[文章编号] 1003－4684(2026)02-0100-05

猴痘病毒膜蛋白 L1R 胞外域三聚体化的免疫应答

刘 美[1]，任鑫鑫[1]，周金虎[2]，邓 爽[2]，许 雁[2,3]，
Normand Jolicoeur[2]，胡 翰[1,2]，汪 洋[1,2]，刘滨磊[1,2]

(1 湖北工业大学生物工程与食品学院，湖北 武汉 430068；2 武汉滨会生物科技股份有限公司，湖北 鄂州 436000；
3 诺华生物科技(武汉)有限责任公司，湖北 武汉 430073)

[摘 要] 猴痘疫病是由猴痘病毒感染所致的一种病毒性人兽共患病，病毒传播较快。使用 Trimer Domain(TD)将病毒膜蛋白 L1R(185t)三聚体化修饰，通过电转染 CHO 细胞进行蛋白表达，纯化后蛋白纯度为 99.1%。采用昆虫杆状病毒表达系统病毒膜蛋白 L1R(185t)-6×His，将其作为 ELISA 检测抗体滴度的抗原。体内实验中，对 C57BL/6 小鼠进行肌肉注射三聚体化病毒膜蛋白 L1R(185t)。二次免疫后，小鼠血清中抗 L1R(185t)蛋白的特异性 IgG 抗体水平为 6.4×10^5，三次免疫后抗体水平为 1.1264×10^7，两者相比存在显著性差异。采用 ELISpot 法检测免疫后第 54 天小鼠脾脏中 IFN-γ 的表达水平，结果显示免疫组平均斑点数为 102，与空白组相比存在显著性差异。研究表明，将猴痘病毒膜蛋白 L1R 胞外域进行三聚体化修饰，能够有效刺激小鼠产生免疫应答，对后续猴痘病毒相关研究具有重要意义。

[关键词] 猴痘病毒；膜蛋白 L1R(185t)；CHO 细胞；三聚体结构域
[中图分类号]R373.1 [文献标识码] A

猴痘病毒是一种有包膜的双链 DNA 病毒，属于痘病毒科。其临床表现与天花、牛痘相似，病死率为 1%～10%[1]。目前已知的治疗方法有疫苗接种、化学药物、中和抗体和临床对症治疗。由于猴痘病毒与天花病毒具有相似的抗原性，天花疫苗也可为猴痘的预防提供高达 85%的保护率[2]。当前储存的天花疫苗主要有第二代减毒复制活疫苗 ACAM2000 和第三代复制缺陷型减毒疫苗 JYNNEOS。化学药物治疗包括 Cidofovir、Brincidofovir、Tecovirimat 等。这些药物虽然获得监管机构的批准，抗猴痘功效尚未在随机或非随机临床试验中得到验证[3]。研究表明，“二合一”的猴痘病毒重组蛋白疫苗-DAM，通过抗原结构指导的多表位嵌合策略，对猴痘病毒的中和能力是传统减毒活疫苗的 28 倍[4]。病毒膜蛋白 L1R 是细胞内成熟病毒粒子(IMV)膜上的肉豆蔻酰化成分，在于病毒感染后期合成[5-6]。阻断病毒膜蛋白 L1R 的表达会中止病毒形态发生和减少 DNA 与病毒的结合[7]。Ichihashi 等研究发现，单克隆抗体 2D5 可阻止病毒穿透并与病毒膜蛋白 L1R 编码的 VP23-29K 发生反应，从而中和疫苗病毒，表明病毒膜蛋白 L1R 是作为疫苗中和病毒的主要靶标[8]。然而天然膜蛋白存在含量低、纯化困难等问题，且蛋白的错误折叠和聚集也使其无法在细胞中实现过量表达[9]。病毒膜蛋白 L1R(185t)作为截短型 L1R，以单体形式分泌，其分子内含有三个二硫键。研究发现，病毒膜蛋白 L1R(185t)能在致死剂量攻击中保护小鼠[10]，有可能成为候选亚单位疫苗的一个组成部分。三聚体蛋白是一类由三个亚基结合而成的蛋白质复合物，在生物体内具有多种重要的生物学功能。将蛋白构建成三聚体结构能使其具有更高的稳定性，可抵抗外部环境的变化和内部酶的降解，从而保持其功能的持久性，还能够更有效地刺激免疫系统，产生更强的免疫应答，诱导高水平的中和抗体，更有利于暴露更多的抗原表位，使得免疫系统更容易识别和攻击病原体。研究表明，将蛋白组装成三聚体结构作为抗原更接近天然构象，且具有更好的稳定性和更高的效价[11]。本研究旨在构建 L1R(185t)-TD 三聚体蛋白，评估其免疫原性，为猴痘病毒疫苗研发提供实验依据。

