



病毒学报  
Chinese Journal of Virology  
ISSN 1000-8721, CN 11-1865/R

## 《病毒学报》网络首发论文

题目： 猴痘病毒蛋白的原核表达及免疫效果评价  
作者： 王雪琛，李涛，杨晓岚，孙娅坤，王慧，王凤雪  
DOI： 10.13242/j.cnki.bingduxuebao.004527  
收稿日期： 2023-12-28  
网络首发日期： 2024-06-04  
引用格式： 王雪琛，李涛，杨晓岚，孙娅坤，王慧，王凤雪. 猴痘病毒蛋白的原核表达及免疫效果评价[J/OL]. 病毒学报.  
<https://doi.org/10.13242/j.cnki.bingduxuebao.004527>



**网络首发：**在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认：**纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

## 猴痘病毒蛋白的原核表达及免疫效果评价

王雪琛<sup>1,2</sup>, 李涛<sup>2</sup>, 杨晓岚<sup>2</sup>, 孙娅坤<sup>2</sup>, 王慧<sup>2</sup>, 王凤雪<sup>1</sup>

(1. 内蒙古农业大学 兽医学院, 农业农村部动物疾病临床诊疗技术重点实验室, 呼和浩特 010018; 2. 军事科学院 军事医学研究院 微生物流行病学研究所 病原微生物生物安全全国重点实验室, 北京 100071)



开放科学  
(OSID)

**摘要:**猴痘是由猴痘病毒引起的一种人兽共患疾病。研发特异性预防和治疗猴痘的疫苗或药物成为目前全球研究重点之一。本研究以猴痘主要抗原蛋白其中的A29L、E8L、M1R为研究基础,加入His标签构建质粒、原核表达、纯化,并对表达蛋白进行SDS-PAGE及Western blot鉴定其特异性。后续将三种抗原蛋白与CpG-ODN 1826单佐剂、铝单佐剂或CpG与铝复合佐剂三次免疫小鼠,通过酶联免疫吸附实验及病毒蚀斑减少中和实验测定三价疫苗的结合抗体和中和抗体能力。结果表明,重组蛋白A29L、E8L、M1R诱导后均可溶性表达且表达量及纯度良好。三价疫苗以CpG-ODN 1826佐剂联合铝佐剂施行肌肉注射一组表现出较好的结合抗体和中和抗体能力。本研究为研发特异性针对猴痘的疫苗或药物提供基础。

**关键词:**猴痘;猴痘病毒;原核表达;蛋白纯化;佐剂

**中图分类号:**S855.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8721(XXXX)XX-0001-07

猴痘(Monkeypox, Mpox)是由猴痘病毒引起的一种人兽共患疾病。1958年猴痘病毒于食蟹猴身上一种类似痘的疾病中分离得到。它同天花病毒(Variola virus, VARV)、痘苗病毒(Vaccinia virus, VACV)、骆驼痘病毒(Camelpox virus, CMPV)和牛痘病毒(Cowpox virus, CPXV)同属痘病毒科,正痘病毒属。猴痘病毒是一种具有包膜的双链DNA病毒。它是约为200~250nm大小的卵圆形或砖型颗粒,被几何波纹状脂蛋白外膜包裹。病毒粒子主要由一个两侧凹陷的核心体、凹陷处两个侧体和脂质蛋白膜共三个部分构成<sup>[1]</sup>。猴痘病毒有两种形态不同的病毒粒子即具有单一外膜的细胞内成熟病毒粒子(Intracellular mature virus, IMV)和具有额外脂质膜和不同蛋白质组成的细胞外包膜病毒粒子(Extracellular enveloped virus, EEV)。EEV通过与肌动蛋白相互作用释放的方式,在宿主内的长距离

传播中是重要的,而IMV在细胞裂解时释放,对于宿主之间的感染传播是必要的<sup>[2]</sup>。在1980年根除天花而停止接种天花疫苗后,随着世界人口不断流通与猴痘病毒毒株的不断变异与进化,病毒在人类中极易倾向于大规模的爆发,感染猴痘的临床表现主要为发热、皮疹、淋巴结肿大等症状。虽然天花疫苗对猴痘病毒具有大约85%保护性,但是接种后可能会产生危及生命的副作用,如:心肌炎、心包炎等。目前没有特异性的针对预防猴痘的疫苗,积极研发预防Mpox的疫苗及抗病毒药物成为研究重点。

猴痘病毒重组蛋白疫苗是选择与猴痘病毒密切相关的主要抗原蛋白并保留其免疫活性成分的一种新型疫苗。本研究主要选择其中三种蛋白原核表达后作为重组疫苗的组成部分,它们分别为:成熟病毒粒子表面蛋白A29L、M1R和E8L。A29L蛋白是IMV形式的表面包膜蛋白,与VACV A27L、CPXV 162蛋白高度同源,在协助EEV释放、催化病毒与宿主细胞融合中起到重要作用,是疫苗研发的关键点之一<sup>[3]</sup>;E8L是IMV形式的囊膜病毒粒子,与VACV蛋白D8L高度同源,在病毒吸附和进入细胞过程中起重要作用;M1R与VACV L1R蛋白高度同源,作为IMV中高度保守的表面膜蛋白,参与病毒颗粒的组装与进入<sup>[4]</sup>。这三种蛋白已被研究证实为重要的中和抗体靶点<sup>[5,6]</sup>。

