

密级:

论文编号:



中国农业科学院

学位论文

SARS-CoV-2 S1 蛋白单克隆抗体制备及双 抗原夹心 ELISA 抗体检测方法的建立

硕 士 研 究 生: 钟杰

学 号: 82101195326

指 导 教 师: 华荣虹 研究员

申 请 学 位 类 别: 兽医硕士

领 域: 兽医

培 养 单 位: 哈尔滨兽医研究所

研究生院

2022 年 6 月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences Thesis

Preparation of Monoclonal Antibody Against SARS-CoV-2 S1 Protein and Establishment of Double-antigen Sandwich ELISA Antibody Detection Method

Candidate: ZHONG Jie

Student ID: 82101195326

Supervisor: Professor HUA Ronghong

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

Major: Veterinary Medicine

**Institution: Harbin Veterinary Research Institute
Graduate School**

June 2022

摘要

新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 是由新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 感染引起的一种传染病。自 2019 年暴发至 2022 年 4 月已经累计造成近 5 亿人感染, 6 百余万人死亡, 造成人类生命财产重大损失。且有研究表明猫、貂等多种动物对 SARS-CoV-2 具有易感性, 该病原存在人兽共患的风险, 需要开展动物新型冠状病毒疫苗及相关诊断检测技术研究, 以用来建立感染动物模型, 追溯病毒感染的源头。SARS-CoV-2 表面有刺突蛋白, 即 S 蛋白, S 蛋白在病毒与受体结合以及诱导机体产生免疫保护中发挥重要作用。S 蛋白经 furin 位点剪切为 S1 与 S2 两个亚基, S1 亚基中存在受体结合结构域 (RBD), 也是主要的中和表位富集区。

本研究将 SARS-CoV-2 S1 蛋白基因序列进行密码子优化、经合成并克隆至 pCAG-C 载体中, 转染 BHK-21 细胞, 经克隆、间接免疫荧光试验、Western Blot 等试验进行筛选, 筛选出一株可以稳定分泌表达 S1 蛋白的细胞系。对稳定表达细胞系进行扩大培养, 收集培养上清液, 使用 Ni-NTA 亲和层析树脂进行纯化, 并经 SDS-PAGE、Western Blot 等试验鉴定, 最后得到纯化的 S1 蛋白。

将纯化 S1 蛋白作为抗原, 免疫 BALB/c 小鼠。加强免疫后测定小鼠血清抗体效价, 取效价较高的小鼠脾脏细胞进行融合。用 S1 蛋白包被酶标板, 通过间接 ELISA 试验对融合细胞进行筛选, 结果共筛选出 7 株杂交瘤细胞株 (1A4、1F6、5E7、12F5、14F7、6B3、8C6)。间接免疫荧光试验鉴定结果显示 7 株抗体均能与 SARS-CoV-2 S1 发生特异性反应; 而 Western Blot 结果显示 7 株抗体均不能识别变性状态的 S1 蛋白, 表明这些抗体识别的抗原表位为构象表位; 单克隆抗体亚型鉴定结果表明这 7 株抗体均为 IgG1/ κ 型; 中和试验结果表明这 7 株抗体都有病毒中和活性。进一步用间接免疫荧光试验表明 7 株单克隆抗体中的 5 株 (1A4、1F6、12F5、14F7、6B3) 可以与 S1 蛋白的 RBD 区域反应, 且能保持与 Delta 变异株 S 蛋白 RBD 区域的反应性。

本研究又将 SARS-CoV-2 RBD 的基因克隆至 pCAG-C 表达载体中, 转染 BHK21 细胞, 经克隆与筛选后得到了稳定分泌表达 RBD 蛋白的重组细胞系。将重组细胞系培养上清液用 Ni-NTA 树脂进行亲和层析纯化, 获得了纯化的 RBD 蛋白。对纯化 RBD 蛋白进行 HRP 标记, 以纯化 RBD 为包被抗原, 建立新型冠状病毒双抗原夹心 ELISA 抗体检测方法。对 ELISA 方法进行条件优化, 确定了以下条件: 包被液为 0.05 M 的碳酸盐缓冲液, RBD 蛋白的包被浓度为 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 包被条件为 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜包被; 封闭液为含 0.5% PVA 的 PBS, 封闭条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h; 样品稀释液为含 10% 马血清的 PBST; 样品孵育条件为室温 2 h; HRP 标记 RBD 稀释倍数为 1:10000, 室温孵育 30 min; TMB 显色液室温显色 10 min。用该方法对猪流行性腹泻病毒 (PEDV)、猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV) 抗体阳性血清样品进行检测, 结果显示该方法与以上病原的抗体无交叉反应。批间重复与批内重复变异系数都小于 10%, 证明其重复性良好。

综上所述, 本研究成功表达纯化了 SARS-CoV-2 S1 蛋白, 制备了 S1 蛋白单克隆抗体, 为 SARS-CoV-2 致病机制等方面的研究奠定基础。用细胞系表达的 RBD 蛋白建立了一种通用型新型冠状病毒双抗原夹心 ELISA 抗体检测方法, 对动物新型冠状病毒的血清流行病学

监测以及疫苗免疫评价提供了技术支持。

关键词：新型冠状病毒，S1 蛋白，RBD 蛋白，双抗原夹心 ELISA 抗体检测方法

Abstract

COVID-19 is an infectious disease caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Since the outbreak in 2019, it has infected hundreds of millions of people, killed millions of people and caused heavy losses of human life and property. In addition, studies have shown that a variety of animals, such as cats and minks, are susceptible to SARS-CoV-2, and there is a risk of zoonotic infection of SARS-CoV-2. Therefore, studies on animal SARS-CoV-2 vaccine and related diagnostic detection techniques are needed, to establish animal models of infection and trace the source of infection. There are three structural proteins on virus surface, among which S protein is the spike protein, which plays an important role in the binding of receptor and the induction of immune protection. S protein is cleaved into S1 and S2 subunits by furin, and there is receptor binding domain (RBD) in S1 subunit, which is also the main neutralization epitope rich region.

In this study, the gene sequence of S1 protein of SARS-CoV-2 was codon optimized, synthesized and cloned into pCAG-C vector, transfected into BHK-21 cells. Transfected cells were screened by indirect immunofluorescence assay, Western Blot and other tests. The cell lines with stable expression S1 protein were expanded for culture, culture supernatant was collected and purified by Ni-NTA affinity chromatography column. The purified S1 protein was identified by SDS-PAGE and Western blot.

The purified S1 protein was used as antigen to immune BALB/c mice for monoclonal antibodies preparation. After immunization, the antibody titer of mouse serum was determined. And the spleen cells of mouse with highest antibody titer were fused with SP2/0 cells. Seven hybridoma cell lines (1A4, 1F6, 5E7, 12F5, 14F7, 6B3, 8C6) were screened by indirect ELISA using S1 protein coated plate. Indirect immunofluorescence assay showed that all the 7 antibodies could react specifically with SARS-CoV-2 S1, while Western Blot showed no specific bands, indicating that the epitopes recognized by these antibodies were conformation epitopes. Monoclonal antibody subtype identification showed that all the 7 antibodies were IgG1/ κ type. The neutralization test results showed that all the 7 antibodies had neutralization activity. Further indirect immunofluorescence assay showed that five of the seven monoclonal antibodies (1A4, 1F6, 12F5, 14F7, 6B3) could react with the RBD region of S1 protein and maintain the reactivity with the RBD region of Delta variant S protein. The double-antigen sandwich ELISA method was established for the detection of SARS-CoV-2 antibody. The following conditions were determined after optimization of ELISA: The coating solution was 0.05 M carbonate buffer, the coating concentration of RBD protein was 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and the coating condition was at 4°C for overnight. The blocking solution was PBS containing 0.5% PVA, and the blocking condition was at 37°C for 2 h. The sample was diluted with PBST containing 10% horse serum and incubated at room temperature for 2 h. The HRP-RBD dilution ratio was 1:10,000, and incubated at room

temperature for 30 min. TMB chromogenic solution chromogenic incubation at room temperature for 10 min. The positive sera samples of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) and transmissible gastroenteritis (TGEV) antibodies were detected by this method, and the results showed that this method had no cross-reaction with the antibodies of these pathogens. The coefficient of variation of interbatch and intra-batch repeats were both less than 10%, which proved that the repeatability was well.

In summary, S1 protein of SAES-CoV-2 was successfully expressed and purified in this study, and monoclonal antibodies of S1 protein were prepared, which laid a foundation for the study of SARS-CoV-2 pathogenesis and other aspects. A novel double-antigen sandwich ELISA antibody detection assay has been established for detection of SARS-CoV-2 specific antibody. This study provides technical support for the sero-epidemiological surveillance of SARS-CoV-2 in animals and the evaluation of vaccine.

Keywords: SARS-CoV-2, S1 protein, RBD protein, Double antigen sandwich ELISA for antibody detection

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 SARS-COV-2 病毒的结构与基因表达.....	1
1.2 SARS-COV-2 S 蛋白的结构与功能	2
1.2.1 SARS-CoV-2 S 蛋白的结构	2
1.2.2 SARS-CoV-2 S1 亚基的结构	2
1.2.3 SARS-CoV-2 S 蛋白的功能	3
1.3 SARS-COV-2 的流行病学.....	4
1.4 新型冠状病毒肺炎的诊断	4
1.4.1 核酸检测.....	4
1.4.2 CT 诊断.....	5
1.4.3 免疫学检测.....	5
1.5 本研究的目 的及意义.....	5
第二章 SARS-CoV-2 S1 蛋白的表达纯化与单克隆抗体的制备	7
2.1 实验材料.....	7
2.1.1 试验试剂与材料.....	7
2.1.2 主要实验设备.....	7
2.2 实验方法.....	7
2.2.1 SARS-CoV-2 S1、RBD、SARS-CoV-2(B.1.617.2 株)RBD 表 达质粒的构建	7
2.2.2 质粒的转染及表达 S1 蛋白细胞的克隆与筛选	8
2.2.3 S1 蛋白的纯化与鉴定	9
2.2.4 动物免疫.....	10
2.2.5 血清抗体效价检测.....	10
2.2.6 饲养细胞的制备.....	10
2.2.7 细胞融合	10
2.2.8 杂交瘤细胞的筛选.....	11
2.2.9 单克隆抗体 IFA 鉴定.....	11
2.2.10 单克隆抗体 Western Blot 鉴定.....	11
2.2.11 单克隆抗体亚型的鉴定.....	11
2.2.12 单克隆抗体的纯化.....	11
2.2.13 单克隆抗体的效价测定.....	12
2.2.14 单克隆抗体与 S 蛋白 RBD 区域的反应性鉴定	12
2.2.15 单克隆抗体与 Delta 突变株 S 蛋白 RBD 区域的反应性 鉴定	12

2.3 实验结果.....	12
2.3.1 表达细胞的筛选与克隆.....	12
2.3.2 蛋白纯化.....	14
2.3.3 小鼠免疫及血清抗体检测.....	14
2.3.4 杂交瘤细胞筛选结果.....	15
2.3.5 单克隆抗体 IFA 鉴定结果.....	15
2.3.6 单克隆抗体 Western Blot 鉴定结果.....	16
2.3.7 单克隆抗体亚型鉴定结果.....	17
2.3.8 单克隆抗体的纯化结果.....	17
2.3.9 单克隆抗体效价检测结果.....	18
2.3.10 单克隆抗体与 S 蛋白 RBD 区域的反应性鉴定.....	20
2.3.11 单克隆抗体与 Delta 变异株 SARS-CoV-2 RBD 区域的反应性鉴定.....	20
2.4 讨论.....	21
第三章 SARS-CoV-2 RBD 蛋白的表达纯化与双抗原夹心 ELISA 抗体检测方法的初步建立.....	23
3.1 实验材料.....	23
3.1.1 血清.....	23
3.1.2 主要试剂与材料.....	23
3.1.3 主要实验仪器.....	23
3.2 实验方法.....	24
3.2.1 表达 RBD 蛋白细胞的构建.....	24
3.2.2 RBD 蛋白的纯化与鉴定.....	24
3.2.3 RBD 蛋白的 HRP 标记.....	24
3.2.4 HRP 标记物最佳使用浓度的确定.....	25
3.2.5 抗原最佳包被浓度.....	25
3.2.6 包被条件的确定.....	25
3.2.7 封闭液与封闭条件的选择.....	26
3.2.8 样品稀释液的选择.....	26
3.2.9 样品反应时间的确定.....	26
3.2.10 酶标蛋白作用时间的确定.....	26
3.2.11 临界值的确定.....	26
3.2.12 重复性试验.....	26
3.2.13 ELISA 的特异性试验.....	26
3.3 实验结果.....	27
3.3.1 表达细胞的筛选.....	27
3.3.2 蛋白的纯化与鉴定.....	29
3.3.3 酶标记物最佳稀释度.....	29

3.3.4 抗原最佳包被浓度.....	29
3.3.5 样品包被条件的确定.....	30
3.3.6 封闭液的确定.....	31
3.3.7 稀释液的确定.....	32
3.3.8 样品反应时间的确定.....	33
3.3.9 HRP-RBD 作用时间的确定	34
3.3.10 临界值的确定.....	35
3.3.11 重复性实验结果.....	35
3.3.12 特异性实验结果.....	36
3.4 讨论.....	37
第四章 全文结论	39
参考文献.....	40

主要符号对照表

英文缩写	英文全称	中文名称
BHK-21	Baby hamster kidney cell-21	幼仓鼠肾细胞
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
CoV	Corona virus	冠状病毒
COVID-19	Corona virus disease 2019	新型冠状病毒肺炎
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
FITC	Fluorescein isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
IFA	Indirect immunofluorescence assay	间接免疫荧光试验
mg	Milligram	毫克
mL	Milliliter	毫升
NC	Nitrocellulose	硝酸纤维素
NSP	Nonstructural protein	非结构蛋白
PBS	Phosphate buffered solution	磷酸盐缓冲液
PBST	Phosphate buffered solution with Tween-20	含吐温-20 的磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
RBD	Rceptor binding domain	受体结合结构域
RCF	Relative centrifugal force	相对离心力
rpm	Round per minute	每分钟转数
RT-PCR	Reverse transcription-PCR	反转录聚合酶链式反应
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2	新型冠状病毒
μg	Microgram	微克
μL	Microliter	微升

第一章 绪论

2019年12月下旬,武汉出现了一种罕见的流行性肺炎,经专家鉴定引起这一肺炎的病原为一种新型冠状病毒,国际病毒分类学委员会通过对相关冠状病毒进行分析,将其命名为新型冠状病毒(Severe acute Respiratory Syndrome–Coronavirus, SARS-CoV-2)。(SHI et al., 2020)。有研究表明 SARS-CoV-2 可通过飞沫传播且具有跨物种间感染、人与人之间传播速度快等特征(UMAKANTHAN et al., 2020)。

冠状病毒在鸟类和哺乳动物中广泛存在,在猪、牛、禽、犬和猫中可引起多种疾病,主要有猪传染性胃肠炎、猪流行性腹泻、新生犊牛腹泻、鸡传染性支气管炎病毒、犬冠状病毒病、猫传染性腹膜炎等。在人类中,冠状病毒也可导致多种疾病,从轻度的自限性呼吸道感染到严重的急性呼吸窘迫综合征(ARDS)(BÁRCENA et al., 2009; CHENG et al., 2007; GODET et al., 1992; YAO et al., 2020)。

最初新型冠状病毒肺炎患者均与华南海鲜批发市场关联,因为该市场销售蛇、蝙蝠等野味,怀疑是由人畜共患病病原导致的获得性感染,但深入的调查并没有确定最初的感染途径。通过分离可能引发感染的宿主病毒,对不同物种易感的冠状病毒进行全基因组序列分析,结果表明, SARS-CoV-2 是一种介于蝙蝠冠状病毒和未知来源冠状病毒之间的重组病毒(SHARMA et al., 2021)。一项基于多物种的相对同义密码子使用度(RSCU)的研究显示,蝙蝠最有可能是 SARS-CoV-2 的自然宿主。这种同源重组的情况此前已在经典猪瘟病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒和登革病毒中所证实(CUI et al., 2019; GUAN et al., 2003; JIA et al., 2018; LI et al., 2020b; MALTA et al., 2020; WOO et al., 2005)。

1.1 SARS-CoV-2 病毒的结构与基因表达

SARS-CoV-2 属于冠状病毒科, β 冠状病毒属。SARS-CoV-2 病毒粒子为球形,大小为 60~120 nm,有囊膜结构,在病毒囊膜表面上有规则排列的棘状突起。冠状病毒的基因组都是单股正链 RNA,也是最大的 RNA 病毒(FAN et al., 2020), SARS-CoV-2 作为冠状病毒 β 属的成员,其基因组的大小约为 29.9 kb,主要编码 4 个结构蛋白和 16 个非结构蛋白(Nsp1–Nsp16)组成。结构蛋白分别为刺突蛋白(Spike Protein, S);包膜蛋白(Envelope Protein, E);膜蛋白(Membrane Protein, M);核衣壳蛋白(Nucleocapsid Protein, N)(LU et al., 2020)。非结构蛋白的主要功能分别为: Nsp1 介导 RNA 的加工和复制、Nsp2 调控宿主细胞的生存信号通路、Nsp3 可以分离翻译后的蛋白质、Nsp4 含有跨膜结构域 2(TM2)并可以修饰内质网膜(HARRISON et al., 2020)。Nsp5 参与多聚蛋白的复制过程。Nsp6 是一个假定的跨膜结构域、Nsp7 和 Nsp8 可以增强 Nsp12 与模板引物 RNA 的结合的能力。Nsp9 是一种单链核糖核酸(ssRNA)的结合蛋白。Nsp10 对于 SARS-CoV-2 的 mRNA 的甲基化非常重要。Nsp12 含有 RNA 依赖 RNA 聚合酶(RdRp), RdRp 是冠状病毒复制与转录的关键组成部分。Nsp13 与 ATP 结合,且它的锌结合域参与病毒复制和转录过程。Nsp14 具有校对核糖核酸外酶结构域的功能。Nsp15 具有 Mn^{2+} 依赖性核糖核酸内切酶活性, Nsp16 是一

个核糖甲基转移酶 (LU et al., 2020)。还有一项研究认为, 一些非结构蛋白具有介导剪接, 翻译和蛋白质运输的作用, 从而抑制宿主的防御。在感染 SARS-CoV-2 后, Nsp16 结合剪接体 RNA 的 mRNA 识别域, 抑制 mRNA 的剪接。Nsp1 核糖体的 mRNA 与 18 S 核糖体 RNA 结合, 干扰 mRNA 的翻译等。(BANERJEE et al., 2020)。