1 实验材料

1.1 菌株、细胞和实验动物

大肠杆菌 TOP10、中国仓鼠卵巢细胞 CHO-

[收稿日期] 2024－01－18
[第一作者] 刘 美(1999－)，女，湖南常德人，湖北工业大学硕士研究生，研究方向为微生物与生化药学。
[通信作者] 刘滨磊(1962－)，男，湖北武汉人，湖北工业大学教授，研究方向为生物制药。

K1、草地贪夜蛾细胞 Sf9 均为本实验室保存；SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠(6～8 周龄)购自湖北省实验动物研究中心。

1.2　主要试剂

L1R(185t)基因序列来源于 US7560116B2；pcDNA3.4-L1R(185t)质粒由南京金斯瑞生物科技有限公司制备；pEE12.4 质粒、抗 TD 三聚体化结构域单克隆抗体(TD-Ab)、质粒提取试剂盒和 DNA marker 由本实验室提供；*Hind III*、*Xma I*、*BamH I* 内切酶购自 BioLabs；170 kDa 蛋白 Marker、快速银染试剂盒购自碧云天；ECL 化学发光底物试剂盒购自 Biosharp；IB905 培养基购自壹生科；SF-900TMIII 培养基、Dynamis 培养基、L-Glutamine 购自 Gibco；山羊抗兔 IgG、山羊抗小鼠 IgG、抗 6×His 标签抗体购自 Proteintech；NHS 激活的 Sepharose 4 FastFlow 填料购自 Cytiva；Ni-NTA Purose 6 FastFlow 购自千纯；氢氧化铝购自 CRODA；CpG 1080 购自通用生物；L-蛋氨酸亚砜酰亚胺(MSX)购自 Sigma。

2　实验方法

2.1　构建 L1R(185t)-TD 蛋白和 L1R(185t)-6×His 蛋白表达载体

由南京金斯瑞合成 pcDNA3.4-L1R(185t)-TD 质粒，以 pcDNA3.4-L1R(185t)-TD 质粒为模板，设计带 His 标签的下游引物，PCR 得到 L1R(185t)-6×His 产物。*Hind III*、*Xma I* 内切酶酶切 pcDNA3.4-L1R(185t)-TD 质粒和 pEE12.4 空载，*Hind III*、*BamH I* 内切酶酶切 L1R(185t)-6×His 和 pFastBac1 载体，T4 连接酶连接，获得 pEE12.4-L1R(185t)-TD 质粒和 pFastBac1-L1R(185t)-6×His 质粒，将 pFastBac1-L1R(185t)-6×His 质粒转化进 DH10Bac 感受态细胞中，得到重组质粒 Bacmid-L1R(185t)-6×His。取质粒 PCR 后的产物送去测序。

表 1　PCR 相关引物序列

引物名称	序列
L1R-PFB-BamHI-F	5'-CAAGGATCCGCCACCATGCCTCTGCTGCTG-3'
L1R-PFB-HIII-His-R	5'-CTCAAGCTTTTAGTGATGGTGATGGTGATGTTGAACACCTGTTCCGGC-3'

