



中国动物传染病学报
Chinese Journal of Animal Infectious Diseases
ISSN 1674-6422, CN 31-2031/S

《中国动物传染病学报》网络首发论文

题目： 盘尾丝虫 ASP1 蛋白佐剂活性区不同标签融合表达与佐剂活性比较
作者： 胡威，卢会鹏，张晓凯，李洋洋，张鑫宇，夏晓莉，孙怀昌
网络首发日期： 2019-04-15
引用格式： 胡威，卢会鹏，张晓凯，李洋洋，张鑫宇，夏晓莉，孙怀昌. 盘尾丝虫 ASP1 蛋白佐剂活性区不同标签融合表达与佐剂活性比较[J/OL]. 中国动物传染病学报. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2031.s.20190411.1215.002.html>



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。

盘尾丝虫 ASP1 蛋白佐剂活性区不同标签融合表达与佐剂活性比较

胡威¹, 卢会鹏¹, 张晓凯¹, 李洋洋¹, 张鑫宇¹, 夏晓莉¹, 孙怀昌^{1,2}

(1. 扬州大学兽医学院, 江苏高校动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 扬州 225009; 2. 江苏农牧科技职业学院, 泰州 225300)

摘要: 为了探明纯化标签对盘尾丝虫活化相关分泌蛋白 1 (Activation-associated secreted protein 1, ASP1) 佐剂活性的影响, 将其佐剂活性区 PR-1 编码序列分别与类弹性蛋白多肽 (Elastin-like polypeptide, ELP)、ELK16 自聚肽或 His 标签进行融合表达, 用相变循环、离心洗涤和镍亲和层析进行融合蛋白纯化; 将 ELP 与传染性法氏囊病病毒 (Infectious bursal disease virus, IBDV) VP2 基因片段进行融合表达, 用蛋白酶切除 ELP 标签后与不同标签融合 PR-1 免疫小鼠, 两次免疫后不同时间采血分离血清, 用 ELISA 检测 VP2 特异 IgG、IgG1 和 IgG2c 滴度, 用试剂盒检测免疫小鼠血清的 IFN- γ 、TNF- α 、IL-6、IL-10 浓度。结果显示, ELP-PR1、ELK-PR1、His-PR1 和 ELP-VP2 融合蛋白在重组大肠杆菌中均获得正确表达, 纯化蛋白纯度大于 90%; 三种标签融合 PR-1 均能增强免疫小鼠的抗原特异 IgG、IgG1 和 IgG2 应答, 并能刺激小鼠产生 IFN- γ 、TNF- α 、IL-6 或 IL-10 细胞因子。在三种 PR-1 融合蛋白中, ELP-PR1 的佐剂活性最强, ELK-PR1 与不完全弗氏佐剂相当。

关键词: 盘尾丝虫活化相关分泌蛋白 1; PR-1 佐剂活性区; 不同标签融合; 佐剂活性比较

FUSION EXPRESSION AND ACTIVITY COMPARISON OF ADJUVANT FUNCTIONAL REGION OF ONCHOCERCA VOLVULUS ASP1 PROTEIN WITH DIFFERENT PURIFICATION TAGS

项目基金: 国家重点研发计划项目资助 (2017YFNC0201303, 2018YFC08404004); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD)

作者简介: 胡威, 男, 安徽宿州人, 硕士研究生, 预防兽医学专业

通信作者: 孙怀昌, E-mail: sunh@yzu.edu.cn

HU Wei¹, LU Hui-peng¹, ZHANG Xiao-kai¹, LI Yang-yang¹, ZHANG Xin-yu¹, XIA Xiao-li¹,
SUN Huai-chang^{1,2}

(1. College of Veterinary Medicine, Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China)

Abstract: To investigate the influence of fusion tags on the adjuvant activity of *Onchocerca volvulus* activation associated secreted protein-1 (ASP-1), the PR-1 functional domain of ASP-1 was expressed as an elastin-like polypeptide (ELP), self-aggregating peptide ELK16 or His-tagged protein and purified by inverse transition cycling, centrifugation and washing or nickel affinity chromatography. The VP2 segment of infectious bursal disease virus was used as an ELP fusion protein and used to immunize mice after cleavage of ELP tag. The VP2-specific IgG, IgG1 and IgG2c were detected using indirect ELISA, and concentrations of IFN- γ , TNF- α , IL-6 and IL-10 were detected ELISA kit. The results showed that ELP-PR1, ELK-PR1, His-PR1 and ELP-VP2 fusion proteins were correctly expressed in recombinant *E. coli* and purified to more than 90% purity. All of three PR-1 fusion proteins could enhance the VP2-specific IgG, IgG1 and IgG2c responses, and IFN- γ , TNF- α , IL-6 and/or IL-10 production. Among the three PR-1 fusion proteins, ELP-PR1 showed the strongest humoral and cellular adjuvant effects, followed by ELK-PR1 and His-PR1.