肌肉注射作为疫苗传统的注射方法较为常见,能迅速触发机体产生特定免疫反应,对病原体建立

**收稿日期:**2023-12-28; **接受日期:**2024-03-05

**基金项目:**内蒙古农业大学青年教师科研能力提升专项(项目编号:BR220113),题目:内蒙地区重要猪病毒病生物制品研发及流行病学调查;内蒙古自治区教育厅“高校青年科技英才”项目(项目编号:NJYT22043);国家重点实验室课题(病原微生物生物安全国家重点实验室开放研究基金资助项目)(项目编号:SKLPBS2204),题目:天花疫苗对猴痘病毒感染的交叉保护作用及免疫应答反应研究

**作者简介:**王雪琛(1999-),女,从事微生物学与免疫学研究, Email:1448731837@qq.com

**\*通讯作者:**王凤雪(1978-),女,副研究员,从事微生物学与免疫学研究, Email:wangfx\_vet@163.com; 王慧(1971-),女,研究员,从事感染免疫与防治研究, Email:geno0109@vip.sina.com

免疫力。滴鼻免疫作为黏膜免疫的一种,可诱导全身产生强烈的体液免疫反应,可以诱导机体产生高滴度 IgG 抗体。而单纯的可溶性抗原经滴鼻免疫很难达到预期免疫效果,必须辅以安全有效的黏膜佐剂以增强免疫应答强度和持续时间。铝佐剂作为一种较早使用的佐剂,已被临床批准用于多种疫苗。由于其接种大多数人后具有的有效性、安全性而被广泛应用。除此之外,铝佐剂通过刺激机体 B 细胞分化,提高产生抗体水平,并激发先天免疫反应。虽然与无佐剂抗原疫苗相比,加入铝佐剂明显提高机体免疫反应,但是与其它佐剂相比,铝佐剂产生的免疫反应相对较弱<sup>[7]</sup>。CpG-ODN 是一种新型的极具应用前景的黏膜免疫增强剂,已被批准用于人类的 TLR9 激动剂免疫增强剂。根据对树突状细胞作用的不同,CpG-ODN 可分为 A、B 和 C 三种类型。其中 B 类 CpG-ODN 中的 CpG-ODN 1826 是一种 TLR9 激动剂,在小鼠模型中可强有效的活化 B 细胞。CpG-ODN 能促进树突状细胞、自然杀伤细胞、淋巴细胞、巨噬细胞等的增值与活化,促进抗体的分泌;间接活化 T 细胞和 NK 细胞等免疫效应细胞,诱导产生以 Th1 型为主的免疫应答反应<sup>[8]</sup>。但 CpG 易在注射部位扩散,导致免疫效力降低。已有研究证实 CpG-ODN 吸附在氢氧化铝上能增强树突状细胞的抗原的摄取与活化,机体迅速产生相应的体液免疫反应和细胞免疫应答<sup>[9]</sup>。Davis 等人研究发现,乙肝抗原 HbsAg 联合 CpG-ODN 及氢氧化铝同时免疫小鼠后,血清抗体效价比单独使用氢氧化铝免疫高 35 倍<sup>[10]</sup>;以 RBD 为目标抗原,结合 CpG 单佐剂、氢氧化铝单佐剂或 CpG 与氢氧化铝复合佐剂免疫小鼠可明显提高和平衡小鼠的细胞免疫反应,并产生对不同 SARS-CoV-2 高滴度的交叉中和抗体<sup>[11]</sup>;Ioannou 等人以兔为研究模型,发现 CpG-ODN 与氢氧化铝佐剂和疫苗共同使用时,能协同增加小鼠的免疫应答<sup>[12]</sup>。CpG 佐剂与铝佐剂均已用于商业许可的疫苗,且在临床和上市研究中获得大量使用安全性数据<sup>[13,14]</sup>。

本研究将猴痘病毒蛋白 A29L 克隆于原核表达质粒 pET-9a, E8L 和 M1R 克隆于原核表达质粒 pET-26b 中,利用 His 标签纯化可溶性蛋白,并将重组 A29L、E8L 和 M1R 蛋白联合 CpG-ODN 单佐剂、铝单佐剂或 CpG 与铝复合佐剂,通过滴鼻免疫或传统肌注免疫的方式免疫 BALB/c 小鼠进行对比,比较三次免疫后收集到血清检测抗原与抗体的结合能力及抗体的中和能力。实验结果表明,该疫