2.2　制备 L1R(185t)-TD 蛋白和 L1R(185t)-6×His 蛋白

pEE12.4-L1R(185t)-TD 质粒电转染 CHO-K1 细胞，48 h 后取细胞铺 24 孔板，通过谷氨酰胺筛选系统筛选细胞池。使用 TD-Ab 作为一抗，稀释比例 1∶1000，DotBblot 筛选出蛋白高表达量的细胞池；将孔板内选中的细胞池扩大培养至 30 mL 后进行补料分批培养(Fed-batch)，间隔 24 h 补料一次，补料 4 次后离心取细胞上清。用 PEI Max 将重组质粒 Bacmid-L1R(185t)-6×His 转染进 Sf9 细胞，收获病毒上清后感染 Sf9 细胞表达 L1R(185t)-6×His 蛋白，当细胞活率为 60%时收获取细胞上清。Western Blot 检测细胞上清中的蛋白表达含量。一抗来源于实验室自制 TD-Ab，抗体比例 1∶1000。二抗来源于 Proteintech 的山羊抗兔 IgG，抗体比例 1∶2000。

2.3　纯化 L1R(185t)-TD 蛋白和 L1R(185t)-6×His 蛋白

纯化 L1R(185t)-TD 蛋白使用本实验自制的 TDAb-NHS 亲和层析填料。1×PBS 平衡纯化柱，手动将蛋白上清与填料结合，1×PBS 洗杂，0.1 mol/L 甘氨酸(pH＝3.0)洗脱 L1R(185t)-TD 蛋白，加入 0.5 mol/L 磷酸氢二钠中和 pH 值。纯化 L1R(185t)-6×His 蛋白使用 Ni-TED Purose 6 Fast Flow 填料。平衡缓冲液平衡纯化柱，填料与蛋白结合后用冲洗缓冲液洗杂，洗脱缓冲液洗脱 L1R(185t)-6×His 蛋白。银染检测纯化后的蛋白。

2.4　SEC-HPLC 检测纯化的 L1R(185t)-TD 蛋白

使用带有分析型 SRT SEC-300 色谱柱的 Shimadzu LC-2030 HPLC，通过尺寸排阻色谱法(SEC-HPLC)分析纯化后的 L1R(185t)-TD 蛋白。取 600 μL 浓度为 0.2 mg/mL 的蛋白作为检测样品，蛋白磷酸盐缓冲液(PBS)用作流动相，OD 280 nm，检测时间为 20 min，流速为 1 mL/min，检测蛋白纯度。

2.5　L1R(185t)-TD 蛋白的免疫原性检测

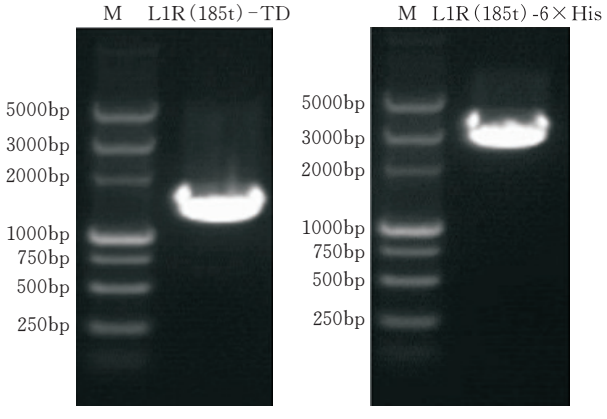
取 10 只 C57BL/6 小鼠随机分为两组。空白组注射 PBS，免疫组注射 L1R(185t)-TD 蛋白疫苗(每剂含 10 μg L1R(185t)-TD 蛋白＋375 μg 氢氧化铝＋750 μg CpG1018)。注射方式为腿部肌肉注射。免疫组每只小鼠共免疫 3 针(第 0 天、14 天、28 天)，在第 21 天和 38 天通过眼眶采血收集免疫小鼠的血清。ELISA 检测特异性 IgG 抗体终点 Geometric Mean Titer(GMT)：取包被液稀释 L1R(185t)-6×His 蛋白原液，将待测血清分为 8 个梯度，从 8×10^4 依次两倍稀释，同时做两个复孔平行，HRP-Goat Anti-Mouse IgG(1∶2000)37℃室温孵育 1 h，TMB 溶液显色，酶标仪测量 450 nm 的吸光度值。第 54 天通过颈脱位处死小鼠，ELISpot 检测小鼠脾脏中