Keywords: *Onchocerca volvulus* activation associated secreted protein-1; PR-1 domain; Fusion expression; Adjuvant activity comparison

重组亚单位疫苗具有安全性好等优点, 但免疫原性较差, 需与适当免疫佐剂配合使用才能取得良好免疫效果。现有免疫佐剂主要有油佐剂和水佐剂, 其中油佐剂诱导抗体产生较慢, 应激反应较大, 但抗体维持时间较长; 水佐剂诱导抗体产生快, 应激反应较小, 但抗体维持时间较短。这些传统免疫佐剂一般仅能增强体液免疫应答^[1], 因此迫切需要研制能诱导全面免疫应答的新型免疫佐剂。

盘尾丝虫(*Onchocerca volvulus*, Ov)第三期幼虫活化相关分泌蛋白(Activation-associated secreted protein 1, ASP-1)具有很强的免疫佐剂活性^[2-3]。将重组 Ov-ASP-1 与卵清蛋白、人免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus, HIV)或 SARS 冠状病毒重组亚单位疫苗进

行动物免疫试验, 结果显示不仅能促进平衡的 Th1/Th2 抗体应答, 而且能增强向 Th1 偏移的细胞免疫应答^[4]。将重组 Ov-ASP-1 与低剂量流感病毒灭活疫苗免疫小鼠, 不仅能显著加强和加速抗体应答, 还能加强交叉免疫保护^[5]。将 Ov-ASP-1 的 PR-1 佐剂活性区与卵清蛋白、乙型肝炎病毒表面抗原、HIV 抗原肽免疫小鼠, 不仅能刺激抗原特异抗体产生, 而且能刺激脾细胞产生 γ 干扰素和 IL-6 等细胞因子^[6]。然而这些重组大肠杆菌表达的 Ov-ASP-1 均为不溶性包涵体, 不仅需要进行复杂的变性/复性处理, 而且需用价格较贵的亲和层析纯化, 作为兽用免疫佐剂使用受到限制。

类弹性蛋白多肽 (Elastin-like polypeptide, ELP) 是根据体内弹性蛋白五肽重复序列 (如 VPGXG) 合成的多肽聚合物, 具有温度敏感的可逆相变特性, 在低于相变温度下呈可溶状态, 在高于相变温度下呈凝聚状态, 因此其融合蛋白可用简单的相变循环纯化^[7-8]。另外, ELP 还有一定的免疫佐剂作用^[9]。ELK16 等自聚肽能在细菌内或液体中自动聚集成蛋白凝聚物, 其融合蛋白可用离心洗涤法纯化, 纯化效率与亲和层析法接近^[10]。本研究将 Ov-ASP-1 佐剂活性区 PR-1 分别与 ELP、ELK16 和 His 标签进行融合表达, 与传染性法氏囊病病毒 (Infectious bursal disease virus, IBDV) 重组 VP2 蛋白进行动物免疫试验, 旨在探索不同纯化标签对 PR-1 免疫佐剂活性的影响, 为 IBDV 新型亚单位疫苗佐剂研制打好基础。

1 材料和方法

1.1 材料 ELK16 自聚肽和 ELP 融合表达载体 pET-P16P^[10] 和 pET-ELP^[8] 由本实验室构建和保存; His 标签蛋白纯化试剂盒购于康为世纪公司; 烟草蚀纹病毒 (Tobacco etch virus, TEV) 蛋白酶活性包涵体由本实验室制备^[11]; RPMI 1640 细胞培养液购于美国 GE 公司; 细胞因子 ELISA 试剂盒购于武汉酶免生物公司; SPF 级 Balb/c 小鼠购于扬州大学比较医学中心。

1.2 重组载体构建 用网上在线软件 JAVA Codon Adaption Tool, 将 IBDV VP2 基因片段^[12] 优化成大肠杆菌偏爱密码子序列, 5' 端引入 TEV 蛋白酶切位点, 序列由上海生工生物公司合成。用限制酶 *SaII* 和 *XhoI* 将 VP2 编码序列插入 pET-ELP 载体, 重组载体命名为 ELP-VP2。将上海生工生物公司合成的 ASP-1 PR-1 功能区^[6] 编码序列分别插入 pET-P16P、pET-ELP 和 pET-30a 载体的 *SaII/NotI* 位点, 获得的重组载体命名为 ELK-PR1、ELP-PR1 和 His-PR1。