苗和 CpG 与铝复合佐剂并通过肌肉注射免疫小鼠,可诱导小鼠体内产生高水平抗体反应。

## 材料与amp;方法

### 1 基因序列、病毒、细胞及载体

MPox A29L 序列参照 Genbank (YP\_010377135)、MPox E8L 序列参照 Genbank (YP\_010377102)、MPox M1R 序列参照 Genbank (YP\_010377077),质粒合成、测序均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成,大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E.coli*) BL21(DE3)感受态细胞购自北京全式金生物;pET-9a 和 pET-26b 载体均由生工生物工程(上海)股份有限公司提供并合成;Vero E6 细胞、活 VACV 毒株天坛株由军事医学研究院保存。

### 2 主要试剂及实验动物

HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自 Abcom; HisTrap FF 标签蛋白纯化预装柱购自思拓凡(Cytiva); A29L 兔多抗、E8L 鼠单抗、M1R 鼠单抗均购自普健生物;6×Protein Marker 购自北京全式金生物;CpG-ODN 1826、铝佐剂购自 InvivoGen;无菌无酶水、BCA 蛋白试剂盒、透析袋、PBS 磷酸缓冲液粉末、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)粉末、卡那霉素购自北京索莱宝科技有限公司;胎牛血清、1×DMEM、青霉素-链霉素、PBS 缓冲液、胰蛋白酶-EDTA (0.25%) 购自 Gibco; PVDF 膜购自 Millipore; ECL 快速显色液购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司; QuickBlue 快速染胶液购自北京博奥龙免疫技术有限公司; 36 只 16 g~18 g 的 5 周龄的 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,小鼠饲养于军事医学研究院实验动物中心。

### 3 主要仪器

超净工作台、恒温水浴锅、高压蒸汽灭菌锅、电子天平、超声破碎仪、凝胶电泳仪、半干转膜仪、落地离心机、细菌摇床培养箱、AKTA 蛋白纯化仪。

### 4 抗原的原核表达及纯化

根据 Genbank 的基因序列,选取基因,按照大肠杆菌埃希氏菌密码子偏好进行优化,委托上海生工进行人工基因合成,所得三个合成基因均在 C 端添加 6×His 标签,并进行密码子优化。插入 pET-9a 和 pET-26b 表达质粒后分别得到重组表达菌株 pET-9a-A29L、pET-26b-E8L 和 pET-26b-M1R,验证测序结果。

质粒经热激法转入大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞得到重组表达菌株。取所得重组表达菌株涂布于卡那抗性的LB固体培养基上,置于37℃恒温培养箱过夜培养。挑取单个菌落于含有卡那抗性的LB液体培养基中,扩大培养4-5 h。菌液置摇床培养箱培养至 $OD_{600nm} = 0.6$ 左右,加入0.1 mM IPTG诱导蛋白表达。诱导表达后,离心8000 rpm 15 min收集菌体。离心得到的菌体沉淀用含有40 mM咪唑的A液进行冲悬,并用破碎仪破碎后,4℃、8000 rpm、15 min离心分离上清和沉淀。上清经0.22  $\mu$ m滤器真空抽滤后,使用AKTA纯化仪并安装镍柱进行梯度咪唑洗脱、纯化蛋白。

透析袋置于无菌无酶水中煮3次,每次10 min,收集按照40 mM咪唑的A液、400 mM咪唑的B液不同配比洗脱纯化的蛋白置于透析袋中,在2 L的PBS溶液中4℃透析,并分别在2 h、4 h、8 h、16 h后更换透析液。

## 5 抗原的免疫印迹鉴定

将纯化、透析后的A29L、E8L、M1R重组蛋白经SDS-PAGE鉴定后,干转仪设置14V 25 min转移蛋白至PVDF膜上,用5%的脱脂乳室温封闭4 h后,PBST洗涤3次,10 min/次;一抗分别为Monkeypox A29L蛋白兔多克隆抗体(1:2000)、Monkeypox E8L蛋白鼠单克隆抗体(1:3000)和Monkeypox M1R蛋白鼠单克隆抗体(1:3000)全部4℃孵育过夜;一抗回收后,PBST洗涤3次,10 min/次;E8L和M1R与1:5000比例稀释的HRP标记的羊抗鼠的IgG抗体室温孵育1 h;A29L与1:2500比例稀释的HRP标记的羊抗兔的IgG抗体室温孵育1 h;PBST洗涤5次,10 min/次,最后加ECL显色剂A液与B液1:1混合于膜上,凝胶成像仪上显色、拍照。

## 6 重组蛋白联合佐剂免疫小鼠

将5周龄BALB/c雌性小鼠随机分为6组,每组6只。每组使用的A29L、E8L、M1R三种抗原合剂量均20  $\mu$ g。所有小鼠分组在0,14 d,28 d进行PBS滴鼻及肌肉注射免疫、CpG单佐剂、A1单佐剂和CpG与A1复合佐剂的滴鼻免疫、CpG与A1复合佐剂的肌肉注射免疫,共免疫三剂次,其中CpG-ODN 1826免疫剂量为10  $\mu$ g,A1免疫剂量为10  $\mu$ g/mL,免疫疫苗使用剂量均为25  $\mu$ L。