1.2 SARS-CoV-2 S 蛋白的结构与功能

1.2.1 SARS-CoV-2 S 蛋白的结构

SARS-CoV-2 S 蛋白的总长度在 1273~1300 个氨基酸残基之间, 由位于 N 端的信号肽(氨基酸位点 1~13)、负责与受体结合的 S1 亚基(氨基酸位点 14~685)和负责与宿主细胞膜融合的 S2 亚基(氨基酸位点 686~1273)组成的 I 型膜蛋白(XIA et al., 2020)。S 蛋白以三聚体形式在病毒颗粒表面形成典型的突起。根据冠状病毒 S 蛋白单体的结构, S1 和 S2 亚基构成了冠状病毒刺突的头部和茎部(TANG et al., 2020)。它通常是以亚稳定的预融合构象存在, 当病毒与宿主细胞发生相互作用时, S 蛋白发生大规模的结构重排, 帮助病毒与宿主细胞膜的融合。SARS-CoV-2 三聚体 S 蛋白的结构已经通过低温电子显微镜确定, 在原子水平揭示了 S 蛋白受体结合结构域(Receptor binding domain RBD)在开放和封闭状态下的不同构象及其相应的功能(WANG et al., 2020d; WRAPP et al., 2020)。在开放状态下, 只有以“向上”的构象存在的 RBD 才能与宿主细胞受体血管紧张素转化酶 2 (ACE2) 发生相互作用, 进而与宿主细胞膜结合(谭玉靓 等, 2020)。一般情况下, 冠状病毒 (CoV) 的 S 蛋白以不活跃的前体形式存在, 在病毒与宿主细胞结合后, 靶细胞的蛋白酶通过将 S 蛋白裂解成 S1 和 S2 亚基来激活 S 蛋白(BERTRAM et al., 2013), 这是病毒进入靶细胞后激活膜融合所必需的条件(HOFFMANN et al., 2020; XING et al., 2020)。且 S 蛋白被多糖分子包裹, 以此来伪装它们使它们在进入宿主细胞时逃避宿主免疫系统的监视从而实现增殖和传播(谭玉靓 等, 2020)。(WATANABE et al., 2020)。

1.2.2 SARS-CoV-2 S1 亚基的结构

病毒粒子吸附在宿主细胞表面随后与宿主细胞受体结合这是病毒入侵宿主细胞导致其感染的第一步, 因此, 受体识别是病毒进入的重要决定因素, 也是药物设计的靶点。S1 亚基由 C 端结构域 (CTD) 和 N 端结构域 (NTD) 组成(HUANG et al., 2020)。病毒与宿主细胞受体 ACE2 结合的受体结合域位于 SARS-CoV-2 的 CTD 区域。总体上来说, SARS-CoV-2 的 CTD 与 SARS 冠状病毒 RBD (SARS-CoV RBD) 有相似的受体结合模式。但 SARS-CoV-2-CTD 比 SARS-RBD 与 ACE2 形成更多的原子相互作用。所以 SARS-CoV-2 比 SARS 有更高的受体结合亲和力(WALLS et al., 2020; WANG et al., 2020d)。RBD 区域是中和抗体 (nAbs) 的关键靶点, 所以有潜力开发为一种安全有效的 SARS-CoV-2 亚单位疫苗。SARS-CoV-2 的 RBD 与 SARS-CoV 的 RBD 序列相似度约为 73% ~76%左右。对 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 的受体结合基序 (RBM) (RBD 的一部分与 ACE2 直接接触) 的分析表明,

SARS-CoV S 蛋白中与 ACE2 结合所必需的残基大部分都是保守的。但也有研究表明, SARS-RBD 蛋白的小鼠单克隆抗体 (MAbs) 和多克隆抗体不能与 SARS-CoV-2 S 蛋白相互作用, 表明 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 的抗原性存在差异 (YESUDHAS et al., 2021)。

1.2.3 SARS-CoV-2 S 蛋白的功能

冠状病毒表面的 S 蛋白是参与感染的关键因素, 是一种介导病毒进入细胞的三聚体类的 I 型膜蛋白。SARS-CoV-2 的 S 蛋白在病毒感染过程中起到介导受体识别、细胞附着和融合的作用 (GUI et al., 2017)。位于病毒包膜表面的 S 蛋白三聚体是 S 蛋白与受体结合的基本单位。S1 亚基包含 RBD, 主要负责病毒与受体的结合, S2 亚基有 (七肽重复序列) HR 结构域, 包括 HR1 和 HR2, 是病毒与宿主细胞融合的关键因素 (CUI et al., 2019; HULSWIT et al., 2016)。SARS-CoV-2 S 蛋白通过识别受体 ACE2 与宿主细胞结合。ACE2 是 ACE 的同源物, 它将血管紧张素转化酶 1 转化为血管紧张素转化酶 1~9 (DONOGHUE et al., 2000)。ACE2 主要表达在肺泡上皮 II 型细胞 (ZHANG et al., 2020)。ACE2 也是 SARS-CoV 受体的一种。SARS-CoV S 蛋白的 S1 亚基与 ACE2 结合, 促进内吞体的形成, 在低 pH 下触发病毒与宿主细胞的膜融合活动 (SHANG et al., 2020)。S 蛋白与 ACE2 之间的相互作用可用于识别 SARS-CoV-2 的中间宿主, 因为来自两栖动物、鸟类和哺乳动物等不同物种的 ACE2 具有保守的初级结构 (LU et al., 2020)。比较哺乳动物、禽类、蛇、海龟的 ACE2 与 SARS-CoV-2 S 结合亲和力, 发现牛科和蟋蟀科的 ACE2 与 SARS-CoV-2 S RBD 相互作用良好, 而蛇和海龟的 ACE2 则不能。SARS-CoV-2 S 与人 ACE2 结合的解离常数 (KD) 为 14.7 nM, 而 SARS-CoV S 与 ACE2 结合的解离常数 (KD) 为 325.8 nM (WRAPP et al., 2020), 表明 SARS-CoV-2 S 比 SARS-CoV S 对 ACE2 更敏感。通过对比 SARS-CoV-2 蛋白与 SARS-CoV 的蛋白, 发现 SARS-CoV-2 与 SARS-CoV 的 S 差异约为 24%, RBD 差异约为 23% (WAN et al., 2020)。

病毒的膜融合是指病毒膜与宿主细胞膜的融合。它可以使病毒释放出其自身的基因组进入宿主细胞中, 复制其自身的遗传物质, 而 SARS-CoV-2 S1 和 S2 亚基的裂解正是融合的关键一步。S 蛋白被宿主蛋白酶裂解成两部分, S1 亚基和 S2 亚基, 裂解后一开始亚基以非共价形式存在, 直到病毒融合过程的发生 (TORTORICI et al., 2019)。SARS-CoV-2 的 S 蛋白与 SARS-CoV 的 S 蛋白具有相似的结构, 同样的宿主细胞蛋白酶也会促进 SARS-CoV-2 S 蛋白的裂解。但不同的是 SARS-CoV-2 S 上存在一个特定的 furin 裂解位点, 这可能是 SARS-CoV-2 比 SARS-CoV 更具传染性的一个原因 (HEURICH et al., 2014; OU et al., 2020)。SARS-CoV-2 S 蛋白 N 端融合肽 (FP) 和 S2 上的两个七肽重复序列 (HR) 结构域对病毒与宿主细胞融合至关重要 (KAWASE et al., 2019)。在 S 蛋白裂解后, SARS-CoV-2 的 FP 暴露并引发病毒融合。在一些特殊配体的作用下, 融合蛋白发生构象变化, 然后插入宿主细胞膜。使病毒膜与宿主细胞膜之间的距离缩短, S 蛋白的 HR1 结构域离宿主细胞膜较近, 而 HR2 结构域离病毒膜侧较近。然后, HR2 折叠回 HR1, 两个 HR 结构域以反平行的形式形成融合核心的六螺旋结构 (6HB), 病毒膜被拉向宿主细胞膜并紧紧结合, 两层膜融合。

1.3 SARS-CoV-2 的流行病学

SARS-CoV-2 经飞沫与气溶胶传播,有报道证明 SARS-CoV-2 也可以通过粪口途径传播(杨逸成等, 2021)。它的基本传染数(R_0)在 2 到 3 之间,潜伏期为 2~14 天(ENDO et al., 2020; LI et al., 2020b; ROCKLÖV et al., 2020)。大多数国家 20 至 59 岁年龄组的病例数量最高。虽然患者感染 SARS-CoV-2 后引起的症状广泛,从无症状、少症状到中度甚至严重的多器官衰竭疾病,但大多数感染者的症状较轻,大约 90% 的感染者无并发症、症状轻微或中度症状,但高龄、高血压、慢心病或肺部疾病以及免疫抑制仍是疾病的危险因素(WANG et al., 2020a)。有的患者感染 SARS-CoV-2 后会产生嗅觉、味觉功能减退等后遗症。虽然最近的研究结果中表明 SARS-CoV-2 可能起源于蝙蝠,但传染给人类需要中间宿主,因为有研究表明蝙蝠来源的冠状病毒很少感染给人类(HALAJI et al., 2021)。对中国和马来西亚穿山甲进行 SARS-CoV-2 冠状病毒检测结果显示大多数都呈阳性。经过全面分析,穿山甲冠状病毒刺突蛋白中的受体结合结构域(RBD)与 SARS-CoV-2 仅在一个氨基酸上存在微小差异。这些数据进一步表明, SARS-CoV-2 可能源于穿山甲冠状病毒和蝙蝠冠状病毒之间的病毒重组,然后传播给人类(SHARMA et al., 2021; XIAO et al., 2020)。尽管多份研究提到 SARS-CoV-2 必须有携带者才能传播,但在整个大流行期间,还观察到病毒以其他形式的传播,如污染物传播。

1.4 新型冠状病毒肺炎的诊断

1.4.1 核酸检测

实时荧光定量 PCR 和高通量测序技术,目前在新型冠状病毒核酸检测中应用广泛,都具有很高的特异性。然而,因高通量测序对设备的依赖性和高昂的成本,很少应用在临床诊断中,所以在实际应用中实时荧光定量 PCR 检测技术更为普遍(WU et al., 2020)。在有关实时荧光定量 PCR 诊断新型冠状病毒肺炎的报道中,针对 SARS-CoV-2 的刺突基因区(S)的诊断具有较高的特异性,但敏感性较弱(CORMAN et al., 2020; FANG et al., 2020)。随后使用病毒其他特异性基因包括 ORF1ab 区域的 RdRp 基因、核衣壳(N)基因和包膜(E)基因的特异性探针,使该技术的灵敏度大大提高。这种检测方法应设计两种分子靶点来提高 SARS-CoV-2 检测的准确性。世界卫生组织建议将 E 基因与 RdRp 基因作为靶点来检测 SARS-CoV-2。而在我国应用最广的基因靶点为 ORF1ab 基因与 N 基因,这两个基因作为靶点具有良好的特异性和敏感性。荧光定量 PCR 技术具有较高的特异性,是新型冠状病毒肺炎诊断的常用手段之一,但其敏感性会受到病毒载量、RNA 提取技术和样品来源的影响(OLIVEIRA et al., 2020)。

Sherlock Biosciences 公司开发出了一种通过 SARS-CoV-2 特异性的 crRNA 引导激活 Cas13a,从而剪切报告 RNA 序列,建立了一种 CRISPR/Cas 核酸检测技术(BROUGHTON et al., 2020; GOOTENBERG et al., 2017; SHARMA et al., 2021)。CRISPR/Cas 技术拥有强大的基因编辑的能力,它的一些蛋白如 Cas12a、Cas13a 与 Cas14a 可以用于核酸检测(CALIENDO

et al., 2017; LI et al., 2019; SASHITAL, 2018)。这些 Cas 蛋白与 crRNA 形成的复合物在识别特异性的靶标基因后,可以激活其附加切割活性,在反应体系中引入荧光-淬灭基团修饰的单链报告 DNA 分子,当其在被 Cas 蛋白酶切割后可以通过仪器检测到荧光信号。目前基于这种原理,开发出了针对 RNA 靶标与针对 DNA 靶标的 CRISPR/Cas 生物检测技术(蒋静等, 2022)。CRISPR/Cas 的检测方法不需要复杂的检测仪器,可以结合侧向流试纸条与荧光可视化技术,在反应体系中使用末端带有末端荧光素和生物素标记的 DNA 与 RNA 报告基因,即可实现核酸现场可视化(QIN et al., 2019)。

1.4.2 CT 诊断

使用计算机断层扫描技术(CT 扫描)对患者肺部进行放射成像显示肺部病变的特征,可以作为新型冠状病毒肺炎的辅助诊断工具。新型冠状病毒感染患者的胸部 CT 图像会显示出肺部出现磨玻璃影,这是新型冠状病毒肺炎患者常见的症状(LAUER et al., 2020; WANG et al., 2020a)。据文献报道,98%的 SARS-CoV-2 感染者在筛查时胸部 CT 图像呈现磨玻璃影样特异性图像。在 2020 年的一项研究中,虽然 51 例患者虽然最初核酸检测结果为阴性但其胸部 CT 检测到异常(FANG et al., 2020)。这突出了使用多种检测方法以确保患者诊断准确性的重要性。目前全世界拥有大量的胸部 CT 图像,这使得我们可以使用人工智能(AI)诊断方法。虽然并非所有的新型冠状病毒肺炎的 CT 图像都可供大多数研究人员使用,但有些人工智能资源开放其源代码可供公众使用。其中 COVIDNet 是一种深度传统神经网络,用于识别 SARS-CoV-2 阳性患者的胸部 CT 图像(WANG et al., 2020b)。另一项研究使用 COVNet,这是一种从胸部 CT 图像中提取视觉特征的 3D 模型,可以帮助检测 SARS-CoV-2 的感染(LI et al., 2020a),可以明显区分新型冠状病毒疾病模型与社区获得性肺炎和其他肺部疾病,进一步增强 SARS-CoV-2 检测的准确性。

1.4.3 免疫学检测

免疫学检测是快速且经济有效的诊断方法,同时也可作为核酸检测的替代方法。免疫学检测技术包括免疫荧光试验、核衣壳蛋白检测试验、蛋白质芯片、半导体量子点和微中和试验、酶联免疫吸附实验等(CHAN et al., 2013; HOEY, 2003; ROH et al., 2011; VALIZADEH et al., 2020)。其中酶联免疫吸附试验(ELISA)是利用抗原与抗体之间的特殊反应,将被测物质与生物酶结合,然后催化底物显色,用于检测抗体或抗原。ELISA 的优势主要有操作简单灵敏度高可以对微量的抗原抗体进行检测,且反应过程没有危险性所以可以在低级别生物安全环境下进行操作。

1.5 本研究的目及意义

SARS-CoV-2 具有传播速度快,且有一定致命性的特征。目前已造成全球大流行,已经对人类生命健康造成了严重威胁。有研究表明猫、貂等多种动物对 SARS-CoV-2 易感,该病

原存在人兽共患的风险,所以迫切需要开展动物感染排查、动物感染模型与疫苗评价等研究。常用的检测抗体的方法为酶联免疫吸附试验,由于 SARS-CoV-2 可感染多种动物,所以需要建立对动物血清无种属限制的方法,如阻断 ELISA、竞争 ELISA 和双抗原夹心 ELISA 等。但是双抗原夹心 ELISA 与前两者相比具有操作简单、灵敏度高的优点,所以本研究拟建立双抗原夹心 ELISA 方法 (HARDT et al., 2003; WERNIKE et al., 2021)。

目前有研究已经开发了基于病毒核衣壳(N)蛋白、刺突蛋白(S)或 S 受体结合域(RBD)等抗原的 ELISA 抗体检测方法 (BEAVIS et al., 2020; KLUMPP-THOMAS et al., 2020; TRÉ-HARDY et al., 2021)。当比较不同的抗原作为检测靶点时,基于全病毒或 N 蛋白的免疫学检测中,不同冠状病毒之间发生了相当大的交叉反应,而基于 S 或 RBD 的检测方法表现出比较高的特异性 (CHIA et al., 2020; DRECHSLER et al., 2011; KLUMPP-THOMAS et al., 2020)。所以本研究拟使用真核表达系统表达纯化 SARS-CoV-2 S1 蛋白与 RBD 蛋白,制备 S1 蛋白单克隆抗体,其在新型冠状病毒变异、抗原表位的鉴定、病毒感染机制的研究、诊断检测与疫病治疗方面都具有重要作用。建立基于 SARS-CoV-2 RBD 蛋白的双抗原夹心 ELISA 抗体检测方法,为动物新型冠状病毒的血清流行病学监测以及疫苗免疫评价提供技术支持。

第二章 SARS-CoV-2 S1 蛋白的表达纯化与单克隆抗体的制备

2.1 实验材料

2.1.1 试验试剂与材料

His-P30, His-CD2v, His-205R 蛋白、幼仓鼠肾细胞 (BHK-21)、pCAG-C 质粒由本团队 (重要人兽共患病与烈性外来病研究创新实验室) 保存; PurKine™ 蛋白 G 纯化树脂 (货号 BMR20604) 购自 Abbkine 公司; Triton X-100、6×His 标签抗体、预制蛋白电泳凝胶快速染液、Ni-NTA 亲和层析树脂购自 Genscript 公司; IRDye 800CW 标记驴抗鼠 IgG 抗体购自 LI-COR 公司; FITC 标记羊抗鼠 IgG 抗体、HRP 标记抗鼠 IgG 抗体购自中杉金桥公司; G418 购自美国 Amresco 公司; 蛋白凝胶快速染液购自北京博奥龙免疫技术有限公司; SPF 级 42 日龄 BALB/c 小鼠、SPF 级 56 日龄昆明鼠购自北京维通利华生物技术有限公司; 4% 多聚甲醛、BCA 法蛋白浓度测定试剂盒购自 Biosharp 公司; 单克隆抗体亚型鉴定试剂盒 (货号 26179) 购自北京宝林科公司; 10×PBS 购自索莱宝公司。

蛋白纯化相关试剂的配制:

Binding buffer 的配制: 7.80 g NaH_2PO_4 , 17.54 g NaCl, 加入超纯水定容至 1 L, 调节 pH 为 8.0。

1 M 咪唑溶液的配制: 7.80 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 17.54 g NaCl, 加入超纯水定容至 1 L, 调节 pH 为 8.0。

单克隆抗体纯化相关试剂的配制:

结合缓冲液: Na_2HPO_4 1.732 g, NaH_2PO_4 0.936 g, 用超纯水定容至 1 L, 调节 pH 为 7.0。

洗脱液: 甘氨酸 7.51 g, 超纯水定容至 1 L, 用 HCl 调节 pH 为 3.0。

中和缓冲液: Tris 12.11 g, 加入超纯水定容至 0.1 L, 用 HCl 调节 pH 为 8.5。

2.1.2 主要实验设备

倒置荧光显微镜 (Life); 蛋白电泳仪 (美国 Bio-rad); 半干蛋白转膜仪 (美国 Bio-Rad); 酶标仪 (biotech); 近红外荧光扫描成像系统 (Odyssey); 微量紫外分光光度计 (Implen)。

2.2 实验方法

2.2.1 SARS-CoV-2 S1、RBD、SARS-CoV-2 S1 (B.1.617.2 株) RBD 表达质粒的构建

质粒构建如图 2-1, 参考 GenBank 中 SARS-CoV-2 与 SARS-CoV-2 (B.1.617.2 株) 基因编码序列, 将 S1 蛋白基因、RBD 蛋白基因与 变异株 (B.1.617.2) RBD 蛋白基因密码子分

别进行优化、改造、克隆至 pCAG-C 表达载体中, 构建重组表达质粒 pCAG-S1、pCAG-RBD、pCAG-delta-RBD 以备后续转染细胞使用。

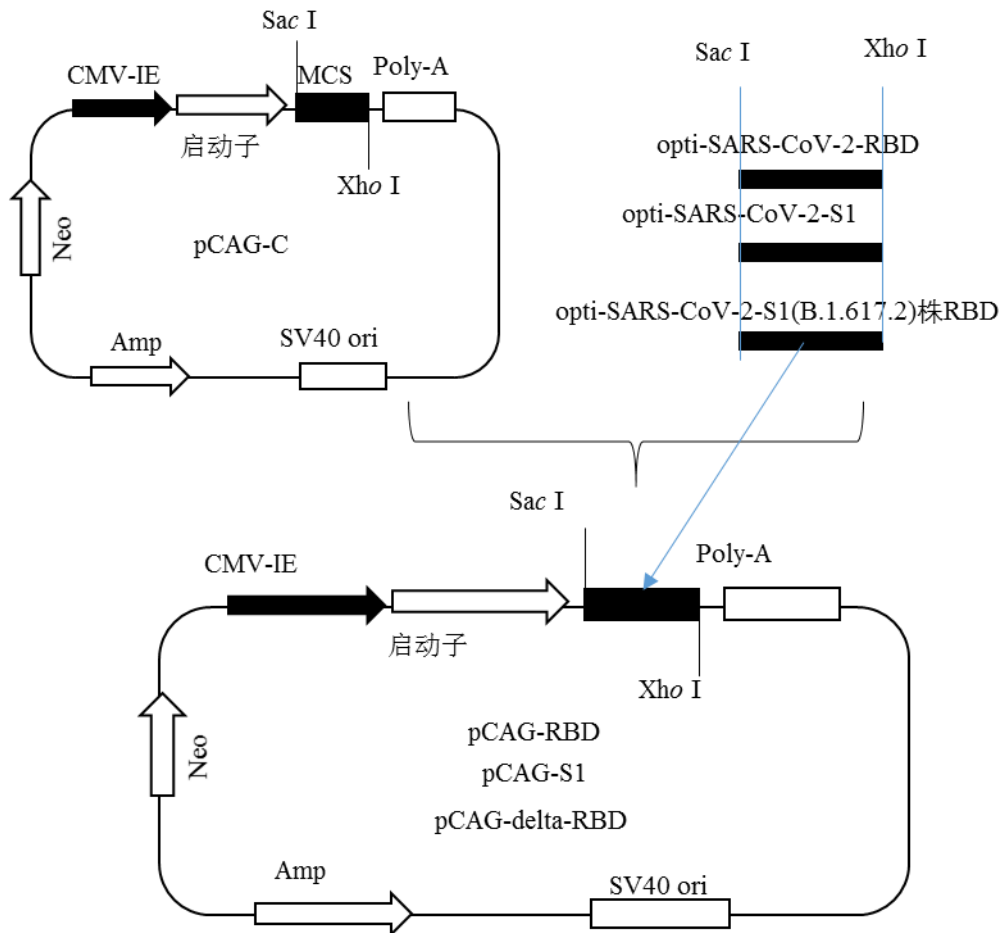


图 2-1 质粒构建示意图

Fig. 2-1 Schematic diagram of plasmid construction.