1.3 重组蛋白表达 分别将重组质粒 ELP-VP2、ELK-PR1、ELP-PR1 和 His-PR1 转化 BL21 (DE3) 大肠杆菌感受态细胞, 37 °C 振荡培养过夜。按 1 : 100 比例接种 500 mL 卡那霉素

(50 µg/mL) 2×YT 培养基, 37℃振荡培养至 OD₆₀₀=0.6, 加入终浓度为 0.2 mmol/L IPTG, 37℃诱导表达 6 h。4℃、4000 g 离心 10 min 收集菌体, 用 1/10 体积菌体裂解液或 PBS 重悬, 用 JNBIO 高压细胞破碎仪破碎 3 次 (1300 Pa), 4℃、12000 g 离心 10 min 收集上清。加入终浓度为 0.5% 聚乙烯亚胺(Polyethylenimine, PEI)混匀, 4℃、14000 g 离心 10 min 收集离心上清用于重组蛋白纯化。

1.4 重组蛋白纯化 ELP 融合蛋白的相变循环按文献报道^[8]进行, 纯化 ELP-VP2 融合蛋白的相变温度为 26℃, 氯化钠浓度为 1.5 mol/L; 纯化 ELP-PR1 融合蛋白的相变温度为 26℃, 用 0.4 mol/L 硫酸铵和 1 mol/L 尿素进行。孵育 10 min 后, 室温、12000 g 离心 5 min, 沉淀蛋白用预冷 PBS 重悬, 冰浴 30 min, 4℃、12000 g 离心 10 min 去除不溶性杂蛋白, 必要时重复 1 次相变循环。ELK-PR1 融合蛋白纯化按文献报道^[10,11]进行, 将高压破碎菌液在 4℃、12000 g 离心 10 min, 沉淀蛋白先用洗涤液 1 (50 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L NaCl, 2 mol/L 尿素, 1% Triton X-100, 1 mmol/L EDTA, 3 mmol/L DTT, pH 8.0) 离心洗涤 2 次 (4℃、1000 g 离心 10 min), 再用洗涤液 2 (50 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L NaCl, 0.5% Triton X-100, pH 7.2) 离心洗涤 3 次, 最后用 1% Triton X-114 抽提去除内毒素, PBS 离心洗涤 2 次后备用。His-PR1 融合蛋白的纯化按照康为世纪 His 标签蛋白纯化试剂盒说明书进行。

1.5 ELP 标签切除 ELP-VP2 融合蛋白标签切除按文献报道^[11]进行, 沉淀的融合蛋白先用预冷 TEV 蛋白酶反应液 4℃复溶, 按 1:30 µg 比例与 TEV 蛋白酶活性包涵体混合, 30℃孵育 6 h; 4℃、12000 g 离心 10 min, 去除蛋白酶活性包涵体, 上清液加入 2 mol/L 氯化钠在 26℃进行再次相变循环, 离心去除 ELP 蛋白沉淀, 离心上清液针对 PBS 透析 1 次。

1.6 小鼠免疫 将 20 只 6 周龄 Balb/c 小鼠随机分为 5 组, 每组 4 只, 分别为 VP2、VP2+IFA (不完全弗氏佐剂)、VP2+ ELP-PR1、VP2+ELK-PR1 和 VP2+His-PR1 免疫组, 免疫途径为腿部肌肉注射, 抗原用量为 20 µg/只, 所用三种 PR-1 融合蛋白摩尔浓度相同, His-PR1 用量为 10 µg/只, ELP-PR1 用量为 26.6 µg/只, ELK-PR1 用量为 12.4 µg/只, 首免后 2 周加强免疫 1 次。首免后每周眶下静脉丛采血分离血清, -80℃冻存备用。

1.7 免疫小鼠抗体检测 免疫小鼠血清的 VP2 特异 IgG、IgG1 和 IgG2c 用间接 ELISA 检测, 包被抗原为纯化 VP2 重组蛋白 (5 µg/mL), 4℃包被过夜, PBST (含 0.1% Tween-20 的 PBS, pH 7.4) 洗板 3 次; 封闭液为含 5%脱脂乳粉的 PBST, 37℃封闭 1 h; PBST 洗板 3 次, 各孔依次加入连续 2 倍稀释 (从 1:100 开始) 免疫小鼠血清, 37℃作用 1 h; PBST 洗

板 3 次，加入酶标羊抗鼠 IgG、IgG1 或 IgG2c，37 °C 作用 1 h；PBST 洗板 3 次，每孔加入 100 μL 显色液，室温避光显色 20 min，加入 50 μL 终止液终止反应。以空白孔调零，用全波长酶标仪测定每孔 OD₄₅₀ 值，将 P/N ≥ 2.1 判为阳性，P/N < 1.5 判为阴性。