## 7 小鼠血清抗体检测

### 7.1 酶联免疫吸附实验

采集小鼠用包被液稀释至终浓度1  $\mu$ g/mL的

A29L、E8L、M1R蛋白包被96孔酶联板,4℃包被过夜。1×PBST洗板并拍干后,用含有2%牛血清白蛋白(BSA)的TST溶液封闭于37℃培养箱孵育2 h。封闭结束后,1×PBST洗板并拍干。将血清用TST溶液作2倍倍比稀释,同时以对照组小鼠血清作阴性对照,阴性对照设置2个复孔,设置4个空白孔。37℃培养箱孵育1 h后,洗板三次并拍干,按照1:12000稀释比例加入HRP标记的羊抗鼠IgG抗体。37℃培养箱孵育45 min后,洗板三次并拍干,每孔加入TMB单组份显色液显色8~9 min后,加入2 M硫酸终止液终止显色。用酶标仪在 $OD_{450nm}$ 处读取各孔数值,各孔数值减去本底的均值后,大于阴性对照孔数值均值的2.1倍所在最大稀释倍数视作血清抗体效价(Endpoint IgG titer)。通过GraphPad Prism 8.3.0软件中六参数柱状图表示血清结合抗体滴度。

### 7.2 病毒蚀斑减少中和实验

三免后小鼠血清在56℃中灭活30 min。血清用2% DMEM(含2%胎牛血清)2倍倍比稀释,每个样本均设置病毒阳性对照。稀释不同倍数的血清与活病毒VACV天坛株(100 PFU)以总体积1:1比例混合加入不同稀释倍数的血清中,37℃培养箱中孵育1 h。病毒与血清混合液再加入长满单层的Vero E6细胞中,置于37℃培养箱中作用2 h。每孔加入2%低熔点琼脂糖,待琼脂凝固后放回培养箱。

培养3 d后各孔用4%多聚甲醛固定,流水冲洗掉琼脂糖盖后,用1%结晶紫染色液染色各孔。根据菌斑数量进行计数并使用Reed-Munch方法,中和抗体滴度为能导致病毒斑块数减少50%的最高血清稀释度(PRNT 50)。通过GraphPad Prism 8.3.0软件中六参数柱状图表示血清中和抗体滴度。

所有数据均使用GraphPad Prism 8.3.0软件中Analysis的t test (and nonparametric tests)两组比较分析。使用nonparametric和Mann-Whitney test检验进行组间差异分析。如果 $P < 0.05$ ,则认为差异显著。

## 结 果

### 1 Mpx重组蛋白的SDS-PAGE鉴定及Western blot验证

所得重组菌经IPTG诱导并纯化后,均可获得较高产量及较高纯度的目的蛋白。诱导pET-9a-

A29L表达的蛋白大小约为14.6 kDa、pET-26b-E8L表达的蛋白大小约为29.6 kDa、pET-26b-M1R表达的蛋白大小约为25.5 kDa(如图1A),与预期的重组蛋白大小一致。免疫印迹结果显示A29L、E8L和

M1R特异性条带均能分别被Mpx的A29L多克隆抗体、E8L和M1R单克隆抗体特异性识别(图1B,图1C,图1D)。

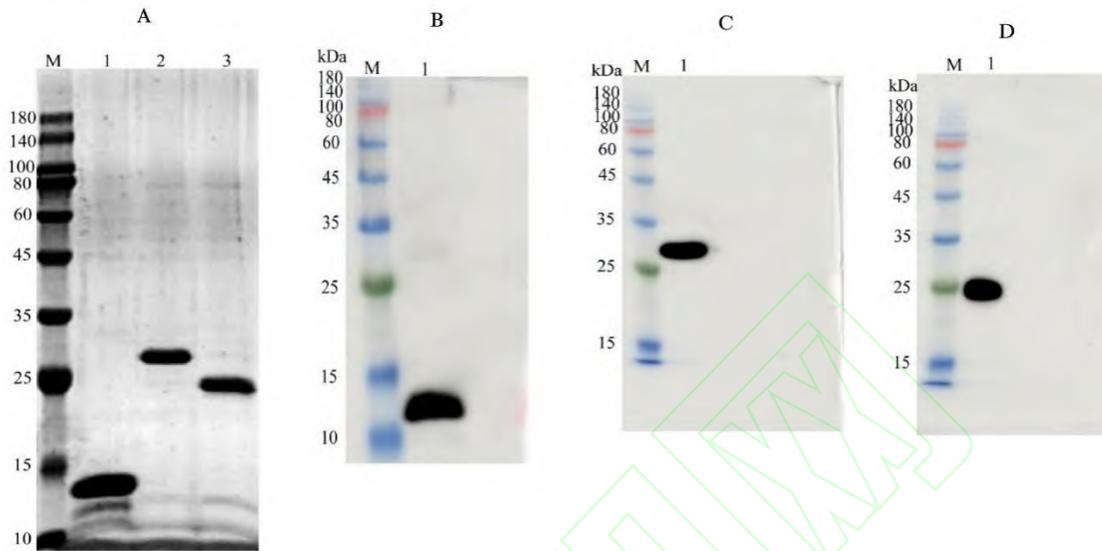


图1 Mpx重组蛋白的表达与纯度验证

注:M. 蛋白Marker (10-180 kDa); A1. A29L蛋白; A2. E8L蛋白; A3. M1R蛋白; B1. A29L蛋白; C1. E8L蛋白; D1. M1R蛋白。