2.2.2 质粒的转染及表达 S1 蛋白细胞的克隆与筛选

根据转染试剂的说明书进行操作, 首先将构建好的 pCAG-S1 重组表达质粒转染到事先准备好的单层 BHK-21 的细胞中, 48 h 后更换含有 G418 的培养基对其进行筛选, 4 d 后对转染细胞亚克隆, 将其稀释克隆至 96 孔细胞培养板中。6 d 后用倒置荧光显微镜挑选单克隆, 也就是含有单细胞集落的孔, 对其进行扩大培养。同时对细胞培养上清液进行 IFA 与 Western Blot 鉴定, 筛选出表达目标蛋白的细胞克隆。

IFA 具体步骤为: 弃掉培养基, 用 PBS 清洗 1 次, 1 mL/孔, 弃掉液体。用 4% 多聚甲醛固定液, 在室温条件下固定 30 min, 500 μ L/孔。用 PBS 洗 3 次, 1 mL/孔, 5 min/次。加入含有 0.1% Triton X-100 的 PBS 溶液, 500 μ L/孔, 在室温条件下透膜 15 min。弃掉透膜液, 用 PBS 洗 3 次, 1 mL/孔, 5 min/次。加入含有 4% BSA 的 PBS 溶液进行封闭, 1 mL/孔, 37 $^{\circ}$ C 作用 30 分钟。用 PBST 洗 3 次, 1 mL/孔, 5 min/次。加入一抗 (杂交瘤细胞培养上清液) 1 mL/孔, 37 $^{\circ}$ C 1 h。弃一抗, 用 PBST 洗 3 次, 1 mL/孔, 5 min/次。加入 FITC 标记的二抗 (用

PBST 100 倍稀释) 500 μL /孔 37°C 40 min。弃二抗, 用 PBST 洗 5 次, 1 mL/孔, 5 min/次。加入用 PBS 10000 倍稀释的 Hoechst 33342 500 μL /孔室温染核 30 min (放在摇床上)。弃 Hoechst, 用 PBST 洗 5 次, 1 mL/孔, 5 min/次。用荧光显微镜观察 (加入 500 μL 的 PBS)。

Western Blot 具体步骤为: 将细胞系扩大到 24 孔板后, 待细胞长满后收集细胞上清液, 用 10 kDa 的超滤管进行 5 倍浓缩, 加入蛋白变性剂, 制成凝胶电泳样品。再用 Western Blot 试验筛选出阳性细胞克隆对其进行扩大培养。将制备好的蛋白样品进行 SDS 凝胶电泳试验, 140 V 约 1 h 10 min。将蛋白转印到 NC 膜上, 转印完成后将膜正面朝上用 PBST 冲洗一次, 然后用快速封闭液封闭 10 min, 然后加入抗 His 标签抗体 (1:2500 稀释), 室温孵育 1 h, PBST 洗 4 次, 5 min/次, 加入用 PBST 1:15000 稀释的红外荧光标记驴抗鼠 IgG, 室温孵育 40 min, 再用 PBST 清洗 4 次, 5 min/次, 最后分析 Western Blot 结果。

2.2.3 S1 蛋白的纯化与鉴定

待表达 S1 蛋白的重组细胞系细胞长满后, 更换为细胞维持液 (含 1% FBS 的 DMEM 与 1% 1640 混合培养基) 培养, 在细胞培养箱维持 2 d 后用碳酸盐缓冲液调节 pH 再过 2 d 后, 收集细胞系培养上清液对蛋白进行纯化。

样品前处理: 向细胞上清液中加入 1 M 咪唑至终浓度为 20 mM, 加入 NaCl 至终浓度为 500 mM, 调节 pH 至 8.0。

纯化步骤:

- 1) 将处理好的细胞上清液用双层滤纸过滤去除大颗粒和不溶物质。
- 2) 用 2 倍柱体积的 ddH₂O 清洗纯化柱, 去除 Ni-NTA 填料中 20% 乙醇。
- 3) 用 10 倍体积的 Binding buffer 平衡树脂。
- 4) 将平衡好的树脂加入到处理好的样品中。
- 5) 室温震荡结合 30 min。
- 6) 用空 PD-10 柱滤过样品与 Ni-NTA 混合物。
- 7) 分别用含 40 mM 与 80 mM 咪唑的洗液洗涤。
- 8) 用含 500 mM 的咪唑的洗脱液洗脱 S1 蛋白, 再将其用 50 kDa 超滤管浓缩。
- 9) 浓缩液用蒸馏水、PBS 各置换 1 次液体, 所得即为蛋白溶液。测定蛋白的含量分装到 1 mL EP 管冻存。

用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定纯化蛋白含量:

- 1) 将试剂盒所提供的 BCA 试剂用 PBS 溶液稀释至 1 mg/mL, 制成蛋白标准品。
- 2) 将蛋白标准品用试剂盒所给 PBS 溶液稀释蛋白标准品, 稀释至合适浓度制成对照样品。
- 3) 避光, 向 ELISA 反应板中加入 200 μL 的蛋白测定工作液。
- 4) 将 30 μL 对照样品与待测样品加入到 ELISA 反应板中, 对照样品与待测样品各做一个重复, 与工作液混匀, 避光室温反应 2 h。
- 5) 用蛋白稀释液 PBS 溶液为空白对照, 酶标仪测 562 nm 处的吸光值, 记录读数, 根据试剂盒所给出的算法计算出纯化的 S1 蛋白的浓度。

利用蛋白凝胶电泳实验鉴定 S1 蛋白的纯化效果。

2.2.4 动物免疫

选择三只 6 周龄的 BALB/c 雌鼠，将其用纯化后的 S1 蛋白 100 μg /只进行免疫，首次免疫使用弗氏完全佐进行乳化，免疫后 21 d 和 42 d 用弗氏不完全佐剂乳化 S1 蛋白进行第 2 次和第 3 次免疫，第三次免疫后 7 d 采集并分离小鼠血清，检测 S1 蛋白抗体的效价，选择 S1 蛋白抗体效价最高的小鼠脾脏进行后续的细胞融合试验。在融合前 3 d 用没有乳化的 S1 蛋白 100 μg 注射入小鼠的腹腔对其进行加强免疫。

2.2.5 血清抗体效价检测

用纯化后的 S1 蛋白按照 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度包被 ELISA 板，利用间接 ELISA 方法检测免疫 S1 蛋白免疫后小鼠血清抗体效价，用免疫前小鼠血清作为阴性对照，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜包被；弃掉包被液拍干用 PBST 洗 3 次（300 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ），5 min/次。加入含 5% 脱脂乳的 PBS 封闭液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h（200 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ），弃掉封闭液，拍干后洗涤 3 次，5 min/次。将小鼠阳性待检血清分别进行 1: 400、1: 800、1: 1600、1: 3200、1: 6400、1: 12800、1: 25600、1: 51200 稀释，将小鼠阴性血清稀释 400 倍后按 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 的剂量加入 ELISA 板，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置孵育 1 h，弃掉液体，拍干后用 PBST 洗 5 次，5 min/次。然后加入 HRP 标记羊抗鼠二抗（1:20000 稀释），100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中孵育 30 min，弃掉液体，拍干后加入 PBST 溶液清洗反应孔 5 次，每次 5 min。将 PBST 拍干后加入 TMB 显色液，每孔 100 μL ，室温静置显色 10 min，再加入终止液 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，立即测定 OD 450 nm 值。

2.2.6 饲养细胞的制备

取健康昆明鼠用经颈椎脱臼法将其处死。将小鼠浸泡于装有 75% 酒精的烧杯中消毒，然后再将消毒后的小鼠固定在解剖板上。先在小鼠腹部的皮肤剪开一个小孔暴露腹膜，随后轻轻掀起腹部皮肤将腹膜与腹部皮肤分离，小心不要弄破小鼠的腹膜，再一次用酒精棉球对腹部进行消毒。将含 10% FBS 和 HAT 的 1640 培养基，用 5 mL 注射器注入进小鼠腹腔并轻轻按摩。反复冲洗数次后，用 1640 完全培养基稀释冲洗液内巨噬细胞的浓度，最后将其加入到 96 孔细胞培养板中，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养以备细胞融合使用。

2.2.7 细胞融合

将放血并处死后的小鼠置于 75% 酒精中浸泡消毒后将其固定于解剖板上。用准备好的高压灭菌后的眼科剪与眼科镊小心的将小鼠的脾脏完整的分离出来。用 1 mL 的注射器吸取含有 2.5% FBS 的 1640 培养基反复冲洗脾脏。当小鼠脾脏内的细胞都冲洗干净后，研磨。用含 2.5% FBS 的 1640 培养基将 SP2/0 细胞重悬，将其与脾脏研磨液与冲洗液混匀后离心。离心后将上清液去掉，轻磕离心管的底部，使细胞结块松散。将盛有细胞的离心管置于 37 $^{\circ}\text{C}$

的水浴中，逐滴加入 PEG 边加边轻轻摇动离心管，慢慢的将 1 mL 的 PEG 在 2 min 内滴加完成。用 1 mL 的无菌注射器吸取 2.5% FBS 的 1640 培养基均匀慢慢的滴加到离心管中。再取 5 mL 不含血清的 1640 培养基慢慢的均匀的滴加到离心管中，再用不含血清的 1640 培养基将液体补足到 12 mL，离心，弃掉上清液，用加有 HAT 的含 10% FBS 的 1640 选择培养基稀释，均匀的铺在装有饲养层细胞的 96 孔板中，在细胞培养箱中进行培养。

2.2.8 杂交瘤细胞的筛选

小鼠脾脏细胞与 SP2/0 融合后 3 d，用含 HAT 的 1640 培养基更换半量的细胞上清液，同时在显微镜下观察细胞的生长情况。同时用纯化后的 S1 蛋白包被 ELISA 反应板，若融合细胞长势良好，约细胞融合 9 d 后取细胞上清液，利用间接 ELISA 方法，以 SARS-CoV-2 阴性小鼠血清与免疫 S1 蛋白后的小鼠血清分别作为阳性对照与阴性对照，根据颜色反应的深浅筛选出合适的阳性细胞克隆。将筛选出的阳性融合细胞进行亚克隆，约 3 d 后在显微镜下观察并挑选出单细胞集落。约 6 d 后再用上述的 ELISA 方法继续进行筛选，经数次亚克隆和筛选后，将得到的杂交瘤细胞扩大培养并及时冻存。

2.2.9 单克隆抗体 IFA 鉴定

用表达 S1 蛋白的细胞接种 24 孔板，以 BHK-21 细胞为阴性对照，用 IFA 的方法检测单克隆抗体与 S1 蛋白的反应性，具体步骤如 2.2.2。

2.2.10 单克隆抗体 Western Blot 鉴定

将纯化的 S1 蛋白样品 60 μ L 加入 20 μ L 蛋白 loading buffer，水浴 100 $^{\circ}$ C 加热 10 min，瞬时离心后，使用 8% 的蛋白凝胶，在恒压 140 V 下进行凝胶电泳实验。运行 1h 10 min 后，将蛋白转印到 NC 膜上，用 PBST 缓冲液冲洗一次，加入快速封闭液进行封闭，将膜置于摇床上轻摇 10 min 封闭，再分别加入不同的杂交瘤细胞上清液，室温孵育 1 h。用 PBST 清洗 4 次后，加入红外荧光驴抗鼠 IgG（PBST 1:15000 稀释），室温孵育 40 min，用 PBST 清洗 4 次，最后用近红外荧光扫描成像系统分析 Western Blot 结果。

2.2.11 单克隆抗体亚型的鉴定

使用宝林科公司的单克隆抗体亚型鉴定试剂盒鉴定所制备单克隆抗体的亚型，具体步骤如下：使用前将试剂盒放置至室温，将 2.2.8 中筛选出的杂交瘤细胞培养上清液用试剂盒内的样品稀释液将其进行 10 倍稀释，取 150 μ L 加入反应孔中。10 min 后，观察结果。

2.2.12 单克隆抗体的纯化

向杂交瘤细胞培养液中加入 ProClin 300 防腐剂后用双层滤纸过滤，将蛋白 G 偶联树脂

用两倍柱床体积的结合缓冲液平衡。将平衡好的树脂加入到过滤后的细胞培养液中，置摇床上室温震荡结合 3 h。将结合好的样品加入空层析柱中使其流出滤过。向柱子中加入两倍柱床体积的结合缓冲液，洗去非特异性吸附蛋白，重复此步骤 6 次。再向柱中加入 5~10 倍柱床体积的洗脱缓冲液，洗脱，收集洗脱蛋白（收集管中先加入 100 μL 的中和缓冲液），分段收集 1 mL/管。用蛋白染色法检查含有洗脱蛋白的组分。合并含洗脱蛋白收集管，使用截留分子量为 100 kDa 超滤管离心更换缓冲液后测定蛋白含量，分装后置 -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。SDS-PAGE 电泳检查抗体纯化效果。

2.2.13 单克隆抗体的效价测定

用间接 ELISA 法对单克隆抗体进行效价测定。包被：将 S1 蛋白用 pH 值为 9.6 的碳酸盐缓冲溶液稀释至终浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后，再加入到 96 孔 ELISA 反应板中，100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。封闭：将 ELISA 反应板内的液体甩干，加入含 5% 脱脂乳的 PBS 溶液 200 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。洗涤：将酶标孔内的封闭液甩干，加入 PBST 溶液 300 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，每次浸泡 2 min，轻轻甩干，重复洗 3 次，拍干备用。加入一抗：将单克隆抗体用 PBS 溶液倍比稀释，加入封闭好的酶标孔内，每孔 100 μL ，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1h。洗涤：将酶标孔内溶液甩干，每孔加入 300 μL PBST 溶液，每次浸泡 2 min，轻轻甩干，重复洗 5 次；加入二抗：加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的山羊抗小鼠抗体（用 PBST 进行 1:20000 稀释），100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。洗涤：将酶标孔内溶液甩干，每孔加入 300 μL PBST 溶液，每次浸泡 2 min，轻轻甩干，重复洗 5 次。显色：用 TMB 显色液显色，100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，室温显色 10 min。测定 OD 值：加入 2 M H_2SO_4 ，50 μL 终止显色，用酶标仪测量在 450 nm 下的 OD 值。

2.2.14 单克隆抗体与 S 蛋白 RBD 区域的反应性鉴定

用 2.2.1 构建好的 pCAG-RBD 质粒转染 BHK-21 细胞，以 BHK-21 细胞为阴性对照，待细胞长到合适浓度后通过 IFA 的方法检测其反应性，IFA 具体步骤如 2.2.7。

2.2.15 单克隆抗体与 Delta 突变株 S 蛋白 RBD 区域的反应性鉴定

用 2.2.1 构建好的 pCAG-delta-RBD 质粒转染 BHK-21 细胞，以未转的 BHK-21 细胞为对照，待细胞长到合适浓度后通过 IFA 的方法检测其阳性反应性，具体步骤如 2.2.7。

2.3 实验结果

2.3.1 表达细胞的筛选与克隆

将 S1 蛋白基因重组表达质粒转染 BHK-21 细胞后，经过亚克隆，再用含 G418 的培养基进行选择培养，经 IFA 筛选，结果显示：阳性细胞克隆有强荧光信号，而对照细胞无荧光信号（图 2-2）。将阳性细胞克隆扩大培养，收集细胞培养上清液，再用 Western Blot 进行

筛选。结果显示：筛选出的阳性克隆细胞培养上清液经 Western Blot 检测后，在 130 kDa 左右出现特异性条带，与预期大小一致，而 BHK-21 对照细胞培养上清液未检测出特异性条带。将筛选出的细胞系命名为 BSARS-CoV-2-S1，结果如图 2-3。

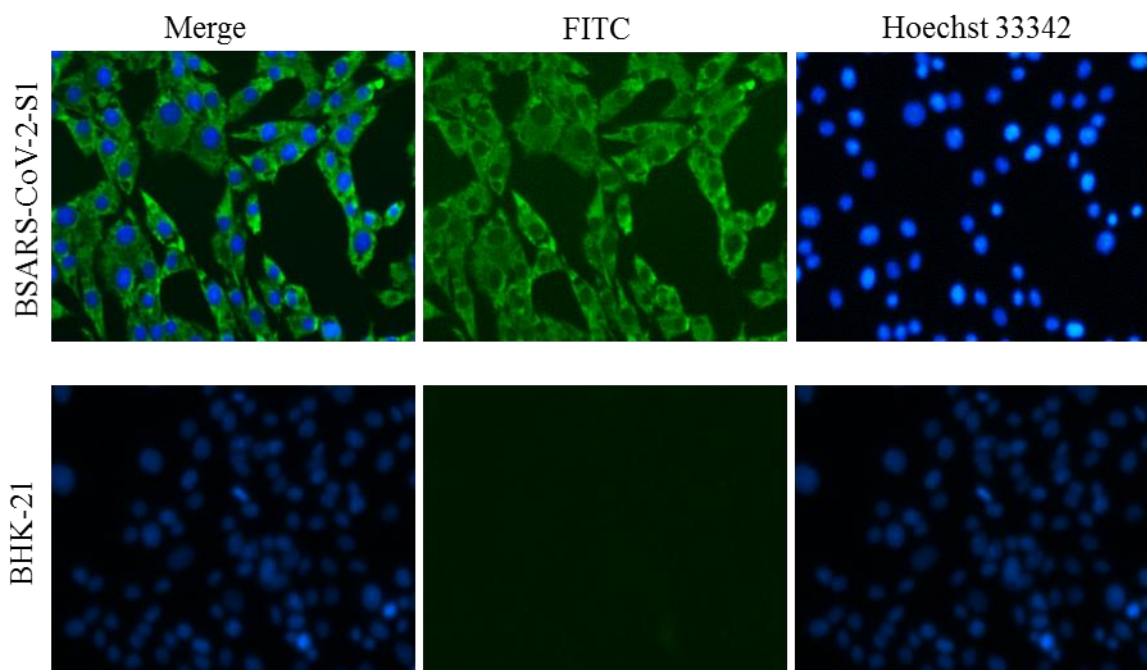


图 2-2 表达 S1 蛋白细胞系的 IFA 筛选

Fig. 2-2 The results of screening cells expressing S1 by IFA.