1.8 免疫小鼠细胞因子检测 在初免后 28 天采血分离血清，按照细胞因子检测 ELISA 试剂盒说明书测定免疫小鼠血清的 IFN-γ、TNF-α、IL-6 和 IL-10 浓度，每样品设 3 次重复，计算平均值及标准误（SD）。

2 结果

2.1 重组 VP2 蛋白表达与纯化 将 ELP-VP2 重组载体转化 BL21（DE3）大肠杆菌，用 0.2 mmol/L IPTG 在 37 °C 诱导 6 h。SDS-PAGE 分析显示表达的 ELP-VP2 融合蛋白为预期的 66.6 kDa，经过 2 次相变循环纯化的融合蛋白纯度为 95%；用 TEV 蛋白酶活性包涵体切除 ELP 标签，再次相变循环回收的重组 VP2 蛋白为预期的 13 kDa，纯度为 95%（图 1）。

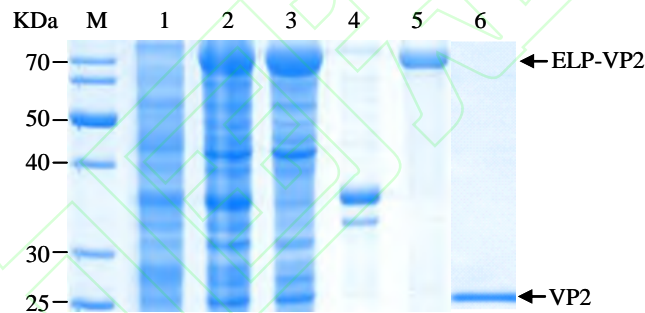


图 1 ELP-VP2 融合蛋白表达、纯化与标签切除

Fig.1 Expression, purification and tag cleavage of ELP-VP2 fusion protein

M: 蛋白质分子量标准；1: 未诱导重组菌；2: IPTG 诱导重组菌；3: 裂解重组菌离心上清；4: 裂解重组菌离心沉淀；5: 纯化融合蛋白；6: 切除 ELP 标签后的重组 VP2 蛋白

M: Protein marker; 1: Recombinant *E. coli* without induction; 2: IPTG-induced recombinant *E. coli*; 3: Supernatant of centrifuged bacterial lysate; 4: Pellet of centrifuged bacterial lysate; 5: Purified fusion protein; 6: Recombinant VP2 protein after ELP tag cleavage

2.2 PR-1 融合蛋白的表达与纯化 分别将 His-PR1、ELK-PR1 和 ELP-PR1 融合表达载体转化 BL21 (DE3) 大肠杆菌, 用 0.2 mmol/L IPTG 在 37 °C 诱导 6 h, SDS-PAGE 分析显示表达的 His-PR1、ELK-PR1、ELP-PR1 融合蛋白分别为预期的 23、28 和 60 kDa (图 2)。其中, His-PR1 融合蛋白为不溶性包涵体表达, 在变性条件下用镍亲和柱纯化; ELK-PR1 融合蛋白为活性包涵体表达, 用离心洗涤法纯化; ELP-PR1 融合蛋白为可溶性表达, 用相变循环纯化 (表 1)。

表 1 三种 PR-1 融合蛋白的纯化指标

Table 1 Purification performance of three PR-1 fusion proteins

Protein	Expression (mg/L)	Purity (%)	Recovery (%)	Yield (mg/L)	Time (h)
His-PR1	138	95	81.2	112.0	21.0
ELK16-PR1	130	90	58.5	76.0	5.8
ELP-PR1	105	93	52.9	55.5	2.5

2.3 免疫小鼠抗体水平检测 在初次免疫后第 1 周和第 4 周, 从 5 个实验组小鼠采血分离血清, 以重组 VP2 蛋白为检测抗原, 用间接 ELISA 检测抗原特异性 IgG、IgG1 和 IgG2c。在初免后第 7 天, His-PR1 佐剂组总 IgG 水平较 VP2 免疫对照组差异显著 ($P < 0.05$), IFA、ELK-PR1 和 ELP+PR1 佐剂组差异极显著 ($P < 0.01$), 其中 ELP+PR1 佐剂组总 IgG 水平最高; His-PR1 和 IFA 佐剂组的 IgG1 水平与 VP2 免疫对照组差异不显著, ELP-PR1 佐剂组差异显著, ELK-PR1 佐剂组差异极显著; 4 个佐剂组的 IgG2c 水平与 VP2 免疫对照组差异极显著, 其中 ELP-PR1 佐剂组的 IgG2c 水平最高。在初免后第 28 天, 4 个佐剂组的总 IgG 水平与 VP2 免疫对照组差异极显著, 其中 ELP-PR1 佐剂组总 IgG 水平最高; His-PR1 佐剂组的 IgG1 水平与 VP2 免疫对照组差异显著, 其他 3 个佐剂组差异极显著; 4 个佐剂组的 IgG2c 水平与 VP2 免疫对照组差异极显著, 其中 ELP-PR1 佐剂组 IgG2c 水平最高。

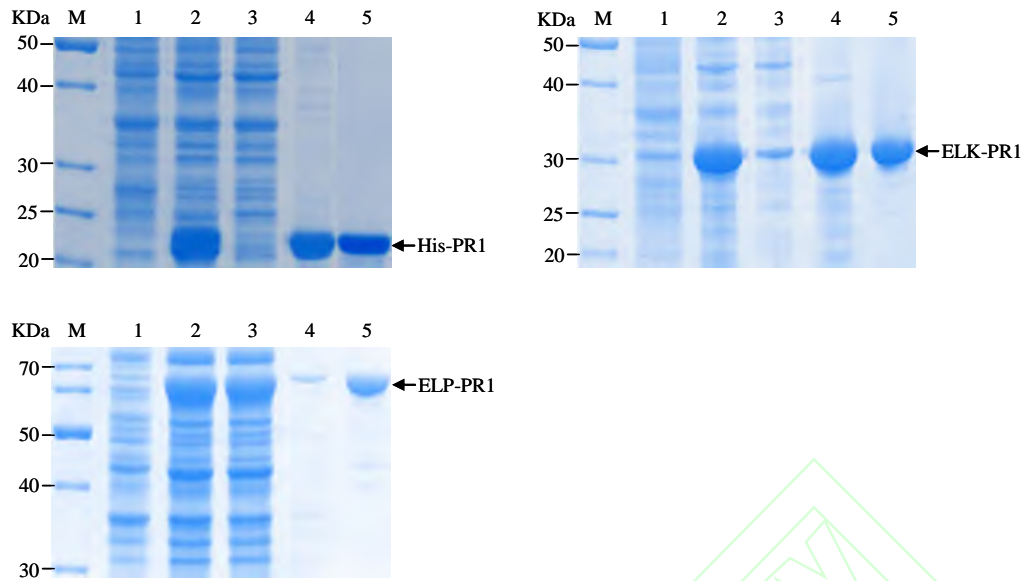


图 2 三个 PR-1 融合蛋白表达及纯化

Fig.2 Expression and purification of the PR-1 fusion proteins

M: Protein marker; 1: Recombinant *E. coli* before induction; 2: IPTG-induced recombinant *E. coli*; 3: Supernatant of centrifuged bacterial lysate; 4: Pellet of centrifuged bacterial lysate; 5: Purified fusion protein

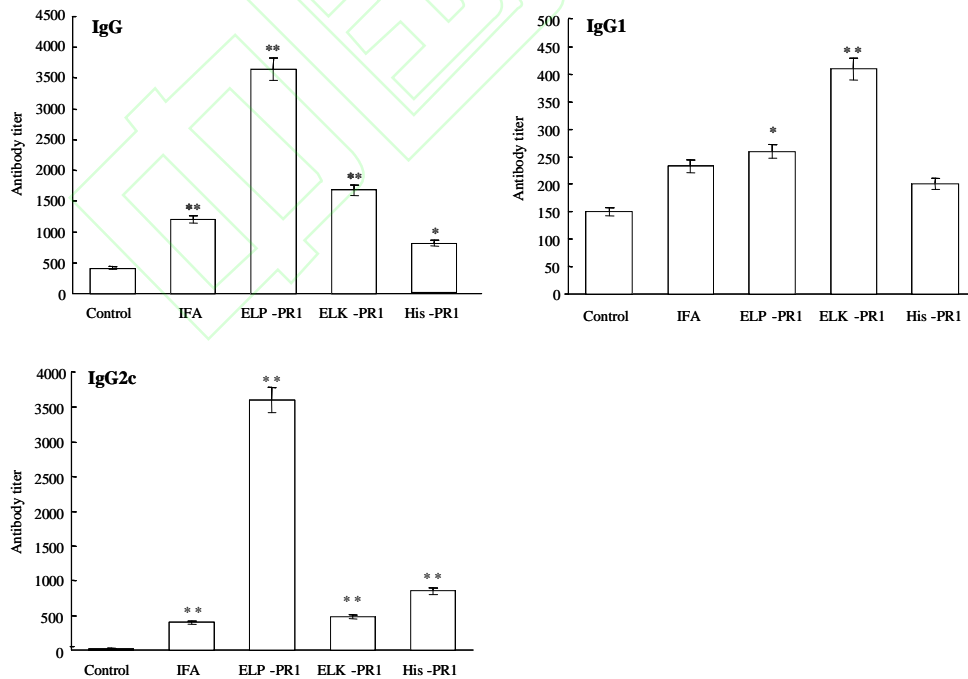


图 3 免疫小鼠的 VP2 特异抗体检测 (初免后第 7 天)