Figure 1 Expression and purity of the recombinant protein of Mpx

Notes:M. Protein marker (10 - 180 kDa); A1. A29L protein; A2. E8L protein; A3. M1R protein; B1. A29L protein; C1. E8L protein; D1. M1R protein.

## 2 小鼠血清IgG效价与中和抗体检测结果

为了研究重组蛋白A29L、E8L、M1R三价疫苗结合不同的佐剂、采取不同的免疫途径免疫各组小鼠后,小鼠产生的结合抗体水平的能力,取小鼠血清进行Elisa检测。以A29L、E8L、M1R为抗原包被的酶联板上首孔稀释三免后的小鼠血清后,往后各孔按照2倍比稀释血清。结果如图2A、图2B、图2C可见,第三次免疫小鼠后,四个免疫组均具有较高的结合抗体水平,其中铝佐剂联合CpG佐剂肌肉注射免疫小鼠组IgG抗体水平最高,超过 $10^5$ ;铝佐剂联合CpG佐剂肌肉注射免疫小鼠组的特异性结合抗体能力水平均高于这两种佐剂的滴鼻组且有统计学差异( $P < 0.05$ )。

为了研究重组蛋白A29L、E8L、M1R三价疫苗结合不同的佐剂、采取不同的免疫途径对三次免疫后的小鼠的病毒中和能力水平进行评估,因此进行活痘病毒中和实验。结果如图2D显示,四组免疫组均产生结合抗体,其中CpG佐剂联合铝佐剂滴鼻组的中和抗体水平高于单CpG佐剂滴鼻组(GMT: 188.6)(无统计学意义)或单铝佐剂滴鼻组(GMT: 141.4)(有统计学意义, $P < 0.05$ ),说明联合佐剂的

滴鼻免疫效果高于单佐剂滴鼻免疫;CpG佐剂联合铝佐剂肌肉注射小鼠组中和抗体水平最高(GMT: 503.9),显著高于CpG佐剂联合铝佐剂滴鼻组(GMT: 317.4)(无统计学意义),说明联合佐剂的肌肉注射免疫效果高于滴鼻免疫。

## 讨论

猴痘病毒基因组由一种长约197 kb线性双链DNA组成,共编码200余种蛋白,其中研究主要集中在IMV和EEV两种形态不同的病毒粒子的膜上和包膜上的蛋白质靶点。由于IMV和EEV膜蛋白的组成不同,在设计与研发亚单位疫苗时要加以考虑,确保疫苗效力对这两种感染方式的病毒都起到免疫效果。A29L是IMV形式的细胞表面包膜蛋白,是IMV转运和导致IEV形成的包膜过程所必需<sup>[15]</sup>,开发靶向猴痘病毒A29L蛋白的疫苗可干扰病毒在宿主细胞表面的黏附。E8L是IMV形式的膜蛋白,对于病毒粒子附着在细胞表面的过程至关重要,同时,E8L可激活树突状细胞并诱导细胞因子IL-12p70、IL-10、TNF- $\alpha$ 和IL-6的分泌<sup>[16]</sup>。E8L这

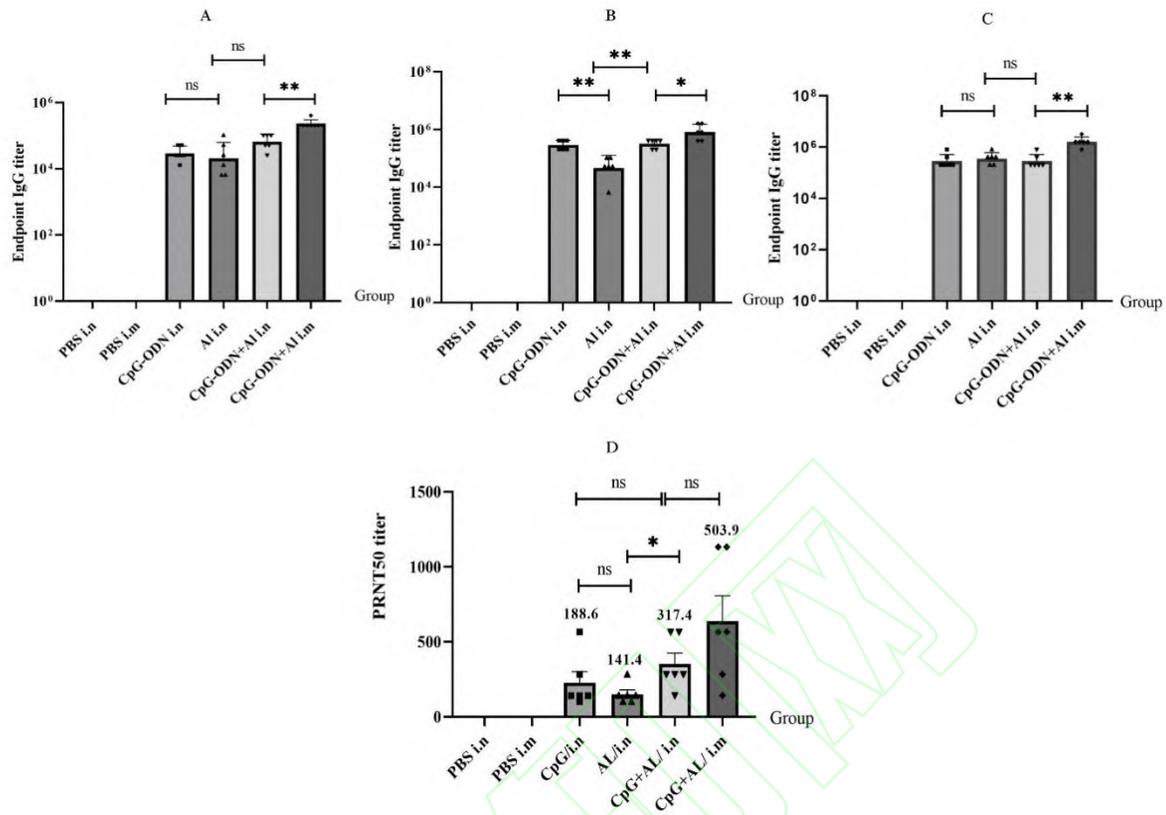


图2 小鼠三免后血清IgG与中和抗体检测

注:A. 包被 A29L 抗原蛋白;B. 包被 E8L 抗原蛋白;C. 包被 M1R 抗原蛋白;D. 小鼠三免血清中和实验结果;各使用佐剂免疫组的抗原均为 A29L、E8L、M1R,共 20  $\mu$ g;误差线表示平均值 $\pm$ 标准差;在显著性水平  $\alpha=0.05$  下,\*表示  $P < 0.05$ ;\*\*表示  $P < 0.01$ 。

Figure 2 Detection of serum levels of IgG and neutralizing antibody in mice after three immunizations

Notes:A. Coated A29L antigen protein; B. Coated E8L antigen protein; C. Coated M1R antigen protein; D. Results of the third immune serum neutralization test in mice; The antigens of each adjuvant immunization group were A29L, E8L and M1R, a total of 20  $\mu$ g; The error bar represents the mean  $\pm$  standard deviation; At a significance level of  $\alpha = 0.05$ , \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

些特性使得 Mpox 疫苗可以产生有效的中和抗体。M1R 是 IMV 形式的表面膜蛋白,可溶形式的 M1R 可在病毒吸附过程中阻断病毒进入,且抗 M1R 的单克隆抗体能通过独立于细胞表面蛋白聚糖的机制阻断病毒进入<sup>[17]</sup>。Ding Tang 等人证明多种重组疫苗触发针对 IMV 和 EEV 形式的 MPXV 的抗体,其诱导的中和抗体充分抑制了病毒的繁殖,同时保护小鼠免受猴痘病毒的持续感染<sup>[18]</sup>。这说明了单个抗原免疫并不能完全保护小鼠免受病毒感染,因为它们产生的抗体可能只作用于病毒感染的其中一个阶段,所以 MPox 多个抗原组成的重组蛋白疫苗免疫效力优于单个抗原疫苗免疫效果。此外,蛋白尽可能地在血清中可溶性表达,以保证蛋白保存的稳定性和后续免疫原性。因此,选择 A29L、E8L、M1R 这三种蛋白组成疫苗探究小鼠免疫效果。

本研究将猴痘病毒抗原蛋白 A29L、E8L、M1R 三种基因序列按照大肠杆菌埃希氏菌密码子偏好进

行优化,合成质粒后克隆到 pET-9a 和 pET-26b 进行原核表达,经镍柱分别纯化出大小约 14.6 kDa、29.6 kDa、25.5 kDa 的蛋白。SDS-PAGE 与 Western blot 鉴定确定为目的蛋白,表明抗原特异性良好。联合 CpG 佐剂与铝佐剂以滴鼻或肌肉注射免疫小鼠。经三次免疫后,采取小鼠血清,分析小鼠体内结合抗体水平和中和抗体能力。正如 Xuetao Yang 等人研究结果一样,本研究可以看出,与单佐剂相比,CpG 与铝复合佐剂进行肌肉注射具有明显的免疫增强作用,能显著提高小鼠体液免疫反应(产生中和抗体水平比复合佐剂滴鼻组高约 1.58 倍)。这说明 CpG 吸附在氢氧化铝上显著增强了树突状细胞依赖的记忆 T 细胞活化<sup>[19]</sup>,增强树突状细胞的抗原的摄取与活化,机体迅速产生相应的体液免疫反应和细胞免疫应答。然而本实验仍存在一些局限性。首先,由于每一组小鼠只数较少,实验总个体数量较少,且小鼠个体差异比较大而导致 CpG 佐剂联合铝佐剂肌