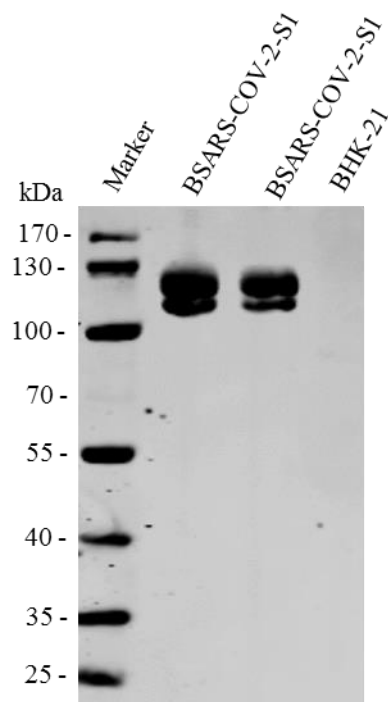


图 2-3 表达 S1 蛋白的细胞的 Western Blot 筛选

Fig. 2-3 The results of screening cells expressing S1 by Western Blot

2.3.2 蛋白纯化

纯化后的 S1 蛋白用 SDS-PAGE 电泳进行鉴定，纯化后的 S1 蛋白条带清晰无杂带（图 2-4），相对分子量在 130 kDa 左右，与文献报道相符，可以进一步的实验。

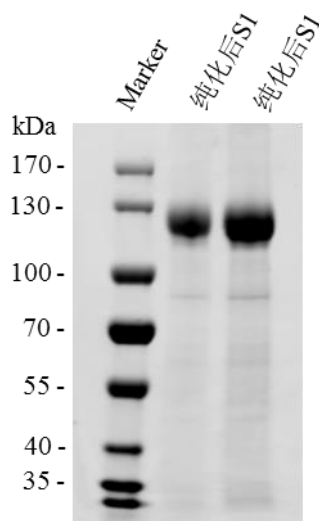


图 2-4 SDS-PAGE 鉴定 S1 蛋白的纯化

Fig. 2-4 Identification of the purification of S1 proteins by SDS-PAGE

2.3.3 小鼠免疫及血清抗体检测

小鼠第三次免疫 7 d 后，采集小鼠血清。用间接 ELISA 检测血清 S1 蛋白抗体效价，结果如图 2-5 所示：mouse-3 号小鼠免疫的效果最好血清抗体效价较高，选择 mouse-3 号小鼠进行脾细胞融合实验。

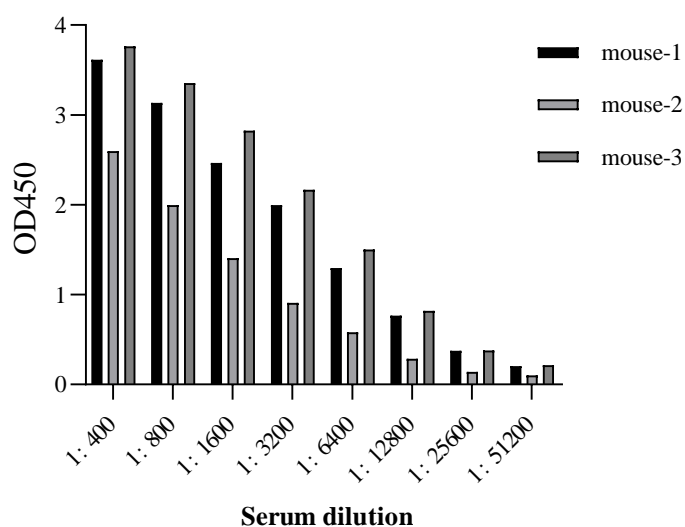


图 2-5 小鼠血清抗体效价 ELISA 检测结果

Fig. 2-5 The results of detecting mouse serum antibody titer by ELISA

2.3.4 杂交瘤细胞筛选结果

细胞融合后 9 d 以融合细胞的上清液作为待检样品, 用 ELISA 方法进行筛选, 选择显色信号较强融合细胞孔进行亚克隆筛选。经过 3 次亚克隆与筛选后最终得到 7 株可以分泌抗 S1 蛋白抗体的杂交瘤细胞株, 命名为 1A4、1F6、5E7、12F5、14F7、6B3 和 8C6。杂交瘤细胞冻于液氮中保存, 用带 His 标签的 His-P30, His-CD2v, His-205R 蛋白利用间接 ELISA 的方法检测筛选出的单克隆抗体是否对 His 标签反应, 结果显示: 单克隆抗体只与 S1 蛋白发生特异性反应, 与带 His 标签的蛋白无反应。证明这 7 株单克隆抗体是 S1 蛋白特异性抗体 (图 2-6)。

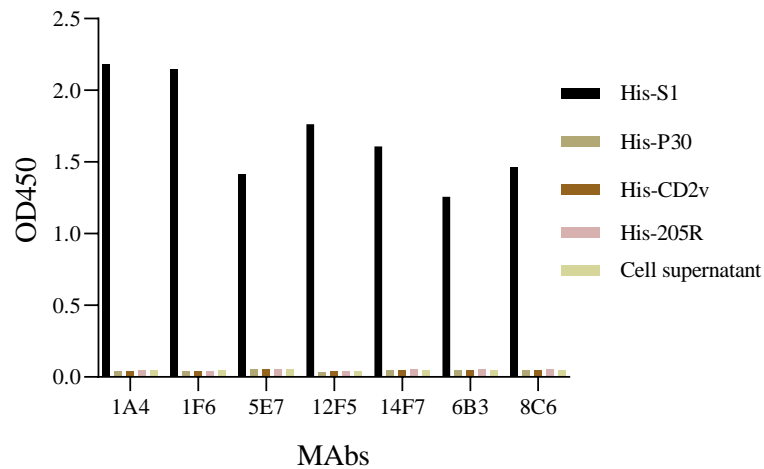


图 2-6 单克隆抗体的特异性鉴定

Fig. 2-6 The specificity identification results of MAbs

2.3.5 单克隆抗体 IFA 鉴定结果

将各杂交瘤细胞培养上清液作为一抗, 用 FITC 标记抗鼠 IgG 抗体 (1:100 稀释) 为二抗, 对 BSARS-CoV-2-S1 细胞及 BHK-21 细胞进行 IFA 检测。结果显示: 7 株抗体 (1A4、1F6、5E7、12F5、14F7、6B3、8C6) 与 BSARS-CoV-2-S1 细胞均能发生特异性反应, 而 BHK-21 空白对照细胞则无特异性荧光。结果如图 2-7。

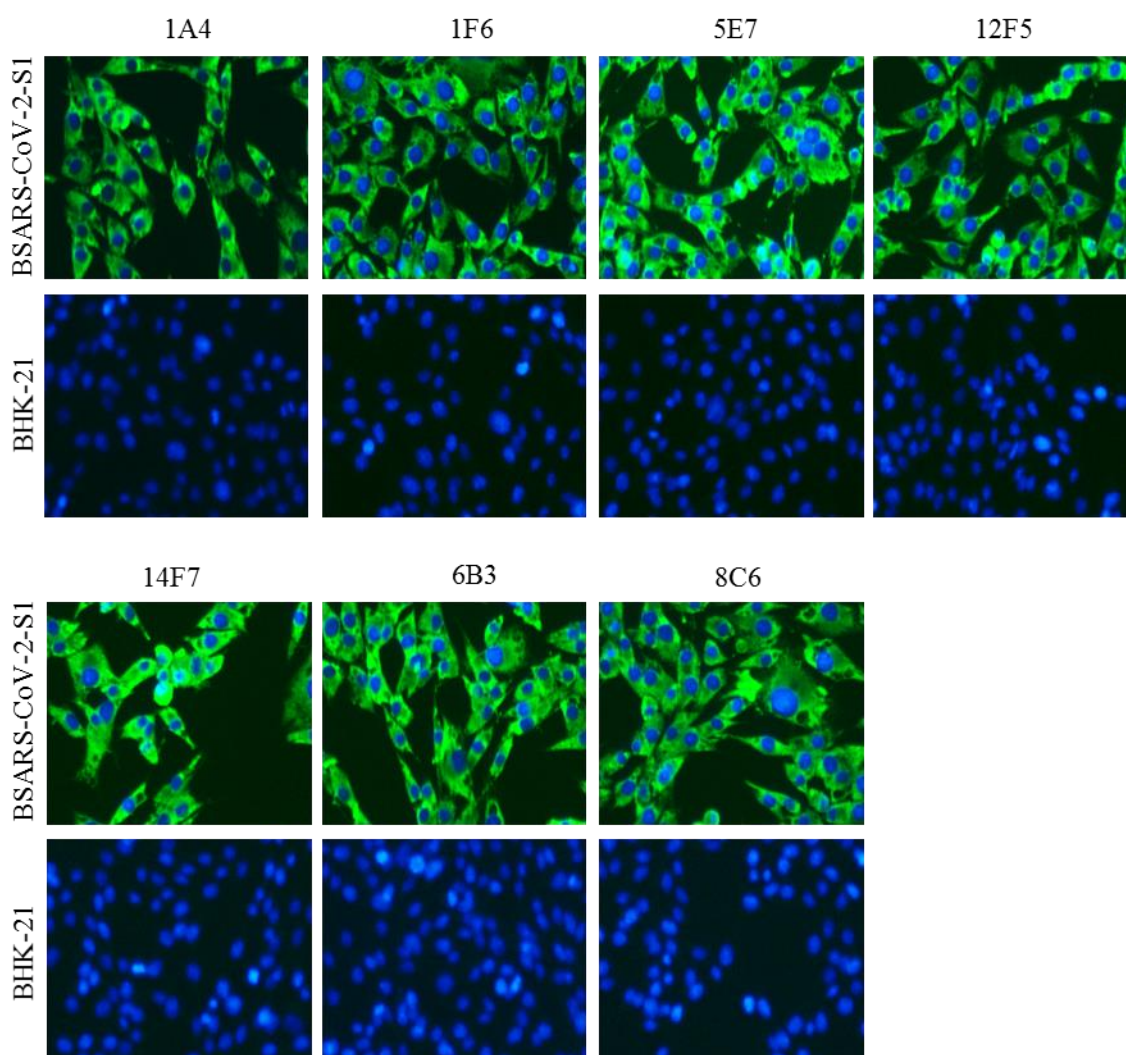


图 2-7 单克隆抗体 IFA 鉴定结果

Fig. 2-7 The identification results of MAbs by IFA

2.3.6 单克隆抗体 Western Blot 鉴定结果

使用纯化的 S1 蛋白作为抗原，BHK-21 细胞培养液为对照，使用 8% 的蛋白分离凝胶进行凝胶电泳试验，再将蛋白转印至 NC 膜上，使用 7 株杂交瘤细胞株培养上清液作为一抗进行 Western Blot 检测，同时用抗 His 标签抗体对 S1 蛋白与 BHK-21 细胞培养液进行检测。如图 2-8 所示，7 株抗体（1A4、1F6、5E7、12F5、14F7、6B3、8C6）均不能与 S1 蛋白发生特异性反应，表明这些抗体的表位为非线性表位。

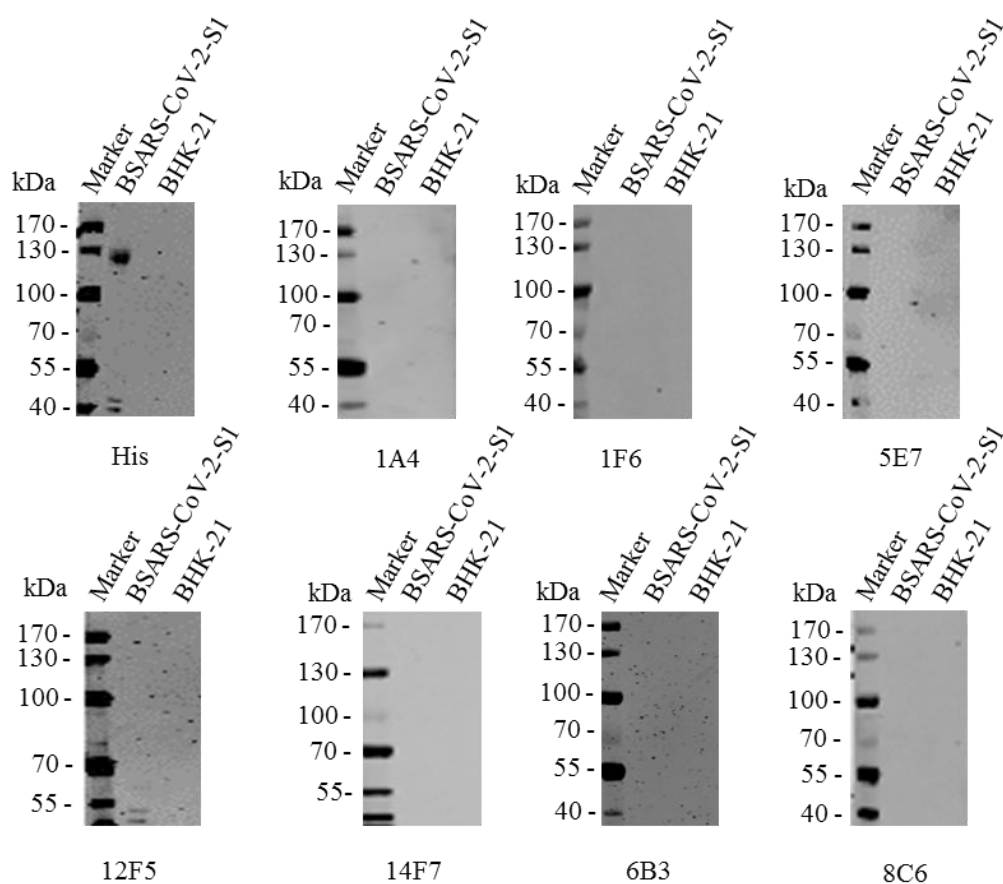


图 2-8 单克隆抗体 Western Blot 鉴定结果

Fig. 2-8 Western blot analysis results of MAbs.

2.3.7 单克隆抗体亚型鉴定结果

用单克隆抗体亚型鉴定试剂盒对单克隆抗体 1A4、1F6、5E7、12F5、14F7、6B3、8C6 的亚型进行鉴定，结果显示 7 株单克隆抗体均为 IgG1/ κ 型（图 2-9）。

2.3.8 单克隆抗体的纯化结果

使用 HiTrap Protein G HP 亲和层析柱纯化杂交瘤细胞培养上清液，再对纯化后的抗体进行 SDS-PAGE 分析，如图 2-10 所示，各单克隆抗体均得到较好的纯化，在 55 kDa 与 25 kDa 处分别可见清晰重、轻链条带，无明显杂带。表明各单克隆抗体得到较好的纯化效果。

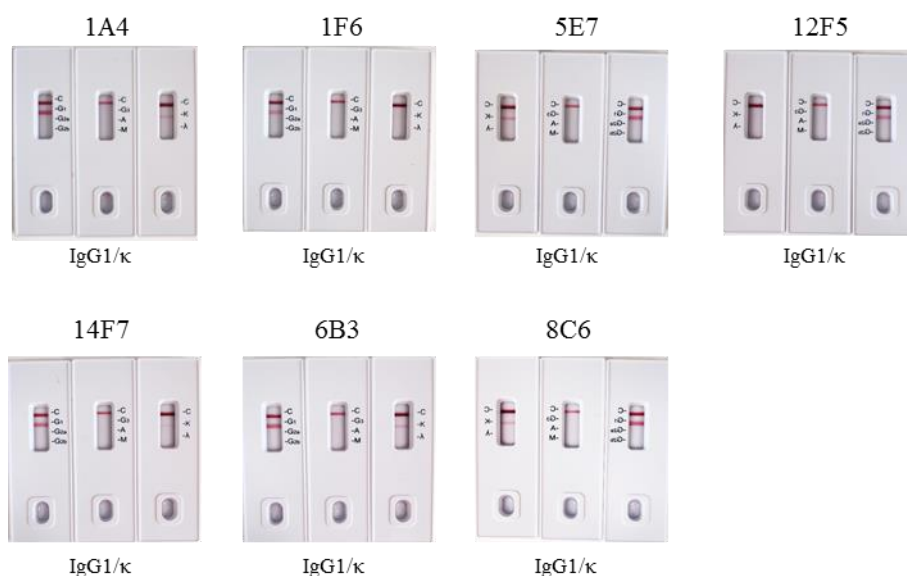


图 2-9 单克隆抗体亚型鉴定结果

Fig. 2-9 The results of subtype identification of MAbs

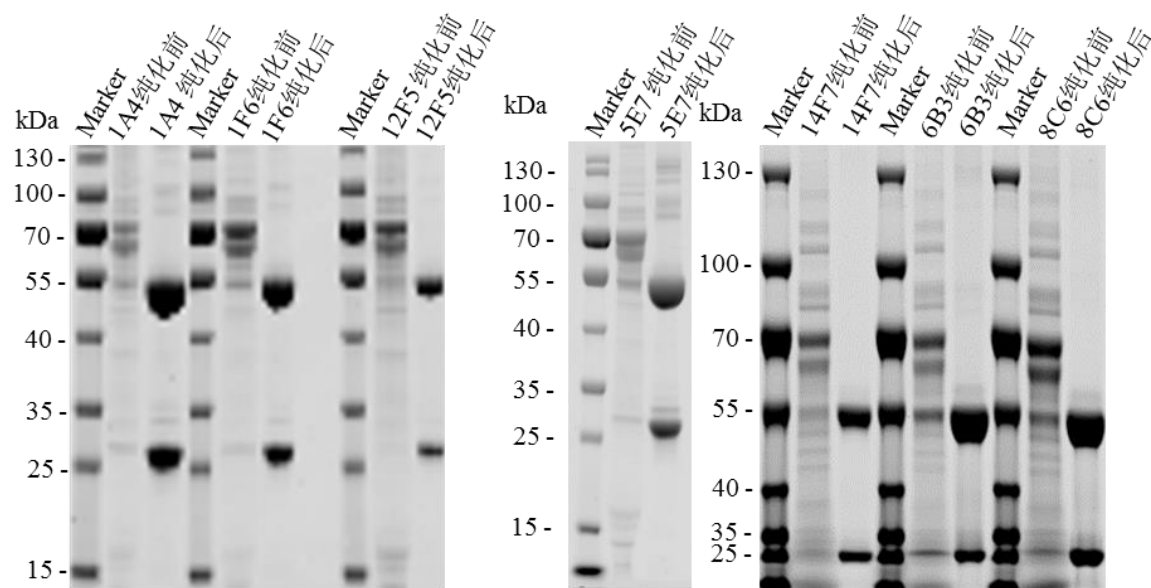


图 2-10 纯化单克隆抗体 SDS-PAGE 检测

Fig. 2-10 SDS-PAGE analysis for purified monoclonal antibodies

2.3.9 单克隆抗体效价检测结果

利用间接 ELISA 方法，对 1A4、1F6、5E7、12F5、14F7、6B3、8C6 杂交瘤细胞培养上清液的抗体效价及纯化后的抗体效价进行检测。筛选出的这 7 株抗体，纯化前抗体效价分别为 1024、128、1024、128、512、1024、512（图 2-11）。纯化后的抗体效价分别为 409600、102400、51200、25600、25600、102400、6400（图 2-12）。如表 2-1 所示这 7 株杂交瘤细胞分泌的抗体都具有中和活性。

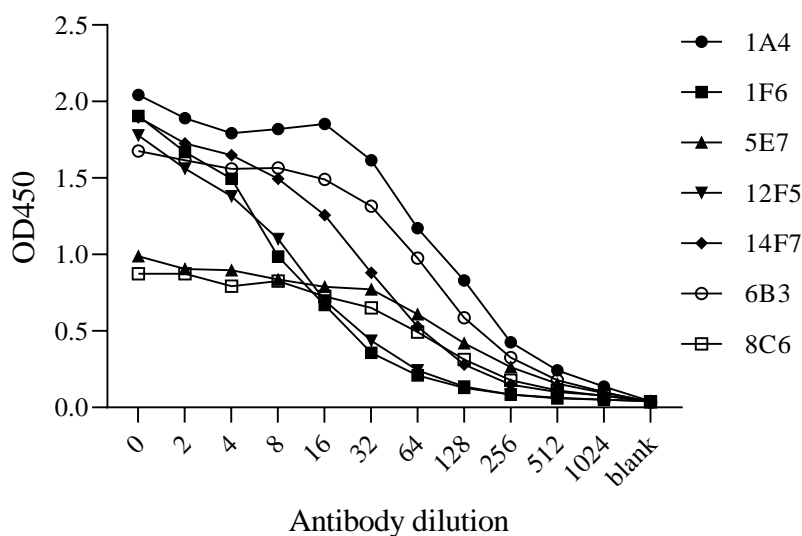


图 2-11 单克隆抗体细胞培养培养液抗体效价检测结果

Fig. 2-11 Cell culture supernatant antibody titer detection results.