Fig. 3 Detection of VP2-specific antibody response in mice on day 7 after immunization

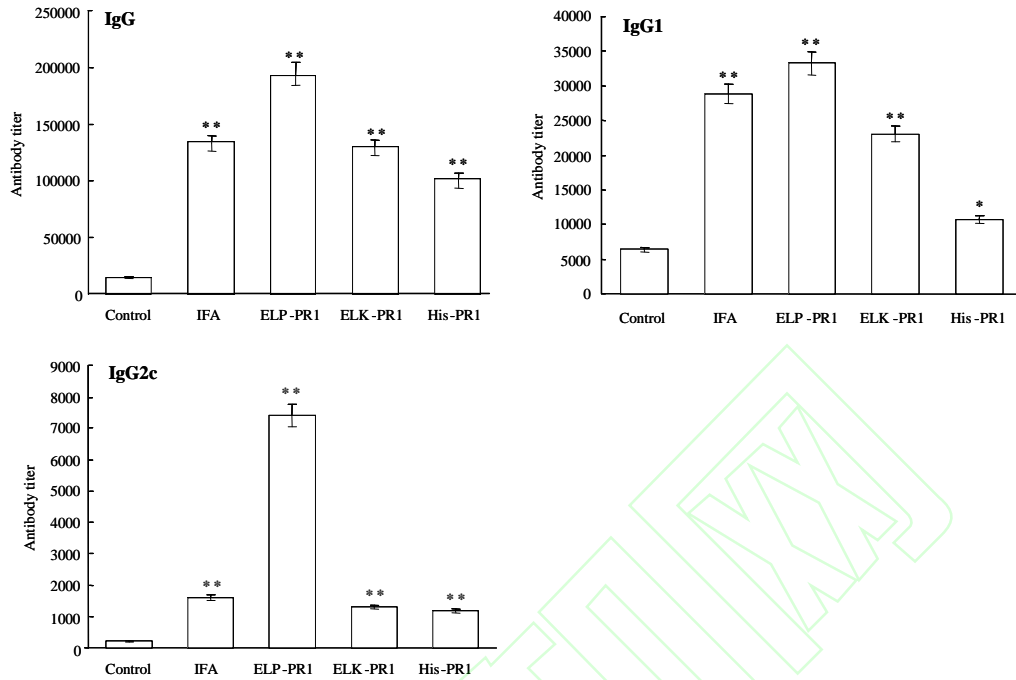


图 4 免疫小鼠的 VP2 特异抗体检测（初免后第 28 天）

Fig. 4 Detection of VP2-specific antibody response in mice on day 28 after immunization

2.4 小鼠血清细胞因子检测 在初免后 28 天采血分离血清,用 ELISA 试剂盒检测细胞因子浓度。与 VP2 免疫组对照相比, ELP-PR1 佐剂组的 $IFN-\gamma$ 水平差异极显著, 其他 3 个佐剂组差异不显著 (图 5A); 与 VP2 免疫对照组相比, ELK-PR1 佐剂组的 IL-6 水平差异显著, ELP-PR1 佐剂组差异极显著, ELK-PR1 和 His-PR1 佐剂组差异不显著(图 5B); 与 VP2 免疫对照组相比, ELP-PR1 免疫组的 IL-10 水平差异极显著, 其他 3 个佐剂组差异显著 (图 5C); 与 VP2 免疫对照组相比, IFA 佐剂组的 $TNF-\alpha$ 水平差异不显著, 其他 3 个佐剂组差异极显著 (图 5D)。