肉注射小鼠组与 CpG 佐剂联合铝佐剂滴鼻组的中和抗体相比无统计学差异;其次,进一步评估该疫苗的免疫原性及免疫效力还需基于灵长类动物等其它实验动物上进行;最后,原核表达的蛋白可能不如在真核细胞中表达,能具有正确的折叠和翻译后修饰,如糖基化等,正确修饰将有助于提高细胞免疫反应,但是从 SDS-PAGE 和 Western Blot 的鉴定中表明,这三种原核表达的蛋白仍保持良好的抗原性。综上所述,本试验表明重组蛋白 A29L、E8L、M1R 配伍 CpG 佐剂与铝佐剂组成的疫苗,对小鼠肌肉注射免疫后可在其体内诱导产生高水平的抗体反应,对日后研发特异性针对猴痘的疫苗或药物设计具有借鉴意义。

#### 伦理审批声明

本文所有动物实验操作已通过军事医学研究院微生物流行病学研究所动物福利伦理审查,获批日期为 2022.12.27,伦理审批编号为 IACUC-DWZX-2022-070。

#### 作者贡献声明

**王雪琛**:方法设计、实验操作、数据管理、可视化、初稿写作、形式分析;**李涛**:方法设计、获取资助、审查和编辑写作;**杨晓岚**:方法设计、实验操作、提供资源、审查和编辑写作;**孙娅坤**:提供资源、初稿写作;**王慧**:监督指导、获取资助;**王凤雷**:初稿写作、获取资助。

#### 作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

#### 参考文献:

- [1] Odom M R, Hendrickson R C, Lefkowitz E J. Poxvirus protein evolution: family wide assessment of possible horizontal gene transfer events[J]. *Virus Res*, 2009, 144 (1-2):233-249. DOI: 10.1016/j.virusres.2009.05.006.
- [2] Ichihashi Y. Extracellular enveloped Vaccinia virus escapes neutralization[J]. *Virology*, 1996, 217(2):478-485. DOI: 10.1006/viro.1996.0142.
- [3] 石建州,王国川,王彦伟,等.猴痘病毒研究进展[J].*病毒学报*, 2022, 38(05):1195-1205. DOI: 10.13242/j.cnki.bingduxuebao.004188.
- [4] Fang M, Cheng H, Dai Z, et al. Immunization with a single extracellular enveloped virus protein produced in bacteria provides partial protection from a lethal orthopoxvirus infection in a natural host[J]. *Virology*, 2006, 345 (1) : 231 - 243. DOI: 10.1016/j.virol.2005.09.056.
- [5] Shchelkunov S N, Totmenin A V, Safronov P F, et al. Analysis of the monkeypox virus genome[J]. *Virology*, 2002, 297(2):172-194. DOI: 10.1006/viro.2002.1446.
- [6] Papukashvili D, Rcheulishvili N, Liu C, et al. Strategy of developing nucleic acid-based universal monkeypox vaccine candidates [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1050309. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1050309.
- [7] Akache B, Stark F C, Jia Y, et al. Sulfated archaeol glycolipids: Comparison with other immunological adjuvants in mice [J/OL]. *PLoS One*, 2018, 13(12): e0208067. DOI: 10.1371/journal.pone.0208067.
- [8] 张庆勇,罗春华,朱武飞. CpG-ODN 疫苗佐剂的研究进展[J]. *中国免疫学杂志*, 2014, 30(10): 1416-1418. DOI:10.3969/j.issn.1000-484X.2014.10.027.
- [9] Lu F, Mosley Y C, Carmichael B, et al, HogenEsch H. Formulation of aluminum hydroxide adjuvant with TLR agonists poly (I: C) and CpG enhances the magnitude and avidity of the humoral immune response [J]. *Vaccine*, 2019, 37(14):1945-1953. DOI:10.1016/j.vaccine.2019.02.033.
- [10] Davis H L, Weeratna R, Waldschmidt T J, et al. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen [published correction appears in *J Immunol* 1999 Mar 1, 162(5):3103. Weeranta R [corrected to Weeratna R]] [J]. *J Immunol*, 1998, 160(2):870-876.
- [11] 任虎,何远薇,张亚楠,等. CpG 联合铝佐剂增强 RBD-Fc 重组蛋白诱导小鼠免疫反应效果的研究[J]. *病毒学报*, 2023, 39(06): 1549-1560. DOI:10.13242/j.cnki.bingduxuebao.004412.
- [12] Ioannou X P, Gomis S M, Hecker R, et al. Safety and efficacy of CpG - containing oligodeoxynucleotides as immunological adjuvants in rabbits [J]. *Vaccine*, 2003, 21(27-30):4368-4372. DOI:10.1016/s0264-410x(03)00437-7.
- [13] Bravo L, Smolenov I, Han H H, et al. Efficacy of the adjuvanted subunit protein COVID-19 vaccine, SCB-2019: a phase 2 and 3 multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial [J]. *Lancet*, 2022, 399(10323):461-472. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)00055-1.
- [14] Campbell J D. Development of the CpG Adjuvant 1018: A Case Study [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1494:15-27. DOI:10.1007/978-1-4939-6445-1\_2.
- [15] Sanderson C M, Hollinshead M, Smith G L. The vaccinia virus A27L protein is needed for the microtubule-dependent transport of intracellular mature virus particles [J]. *J Gen Virol*, 2000, 81(Pt 1):47-58. DOI: 10.1099/0022-1317-81-1-47.
- [16] Agrawal S, Gupta S, Agrawal A. Vaccinia virus proteins activate human dendritic cells to induce T cell

- responses in vitro [J]. *Vaccine*, 2009, 27 (1) : 88-92. DOI:10.1016/j.vaccine.2008.10.031.
- [17] Foo C H, Lou H, Whitbeck J C, et al. Vaccinia virus L1 binds to cell surfaces and blocks virus entry independently of glycosaminoglycans [J]. *Virology*, 2009, 385 (2) : 368 - 382. DOI: 10.1016/j.virol.2008.12.019.
- [18] Tang D, Liu X, Lu J, et al. Recombinant proteins A29L, M1R, A35R, and B6R vaccination protects mice from mpox virus challenge [J]. *Front Immunol*. 2023, 14: 1203410. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1203410.
- [19] Yang X, Yang X, Du S, et al. A Subunit Vaccine Candidate Composed of Mpox Virus A29L, M1R, A35R, and B6R Elicits Robust Immune Response in Mice. *Vaccines (Basel)* [J]. 2023; 11 (9) : 1420. DOI: 10.3390/vaccines11091420.

## Prokaryotic Expression and Evaluation of the Immune Effect of the Proteins of the Monkeypox Virus

WANG Xuechen<sup>1,2</sup>, LI Tao<sup>2</sup>, YANG Xiaolan<sup>2</sup>, SUN Yakun<sup>2</sup>, WANG Hui<sup>2\*</sup>, WANG Fengxue<sup>1\*</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Key Laboratory for Clinical Diagnosis and Treatment of Animal Diseases of Ministry of Agriculture, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China; 2. State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medicine, Academy of Military Sciences, Beijing 100071, China)

**Abstract:** Monkeypox is a zoonotic disease caused by infection with the monkeypox virus. The development of vaccines/drugs that prevent and treat monkeypox specifically has become a global research priority. In this study, A29L, E8L, and M1R, as the main antigen proteins of monkeypox, were used as the research subjects. A His tag was added to construct plasmids as well as to aid their prokaryotic expression and purification. The expressed protein was identified by sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis and western blotting. Subsequently, mice were immunized with these three antigen proteins combined with the adjuvant CpG-ODN 1826 or Al adjuvant. The ability to bind antibody and bind neutralizing antibody of the trivalent vaccine was determined by enzyme-linked immunosorbent assay and virus plaque reduction neutralization assay. The recombinant proteins A29L, E8L, and M1R were expressed in soluble form after induction, and the expression and purity were high. An intramuscular injection of a trivalent vaccine with CpG-ODN 1826 adjuvant combined with Al adjuvant showed a high ability to bind antibody and bind neutralizing antibody. This study provides a basis for the development of vaccines/drugs that target monkeypox specifically.

**Keywords:** Monkeypox; Monkeypox virus; Prokaryotic expression; Protein purification; Adjuvant

*Funding:* This work was funded by the Inner Mongolia Agricultural University Young Teachers Research Ability Promotion Project (BR220113; "Epidemiological investigation of important pig virus diseases in Inner Mongolia and development of biological products"), Education Department of Inner Mongolia Autonomous Region "Young scientific and technological talents in universities" (NJYT22043), and State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity (Academy of Military Medical Science) (SKLPBS2204; "Cross-protection and immune response of smallpox vaccine against monkeypox virus infection").

\* Corresponding authors : WANG Fengxue, Email: wangfx\_vet@163.com; WANG Hui, Email: geno0109@vip.sina.com

引用本文: 王雪琛,李涛,杨晓岚等.猴痘病毒蛋白的原核表达及免疫效果评价[J].病毒学报,XXXX,XX(X): 1-7.

WANG Xuechen, LI Tao, YANG Xiaolan, et al. Prokaryotic Expression and Evaluation of the Immune Effect of the Proteins of the Monkeypox Virus[J]. *Chin J Virol*, XXXX, XX(X): 1-7.