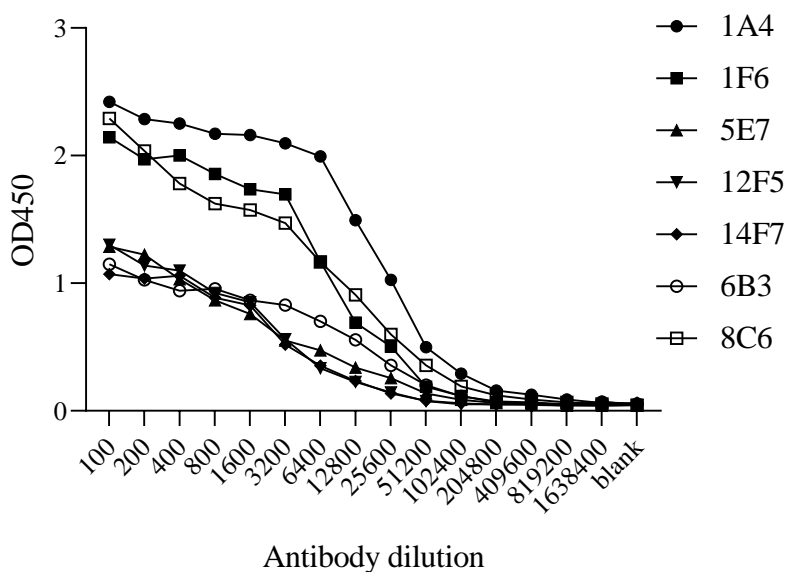


图 2-12 纯化单克隆抗体效价检测结果。

Fig. 2-12 Detection the titer of purified MAbs

表 2-1 抗体效价测定

Table 2-1 Determination of mice anti-serum titer by iELISA.

杂交瘤细胞	中和活性*	抗体效价	纯化后抗体效价
1A4	+	1024	409600
1F6	+	128	102400
5E7	+	1024	51200
12F5	+	128	25600
14F7	+	512	25600

表 2-1 (续)

杂交瘤细胞	中和活性*	抗体效价	纯化后抗体效价
6B3	+	1024	102400
8C6	+	512	6400

*注：中和活性的检测是委托温志远老师在生物安全四级实验所室测测定方法参考(Wang, et al 2020)。

2.3.10 单克隆抗体与 S 蛋白 RBD 区域的反应性鉴定

通过间接免疫荧光试验鉴定，7 株单克隆抗体中的 5 株（1A4、1F6、12F5、14F7、6B3）可以与 S1 蛋白的 RBD 区域反应，5E7、8C6 不能识别 S 蛋白 RBD 区域（图 2-13）。

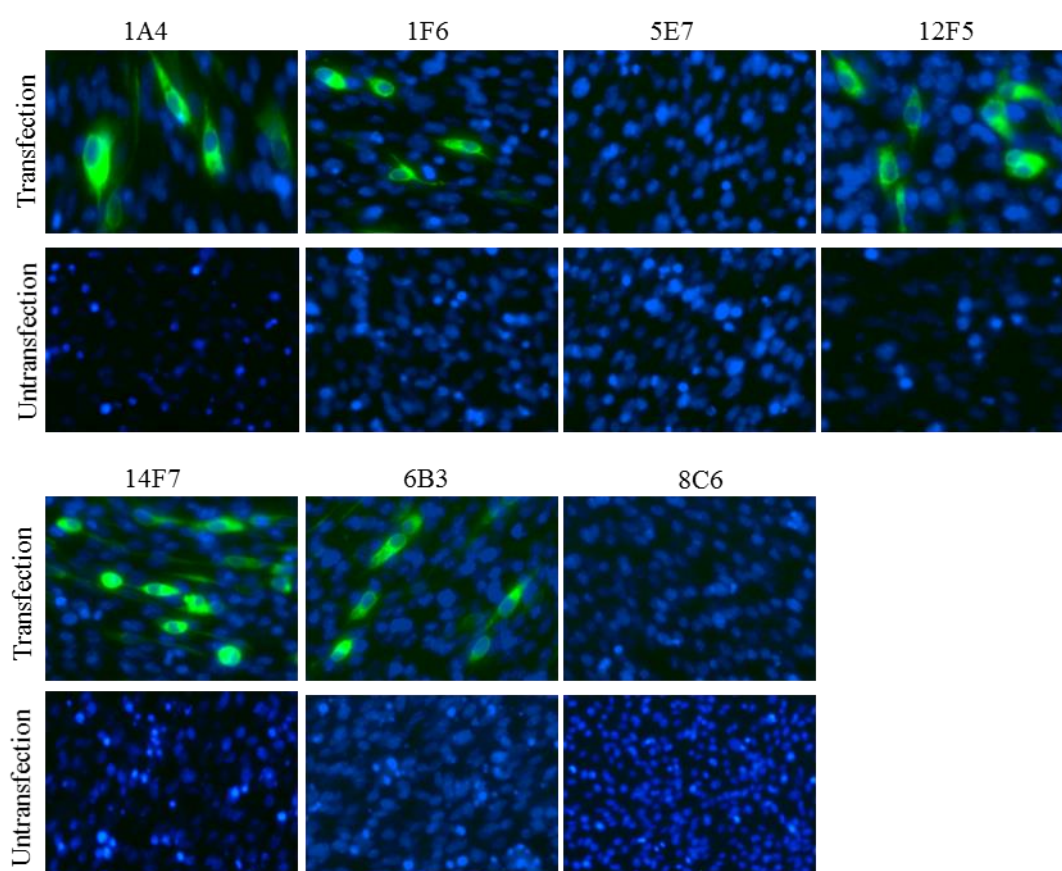


图 2-13 单克隆抗体与 RBD 反应的 IFA 鉴定结果

Fig. 2-13 RBD recognizing results of MAbs by IFA

2.3.11 单克隆抗体与 Delta 变异株 SARS-CoV-2 RBD 区域的反应性鉴定

通过间接免疫荧光试验鉴定，结果表明 1A4、1F6、12F5、14F7、6B3 可以与 SARS-CoV-2 (B.1.617.2 株) S1 蛋白 RBD 反应，5E7、8C6 与 RBD 区域不反应（图 2-14）。

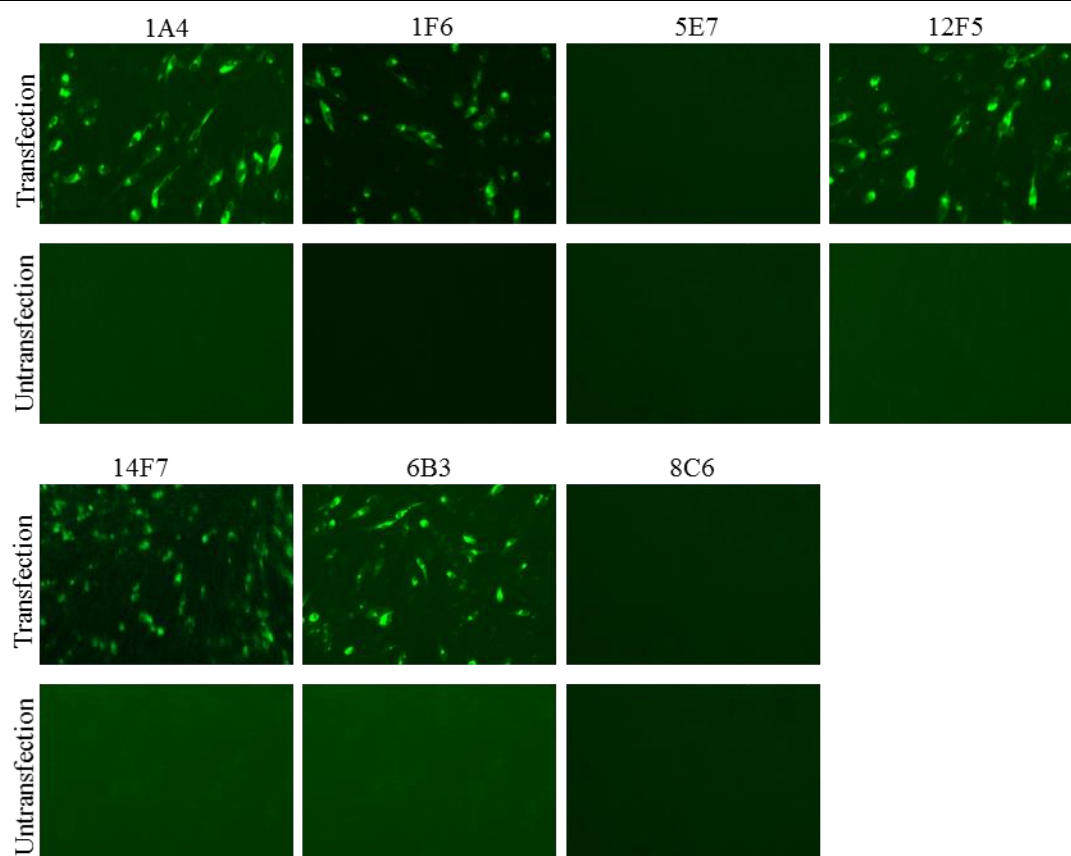


图 2-14 单克隆抗体与 delta-RBD 的 IFA 鉴定结果

Fig. 2-14 Delta strain RBD recognizing results of MAbs by IFA

2.4 讨论

SARS-CoV-2 是一种单链 RNA 包膜病毒，有 4 个结构蛋白分别为核衣壳蛋白 (N)、膜蛋白 (M)、刺突蛋白 (S) 和囊膜蛋白组成 (E)。S 蛋白是由 S1 和 S2 亚基组成的 I 型融合跨膜结构糖蛋白，为同源三聚体，大小为 180~200 kDa，总长度在 1273~1300 个氨基酸之间。入侵宿主细胞时，S 蛋白被切割为 S1 和 S2 两个片段，S1 包含受体识别位点，主要参与病毒与宿主细胞之间的识别，S2 蛋白介导宿主细胞膜与病毒的膜融合。病毒粒子与宿主细胞表面的细胞受体结合是病毒感染的开始。S1 蛋白是 SARS-CoV-2 所有结构蛋白的主要抗原成分，主要负责诱导宿主免疫应答，以 S 蛋白为靶点的中和抗体可以诱导对病毒感染的保护性免疫，常作为冠状病毒的免疫学检测的靶标蛋白 (WALLS et al., 2020, HUANG et al., 2020)^{2,20}。如智飞生物与 NovaVax 公司生产的以 S1 蛋白为基础的亚单位疫苗 (黄苏玥 等, 2021)。

重组蛋白表达是将目的蛋白的基因序列在体外将其插入到质粒、病毒等其他载体中，再把他导入到细胞中使目的蛋白得到稳定的扩增及表达 (范翠英 等, 2012)。到目前为止已经有研究表明，可以通过原核表达系统成功表达 SARS-CoV-2 的 S 蛋白、N 蛋白、与 RBD 蛋白 (汪巧菊 等, 2021)。虽然表达量高，但缺少对保持蛋白功能完整的重要的修饰所以会影响重组蛋白的免疫原性、可溶性和生物学功能。与原核表达系统相比哺乳动物细胞

表达系统表达的外源蛋白能够进行正确的蛋白折叠、翻译后加工修饰及四级结构组装,对保持蛋白质完整的、天然的生物学活性尤为重要。已有研究人员成功利用 BHK-21 细胞表达出具有活性的猪 α 干扰素,为开发新型的动物抗病毒抑制剂奠定了基础(肖红冉等,2013)。所以本研究采用 BHK-21 细胞作为表达系统,将优化好的 SARS-CoV-2 S1 的基因序列克隆到 pCAG-C 表达载体上,转染 BHK 细胞,将表达后的蛋白用亲和层析的方法进行纯化,获得了高度纯化的 S1 蛋白,为单克隆抗体制备提供优质的抗原。抗原表位是抗原刺激机体产生免疫的重要媒介,是疫苗研究的重点,有研究表明 S1 蛋白是新冠病毒中和表位的富集区(谭玉靓等,2020),可以对未来研制亚单位疫苗提供新的思路。

单克隆抗体是由 B 细胞克隆产生的针对一个抗原决定簇的抗体,具有特异性强、纯度高、亲和力强、效价高等特点,对生物学和免疫学等领域具有非常深远的意义(张昶等,2007)。尤其在动物检测方面:由于单克隆抗体的特异性强、灵敏度高可以特异准确的识别动物的病原,对引起疾病的抗原进行定性甚至定量的分析(鲍登克等,2009),单克隆抗体还可以简单快速的检测同一病毒的不同分型,可快速检测动物所感染细菌的种类与细菌的亚型,也可用于分析病原结构与某些易变异或结构复杂的病毒抗原。

所以本研究用纯化后的 S1 蛋白免疫小鼠,制备针对 S1 蛋白的单克隆抗体。筛选时应用纯化的 S1 蛋白包被反应板,采用间接 ELISA 方法对抗体进行检测,共获得 7 株分泌抗 S1 蛋白的杂交瘤细胞株,分别命名为 1A4、1F6、5E7、12F5、14F7、6B3、8C6。这种高纯度的蛋白包被反应板筛选方法具有简单、高效的特点。最后这 7 株杂交瘤细胞产生的单克隆抗体亚型都为 IgG/ κ 型。经 IFA 鉴定对 S1 蛋白有良好的反应性,且都具有中和活性。Western Blot 试验结果显示这些抗体识别的表位类型为构象表位,分析可能是因为由于本研究所选的表达抗原蛋白的细胞系为 BHK-21 真核表达,蛋白质在细胞内得到很好的修饰和折叠,在体外也可保持其稳定构象,所以免疫小鼠后刺激 B 细胞分泌的抗体也都为构象表位。7 株抗体中有 5 株都识别 S 蛋白的 RBD 区域,但它们的抗原表位是否相同,需要在接下来的试验中进行鉴定。S1 蛋白具有良好的免疫原性,其刺激机体产生抗体出现时间较早,是新型冠状病毒检测的常用靶点。

综上所述,本研究制备的 S1 蛋白单克隆抗体,为下一步探索新的 SARS-CoV-2 诊断方法的研究奠定了基础并提供了物质条件,同时也对 SARS-CoV-2 的抗原表位的鉴定、病毒的变异与致病机理的研究具有重要的意义。

第三章 SARS-CoV-2 RBD 蛋白的表达纯化与双抗原夹心 ELISA 抗体检测方法的初步建立

酶联免疫吸附试验 (ELISA) 是很常见的检测方法, 其原理是将已知的可溶性抗原或抗体吸附在固相载体表面, 利用酶标抗体或酶标抗原形成酶物。加入相应的酶底物显色, 然后通过酶标仪测定吸光值 (曹海旭 等, 2022)。目前常用的 ELISA 检测方法主要有直接 ELISA 检测、间接 ELISA 检测、双抗体夹心 ELISA 检测、双抗原夹心 ELISA、直接竞争 ELISA 和间接竞争 ELISA 等方法。本研究拟通过表达纯化 SARS-CoV-2 的 RBD 蛋白, 并利用 RBD 蛋白作为抗原, 优化双抗原夹心 ELISA 反应条件, 初步建立一种双抗原夹心 ELISA 的免疫学诊断方法。

3.1 实验材料

3.1.1 血清

SARS-CoV-2 抗体阴性动物血清 (由本试室保存), SARS-CoV-2 抗体阳性羊血清 (用 2.2.3 的步骤中纯化后的 S1 蛋白, 按照免疫程序分三次免疫羊, 采血分离血清得到)。猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 抗体阳性猪血清, 猪传染性胃肠炎 (TGEV) 病毒抗体阳性猪血清由猪消化道团队提供。

3.1.2 主要试剂与材料

幼仓鼠肾细胞、非洲猪瘟 205R 蛋白包被板由本实验室 (重要人兽共患病与烈性外来病研究创新团队) 保存; PD-10 脱盐柱购自 GE 公司; Triton X-100、6 × His 标签抗体、Ni-NTA 亲和层析树脂、预制蛋白电泳凝胶自 Genscript 公司; IRDye 800CW Donkey anti-Mouse 抗鼠 IgG 抗体购自 LI-COR 公司; FITC 标记羊抗鼠 IgG 抗体购自中杉金桥公司; G418 购自美国 Amresco 公司; QuickBlue 快速染胶液购自北京博奥龙免疫技术有限公司; SPF 级 6 周龄 BALB/c 小鼠、SPF 级 8 周龄昆明鼠购自辽宁长生生物技术有限公司; 4% 多聚甲醛购自 Biosharp 公司; 10 × PBS 购自索莱宝公司; ELISA 反应板购自 Costar 公司; ProClin 300 防腐剂购自 Sigma 公司。

3.1.3 主要实验仪器

倒置荧光显微镜 (Life); 蛋白电泳仪 (Bio-rad); 半干蛋白转膜仪 (Bio-Rad); 纯水仪 (Thermofisher); 蛋白凝胶成像系统 (Odyssey); 多功能酶标仪 (PE)。超微量分光光度计 (Implen P330)。

3.2 实验方法

3.2.1 表达 RBD 蛋白细胞的构建

根据转染试剂的说明书进行操作，首先将构建好的 pCAG-S1 重组表达质粒转染到事先准备好的单层 BHK-21 的细胞中，在细胞培养箱中培养 48 h 后更换含有 G418 的培养基对其进行筛选培养，4 d 后进行转染细胞的亚克隆，将其稀释克隆至 96 孔细胞培养板中。6 d 后用倒置荧光显微镜挑选单克隆，也就是含有单细胞集落的孔，对其进行扩大培养。同时对各细胞及细胞培养上清液进行 IFA 与 Western Blot 鉴定，筛选目的蛋白表达细胞克隆。IFA 与 Western blot 具体步骤如 2.2.7、2.2.8。