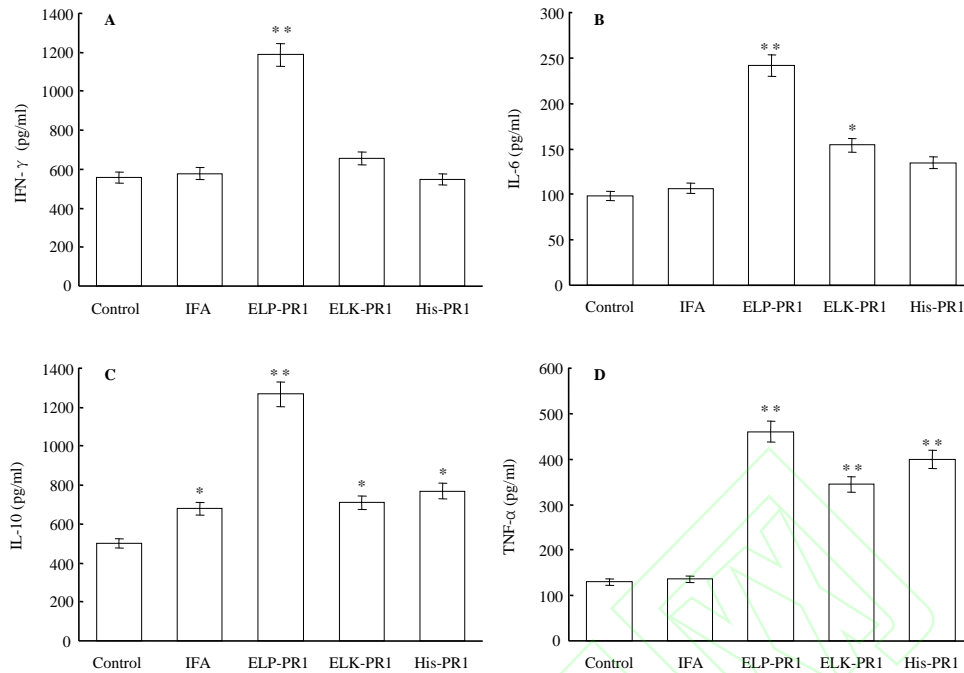


图 5 免疫小鼠血清细胞因子检测

Fig 5 Detection of cytokines in immunized mouse serum

3 讨论

重组蛋白和合成肽等亚单位疫苗具有安全性好等优点，但免疫原性较差，需与适当佐剂配合使用。铝盐和油乳剂等传统免疫佐剂可以加强疫苗抗原的体液免疫应答，但不能有效的细胞免疫。Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 等模式识别受体 (Pattern recognition receptor, PRR) 可以激活抗原提呈细胞和促炎性细胞因子产生，在先天性和获得性免疫应答中发挥重要作用，因此 TLR 配体是很有应用前景的新型免疫佐剂^[13]。Ov-ASP-1 是 TLR2 和 TLR4 的配体，具有很强的免疫佐剂活性，其佐剂活性区位于核心致病性相关-1 (PR-1) 结构域^[6]。重组大肠杆菌表达的 PR-1 不仅对卵清蛋白和乙肝表面抗原等具有体液免疫佐剂作用，还能诱导细胞免疫应答^[6]，但需用镍亲和柱纯化，不仅制备成本较高，而且难以规模化制备，因此兽医临床使用受到限制。ELP 是根据体内弹性蛋白重复序列合成的多聚体，具有免疫原低、体内相容性好等优点，已作为药物运送载体和组织工程材料进行开发。更为重要的是，ELP 具有温度敏感的可逆相变特性，其融合蛋白可用简单的相变循环纯化，是近年来快速发展的重组蛋白纯化标签^[8]。在本研究中，ELP-PR1 融合蛋白纯化可以在 2.5 h 内完成，纯化蛋白

的纯度高达 93%，与镍亲和层析纯化 His-PR1 融合蛋白的效率（95%）接近，但仅需氯化钠等常规化学试剂和离心机等简单设备。尽管纯化 His-PR1 融合蛋白的回收率和产量高于 ELP-PR1 融合蛋白，但需用价格较贵的镍亲和层析柱，而且纯化过程需时长达 21h。ELK16 等自聚肽能自动聚集成活性包涵体，因此其融合蛋白也可用简单的离心洗涤法纯化^[10, 11]，这在本研究中得到进一步验证。

鉴于自然环境中 IBDV 广泛存在，其疫苗使用又非常普遍，所以难以找到适合免疫应答研究的非免疫雏鸡或鸡胚，即使是非免疫雏鸡或鸡胚也不能保证无 IBDV 母源抗体存在。SPF 雏鸡不仅来源受限、价格较贵，试验过程中也容易受到 IBDV 污染而导致试验失败。小鼠为 IBDV 非易感动物，SPF 小鼠不仅来源方便，试验过程中也不会受到 IBDV 污染。因此，本研究分别将三种 PR-1 融合蛋白与 IBDV 重组 VP2 抗原进行小鼠免疫试验，以便对重组 VP2 抗原的免疫原性及其所需免疫佐剂进行初步评价。