IFN-γ的表达水平：脾细胞密度为 5×10^5/孔，L1R(185t)-TD 蛋白浓度为 5 μg/孔，混合后在 37℃下孵育 48 h。1×Biotinylated Antibody 室温孵育 1 h，1×Streptavidin-HRP 室温孵育 1 h，AEC 显色液显色，ELISpot 检测系统分析孔板内斑点生成情况。采用 GraphPad Prism 8.0.1 进行统计分析。

3 结果

3.1 检测 L1R(185t)-TD 蛋白和 L1R(185t)-6×His 蛋白表达载体的目的基因

L1R(185t)-TD 基因序列全长 819 bp，PCR 扩增大小为 1269 bp，L1R(185t)-6×His 基因序列全长 621 bp，使用载体通用引物扩增载体大小在 2000 bp左右。PCR 扩增 L1R(185t)-TD 基因结果如图 1a 所示，条带在 1000 bp 左右，符合理论大小；PCR 扩增 L1R(185t)-6×His 基因如图 1b 所示，条带在 3000 bp 左右，大小与预期相符。测序结果显示目的基因序列与设计合成的序列一致，表明质粒构建成功。



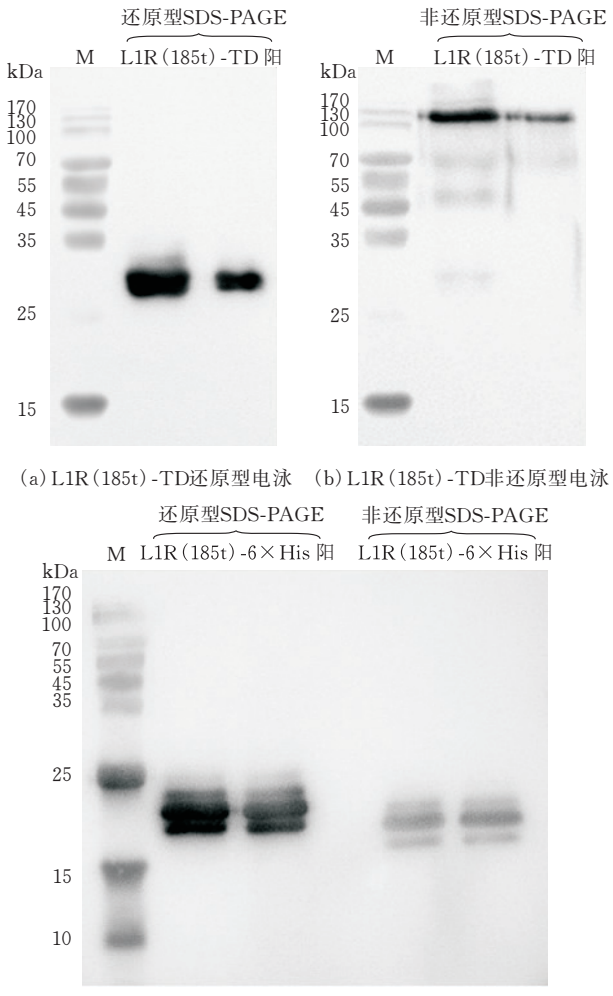
(a) L1R(185t)-TD基因 (b) L1R(185t)-6×His基因

M：DL 5000 Marker

图 1 PCR 扩增 L1R(185t)-TD 和 L1R(185t)-6×His 基因的电泳

3.2 检测 L1R(185t)-TD 蛋白和 L1R(185t)-6×His 蛋白的表达

Western Blot 检测蛋白上清，银染检测纯化后的蛋白。L1R(185t)-TD 蛋白单体大小为 29.9 kDa。如图 2a、图 2b、图 3a、图 3b 所示：在还原条件下蛋白为单体结构，30 kDa 处有目的条带；在非还原条件下蛋白为三聚体结构，100 kDa 处有目的条带。由于糖基化等原因，蛋白条带大小会大于其预测值。L1R(185t)-6×His 蛋白大小为22 kDa。如图 2c、图 3c、图 3d 所示，蛋白在还原与非还原条件下均为单体结构，25 kDa 处有目的条带，符合目的蛋白预期的条带大小。