3.2.2 RBD 蛋白的纯化与鉴定

将表达细胞系扩大培养，每隔 4 d 收集细胞系培养上清液。用 Ni-NTA 亲和层析树脂纯化 RBD 蛋白，优化与确定 RBD 纯化条件。具体步骤如下：将维持 4 d 的细胞表达上清液经双层滤纸过滤后，分成两份每份 250 mL，一份加 NaCl 至终浓度为 300 mM，另一份加 NaCl 至终浓度为 500 mM。再分别加入 2 mL Ni-NTA 树脂，室温结合 3 h。用 2 个 PD-10 空层析柱滤过。各用 30 mL 40 mM 咪唑洗液洗涤，再分别用 10 mL 80 mM、200 mM、300 mM、500 mM 咪唑洗脱，各浓度洗脱收集 8 mL（每次洗脱前 2 mL 不收集洗脱液），用 10 kDa 超滤管浓缩至 2 mL，取样做 SDS-PAGE 试验与 Western Blot 试验进行鉴定，将纯化蛋白脱盐更换为 PBS 缓冲液后 BCA 法测定浓度，-70°C 保存。

根据以上试验确定最终的蛋白纯化步骤为：收集培养 4 d 的 RBD 表达细胞系上清，加入 1/2000 体积的防腐剂 ProClin 300。用双层滤纸过滤细胞培养上清液；加入 NaCl 至终浓度为 300 mM；加入 4% 体积的 1 M 咪唑洗脱贮液（结合浓度 40 mM）；用 5 M NaOH 调整 pH 值为 8.0；每 500 mL 培养液加入 4 mL Ni 填料（已经用含 40 mM 咪唑平衡好）；室温振摇 3 h 结合；用 PD-10 脱盐柱柱滤过结合好的培养液，2 mL 填料/柱；用 20 mL 结合缓冲液平衡柱子后，加入 10 mL 20% 乙醇保存柱子与填料；收集洗脱蛋白用截留分子量为 10 kDa 的 15 mL 超滤管浓缩至约 1 mL；浓缩蛋白用 PD-10 脱盐柱更换为 PBS 缓冲液（将超滤浓缩的约 2 mL 蛋白加入用 25 mL PBS 平衡好的脱盐柱中，补 PBS 至 2.5 mL，滤过；加入 3.5 mL PBS，收集 3.5 mL 洗脱液，分装；测定蛋白浓度。脱盐柱再用 25 mL PBS 平衡好备用。置 -70°C 冰箱保存。视需要可再进行分子筛纯化。

3.2.3 RBD 蛋白的 HRP 标记

将纯化后的 RBD 蛋白用分子筛层析法进一步纯化后送至商业生物技术公司进行 HRP 标记，HRP 标记采用改良的过碘酸钠标记法辣根过氧化物酶标记法，标记的 RBD 蛋白添加蛋白保护剂与甘油后分装置 -70°C 保存备用。

3.2.4 HRP 标记物最佳使用浓度的确定

首先用直接 ELISA 的方法确定 HRP-RBD 的使用浓度, 具体步骤为: 加样: 取 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 14F7 单克隆抗体包被板, 再取 205R 蛋白包被板作为空白对照, 将标记好的 RBD 蛋白稀释 100 倍至 20000 倍, 将稀释好的蛋白与空白对照加入板孔中 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 室温放置 30 min; 洗涤: 倒尽板孔中的液体, PBST 洗涤 3 次, 300 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 2 min/次; 显色: TMB 显色液 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 室温显色 10 min; 终止: 加入 2 M 硫酸溶液 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 终止; 检测: 测定 450 nm OD 值。选择合适的 HRP-RBD 浓度进行试验。

3.2.5 抗原最佳包被浓度

根据试验 3.2.4 步骤确定的 HRP-RBD 浓度, 继续优化抗原的包被浓度, 用 pH 为 9.6 的 0.05 M 的碳酸盐缓冲液稀释抗原至浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 包被 ELISA 反应板, 初始的实验条件如下所示:

包被: 用 pH 为 9.6 的 0.05 M 碳酸盐缓冲液包被浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RBD 蛋白和空白对照。

洗涤: 倒尽板孔中的液体, PBST 洗涤 3 次, 300 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 2 min/次

封闭: 用 0.5% PVA PBS 200 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 37°C 封闭 2 h。

洗涤: 倒尽板孔中的液体, PBST 洗涤 1 次, 300 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 2 min。

保护: 加入 200 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 包被板保护液 4°C 过夜。

烘干: 在 37°C 温箱烘干 3 小时。

加样: 每孔加入 50 μL 稀释液后, 再加入阳性血清, 与阴性血清 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 室温放置 2 h。

洗涤: 倒尽板孔中的液体, PBST 洗涤 3 次, 300 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 2 min/次。

酶标记物: 加入 1:10000 稀释的 HRP 标记的 RBD, 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 室温放置 30 min。

洗涤: PBST 洗涤 3 次, 300 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 2 min/次。

显色: TMB 显色液 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 室温显色 10 min。

终止: 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 2 M 硫酸溶液终止。

检测: 测定 450 nm OD 值。

3.2.6 包被条件的确定

本研究选取 pH 为 9.6, 0.05 M 的碳酸盐缓冲液 (CB) 对 RBD 包被抗原进行稀释, 选择 4°C 过夜包被, 37°C 下包被 2 h 和 37°C 2 h 加 4°C 过夜包被, 用上述初步确定的抗原浓度、酶标抗原的浓度对阴、阳性血清样品进行检测通过比较阳性血清的均值与阴性血清均值的比值 (P/N), 来判断这些条件对样品检测有无影响, ELISA 试验步骤同 3.2.3。

3.2.7 封闭液与封闭条件的选择

用以上优化的试验条件继续试验，确定封闭液与封闭条件。封闭液可以封闭包被板中未结合包被抗原抗体的位点，避免酶反应实验中无关的抗原与抗体结合到酶标板上，而得到假阳性的结果，影响实验结果的判读。选取含 5% 的脱脂乳的 PBS 溶液、含 1% BSA 的 PBS 溶液、含 0.5% PVA 的 PBS 溶液、与含 10% 胎牛血清的 PBS 溶液作为封闭液。条件为 37°C 封闭 2 h，ELISA 步骤同上。

3.2.8 样品稀释液的选择

按上述试验确定的条件，将样品用含 0.5% 明胶的 PBST 溶液、含 10% 马血清的 PBST 溶液、含 10% 牛血清的 PBST 溶液、含 0.5% BSA 的 PBST 溶液、含 1% BSA 的 PBST 溶液、含 2% BSA 的 PBST 溶液进行稀释后进行检测，确定样品的最佳稀释液。

3.2.9 样品反应时间的确定

按上述试验确定的条件，分别将样品在室温作用 150 min、120 min、90 min、60 min，其余条件与以上步骤相同，以此选择合适的样品反应时间。

3.2.10 酶标蛋白作用时间的确定

按上述试验确定的条件，测试酶标蛋白在室温作用 20 min、30 min、40 min、60 min 的 OD 值，选择合适的样品反应时间。

3.2.11 临界值的确定

按上述试验确定的部分条件检测 31 份 SARS-CoV-2 抗体阴性样本，计算其 OD 值的平均值和标准差，其平均值加三个标准差即为阳性临界值。

3.2.12 重复性试验

批内重复：使用优化好的条件在同一批次包被的 ELISA 板上对阳性和阴性样本进行检测，每孔重复 3 次测定 OD 值；批间重复：用建立好的 ELISA 方法对阳性和阴性样本在分 3 批包被的酶标板上检测，每孔重复 3 次。最后计算其平均值、标准差和变异系数。

3.2.13 ELISA 的特异性试验

用建立的 ELISA 方法检测 PEDV、TGEV 病毒抗体阳性血清，同时用 SARS-CoV-2 抗

体阳性血清与阴性血清作为阳性和阴性对照检测方法的特异性。

3.3 实验结果

3.3.1 表达细胞的筛选

将 2.2.1 构建的 RBD 蛋白的重组表达质粒转染 BHK-21 细胞后，经过亚克隆，再用含有 G418 的培养基进行选择培养，经 IFA 筛选。结果显示：重组细胞系有较强的荧光信号，而阴性对照 BHK-21 细胞无荧光信号（图 3-1）。所以继续将阳性细胞克隆扩大培养，并收集细胞培养上清液，再用 Western Blot 进行检测。结果显示：重组细胞系培养上清液在 35 kDa 与 40 kDa 之间出现特异性条带，与文献报道的 RBD 蛋白大小一致将筛选出的阳性细胞命名为 BSARS-CoV-2-RBD（图 3-2）。

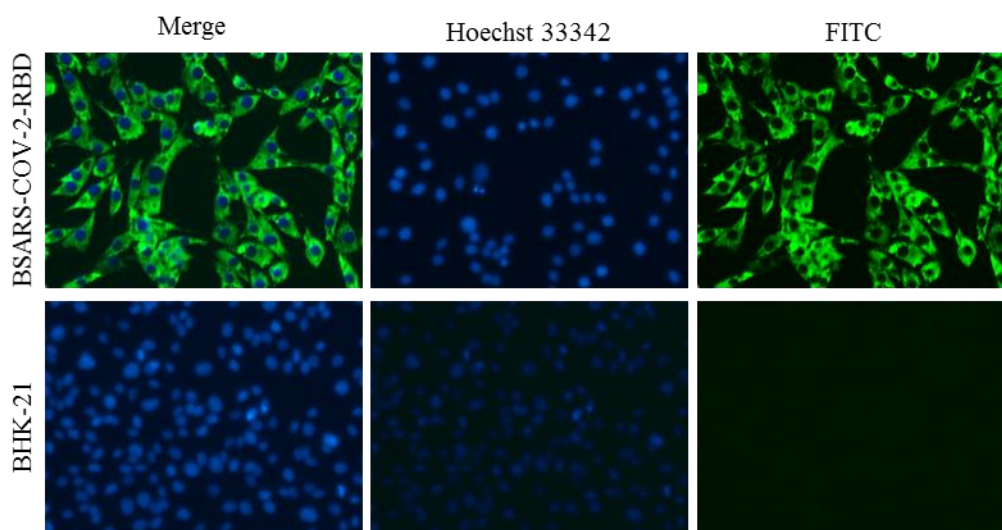


图 3-1 表达 SARS-CoV-2 RBD 蛋白的细胞的 IFA 筛选

Fig. 3-1 The results of screening cells expressing SARS-CoV-2 RBD by IFA

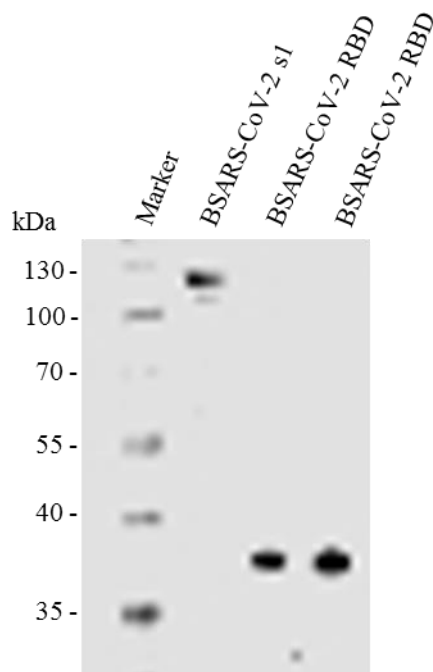


图 3-2 表达 SARS-CoV-2 RBD 蛋白的细胞的 Western Blot 筛选

Fig. 3-2 The results of screening cells expressing SARS-CoV-2 RBD by Western Blot

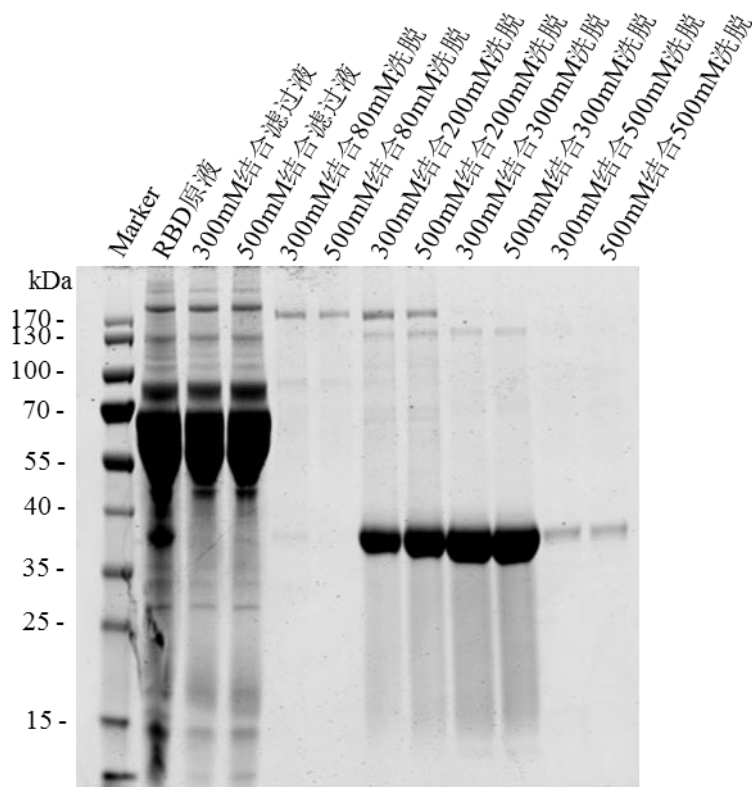


图 3-3 SDS-PAGE 鉴定 RBD 蛋白的纯化

Fig. 3-3 Identification of the purification of RBD proteins by SDS-PAGE

3.3.2 蛋白的纯化与鉴定

将重组细胞系扩大培养后，每隔 4 天收集上清，先少量纯化蛋白以用来确定蛋白的结合纯化与洗脱条件。经过 SDS-PAGE 与 Western Blot 两种试验结果结合来确定蛋白与 Ni 树脂结合、洗杂、洗脱的条件。300 mM 离子浓度的结合与 500 mM 离子浓度结合的条带没有差别，当咪唑浓度为 200 mM 时蛋白开始洗脱，但是在 300 mM 时条带最粗，所以确定蛋白纯化的条件为 300 mM 离子浓度结合，80 mM 咪唑浓度洗杂，300 mM 咪唑浓度洗脱（图 3-3）。

3.3.3 酶标记物最佳稀释度

酶标记物最合适的稀释倍数为 10000 倍稀释，在这个稀释度阳性样品的 OD 值最高，阴性样本的 OD 值最低（图 3-4）。

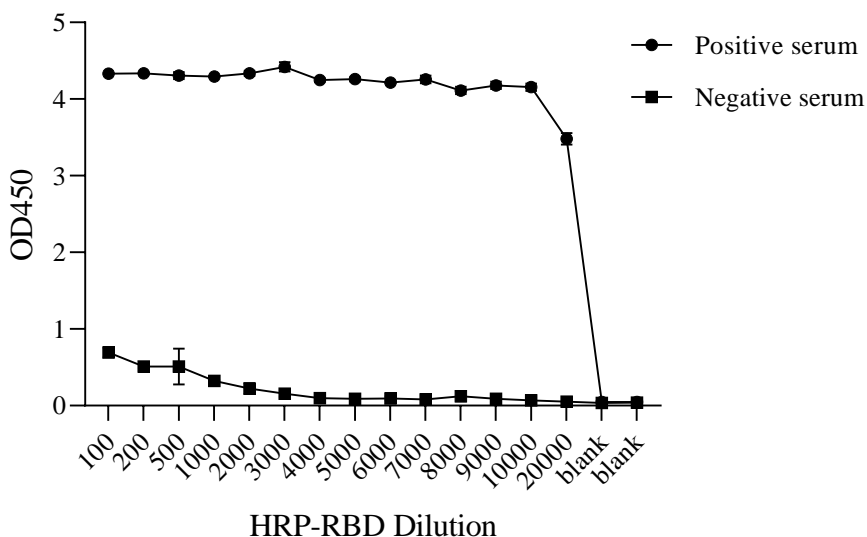


图 3-4 HRP-RBD 稀释倍数的确定

Fig. 3-4 Determination of the dilution of HRP-RBD

3.3.4 抗原最佳包被浓度

利用初步确立的双抗原夹心 ELISA 方法证明抗原最佳的包被浓度为 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，在此浓度下酶标板上面的蛋白结合量已经达到饱和，蛋白浓度升高 OD 值变化不明显。所以用此条件继续试验（图 3-5）。

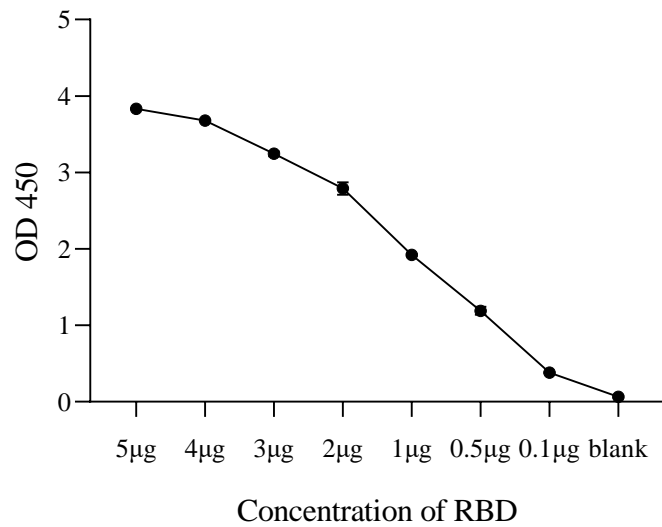


图 3-5 RBD 蛋白的包被浓度

Fig. 3-5 Coating concentration of RBD protein

3.3.5 样品包被条件的确定

利用初步确立的方法对不同的包被条件进行检测，在 4°C 过夜包被的条件下阳性血清的 OD 值（表 3-1）与 P/N 的值最高（图 3-6），所以后续实验都用此条件进行。

表 3-1 包被条件的优化

Table 3-1 ELISA test results of coating condition

血清	包被条件		
	4°C 过夜包被	37°C 2h 包被	37°C 2h +4°C 过夜包被
阳性血清	2.06	1.779	1.602
阳性血清	1.959	1.578	1.523
阳性血清	1.955	1.609	1.588
阴性血清	0.041	0.048	0.049
阴性血清	0.053	0.051	0.051
阴性血清	0.045	0.042	0.046
空	0.068	0.07	0.08
空	0.08	0.07	0.077

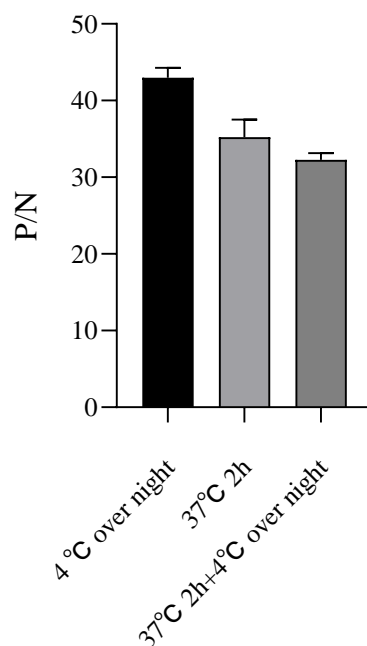


图 3-6 包被条件的确定

Fig. 3-6 Determination of coating condition

3.3.6 封闭液的确定

在本试验中使用含 0.5% PVA 的 PBS 溶液在 37°C 温箱中封闭 2 h，其 P/N 的值最高（图 3-7）且阳性 OD 值最高（表 3-2）所以用此条件继续优化方法。