在初免后 7 天，3 个 PR-1 佐剂组 VP2 特异 IgG 滴度较 VP2 免疫对照组均有显著提高，其中 ELP-PR1 佐剂组升高最显著，ELK-PR1 佐剂组与 IFA 佐剂组相当，His-PR1 佐剂组较差。在初免后 28 天，3 个 PR-1 佐剂组 VP2 特异 IgG 滴度均进一步升高，但抗体水平变化格局相似。除抗原特异性 IgG1 滴度不同程度升高外，3 个 PR-1 佐剂组的 IgG2c 水平也有显著升高，进一步证明 Ov-ASP-1 PR-1 结构域不仅能诱导平衡的 Th1/Th2 应答，还能将免疫应答向 Th1 偏移。在 3 个融合标签中，ELP 不仅分子量最大（55kDa），还能在体内形成颗粒样结构，可能是 ELP-PR1 佐剂活性较强的原因所在。His 标签分子量最小（0.5kDa），加之 PR-1 分子量也较小（16kDa），His-PR1 免疫佐剂活性较低可能与其降解速度较快有关。

细胞因子包括 Th1 和 Th2 类细胞因子，前者代表性细胞因子主要包括 IL-6、IFN- γ 和 TNF- α ，主要参与细胞免疫调节；后者代表性细胞因子主要有 IL-4 和 IL-10，主要参与体液免疫调节^[14]。在 3 个 PR-1 佐剂组中，ELP-PR1 对 IL-6、IL-10、IFN- γ 和 TNF- α 四种细胞因子产生的刺激作用均较强，可能与其自身免疫佐剂活性有关。ELK-PR1 对 IL-6、IL-10 和 TNF- α 产生的刺激作用较强，而 His-PR1 对 IL-10 和 TNF- α 产生的刺激作用较强。这些研究结果不仅证明 PR-1 能刺激 Th1 和 Th2 细胞因子产生，而且提示不同融合标签对 PR-1 刺激产生的细胞因子种类有所影响。

参考文献

- [1]尹玮, 曾瑞红, 李荣耀, 等. 疫苗佐剂的研究发展[J]. 医学动物防制, 2016(10): 1123-1124.
- [2]Jiang J, Fisher EM, Concannon M, *et al.* Enhanced humoral response to influenza vaccine in aged mice with a novel adjuvant, rOv-ASP-1[J]. *Vaccine*, 2016, 34(7): 887-892.
- [3]Joseph G T, Huima T, Lustigman S. Characterization of an *Onchocerca volvulus* L3-specific larval antigen, Ov-ALT-1[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1998, 96(1-2):177-183.
- [4]MacDonald A J, Cao L, He Y, *et al.* rOv-ASP-1, a recombinant secreted protein of the helminth *Onchocercavolvulus*, is a potent adjuvant for inducing antibodies to ovalbumin, HIV-1 polypeptide and SARS-CoV peptide antigens[J]. *Vaccine*, 2005,23(26):3446-3452.
- [5]Jiang J, Fisher E M, Hensley S E, *et al.* Antigen sparing and enhanced protection using a novel rOv-ASP-1 adjuvant in aqueous formulation with influenza vaccines[J]. *Vaccine*, 2014, 32(23): 2696-2702.
- [6]郭晶晶, 宁秀哲, 杨裔, 等. 新型疫苗佐剂 Ov-ASP-1 佐剂活性功能区的设计、表达及生物学特性研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2018, 34(9): 788-793.
- [7]Yeboah A, Cohen R I, Rabolli C, *et al.* Elastin-like polypeptides: A strategic fusion partner for biologics[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2016, 113(8):1617-1627.
- [8]Liu W J, Wu Q, Xu B, *et al.* Single-step purification of recombinant proteins using elastin-like peptide-mediated inverse transition cycling and self-processing module from *Neisseria meningitidis* FrpC[J]. *Protein Expr Purif*, 2014, 98: 18-24.
- [9]Ingrole R S, Tao W, Tripathy J N, *et al.* Synthesis and Immunogenicity Assessment of Elastin-Like Polypeptide-M2e Construct as an Influenza Antigen[J]. *Nano Life*, 2014, 4(2):1450004.
- [10]Zong Y, Zong X, Xia W, *et al.* A novel method for concentration of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from the environmental samples using self-aggregating peptide-tagged CD151-binding capture[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101(21): 7987-7996.
- [11]Li G Y, Xiao Z Z, Lu H P, *et al.* A simple method for recombinant protein purification using self-assembling peptide-tagged tobacco etch virus protease[J]. *Protein Expr Purif*, 2016, 128: 86-92.
- [12]Pradhan S N, Prince P R, Madhumathi J, *et al.* Protective immune responses of recombinant VP2 subunit

antigen of infectious bursal disease virus in chickens[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2012, 148(3-4):293-301.

[13]St P M, Brisbin J T, Abdul-Careem M F, *et al.* Immunostimulatory properties of Toll-like receptor ligands in chickens[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2013,152(3-4): 191-199.

[14]肇静娴, 曾耀英, 王青, 等. 喘可治注射液对人外周血单个核细胞 Th1 / Th2 细胞因子谱的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2006(4): 356-359.