(a) L1R(185t)-TD还原型电泳 (b) L1R(185t)-TD非还原型电泳

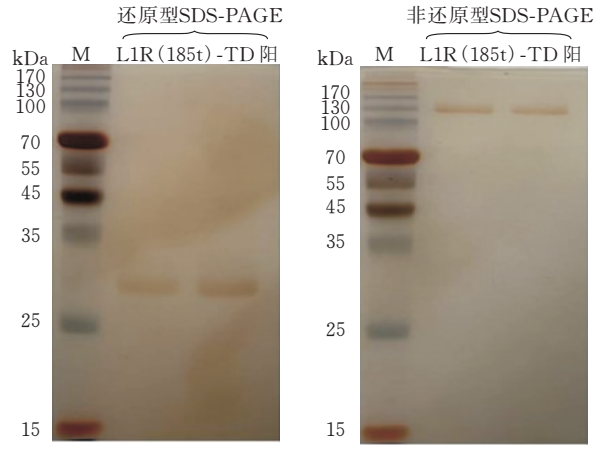
(c) L1R(185t)-6×His还原型电泳和非还原型电泳

M：170kDa Marker

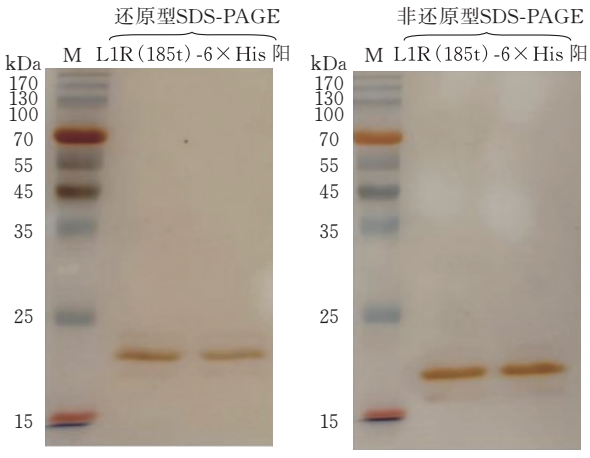
图 2 Western Blot 检测 L1R(185t)-TD 和 L1R(185t)-6×His 蛋白电泳

3.3 SEC-HPLC 检测纯化的 L1R(185t)-TD 蛋白

对纯化后的 L1R(185t)-TD 蛋白进行 SEC-HPLC 检测。如图 4 所示，在 800 kDa 附近出现纯度＞99%的主峰，主峰为 L1R(185t)-TD 蛋白，通过计算面积比得出其纯度为 99.10%，同时无明显聚集体或降解条带。



(a) L1R(185t)-TD还原型电泳 (b) L1R(185t)-TD非还原型电泳



(c) L1R(185t)-6×His 还原型电泳　(d) L1R(185t)-6×His 非还原型电泳

M:170kDa Marker

图 3　银染检测纯化后的 L1R(185t)-TD 和 L1R(185t)-6×His 蛋白电泳

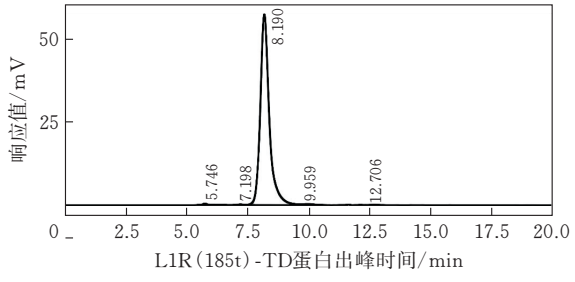
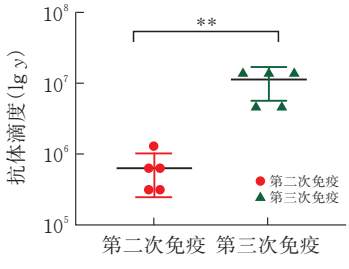