表 3-2 封闭液与封闭条件的确定

Table 3-2 Determination of blocking reagents and blocking condition

血清	封闭液			
	5% 脱脂乳	1% BSA	0.5% PVA	10% FBS
阳性血清	0.694	1.585	1.728	0.71
阳性血清	0.649	1.667	1.666	0.772
阳性血清	0.653	1.75	1.75	0.815
阴性血清	0.048	0.05	0.047	0.048
阴性血清	0.051	0.054	0.054	0.056
阴性血清	0.045	0.05	0.047	0.049
空	0.05	0.096	0.088	0.117
空	0.057	0.124	0.101	0.119

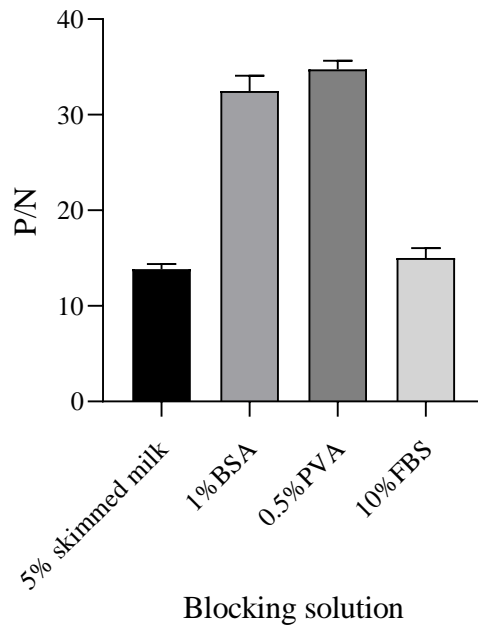


图 3-7 封闭液与封闭条件的确定

Fig. 3-7 Determination of blocking reagents and blocking condition

3.3.7 稀释液的确定

按照上述试验中确立的条件，样品稀释液为含 10% 马血清的 PBST 溶液时，P/N 的值最高（图 3-8）且阳性 OD 值最高（表 3-3），所以确定 10% 马血清的 PBST 溶液为样品稀释液。

表 3-3 稀释液的选择

Table 3-3 Determination of sample solution

血清	稀释液					
	0.5% 明胶	10% 马血清	10% FBS	0.5% BSA	1% BSA	2% BSA
阳性血清	1.451	1.567	1.401	1.468	1.525	1.467
阳性血清	1.439	1.524	1.421	1.431	1.461	1.475
阳性血清	1.495	1.524	1.327	1.49	1.409	1.429
阴性血清	0.042	0.041	0.043	0.043	0.044	0.044
阴性血清	0.045	0.045	0.048	0.047	0.047	0.049
阴性血清	0.042	0.043	0.04	0.043	0.042	0.045
空	0.035	0.039	0.044	0.049	0.055	0.066
空	0.041	0.042	0.048	0.059	0.062	0.071

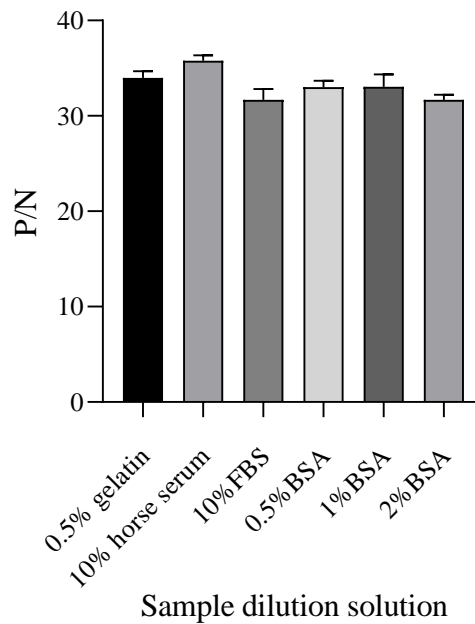


图 3-8 样品稀释液的选择

Fig. 3-8 Determination of sample dilution solution

3.3.8 样品反应时间的确定

在上述条件优化的基础上，进一步确定抗原反应的最佳时间，样品反应时间为 120 min 以上时阳性血清的 OD 值与 P/N 的值变化不明显，但反应时间在 120 min 以下时阳性 OD 值与 P/N 的值急剧降低，结果如表 3-4 与图 3-9。

表 3-4 样品反应时间的确定

Table 3-4 Determination of sample incubation time.

血清	样品反应时间			
	150 min	120 min	90 min	60 min
阳性血清	1.445	1.469	1.151	1.037
阳性血清	1.557	1.475	1.247	1.02
阳性血清	1.578	1.497	1.166	1.029
阴性血清	0.044	0.043	0.042	0.042
阴性血清	0.048	0.048	0.047	0.048
阴性血清	0.042	0.043	0.042	0.042
空	0.039	0.041	0.044	0.042
空	0.047	0.055	0.047	0.05

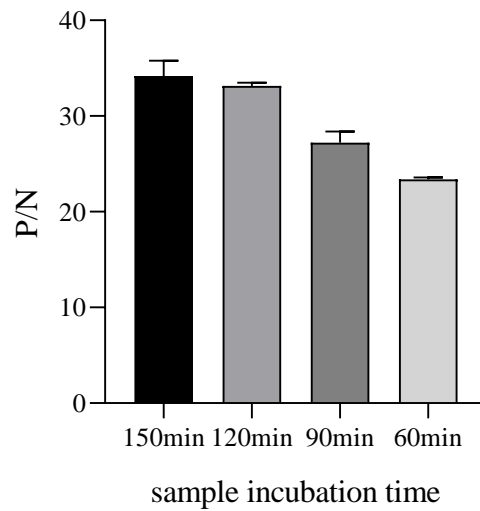


图 3-9 样品反应时间的确定

Fig. 3-9 Determination of sample incubation time

3.3.9 HRP-RBD 作用时间的确定

按照上述试验中确立的条件，继续进行试验当 HRP-RBD 作用时间为 30 min 时，阳性血清的 OD 值（表 3-5）与 P/N 值最高（图 3-10），后续试验使用此条件进行。

表 3-5 HRP-RBD 反应时间的确定

Table 3-5 Determination of HRP-RBD incubation time

血清	HRP-RBD 反应时间			
	20 min	30 min	40 min	60 min
阳性血清	1.388	1.472	1.449	1.505
阳性血清	1.285	1.512	1.501	1.542
阳性血清	1.313	1.521	1.413	1.514
阴性血清	0.057	0.059	0.061	0.068
阴性血清	0.063	0.067	0.07	0.071
阴性血清	0.057	0.062	0.058	0.068
空	0.041	0.044	0.046	0.052
空	0.047	0.053	0.056	0.058

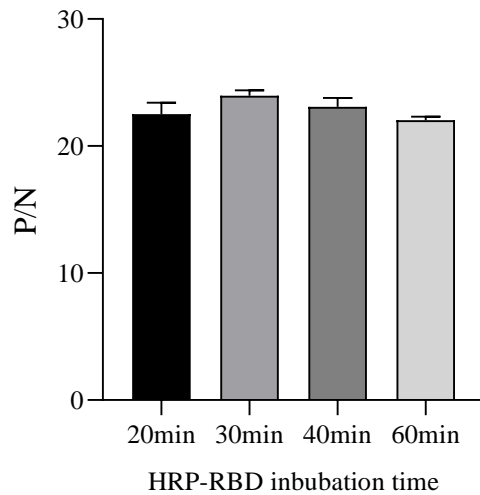


图 3-10 HRP-RBD 反应时间的确定

Fig. 3-10 Determination of HRP-RBD incubation time

3.3.10 临界值的确定

用已确定的双抗原夹心 ELISA 方法，检测已知 31 份 SARS-CoV-2 抗体阴性血清样品与 22 份 SARS-CoV-2 抗体阳性血清样品，测定 OD 值，计算抗体阴性样品 OD 值平均值 (\bar{x}) 与 标准差 (SD)，以 $\bar{x}+3SD$ 的值为临界值 (cut off 值)。计算结果 \bar{x} 为 0.0778 标准差为 0.0181，cut off 值计算结果为 0.1320 (图 3-11)。

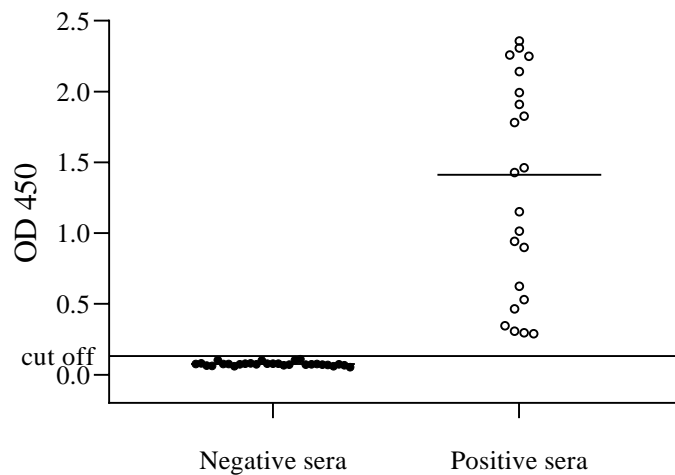


图 3-11 临界值实验结果

Fig. 3-11 Determination of cut off value

3.3.11 重复性实验结果

批内重复：采用建立的双抗原 ELISA 方法用同批次包被的 ELISA 板检测强阳性样品、弱阳性样品和阴性样品，每份样品重复检测三次。根据测定结果计算各样品的变异系数分别为 0.788、1.725、2.440、1.746、3.109、1.856（如表 3-6），均小于 10%，证明此方法批内重复性良好。

表 3-6 批内重复性试验

Table 3-6 The repeatability of Intra batch ELISA

样品	板号			平均值 (AVG)	标准差 (SD)	变异系数 (CV%)
	1	2	3			
1	3.365	3.428	3.381	3.391	0.027	0.788
2	3.197	3.125	3.065	3.129	0.054	1.725
3	2.060	1.959	1.955	1.991	0.049	2.440
4	1.713	1.741	1.787	1.747	0.031	1.746
5	0.053	0.054	0.057	0.055	0.002	3.109
6	0.043	0.045	0.044	0.044	0.001	1.856

批间重复：采用建立的双抗原 ELISA 方法，用不同批次包被的 ELISA 板检测阳性样品和阴性样品，每份样品重复检测三次。根据测定结果计算各样品的变异系数分别为 7.750、8.497、8.714、7.899、6.949、2.041（如表 3-7）均小于 10%，证明此方法批间重复性良好。

表 3-7 批间重复性试验

Table 3-7 The repeatability of Intra batch ELISA

样品	板号			平均值 (AVG)	标准差 (SD)	变异系数 (CV%)
	1	2	3			
1	1.822	1.666	1.506	1.665	0.129	7.750
2	1.809	1.715	1.473	1.666	0.142	8.497
3	1.810	1.702	1.464	1.659	0.145	8.714
4	1.866	1.688	1.538	1.697	0.134	7.899
5	0.047	0.043	0.051	0.047	0.003	6.949
6	0.039	0.040	0.041	0.040	0.001	2.041

3.3.12 特异性实验结果

用建立的双抗原夹心 ELISA 抗体方法对 PEDV 抗体阳性血清、TGEV 抗体阳性血清、SARS-CoV-2 抗体阳性血清、SARS-CoV-2 抗体阴性血清进行检测。结果表明，只有 SARS-CoV-2 抗体阳性血清呈阳性反应，而 PEDV，TGEV 抗体以及阴性对照均无反应，结果如图 3-12。

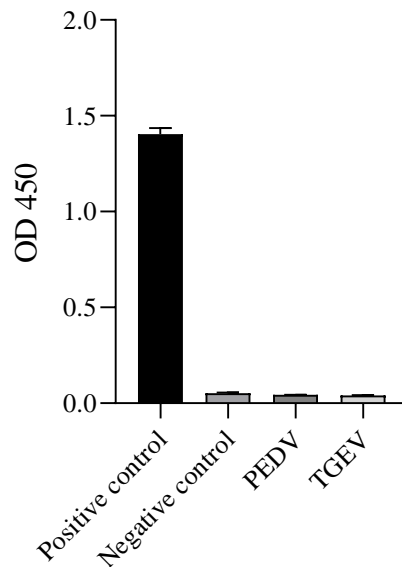


图 3-12 特异性实验结果

Fig. 3-12 Determination the specificity of double-antigen sandwich ELISA.

3.4 讨论

新型冠状病毒肺炎自暴发以来已经蔓延全球多个国家和地区,对世界各国造成了不可估计的经济损失。然而有报道证明该病毒起源于动物宿主,通过自然选择和适应后直接传染给人类或通过哺乳动物中间宿主传染给人类 (ANDERSEN et al., 2020)。所以考虑到 SARS-CoV-2 起源于动物是一种人兽共患病病毒,以及在某些动物物种中存在与人新型冠状病毒受体 ACE2 高度相似的同源物。所以我们要找到这些易感动物并对其进行流行病学监测是尤其重要的。随着新型冠状病毒肺炎的流行,有文献报道,狗、猫和貂等动物感染新型冠状病毒的报道 (WANG et al., 2020c)。因此研究 SARS-CoV-2 的中间宿主与监测 SARS-CoV-2 的流行状况建立针对多种动物的新型冠状病毒检测方法是十分重要的。目前,新型冠状病毒的感染大多是通过 RT-PCR 检测,且此方法高度敏感且具有很强的特异性,但有试验表明,动物有时只能在感染后很短的时间内才能检测出阳性。所以为了对动物感染模型的研究,宿主的排查,新型冠状病毒疫苗的评价,需要开展对新型冠状病毒抗体检测方法的研究。

病毒的抗体检测是指利用病毒的蛋白为抗原,利用抗原抗体免疫学反应,检测机体感染病毒后体内抗体的方法。它对于疾病诊断、疫苗的评价、流行病学调查及抗体的检测具有重要的意义。目前抗体检测的主要方法有免疫荧光技术、免疫印迹技术、放射性检测及酶联免疫吸附试验等。免疫荧光技术是将荧光素标记抗原,检测动物血清中抗体的方法,广泛应用于流式细胞技术和免疫荧光检测等方面。免疫印迹检测技术是将酶联免疫吸附试验与电泳技术相结合的一种检测方法,对真菌的结核病具有很高的诊断价值 (闵福援 等, 2004)。但是此方法繁琐成本高故很少应用在临床检测方面。放射性免疫检测技术是将放射性同位素标记

在抗原表面，通过检测抗原抗体结合物的放射性同位素的检测技术。酶联免疫吸附试验（ELISA）是将可溶性抗原吸附于固相载体表面，利用酶标抗体或抗原结合形成酶标记的免疫复合物，加入相应底物而进行显色，根据颜色的深浅或利用酶标仪读数对抗体进行定量或定性的分析（王磊 等，2021）。该检测技术具有快速、高效、准确、经济、简便的特点因此经常应用于临床诊断中（张艳艳 等，2015）。ELISA 用于检测抗体的技术类型有间接 ELISA、双抗原夹心 ELISA、竞争 ELISA 与中和抑制 ELISA 等（刘文阁，2011）。此前德国柏林自由大学，病毒学院的研究人员已经开发出了一种多物种检测动物体内 SARS-CoV-2 抗体的间接 ELISA 方法（WERNIKE et al., 2021），但是需要抗多种动物的酶标抗体，不具有通用性。而竞争 ELISA 方法虽然也可以避免种属动物二抗的选择，但是待检抗体需要与酶标抗体竞争结合包被在固相载体上的抗原，显色结果与待检抗体量成反比，此方法相较于双抗原夹心 ELISA 方法操作繁琐且敏感性低。目前国内已经有研究人员利用杆状病毒表达技术，制备 SARS-CoV-2 重组 S1 蛋白。因为 SARS-CoV，MERS-CoV 与 SARS-CoV-2 可引起相似的症状，且 SARS-CoV 与 SARS-CoV-2 有相似的基因序列，为有效鉴别这三种病毒，通过基因对比序列分析选取 S1 蛋白 N 端区域（NTD）作为诊断靶标，建立了 SARS-CoV-2 双抗原夹心 ELISA 抗体检测方法（邓均华 等，2020），但是此方法也有较大的缺点，即并没有对变异毒株进行检测。

此前已有研究报道说明，RBD 结构域是检测 SARS-CoV-2 抗体最特异的抗原位点，且是 RBD 是抗体的主要靶点，不同冠状病毒的 RBD 保守性较差（CHIA et al., 2020; PREMKUMAR et al., 2020）。所以本研究利用哺乳动物细胞表达系统表达 RBD 蛋白，表达的 RBD 蛋白表达量高易于纯化。将其利用辣根过氧化物酶进行标记。建立针对 SARS-CoV-2 抗体的诊断方法，对该检测方法的抗原包被浓度、包被液、封闭液、包被时间、封闭时间、样品作用时间、HRP-RBD 稀释度及显色时间进行优化，确定了最终的反应条件。本方法的样品反应条件为室温，有效的提高了该方法的便携性。无论何种动物血清，只要存在 SARS-CoV-2 抗体都能产生特异性反应。用本方法检测其他冠状病毒血清 PEDV 与 TGEV 结果为阴性，这表明特异性良好；检测 SARS-CoV-2 S1 蛋白免疫的兔血清与羊血清结果均为阳性，表明本方法没有动物种属限制。所以可作为追溯感染的自然宿主和中间宿主、排查畜禽及宠物等动物 SARS-CoV-2 的感染情况，为动物感染模型的研究、动物疫苗的评价提供便捷的检测工具（邓均华 等，2020）。尽管本方法拥有优点，但同时它也存在一些不足之处，选择的样本量有限，没有对新冠病毒同源性较高的 SARS 冠状病毒与变异毒株进行特异性检测，对此方法的敏感性也没有进行检测。这些不足需要在接下来的研究中进一步进行完善。

第四章 全文结论

- 1.成功构建了 SARS-CoV-2 S1 蛋白稳定表达细胞系，获得纯化 S1 蛋白抗原。
- 2.成功制备了 7 株具有病毒中和活性的 S1 蛋白单克隆抗体 1A4、1F6、5E7、12F5、14F7、6B3、8C6。
- 3.成功构建了 SARS-CoV-2 RBD 蛋白稳定表达细胞系，利用纯化 RBD 蛋白初步建立了 SARS-CoV-2 双抗原夹心 ELISA 抗体检测方法。

参考文献

- 鲍登克, 杨苏珍, 万博, 杨兴琪, 2009. 单克隆抗体及其在畜禽传染病诊治中的应用研究进展. 河南畜牧兽医(综合版) 30(05): 9-10.
- 曹海旭, 胡博, 李虹晔, 李昞真, 代昕宇, 张成琪, 李双双, 张海玲, 廉士珍, 白雪, 基于s蛋白的犬冠状病毒间接elisa检测方法的建立与应用. 中国兽医科学. 1-9. DOI: 10.16656/j.issn.1673-4696.2022.0083.
- 邓均华, 白露露, 白晶晶, 孙杰, 颜世君, 王娟, 郝丽影, 黄甜, 谭菲菲, 靳亚平, 田克恭, 2020. 动物血清中SARS-CoV-2抗体检测方法的建立与评价. 动物医学进展. 41(11): 7-14. DOI: 10.16437/j.cnki.1007-5038.2020.11.002.
- 范翠英, 冯利兴, 樊金玲, 果德安, 刘璇, 2012. 重组蛋白表达系统的研究进展. 生物技术. (2): 5.
- 黄苏玥, 沈银忠, 2021. 新型冠状病毒疫苗的研发进展. 上海医药. 42(17): 16-21.
- 蒋静, 赵文亮, 李文越, 陶大刚, 潘文雅, 徐兵荣, 肖箫, 谢胜松, 蒋羽, 2022. 基于crispr/cas系统的现场核酸检测技术. 中国动物检疫. 39(3): 6.
- 刘文阁, 2011. 对临床常用酶联免疫吸附试验技术类型的评价与分析. 中国医药导报. 8(4): 2.
- 闵福援, 孙桂珍, 王健, 辛永梅, 2004. 前s1蛋白在乙型肝炎诊断及判断预后中的作用. 中华检验医学杂志. 27(4): 3.
- 谭玉靛, 唐标, 2020. 2019新型冠状病毒S蛋白的结构和功能分析. 微生物学杂志. 40(03): 41-50.
- 汪巧菊, 胡雨萌, 温亚亚, 宋丽, 孟闯, 潘志明, 焦新安, 新型冠状病毒s1蛋白的表达及活性鉴定. 生物技术通报. 1-7. DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2021-1076.
- 王磊, 刘海霞, 王艳晓, 2021. 免疫抗体检测技术在预防重大畜禽疫病中的问题和建议. 畜禽业. 32(12): 48-49. DOI: 10.19567/j.cnki.1008-0414.2021.12.021.
- 肖红冉, 王大伟, 贺志锐, 王鹏雁, 倪伟, 胡圣伟, 陈创夫, 2013. 猪 α 干扰素在bhk-21细胞中的表达与生物活性分析. 石河子大学学报(自然科学版). 31(02): 182-186. DOI: 10.13880/j.cnki.65-1174/n.2013.02.010.
- 杨逸成, 肖志强, 叶凯雁, 郎欣月, 蔡雯念, 肖维威, 赵卫, 2021. SARS-CoV-2与SARS-CoV: 病原学、流行病学、临床与病理. 病毒学报. 37(01): 211-218. DOI: 10.13242/j.cnki.bingduxuebao.003848.
- 张昶, 任向阳, 刘秋燕, 吴青, 陈陆, 王川庆, 2007. 单克隆抗体在畜禽疫病诊断中的应用. 中国畜牧兽医. (05): 93-95.
- 张艳艳, 赵国先, 冯焯, 李树鹏, 2015. 免疫学检测技术在畜禽疾病诊断中的应用. 饲料广角. (12): 4.
- ANDERSEN K G, RAMBAUT A, LIPKIN W I, HOLMES E C, GARRY R F, 2020. The proximal origin of sars-cov-2. Nat Med, 26(4): 450-452. DOI: 10.1038/s41591-020-0820-9.
- BANERJEE A K, BLANCO M R, BRUCE E A, HONSON D D, CHEN L M, CHOW A, BHAT P,

- OLLIKAINEN N, QUINODOZ S A, LONEY C, THAI J, MILLER Z D, LIN A E, SCHMIDT M M, STEWART D G, GOLDFARB D, DE LORENZO G, RIHN S J, VOORHEES R M, BOTTEN J W, MAJUMDAR D, GUTTMAN M, 2020. Sars-cov-2 disrupts splicing, translation, and protein trafficking to suppress host defenses. *Cell*, 183(5): 1325-1339.e1321. DOI: 10.1016/j.cell.2020.10.004.
- BáRCENA M, OOSTERGETEL G T, BARTELINK W, FAAS F G, VERKLEIJ A, ROTTIER P J, KOSTER A J, BOSCH B J, 2009. Cryo-electron tomography of mouse hepatitis virus: Insights into the structure of the coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(2): 582-587. DOI: 10.1073/pnas.0805270106.
- BEAVIS K G, MATUSHEK S M, ABELEDA A P F, BETHEL C, HUNT C, GILLEN S, MORAN A, TESIC V, 2020. Evaluation of the euroimmun anti-sars-cov-2 elisa assay for detection of iga and igg antibodies. *J Clin Virol*, 129104468. DOI: 10.1016/j.jcv.2020.104468.
- BERTRAM S, DIJKMAN R, HABJAN M, HEURICH A, GIERER S, GLOWACKA I, WELSCH K, WINKLER M, SCHNEIDER H, HOFMANN-WINKLER H, THIEL V, PöHLMANN S, 2013. Tmprss2 activates the human coronavirus 229e for cathepsin-independent host cell entry and is expressed in viral target cells in the respiratory epithelium. *J Virol*, 87(11): 6150-6160. DOI: 10.1128/jvi.03372-12.
- BROUGHTON J P, DENG X, YU G, FASCHING C L, SERVELLITA V, SINGH J, MIAO X, STREITHORST J A, GRANADOS A, SOTOMAYOR-GONZALEZ A, ZORN K, GOPEZ A, HSU E, GU W, MILLER S, PAN C Y, GUEVARA H, WADFORD D A, CHEN J S, CHIU C Y, 2020. Crispr-cas12-based detection of sars-cov-2. *Nat Biotechnol*, 38(7): 870-874. DOI: 10.1038/s41587-020-0513-4.
- CALIENDO A M, HODINKA R L, 2017. A crispr way to diagnose infectious diseases. *N Engl J Med*, 377(17): 1685-1687. DOI: 10.1056/NEJMcibr1704902.
- CHAN K H, CHAN J F, TSE H, CHEN H, LAU C C, CAI J P, TSANG A K, XIAO X, TO K K, LAU S K, WOO P C, ZHENG B J, WANG M, YUEN K Y, 2013. Cross-reactive antibodies in convalescent sars patients' sera against the emerging novel human coronavirus emc (2012) by both immunofluorescent and neutralizing antibody tests. *J Infect*, 67(2): 130-140. DOI: 10.1016/j.jinf.2013.03.015.
- CHENG V C, LAU S K, WOO P C, YUEN K Y, 2007. Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection. *Clin Microbiol Rev*, 20(4): 660-694. DOI: 10.1128/CMR.00023-07.
- CHIA W N, TAN C W, FOO R, KANG A E Z, PENG Y, SIVALINGAM V, TIU C, ONG X M, ZHU F, YOUNG B E, CHEN M I, TAN Y J, LYE D C, ANDERSON D E, WANG L F, 2020. Serological differentiation between covid-19 and sars infections. *Emerg Microbes Infect*, 9(1): 1497-1505. DOI: 10.1080/22221751.2020.1780951.
- CORMAN V M, LANDT O, KAISER M, MOLENKAMP R, MEIJER A, CHU D K, BLEICKER

- T, BRÜNINK S, SCHNEIDER J, SCHMIDT M L, MULDER D G, HAAGMANS B L, VAN DER VEER B, VAN DEN BRINK S, WIJSMAN L, GODERSKI G, ROMETTE J L, ELLIS J, ZAMBON M, PEIRIS M, GOOSSENS H, REUSKEN C, KOOPMANS M P, DROSTEN C, 2020. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-ncov) by real-time rt-pcr. *Euro Surveill*, 25(3). DOI: 10.2807/1560-7917.Es.2020.25.3.2000045.
- CUI J, LI F, SHI Z L, 2019. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol*, 17(3): 181-192. DOI: 10.1038/s41579-018-0118-9.
- DONOGHUE M, HSIEH F, BARONAS E, GODBOUT K, GOSSELIN M, STAGLIANO N, DONOVAN M, WOOLF B, ROBISON K, JEYASEELAN R, BREITBART R E, ACTON S, 2000. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ace2) converts angiotensin i to angiotensin 1-9. *Circ Res*, 87(5): E1-9. DOI: 10.1161/01.res.87.5.e1.
- DRECHSLER Y, ALCARAZ A, BOSSONG F J, COLLISSON E W, DINIZ P P, 2011. Feline coronavirus in multicat environments. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 41(6): 1133-1169. DOI: 10.1016/j.cvsm.2011.08.004.
- ENDO A, ABBOTT S, KUCHARSKI A J, FUNK S, 2020. Estimating the overdispersion in covid-19 transmission using outbreak sizes outside China. *Wellcome Open Res*, 567. DOI: 10.12688/wellcomeopenres.15842.3.
- FAN X, CAO D, KONG L, ZHANG X, 2020. Cryo-em analysis of the post-fusion structure of the sars-cov spike glycoprotein. *Nat Commun*, 11(1): 3618. DOI: 10.1038/s41467-020-17371-6.
- FANG Y, ZHANG H, XIE J, LIN M, YING L, PANG P, JI W, 2020. Sensitivity of chest ct for covid-19: Comparison to rt-pcr. *Radiology*, 296(2): E115-e117. DOI: 10.1148/radiol.2020200432.
- GODET M, L'HARIDON R, VAUTHEROT J F, LAUDE H, 1992. Tgev corona virus orf4 encodes a membrane protein that is incorporated into virions. *Virology*, 188(2): 666-675. DOI: 10.1016/0042-6822(92)90521-p.
- GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, LEE J W, ESSLETZBICHLER P, DY A J, JOUNG J, VERDINE V, DONGHIA N, DARINGER N M, FREIJE C A, MYHRVOLD C, BHATTACHARYYA R P, LIVNY J, REGEV A, KOONIN E V, HUNG D T, SABETI P C, COLLINS J J, ZHANG F, 2017. Nucleic acid detection with crispr-cas13a/c2c2. *Science*, 356(6336): 438-442. DOI: 10.1126/science.aam9321.
- GUAN Y, ZHENG B J, HE Y Q, LIU X L, ZHUANG Z X, CHEUNG C L, LUO S W, LI P H, ZHANG L J, GUAN Y J, BUTT K M, WONG K L, CHAN K W, LIM W, SHORTRIDGE K F, YUEN K Y, PEIRIS J S, POON L L, 2003. Isolation and characterization of viruses related to the sars coronavirus from animals in southern China. *Science*, 302(5643): 276-278. DOI: 10.1126/science.1087139.
- GUI M, SONG W, ZHOU H, XU J, CHEN S, XIANG Y, WANG X, 2017. Cryo-electron microscopy structures of the sars-cov spike glycoprotein reveal a prerequisite conformational

- state for receptor binding. *Cell Res*, 27(1): 119-129. DOI: 10.1038/cr.2016.152.
- HALAJI M, HEIAT M, FARAJI N, RANJBAR R, 2021. Epidemiology of covid-19: An updated review. *J Res Med Sci*, 2682. DOI: 10.4103/jrms.JRMS_506_20.
- HARDT P D, HAUENSCHILD A, NALOP J, MARZEION A M, PORSCH-OZCüRüMEZ M, LULEY C, SZIEGOLEIT A, KLOER H U, 2003. The commercially available elisa for pancreatic elastase 1 based on polyclonal antibodies does measure an as yet unknown antigen different from purified elastase 1. Binding studies and clinical use in patients with exocrine pancreatic insufficiency. *Z Gastroenterol*, 41(9): 903-906. DOI: 10.1055/s-2003-41832.
- HARRISON A G, LIN T, WANG P, 2020. Mechanisms of sars-cov-2 transmission and pathogenesis. *Trends Immunol*, 41(12): 1100-1115. DOI: 10.1016/j.it.2020.10.004.
- HASAN A, PARAY B A, HUSSAIN A, QADIR F A, ATTAR F, AZIZ F M, SHARIFI M, DERAKHSHANKHAH H, RASTI B, MEHRABI M, SHAHPASAND K, SABOURY A A, FALAHATI M, 2021. A review on the cleavage priming of the spike protein on coronavirus by angiotensin-converting enzyme-2 and furin. *J Biomol Struct Dyn*, 39(8): 3025-3033. DOI: 10.1080/07391102.2020.1754293.
- HEURICH A, HOFMANN-WINKLER H, GIERER S, LIEPOLD T, JAHN O, PöHLMANN S, 2014. Tmprss2 and adam17 cleave ace2 differentially and only proteolysis by tmprss2 augments entry driven by the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *J Virol*, 88(2): 1293-1307. DOI: 10.1128/jvi.02202-13.
- HOEY J, 2003. Updated sars case definition using laboratory criteria. *Canadian Medical Association Journal*, 168(12): 1566-1567.
- HOFFMANN M, KLEINE-WEBER H, SCHROEDER S, KRüGER N, HERRLER T, ERICHSEN S, SCHIERGENS T S, HERRLER G, WU N H, NITSCHKE A, MüLLER M A, DROSTEN C, PöHLMANN S, 2020. Sars-cov-2 cell entry depends on ace2 and tmprss2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*, 181(2): 271-280.e278. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
- HUANG Y, YANG C, XU X F, XU W, LIU S W, 2020. Structural and functional properties of sars-cov-2 spike protein: Potential antiviral drug development for covid-19. *Acta Pharmacol Sin*, 41(9): 1141-1149. DOI: 10.1038/s41401-020-0485-4.
- HULSWIT R J, DE HAAN C A, BOSCH B J, 2016. Coronavirus spike protein and tropism changes. *Adv Virus Res*, 9629-57. DOI: 10.1016/bs.aivir.2016.08.004.
- JIA L, HU F, LI H, LI L, TANG X, LIU Y, DENG H, HAN J, LI J, CAI W, 2018. Characterization of small genomic regions of the hepatitis b virus should be performed with more caution. *Virol J*, 15(1): 188. DOI: 10.1186/s12985-018-1100-x.
- KLUMPP-THOMAS C, KALISH H, DREW M, HUNSBERGER S, SNEAD K, FAY M P, MEHALKO J, SHUNMUGAVEL A, WALL V, FRANK P, DENSON J P, HONG M, GULTEN G, MESSING S, HICKS J, MICHAEL S, GILLETTE W, HALL M D, MEMOLI M,

- ESPOSITO D, SADTLER K, 2020. Standardization of enzyme-linked immunosorbent assays for serosurveys of the sars-cov-2 pandemic using clinical and at-home blood sampling. medRxiv, DOI: 10.1101/2020.05.21.20109280.
- LAUER S A, GRANTZ K H, BI Q, JONES F K, ZHENG Q, MEREDITH H R, AZMAN A S, REICH N G, LESSLER J, 2020. The incubation period of coronavirus disease 2019 (covid-19) from publicly reported confirmed cases: Estimation and application. *Ann Intern Med*, 172(9): 577-582. DOI: 10.7326/m20-0504.
- LI Q, GUAN X, WU P, WANG X, ZHOU L, TONG Y, REN R, LEUNG K S M, LAU E H Y, WONG J Y, XING X, XIANG N, WU Y, LI C, CHEN Q, LI D, LIU T, ZHAO J, LIU M, TU W, CHEN C, JIN L, YANG R, WANG Q, ZHOU S, WANG R, LIU H, LUO Y, LIU Y, SHAO G, LI H, TAO Z, YANG Y, DENG Z, LIU B, MA Z, ZHANG Y, SHI G, LAM T T Y, WU J T, GAO G F, COWLING B J, YANG B, LEUNG G M, FENG Z, 2020b. Early transmission dynamics in wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N Engl J Med*, 382(13): 1199-1207. DOI: 10.1056/NEJMoa2001316.
- LI Y, LI S, WANG J, LIU G, 2019. Crispr/cas systems towards next-generation biosensing. *Trends Biotechnol*, 37(7): 730-743. DOI: 10.1016/j.tibtech.2018.12.005.
- LU R, ZHAO X, LI J, NIU P, YANG B, WU H, WANG W, SONG H, HUANG B, ZHU N, BI Y, MA X, ZHAN F, WANG L, HU T, ZHOU H, HU Z, ZHOU W, ZHAO L, CHEN J, MENG Y, WANG J, LIN Y, YUAN J, XIE Z, MA J, LIU W J, WANG D, XU W, HOLMES E C, GAO G F, WU G, CHEN W, SHI W, TAN W, 2020. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: Implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*, 395(10224): 565-574. DOI: 10.1016/s0140-6736(20)30251-8.
- MALTA M, RIMOIN A W, STRATHDEE S A, 2020. The coronavirus 2019-ncov epidemic: Is hindsight 20/20? *EclinicalMedicine*, 20100289. DOI: 10.1016/j.eclinm.2020.100289.
- MILLET J K, WHITTAKER G R, 2015. Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Res*, 202120-134. DOI: 10.1016/j.virusres.2014.11.021.
- OLIVEIRA B A, OLIVEIRA L C, SABINO E C, OKAY T S, 2020. Sars-cov-2 and the covid-19 disease: A mini review on diagnostic methods. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 62e44. DOI: 10.1590/s1678-9946202062044.
- OU X, LIU Y, LEI X, LI P, MI D, REN L, GUO L, GUO R, CHEN T, HU J, XIANG Z, MU Z, CHEN X, CHEN J, HU K, JIN Q, WANG J, QIAN Z, 2020. Characterization of spike glycoprotein of sars-cov-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with sars-cov. *Nat Commun*, 11(1): 1620. DOI: 10.1038/s41467-020-15562-9.
- PREMKUMAR L, SEGOVIA-CHUMBEZ B, JADI R, MARTINEZ D R, RAUT R, MARKMANN A, CORNABY C, BARTELT L, WEISS S, PARK Y, EDWARDS C E, WEIMER E, SCHERER E M, ROUPHAEL N, EDUPUGANTI S, WEISKOPF D, TSE L V, HOU Y J, MARGOLIS D, SETTE A, COLLINS M H, SCHMITZ J, BARIC R S, DE SILVA A

- M, 2020. The receptor binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in sars-cov-2 patients. *Sci Immunol*, 5(48). DOI: 10.1126/sciimmunol.abc8413.
- QIN Q, WANG K, YANG J, XU H, CAO B, WO Y, JIN Q, CUI D, 2019. Algorithms for immunochromatographic assay: Review and impact on future application. *Analyst*, 144(19): 5659-5676. DOI: 10.1039/c9an00964g.
- ROCKLÖV J, SJÖDIN H, WILDER-SMITH A, 2020. Covid-19 outbreak on the diamond princess cruise ship: Estimating the epidemic potential and effectiveness of public health countermeasures. *J Travel Med*, 27(3). DOI: 10.1093/jtm/taaa030.
- ROH C, JO S K, 2011. Quantitative and sensitive detection of sars coronavirus nucleocapsid protein using quantum dots-conjugated rna aptamer on chip. *J Chem Technol Biotechnol*, 86(12): 1475-1479. DOI: 10.1002/jctb.2721.
- SASHITAL D G, 2018. Pathogen detection in the crispr-cas era. *Genome Med*, 10(1): 32. DOI: 10.1186/s13073-018-0543-4.
- SHANG J, WAN Y, LUO C, YE G, GENG Q, AUERBACH A, LI F, 2020. Cell entry mechanisms of sars-cov-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(21): 11727-11734. DOI: 10.1073/pnas.2003138117.
- SHARMA A, AHMAD FAROUK I, LAL S K, 2021. Covid-19: A review on the novel coronavirus disease evolution, transmission, detection, control and prevention. *Viruses*, 13(2). DOI: 10.3390/v13020202.
- SHI J, WEN Z, ZHONG G, YANG H, WANG C, HUANG B, LIU R, HE X, SHUAI L, SUN Z, ZHAO Y, LIU P, LIANG L, CUI P, WANG J, ZHANG X, GUAN Y, TAN W, WU G, CHEN H, BU Z, 2020. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to sars-coronavirus 2. *Science*, 368(6494): 1016-1020. DOI: 10.1126/science.abb7015.
- TANG T, BIDON M, JAIMES J A, WHITTAKER G R, DANIEL S, 2020. Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development. *Antiviral Res*, 178104792. DOI: 10.1016/j.antiviral.2020.104792.
- TORTORICI M A, WALLS A C, LANG Y, WANG C, LI Z, KOERHUIS D, BOONS G J, BOSCH B J, REY F A, DE GROOT R J, VEESLER D, 2019. Structural basis for human coronavirus attachment to sialic acid receptors. *Nat Struct Mol Biol*, 26(6): 481-489. DOI: 10.1038/s41594-019-0233-y.
- TRÉ-HARDY M, WILMET A, BEUKINGA I, FAVRESSE J, DOGNÉ J M, DOUXFILS J, BLAIRON L, 2021. