

密级:

论文编号:



中国农业科学院

学位论文

H7N9 亚型流感病毒 HA1 蛋白单克隆抗体 特性鉴定及应用

硕 士 研 究 生: 申汶涛

学 号: 82101195338

指 导 教 师: 朱启运 研究员

申请学位类别: 兽医硕士

领 域: 兽医

培 养 单 位: 兰州兽医研究所

研究生院

2022 年 6 月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences Thesis

Characterization and Application of Monoclonal Antibody against HA1 Protein of H7N9 Subtype Influenza Virus

Candidate: SHEN Wentao

Student ID: 82101195338

Supervisor: Professor ZHU Qiyun

**Degree Type: Master of Professional Degree in
Veterinary Medicine**

Major: Veterinary Medicine

**Institution: Lanzhou Veterinary Research
Institute**

Graduate School

June 2022

摘要

流感病毒属于正黏病毒科流感病毒属，有 A、B、C、D 四型。其中 A 型流感病毒（IAV）可以感染多种家禽以及哺乳动物，对养殖业和公共卫生造成巨大威胁。流感病毒易发生抗原漂移与转变，引起抗原特性不断改变，使得流感的预防与治疗变得较为艰难，迫切需要具有预防治疗作用的药物。

本研究筛选针对 H7N9 亚型流感病毒 HA1 蛋白的稳定分泌的单克隆杂交瘤细胞株，在杂交瘤细胞上清液中纯化出 6 株特异性抗体：2B2B3、3C5D6、4H1E8、4E12D6、7H9A6 和 9F10G3。6 株单克隆抗体效价最高可达 2^{18} ，均为具有 κ 轻链的 IgG_{2b} 亚类，但均不具有血凝抑制活性（HI），其中 3 株单克隆抗体（4H1E8、7H9A6 和 9F10G3）与 H7N9 亚型流感病毒颗粒具有较高的亲和力。6 株单克隆抗体的中和活性均呈剂量依赖性，4H1E8 和 7H9A6 的半数抑制浓度（IC₅₀）分别可达 12.59 ng/ μ L 和 25.1 ng/ μ L。通过单克隆抗体中和活性和免疫学实验发现，6 株单克隆抗体均未诱导出有效的抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用（ADCC），中和活性最高的 4H1E8 和 7H9A6 抗体则明显阻断了 H7N9 亚型流感病毒的吸附过程，从而抑制病毒复制。因此，本研究初步筛选得到了两株特异性和生物活性较高的单抗 4H1E8 与 7H9A6。

采用肽扫描技术鉴定了这些单克隆抗体识别的抗原表位。结果显示，6 株单克隆抗体识别的表位可分为两类：2B2B3、3C5D6 和 4H1E8 识别的表位包含 ¹²¹RESG¹²⁴ 氨基酸残基；4E12D6、7H9A6 和 9F10G3 识别的表位包含 ¹¹¹VNEEALR¹¹⁷ 氨基酸残基。对筛选出的抗原表位进行 3D 建模显示，4H1E8 和 7H9A6 单克隆抗体的表位定位于受体结合域（RBD）和残留酯酶域（VE）的结合部位。对 GenBank 数据库中所有 H7 亚型流感病毒的 HA 序列进行比对，除 115 和 130 位氨基酸残基外，其余氨基酸残基均高度保守。研究结果显示，筛选出的 H7 亚型 HA 蛋白抗原表位 ¹²¹RESG¹²⁴、¹¹¹VNEEALR¹¹⁷ 为两种新型且保守的抗原表位。

为验证单克隆抗体在动物体内的保护效力，用 H7N9 亚型流感病毒感染分别注射了 4H1E8 和 7H9A6 单抗的雌性 BALB/c 小鼠。数据表明，两株单抗对 H7N9 亚型流感病毒的亚致死与致死剂量感染可提供 90% 以上的保护率，相较对照组小鼠可加快体重恢复速度，降低组织病毒载量，可显著降低肺泡、气管、支气管、上皮等组织损伤，减少炎性细胞浸润。这些结果表明 4H1E8 和 7H9A6 可应用于对 H7N9 亚型流感病毒感染的预防和治疗。

本研究结果筛选得到识别 H7N9 亚型流感病毒 HA1 蛋白新表位的高特异性中和单克隆抗体并验证其在体内具有完全保护效应，为抗流感疫苗的设计与药物的研发提供理论依据。

关键词：H7N9 亚型流感病毒，HA1 蛋白，单克隆抗体，抗原表位，中和活性

Abstract

Influenza virus belongs to the family *orthomyxoviridae*, which include type A, B, C and D viruses. Influenza A virus (IAV) can infect a variety of poultry and mammals, continually challenging breeding industry and human health. Due to the constant antigenic drift and shift, it is becoming more difficult to prevent and monitor the influenza virus. Thus, there is an urgent need for the novel antiviral agent with prophylactic and/or therapeutic effect.

In this study, we screened six monoclonal antibodies (mAbs), 2B2B3, 3C5D6, 4H1E8, 4E12D6, 7H9A6 and 9F10G3 specifically recognizing the hemagglutinin (HA1) protein of the H7N9 subtype influenza virus. The highest titer of the six mAbs was up to 2^{18} . Three mAbs (4H1E8, 7H9A6 and 9F10G3) revealed high affinity with H7N9 viral particles. The six mAbs had dose-dependently neutralization activity, and the IC_{50} of 4H1E8 and 7H9A6 were 12.59 ng/ μ L and 25.1 ng/ μ L. Characteristic identification indicated that none of the six mAbs had antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC). Additionally, the 4H1E8 and 7H9A6 antibodies, which displayed the highest neutralizing activity, and significantly blocked the viral attachment of H7N9 virus. Therefore, two monoclonal antibodies with high specificity and biological activity, 4H1E8 and 7H9A6, were preliminarily screened in this study.

Peptide scanning technique was used to identify the epitopes recognized by the six mAbs. The results showed, the six mAbs could be divided into two categories: the epitopes binding 2B2B3, 3C5D6, and 4H1E8 share residues $^{121}RESG^{124}$ of the HA1 protein, and the epitopes recognized by 4E12D6, 7H9A6, and 9F10G3 share residues $^{111}VNEEALR^{117}$ of the HA1 protein. 3D modeling of the selected epitopes showed that the epitopes of 4H1E8 and 7H9A6 localized to the conjugation of receptor binding domain (RBD) and residual esterase domain (VE). Next, we aligned all the HA sequences of H7 subtype IAVs from GenBank. Sequence alignment illustrated that the epitopes of six mAbs were nearly completely conserved within the H7 subtype, except for the 115 and 130 amino acid residues.

To verify the protective efficacy of mAbs *in vivo*, two mAbs with high neutralizing activity and affinity (4H1E8 and 7H9A6) were selected to test the prophylactic or therapeutic efficacy in BALB/c mice. Data showed that the two mAbs provided more than 90% protection against sublethal and lethal dose infection of H7N9 virus. Compared with the control group, the two mAbs significantly improved weight recovery, inhibited pulmonary viral replication and reduced lung lesions after viral challenge. These results suggest that 4H1E8 and 7H9A6 could be suitable prophylactic or therapeutic candidates against H7N9 IAVs.

In this study, a highly specific neutralizing monoclonal antibody was screened to identify the new epitopes of the hemagglutinin (HA1) protein of the H7N9 subtype influenza virus and verified its complete protective effect *in vivo*, providing theoretical basis for the design of anti-influenza vaccine and drug development.

Keywords: H7N9 subtype influenza virus, HA1 protein, Monoclonal antibody, Epitope, Neutralizing activity

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 A 型流感病毒概述.....	1
1.1.1 A 型流感.....	1
1.1.2 A 型流感病毒主要结构蛋白.....	1
1.1.3 A 型流感病毒流行病学.....	4
1.2 H7N9 亚型流感病毒概述.....	5
1.2.1 H7N9 亚型流感病毒及其流行病学.....	5
1.2.2 H7N9 亚型流感病毒变异与进化.....	6
1.3 单克隆抗体概述.....	6
1.3.1 单克隆抗体的发展.....	6
1.3.2 流感病毒单克隆抗体药物的研究.....	7
1.4 研究的目的是和意义.....	8
第二章 抗 H7N9 亚型流感病毒 HA1 蛋白单克隆抗体的制备与特性研究.....	9
2.1 材料方法.....	9
2.1.1 细胞和实验动物.....	9
2.1.2 主要试剂.....	9
2.1.3 主要仪器.....	9
2.1.4 杂交瘤细胞的冻存与复苏.....	10
2.1.5 腹水的制备.....	10
2.1.6 单抗亚类鉴定.....	10
2.1.7 血凝抑制实验(HI).....	10
2.1.8 酶联免疫吸附实验(ELISA).....	11
2.1.9 间接免疫荧光实验(IFA).....	11
2.1.10 蛋白电泳及免疫印迹(WB)分析.....	11
2.1.11 单抗亲和力检测.....	12
2.1.12 单抗中和活性检测.....	12
2.1.13 抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC)检测.....	13
2.1.14 吸附实验.....	13
2.1.15 内化实验.....	13
2.1.16 实时荧光定量 PCR.....	13
2.2 结果.....	15
2.2.1 亚类鉴定.....	15
2.2.2 血凝抑制(HI)效价测定.....	15

2.2.3 单抗亲和力检测.....	15
2.2.4 酶联免疫吸附试验(ELISA)效价测定	15
2.2.5 间接免疫荧光(IFA)特异性检测.....	16
2.2.6 蛋白免疫印迹(WB)特异性检测	17
2.2.7 单抗中和活性检测.....	18
2.2.8 单抗体内保护效应机制.....	18
2.3 小结.....	19
2.4 讨论.....	19
第三章 H7N9 亚型流感病毒 HA 蛋白抗原表位的鉴定与分析	21
3.1 材料与方法.....	21
3.1.1 主要载体、细胞.....	21
3.1.2 主要试剂.....	21
3.1.3 主要仪器.....	21
3.1.4 引物设计.....	21
3.1.5 目的基因的扩增.....	26
3.1.6 载体酶切与同源重组连接.....	26
3.1.7 转化.....	27
3.1.8 挑取阳性克隆与质粒提取.....	27
3.1.9 质粒转染.....	28
3.1.10 蛋白电泳与免疫印迹(WB)分析	28
3.1.11 抗原表位建模与分析.....	28
3.2 结果.....	28
3.2.1 抗原表位第一轮筛选结果.....	28
3.2.2 抗原表位第二轮筛选结果.....	29
3.2.3 抗原表位第三轮筛选结果.....	29
3.2.4 抗原表位精确定位结果.....	30
3.2.5 抗原表位建模与分析.....	31
3.3 小结.....	32
3.4.讨论.....	32
第四章 H7N9 亚型流感病毒 HA1 蛋白单抗体内保护效力研究	34
4.1 材料与方法.....	34
4.1.1 病毒、细胞和试验动物.....	34
4.1.2 主要试剂.....	34
4.1.3 主要仪器.....	34
4.1.4 原核表达质粒的构建.....	34
4.1.5 蛋白诱导表达.....	34
4.1.6 原核蛋白纯化.....	35
4.1.7 抗体纯化.....	35

4.1.8 抗原特异抗体亲和层析.....	35
4.1.9 单抗预防试验.....	36
4.1.10 单抗治疗试验.....	37
4.1.11 肺组织病理学检测.....	37
4.1.12 组织病毒载量滴定.....	37
4.2 结果.....	37
4.2.1 原核蛋白纯化.....	37
4.2.2 单克隆抗体纯化.....	38
4.2.3 单抗预防试验.....	38
4.2.4 单抗治疗试验.....	40
4.3 小结.....	42
4.4 讨论.....	42
第五章 结论.....	44
参考文献.....	45
附录 A.....	58

主要符号对照表

英文缩写	英文全称	中文名称
A549	Human lung adenocarcinoma cell line	人肺癌细胞
aa	Amino acid	氨基酸
ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity	抗体介导的依赖性细胞毒作用
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
cDNA	Complementary DNA	互补 DNA
dpi	Day post inoculation	接种天数
EID ₅₀	50% of egg infectious dose	鸡胚半数感染剂量
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
h	Hour	小时
HEK293T	Human embryonic kidney cell	人胚肾细胞
HI	Hemagglutination inhibition	血凝抑制
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
IAV	Influenza A virus	A 型流感病毒
IFA	Immunofluorescence	免疫荧光
mAb	Monoclonal antibody	单克隆抗体
MDCK	Madin-Darby canine kidney	狗肾传代细胞
mL	Milliliter	毫升
MOI	Multiplicity of infection	感染复数
NA	Neuraminidase	神经氨酸酶
NC	Nitrocellulose	硝酸纤维素膜
OD	Optical density	吸光度
PBS	Phosphate buffer saline	磷酸缓冲盐溶液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
RBS	Receptor binding site	受体结合位点
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
RT-PCR	Reverse transcription PCR	反转录聚合酶链式反应
SPF	Specific-pathogen-free	无特定病原
TCID ₅₀	50% tissue culture infectious dose	半数组织细胞感染剂量
TMB	Tetramethylbenzidine	四甲基联苯胺
WB	Western blotting	免疫印迹

第一章 绪论

流感病毒 (Influenza virus) 属正黏病毒科流感病毒属, 有 A、B、C、D 四型。其中 A 型流感病毒 (Influenza A virus, IAV) 可以感染多种家禽以及哺乳动物, 对人类公共卫生健康能够产生巨大威胁。A 型流感病毒的变异已引发多次流感大流行, 在人类经历的四次流感大流行中, 1918 年西班牙流感病毒可能是人流感病毒和禽流感病毒通过基因重组或重排产生 (YANG et al., 2014); 1957 年亚洲流感是由流感病毒基因重排产生的二元重组病毒 (LIU et al., 2009); 1968 年香港流感是人源 H2N2 病毒与禽源流感病毒进行基因重排产生的二元重组病毒 (SIKORA et al., 2014); 2009 年 A 型 H1N1 流感病毒是一个四元基因重组的产物 (CURCIO et al., 2010; ZHANG et al., 2010)。流感病毒抗原漂移和转变的特性给流感的预防和治疗造成巨大困难。2013 年我国首次发现 H7N9 亚型流感病毒跨越种间屏障感染人的病例, 经过变异, H7N9 亚型流感病毒已转变为高致病性毒株, 感染数与病死率 (35%) 大幅上升, 造成严重的经济损失, 并且威胁公共卫生安全。越来越多的研究从抗原特性、受体结合特性、抗体中和效应和体液免疫等方向去研究预防和治疗 H7N9 亚型流感病毒感染的方法。目前, 尚需可以有效预防与治疗 H7N9 亚型流感病毒感染的药物, 识别抗原表位高度保守的抗体对产生抗原漂移的毒株仍可持续保持识别能力, 但高度保守的抗原表位鉴定工作仍需进一步研究。

1.1 A 型流感病毒概述

1.1.1 A 型流感

A 型流感是一种人兽共患病, 其病原为 A 型流感病毒, 多种哺乳动物和禽类可感染, 人和猪等哺乳动物感染后表现为不同的临床症状与病理特征, 多引起发热、呼吸困难、流鼻涕及乏力等呼吸道症状, 一般愈后良好, 而禽流感病毒感染家禽引起的症状和损害则差别极大。流感从 1878 年开始至今在动物中存在的历史已久, 1878 年, 意大利首次报道发生真性鸡瘟; 1918 年, 猪流感在美国大流行 (JONES, 2010; SOPER, 1918); 1955 年, 在东欧分离到马流感病毒。高致病性禽流感为 OIE (Office International des Epizooties, OIE) 动物疾病名录分类中定为必须申报的疫病。人流感的流行已有百余次之多, 自 1997 年香港高致病性禽流感直接从禽传染人并引起死亡开始 (CHAN, 2002; SNACKEN et al., 1999), 该病引起世界各国的高度重视。在我国, A 型流感病毒已经在人群中发生过数次感染, 在其他动物特别是禽类中也频频爆发。研究报道, 由于流感病毒经过多年的变异与进化, 已经对金刚烷胺类、奥司他韦类等现有主要抗流感病毒药物产生了耐药性, 使得对 A 型流感的预防治疗效果逐渐减弱, 导致感染率大幅上升。

1.1.2 A 型流感病毒主要结构蛋白

A 型流感病毒属正黏病毒科流感病毒属, 为单股负链 RNA 病毒, 基因组由 8 个单股负链 RNA (Viral RNA, vRNA) 片段组成, 分别为 NA、M、PB1、PB2、PA、HA、NP 和 NS。其基因组编码至少 17 种必需蛋白与非必需蛋白。病毒粒子最外层包裹着一层脂质囊膜, 表面镶嵌着两种糖蛋白纤突, 即血凝素 HA 和神经氨酸酶 NA, 另外还存在非糖基化的质子通道蛋白 M2。

根据 HA 和 NA 的不同,可将 A 型流感分为不同的亚型,目前 HA 可分为 18 个亚型(H1~H18), NA 可分为 11 个亚型 (N1~N11) (JOSEPH et al., 2017)。病毒囊膜下层为基质蛋白 M1, 在囊膜下层呈辐射状的短棒状结构,具有型特异性。最内层为核糖核蛋白(Viral ribonucleoprotein, vRNP) 复合体, 由病毒 RNA 片段、聚合酶蛋白以及核蛋白 NP 所组成(于康震 等, 2015)。

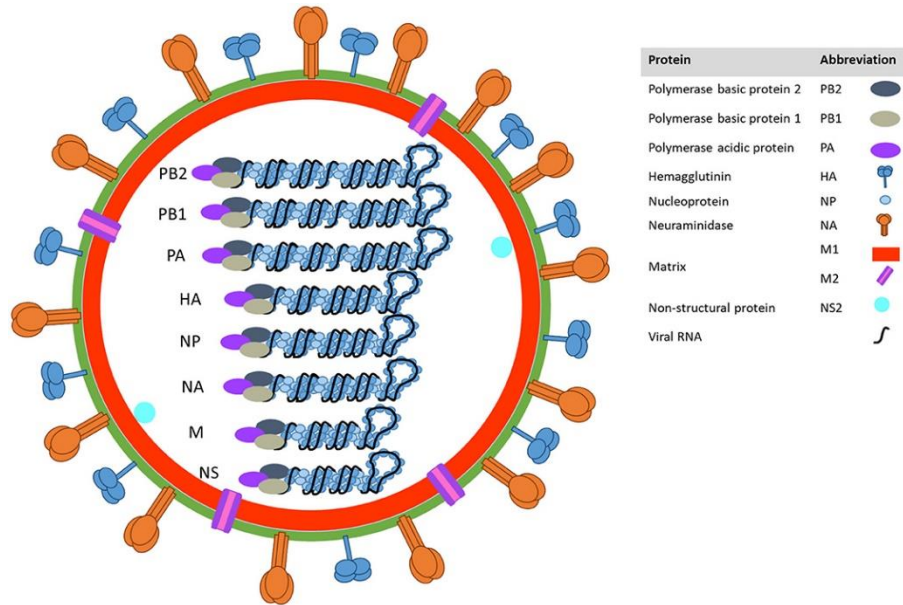


图 1-1 IAV 病毒粒子模式图(MANCERA GRACIA et al., 2020)

Figure 1-1 Diagram of an influenza A virus

HA 蛋白由三个 HA1 分子与三个 HA2 分子构成, 分为头部与茎部结构域, 整体呈棒状。HA 蛋白在裂解位点被蛋白酶切割后, 会产生 HA1 和 HA2 分子, 两者之间是以二硫键相连, 经过切割后的 HA 蛋白才能在病毒感染中发挥作用, 已有大量 HA 蛋白的晶体结构被解析出来(CHEN et al., 2018; DONG et al., 2020; SHI et al., 2013)。利用结构解析的结果, 可以人工合成具有生物活性的 HA 蛋白, 数据显示人工合成的蛋白能被正确切割、折叠成三聚体结构, 并且能保持正确的抗原性(BAR-PELED et al., 2019)。可通过生物学技术构建具有大量抗原位点的蛋白来诱导抗原表位多样性的抗体。HA 蛋白介导流感病毒与宿主受体结合, 诱导膜融合进行脱壳, 其受体结合位点位于 HA 分子的头部, 与细胞唾液酸受体结合(SKEHEL et al., 2000)。HA 蛋白识别的唾液酸类型是不同的, 禽源流感病毒与宿主细胞表面的 α -2,3 唾液酸受体结合, 而人源流感病毒则与 α -2,6 唾液酸受体结合, 受体结合特性是流感病毒跨宿主传播的重要因素(BROSZEIT et al., 2019)。流感病毒受体结合位点边缘由 130-环, 190-螺旋和 220-环组成, 共同形成一个口袋状结构容纳唾液酸受体(WILSON et al., 1981)。基部包括四个保守残基 Y98、W153、H183 和 Y195, 它们负责锚定唾液酸受体部分, 早期研究报道禽源流感病毒在人源性传播后获得了 2 个 220 环突变 (Q226L 和 G228S), 导致 RBS 域扩大。通过反向遗传学对突变位点进行验证, 发现 α -2,3 受体特异性转变为 α -2,6 受体特异性(SONG et al., 2017; WANG et al., 2021; XU et al., 2019)。此外适应人类受体的 RBS 域中由于其 190 螺旋 (E190D) 和 220 环 (G225D) 上的两位氨基酸替换, 使其更倾向于识别 α -2,6 唾液酸受体, 这些研究表明一些突变足以将受体特异性转换为人类结合类型(NOBUSAWA et al., 2000; TAMBUNAN et al., 2010; XIE et al., 2017)。

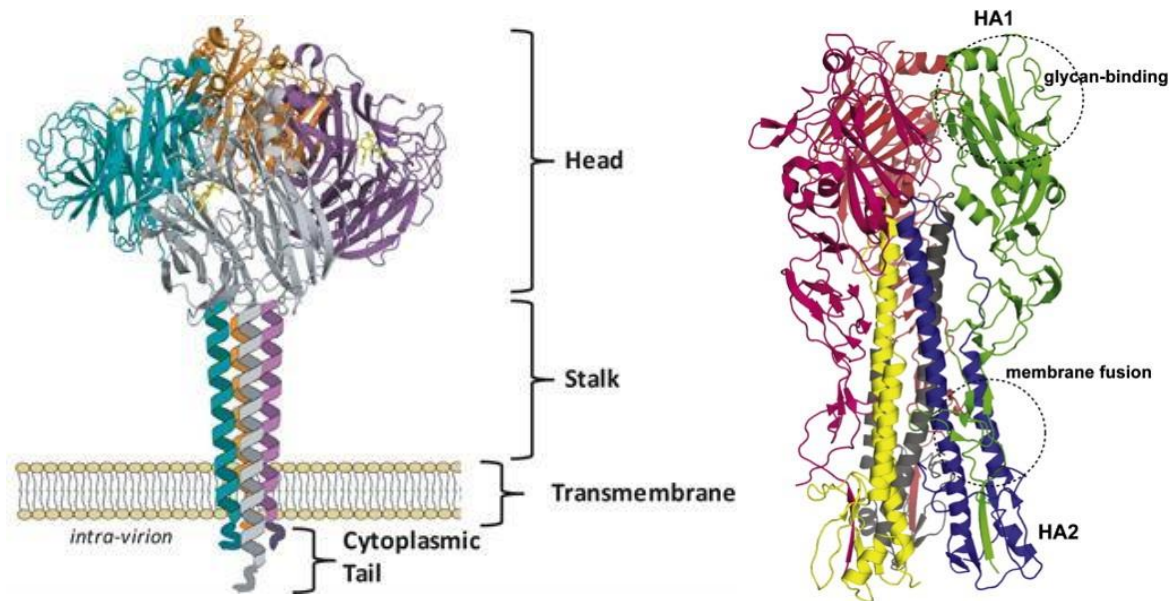


图 1-2 A 型流感病毒 HA 蛋白结构图(MCAULEY et al., 2019; SHRIVER et al., 2009)

Figure 1-2 Structure of HA protein of influenza A virus

神经氨酸酶 NA 蛋白是流感病毒表面的第二大糖蛋白，以四聚体的形式存在，每个单体由四个结构域组成：一个短且高度保守的 N 端细胞质序列，一个疏水跨膜结构域，一个茎区和一个带有酶活性位点的球状“头”结构域。NA 蛋白主要负责切割与新形成的病毒粒子结合的宿主细胞唾液酸受体，缺乏 NA 蛋白后病毒粒子的释放将受阻(BAO et al., 2021; GUO et al., 2018; PALESE et al., 1974; PARK et al., 2016)，V116A 位点被证实是抗病毒药物奥司他韦与扎那米韦抑制 NA 蛋白活性的主要作用位点(ADAMS et al., 2019; TANG et al., 2021)。

PB2 蛋白与 vRNA 转录和复制密切相关，是流感病毒关键的毒力因子(MUKAIGAWA et al., 1991)，据报道，PB2 蛋白在体外药物压力下极易产生突变，627K、271T、701N 等突变可导致流感病毒的传播能力增强(HAYASHI et al., 2015; KONG et al., 2019; ZHOU et al., 2021)，K376、M431 和 N510 等突变可增强季节性流感的耐药能力(ZHU et al., 2015)，使抗病毒药物的效力减弱，PB2 蛋白的多重突变也是季节性流感病例突增的原因之一(ELGENDY et al., 2021)。Pimodivir (VX-787)是一种口服的 PB2 蛋白酶抑制剂，它可阻止 PB2 与宿主 mRNA 的 7-甲基 GTP(m7GTP)帽状结构结合，并抑制病毒转录的早期阶段(PATEL et al., 2021)。

PB1 作为聚合酶复合体的核心蛋白，通过其 C 端区域与 PA 的 N 端区域相互作用，而 PB1 的 C 端区域与 PB2 的 N 端区域结合。PB1 可以与 PB2 相互作用，但不与 PA 相互作用(BISWAS et al., 1998; GAO et al., 2020)；PB1 已被证明是合成 RNA 延伸所必需的(ARGOS, 1988; BISWAS et al., 1994)；PB1 可介导 MAVS 的 K27 型泛素化来抑制 H7N9 亚型流感病毒的感染(ZENG et al., 2021)。

PA 蛋白为流感病毒聚合酶复合体的组成成员，主要作用为切割 mRNA 前体分子，可与 PB1 以及 PB2 相互作用，在流感病毒基因组转录及复制过程发挥重要作用(HATAKEYAMA et al., 2022; MENG et al., 2021)，通过化学抑制剂的作用，可使 PA 与聚合酶复合体内其他蛋白的作用减弱，影响流感病毒的增殖(MIZUTA et al., 2022)。

NP 蛋白在病毒复制周期中扮演着重要的角色, 其可参与细胞内的运输、寡聚和 vRNP 复合物与 RNA 的结合(ELTON et al., 1999)。NP 的磷酸化和去磷酸化在 A 型流感病毒的生命周期中发挥着独特的作用, A 型流感病毒 NP 蛋白的多个磷酸化残基对 vRNP 复合物和聚合酶活性有重要影响(LI et al., 2018; MONDAL et al., 2015; ZHENG et al., 2021; ZHU et al., 2019)。这些残基的磷酸化不仅可延迟 NP 核输出, 而且抑制 NP 泛素化(CUI et al., 2019)。然而, NP 上仍有许多未被识别的磷酸化位点, 这些位点的功能还有待进一步阐明。

基质蛋白 M1 是 A 型流感病毒中最丰富、最保守的蛋白之一。它是由 N 端 α -螺旋结构域和 C 端结构域组成。完整病毒粒子内的基质壳是由 M1 的单螺旋层形成的, 该层与病毒结构密切相关(ARZT et al., 2001; BUI et al., 1996; SELZER et al., 2020)。M1 与病毒表面蛋白血凝素和神经氨酸酶的内部结构域直接结合, 辅助病毒粒子的组装与出芽。

M2 蛋白是 pH 调节的质子选择性离子通道, 介导质子进入病毒内部, 创造一个有利于病毒粒子组装与脱壳的酸性环境, 参与到流感病毒生命周期的各个步骤(ROSSMAN et al., 2010; SCHROEDER et al., 2005; TORABIFARD et al., 2020)。M2 蛋白是决定流感病毒致病力与传播能力的重要因子, 通过阻断 M2 蛋白或破坏质子通道能够显著抑制流感病毒在组织内的载量(MANZOOR et al., 2020; ZHANG et al., 2021)。

NS1 蛋白是一种非结构多功能蛋白, 能够与各种宿主细胞配体相互作用, 对病毒的复制、传播和发病机制至关重要(HAYE et al., 2009; ZHAO et al., 2017)。最主要作用为抑制干扰素产生, 通过抑制聚腺苷化特异性因子 30 (CPSF30) 的功能来抑制抗病毒 mRNA 的形成(NEMEROFF et al., 1998)。

NS2 蛋白介导病毒基因组的核输出, 参与流感病毒 vRNP 复合体的转运。研究发现, NS2 蛋白与核孔蛋白 214 (Nup214) 的 FG 结构域相互作用进行 vRNP 复合体的出核, 并且还需染色体重构因子 CHD3 协助 NS2 蛋白介导的核输出过程(HU et al., 2015; SENBAS AKYAZI et al., 2020)。

1.1.3 A 型流感病毒流行病学

A 型流感病毒宿主范围较广, 主要感染野鸟和家禽, 这两大类别的禽鸟在禽流感病毒的传播上呈现相互交流、相互支持的关系, 目前所发现的 HA 和 NA 亚型的流感病毒, 除 H17N10 与 H18N11 仅通过在蝙蝠中测序确定外(CIMINSKI et al., 2020), 其余亚型均可在水禽中分离到。A 型流感病毒偶尔可通过家禽感染其他种类的动物。猪可以通过家禽感染各亚型流感病毒, 各亚型流感病毒在猪体内发生基因重配, 由此产生全新毒株, 人类群体中对产生的新毒株几乎没有或根本没有预先存在的体液或细胞免疫, 这也是四次世界流感大流行的一个共同特征。在 1997 年香港首次报道发生 18 例 H5N1 人感染禽流感病毒病例, 其中 6 例死亡, 这是首次禽流感病毒跨物种传播给人, 并导致人的死亡, 引起全球广泛关注(LI et al., 2004)。作为细胞内寄生病毒, 该病毒高度依赖于宿主细胞的众多相互作用, 其中许多相互作用的分子特异性在人类宿主和动物宿主间存在差异。流感病毒跨物种传播时必须降低这种差异, 主要通过两种机制来适应新宿主: 抗原漂移和抗原转移。流感病毒在复制周期之间大量交互病毒和细胞, 从而突破跨物种传播的障碍, 在 2013 年出现的 H7N9 亚型低致病性禽流感病毒, 通过重组与变异对人的感染力超过了既往所有已知的禽流感病毒。

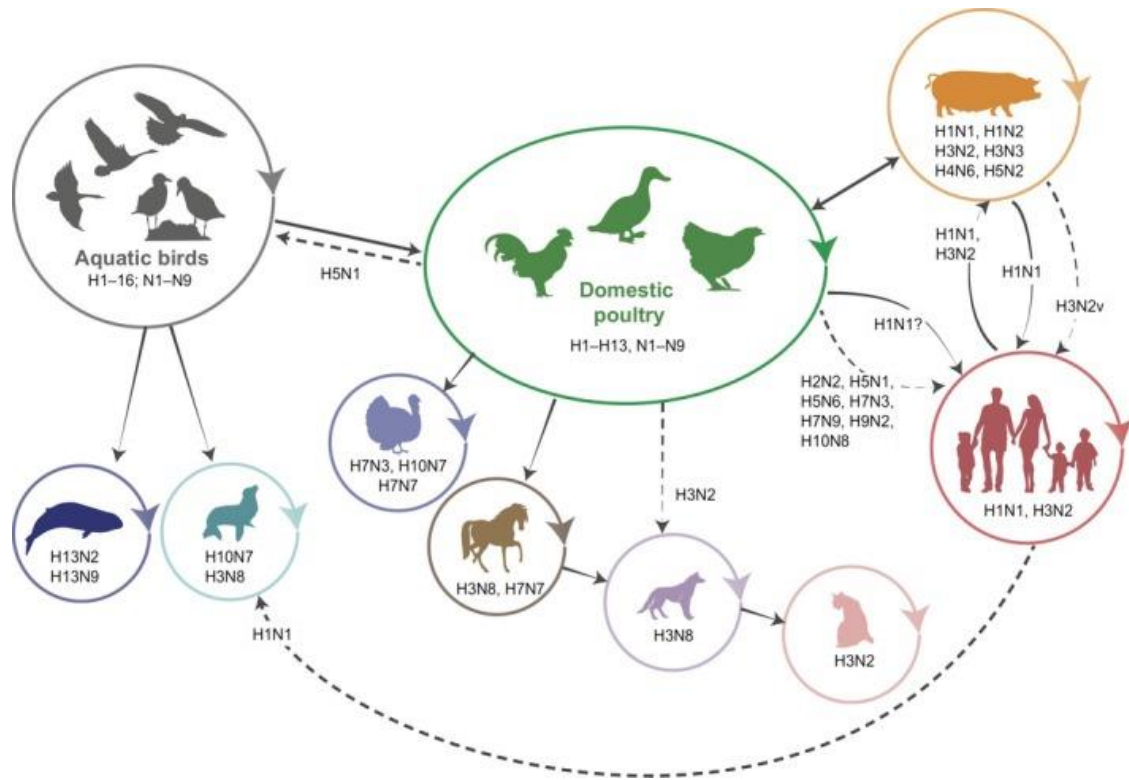


图 1-3 A 型流感病毒宿主谱(JOSEPH et al., 2017)

Figure 1-3 Host profile of influenza A virus

1.2 H7N9 亚型流感病毒概述

1.2.1 H7N9 亚型流感病毒及其流行病学

2013 年, 流感病毒在宿主中传播几十年之后, 出现 H7N9 亚型流感病毒的特定毒株感染人类的病例, 至今已发生了五波人感染疫情, 共 1500 多人感染, 死亡率约为 40%(GAO et al., 2013; HE et al., 2021; LAM et al., 2015; LI et al., 2021)。H7N9 亚型流感病毒的进化史是复杂的, 涉及 H7 和 N9 亚型流感病毒的点突变和基因重组, 并涉及多个宿主物种。迄今为止, H7N9 亚型流感病毒的确切起源和来源仍不清楚, 其内部基因可能来自禽流感 H9N2 病毒, 而 HA 和 NA 基因可能来自未知的禽流感欧亚起源病毒(LAM et al., 2013)。结构基因(HA 和 NA)很可能起源于亚洲的 H7N3 和 H2N9/H11N9 禽流感病毒。由于该病毒在被感染的家禽中不引起任何症状, 因此很难识别被感染的家禽, 这一特点使病毒在家禽中无声地传播。家鸭被认为是关键的中间宿主, 是多种流感病毒的宿主, 促进了不同亚型病毒的产生, 并将其传播给鸡(NEUMANN et al., 2015)。2013 年流感病毒对人类的适应性表明, 流感病毒基因组变化发挥了关键作用。H7N9 亚型流感病毒的持续进化产生了多株可致人类感染的毒株(TAN et al., 2021)。2017 年初, H7N9 低致病性禽流感病毒 (Low pathogenic avian influenza virus, LPAIV) 进化为高致病性禽流感病毒 (High pathogenic avian influenza virus, HPAIV), 对人类健康造成更大威胁, 给家禽业造成毁灭性损失。自 2017 年 9 月以来, 在全国范围内对鸡接种 H5/H7 双价灭活疫苗, 成功控制了 H7N9 禽流感在家禽中的感染, 重要的是也预防了人类感染。

1.2.2 H7N9 亚型流感病毒变异与进化

关于禽流感病毒向人类宿主传播所需的基因变化已经有许多报道(NEUMANN et al., 2015)。这些突变包括增强人类细胞中病毒 RNA 复制的 PB2 蛋白突变(DE JONG et al., 2013; MOK et al., 2014), 以及促进禽流感病毒与人类细胞结合的 HA 蛋白突变(DORTMANS et al., 2013; THARAKARAMAN et al., 2013), 也有一项大规模的与 A 型流感病毒人传人相关的突变分析(MIOTTO et al., 2008)。然而, 目前还缺乏对 H7N9 亚型流感病毒替换的发生率及其在禽类和人与人之间传播途径的全面分析。Tan 等人比较了 2014 年和 2017 年报告的禽和人 H7N9 毒株的 4706 个重叠排列的非 *amer* 氨基酸序列, 分析确定了 H7N9 亚型流感病毒株的非 *amer* 序列的氨基酸替换, 并评估了 2017 年报告的禽源和人源 H7N9 亚型流感病毒的持续进化。在从感染人群分离的 H7N9 亚型流感病毒中, 50 个氨基酸位点的替换对人类适应可能是必要的。值得注意的是, 这 50 个位点中有 17 个是在 2013 年分离的毒株中首次被鉴定, 这些替换主要集中在两种结构蛋白: M1 蛋白和 NS1 蛋白, 说明对动物 A 型流感病毒的筛查不应仅限于表面蛋白。

HA 蛋白中, Q235L 突变使得禽源 H7N9 亚型流感病毒能够与人源 α -2, 6 唾液酸受体结合, G228S 与 K58I 的氨基酸替换增强了受体结合的亲和力(DE GRAAF et al., 2014)。研究发现在 HA 蛋白上有 4 个碱性氨基酸 KRTA 插入, 这使得低致病性 H7N9 亚型流感病毒向高致病性毒株的转变(QUAN et al., 2018)。位于 HA 蛋白受体结合位点附近的 A135V、A143K、R148K、V177N、L217Q 发生氨基酸突变后, 可显著降低体液免疫产生的中和抗体活性(CHANG et al., 2020; NING et al., 2019; OWUOR et al., 2020; SUN et al., 2021)。NA 蛋白 T401A 位点是血凝素-神经氨酸苷酶受体平衡的一个重要因子, 是保持 NA 蛋白催化活性的关键位点, 系统发育树表明, T401A 的替换早于 HA 蛋白上的位点突变, 这种突变可能促进了 HA 受体结合特性的改变, 有利于 H7N9 亚型流感病毒的传播(NAGUIB et al., 2016)。此外, PB1 蛋白 I368V、M2 蛋白 S31N、PA 蛋白 S409N、NS1 蛋白 P212S、NP 蛋白 V33I 与 I109V 突变都能提高 H7N9 亚型流感病毒的致病性(BIALAS et al., 2014; CHEN et al., 2015; JALILY et al., 2016; KANG et al., 2014; SUN et al., 2015)。这些主要替换已成为区分禽源与人源 H7N9 亚型流感病毒的重要依据。

1.3 单克隆抗体概述

1.3.1 单克隆抗体的发展

单克隆抗体 (Monoclonal antibody, mAb) 是指由单一 B 细胞分化增殖形成的针对特定抗原决定簇的子代细胞分泌的抗体, Kohler 和 Milstein 开发了体外杂交瘤融合细胞技术, 将 B 细胞与骨髓瘤细胞进行体外融合, 产生的杂交瘤细胞具有无限增殖的能力, 又有分泌特异性抗体的能力(KOHLER et al., 1975)。与多克隆抗体相比, 单克隆抗体具有特异性高、纯度高、均质性高、生物活性高、生产简单等优点, 但稳定性较差, 对理化条件敏感。

目前, 杂交瘤技术仍是生产单抗的主要方法, 主要是利用啮齿动物进行抗体的生产与制备, 包括兔源单克隆抗体、鼠源单克隆抗体等。Nakano 等用无细胞蛋白合成法 (CFPS) 生产了兔单克隆抗体, 进一步优化了单克隆抗体生产方式, 降低了生产成本(SILA-ON et al., 2020)。20 世纪 90 年代出现新的多种组合技术, 包括噬菌体、DNA、RNA 和酵母展示技术, 但多种组合技术产

生的抗体不经过体内选择,经常产生抗体与免疫球蛋白链的非生理配对现象。有研究显示,组合技术产生的药物长期使用会导致产生中和抗体(SCHOUWENBURG et al., 2013)。为避免动物抗体的免疫原性,人源单克隆抗体在近几年得到快速发展,Chen 等通过噬菌体展示技术筛选出多株具有广泛中和活性的人源单克隆抗体(CHEN et al., 2018)。用 IL-6 刺激后,浆细胞可以存活数天,这使得从浆细胞筛选针对广泛抗原的分泌抗体成为可能,也有研究表明外周血也可以筛选出具有广泛中和活性的抗体(WALDMANN, 2019)。

1.3.2 流感病毒单克隆抗体药物的研究

1975 年体外杂交瘤融合细胞技术的问世,使得大批量制备稳定均一的单克隆抗体成为现实,推动了单克隆抗体药物的发展。但是鼠源单克隆抗体进入人体后,会被免疫系统识别为异源蛋白,进而被机体清除,使单抗药物的半衰期变短,疗效减弱,有时还会导致机体产生严重不良反应与损伤(VESIKARI et al., 2019)。目前,尚未有上市的抗流感单克隆抗体药物,因此流感单克隆抗体药物的研发仍值得引起关注(邵亮 等, 2021)。

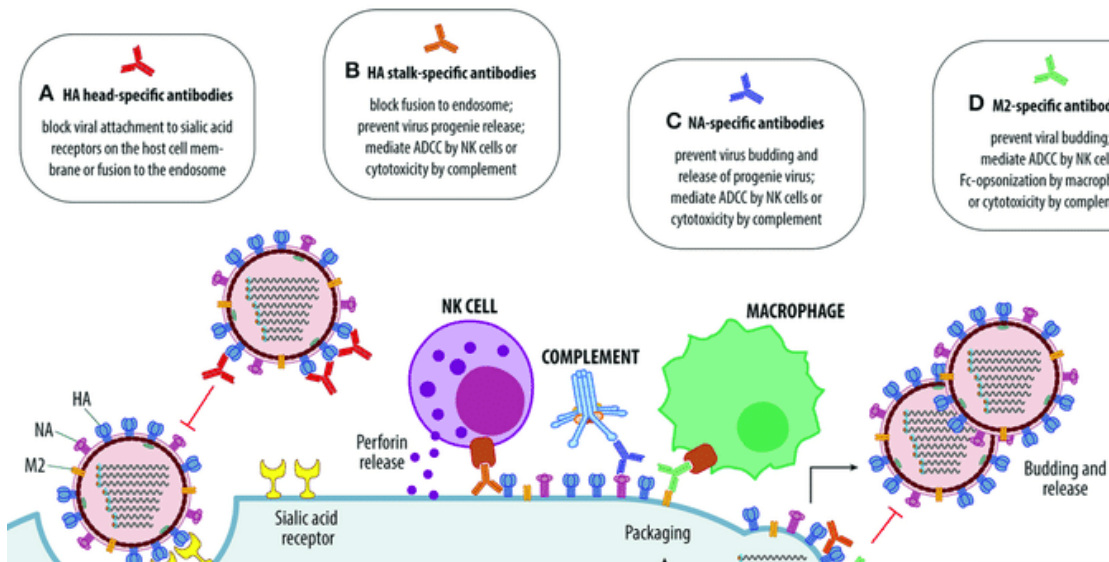


图 1-4 A 型流感病毒中和抗体作用示意图(RAJAO et al., 2018)

Figure 1-4 Schematic diagram of neutralizing antibodies of influenza A virus

抗流感病毒单克隆抗体药物的研发,重中之重是可对所有主要亚型流感病毒都产生中和作用的抗体,一系列的具有广谱保护效果的单抗(bnAbs)被报道,大部分为抗 HA 与 NA 蛋白的单克隆抗体。抗 HA 蛋白的中和抗体多数为型特异性抗体,一般只针对单个亚型流感病毒(CHEN et al., 2018; LEE et al., 2021; WAN et al., 2020; WANG et al., 2015),在众多研究中,抗 HA 蛋白抗体产生广谱中和活性的关键在于识别的表位在所有亚型流感病毒中都高度保守。有三项代表性研究报道了 HA 头部的高度保守表位,这些表位都隐藏在 HA 蛋白三聚体接触面,FluA-20、S5V2-29 为从接种流感季节性疫苗的人群中分离得到,8H10 是通过设计糖基化修饰的 HAs 免疫动物后分离出的,这些抗体展示出优于以往其他抗体的中和活性,可识别几乎所有 HA 亚型,动物实验表明,这些抗体可预防和治疗多种亚型流感病毒的感染(BAJIC et al., 2019; BANGARU et al., 2018; WATANABE et al., 2019)。RBS 域 220-loop 为大多数抗 HA 蛋白广谱中和抗体的关键作

用位点, 通过影响抗原与细胞受体结合发挥中和作用(HSIEH et al., 2022; WU et al., 2019), 另一方面, 一些抗体不产生体外中和活性, 在研究中很容易被筛选掉, 研究表明, 不产生体外中和活性的抗体可通过 Fc 片段介导的体液免疫效应与空间位阻效应发挥体内保护效应, 这也是中和抗体发挥作用的另一重要途径(ARUNKUMAR et al., 2019; KO et al., 2021; QIU et al., 2020)。抗 HA 蛋白抗体靶向 HA2 蛋白时, 也可产生广谱中和活性, 因为 HA2 蛋白相较于 HA 头部结构域其序列高度保守, 不易发生突变, 但是 HA2 靶向抗体的中和活性不如靶向 HA 头部的中和抗体。NA 蛋白作为奥司他韦药物的作用靶点, NA 蛋白诱导产生的抗体靶向 NA 蛋白的活性位点时, 可阻断流感病毒粒子的组装与释放, 抗 NA 蛋白抗体通常展现出更广泛的交叉反应, 但大多局限于特定亚型内(XIONG et al., 2020)。Stadlbauer 等 H3N2 感染个体内通过单个 B 细胞测序分离出多株单克隆抗体 (1G04、1E01 与 1G01), 均显示出广泛的异型亚型结合活性, 可以结合所有 NA 亚型与 B 型流感病毒 NAs, 并显示出高的中和活性与以及体内保护效应(STADLBAUER et al., 2019)。

1.4 研究的目的是和意义

流感病毒由于自身突变和基因重组导致新型病毒的产生, 持续威胁公共卫生安全。2013 年在中国出现重组 H7N9 亚型流感病毒感染人的事件, 2016 年底发现该病毒在碱性裂解位点插入多个碱性氨基酸, 进化为高致病性, 至今已引起五波人类感染, 为避免 H7N9 亚型流感病毒对家禽业和人类健康造成严重损害, 迫切需要高效的预防与治疗药物。单克隆抗体具有高特异性、重复性强、可大量生产等优点, 是血清学与免疫学研究重要部分, 有大量单克隆抗体药物被报道, 并应用于各种疾病的预防与治疗中。在本研究中, 构建筛选得到 6 株特异性识别 H7N9 亚型流感病毒 HA1 蛋白的单克隆抗体, 通过对其生物活性与特异性鉴定, 筛选出生物活性高的抗体, 选取中和活性高的单抗筛选中和抗原表位以及验证单抗在体内的应用前景。本研究结果为流感疫苗的设计提供新思路, 以期更有效预防与治疗 H7N9 亚型流感病毒的感染。

第二章 抗 H7N9 亚型流感病毒 HA1 蛋白单克隆抗体的制备与特性研究

本实验室前期通过对小鼠免疫 H7N9 亚型流感病毒 HA1 蛋白，利用杂交瘤细胞技术制备出一批杂交瘤细胞株，本章节首先对单克隆抗体进行制备与纯化，鉴定单克隆抗体特异性与中和活性，筛选出高特异性中和 H7N9 亚型流感病毒的单抗，再通过 HI 活性、ADCC 效应与吸附试验对单抗产生中和活性的机制进行阐明。

2.1 材料方法

2.1.1 细胞和实验动物

MDCK、HEK293T、A549 细胞购自 ATCC；杂交瘤细胞株由本实验室保存；BALB/c 小鼠购自维通利华实验动物有限公司；研究所使用毒株 H7N9 流感病毒（A/Environment/Suzhou/SZ19/2014）由本实验室于 2014 年从环境样品中分离鉴定并保存。

2.1.2 主要试剂

Flag-HRP 抗体、DMSO、羊抗鼠 IgG-HRP 均购自 Sigma 公司；Clone easy 培养基购自博奥龙公司；Alexa Fluor® 488 conjugated 羊抗鼠二抗购自 ZSGB-BIO 公司；脱脂乳购自 BD 公司；ELISA 板、DMEM 培养基购自 HyClone 公司；Clono typing System/HRP Kit 亚型鉴定试剂盒购自 SBA 公司；DAPI 购自碧云天公司；脂质体 2000 购自 Invitrogen 公司；GAPDH 一抗购自 Abcam 公司；NP 抗体购自 Sino Biological 公司；本实验所用引物均由北京擎科新业生物技术有限公司合成。

2.1.3 主要仪器

本研究所使用的仪器与设备见表 2-1。

表 2-1 主要仪器与设备

Table 2-1 The apparatus and equipment

仪器	生产厂家
蛋白凝胶电泳仪	美国 BIO-RAD 公司
PCR 仪	德国 Eppendorf 公司
光学倒置显微镜及荧光显微镜	日本尼康公司
SX 型 X 光胶片洗片机	泰兴市苏星有限公司
小型冷冻离心机、恒温 CO ₂ 培养箱、酶标仪	美国 ThermoFisHer 公司
低温高速离心机	Beckman 公司
电子天平	Sartorius 公司

2.1.4 杂交瘤细胞的冻存与复苏

将杂交瘤细胞于液氮中取出后，迅速置于 37°C 水浴锅进行快速融化后，加入含 20% FBS、0.5% 双抗的 DMEM 培养基 15 mL，18 h 后待细胞贴壁后，更换新的培养基，细胞密度 80% 时，进行传代。

杂交瘤细胞生长至合适密度后，将细胞转移至 15 mL 离心管，1200 r/min 离心 10 min，弃上清，使用含 90% 血清、10% DMSO 的冻存液重悬细胞后，分装至细胞冻存管，每管 1 mL，将细胞置于加入异丙醇的细胞冻存盒内，于 -80°C 冰箱内冻存 24 h 小时后，转移至液氮罐中长期保存。

2.1.5 腹水的制备

领取 6~8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠，适应一周后，使用液体石蜡油将其致敏，每只腹腔注射 0.5 mL，一周后，每只小鼠接种 $10^5 \sim 10^6$ 个阳性杂交瘤细胞，密切关注小鼠的健康状态，待其腹部膨胀发紫即可收取腹水。收集完的腹水转移至离心管中，2000 r/min 离心 20 min，吸上清保存至 -80°C 备用。

2.1.6 单抗亚类鉴定

使用 SBA Clonotyping TM System/HRP 试剂盒对抗进行亚类鉴定，具体方法如下：

准备溶液：ABTS 底物储备溶液为 15 mg ABTS 粉末溶解在 1 mL 双蒸水中，2~8°C 保存；底物溶液为 10 mL pH 4.0 的柠檬酸底物缓冲液（50 mL 双蒸水+525 mg 柠檬酸）、0.2 mL ABTS 原液、10 μ L 30% H₂O₂；

操作步骤：稀释捕获抗体浓度至 5 μ g/mL，每孔加入 0.1 mL，使用封板膜封好 ELISA 板后，在 2~8°C 环境下孵育至少 12 h，包被结束后使用 0.05% PBST 溶液清洗三次；每孔加入 1% BSA 溶液 300 μ L，室温封闭 1 h 后，0.05% PBST 溶液清洗三次；每孔加入杂交瘤细胞上清 0.1 mL，混匀后室温放置 1 h，0.05% PBST 溶液清洗三次；稀释检测抗体至 1 μ g/mL，每孔加入 0.1 mL，室温孵育 1 h，0.05% PBST 溶液清洗三次；每孔加入 0.1 mL 底物溶液，15 min 后，读取每个孔在 405 nm 处的吸光值。

2.1.7 血凝抑制实验 (HI)

4 单位抗原的配置：先对毒株的 HA 效价进行测定，在血凝板上所有孔内加入 25 μ L PBS，第 1 孔加入 25 μ L 病毒液上清；从第 1 孔至第 11 孔连续 2 倍倍比稀释，稀释时避免产生气泡，第 12 孔作为阴性对照孔；每孔再加入 25 μ L PBS，轻轻混匀；所有孔内加入 25 μ L 1% 鸡红细胞；放置 15 min 后，将血凝板倾斜，记录 HA 效价。如若 HA 效价为 128，则需稀释 32 倍配置成 4 单位抗原，配置完成后对 4 单位抗原进行血凝验证。

HI 效价测定：在血凝板上每孔加入 25 μ L PBS；每列第一孔加入 25 μ L 待检杂交瘤细胞上清或腹水，2 倍倍比稀释至第十孔，第十一孔为阳性对照孔（血抑价 $> 2^4$ ），最后 1 孔为阴性对照孔（血抑价 $< 2^2$ ）；第一至第十一列每孔加入 25 μ L 4 单位抗原，放置 15 min，所有孔内加入 25 μ L 1% 鸡红细胞，轻轻混匀，放置 15 min，读取未血凝孔的个数；结果的准确性应通过阳性对照血清

和阴性对照血清来进行判定。

2.1.8 酶联免疫吸附实验 (ELISA)

将灭活的 SZ19 全病毒颗粒包被 ELISA 板, 每孔 100 ng, 37°C 2 h 或 4°C 过夜, 包被结束后, 0.05% PBST 溶液清洗三次; 每孔加入 300 μ L 2% BSA 封闭 2 h, 0.05% PBST 溶液清洗三次; 以梯度稀释的杂交瘤细胞上清与腹水作为一抗, 每个稀释度三个复孔, 每孔 100 μ L 室温孵育 2 h, 0.05% PBST 溶液清洗三次; 以羊抗鼠 IgG-HRP 酶标二抗, 每孔 100 μ L, 室温孵育 1 h, 每孔加入 100 μ L TMB 显色液, 室温下避光显色 15 min; 显色结束后, 每孔加入 100 μ L 终止液, 测定 450 nm 处的 OD 值, 以阳性值/阴性值 (P/N) \geq 2.1 标准判读阳性。

2.1.9 间接免疫荧光实验 (IFA)

爬片的准备: 将新爬片取出后, 裁剪至合适的尺寸, 自来水冲洗掉表面的杂质, 放置在浓硫酸中过夜浸泡, 取出爬片后在自来水下冲洗直至硫酸冲洗干净, 晾干后再置于无水乙醇中, 使用时捞出处理。用镊子夹取适量爬片, 使用酒精灯将酒精灼烧干净, 放入细胞板或细胞孔内晾干, 每孔放置一个爬片。配置 1 mg/mL 的多聚赖氨酸, 配置的溶液使用滤器过滤后冻存备用, 使用时 10 倍稀释后, 每孔加入 300 μ L 对爬片进行包被, 15 min 后将多聚赖氨酸弃掉, 于超净工作台内晾干备用。

细胞爬片制备: 取生长状态良好的细胞, 胰酶消化后使用完全培养基重悬, 转移至离心管内离心去除胰酶, 使用完全培养基充分吹打混匀, 形成均匀的单细胞悬液。取出多聚赖氨酸包被的细胞板, 选择合适细胞密度缓慢滴入细胞板内。接种细胞前, 可在爬片下滴入少量培养基, 再缓慢放下爬片压紧, 防止形成双层细胞爬片。

细胞的固定及免疫荧光: 待细胞生长至 80% 密度时, 将质粒或病毒按照标准操作流程转入细胞后, 继续培养 24 h。弃掉培养基, 使用 PBS 将细胞清洗 3 次, 3 min/次; 每孔加入 300 μ L 4% 多聚甲醛, 作用 30 min, 将细胞固定至爬片上, 弃掉多聚甲醛后, PBS 清洗 3 次, 用 -20°C 无水甲醇洗一遍再加入 1 mL 预冷的无水甲醇, 置于 -20°C 冰箱放置 20 min, 20 min 后用 -20°C 的 75% 乙醇洗一遍再加入 1 mL 预冷的 75% 乙醇, 置于 -20°C 冰箱保存备用; 如有通透需要, 每孔加入 300 μ L 0.5% TritonX-100 通透 30 min, 弃掉 TritonX-100 后, PBS 清洗 3 次; 每孔加入 300 μ L 10% 脱脂乳室温封闭 45 min, 封闭后不用清洗, 直接孵育稀释后的杂交瘤细胞上清或腹水, 4°C 过夜或 37°C 孵育 2 h; 取出杂交细胞上清或腹水后, PBS 清洗细胞 5 次, 5 min/次; 每孔加入 300 μ L 合适浓度二抗, 孵育 90 min, 从孵育二抗开始, 之后的每一步都在暗处进行; 去除荧光二抗后, 使用 PBS 清洗 8 次, 5 min/次, 更好的清除非特异性结合与背景荧光; 在载玻片上滴加适量加入抗荧光淬灭剂的 DAPI, 将爬片轻轻覆盖在 DAPI 上, 用吸水纸将残留的液体吸干后, 置于荧光显微镜下观察并采集图像。

2.1.10 蛋白电泳及免疫印迹 (WB) 分析

将配置好的蛋白胶板, 插入电泳槽内, 电泳槽中加新配置的 1 \times Running Buffer, 拔掉梳齿, 用移液枪吹洗胶孔数次后加入制备好的蛋白样品, 随后浓缩胶恒压 80 V 电泳 30 min, 分离胶恒

压 150 V 电泳 50 min；电泳期间，配置转膜液（ddH₂O：10×PAGE 转膜液：无水甲醇=7:1:2），置于冰上预冷；电泳结束后，轻轻取下凝胶，放置在铺有海绵、滤纸和 NC 膜的转膜夹板内，保证凝胶与 NC 膜的紧密相帖；夹板按照正负极方向插入转膜槽中，加入预冷 PAGE 转膜液，槽外加入冰水混合物保持低温，300 mA 或 600 mA 恒流 150 min；转膜结束后，NC 膜置于 TBS 配置的 5% 脱脂奶中室温封闭 1 h，封闭结束后，直接孵育相应的一抗，室温 2 h，0.1% TBST 清洗三次，每次 3 min，孵育稀释好的酶标二抗室温 1 h，0.1% TBST 清洗三次，每次 3 min，滴加 ECL 化学发光底物后进行显影，采集图像。

2.1.11 单抗亲和力检测

使用最佳包被量的特异性抗原包被固相载体，每孔 100 μL，4℃过夜；弃掉孔内液体，加入 200 μL 1×0.05% PBST 清洗，将孔内液体倒出，在吸水纸上拍净，重复清洗 3 次，每次 3 分钟，每一步结束后都要进行清洗；每孔加入最佳封闭剂 200 μL，37℃封闭 2 h；将最佳稀释度的抗体，每孔加 100 μL，使用封板膜封板后微量振荡器或手动方式，震动 30 秒，37℃孵育 1 h；每孔加入 100 μL 不同浓度的硫氰酸钠溶液（pH 7.4 的 PBS 稀释），37℃孵育 15 min，对照组使用 PBS 孵育；加入 100 μL HRP 标记的二抗（最佳封闭剂稀释），使用封板膜封板后微量振荡器或手动方式，震动 30 秒，室温孵育 1 h；加入 100 μL TMB，室温显色 3~15 min 后，加入 100 μL 终止液终止显色；在 450 nm 波长处测定各孔 OD 值，数据读取应在 30 min 内完成。亲和力由洗脱 50% 抗体结合（阳性对照孔为 100% 结合）时的硫氰酸钠浓度表示。

2.1.12 单抗中和活性检测

中和活性的测定使用固定抗原稀释血清法，具体操作如下：

准备：复苏处理 MDCK 细胞，连续传代至所需数量细胞，铺 96 孔细胞板备用；中和实验时需用 100 TCID₅₀ 单位/孔，每孔中病毒液体积为 0.02 mL，相当于 500 TCID₅₀ 单位/0.1 mL，所以应将已知 TCID₅₀ 的病毒液稀释 500 倍，制备成 500 TCID₅₀ 单位/0.1 mL 病毒液；每种杂交瘤细胞上清与腹水稀释 12 个稀释度，每个稀释度 4 个复孔。另设病毒对照孔（阳性对照孔）、血清对照孔（阴性对照孔）和空白细胞孔。0.09 mL 不同稀释度的血清，各加入同体积的病毒液，混匀后置 4℃ 2 h 或室温 1 h，病毒对照为用同体积培养基代替血清，血清对照为同体积培养基代替病毒液，空白细胞对照孔中只含培养基。

血凝测定法：每个稀释度血清与病毒混合液接种 4 孔，0.04 mL/孔，接种细胞时，最好每个血清稀释度换一支枪尖或从最低血清稀释度（1:10）开始往高稀释度顺序加，然后每管再补加 0.06 mL 维持液，置 37℃孵育 72 h；通过血凝活性检测结果，具体步骤参照 2.1.7，病毒对照孔 HA 呈阳性，血清与正常细胞对照呈阴性。

50% 中和滴度的计算：能保护 50% 细胞孔不被感染的血清稀释度的倒数作为中和滴度，计算公式为 $\log 50\% \text{中和滴度} = L - d(s - 0.5)$ 。其中 L 为最低稀释度，在此为 -1，d 为每 log 稀释度的间距，在此为 0.3，s 为被感染细胞比例之和。

Cell-base ELISA 检测法：将加入混合液培养 20 h 后的细胞板拿出，弃掉培养基，PBS 清洗 3 次后，加入 4% 多聚甲醛固定 30 min，PBS 清洗 3 次后，加入 0.5% TritonX-100 通透 30 min，PBS

清洗 3 次；加入合适浓度的抗流感病毒 NP 抗体，室温孵育 2 h 后，PBS 轻轻清洗 5 次，3 min/次；加入合适浓度 HRP 标记二抗，室温孵育 50 min，PBS 清洗 5 次，3 min/次，每孔加入 50 μ L TMB 显色液，室温避光显色 15 min，加入 50 μ L 终止液终止显色，测定各孔在 450 nm 处的吸光值。中和抑制率=1-（每个稀释度血清 OD 值-阴性对照 OD 值）/（阳性对照 OD 值-阴性对照 OD 值），在计算之前，所有孔 OD 值减去空白孔的 OD 值。根据计算出的每个血清稀释度的中和抑制率与浓度，可将中和抑制率转化为标准曲线，根据得出的公式计算 IC₅₀。

2.1.13 抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用（ADCC）检测

H7-HA 蛋白稳转细胞系建立：取 293T 细胞于细胞培养皿中培养至 50% 密度，按照脂质体转染标准操作步骤，将 4 μ g 的 psPAX2、4 μ g 的 pMD2G 以及 8 μ g 的 Phage 载体 H7-HA 蛋白质粒共转至细胞内，转染完成后 8 h 换用无双抗的完全培养基，继续培养 48 h 后，将上清过滤后冻存，获得慢病毒液；每毫升慢病毒液内加入聚凝胺后混匀感染细胞，每天更换加有双抗的培养基，同时设置对照组，培养 14 天后可见单克隆细胞群出现，挑取单克隆细胞于 48 板内，每孔挑取 50 个单克隆细胞，培养至合适密度后，转移至 24 孔板内，待得细胞长满后，收取细胞，制备样品进行 WB 鉴定目的基因是否表达。

乳酸脱氢酶检测：实验前铺 96 孔细胞板，要求每孔细胞量尽量均匀，细胞密度 90% 时开始实验，从 37 $^{\circ}$ C 培养箱中取出细胞板室温平衡至 22 $^{\circ}$ C（约 20~30 min），将抗体、阳性对照与溶解溶液（最大 LDH 释放控制，每孔 2 μ L 溶解溶液）添加到 96 孔板中，每种样品 4 个复孔，每孔 100 μ L；每孔加入 25 μ L CytotoxOne™ 试剂，混匀后 22 $^{\circ}$ C 孵育 10 min；每孔添加 50 μ L 终止溶液；晃动平板 10 s，记录激发波长为 560 nm 和发射光谱波长 590 nm 的荧光；结果计算：从所有荧光值中减去培养基背景的平均荧光值。使用实验、LDH 最大释放量和培养基背景的平均荧光值计算给定实验治疗的细胞毒性百分比。

细胞毒性百分比=（各稀释度荧光值-空白背景荧光值）/（LDH 最大释放孔荧光值-空白背景荧光值） \times 100%

2.1.14 吸附实验

A549 细胞铺 12 孔板，细胞密度 100% 时进行实验；将抗体与不同感染剂量的病毒混合，抗体终浓度为 1 μ g/mL，4 $^{\circ}$ C 孵育 2 h；取出细胞后，使用预冷 PBS 洗涤细胞表面三次；将抗体与病毒的混合液加入洗好的细胞板内，4 $^{\circ}$ C 孵育 1 h；孵育结束后，去除混合物，冷 PBS 清洗细胞三次，收取样品进行 WB 与提取总 RNA 进行 qPCR。

2.1.15 内化实验

加入抗体与病毒混合液孵育后，使用蛋白酶 K 将细胞表面的病毒清洗掉，其余同 2.1.14。

2.1.16 实时荧光定量 PCR

试剂配制：三氯甲烷（氯仿）；异丙醇；0.1% DEPC 处理水：每 1000 mL 水中加入 1 mL 的

DEPC 原液；4℃搅拌过夜，高温灭菌使 DEPC 失活；4℃保存（长期需保存于-20℃）；75%乙醇：75 mL 乙醇中加入 25 mL DEPC 水，混匀。

细胞总 RNA 提取：贴壁细胞用 PBS 洗 2 遍后加入 1 mL Trizol，室温静置 5 min 后，吹打混匀后移入 1.5 mL 离心管中；加入 0.2 mL 的三氯甲烷，剧烈振荡 15 s 以上，充分乳化后，放置 5 min；4℃ 12000 r/min 离心 15 min；将上清转移至新的离心管中，并加入等体积的异丙醇，充分混匀后放置 10 min；4℃ 12000 r/min 离心 10 min，弃上清；缓慢地沿离心管壁加入 1 mL 75%乙醇，轻柔的上下颠倒洗涤，4℃，12000 r/min 离心 5 min；去上清，室温静置 10 min，去除残留乙醇，加入 32 μL RNase-Free Water，溶解 RNA，随后立即反转录，37℃孵育 2 h 以上，反转录体系如表 2-2 所示。反转录结束后，按表 2-3、2-4 所示体系与程序进行荧光定量 PCR 检测。

表 2-2 反转录体系

Table 2-2 Reverse transcription system

组分	体积
RNA+引物	34 μL
M-MLV RT	1 μL
RRI	1 μL
dNTP	4 μL
M- MLV RT Buffer	10 μL

表 2-3 实时荧光定量 PCR 体系

Table 2-3 Quantitative Real-time PCR system

组分	体积
2×SYBRGreen mix (含 ROX)	10 μL
Forwardprimer (2 μM)	2 μL
Reverseprimer (2 μM)	2 μL
cDNA	2 μL
ddH ₂ O	4 μL

表 2-4 实时荧光定量 PCR 程序

Table 2-4 Quantitative Real-time PCR program

Step 1: 预变性	Step 2: PCR 反应	Step 3: 溶解曲线步骤:
循环数: 1 95°C 30 s	循环数: 45	95°C 15 s
	95°C 5 s	60°C 60 s
	60°C 30~60 s	90°C 30 s
		60°C 15 s

2.2 结果

2.2.1 亚类鉴定

按照 SBA Clonotyping TM System/HRP 试剂盒操作对单抗的亚类进行了鉴定，捕获抗体包被 ELISA 板，将单抗杂交瘤细胞上清作为一抗孵育，单抗各亚类的检测抗体稀释到合适浓度后，显色读值。结果如表 2-5 所示，6 株单抗均为具有 κ 轻链的 IgG_{2b} 亚型。

表 2-5 单抗的亚类鉴定

Table 2-5 Subclass identification of monoclonal antibodies

细胞株	亚类	轻链
2B2B3	IgG _{2b}	κ
3C5D6	IgG _{2b}	κ
4E12D6	IgG _{2b}	κ
4H1E8	IgG _{2b}	κ
7H9A6	IgG _{2b}	κ
9F10G3	IgG _{2b}	κ

2.2.2 血凝抑制 (HI) 效价测定

取扩增的 SZ19 病毒液测定 TCID₅₀ 后，制备 4 单位抗原，之后将制备的单抗杂交瘤细胞上清和腹水梯度稀释后，分别与 SZ19 病毒进行 HI 活性的检测，结果如表 2-6 所示 6 株单抗均无 HI 活性。

2.2.3 单抗亲和力检测

将 SZ19 灭活病毒粒子包被 ELISA 板之后，6 株单抗作为一抗，之后使用不同浓度的硫氰酸钠进行洗脱 15 min 后，孵育酶标二抗测定 OD_{450nm} 吸光值，亲和力由洗脱 50% 抗体结合时的硫氰酸钠浓度表示，结果见表 2-6，三株单抗 (4H1E8、7H9A6、9F10G3) 具有较高的亲和力。

2.2.4 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 效价测定

将 H7N9 亚型流感病毒加入甲醛灭活后，蔗糖密度梯度低温超速离心制备灭活全病毒颗粒蛋白，包被 ELISA 板后，将 6 株单抗的杂交瘤细胞上清或腹水梯度稀释后，检测与 H7N9 亚型流感病毒全病毒颗粒蛋白的反应，结果如表 2-6 所示，6 株单抗都具有较高的 ELISA 效价，达 2¹² 以上，其中 7H9A6 株的效价最高，可达 2¹⁸。

表 2-6 单抗特性鉴定

Table2-6 Characterization of monoclonal antibodies

细胞株	HI 效价	亲和力	效价
2B2B3	0	0.67	$>2^{12}$
3C5D6	0	0.58	$>2^{15}$
4E12D6	0	0.67	$>2^{16}$
4H1E8	0	1	$>2^{16}$
7H9A6	0	1.08	$>2^{18}$
9F10G3	0	1	$>2^{13}$

2.2.5 间接免疫荧光（IFA）特异性检测

将 H1、H3、H5、H6、H7 亚型 HA 蛋白真核表达质粒转染 A549 细胞后，将 6 株单抗作为一抗孵育，检测单抗特异性，结果如图 2-1 与 2-2 显示，6 株单抗均特异性识别 H7 亚型流感病毒 HA 蛋白，与 H1、H3、H5、H6 亚型流感病毒 HA 蛋白无交叉反应；同时可识别多株 H7N9 亚型流感病毒 HA 蛋白。

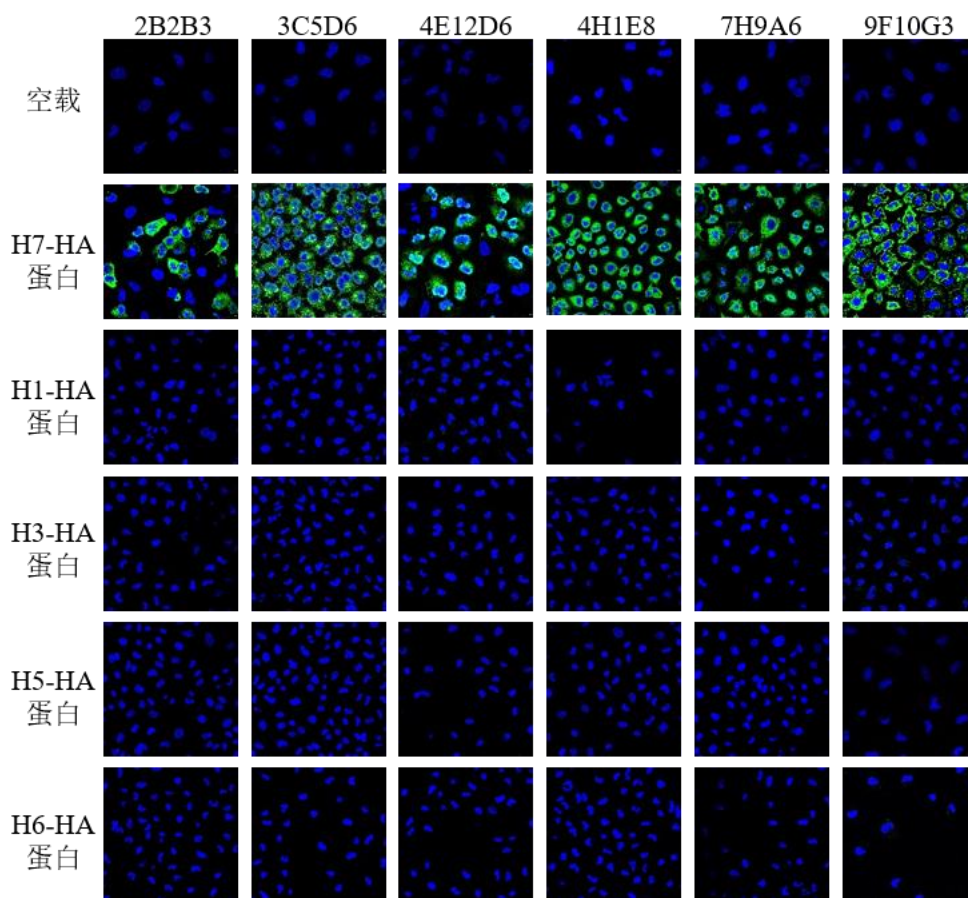


图 2-1 单抗特异性识别 H7 亚型流感病毒 HA 蛋白

Figure2-1 Monoclonal antibodies specifically recognize the HA protein of H7 influenza virus

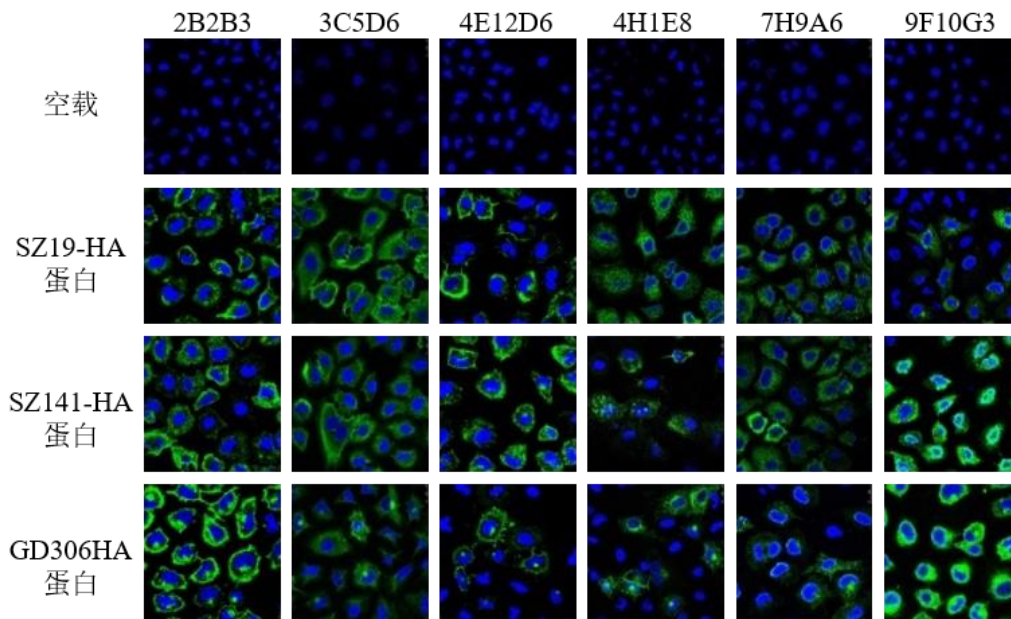


图 2-2 单抗特异性识别 H7N9 亚型流感病毒 HA 蛋白

Figure2-2 Monoclonal antibodies specifically recognize the HA protein of H7N9 influenza virus

2.2.6 蛋白免疫印迹 (WB) 特异性检测

将 H1、H3、H5、H7、H9、H10 真核表达质粒转染 HEK293T 细胞制备蛋白样品，WB 检测单抗对其的识别能力，结果如图 2-3-A 所示，6 株单抗均特异性识别 H7 亚型流感病毒 HA 蛋白，与 H1、H3、H5、H9、H10 亚型流感病毒无交叉反应；同时制备三株 H7N9 亚型流感病毒毒株灭活全病毒颗粒样品进行 WB，6 株单抗均可识别三株 H7N9 亚型流感病毒颗粒。(图 2-3-B)。

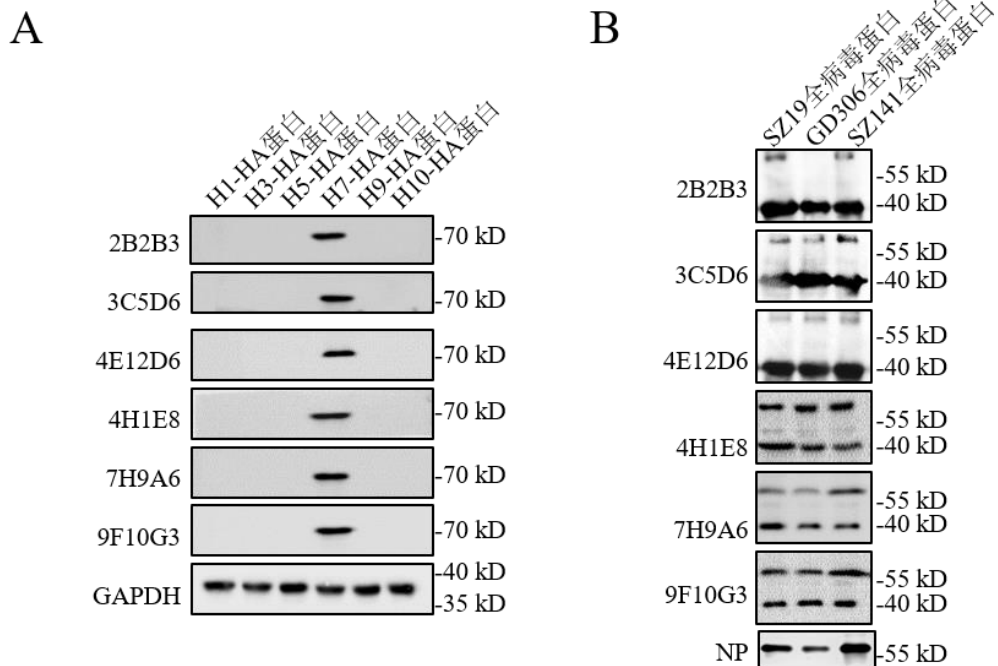


图 2-3 单抗特异性识别 H7 亚型流感病毒 HA 蛋白与病毒颗粒

Figure2-3 Monoclonal antibodies specifically recognize the HA protein of H7 influenza virus and virus particles

2.2.7 单抗中和活性检测

将杂交瘤细胞上清液或腹水梯度稀释液与 100 TCID₅₀ 单位的 H7N9 亚型流感病毒在 37°C 等体积混合 1 小时，将该混合物加入到培养的 MDCK 细胞中，用抗流感病毒核蛋白 (NP) 单克隆抗体间接 ELISA 法测定病毒感染。使用 GraphPad Prism 7 软件(GraphPad software, San Diego, CA, USA)测定将感染降低到 50% 的最终抗体浓度 (IC₅₀)。结果显示 (图 2-4)，单克隆抗体对 H7N9 亚型流感病毒的中和作用均呈剂量依赖性，其中 4H1E8 和 7H9A6 的中和活性最高，IC₅₀ 分别为 12.59 ng/μL 和 25.1 ng/μL。

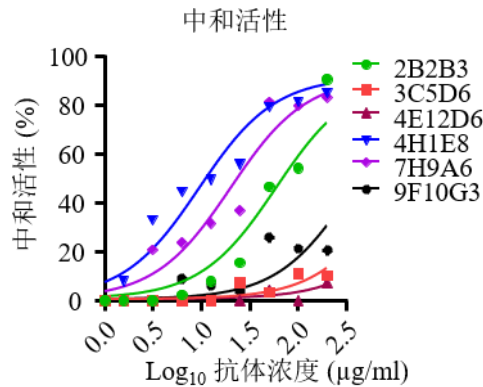


图 2-4 抗体中和实验

Figure 2-4 Neutralizing activity of monoclonal antibodies

2.2.8 单抗体内保护效应机制

为了验证单抗在体内产生保护效应的机制，构建 H7N9 亚型流感病毒 HA 蛋白稳转细胞系，利用乳酸脱氢酶检测法测定单抗在体内是否可引起 ADCC 效应，ADCC 效应实验表明，6 株单克隆抗体均不能诱导出有效的 ADCC 效应 (图 2-5-A)；通过将抗体与病毒颗粒混合后静置，再加入细胞中，研究单抗在病毒吸附与组装过程中是否发挥作用，数据表明 (图 2-5-B)，在吸附实验中，中和活性最高的 4H1E8 和 7H9A6 抗体明显阻断了 H7N9 亚型流感病毒的附着，而中和活性较低的 9F10G3 则没有阻断病毒附着。

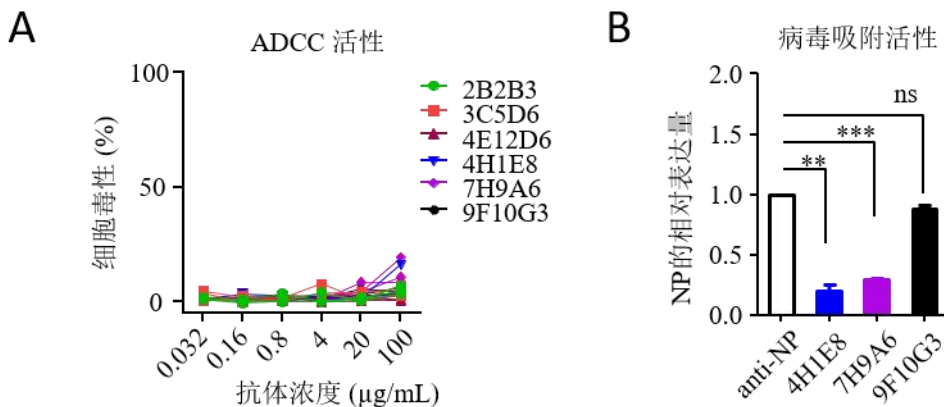


图 2-5 单抗可阻断病毒粒子的吸附

Figure 2-5 mAbs block the adsorption of virions

2.3 小结

本章研究筛选得到六株特异性识别 H7N9 亚型流感病毒的特异性抗体,对其中和活性鉴定后,六株特异性抗体中和活性均呈剂量依赖式作用,其中 4H1E8 与 7H9A6 两株抗体中和活性较高;免疫学研究结果显示,筛选出的中和抗体通过阻断 H7N9 亚型流感病毒的吸附过程来发挥中和作用。

2.4 讨论

H7N9 亚型流感病毒是一种重组病毒,由多株流感病毒重排产生,最初只在禽间发现,只引起轻微症状,经过多年的流行与传播,H7N9 流感病毒的宿主与感染性发生了改变。2013 年,中国出现人感染 H7N9 亚型流感病毒的病例,病死率极高,约为 40%,临床出现严重症状,表现为呼吸道感染,伴随呼吸窘迫症,器官衰竭等并发症。随着流感病毒抗原的不断漂移与变异,H7N9 亚型流病毒也在快速的进化,以适应在宿主体内的生长,研究表明,H7N9 亚型流感病毒已经对常见的 M2 通道抑制剂等流感抗病毒药物产生了耐药性,并出现变异株,对人类健康产生潜在威胁。因此,如何快速检测与预防治疗 H7N9 亚型流感病毒都显得至关重要。

单克隆抗体已被广泛用于流感病毒的检测中,并呈现出良好的效果。Nishiyama 等利用 H5 亚型流感病毒抗体,通过荧光素标记成为标记抗体,与便携式分析仪联用,实现了对 H5 亚型流感病毒的高效现场诊断与监测(NISHIYAMA et al., 2020);利用单抗开发出来的检测试剂与方法,都明显的改进了对目的成分检测效率,如阻抗性免疫传感器、量子点层析技术、免疫组化法(CHEN et al., 2019; LI et al., 2020; WANG et al., 2020)等。部分研究显示通过对单克隆抗体的改造与优化,可以提高其特异性与亲和力。这些检测方法均将抗原抗体的特异性反应与不同领域、不同材料、不同设备结合,从而达到快速、准确、灵敏诊断的目的。

目前针对抗流感病毒单抗药物,大多数针对 HA、NA 及 M2 蛋白,因其在病毒颗粒表面起到重要作用,抗体通过与之结合阻断病毒在宿主体内的增殖来达到治疗的作用。针对 HA 蛋白的治疗性单抗,大多数针对较为保守的 HA 茎部,因此普遍具有广谱治疗效果,如单抗 CR6261、F10 和 C179 等(DREYFUS et al., 2013; PRACHANRONARONG et al., 2019; SUTTON et al., 2017)。靶向 HA 头部的治疗性单抗作用范围则较窄,但中和活性较强。单抗 CR6261 和 MEDI8852(PAULES et al., 2017)都已进入临床试验,有望上市成为治疗流感的药物。抗 NA 蛋白抗体在中和流感病毒方面也展现出较大的潜力,近年来有研究鉴定出位于 A 型和 B 型流感病毒 NA 蛋白上的通用表位,具有设计流感通用疫苗潜力(CHIDA et al., 2020)。由于 M2 蛋白在不同亚型流感病毒中高度保守,其胞外域已成为设计疫苗和治疗型单抗的潜在靶点,识别 M2 蛋白的抗体更多的被应用于检测。

对流感病毒的检测与治疗的关键在于获得生物活性与特异性高的单克隆抗体。本研究中利用杂交瘤细胞技术,成功制备筛选出 6 株单克隆抗体(2B2B3、3C5D6、4E12D6、4H1E8、7H9A6、9F10G3),并对其特异性与生物活性进行了检测。IFA 结果显示,6 株抗体均能特异性识别 H7N9 病毒的 HA 蛋白,且能识别多株 H7N9 亚型流感病毒毒株,不与其他亚型流感病毒交叉反应。WB 与 ELISA 表明单抗可与 H7N9 亚型流感病毒颗粒发生反应,与 IFA 和 WB 得到的结果一致;单抗 4H1E8、7H9A6、9F10G3 展示出较高的亲和力,有趣的是 6 株单抗都不具有 HI 活性。

由于 6 株单克隆抗体均与 H7N9 亚型流感病毒发生反应,本研究分析了 6 株单克隆抗体对一株早期低致病性 H7N9 病毒株 (A/Environment/Suzhou/SZ19/2014) 的中和活性,单克隆抗体对 H7N9 亚型流感病毒的中和均呈剂量依赖性,其中 4H1E8 和 7H9A6 的中和活性最高,IC₅₀ 分别为 12.59 ng/μL 和 25.1 ng/μL。ADCC 效应实验表明,6 株单克隆抗体均不能诱导出有效的 ADCC 效应。由于 HA 头部结合的中和性抗体通常会阻断病毒吸附,随后分析了单克隆抗体是否阻断病毒附着。数据显示,中和活性最高的 4H1E8 和 7H9A6 抗体明显阻断了 H7N9 病毒的病毒附着,而中和活性较低的 9F10G3 则没有阻断病毒附着。

因此,本研究初步筛选得到特异性识别 H7N9 亚型流感病毒 HA1 蛋白且中和活性与亲和力较高的两株单克隆抗体 (4H1E8 与 7H9A6) 用于后续研究,验证其在临床上是否具有预防和治疗应用前景。

第三章 H7N9 亚型流感病毒 HA 蛋白抗原表位的鉴定与分析

上一章节的研究通过筛选得到两株高特异性中和 H7N9 亚型流感病毒的单克隆抗体 4H1E8 与 7H9A6，并验证其是通过影响流感病毒吸附过程发挥中和活性，但是单抗又无 HI 活性，不影响流感病毒与细胞受体的结合，其中必然存在其独特的作用机制。因此，本章通过鉴定单克隆抗体识别的抗原表位来对其作用机制进行深入研究。

3.1 材料与方法

3.1.1 主要载体、细胞

pRK-Flag、pRK-GFP 载体由本实验室保存；细胞详见 2.1.1。

3.1.2 主要试剂

DNA Marker 购自诺唯赞公司；限制性内切酶购自 NEB 公司；PrimerStar 高保真聚合酶购自 Takara 公司；ECL 化学发光底物购自 Millipore 公司；Western 相关试剂购自碧云天生物技术公司；NC 膜购自 Life Science 公司；MLV 反转录酶购自 Invitrogen 公司；；DMEM、Opti-MEM 培养基购自 Gibco 公司；其他试剂详见 2.1。本研究所用引物均由北京擎科生物技术有限公司合成。

3.1.3 主要仪器

蛋白电泳槽、转膜槽、微型垂直槽、多板灌胶器购自中国天能；e-Blot 电子压片成像仪购自伊宇特公司；其他仪器详见第二章所述。

3.1.4 引物设计

根据 SZ19-HA1 蛋白的基因序列，使用 Primer 5 软件设计截短体的特异扩增引物，同时在其上下游引物上插入同源臂与 *Sal I* 和 *Not I* 两个酶切位点，引物具体信息见表 3-1 至 3-6。

表 3-1 SZ19-HA1 蛋白第一轮截短引物

Table 3-1 Primers for the first round of SZ19-HA1 protein truncation

片段	序列 (5'-3')
pRK-SZ19-HA1-Flag-F	CGACGACGATGACAAGGGGTCGACCATGAACACTCAAATCCTGGT
pRK-SZ19-HA1-Flag-R	TGCATGCATGCTCGAGCGGCCGCTTATCTTCCCTTTGGAATCTCAG
pRK-SZ19-HA1-900-Flag-R	TGCATGCATGCTCGAGCGGCCGCTTAGTTACTTATTATTGTCCCAC
pRK-SZ19-HA1-750-Flag-R	TGCATGCATGCTCGAGCGGCCGCTTAATCATTGGGATTTAGCATT
pRK-SZ19-HA1-600-Flag-R	CATGCATGCTCGAGCGGCCGCTTATTGCTCTGCAGTTGAAACGGAGCTT
pRK-SZ19-HA1-450-Flag-R	TGCATGCATGCTCGAGCGGCCGCTTATGATCTCTTACATGCACTGG

表 3-1 (续)

片段	序列 (5'-3')
pRK-SZ19-HA1-151-Flag-F	CGACGACGATGACAAGGGGTCGACCGTGAACGAACAAACATC
pRK-SZ19-HA1-301-Flag-F	CGACGACGATGACAAGGGGTCGACCGGAAGTGATGTCTGTTATCC
pRK-SZ19-HA1-451-Flag-F	CGACGACGATGACAAGGGGTCGACCGGATCTTCATTCTATGCA
pRK-SZ19-HA1-601-Flag-F	CGACGACGATGACAAGGGGTCGACCACCAAGCTATATGGGAGT

表 3-2 SZ19-HA1 蛋白第二轮截短引物

Table 3-2 Primers for the second round of SZ19-HA1 truncation

片段	序列 (5'-3')
pRK-SZ19-HA1-339-Flag-F	GTTCCAGATTACGCGTCGACCATGGAAGCTCTGAGGCAAATTCT
pRK-SZ19-HA1-375-Flag-F	GTTCCAGATTACGCGTCGACCATGATTGACAAGGAAGCAATGGGA
pRK-SZ19-HA1-411-Flag-R	GCATGCTCGAGCGGCCGCTTATCCATTGTATGTGAATCCCAT
pRK-SZ19-HA1-450-Flag-R	GCATGCTCGAGCGGCCGCTTATGATCTCTTACATGCACTGGT

表 3-3 SZ19-HA1 蛋白第三轮截短引物

Table 3-3 Primers for the third round of SZ19-HA1 truncation

片段	序列 (5'-3')
pRK-SZ19-HA1-310-Flag-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCGTCTGTTATCCTGGGAAA
pRK-SZ19-HA1-319-Flag-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCCCTGGGAAATTCGTGAATGAA
pRK-SZ19-HA1-339-Flag-R	TGCGCCTGCAGGTCGCGGCCGCTTATTCATTACGAATTTCCC
pRK-SZ19-HA1-327-Flag-R	TGCGCCTGCAGGTCGCGGCCGCTTATTTCCCAGGATAACAGAC
pRK-SZ19-HA1-349-Flag-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCAGGCAAATTCAGAGAATCAGG
pRK-SZ19-HA1-358-Flag-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCCTCAGAGAATCAGGCGGAATT
pRK-SZ19-HA1-375-Flag-R	TGCGCCTGCAGGTCGCGGCCGCTTATCCGCTGATTCTCTGAG
pRK-SZ19-HA1-366-Flag-R	TGCGCCTGCAGGTCGCGGCCGCTTATCTCTGAGAATTTGCCT

表 3-4 SZ19-HA1 蛋白第四轮截短引物

Table 3-4 Primers for the fourth round of SZ19-HA1 truncation

片段	序列 (5'-3')
pRK-SZ19-HA1-107-122-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCCCTGGGAAATTCGTGAATGAAGAAGC
pRK-SZ19-HA1-107-122-GFP-R	TGCGCCTGCAGGTCGCGGCCGCTTATCTCTGAGAATTTGCCTCAGAG CTG
pRK-SZ19-HA1-110-122-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCTTCGTGAATGAAGAAGCTCTGAGGC

表 3-4 (续)

片段	序列 (5'-3')
pRK-SZ19-HA1-109-122-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCAAATTCGTGAATGAAGAAGCTCTGA GC
pRK-SZ19-HA1-108-122-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCGGGAAATTCGTGAATGAAGAAGCTC TGCA
pRK-SZ19-HA1-107-119-GFP-R	TGCGCCTGCAGGTCGCGGCCGCTTAAATTTGCCTCAGAGCTTCTTCA TTCAC
pRK-SZ19-HA1-107-120-GFP-R	TGCGCCTGCAGGTCGCGGCCGCTTAGAGAATTTGCCTCAGAGCTTCT TCATT
pRK-SZ19-HA1-107-121-GFP-R	TGCGCCTGCAGGTCGCGGCCGCTTATCTGAGAATTTGCCTCAGAGCT TCTTC
pRK-SZ19-HA1-117-125-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCAGGCAAATTCAGAGAATCAGGCA GG
pRK-SZ19-HA1-117-125-GFP-R	TGCGCCTGCAGGTCGCGGCCGCTTATCCGCCTGATTCTCT
pRK-SZ19-HA1-118-125-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCCAAATTCAGAGAATCAGGCGGA GCT
pRK-SZ19-HA1-119-125-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCAATTCAGAGAATCAGGCGGA
pRK-SZ19-HA1-120-125-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCCTCAGAGAATCAGGCGGAGCACGAT TGGC
pRK-SZ19-HA1-121-125-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCAGAGAATCAGGCGGA
pRK-SZ19-HA1-117-124-GFP-R	TGCGCCTGCAGGTCGCGGCCGCTTAGCCTGATTCTCTGAGAAT
pRK-SZ19-HA1-114-137-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCGAAGCTCTGAGGCAAATTCAGAG AATCAGGCGGA
pRK-SZ19-HA1-114-137-GFP-R	TGCGCCTGCAGGTCGCGGCCGCTTATCCATTGTATGTGAATCCCATTG CTTCCTTGTC AATCCGCCTGATTC
pRK-SZ19-HA1-114-125-GFP-R	TGCGCCTGCAGGTCGCGGCCGCTTATCCGCCTGATTCTCTGA
pRK-SZ19-HA1-114-128-GFP-R	TGCGCCTGCAGGTCGCGGCCGCTTACTTGTC AATCCGCCTGATTCTC T
pRK-SZ19-HA1-114-131-GFP-R	TGCGCCTGCAGGTCGCGGCCGCTTACATTGCTTCCTTGTC AATTC CGCCTGATTC
pRK-SZ19-HA1-114-134-GFP-R	TGCGCCTGCAGGTCGCGGCCGCTTATGTGAATCCCATTGCTTCCTTGT CAATCCGCCTGATTC
pRK-SZ19-HA1-117-137-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCAGGCAAATTCAGAGAATCAGGCG GAATTGACAAGGAAGCAATGGGA

表 3-5 SZ19-HA1 蛋白第五轮截短引物

Table 3-5 Primers for the fifth round of SZ19-HA1 truncation

片段	序列 (5'-3')
pRK-SZ19-HA1-343-411-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCGCTCTGAGGCAAATTCTCAGAGA ATCAGGCGGAATTGACAA
pRK-SZ19-HA1-343-411-GFP-R	TGCGCCTGCAGGTCGCGGCCGCTTATCCATTGTATGTGAATCCCAT TGCTTCCTTGCAATTCCGC
pRK-SZ19-HA1-346-411-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCCTGAGGCAAATTCTCAGAGAATC AGGCGGAATTGACAAGGA
pRK-SZ19-HA1-343-390-GFP-R	TGCGCCTGCAGGTCGCGGCCGCTTATGCTTCCTTGCAATTCCGC CTGAT
pRK-SZ19-HA1-343-387-GFP-R	TGCGCCTGCAGGTCGCGGCCGCTTATTCCTTGCAATTCCGCCTG ATTCT
pRK-SZ19-HA1-349-369-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCAGGCAAATTCTCAGAGAA
pRK-SZ19-HA1-349-369-GFP-R	TGCGCCTGCAGGTCGCGGCCGCTTATGATTCTCTGAGAATT
pRK-SZ19-HA1-366-375-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCATCAGGCGGA
pRK-SZ19-HA1-366-375-GFP-R	TGCGCCTGCAGGTCGCGGCCGCTTATCCGCCTGAT
pRK-SZ19-HA1-334-363-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCAATGAAGAAGCTCTGAGGCAAAT
pRK-SZ19-HA1-340-363-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCGAAGCTCTGAGGCAAATTCTCAG
pRK-SZ19-HA1-346-363-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCCTGAGGCAAATTCTCAGA
pRK-SZ19-HA1-352-363-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCCAAATTCTCAGA
pRK-SZ19-HA1-363-GFP-R	TGCGCCTGCAGGTCGCGGCCGCTTATCTGAGAATTTGCCTCAGAG CTTC
pRK-SZ19-HA1-328-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCTTCGTGAATGAA
pRK-SZ19-HA1-328-351-GFP-R	TGCGCCTGCAGGTCGCGGCCGCTTACCTCAGAGCTTCTTCATTCA CGAA
pRK-SZ19-HA1-328-345-GFP-R	TGCGCCTGCAGGTCGCGGCCGCTTAAGCTTCTTCATTCACGAA
pRK-SZ19-HA1-328-339-GFP-R	TGCGCCTGCAGGTCGCGGCCGCTTATTCATTCACGAAAGTCAG
pRK-SZ19-HA1-319-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCCCTGGGAAATTCGTGAATGAAGA AGCTCTGAGGC
pRK-SZ19-HA1-319-369-GFP-R	TGCGCCTGCAGGTCGCGGCCGCTTATGATTCTCTGAGAATTTGCC TCAGAGCTTCTTCA
pRK-SZ19-HA1-319-372-GFP-R	TGCGCCTGCAGGTCGCGGCCGCTTAGCTGATTCTCTGAGAATTT GCCTCAGAGCTTCT

表 3-6 抗原表位精确定位截短引物

Table 3-6 Primers for precise positioning of epitope

片段	序列 (5'-3')
pRK-SZ19-HA1-343-393-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCGCTCTGAGGCAAATTCTCAGA GAATCAGGCGGAA
pRK-SZ19-HA1-343-393-GFP-R	TGCGCCTGCAGGTCGCGGCCGCTTACATTGCTTCCTTGTCAAT TCCGCCTGATTCTCTG
pRK-SZ19-HA1-346-393-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCCTGAGGCAAATTCTCAGAGA ATCAGGCGGAATTG
pRK-SZ19-HA1-340-390-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCGAAGCTCTGAGGCAAATTCTC AGAGAATCAGGCG
pRK-SZ19-HA1-340-390-GFP-R	TGCGCCTGCAGGTCGCGGCCGCTTATGCTTCCTTGTCAATTCC GCCTGATTCTCTGAGA
pRK-SZ19-HA1-340-387-GFP-R	TGCGCCTGCAGGTCGCGGCCGCTTATTCCTTGTCAATTCCGCC TGATTCTCTGAGAATT
pRK-SZ19-HA1-331-357-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCGTGAATGAAGAAGCTCTGAG GCAA
pRK-SZ19-HA1-334-357-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCAATGAAGAAGCTCTGAGGCA
pRK-SZ19-HA1-337-357-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCGAAGAAGCTCTGAGGCAAAT
pRK-SZ19-HA1-331-357-GFP-R	TGCGCCTGCAGGTCGCGGCCGCTTAAATTGCCTCAGAGCTT CTTC
pRK-SZ19-HA1-328-354-GFP-R	TGCGCCTGCAGGTCGCGGCCGCTTATTGCCTCAGAGCTTCTTC ATT
pRK-SZ19-HA1-328-351-GFP-R	TGCGCCTGCAGGTCGCGGCCGCTTACCTCAGAGCTTCTTCATT CAC
pRK-SZ19-HA1-328-348-GFP-R	TGCGCCTGCAGGTCGCGGCCGCTTACAGAGCTTCTTCATTCA CGAA
pRK-SZ19-HA1-328-354-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCTTCGTGAATGAAGAAGCTCTG
pRK-SZ19-HA1-331-363-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCGTGAATGAAGAAGCTCTGAG GCAA
pRK-SZ19-HA1-334-363-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCAATGAAGAAGCTCTGAGGCA AATT
pRK-SZ19-HA1-337-363-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCGAAGAAGCTCTGAGGCAAAT TCTC
pRK-SZ19-HA1-340-363-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCGAAGCTCTGAGGCAAATTCTC
pRK-SZ19-HA1-343-363-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCGCTCTGAGGCAAATTCTCAGA

表 3-6 (续)

片段	序列 (5'-3')
pRK-SZ19-HA1-346-363-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCCTGAGGCAAATTCTCAG
pRK-SZ19-HA1-349-363-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCAGGCAAATTCTCAG
pRK-SZ19-HA1-352-363-GFP-R	TGCGCCTGCAGGTCGCGGCCGCTTATCTGAGAATTTGCC
pRK-SZ19-HA1-364-372-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCGAATCAGGC
pRK-SZ19-HA1-364-372-GFP-R	TGCGCCTGCAGGTCGCGGCCGCTTAGCCTGATTC
pRK-SZ19-HA1-361-369-GFP-F	GAGCTGTACAAGGCGTCGACCAGAGAATCA
pRK-SZ19-HA1-361-369-GFP-R	TGCGCCTGCAGGTCGCGGCCGCTTATGATTCTCT

3.1.5 目的基因的扩增

取实验室保存的 SZ19-HA 蛋白质粒测序后确定其基因序列, 以此质粒为模板, 按表 3-7 所示的 PCR 体系扩增各轮截短体的基因片段。

表 3-7 PCR 扩增体系

Table 3-7 Reaction system of PCR

组分	体积
PrimerStar	1 μ L
上下游引物 (20 μ M)	1 μ L
dNTP	4 μ L
5 \times Buffer	10 μ L
Template	\leq 200 ng
ddH ₂ O	补足 50 μ L

PCR 扩增程序: 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 共 30 个循环; 扩增产物加入 6 \times Loading 进行琼脂糖凝胶 (1.5%) 电泳, 恒流 240 mA 电泳 40 min, 在紫外线照胶仪下切下合适目的基因条带进行胶回收。

胶回收: 每管加入约 500 μ L Binding Buffer, 65 $^{\circ}$ C 将切下的胶块溶解; 胶块完全融入 Binding Buffer 后, 转移至吸附柱, 11000 r/min 离心 60 s, 弃离心液; 加入 300 μ L Binding Buffer, 清洗一次, 11000 r/min 离心 60 s; 向吸附柱中加入 700 μ L DNA Wash Buffer 清洗两次, 11000 r/min 离心 60 s; 之后 11000 r/min 空离 3 min, 将吸附柱转移至新离心管, 加入 ddH₂O, 12000 r/min 离心 2 min, 收集离心液测定浓度置于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

3.1.6 载体酶切与同源重组连接

pRK-Flag、pRK-GFP 空载体经 *Sal I* 和 *Not I* 双酶切, 37 $^{\circ}$ C 水浴锅 2 h, 按上述琼脂糖凝胶电

泳与胶回收步骤回收载体，-20℃保存备用；取带有 *Sal I* 和 *Not I* 酶切位点同源臂的线性化载体与基因片段，按照最适使用量（最适克隆载体使用量=（0.02×克隆载体碱基数） ng，最适目的片段使用量=（0.04×目的片段碱基数） ng 于冰上配制体系后，轻轻吹打混匀，37℃反应 30 min，立即冰浴 5 min，直接转化或冻存与-20℃备用。酶切体系与同源重组体系见表 3-8 与 3-9。

表 3-8 酶切体系

Table 3-8 Enzyme digestion system

组分	体积
载体（500 ng/μL）	1 μL
<i>Sal I</i>	1.5 μL
<i>Not I</i>	1.5 μL
10×Buffer	15 μL
ddH ₂ O	补足 50 μL

表 3-9 同源重组体系

Table 3-9 Homologous recombination system

组分	体积
Exnase® II	2 μL
5×CE II Buffer	4 μL
线性化载体	50-200 ng
目的片段	50-200 ng
ddH ₂ O	补足 20 μL

3.1.7 转化

取同源重组连接产物 10 μL，缓慢加入至 DH5α 感受态细胞中，轻轻弹动管壁，使感受态细胞与连接产物混匀，冰浴 30 min 后，42℃热激 90 s，再冰浴 3 min 后，5000 r/min 离心 5 min，重悬菌体均匀涂布于预热的 Amp⁺固体 LB 培养基中，37℃倒置培养 12 h。

3.1.8 挑取阳性克隆与质粒提取

在平板培养基上选取表面平滑的的单菌落，挑取并接种于 Amp⁺液体 LB 培养基中，37℃振荡培养 12 h 后，转移至离心管，11000 r/min 离心后弃上清，加入 250 μL 溶液 I，震荡重悬菌体，充分混匀，后加入 250 μL 溶液 II，轻轻混匀后静置 2 min，最后加入 350 μL 溶液 III，出现絮状沉淀，混合液转移至吸附柱，11000 r/min 离心 10 min，500 μL HBC Buffer 清洗一次，700 μL DNA Wash Buffer 清洗两次，每次 11000 r/min 离心 1 min 后弃滤出液，之后空离 3 min，吸附柱转移至新离心管，加入预热的 ddH₂O，室温静置 5 min，12000 r/min 离心 2 min，收集滤出液备用。

3.1.9 质粒转染

HEK293T 细胞提前铺 12 孔板, 培养基取出预热; 取无菌的 EP 管, 每管加入 100 μ L 培养基, 加入总质量 1 μ g 所需转染质粒, 充分混匀; 另取 EP 管, 加入 Lipofectamine 2000 与 100 μ L 培养基, 轻轻混匀室温静置 5 min, 转染质粒量与 Lipofectamine 2000 体积之比为 1:2; 将两管混合液混匀为一管后室温静置 20 min 后, 缓慢滴入细胞孔。

3.1.10 蛋白电泳与免疫印迹 (WB) 分析

详细步骤见 2.1.10。

3.1.11 抗原表位建模与分析

为方便观察表位在 HA 蛋白中的位置, 将筛选出的单克隆抗体识别的抗原表位进行 3D 建模。首先在 PDB 网站上查找 H7N9 流感病毒 HA 蛋白参考序列与 3D 模式图, 根据 H7N9 流感病毒的结构, 将 HA 蛋白上五个主要抗原位点进行标注, 蛋白结构图由 Pymol 软件 (DelanoScientific) 制作生成。H7N9 禽流感病毒抗体 HA 蛋白序列分析中, HA 序列选择“折叠相同序列”选项从 GenBank 数据库内下载, 分析图由 Web Logo3 在线工具 (weblogo.threeplusone.com) 生成。

3.2 结果

3.2.1 抗原表位第一轮筛选结果

将第一轮构建成功的截短体质粒转染至 HEK293T 中, 24 h 后收取细胞, 加入 RIPA 裂解液与 6 \times Loading Buffer, 100 $^{\circ}$ C煮样 10 min 制备蛋白进行 WB, 结果如表 3-10 所示, 6 株单抗第一轮筛选结果一致, 识别位点均位于 aa 100-150。

表 3-10 抗原表位第一轮筛选结果

Table 3-10 Results of the first round of epitope screening

截短肽段	2B2B3	3C5D6	4E12D6	4H1E8	7H9A6	9F10G3
F0:aa1-339	+	+	+	+	+	+
F1:aa1-300	+	+	+	+	+	+
F2:aa1-250	+	+	+	+	+	+
F3:aa1-200	+	+	+	+	+	+
F4:aa1-150	+	+	+	+	+	+
F5:aa50-339	+	+	+	+	+	+
F6:aa100-339	+	+	+	+	+	+
F7:aa150-339	-	-	-	-	-	-
F8:aa200-339	-	-	-	-	-	-

3.2.2 抗原表位第二轮筛选结果

将第二轮截短体质粒转染验证后，收取细胞制备蛋白样品进行 WB，结果如表 3-11 所示，6 株单抗中，2B2B3、3C5D6、4H1E8 筛选结果为识别位点位于 aa 113-137，4E12D6、7H9A6 与 9F10G3 筛选结果为识别位点位于 aa 107-137。

表 3-11 抗原表位第二轮筛选结果

Table 3-11 Results of the second round of epitope screening

截短肽段	2B2B3	3C5D6	4E12D6	4H1E8	7H9A6	9F10G3
F9:aa 113-339	+	+	-	+	-	-
F10:aa 125-339	-	-	-	-	-	-
F11:aa 1-137	+	+	+	+	+	+
F12:aa 1-150	+	+	+	+	+	+
F13:aa 103-339	+	+	+	+	+	+
F14:aa 107-339	+	+	+	+	+	+
F15:aa 1-113	-	-	-	-	-	-
F16:aa 1-109	-	-	-	-	-	-
F17:aa 120-339	-	+	-	-	-	-
F18:aa 117-339	-	+	-	+	-	-
F19:aa 1-125	-	+	+	+	+	+
F20:aa 1-122	-	-	+	-	+	+

3.2.3 抗原表位第三轮筛选结果

将第三轮截短体质粒转染验证后，制备样品进行 WB，结果如表 3-12 所示，6 株单抗中，2B2B3 筛选结果为 aa 114-131、3C5D6 筛选结果为 aa 121-124、4E12D6 筛选结果为 aa 110-119、4H1E8 筛选结果为 aa 119-125，7H9A6 筛选结果为 aa 110-121，9F10G3 筛选结果为 aa 107-122。2B2B3、3C5D6、4E12D6、7H9A6 需进一步单个截短精确定位。

表 3-12 抗原表位第三轮筛选结果

Table 3-12 Results of the third round of epitope screening

截短肽段	2B2B3	3C5D6	4E12D6	4H1E8	7H9A6	9F10G3
F21:aa 107-122			+		+	+
F22:aa 110-122			+		+	-
F23:aa 109-122			+		+	-
F24:aa 108-122			+		+	-

表 3-12 (续)

截短肽段	2B2B3	3C5D6	4E12D6	4H1E8	7H9A6	9F10G3
F25:aa 107-119			+		-	-
F26:aa 107-120			+		-	-
F27:aa 107-121			+		+	-
F28:aa 117-125		+		+		
F29:aa 118-125		+		+		
F30:aa 119-125		+		+		
F31:aa 120-125		+		-		
F32:aa 121-125		+		-		
F33:aa 117-124		+		-		
F34:aa 114-137	+			+		
F35:aa 114-125	-			+		
F36:aa 114-128	-			+		
F37:aa 114-131	+			+		
F38:aa 114-134	+			+		
F39:aa 117-137	-			+		

3.2.4 抗原表位精确定位结果

将第三轮筛选出的表位，首尾进行单个氨基酸截短，转染后制备样品进行 WB，结果如图 3-1, 3-2 所示，2B2B3 表位缺失 115 位 A 残基后，无法识别截短体 F40，缺失 130 位 A 残基后，同样丧失识别能力 (F43)，精确定位 2B2B3 识别的抗原表位为 $^{115}\text{ALRQILRESGGIDKEA}^{130}$ ；同理，3C5D6 识别表位为 $^{121}\text{RESG}^{124}$ ；4E12D6 识别表位为 $^{111}\text{VNEEALR}^{117}$ ；4H1E8 识别表位为 $^{119}\text{ILRESGG}^{125}$ ，7H9A6 识别表位为 $^{110}\text{FVNEEALRQILR}^{121}$ ，9F10G3 识别表位为 $^{107}\text{PGK FVNEEALRQILRE}^{122}$ ，最长的为 9F10G3 识别的表位，共 16 个氨基酸残基，最短的为 3C5D6 识别的表位，共 4 个氨基酸残基。

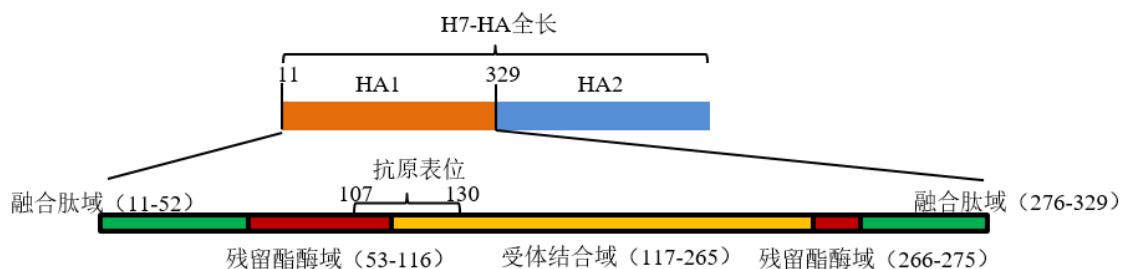


图 3-1 HA1 蛋白结构与表位示意图

Figure 3-1 Structure and epitopes of HA1 protein

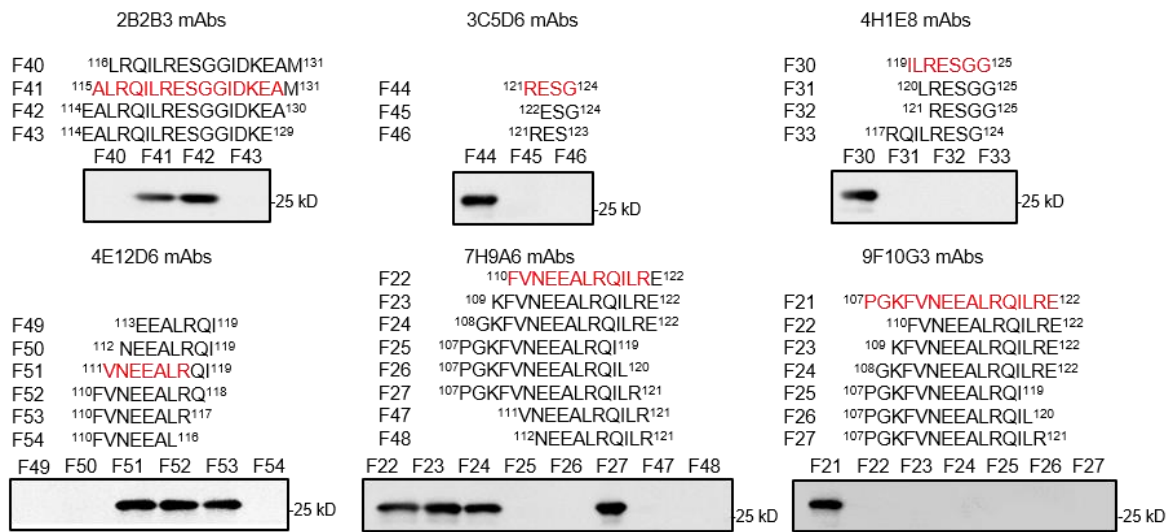


图 3-2 精确定位结果

Figure 3-2 Results of precise positioning

3.2.5 抗原表位建模与分析

单克隆抗体 4H1E8 和 7H9A6 识别的抗原表位分别为青色和浅绿色。根据 H7N9 流感病毒的结构，A（红色）、B（黄色）、C（绿色）、D（蓝色）、E（紫色）五个主要抗原位点位于 HA 表面（PDB:6d8b，图 3-3），由结构得出，鉴定出的抗原表位与 A-E 五个主要抗原位点均无交叉，位于 D 与 E 位点下方的一处凹陷内，部分位于残留酯酶域与受体结合域。结构图是由 Pymol 软件（Delano Scientific）生成。

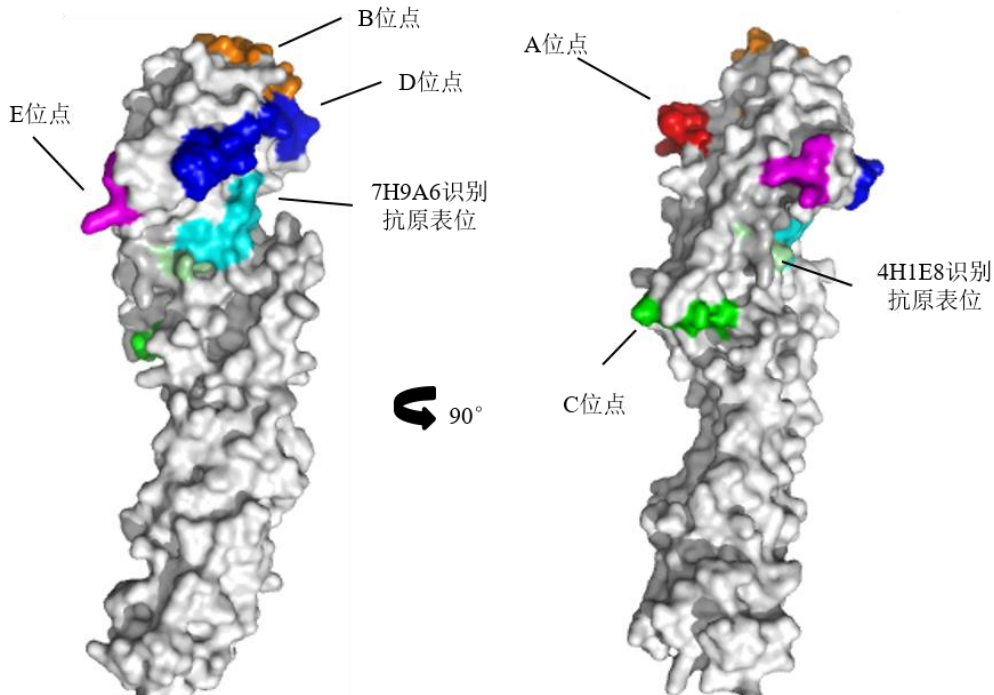


图 3-3 抗原表位建模

Figure 3-3 Modeling of epitopes

登录 GenBank 数据库, 选用“折叠相同序列”下载 H7N9 流感病毒 HA 蛋白序列, 将 6 株单抗筛选出的抗原表位所在肽段 (aa 107-130) 进行序列对比分析, 使用 Web Logo3 在线工具 (weblogo.threeplusone.com) 生成 Logo 分析图 (图 3-4), 整个肽段在 H7N9 流感病毒 HA 蛋白序列中, 除 115 与 130 位氨基酸残基有不同程度的突变外, 其余氨基酸残基均高度保守。

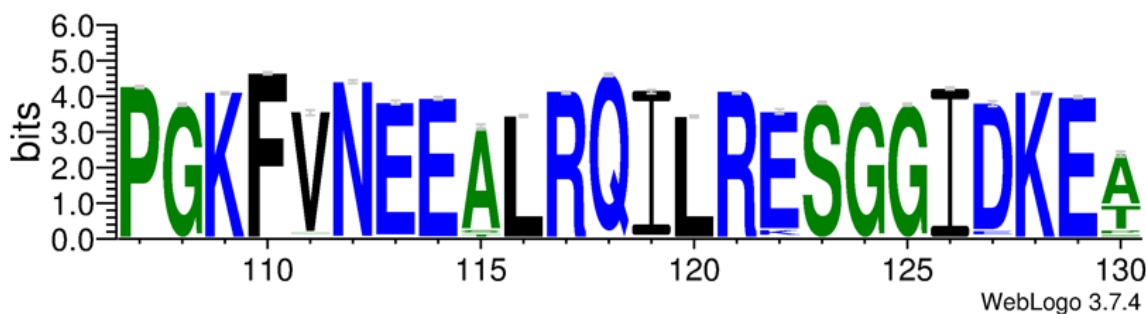


图 3-4 抗原表位保守性分析

Figure 3-4 Conservative analysis of epitopes

3.3 小结

本章通过设计多轮截短体对特异性中和 H7N9 亚型流感病毒的单克隆抗体识别的抗原表位进行了鉴定, 结果显示, 单抗识别的抗原表位距 RBS 域较远, 这可能是单抗不具有 HI 活性的原因; 其次鉴定出的抗原表位位于 HA 蛋白的内侧面, 靶向残留酯酶域, 通过影响 HA 蛋白三聚体结构的稳定性抑制 H7N9 亚型流感病毒的吸附; 最后在所有 H7N9 亚型流感病毒中, 单抗识别的表位高度保守, 支持了前述研究结果, 即这些单克隆抗体可与不同的 H7N9 亚型流感病毒发生反应。

3.4. 讨论

HA 是 A 型流感病毒的主要表面糖蛋白, 在 HA0 前体裂解后, HA 以同型三聚体的形式出现, 每个单体由二硫键连接的 HA1 和 HA2 亚基组成(BIZEBARD et al., 1995)。HA1 亚基含有受体结合位点(RBS), 通过与唾液酸受体结合促进流感病毒吸附(ZOST et al., 2019), 而 HA2 亚基通过酸碱诱导的构象变化, 导致病毒与细胞膜之间的融合(GE et al., 2014)。

HA 蛋白是 IAV 疫苗和抗病毒药物开发的主要靶点。大多数以 HA 蛋白为靶点的中和抗体通常可以被归类为识别头或茎结构域的抗体。为了抑制病毒感染, 与 HA 头部结合的中和抗体通常会阻断病毒吸附, 而与 HA 茎部结合的抗体通过阻止膜融合、阻断 HA0 的裂解发挥中和作用(BANGARU et al., 2018; BRANDENBURG et al., 2013; DILILLO et al., 2014; HUBER et al., 2001)。HA 的典型抗原位点通常可以聚集在五个位点上, 分别为 A、B、C、D 或 E(EKIERT et al., 2011; WILEY et al., 1981)。位点 A 和 B 靠近 RBS 区域, 位点 C 和 D 位于亚基界面, 位点 E 位于残留酯酶(VE)结构域内。

本研究开发并鉴定了 6 个抗 H7N9 亚型流感病毒 HA1 蛋白的单克隆抗体 (2B2B3、3C5D6、4E12D6、4H1E8、7H9A6 和 9F10G3)。表位研究表明, 6 个单克隆抗体识别了 H7 亚型流感病毒中横跨 RBS 和 VE 区域的独特和新颖的表位。6 株单克隆抗体结合在 H7 亚型流感病毒 HA 蛋白的球形头部区域的内侧位点。2B2B3、3C5D6 和 4H1E8 识别的表位含有 $^{121}\text{RESG}^{124}$ 。最近, Yao

等报道了 mAbs 2F8/3F6/5C11 识别 H7 禽流感病毒中高度保守的表位“RESGG”，但其中和或保护作用尚未得到评价。而 4E12D6、7H9A6 和 9F10G3 识别的表位与之前鉴定的所有单克隆抗体不同。在 H7 亚型流感病毒中，单克隆抗体识别的表位高度保守，支持了前述研究结果，即这些单克隆抗体可与不同的 H7N9 亚型流感病毒发生反应。

由于 HA 蛋白在病毒入侵中的重要作用，RBS 是亚型特异性广泛中和抗体的理想靶点。大多数流感病毒抗 HA 蛋白的中和抗体能够识别 RBS 周围的表位，如单克隆抗体 1H10、HNIgGA6 和 1B2，这些抗体通常具有跨亚型中和活性(CHEN et al., 2017; STADLBAUER et al., 2018; YANG et al., 2020)。本研究数据表明，这 6 个单克隆抗体的表位距离 RBS 区域较远，这可能是单克隆抗体没有 HI 活性的原因。另一方面，以 4H1E8 和 7H9A6 单克隆抗体为代表的单克隆抗体具有中和作用并阻断病毒吸附，这可能是由于其产生的空间位阻效应。

对流感病毒疫苗的体液反应传统上是用血凝抑制试验来评估的。HI 试验测量了与 HA 头部结构域结合特异性抗体的滴度，该抗体抑制 HA 蛋白与宿主唾液酸受体的结合(KRAMMER et al., 2013)。然而，目前还不清楚何种水平的 HI 滴度与对流感病毒的保护有关(ANDREWS et al., 2017; NACHBAGAUER et al., 2017)。此前的研究报告称，一些人在接种 H7N9 亚型流感病毒疫苗后，血清没有呈现 HI 活性，但产生了高水平的抗 H7 抗体，并且这些血清在动物模型中具有部分保护作用(GAO et al., 2021; STADLBAUER et al., 2017)。实验结果表明，这种保护作用可能是通过茎反应性抗体和 Fc 介导的效应因子功能如 ADCC 和 ADCP 介导的。在本研究中，数据表明当抗体识别 HA 头部结构域的独特表位而不具有 HI 活性时，可以具有中和活性和保护作用。在此有理由假设，临床中流感病毒的部分抗体可能与本研究中的抗体具有相似的特征，只依靠 HI 滴度的高低来判定体内抗体水平的高低及免疫效果的好坏是不可靠的。

第四章 H7N9 亚型流感病毒 HA1 蛋白单抗体内保护效力研究

前述章节筛选得到两株特异性中和 H7N9 亚型流感病毒的单抗 4H1E8 与 7H9A6，并阐明单抗通过阻断 H7N9 亚型流感病毒吸附过程发挥中和活性，但是对单抗在体内的保护效力与应用潜力尚不清楚。接下来，本章致力于对单抗在体内的保护效力进行研究。

4.1 材料与方方法

4.1.1 病毒、细胞和试验动物

杂交瘤细胞由本实验室保存；HEK293T、A549 细胞购自 ATCC；BALB/c 小鼠购自维通利华实验动物有限公司。SPF 级鸡胚购自山东昊泰实验动物繁育有限公司。本研究所涉及的动物实验严格按照《中华人民共和国科技部实验动物养护使用指南》中的规定进行。涉及 H7N9 亚型流感病毒的研究使用的均为低致病性毒株，在中国农业科学院兰州兽医研究所生物安全实验室进行相关试验。动物实验操作及流程经由中国农业科学院兰州兽医研究所动物伦理委员会批准。动物实验操作严格遵守《实验动物饲养管理和使用指南，第八版》，《实验动物管理条例，1987 年》等相关文件。

4.1.2 主要试剂

Protein A/G 抗体亲和介质、NHS-activated Bestarose 4FF 预活化亲和介质、谷胱甘肽亲和介质 GST Bestarose 4FF/GST Bestarose 4B 购自博格隆公司；NP 抗体购自 Sino Biological 公司；其他试剂详见第二章。

4.1.3 主要仪器

小鼠独立送回风净化笼 IVC 购自苏州市苏杭科技器材有限公司；鸡胚箱体式孵化机购自青岛兴仪电子设备有限公司；LightCycler 480 II 定量 PCR 仪购自德国罗氏诊断公司；生物安全柜购自苏州苏洁净化设备有限公司；高通量组织研磨器购自德国 QIAGEN 公司；高速低温离心机购自美国 Thermo Fisher 公司；其他仪器详见第二章。

4.1.4 原核表达质粒的构建

根据 SZ19-HA 蛋白序列设计引物，扩增带有 pGEX-4T-1 同源臂的目的基因，用同源重组连接酶将目的基因与载体 pGEX-4T-1 连接起来，步骤详见 3.1.4。

4.1.5 蛋白诱导表达

阳性质粒转化 BL21 表达感受态细胞（不同蛋白可用多种表达感受态尝试），挑取 3 个单克隆于 37°C，220 r/min 培养 12 h；按 1:100 接种 5 mL Amp^rLB 培养基中，在 37°C，220 r/min 条件下培养至吸光值达到 0.4~0.6；取 1 mL 菌液在 5000 r/min 下离心 1 min，弃去上清，收集菌体，加入

50 μL 1 \times Loading Buffer 重悬菌体, 然后 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮样 10 min 后冻存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用, 为诱导前样品; 剩余 4 mL 菌液放于冰上 30 min, 然后加入终浓度为 0.1 mM 的 IPTG, 在 16 $^{\circ}\text{C}$ 180 r/min 条件下诱导 24 h, 取样 500 μL , 加入 500 μL 甘油在-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存备用, 为阳性菌液; 剩余 3.5 mL 菌液在 5000 r/min 下离心 1 min, 弃去上清, 收集菌体, 用 500~800 μL PBS 重悬超声破碎菌体 3 min 后, 于 3000 r/min, 离心 1 min, 分离上清和沉淀, 取上清 50 μL , 加入 10 μL 6 \times Loading Buffer, 沉淀用 100 μL 1 \times Loading Buffer 重悬, 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮样 10 min, 为诱导后上清样品和诱导后沉淀样品; 将诱导前样品、诱导后上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色液染色后观察蛋白表达情况。

4.1.6 原核蛋白纯化

平衡缓冲液 (超声液体 10 \times IB Wash Buffer, 使用时稀释为 1 \times): 200 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 10% Triton-X-100, pH 7.5。洗涤缓冲液: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 洗脱缓冲液: 50 mM 预冷 Tris-HCl, pH 8.0, 10-20 mM 还原型谷胱甘肽;

取 2 mL GST 琼脂糖凝胶预装柱, 用 10 mL 平衡缓冲液平衡, 然后取破碎上清 10 mL 样品上样, 收集流出液体; 用 20 mL 洗涤缓冲液洗去未吸附的杂蛋白, 收集每次洗涤的液体; 用 10 mL 洗脱缓冲液洗脱目的蛋白, 2 mL/管收集; 再用 20 mL 平衡缓冲液平衡柱子, 加 20% 乙醇没过介质, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 以备下次使用; 收集的部分取样电泳检测纯化效果和纯度, BCA 法测定蛋白的浓度。

4.1.7 抗体纯化

试剂配置: 平衡缓冲液 (20 mM 磷酸三钠, pH 7.0)、洗脱缓冲液 (0.1 M 甘氨酸, pH 2.7)、中和缓冲液 (1 M Tris-HCl, pH 8.5)、1 M NaOH。为保护亲和介质, 所使用的相关试剂均使用无菌 ddH₂O 配置并用滤器过滤后方可使用。

将保存于 20% 乙醇中的 Protein A 亲和层析介质取出, 装入预装柱中, 使用 ddH₂O 冲洗 3 次, 每次 3 倍柱体积, 然后在使用平衡缓冲液冲洗 3 次, 每次 5 倍柱体积。将腹水与平衡缓冲液 1:1 均匀混合后, 经过滤器过滤后, 加入至预装柱中, 控制流速 2 mL/min, 反复过柱 3 次后, 进行洗脱, 先使用平衡缓冲液清洗 5 次, 每次 2 倍柱体积, 清洗杂蛋白, 收集流出液测定蛋白浓度, 直至流出液没有杂蛋白; 以洗脱缓冲液洗脱与 Protein A 介质特异性结合的蛋白, 共洗脱 15 次, 每次 2 mL, 控制流速 2 mL/min, 流出液立即使用中和缓冲液将 pH 中和至 7-8, 没管流出液留取样品进行 WB 检测洗脱效率; 介质使用 NaOH 冲洗 5 倍柱体积后, 再使用平衡缓冲液冲洗 10 倍柱体积, 加入 20% 乙醇将介质保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 。

4.1.8 抗原特异抗体亲和层析

偶联溶液: 偶联缓冲液 1: 0.2 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl, pH 8.3; 偶联缓冲液 2: 1 mM HCl; 偶联缓冲液 3: 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5; 偶联缓冲液 4: 0.1 M CH₃COONa, 0.5 M NaCl, pH 4~5。

纯化溶液: 平衡缓冲液: 0.15 M NaCl, 20 mM Na₂HPO₄, pH 7.0; 洗脱缓冲液: 0.1 M Glycine, pH 3.0; 中和缓冲液: 1 M Tris-HCl, pH 8.5。

抗原偶联介质：偶联缓冲液配好之后放在冰上冷却后使用；在预装柱中加入 3 mL 浸泡于 20% 乙醇中的 NHS-activated Bestarose 4FF 介质，使用 50 mL 预冷的偶联缓冲液 2 冲洗介质；用 10 mL 预冷的偶联缓冲液 1 充分平衡介质；将纯化好的抗原蛋白加入到介质中，体积比为：蛋白:介质=1:0.5；在室温下偶联 2-4 h，4°C 下可以过夜偶联（将介质转入 5 mL 离心管中，在摇床上孵育）；偶联完成后，将蛋白与介质混合液转入柱子中，用预冷的偶联缓冲液 3 室温封闭介质 2 h；封闭完成后，用 10 mL 预冷偶联缓冲液 3 和偶联缓冲液 4 交替清洗介质 4 次；偶联完成后，加入平衡缓冲液，4°C 保存，或直接进行下一步。

抗体纯化：将腹水和平衡缓冲液以体积比按 1:1 混合后，加入偶联后的介质中；用 50 mL 平衡缓冲液洗涤介质 3 次；用 3 mL 柱体积的洗脱缓冲液洗脱介质 3 次，每次室温孵育 5 min；洗脱后的溶液立即用中和缓冲液中和至 pH 为 7~8（中和缓冲液：洗脱液体积大约为 1:20，注意中和缓冲液不要加过量，否则 pH 过高会影响实验结果）；以上每一步的流出液收集以便后续检测。纯化后的抗体用考马斯亮蓝染色、Western Blotting 或间接免疫荧光进行检测。

4.1.9 单抗预防试验

每组 16 只 SPF (Specific-pathogen-free, SPF) 级 BALB/c 雌性小鼠，其中 10 只小鼠观察体重变化和死亡率，6 只采集脏器做病理检查与病毒载量滴定；设对照组、空白组、预防组；感染剂量分为亚致死剂量组 (10^6 EID₅₀/50 μ L) 与致死剂量组 (10^7 EID₅₀/50 μ L)；用药剂量分为低剂量组 (20 mg/kg) 与高剂量组 (30 mg/kg)。

小鼠到达后适应 2~4 天，按照来时分组分配笼具饲养，每只打上耳标，做好记录；如图 4-1 所示，在感染前 24 h 腹腔注射纯化单克隆抗体，对照组注射相同剂量的 PBS；将已滴定 EID₅₀ 的病毒液取出并置于冰上融化，然后将病毒液稀释至攻毒剂量，感染小鼠前，挑选重量相似的小鼠用于体重变化实验并做好记录，每只小鼠滴鼻感染 50 μ L，对照组感染相同剂量病毒液。

小鼠体重变化实验和存活率实验包括攻毒当日共计 15 天。感染后 3 天和 5 天剖杀小鼠，共采集 5 种脏器，分别为脾脏、肾脏、肺脏、脑和鼻甲。采集的脏器应放置在干冰上，采集 SPF 鼠的脏器作为对照，实验结束后采集的脏器保留两份，一份置于 -80°C 保存用于病毒载量滴定，一份置于福尔马林溶液中保存用于组织病理切片分析。

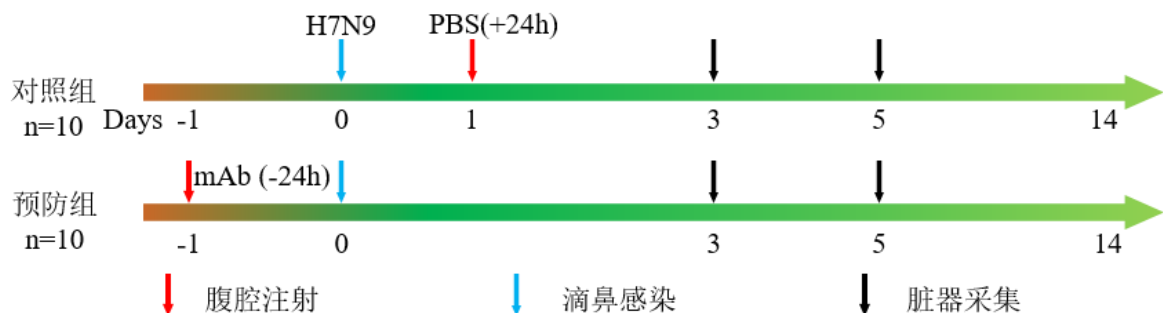


图 4-1 单抗预防试验示意图

Figure 4-1 Schematic diagram of mAb prophylactic experiment

4.1.10 单抗治疗试验

亚致死剂量组 (10^6 EID₅₀/50 μ L) 与致死剂量组 (10^7 EID₅₀/50 μ L) 滴鼻感染小鼠 12 h 后, 按低剂量组 (20 mg/kg) 与高剂量组 (30 mg/kg) 每组腹腔注射单克隆抗体, 放入原笼具饲养, 在第二天与第四天分别注射同剂量的抗体, 其他操作同 4.1.9。具体试验流程见图 4-2。

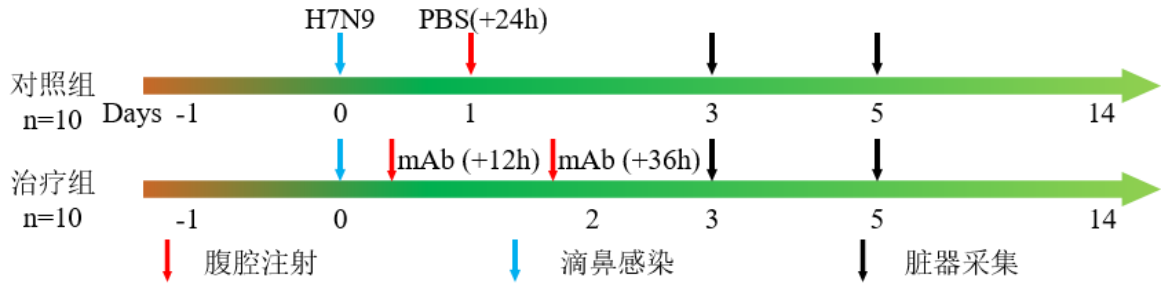


图 4-2 单抗治疗试验示意图

Figure 4-2 Schematic diagram of mAb therapeutic experiment

4.1.11 肺组织病理学检测

感染后第 3 天和第 5 天, 采集空白组、对照组、用药组小鼠肺组织, 于 PBS 中轻轻的漂去残留血迹与异物, 于 10% 福尔马林溶液中固定, 24 h 后更换固定液, 固定完毕的组织统一送至成都扬克斯生物科技有限公司制作组织切片和 HE 染色。

4.1.12 组织病毒载量滴定

取采集的脾脏、肾脏、肺脏、脑和鼻甲, 做好标记, 每个脏器称重后记录, 加入 PBS 与无菌的钢珠, 于组织破碎机内进行组织破碎, 夹板内加入碎冰保持低温, 所有操作脏器必须置于冰上, 以免影响结果。组织匀浆后, 8000 r/min 离心 10 min, 取上清作 10 倍倍比稀释至 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} ... 稀释度, 稀释好的病毒放置于冰上暂存; 取合适的稀释度接胚, 每个稀释度接种 9~11 天 SPF 鸡胚 3-5 枚, 接种量为 0.1 mL/枚; 37°C 温箱培养, 逐日观察至 48 h; 检测血凝, 有血凝则判断为感染阳性; 根据血凝价公式, 计算 EID₅₀。

4.2 结果

4.2.1 原核蛋白纯化

将 SZ19-HA1 蛋白序列通过同源重组连接至 pGEX-4T-1 载体后, 进行质粒构建, 经过测序与 WB 验证构建成功的阳性质粒转化至 BL21 表达感受态, 加入 0.6 mmol/mL 的 IPTG, 16°C 180 r/min 低温诱导 16 h 后, 6000 r/min 离心 10 min, 使用平衡缓冲液重悬沉淀菌体后, 150 W 40 min 超声裂解菌体, 8000 r/min 离心 20 min 后取上清与 GST Bestarose 4FF 介质 4°C 过夜孵育, 使用谷胱甘肽还原酶洗脱进行原核 H7N9-HA1 蛋白纯化。纯化结果如图 4-3 显示, 成功纯化出 SZ19-HA1 原核表达蛋白。

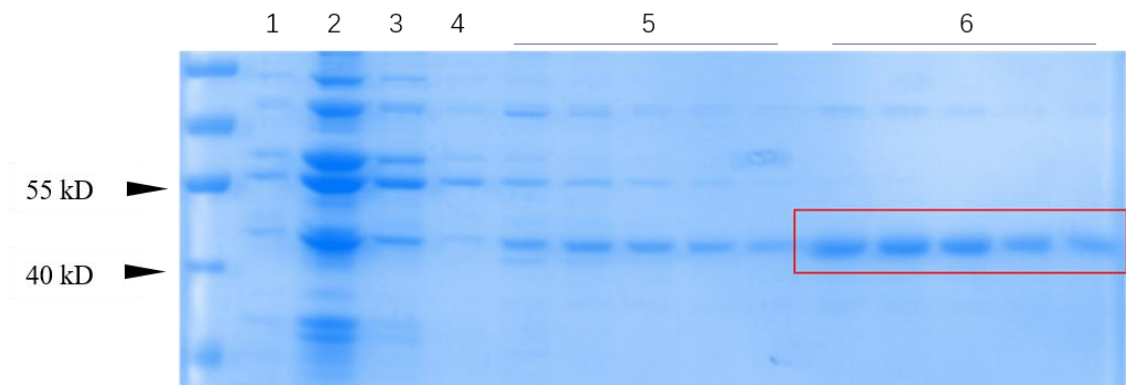


图 4-3 SZ19-HA1 原核蛋白的纯化

Figure 4-3 Purification of prokaryotic expressed protein SZ19-HA1

SZ19-HA1 原核蛋白的纯化: 1. 诱导前; 2. 挂柱前; 3. 挂柱后; 4. 缓冲液洗涤; 5. 低浓度洗脱; 6. 高浓度洗脱

Purification of prokaryotic expressed protein SZ19-HA1: 1. Before the protein induction; 2. Before binding affinity medium; 3. After binding affinity medium; 4. Washing with equilibration buffer; 5. Washing with low concentration eluent; 6. Washing with high concentration eluent

4.2.2 单克隆抗体纯化

取冻存的 4H1E8 与 7H9A6 杂交瘤细胞, 复苏后连续传代至合适密度, 取 6~8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠使用石蜡油致敏后腹腔接种杂交瘤细胞, 待小鼠肚皮明显膨胀发紫后, 收集腹水。将腹水稀释后使用 ProteinA 进行 IgG 全抗体纯化, 全抗体再进行抗原特异抗体亲和层析进行提纯, 纯化效果如图 4-4, 验证纯化单克隆抗体的生物活性后, 透析并使用超滤柱对抗体进行浓缩, 浓缩后 BCA 法测定抗体的浓度可达到 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上, 可满足后续预防治疗试验所用浓度。

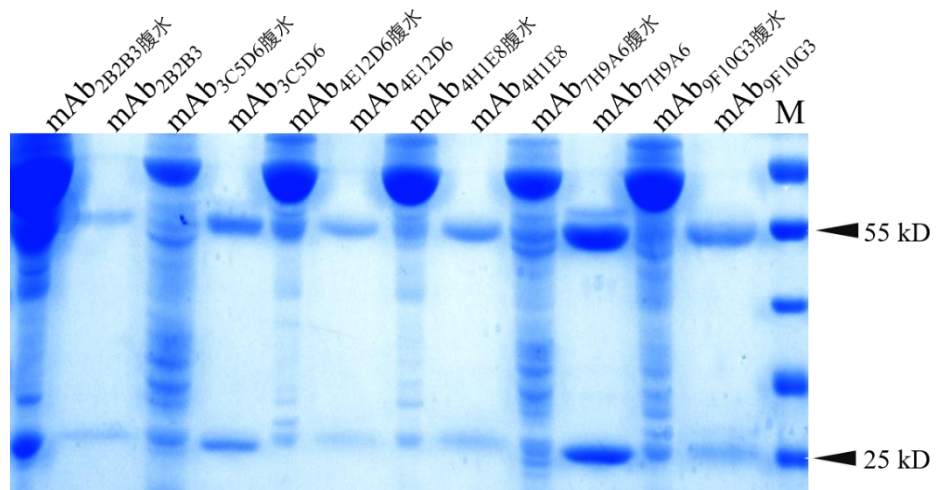


图 4-4 单克隆抗体的纯化

Figure 4-4 Purification of monoclonal antibody

4.2.3 单抗预防试验

本研究为了评估单抗在小鼠体内的保护作用, 选择两株具有高中和活性和高亲和力的单克隆抗体(4H1E8 和 7H9A6)作为代表性抗体, 选取两种不同感染剂量 (10^6 EID₅₀ 或 10^7 EID₅₀) 与接种

剂量 (20 或 30 mg/kg), 检测其对 BALB/c 小鼠的预防作用。如图 4-5 所示, 致死剂量对照组在感染 H7N9 亚型流感病毒 3~5 天后有严重的临床症状, 且在 9 天内死亡; 亚致死剂量对照组 (n=10) 部分 (4/10) 在感染后 8 天内死亡。亚致死剂量组小鼠在感染后第 8 天体重开始大幅回升, 接种单抗的小鼠在感染后第六天体重开始回升, 且体重损失较少, 其中接种 4H1E8 组小鼠体重下降最少且恢复体重最快; 致死剂量组小鼠在感染后 9 天内全部死亡, 接种单克隆抗体的小鼠在感染后第 7 天体重开始恢复。

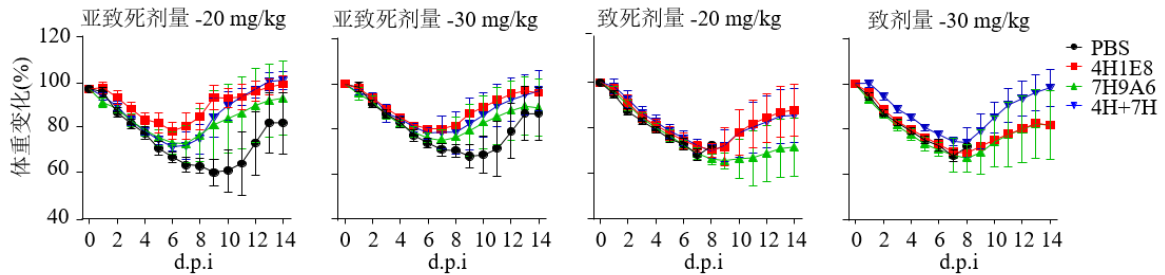


图 4-5 单抗预防试验小鼠体重变化曲线

Figure 4-5 Weight loss of prophylactic efficacy of mAbs in mice challenged with H7N9 virus

在存活率方面, 接受亚致死剂量感染的小鼠存活率为 60%, 部分小鼠于 8 天内死亡, 使用不同剂量的单克隆抗体预防接种的小鼠均可对亚致死剂量感染产生 100% 保护。接受致死剂量感染的小鼠, 在感染后 9 天内全部死亡, 4H1E8 组 20 mg/kg 剂量可对小鼠提供 80% 的保护作用, 30 mg/kg 剂量时, 保护率可提升至 100%; 7H9A6 组 20 mg/kg 剂量可提供 70% 的保护率, 30 mg/kg 剂量时, 可完全保护小鼠免受致死性感染; 同时, 4H1E8+7H9A6 混合组在剂量为 20 mg/kg 时具有 100% 的保护作用 (图 4-6), 而在剂量为 30 mg/kg 时体重下降最少。

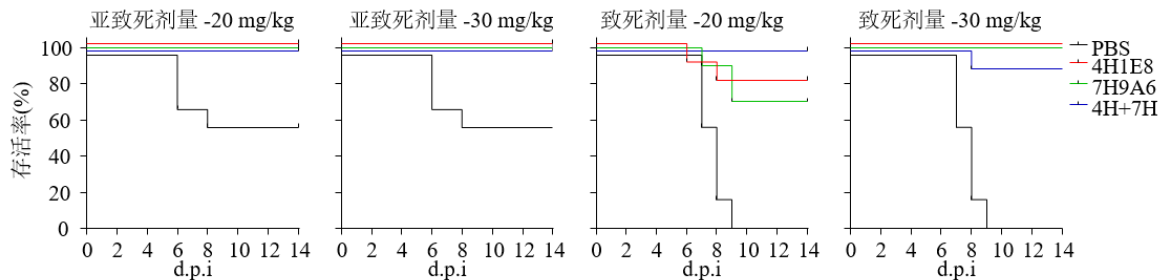


图 4-6 单抗预防试验小鼠存活曲线

Figure 4-6 Survival of prophylactic efficacy of mAbs in mice challenged with H7N9 virus

在致死剂量与亚致死剂量 H7N9 亚型流感病毒感染小鼠后的第 3 天与第 5 天, 每组随机挑取三只小鼠进行麻醉后安乐死, 采集每只小鼠的肺部组织, 使用无菌 PBS 冲洗干净后, 置于福尔马林组织固定液中固定, 进行 HE 染色与病理切片, 如图 4-7 所示, 在小鼠模型中可以观察到典型肺组织损伤, 接受亚致死或致死剂量感染组的小鼠肺部严重损伤, 表现为弥漫性肺泡损伤, 肺泡间隔增厚, 支气管/细支气管上皮明显增生, 肺泡、支气管及血管周围广泛炎性细胞浸润。与此相反, 接种单克隆抗体的小鼠在致死剂量与亚致死剂量感染后第 3 天仅观察到轻度肺损伤, 大多数肺泡间隔和空腔正常, 肺泡间隔与上皮结构明显, 支气管/细支气管和血管周围仅观察到少量炎性细胞浸润。

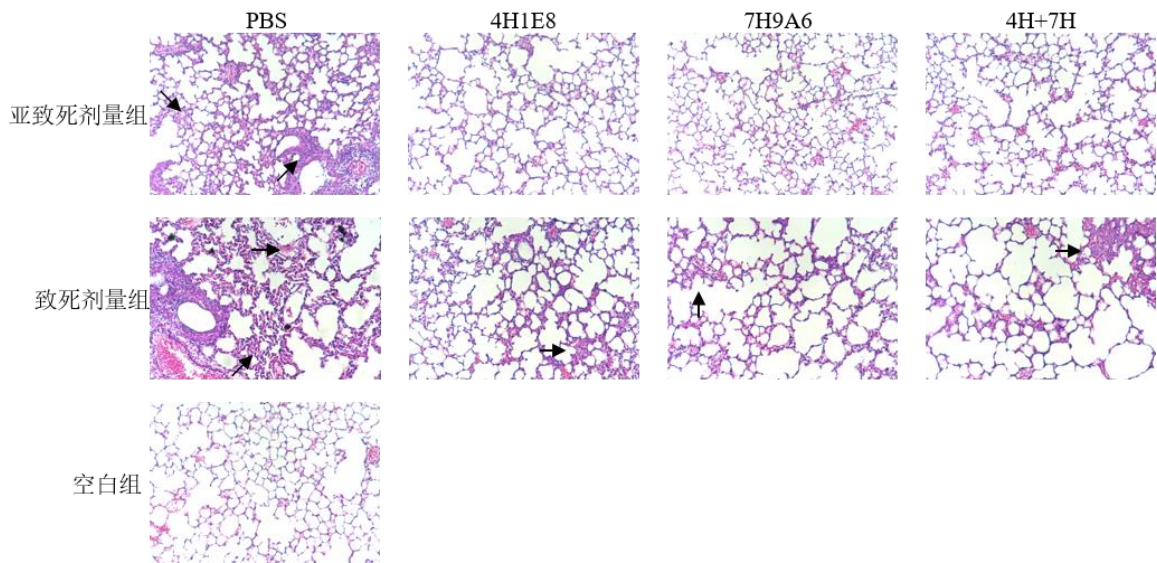


图 4-7 肺脏组织病理学观察

Figure 4-7 Histopathological observation of lung

为了通过抑制病毒增殖来验证其预防作用，对小鼠肺和鼻甲内的病毒载量进行了检测。如图（图 4-8）所示，致死剂量与亚致死剂量感染后的小鼠肺部病毒载量可达 10^6 EID₅₀ 以上，预防性接种单克隆抗体后，小鼠肺部与鼻甲内的病毒载量有不同程度的降低，致死剂量攻毒小鼠肺组织中的病毒滴度在感染后第 3 天显著下降，提示单抗有较好的预防 H7N9 亚型流感病毒感染的作用。

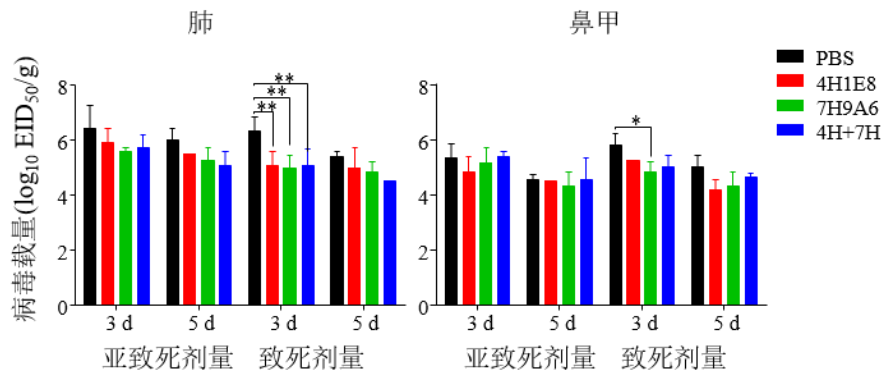


图 4-8 组织病毒载量滴定

Figure 4-8 Viral titration of tissues

4.2.4 单抗治疗试验

对于 4H1E8 和 7H9A6 对 H7N9 病毒的治疗效果，每组 16 只小鼠在感染 H7N9 流感病毒后 12 h 和 36 h 注射抗体 (i.p)。20 或 30 mg/kg 剂量的抗体对亚致死剂量的小鼠提供了完全的保护。体重减轻 20% 后，体重开始恢复，在 30 mg/kg 时比 20 mg/kg 时体重恢复更明显 (图 4-9)。当致死剂量感染时，4H1E8 在 20 或 30 mg/kg 的剂量下提供 80% 或 90% 的保护，7H9A6 在 20 或 30 mg/kg 的剂量下提供 90% 或 100% 的保护 (图 4-10)。同时，4H1E8+7H9A6 在 20 或 30 mg/kg 剂量下可提供 100% 或 90% 的保护。

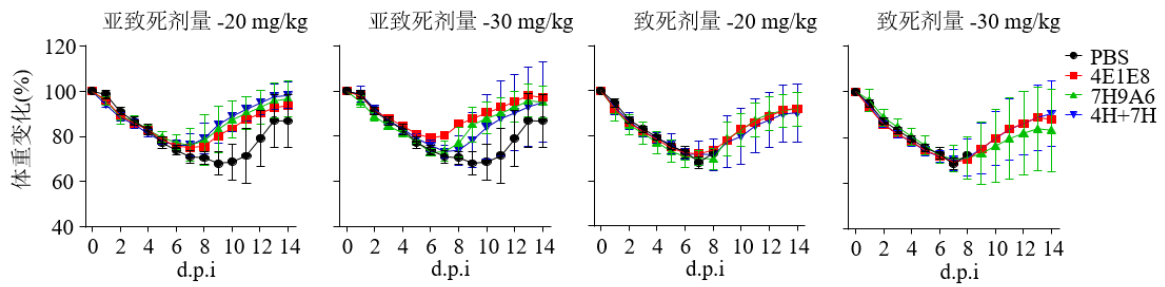


图 4-9 单抗治疗试验小鼠体重变化曲线

Figure 4-9 Weight loss of therapeutic efficacy of mAbs in mice challenged with H7N9 virus

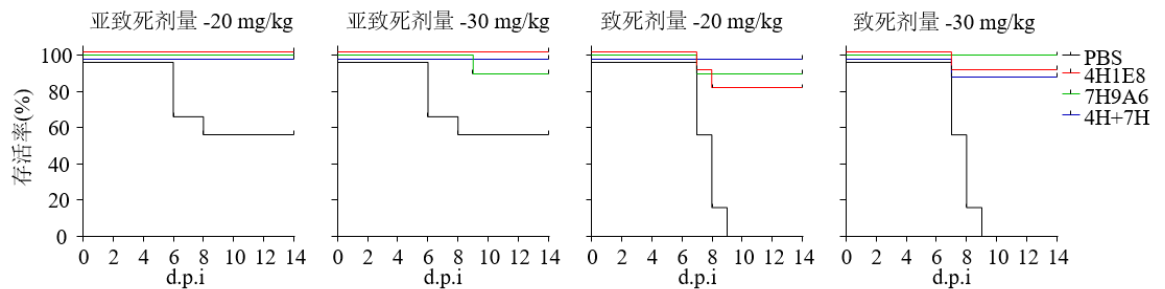


图 4-10 单抗治疗试验小鼠存活曲线

Figure 4-10 Survival of therapeutic efficacy of mAbs in mice challenged with H7N9 virus

与预防组相似，治疗组小鼠经单克隆抗体治疗后肺损伤得到明显抑制。对照组小鼠出现间质性肺炎，肺泡间隔增厚，支气管/细支气管上皮明显增生，肺间质可见大量蓝染的炎性细胞浸润，而亚致死剂量治疗组 3 天小鼠基本正常，偶见肺泡扩张，少量的炎性细胞渗出（图 4-11），致死剂量治疗组小鼠肺部损伤也明显得到抑制，支气管/细支气管与血管周围见少量炎性细胞浸润，肺泡间隔与空腔正常，上皮组织结构明显。

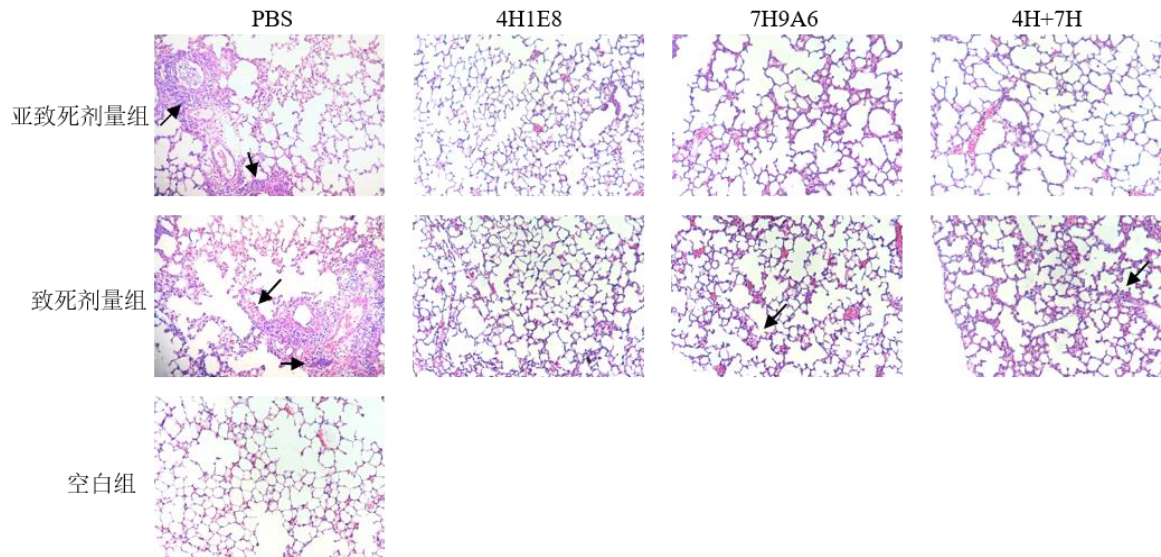


图 4-11 肺脏组织病理学观察

Figure 4-11 Histopathological observation of lung

致死剂量与亚致死剂量感染后的小鼠肺组织病毒载量可达 10^6 EID₅₀ 以上,鼻甲可达 10^5 EID₅₀ 以上,接种单克隆抗体治疗后,亚致死剂量组小鼠肺部病毒载量在感染后第 3 天与第 5 天显著降低,鼻甲中的病毒载量也呈现下降趋势;致死剂量组小鼠肺部与鼻甲中的病毒载量在感染后第 3 天与第 5 天都呈现明显降低,其中鼻甲中的病毒载量降低最为明显,可降低 70 倍,其中 4H+7H 混合组较接种单个抗体在降低病毒载量方面表现出优势。(图 4-12)。

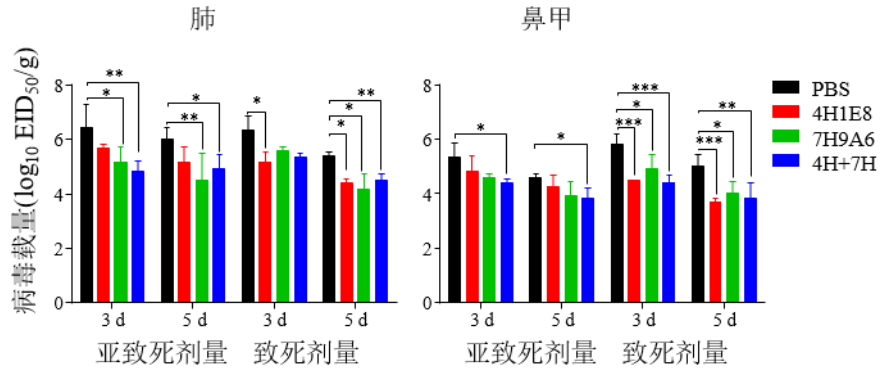


图 4-12 组织病毒载量滴定

Figure 4-12 Viral titration of tissues

4.3 小结

本章对两株高特异性中和 H7N9 亚型流感病毒的单抗 (4H1E8 与 7H9A6) 进行了体内保护效力研究。结果显示,在预防与治疗试验中,两株单抗均能对 H7N9 亚型流感病毒感染发挥完全保护效应,无论是在致死剂量组还是亚致死剂量组,均能加快小鼠体重恢复,显著降低死亡率,减轻肺组织病变与维持肺组织基本结构,在治疗试验中,单抗能够显著降低肺与鼻甲内的病毒载量。因此,此两株单抗可作为预防或治疗 H7N9 亚型流感病毒感染的候选抗体。

4.4 讨论

自 2013 年首例人感染 H7N9 亚型流感病毒以来,该亚型流感病毒长期在中国流行,患者的一般临床表现为流感样症状,但易引起急性呼吸窘迫综合征,尤其是老年人和儿童。截至目前,H7N9 亚型流感病毒共导致 1568 例人类感染病例,其中 615 例死亡(LI et al., 2021; SHI et al., 2017; SHI et al., 2018; ZENG et al., 2018; ZHANG et al., 2013)。由于感染的严重性和人类的高死亡率,H7N9 亚型流感病毒引起了全球的重大健康关注。目前迫切需要一种有效的抗病毒疗法来对抗 H7N9 亚型流感病毒感染。中和性抗体可以预防病毒感染,最近的研究显示了其治疗 A 型流感病毒感染的前景(EKIERT et al., 2011; YOSHIDA et al., 2009)。

本研究在小鼠模型中评估了 4H1E8 和 7H9A6 单克隆抗体的保护作用。在预防试验中,腹腔注射 20mg/kg 或更高剂量的单克隆抗体 4H1E8 和 7H9A6,显著保护小鼠免受亚致死和致死剂量的 H7N9 亚型流感病毒的侵袭。在治疗试验中,4H1E8 和 7H9A6 对致命的 H7N9 病毒也显示出显著的保护作用,对 H7N9 亚型流感病毒感染的保护率可达 90% 以上。对于被亚致死剂量病毒感染的小鼠,抗体治疗可显著改善健康状况,体重恢复较快。进一步的评估表明,该保护作用与呼

呼吸道病毒载量下降有关，表明 H7N9 亚型流感病毒诱导疾病的限制是由于抑制病毒增殖。组织病理学检测也支持这些发现。用单克隆抗体进行预防或治疗，可明显减少病毒感染引起的肺部病变。未来，将在接种其他 H7 亚型流感病毒毒株时，甚至在感染后，确定抗体的有效性。总的来说，数据表明 4H1E8 和 7H9A6 可以对 H7N9 亚型流感病毒感染有很好的预防与治疗作用。体内研究表明，4H1E8 或 7H9A6 在预防或治疗上可保护小鼠免受致命或亚致命攻击，减少病毒复制和肺部病变，这些单克隆抗体可能是一种可以用于预防或治疗 H7N9 亚型流感病毒感染的候选抗体。

第五章 结论

1. 成功制备并筛选获得特异性识别 H7N9 亚型流感病毒 HA1 蛋白且中和活性与亲和力较高的两株单克隆抗体 (4H1E8 与 7H9A6), 并且阐明筛选出的单克隆抗体通过阻断 H7N9 亚型流感病毒粒子的吸附过程发挥抑制病毒增殖的作用。

2. 筛选出两个新的 H7N9 亚型流感病毒 HA1 蛋白的中和表位(¹²¹RESG¹²⁴与¹¹¹VNEEALR¹¹⁷), 在 H7N9 亚型流感病毒中高度保守。

3. 单克隆抗体 4H1E8 与 7H9A6 可对 H7N9 亚型流感病毒感染产生完全保护效应, 显著降低组织病理损伤与病毒载量, 可应用于预防与治疗 H7N9 亚型流感病毒感染。

参考文献

- 邵亮, 俞飞, 2021. 流感病毒抑制剂的研究进展. 病毒学报 37(05): 1187-1196. DOI: 10.13242/j.cnki.bingduxuebao.004036.
- 于康震, 陈化兰, 2015. 禽流感. 中国农业出版社: 27-202.
- ADAMS S E, LEE N, LUGOVITSEV V Y, KAN A, DONNELLY R P, ILYUSHINA N A, 2019. Effect of Influenza H1N1 Neuraminidase V116A and I117V Mutations on NA Activity and Sensitivity to NA Inhibitors. *Antiviral Res*, 169:104539. DOI: 10.1016/j.antiviral.2019.104539.
- ANDREWS S F, JOYCE M G, CHAMBERS M J, GILLESPIE R A, KANEKIYO M, LEUNG K, YANG E S, TSYBOVSKY Y, WHEATLEY A K, CRANK M C, BOYINGTON J C, PRABHAKARAN M S, NARPALA S R, CHEN X, BAILER R T, CHEN G, COATES E, KWONG P D, KOUP R A, MASCOLA J R, GRAHAM B S, LEDGERWOOD J E, MCDERMOTT A B, 2017. Preferential Induction of Cross-Group Influenza A Hemagglutinin Stem-Specific Memory B Cells after H7N9 Immunization in Humans. *Sci Immunol*, 2. DOI: 10.1126/sciimmunol.aan2676.
- ARGOS P, 1988. A Sequence Motif in Many Polymerases. *Nucleic Acids Res*, 16:9909-9916. DOI: 10.1093/nar/16.21.9909.
- ARUNKUMAR G A, IOANNOU A, WOHLBOLD T J, MEADE P, ASLAM S, AMANAT F, AYLLON J, GARCIA-SASTRE A, KRAMMER F, 2019. Broadly Cross-Reactive, Nonneutralizing Antibodies against Influenza B Virus Hemagglutinin Demonstrate Effector Function-dependent Protection against Lethal Viral Challenge in Mice. *J Virol*, 93. DOI: 10.1128/JVI.01696-18.
- ARZT S, BAUDIN F, BARGE A, TIMMINS P, BURMEISTER W P, RUIGROK R W H, 2001. Combined Results from Solution Studies on Intact Influenza Virus M1 Protein and from A New Crystal Form of Its N-terminal Domain Show that M1 Is An Elongated Monomer. *Virology*, 279:439-446. DOI: 10.1006/viro.2000.0727.
- BAJIC G, MARON M J, ADACHI Y, ONODERA T, MCCARTHY K R, MCGEE C E, SEMPOWSKI G D, TAKAHASHI Y, KELSOE G, KURAOKA M, SCHMIDT A G, 2019. Influenza Antigen Engineering Focuses Immune Responses to A Subdominant but Broadly Protective Viral Epitope. *Cell Host & Microbe*, 25:827-+. DOI: 10.1016/j.chom.2019.04.003.
- BANGARU S, ZHANG H, GILCHUK I M, VOSS T G, IRVING R P, GILCHUK P, MATTA P, ZHU X Y, LANG S S, NIEUSMA T, RICHT J A, ALBRECHT R A, VANDERVEN H A, BOMBARDI R, KENT S J, WARD A B, WILSON I A, CROWE J E, 2018. A Multifunctional Human Monoclonal Neutralizing Antibody that Targets A Unique Conserved Epitope on Influenza HA. *Nat Commun*, 9. DOI: 10.1038/s41467-018-04704-9.
- BAO D Q, XUE R X, ZHANG M, LU C Y, MA T X, REN C C, ZHANG T, YANG J M, TENG Q Y, LI X S, LI Z J, LIU Q F, 2021. N-Linked Glycosylation Plays An Important Role in Budding of Neuraminidase Protein and Virulence of Influenza Viruses. *J Virol*, 95. DOI: 10.1128/JVI.02042-20.
- BAR-PELED Y, HUANG J, NUNEZ I A, PIERCE S R, ECKER J W, ROSS T M, MOUSA J J, 2019.

- Structural and Antigenic Characterization of A Computationally-Optimized H5 Hemagglutinin Influenza Vaccine. *Vaccine*, 37:6022-6029. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.08.062.
- BIALAS K M, BUSSEY K A, STONE R L, TAKIMOTO T, 2014. Specific Nucleoprotein Residues Affect Influenza Virus Morphology. *J Virol*, 88:2227-2234. DOI: 10.1128/JVI.03354-13.
- BISWAS S K, BOUTZ P L, NAYAK D P, 1998. Influenza Virus Nucleoprotein Interacts with Influenza Virus Polymerase Proteins. *J Virol*, 72:5493-5501. DOI: 10.1128/JVI.72.7.5493-5501.1998.
- BISWAS S K, NAYAK D P, 1994. Mutational Analysis of The Conserved Motifs of Influenza A Virus Polymerase Basic Protein 1. *J Virol*, 68:1819-1826. DOI: 10.1128/JVI.68.3.1819-1826.1994.
- BIZEBARD T, GIGANT B, RIGOLET P, RASMUSSEN B, DIAT O, BOSECKE P, WHARTON S A, SKEHEL J J, KNOSSOW M, 1995. Structure of Influenza Virus Haemagglutinin Complexed with A Neutralizing Antibody. *Nature*, 376:92-94. DOI: 10.1038/376092a0.
- BRANDENBURG B, KOUDSTAAL W, GOUDSMIT J, KLAREN V, TANG C, BUJNY M V, KORSE H J, KWAKS T, OTTERSTROM J J, JURASZEK J, VAN OIJEN A M, VOGELS R, FRIESEN R H, 2013. Mechanisms of Hemagglutinin Targeted Influenza Virus Neutralization. *PLoS One*, 8:e80034. DOI: 10.1371/journal.pone.0080034.
- BROSZEIT F, TZARUM N, ZHU X, NEMANICHVILI N, EGGINK D, LEENDERS T, LI Z, LIU L, WOLFERT M A, PAPANIKOLAOU A, MARTINEZ-ROMERO C, GAGARINOV I A, YU W, GARCIA-SASTRE A, WENNEKES T, OKAMATSU M, VERHEIJE M H, WILSON I A, BOONS G J, DE VRIES R P, 2019. N-Glycolylneuraminic Acid as A Receptor for Influenza A Viruses. *Cell Rep*, 27:3284-3294 e3286. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.05.048.
- BUI M, WHITTAKER G, HELENIUS A, 1996. Effect of M1 Protein and Low pH on Nuclear Transport of Influenza Virus Ribonucleoproteins. *J Virol*, 70:8391-8401. DOI: 10.1128/JVI.70.12.8391-8401.1996.
- CHAN P K, 2002. Outbreak of Avian Influenza A(H5N1) Virus Infection in Hong Kong in 1997. *Clin Infect Dis*, 34 Suppl 2:S58-64. DOI: 10.1086/338820.
- CHANG P X, SEALY J E, SADEYEN J R, BHAT S, LUKOSAITYTE D, SUN Y P, IQBAL M, 2020. Immune Escape Adaptive Mutations in The H7N9 Avian Influenza Hemagglutinin Protein Increase Virus Replication Fitness and Decrease Pandemic Potential. *J Virol*, 94. DOI: 10.1128/JVI.00216-20.
- CHEN C, LIU L, XIAO Y, CUI S, WANG J, JIN Q, 2018. Structural Insight into A Human Neutralizing Antibody against Influenza Virus H7N9. *J Virol*, 92. DOI: 10.1128/JVI.01850-17.
- CHEN C, LIU Z, LIU L, XIAO Y, WANG J, JIN Q, 2018. Broad Neutralizing Activity of A Human Monoclonal Antibody against H7N9 Strains from 2013 to 2017. *Emerg Microbes Infect*, 7:179. DOI: 10.1038/s41426-018-0182-2.
- CHEN G W, GONG Y N, SHIH S R, 2015. Influenza A Virus Plasticity-A Temporal Analysis of Species-Associated Genomic Signatures. *J Formos Med Assoc*, 114:456-463. DOI: 10.1016/j.jfma.2015.01.015.
- CHEN J L, ZHANG H S, CHEN W W, 2019. Chemiluminescence Immunoassay for Sensing Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 in Cardiovascular Risk Evaluation. *Clin Chim Acta*, 488:143-149. DOI:

- 10.1016/j.cca.2018.11.013.
- CHEN Y Z, LU S, JIA H, DENG Y, ZHOU J F, HUANG B Y, YU Y Y, LAN J M, WANG W L, LOU Y L, QIN K, TAN W J, 2017. A Novel Neutralizing Monoclonal Antibody Targeting The N-Terminal Domain of The MERS-Cov Spike Protein (vol 6, e37, 2017). *Emerg Microbes Infect*, 6. DOI: 10.1038/emi.2017.50.
- CHIDA J, HARA H, UCHIYAMA K, TAKAHASHI E, MIYATA H, KOSAKO H, TOMIOKA Y, ITO T, HORIUCHI H, MATSUDA H, KIDO H, SAKAGUCHI S, 2020. Prion Protein Signaling Induces M2 Macrophage Polarization and Protects from Lethal Influenza Infection in Mice. *PLoS Pathog*, 16. DOI: 10.1371/journal.ppat.1008823.
- CIMINSKI K, PFAFF F, BEER M, SCHWEMMLE M, 2020. Bats Reveal The True Power of Influenza A Virus Adaptability. *PLoS Pathog*, 16:e1008384. DOI: 10.1371/journal.ppat.1008384.
- CUI L, ZHENG W N, LI M H, BAI X Y, YANG W X, LI J, FAN W H, GAO G F, SUN L, LIU W J, 2019. Phosphorylation Status of Tyrosine 78 Residue Regulates The Nuclear Export and Ubiquitination of Influenza A Virus Nucleoprotein. *Front Microbiol*, 10. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01816.
- CURCIO D, FERREIRA CABRERA L, DUARTE A, VALENCIA E, PAZ CHAVEZ C H, IBANEZ-GUZMAN C, JATIVA M, SOTO GERMANI L, FERNANDEZ MERCADO J C, CONTRERAS Z U, MOLIN SALDARRIAGA F, RAMOS PALOMINO I, ALI A, 2010. Ventilator-Associated Pneumonia in Patients with 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) Infection: An Observational Study. *J Chemother*, 22:428-430. DOI: 10.1179/joc.2010.22.6.428.
- DE GRAAF M, FOUCHIER R A M, 2014. Role of Receptor Binding Specificity in Influenza A Virus Transmission and Pathogenesis (vol 33, pg 823, 2014). *Embo J*, 33:1614-1614. DOI: 10.15252/embj.201489251.
- DE JONG R M C, STOCKHOFE-ZURWIEDEN N, VERHEIJ E S, DE BOER-LUIJTZE E A, RUITER S J M, DE LEEUW O S, CORNELISSEN L A H M, 2013. Rapid Emergence of A Virulent PB2 E627K Variant during Adaptation of Highly Pathogenic Avian Influenza H7N7 Virus To Mice. *Virol J*, 10. DOI: 10.1186/1743-422x-10-276.
- DILILLO D J, TAN G S, PALESE P, RAVETCH J V, 2014. Broadly Neutralizing Hemagglutinin Stalk-Specific Antibodies Require Fcγ Interactions for Protection against Influenza Virus In Vivo. *Nat Med*, 20:143-151. DOI: 10.1038/nm.3443.
- DONG J, GILCHUK I, LI S, IRVING R, GOFF M T, TURNER H L, WARD A B, CARNAHAN R H, CROWE J E, JR., 2020. Anti-Influenza H7 Human Antibody Targets Antigenic Site in Hemagglutinin Head Domain Interface. *J Clin Invest*. DOI: 10.1172/JCI136032.
- DORTMANS J C F M, DEKKERS J, WICKRAMASINGHE I N A, VERHEIJE M H, ROTTIER P J M, VAN KUPPEVELD F J M, DE VRIES E, DE HAAN C A M, 2013. Adaptation of Novel H7N9 Influenza A Virus to Human Receptors. *Sci Rep-Uk*, 3. DOI: 10.1038/srep03058.
- DREYFUS C, EKIERT D C, WILSON I A, 2013. Structure of A Classical Broadly Neutralizing Stem Antibody in Complex with A Pandemic H2 Influenza Virus Hemagglutinin. *J Virol*, 87:7149-7154. DOI: 10.1128/JVI.02975-12.

- EKIERT D C, FRIESEN R H, BHABHA G, KWAKS T, JONGENELEN M, YU W, OPHORST C, COX F, KORSE H J, BRANDENBURG B, VOGELS R, BRAKENHOFF J P, KOMPIER R, KOLDIJK M H, CORNELISSEN L A, POON L L, PEIRIS M, KOUDSTAAL W, WILSON I A, GOUDSMIT J, 2011. A Highly Conserved Neutralizing Epitope on Group 2 Influenza A Viruses. *Science*, 333:843-850. DOI: 10.1126/science.1204839.
- ELGENDY E M, ARAI Y, KAWASHITA N, ISOBE A, DAIDOJI T, IBRAHIM M S, ONO T, TAKAGI T, NAKAYA T, MATSUMOTO K, WATANABE Y, 2021. Double Mutations in The H9N2 Avian Influenza Virus PB2 Gene Act Cooperatively to Increase Viral Host Adaptation and Replication for Human Infections. *J Gen Virol*, 102. DOI: 10.1099/jgv.0.001612.
- ELTON D, MEDCALF E, BISHOP K, DIGARD P, 1999. Oligomerization of The Influenza Virus Nucleoprotein: Identification of Positive and Negative Sequence Elements. *Virology*, 260:190-200. DOI: 10.1006/viro.1999.9818.
- GAO J, WAN H, LI X, RAKIC MARTINEZ M, KLENOW L, GAO Y, YE Z, DANIELS R, 2021. Balancing The Influenza Neuraminidase and Hemagglutinin Responses by Exchanging The Vaccine Virus Backbone. *PLoS Pathog*, 17:e1009171. DOI: 10.1371/journal.ppat.1009171.
- GAO Q, YANG C, REN C, ZHANG S, GAO X, JIN M, CHEN H, MA W, ZHOU H, 2020. Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 Delta Inhibits The Nuclear Import of The Nucleoprotein and PA-PB1 Heterodimer of Influenza A Virus. *J Virol*, 95. DOI: 10.1128/JVI.01391-20.
- GAO R B, CAO B, HU Y W, FENG Z J, WANG D Y, HU W F, CHEN J, JIE Z J, QIU H B, XU K, XU X W, LU H Z, ZHU W F, GAO Z C, XIANG N J, SHEN Y Z, HE Z B, GU Y, ZHANG Z Y, YANG Y, ZHAO X, ZHOU L, LI X D, ZOU S M, ZHANG Y, LI X Y, YANG L, GUO J F, DONG J, LI Q, DONG L B, ZHU Y, BAI T, WANG S W, HAO P, YANG W Z, ZHANG Y P, HAN J, YU H J, LI D X, GAO G F, WU G Z, WANG Y, YUAN Z H, SHU Y L, 2013. Human Infection with A Novel Avian-Origin Influenza A (H7N9) Virus. *New Engl J Med*, 368:1888-1897. DOI: 10.1056/NEJMoa1304459.
- GE H, LIU G, XIANG Y F, WANG Y, GUO C W, CHEN N H, ZHANG Y J, WANG Y F, KITAZATO K, XU J, 2014. The Mechanism of Poly-Galloyl-Glucoses Preventing Influenza A Virus Entry into Host Cells. *PLoS One*, 9:e94392. DOI: 10.1371/journal.pone.0094392.
- GUO H, RABOUW H, SLOMP A, DAI M, VAN DER VEGT F, VAN LENT J W M, MCBRIDE R, PAULSON J C, DE GROOT R J, VAN KUPPEVELD F J M, DE VRIES E, DE HAAN C A M, 2018. Kinetic Analysis of The Influenza A Virus HA/NA Balance Reveals Contribution of NA to Virus-Receptor Binding and NA-Dependent Rolling on Receptor-Containing Surfaces. *PLoS Pathog*, 14:e1007233. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007233.
- HATAKEYAMA D, SHOJI M, OGATA S, MASUDA T, NAKANO M, KOMATSU T, SAITOH A, MAKIYAMA K, TSUNEISHI H, MIYATAKE A, TAKAHIRA M, NISHIKAWA E, OHKUBO A, NODA T, KAWAOKA Y, OHTSUKI S, KUZUHARA T, 2022. Acetylation of The Influenza A Virus Polymerase Subunit PA in The N-Terminal Domain Positively regulates Its Endonuclease Activity. *FEBS J*, 289:231-245. DOI: 10.1111/febs.16123.
- HAYASHI T, WILLS S, BUSSEY K A, TAKIMOTO T, 2015. Identification of Influenza A Virus PB2

- Residues Involved in Enhanced Polymerase Activity and Virus Growth in Mammalian Cells At Low Temperatures. *J Virol*, 89:8042-8049. DOI: 10.1128/JVI.00901-15.
- HAYE K, BURMAKINA S, MORAN T, GARCIA-SASTRE A, FERNANDEZ-SESMA A, 2009. The NS1 Protein of A Human Influenza Virus Inhibits Type I Interferon Production and The Induction of Antiviral Responses in Primary Human Dendritic and Respiratory Epithelial Cells. *J Virol*, 83:6849-6862. DOI: 10.1128/JVI.02323-08.
- HE D, GU J, GU M, WU H, LI J, ZHAN T, CHEN Y, XU N, GE Z, WANG G, HAO X, WANG X, HU J, HU Z, HU S, LIU X, LIU X, 2021. Genetic and Antigenic Diversity of H7N9 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus in China. *Infect Genet Evol*, 93:104993. DOI: 10.1016/j.meegid.2021.104993.
- HSIEH C L, RUSH S A, PALOMO C, CHOU C W, PICKENS W, MAS V, MCLELLAN J S, 2022. Structure-Based Design of Prefusion-Stabilized Human Metapneumovirus Fusion Proteins. *Nat Commun*, 13. DOI: 10.1038/s41467-022-28931-3.
- HU Y, LIU X K, ZHANG A D, ZHOU H B, LIU Z D, CHEN H C, JIN M L, 2015. CHD3 Facilitates VrnP Nuclear Export by Interacting with NES1 of Influenza A Virus NS2. *Cell Mol Life Sci*, 72:971-982. DOI: 10.1007/s00018-014-1726-9.
- HUBER V C, LYNCH J M, BUCHER D J, LE J, METZGER D W, 2001. Fc Receptor-Mediated Phagocytosis Makes A Significant Contribution to Clearance of Influenza Virus Infections. *J Immunol*, 166:7381-7388. DOI: DOI 10.4049/jimmunol.166.12.7381.
- JALILY P H, ELDESTROM J, MILLER S C, KWAN D C, TAI S S H, CHOU D, NIKURA M, TIETJEN I, FEDIDA D, 2016. Mechanisms of Action of Novel Influenza A/M2 Viroprotein Inhibitors Derived from Hexamethylene Amiloride. *Mol Pharmacol*, 90:80-95. DOI: 10.1124/mol.115.102731.
- JONES M M, 2010. The American Red Cross and Local Response to The 1918 Influenza Pandemic: A Four-City Case Study. *Public Health Rep*, 125 Suppl 3:92-104. DOI: 10.1177/00333549101250S312.
- JOSEPH U, SU Y C, VIJAYKRISHNA D, SMITH G J, 2017. The Ecology and Adaptive Evolution of Influenza A Interspecies Transmission. *Influenza Other Resp*, 11:74-84. DOI: 10.1111/irv.12412.
- JOSEPH U, SU Y C F, VIJAYKRISHNA D, SMITH G J D, 2017. The Ecology and Adaptive Evolution of Influenza A Interspecies Transmission. *Influenza Other Resp*, 11:74-84. DOI: 10.1111/irv.12412.
- KANG H M, PARK H Y, LEE K J, CHOI J G, LEE E K, SONG B M, LEE H S, LEE Y J, 2014. Characterization of H7 Influenza A Virus in Wild and Domestic Birds in Korea. *PLoS One*, 9. DOI: 10.1371/journal.pone.0091887.
- KO Y A, YU Y H, WU Y F, TSENG Y C, CHEN C L, GOH K S, LIAO H Y, CHEN T H, CHENG T R, YANG A S, WONG C H, MA C, LIN K I, 2021. A Non-Neutralizing Antibody Broadly Protects against Influenza Virus Infection by Engaging Effector Cells. *PLoS Pathog*, 17:e1009724. DOI: 10.1371/journal.ppat.1009724.
- KOHLER G, MILSTEIN C, 1975. Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature*, 256:495-497. DOI: 10.1038/256495a0.
- KONG H, MA S, WANG J, GU C, WANG Z, SHI J, DENG G, GUAN Y, CHEN H, 2019. Identification of Key Amino Acids in The PB2 and M1 Proteins of H7N9 Influenza Virus that Affect Its

- Transmission In Guinea Pigs. *J Virol*, 94. DOI: 10.1128/JVI.01180-19.
- KRAMMER F, COX R J, 2013. The Emergence of H7N9 Viruses: A Chance to Redefine Correlates of Protection for Influenza Virus Vaccines. *Expert Rev Vaccines*, 12:1369-1372. DOI: 10.1586/14760584.2013.850036.
- LAM T T Y, WANG J, SHEN Y Y, ZHOU B P, DUAN L, CHEUNG C L, MA C, LYCETT S J, LEUNG C Y H, CHEN X C, LI L F, HONG W S, CHAI Y J, ZHOU L L, LIANG H Y, OU Z H, LIU Y M, FAROOQUI A, KELVIN D J, POON L L M, SMITH D K, PYBUS O G, LEUNG G M, SHU Y L, WEBSTER R G, WEBBY R J, PEIRIS J S M, RAMBAUT A, ZHU H C, GUAN Y, 2013. The Genesis and Source of The H7N9 Influenza Viruses Causing Human Infections in China. *Nature*, 502:241-+. DOI: 10.1038/nature12515.
- LAM T T Y, ZHOU B P, WANG J, CHAI Y J, SHEN Y Y, CHEN X C, MA C, HONG W S, CHEN Y, ZHANG Y J, DUAN L, CHEN P W, JIANG J F, ZHANG Y, LI L F, POON L L M, WEBBY R J, SMITH D K, LEUNG G M, PEIRIS J S M, HOLMES E C, GUAN Y, ZHU H C, 2015. Dissemination, Divergence and Establishment of H7N9 Influenza Viruses in China. *Nature*, 522:102-U265. DOI: 10.1038/nature14348.
- LEE C C D, WATANABE Y, WU N C, HAN J, KUMAR S, PHOLCHAREE T, SEABRIGHT G E, ALLEN J D, LIN C W, YANG J R, LIU M T, WU C Y, WARD A B, CRISPIN M, WILSON I A, 2021. A Cross-Neutralizing Antibody between HIV-1 and Influenza Virus. *PLoS Pathog*, 17. DOI: 10.1371/journal.ppat.1009407.
- LI C, CHEN H, 2021. H7N9 Influenza Virus in China. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 11. DOI: 10.1101/cshperspect.a038349.
- LI K S, GUAN Y, WANG J, SMITH G J, XU K M, DUAN L, RAHARDJO A P, PUTHAVATHANA P, BURANATHAI C, NGUYEN T D, ESTOEPANGESTIE A T, CHAISINGH A, AUEWARAKUL P, LONG H T, HANH N T, WEBBY R J, POON L L, CHEN H, SHORTRIDGE K F, YUEN K Y, WEBSTER R G, PEIRIS J S, 2004. Genesis of A Highly Pathogenic and Potentially Pandemic H5N1 Influenza Virus in Eastern Asia. *Nature*, 430:209-213. DOI: 10.1038/nature02746.
- LI Y, SUN L, ZHENG W N, MAHESUTHAN M, LI J, BI Y H, WANG H R, LIU W J, LUO T R, 2018. Phosphorylation and Dephosphorylation of Threonine 188 in Nucleoprotein is Crucial for The Replication of Influenza A Virus. *Virology*, 520:30-38. DOI: 10.1016/j.virol.2018.05.002.
- LI Y, WANG J, YANG Y Q, HAN S Q, 2020. Sulfur and Nitrogen Co-Doped Graphene Quantum Dot-Assisted Chemiluminescence for Sensitive Detection of Tryptophan and Mercury (II). *Luminescence*, 35:773-780. DOI: 10.1002/bio.3783.
- LIU J, STEVENS D J, HAIRE L F, WALKER P A, COOMBS P J, RUSSELL R J, GAMBLIN S J, SKEHEL J J, 2009. Structures of Receptor Complexes Formed by Hemagglutinins from The Asian Influenza Pandemic of 1957. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106:17175-17180. DOI: 10.1073/pnas.0906849106.
- MANCERA GRACIA J C, PEARCE D S, MASIC A, BALASCH M, 2020. Influenza A Virus in Swine: Epidemiology, Challenges and Vaccination Strategies. *Front Vet Sci*, 7:647. DOI:

- 10.3389/fvets.2020.00647.
- MANZOOR R, EGUCHI N, YOSHIDA R, OZAKI H, KONDOH T, OKUYA K, MIYAMOTO H, TAKADA A, 2020. A Novel Mechanism Underlying Antiviral Activity of An Influenza Virus M2-Specific Antibody. *J Virol*, 95. DOI: 10.1128/JVI.01277-20.
- MCAULEY J L, GILBERTSON B P, TRIFKOVIC S, BROWN L E, MCKIMM-BRESCHKIN J L, 2019. Influenza Virus Neuraminidase Structure and Functions. *Front Microbiol*, 10. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00039.
- MENG X, WANG Y, 2021. Drug Repurposing for Influenza Virus Polymerase Acidic (PA) Endonuclease Inhibitor. *Molecules*, 26. DOI: 10.3390/molecules26237326.
- MIOTTO O, HEINY A T, TAN T W, AUGUST J T, BRUSIC V, 2008. Identification of Human-to-Human Transmissibility Factors in PB2 Proteins of Influenza A by Large-Scale Mutual Information Analysis. *Bmc Bioinformatics*, 9. DOI: 10.1186/1471-2105-9-S1-S18.
- MIZUTA S, OTAKI H, ISHIKAWA T, MAKAU J N, YAMAGUCHI T, FUJIMOTO T, TAKAKURA N, SAKAUCHI N, KITAMURA S, NONO H, NISHI R, TANAKA Y, TAKEDA K, NISHIDA N, WATANABE K, 2022. Lead Optimization of Influenza Virus RNA Polymerase Inhibitors Targeting PA-PB1 Interaction. *J Med Chem*, 65:369-385. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.1c01527.
- MOK C K P, LEE H H Y, LESTRA M, NICHOLLS J M, CHAN M C W, SIA S F, ZHU H C, POON L L M, GUAN Y, PEIRIS J S M, 2014. Amino Acid Substitutions in Polymerase Basic Protein 2 Gene Contribute to The Pathogenicity of The Novel A/H7N9 Influenza Virus in Mammalian Hosts. *J Virol*, 88:3568-3576. DOI: 10.1128/JVI.02740-13.
- MONDAL A, POTTS G K, DAWSON A R, COON J J, MEHLE A, 2015. Phosphorylation at The Homotypic Interface Regulates Nucleoprotein Oligomerization and Assembly of The Influenza Virus Replication Machinery. *PLoS Pathog*, 11. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004826.
- MUKAIGAWA J, HATADA E, FUKUDA R, SHIMIZU K, 1991. Involvement of The Influenza A Virus PB2 Protein in The Regulation of Viral Gene Expression. *J Gen Virol*, 72 (Pt 11):2661-2670. DOI: 10.1099/0022-1317-72-11-2661.
- NACHBAGAUER R, CHOI A, HIRSH A, MARGINE I, IIDA S, BARRERA A, FERRES M, ALBRECHT R A, GARCIA-SASTRE A, BOUVIER N M, ITO K, MEDINA R A, PALESE P, KRAMMER F, 2017. Defining The Antibody Cross-Reactome Directed against The Influenza Virus Surface Glycoproteins. *Nat Immunol*, 18:464-473. DOI: 10.1038/ni.3684.
- NAGUIB M M, ABDELWHAB E M, HARDER T C, 2016. Evolutionary Features of Influenza A/H5N1 Virus Populations in Egypt: Poultry and Human Health Implications. *Arch Virol*, 161:1963-1967. DOI: 10.1007/s00705-016-2849-0.
- NEMEROFF M E, BARABINO S M L, LI Y Z, KELLER W, KRUG R M, 1998. Influenza Virus NS1 Protein Interacts with The Cellular 30 kda Subunit of CPSF and Inhibits 3' End Formation of Cellular Pre-Mrnas. *Mol Cell*, 1:991-1000. DOI: 10.1016/S1097-2765(00)80099-4.
- NEUMANN G, KAWAOKA Y, 2015. Transmission of Influenza A Viruses. *Virology*, 479:234-246. DOI: 10.1016/j.virol.2015.03.009.

- NING T T, NIE J H, HUANG W J, LI C G, LI X G, LIU Q, ZHAO H, WANG Y C, 2019. Antigenic Drift of Influenza A(H7N9) Virus Hemagglutinin. *J Infect Dis*, 219:19-25. DOI: 10.1093/infdis/jiy408.
- NISHIYAMA K, TAKEDA Y, MAEKI M, ISHIDA A, TANI H, SHIGEMURA K, HIBARA A, YONEZAWA Y, IMAI K, OGAWA H, TOKESHI M, 2020. Rapid Detection of Anti-H5 Avian Influenza Virus Antibody by Fluorescence Polarization Immunoassay Using A Portable Fluorescence Polarization Analyzer. *Sens Actuators B Chem*, 316:128160. DOI: 10.1016/j.snb.2020.128160.
- NOBUSAWA E, ISHIIHARA H, MORISHITA T, SATO K, NAKAJIMA K, 2000. Change in Receptor-Binding Specificity of Recent Human Influenza A Viruses (H3N2): A Single Amino Acid Change in Hemagglutinin Altered Its Recognition of Sialyloligosaccharides. *Virology*, 278:587-596. DOI: 10.1006/viro.2000.0679.
- OWUOR D C, NGOI J M, OTIENO J R, OTIENO G P, NYASIMI F M, NYIRO J U, AGOTI C N, CHAVES S S, NOKES D J, 2020. Genetic Characterization of Influenza A(H3N2) Viruses Circulating in Coastal Kenya, 2009-2017. *Influenza Other Resp*, 14:320-330. DOI: 10.1111/irv.12717.
- PALESE P, TOBITA K, UEDA M, COMPANS R W, 1974. Characterization of Temperature Sensitive Influenza Virus Mutants Defective in Neuraminidase. *Virology*, 61:397-410. DOI: 10.1016/0042-6822(74)90276-1.
- PARK S, LEE I, KIM J I, BAE J Y, YOO K, KIM J, NAM M, PARK M, YUN S H, CHO W I, KIM Y S, KO Y Y, PARK M S, 2016. Effects of HA and NA Glycosylation Pattern Changes on The Transmission of Avian Influenza A(H7N9) Virus in Guinea Pigs. *Biochem Biophys Res Commun*, 479:192-197. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.09.024.
- PATEL M C, CHESNOKOV A, JONES J, MISHIN V P, DE LA CRUZ J A, NGUYEN H T, ZANDERS N, WENTWORTH D E, DAVIS T C, GUBAREVA L V, 2021. Susceptibility of Widely Diverse Influenza A Viruses to PB2 Polymerase Inhibitor Pimodivir. *Antiviral Res*, 188:105035. DOI: 10.1016/j.antiviral.2021.105035.
- PAULES C I, LAKDAWALA S, MCAULIFFE J M, PASKEL M, VOGEL L, KALLEWAARD N L, ZHU Q, SUBBARAO K, 2017. The Hemagglutinin A Stem Antibody MEDI8852 Prevents and Controls Disease and Limits Transmission of Pandemic Influenza Viruses. *J Infect Dis*, 216:356-365. DOI: 10.1093/infdis/jix292.
- PRACHANRONARONG K L, CANALE A S, LIU P, SOMASUNDARAN M, HOU S R, POH Y P, HAN T, ZHU Q, BENZENE N, ZELDOVICH K B, KOWALIK T F, KURT-YILMAZ N, JENSEN J D, BOLON D N A, MARASCO W A, FINBERG R W, SCHIFFER C A, WANG J P, 2019. Mutations in Influenza A Virus Neuraminidase and Hemagglutinin Confer Resistance against A Broadly Neutralizing Hemagglutinin Stem Antibody. *J Virol*, 93. DOI: 10.1128/JVI.01639-18.
- QIU Y, STEGALKINA S, ZHANG J X, BOUDANOVA E, PARK A, ZHOU Y F, PRABAKARAN P, POUGATCHEVA S, USTYUGOVA I V, VOGEL T U, MUNDLE S T, OOMEN R, DELAGRAVE S, ROSS T M, KLEANTHOUS H, QIU H W, 2020. Mapping of A Novel H3-Specific Broadly Neutralizing Monoclonal Antibody Targeting The Hemagglutinin Globular Head Isolated from An Elite Influenza Virus-Immunized Donor Exhibiting Serological Breadth. *J Virol*, 94. DOI:

- 10.1128/JVI.01035-19.
- QUAN C S, SHI W F, YANG Y, YANG Y C, LIU X Q, XU W, LI H, LI J, WANG Q L, TONG Z, WONG G, ZHANG C, MA S F, MA Z H, FU G H, ZHANG Z W, HUANG Y, SONG H H, YANG L Q, LIU W J, LIU Y X, LIU W J, GAO G F, BI Y H, 2018. New Threats from H7N9 Influenza Virus: Spread and Evolution of High- and Low-Pathogenicity Variants with High Genomic Diversity in Wave Five. *J Virol*, 92. DOI: 10.1128/JVI.00301-18.
- RAJAO D S, PEREZ D R, 2018. Universal Vaccines and Vaccine Platforms to Protect against Influenza Viruses in Humans and Agriculture. *Front Microbiol*, 9. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00123.
- ROSSMAN J S, JING X H, LESER G P, LAMB R A, 2010. Influenza Virus M2 Protein Mediates ESCRT-Independent Membrane Scission. *Cell*, 142:902-913. DOI: 10.1016/j.cell.2010.08.029.
- SCHOUWENBURG P A, RISPENS T, WOLBINK G J, 2013. Immunogenicity of Anti-TNF Biologic Therapies for Rheumatoid Arthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 9:164-172. DOI: 10.1038/nrrheum.2013.4.
- SCHROEDER C, HEIDER H, MONCKE-BUCHNER E, LIN T I, 2005. The Influenza Virus Ion Channel and Maturation Cofactor M2 Is A Cholesterol-Binding Protein. *Eur Biophys J Biophys*, 34:52-66. DOI: 10.1007/s00249-004-0424-1.
- SELZER L, SU Z, PINTILIE G D, CHIU W, KIRKEGAARD K, 2020. Full-Length Three-Dimensional Structure of The Influenza A Virus M1 Protein and Its Organization into A Matrix Layer. *PLoS Biol*, 18:e3000827. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000827.
- SENBAS AKYAZI B, PIRINCAL A, KAWAGUCHI A, NAGATA K, TURAN K, 2020. Interaction of Influenza A Virus NS2/NEP Protein with The Amino-Terminal Part of Nup214. *Turk J Biol*, 44:82-92. DOI: 10.3906/biy-1909-49.
- SHI J Z, DENG G H, KONG H H, GU C Y, MA S J, YIN X, ZENG X Y, CUI P F, CHEN Y, YANG H L, WAN X P, WANG X R, LIU L L, CHEN P C, JIANG Y P, LIU J X, GUAN Y T, SUZUKI Y, LI M, QU Z Y, GUAN L Z, ZANG J K, GU W L, HAN S U, SONG Y M, HU Y Z, WANG Z, GU L L, YANG W Y, LIANG L B, BAO H M, TIAN G B, LI Y B, QIAO C L, JIANG L, LI C J, BU Z G, CHEN H L, 2017. H7N9 Virulent Mutants Detected in Chickens in China Pose An Increased Threat to Humans. *Cell Res*, 27:1409-1421. DOI: 10.1038/cr.2017.129.
- SHI J Z, DENG G H, MA S J, ZENG X Y, YIN X, LI M, ZHANG B, CUI P F, CHEN Y, YANG H L, WAN X P, LIU L L, CHEN P C, JIANG Y P, GUAN Y T, LIU J X, GU W L, HAN S Y, SONG Y M, LIANG L B, QU Z Y, HOU Y J, WANG X R, BAO H M, TIAN G B, LI Y B, JIANG L, LI C J, CHEN H L, 2018. Rapid Evolution of H7N9 Highly Pathogenic Viruses that Emerged in China in 2017. *Cell Host & Microbe*, 24:558-+. DOI: 10.1016/j.chom.2018.08.006.
- SHI Y, ZHANG W, WANG F, QI J X, WU Y, SONG H, GAO F, BI Y H, ZHANG Y F, FAN Z, QIN C F, SUN H L, LIU J H, HAYWOOD J, LIU W J, GONG W M, WANG D Y, SHU Y L, WANG Y, YAN J H, GAO G F, 2013. Structures and Receptor Binding of Hemagglutinins from Human-Infecting H7N9 Influenza Viruses. *Science*, 342:243-247. DOI: 10.1126/science.1242917.
- SHRIVER Z, RAMAN R, VISWANATHAN K, SASISEKHARAN R, 2009. Context-Specific Target Definition in Influenza A Virus Hemagglutinin-Glycan Receptor Interactions. *Chem Biol*, 16:803-814.

- DOI: 10.1016/j.chembiol.2009.08.002.
- SIKORA D, ROCHELEAU L, BROWN E G, PELCHAT M, 2014. Deep Sequencing Reveals The Eight Facets of The Influenza A/Hongkong/1/1968 (H3N2) Virus Cap-Snatching Process. *Sci Rep*, 4:6181. DOI: 10.1038/srep06181.
- SILA-ON D, CHERTCHINNAPA P, SHINKAI Y, KOJIMA T, NAKANO H, 2020. Development of A Dual Monoclonal Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for The Detection of Swine Influenza Virus Using Rabbit Monoclonal Antibody by Ecobody Technology. *J Biosci Bioeng*, 130:217-225. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2020.03.003.
- SKEHEL J J, WILEY D C, 2000. Receptor Binding and Membrane Fusion in Virus Entry: The Influenza Hemagglutinin. *Annu Rev Biochem*, 69:531-569. DOI: 10.1146/annurev.biochem.69.1.531.
- SNACKEN R, KENDAL A P, HAAHEIM L R, WOOD J M, 1999. The Next Influenza Pandemic: Lessons from Hong Kong, 1997. *Emerg Infect Dis*, 5:195-203. DOI: 10.3201/eid0502.990202.
- SONG H, QI J, XIAO H, BI Y, ZHANG W, XU Y, WANG F, SHI Y, GAO G F, 2017. Avian-to-Human Receptor-Binding Adaptation by Influenza A Virus Hemagglutinin H4. *Cell Rep*, 20:1201-1214. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.07.028.
- SOPER G A, 1918. The Influenza Pneumonia Pandemic in The American Army Camps During September and October. 1918. *Science*, 48:451-456. DOI: 10.1126/science.48.1245.451.
- STADLBAUER D, AMANAT F, STROHMEIER S, NACHBAGAUER R, KRAMMER F, 2018. Cross-Reactive Mouse Monoclonal Antibodies Raised Against The Hemagglutinin of A/Shanghai/1/2013 (H7N9) Protect against Novel H7 Virus Isolates in The Mouse Model. *Emerg Microbes Infect*, 7. DOI: 10.1038/s41426-018-0115-0.
- STADLBAUER D, RAJABHATHOR A, AMANAT F, KAPLAN D, MASUD A, TREANOR J J, IZIKSON R, COX M M, NACHBAGAUER R, KRAMMER F, 2017. Vaccination with A Recombinant H7 Hemagglutinin-Based Influenza Virus Vaccine Induces Broadly Reactive Antibodies in Humans. *mSphere*, 2. DOI: 10.1128/mSphere.00502-17.
- STADLBAUER D, ZHU X Y, MCMAHON M, TURNER J S, WOHLBOLD T J, SCHMITZ A J, STROHMEIER S, YU W L, NACHBAGAUER R, MUDD P A, WILSON I A, ELLEBEDY A H, KRAMMER F, 2019. Broadly Protective Human Antibodies that Target The Active Site of Influenza Virus Neuraminidase. *Science*, 366:499-+. DOI: 10.1126/science.aay0678.
- SUN H L, CUI P F, SONG Y F, QI Y, LI X K, QI W B, XU C G, JIAO P R, LIAO M, 2015. PB2 Segment Promotes High-Pathogenicity of H5N1 Avian Influenza Viruses in Mice. *Front Microbiol*, 6. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00073.
- SUN Y, MAO H Y, LOU X Y, WANG X Y, CHEN Y, ZHOU B F, ZHANG Y J, 2021. Molecular Epidemiologic Characteristics of Hemagglutinin from Five Waves of Avian Influenza A (H7N9) Virus Infection, from 2013 to 2017, in Zhejiang Province, China. *Arch Virol*, 166:3323-3332. DOI: 10.1007/s00705-021-05233-5.
- SUTTON T C, LAMIRANDE E W, BOCK K W, MOORE I N, KOUDSTAAL W, REHMAN M, WEVERLING G J, GOUDSMIT J, SUBBARAO K, 2017. In Vitro Neutralization Is Not Predictive

- of Prophylactic Efficacy of Broadly Neutralizing Monoclonal Antibodies CR6261 and CR9114 against Lethal H2 Influenza Virus Challenge in Mice. *J Virol*, 91. DOI: 10.1128/JVI.01603-17.
- TAMBUNAN U S, RAMDHAN, 2010. Identification of Sequence Mutations Affecting Hemagglutinin Specificity to Sialic Acid Receptor in Influenza A Virus Subtypes. *Bioinformatics*, 5:244-249. DOI: 10.6026/97320630005244.
- TAN S, SJAUGI M F, FONG S C, CHONG L C, ABD RAMAN H S, NIK MOHAMED N E, AUGUST J T, KHAN A M, 2021. Avian Influenza H7N9 Virus Adaptation to Human Hosts. *Viruses*, 13. DOI: 10.3390/v13050871.
- TANG J, GAO R B, LIU L Q, ZHANG S X, LIU J, LI X Y, FANG Q Q, FENG Z M, XU C L, HUANG W J, WANG D Y, 2021. Substitution of I222L-E119V in Neuraminidase from Highly Pathogenic Avian Influenza H7N9 Virus Exhibited Synergistic Resistance Effect to Oseltamivir in Mice. *Sci Rep*, 11. DOI: 10.1038/s41598-021-95771-4.
- THARAKARAMAN K, JAYARAMAN A, RAMAN R, VISWANATHAN K, STEBBINS N W, JOHNSON D, SHRIVER Z, SASISEKHARAN V, SASISEKHARAN R, 2013. Glycan Receptor Binding of The Influenza A Virus H7N9 Hemagglutinin. *Cell*, 153:1486-1493. DOI: 10.1016/j.cell.2013.05.034.
- TORABIFARD H, PANAHI A, BROOKS C L, 3RD, 2020. M2 Amphipathic Helices Facilitate Ph-Dependent Conformational Transition in Influenza A Virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117:3583-3591. DOI: 10.1073/pnas.1913385117.
- VESIKARI T, OSTERGAARD L, BEESLAAR J, ABSALON J, EIDEN J J, JANSEN K U, JONES T R, HARRIS S L, MAANSSON R, MUNSON S, O'NEILL R E, YORK L J, PEREZ J L, 2019. Persistence and 4-Year Boosting of The Bactericidal Response Elicited by Two- and Three-Dose Schedules of Menb-Fhbp: A Phase 3 Extension Study in Adolescents. *Vaccine*, 37:1710-1719. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.11.073.
- WALDMANN H, 2019. Human Monoclonal Antibodies: The Benefits of Humanization. *Methods Mol Biol*, 1904:1-10. DOI: 10.1007/978-1-4939-8958-4_1.
- WAN J, XING S, DING L, WANG Y, GU C, WU Y, RONG B, LI C, WANG S, CHEN K, HE C, ZHU D, YUAN S, QIU C, ZHAO C, NIE L, GAO Z, JIAO J, ZHANG X, WANG X, YING T, WANG H, XIE Y, LU Y, XU J, LAN F, 2020. Human-Igg-Neutralizing Monoclonal Antibodies Block The SARS-Cov-2 Infection. *Cell Rep*, 32:107918. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.107918.
- WANG G, LIU D, HU J, GU M, WANG X, HE D, ZHANG L, LI J, ZHENG X, ZENG Z, LIU H, HU S, PENG D, JIAO X, LIU X, 2021. Mutations during The Adaptation of H7N9 Avian Influenza Virus to Mice Lungs Enhance Human-Like Sialic Acid Binding Activity and Virulence in Mice. *Vet Microbiol*, 254:109000. DOI: 10.1016/j.vetmic.2021.109000.
- WANG G, WAN Y, LIN G F, LI Z X, DONG Z N, LIU T C, 2020. Development of A Novel Chemiluminescence Immunoassay for The Detection of Procalcitonin. *J Immunol Methods*, 484. DOI: 10.1016/j.jim.2020.112829.
- WANG J M, CHEN Z, BAO L L, ZHANG W J, XUE Y, PANG X H, ZHANG X, QIN C A, JIN Q, 2015.

- Characterization of Two Human Monoclonal Antibodies Neutralizing Influenza A H7N9 Viruses. *J Virol*, 89:9115-9118. DOI: 10.1128/JVI.01295-15.
- WATANABE A, MCCARTHY K R, KURAOKA M, SCHMIDT A G, ADACHI Y, ONODERA T, TONOUCHE K, CARADONNA T M, BAJIC G, SONG S, MCGEE C E, SEMPOWSKI G D, FENG F, URICK P, KEPLER T B, TAKAHASHI Y, HARRISON S C, KELSOE G, 2019. Antibodies to A Conserved Influenza Head Interface Epitope Protect by An Igg Subtype-Dependent Mechanism. *Cell*, 177:1124-+. DOI: 10.1016/j.cell.2019.03.048.
- WILEY D C, WILSON I A, SKEHEL J J, 1981. Structural Identification of The Antibody-Binding Sites of Hong Kong Influenza Haemagglutinin and Their Involvement in Antigenic Variation. *Nature*, 289:373-378. DOI: 10.1038/289373a0.
- WILSON I A, SKEHEL J J, WILEY D C, 1981. Structure of The Haemagglutinin Membrane Glycoprotein of Influenza Virus at 3 A Resolution. *Nature*, 289:366-373. DOI: 10.1038/289366a0.
- WU Y, GAO G F, 2019. "Breathing" Hemagglutinin Reveals Cryptic Epitopes for Universal Influenza Vaccine Design. *Cell*, 177:1086-1088. DOI: 10.1016/j.cell.2019.04.034.
- XIE J, WENG Y, OU J, ZHAO L, ZHANG Y, WANG J, CHEN W, HUANG M, XIU W, CHEN H, ZHANG Y, WU B, HE W, ZHU Y, YOU L, HUANG Z, ZHANG C, HONG L, WANG W, ZHENG K, 2017. Epidemiological, Clinical, and Virologic Features of Two Family Clusters of Avian Influenza A (H7N9) Virus Infections in Southeast China. *Sci Rep*, 7:1512. DOI: 10.1038/s41598-017-01761-w.
- XIONG F F, LIU X Y, GAO F X, LUO J, DUAN P, TAN W S, CHEN Z, 2020. Protective Efficacy of Anti-Neuraminidase Monoclonal Antibodies against H7N9 Influenza Virus Infection. *Emerg Microbes Infect*, 9:78-87. DOI: 10.1080/22221751.2019.1708214.
- XU Y, PENG R, ZHANG W, QI J, SONG H, LIU S, WANG H, WANG M, XIAO H, FU L, FAN Z, BI Y, YAN J, SHI Y, GAO G F, 2019. Avian-to-Human Receptor-Binding Adaptation of Avian H7N9 Influenza Virus Hemagglutinin. *Cell Rep*, 29:2217-2228 e2215. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.10.047.
- YANG F, XIAO Y X, LU R F, CHEN B, LIU F M, WANG L Y, YAO H P, WU N P, WU H B, 2020. Generation of Neutralizing and Non-Neutralizing Monoclonal Antibodies against H7N9 Influenza Virus. *Emerg Microbes Infect*, 9:664-675. DOI: 10.1080/22221751.2020.1742076.
- YANG W, PETKOVA E, SHAMAN J, 2014. The 1918 Influenza Pandemic in New York City: Age-Specific Timing, Mortality, and Transmission Dynamics. *Influenza Other Resp*, 8:177-188. DOI: 10.1111/irv.12217.
- YOSHIDA R, IGARASHI M, OZAKI H, KISHIDA N, TOMABECHI D, KIDA H, ITO K, TAKADA A, 2009. Cross-Protective Potential of A Novel Monoclonal Antibody Directed against Antigenic Site B of The Hemagglutinin of Influenza A Viruses. *PLoS Pathog*, 5:e1000350. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000350.
- ZENG X Y, TIAN G B, SHI J Z, DENG G H, LI C J, CHEN H L, 2018. Vaccination of Poultry Successfully Eliminated Human Infection with H7N9 Virus in China. *Sci China Life Sci*, 61:1465-1473. DOI: 10.1007/s11427-018-9420-1.
- ZENG Y, XU S, WEI Y, ZHANG X, WANG Q, JIA Y, WANG W, HAN L, CHEN Z, WANG Z, ZHANG

- B, CHEN H, LEI C Q, ZHU Q, 2021. The PB1 Protein of Influenza A Virus Inhibits The Innate Immune Response by Targeting MAVS for NBR1-Mediated Selective Autophagic Degradation. *PLoS Pathog*, 17:e1009300. DOI: 10.1371/journal.ppat.1009300.
- ZHANG Q Y, SHI J Z, DENG G H, GUO J, ZENG X Y, HE X J, KONG H H, GU C Y, LI X Y, LIU J X, WANG G J, CHEN Y, LIU L L, LIANG L B, LI Y Y, FAN J, WANG J L, LI W H, GUAN L Z, LI Q M, YANG H L, CHEN P C, JIANG L, GUAN Y T, XIN X G, JIANG Y P, TIAN G B, WANG X R, QIAO C L, LI C J, BU Z G, CHEN H L, 2013. H7N9 Influenza Viruses are Transmissible in Ferrets by Respiratory Droplet. *Science*, 341:410-414. DOI: 10.1126/science.1240532.
- ZHANG W, QI J, SHI Y, LI Q, GAO F, SUN Y, LU X, LU Q, VAVRICKA C J, LIU D, YAN J, GAO G F, 2010. Crystal Structure of The Swine-Origin A (H1N1)-2009 Influenza A Virus Hemagglutinin (HA) Reveals Similar Antigenicity to that of The 1918 Pandemic Virus. *Protein Cell*, 1:459-467. DOI: 10.1007/s13238-010-0059-1.
- ZHANG Y, ZHENG Q C, 2021. In Silico Analysis Revealed A Unique Binding but Ineffective Mode of Amantadine to Influenza Virus B M2 Channel. *J Phys Chem Lett*, 12:1169-1174. DOI: 10.1021/acs.jpcclett.0c03560.
- ZHAO M M, WANG L Y, LI S T, 2017. Influenza A Virus-Host Protein Interactions Control Viral Pathogenesis. *Int J Mol Sci*, 18. DOI: 10.3390/ijms18081673.
- ZHENG W, CUI L, LI M, LI Y, FAN W, YANG L, LI J, SUN L, LIU W, 2021. Nucleoprotein Phosphorylation Site (Y385) Mutation Confers Temperature Sensitivity to Influenza A Virus due to Impaired Nucleoprotein Oligomerization at A Lower Temperature. *Sci China Life Sci*, 64:633-643. DOI: 10.1007/s11427-020-1727-y.
- ZHOU Y Q, WU X X, YAN D Y, CHEN C, LIU X X, HUANG C Y, FU X F, TIAN G, DING C, WU J, XU J, LI L J, YANG S G, 2021. V292I Mutation in PB2 Polymerase Induces Increased Effects of E627K in Influenza H7N9 Virus Replication in Cells. *Virus Res*, 291. DOI: 10.1016/j.virusres.2020.198186.
- ZHU W, FENG Z, CHEN Y, YANG L, LIU J, LI X, LIU S, ZHOU L, WEI H, GAO R, WANG D, SHU Y, 2019. Mammalian-Adaptive Mutation NP-Q357K in Eurasian H1N1 Swine Influenza Viruses Determines The Virulence Phenotype in Mice. *Emerg Microbes Infect*, 8:989-999. DOI: 10.1080/22221751.2019.1635873.
- ZHU W, LI L, YAN Z, GAN T, LI L, CHEN R, CHEN R, ZHENG Z, HONG W, WANG J, SMITH D K, GUAN Y, ZHU H, SHU Y, 2015. Dual E627K and D701N Mutations in The PB2 Protein of A(H7N9) Influenza Virus Increased Its Virulence in Mammalian Models. *Sci Rep*, 5:14170. DOI: 10.1038/srep14170.
- ZOST S J, LEE J, GUMINA M E, PARKHOUSE K, HENRY C, WU N C, LEE C D, WILSON I A, WILSON P C, BLOOM J D, HENSLEY S E, 2019. Identification of Antibodies Targeting The H3N2 Hemagglutinin Receptor Binding Site Following Vaccination of Humans. *Cell Rep*, 29:4460-4470 e4468. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.11.084.

附录 A

H7N9-SZ19-HA 蛋白编码区核苷酸序列

ATG AAC ACT CAA ATC CTG GTA TTC GCT CTG ATT GCG ATC ATT CCA ACA AAT GCA GAC
AAA ATC TGC CTC GGA CAT CAT GCC GTG TCAAAC GGA ACC AAA GTA AAC ACATTA ACT
GAA AGA GGA GTG GAA GTC GTC AAT GCA ACT GAA ACA GTG GAA CGA ACA AAC ATC
CCC AGG ATC TGC TCA AAA GGG AAA AGG ACA GTT GAC CTC GGT CAA TGT GGA CTC
CTG GGG ACA ATC ACT GGA CCA CCT CAA TGT GAC CAA TTC CTA GAA TTT TCG GCC GAT
TTA ATT ATT GAG AGG CGA GAA GGA AGT GAT GTC TGT TAT CCT GGG AAA TTC GTG AAT
GAA GAA GCT CTG AGG CAA ATT CTC AGA GAA TCA GGC GGA ATT GAC AAG GAA GCA
ATG GGA TTC ACA TAC AAT GGA ATA AGA ACT AAT GGA GTA ACC AGT GCA TGT AAG AGA
TCA GGA TCT TCA TTC TAT GCA GAA ATG AAA TGG CTC CTG TCA AAC ACA GAT AAT GCT
GCA TTC CCG CAG ATG ACT AAG TCA TAT AAA AAT ACA AGA AAA AGC CCA GCT ATA ATA
GTA TGG GGG ATC CAT CAT TCC GTT TCA ACT GCA GAG CAA ACC AAG CTA TAT GGG AGT
GGA AAC AAA CTG GTG ACA GTT GGG AGT TCT AAT TAT CAA CAA TCT TTC GTA CCG AGT
CCA GGA GCG AGA CCA CAA GTT AAT GGT CTA TCT GGA AGA ATT GAC TTT CAT TGG CTA
ATG CTA AAT CCC AAT GAT ACA GTC ACT TTC AGT TTC AAT GGG GCT TTC ATA GCT CCA
GAC CGT GCA AGC TTC CTG AGA GGA AAA TCT ATG GGA ATC CAG AGT GGA GTA CAG
GTT GAT GCC AAT TGT GAA GGG GAC TGC TAT CAT AGT GGT GGG ACA ATA ATA AGT AAC
TTG CCA TTT CAG AAC ATA GAT AGC AGG GCA GTT GGA AAA TGT CCG AGA TAT GTT AAG
CAA AGG AGT CTG CTG CTG GCA ACA GGG ATG AAG AAT GTT CCT GAG ATT CCA AAG
GGA AGA GGC CTA TTT GGT GCT ATA GCG GGT TTC ATT GAA AAT GGA TGG GAA GGC CTA
ATT GAT GGT TGG TAT GGT TTC AGA CAC CAG AAT GCA CAG GGA GAG GGA ACT GCT
GCA GAT TAC AAA AGC ACT CAA TCG GCA ATT GAT CAA ATA ACA GGG AAA TTA AAC CGG
CTT ATA GCA AAA ACC AAC CAA CAA TTT GAG TTG ATA GAC AAT GAA TTC AAT GAG GTA
GAG AAG CAA ATC GGT AAT GTG ATA AAT TGG ACC AGA GAT TCT ATA ACA GAA GTG TGG
TCA TAC AAT GCT GAA CTC TTG GTA GCA ATG GAG AAC CAG CAT ACA ATT GAT CTG GCT
GAT TCA GAA ATG GAC AAA CTG TAC GAA CGA GTG AAA AGA CAG CTG AGA GAG AAT
GCT GAA GAG GAT GGC ACT GGT TGC TTT GAA ATA TTT CAC AAG TGT GAT GAT GAC TGT
ATG GCC AGT ATT AGA AAT AAC ACC TAT GAT CAC AGA AAA TAC AGG GAA GAG GCA
ATG CAA AAT AGA ATA CAG ATT GAC CCA GTC AAA CTA AGC AGC GGC TAC AAA GAT GTG
ATA CTT TGG TTT AGC TTC GGG GCA TCA TGT TTC ATA CTT CTA GCC ATT GTA ATG GGC
CTT GTC TTC ATA TGT GTA AAG AAT GGA AAC ATG CGG TGC ACT ATT TGT ATA TAA