图 4　L1R(185t)-TD 蛋白纯化后的高效液相色谱

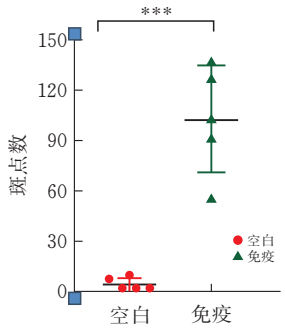
3.4　L1R(185t)-TD 蛋白疫苗的免疫效果

IgG 终点 GMT 定义为空白组血清平均 OD 值加上 3 倍标准差的 OD 值。如图 5 所示，第二次免疫后的抗体 GMT 滴度达到了 6.4×10^5，第三次免疫后的抗体 GMT 滴度达到了 1.1264×10^7。通过统计学方法分析，两次免疫所产生的抗体效价具有显著性差异。在免疫组的脾细胞中测量 Th1 反应。如图 6 所示，免疫组小鼠脾细胞中产生的斑点数为 102 SFC/well。与空白组相比，免疫组所产生的斑点数有显著性差异。结果表明，三聚体化的病毒膜蛋白 L1R(185t)促进了 C57BL/6 小鼠中 Th1 细胞的发育和活化。



统计方法：t 检验；显著性水平($P<0.05$)

图 5　L1R(185t)-TD 蛋白的抗体效价



统计方法：t 检验；显著性水平($P<0.05$)

图 6　L1R(185t)-TD 蛋白的细胞因子表达水平

4　讨论

单体蛋白结构简单、稳定，易于生产和纯化，但可能缺乏某些由多个亚基相互作用所产生的复杂功能。其次，单体蛋白的稳定性可能较低，容易受到环境因素的影响而发生变性或降解。DAM 蛋白疫苗激发针对两种抗原的特异性抗体水平均高于两种抗原混合免疫，实现了“1＋1＞2”的效果，但是数据仍局限于动物模型，尚不明确的“脱靶效应”与长期安全性是潜在危险。三聚体蛋白不仅可以维持蛋白的天然结构、保持蛋白的稳定性，由其研发的疫苗也具有较强的免疫原性，可诱导高水平的中和抗体[12]。但是因其结构相对复杂，给生产和纯化带来了一定挑战。目前研发的“S-三聚体”重组亚单位新冠疫苗候选疫苗(代号 SCB-2019)已经获批使用[13]。本研究将三聚体化的猴痘病毒膜蛋白 L1R(185t)电转染进 CHO-K1 细胞，Dot blot 筛选出高表达量的细胞池；使用自制的 TDAb-NHS 亲和层析填料纯化 L1R(185t)蛋白，HPLC 检测纯化后的蛋白纯度达到了 99.10%，并成功在小鼠体内诱导体液和细胞免疫。重组蛋白疫苗具有安全、生产、质量可控性强等优势。本研究为基于 L1R 三聚体蛋白的猴痘病毒亚单位疫苗研发提供了实验依据和候选抗原。

[参　考　文　献]

[1] CHAUHAN R P, FOGEL R, LIMSON J. Overview of diagnostic methods, disease prevalence and transmission of mpox (formerly monkeypox) in humans and animal reservoirs [J]. Microorganisms, 2023, 11(05): 1186.

[2] TANG H, ZHANG A. Human mpox: Biology, epidemiology, therapeutic options, and development of small molecule inhibitors [J]. Med Res Rev, 2023, 43(04): 1019-1037.

[3] LI B, WANG W, ZHAO L, et al. Aggregation-induced emission-based macrophage-like nanoparticles for targeted photothermal therapy and virus transmis-

sion blockage in monkeypox [J]. Adv Mater, 2024,36(09):e2305378.
[4] WANG H, YIN P, ZHENG T, et al. Rational design of a 'two-in-one' immunogen DAM drives potent immune response against mpox virus [J]. Nat Immunol, 2024,25(02):307-315.
[5] FRANKE C A, REYNOLDS P L, HRUBY D E. Fatty acid acylation of vaccinia virus proteins [J]. J Virol, 1989,63(10):4285-4291.
[6] WOLFFE E J, VIJAYA S, MOSS B. A myristylated membrane protein encoded by the vaccinia virus L1R open reading frame is the target of potent neutralizing monoclonal antibodies [J]. Virology, 1995,211(01):53-63.
[7] RAVANELLO M P, HRUBY D E. Conditional lethal expression of the vaccinia virus L1R myristylated protein reveals a role in virion assembly [J]. J Virol, 1994,68(10):6401-6410.
[8] ICHIHASHI Y, OIE M. Neutralizing epitope on penetration protein of vaccinia virus [J]. Virology, 1996, 220(02):491-494.
[9] PANDEY A, SHIN K, PATTERSON R E, et al. Current strategies for protein production and purification enabling membrane protein structural biology [J]. Biochem Cell Biol, 2016,94(06):507-527.
[10] FOGG C, LUSTIG S, WHITBECK J C, et al. Protective immunity to vaccinia virus induced by vaccination with multiple recombinant outer membrane proteins of intracellular and extracellular virions [J]. J Virol, 2004,78(19):10230-10237.
[11] SHI Y, SHI J, SUN L, et al. Insight into vaccine development for Alpha-coronaviruses based on structural and immunological analyses of spike protein[J]. Journal of Virology, 2021, 95(07): e02284-20.
[12] HE C, YANG J, HONG W, et al. A self-assembled trimeric protein vaccine induces protective immunity against Omicron variant [J]. Nat Commun, 2022,13(01):5459.
[13] BLAKNEY A K, MCKAY P F. Next-generation COVID-19 vaccines: here come the proteins [J]. Lancet, 2021,397(10275):643-645.

Immune Response to the Trimerized Extracellular Domain of Monkeypox Virus Membrane Protein L1R

LIU Mei[1], REN Xinxin[1], ZHOU Jinhu[2], DENG Shuang[2], XU Yan[2,3], Normand Jolicoeur[2], HU Han[1,2], WANG Yang[1,2], LIU Binlei[1,2]
(1 *School of Bioengineering and Food, Hubei Univ. of Tech., Wuhan* 430068, *China*;
2 *Wuhan Binhui Biotechnology Co., Ltd., Wuhan* 436000, *China*;
3 *Nova Biologiques (Wuhan) Ltd., Wuhan* 430073, *China*)

Abstract: Monkeypox virus (MPXV) infection, a zoonotic disease with increasing global concern, causes illness ranging from mild flu-like symptoms to severe complications. Current vaccines offer limited protection, emphasizing the need for novel immunogens. This study explores the immunogenicity of the L1R protein, a crucial component of intracellular mature virions (IMVs), as a potential vaccine candidate against MPXV. We trimerized the L1R(185t) protein to enhance immunogenicity. The trimeric L1R(185t) was expressed in Chinese hamster ovary (CHO) and the non-trimeric form in insect baculovirus systems, achieving protein purity exceeding 99.1% for the trimeric form. In C57BL/6 mice, intramuscular immunization with purified trimerized L1R(185t) triggered robust humoral responses. Specific IgG antibody levels against L1R (185t) protein reached 640,000 after the second immunization and 11,264,000 following the third immunization, demonstrating the protein's potent ability to stimulate antibody production over time. Furthermore, ELISpot assays revealed significant interferon-gamma (IFN-γ) production by splenocytes from immunized mice on the 54th day after immunization with an average number of spots of 102, indicating the induction of a cellular immune response alongside the humoral response. This dual immune response is crucial for effective viral clearance and long-term protection against MPXV infection. These findings highlight the promising potential of trimeric L1R as a vaccine candidate against MPXV. The efficient induction of both humoral and cellular immune responses in mice, evident by the significant increase in IgG titers and IFN-γ production by splenocytes, paves the way for further development and evaluation of this immunogen. The successful development of a safe and efficacious MPXV vaccine would be a significant advancement in global public health efforts to control and prevent this emerging zoonotic disease.

Keywords: monkeypox virus; membrane protein L1R(185t); CHO cells; trimer domain

[责任编校: 张 众]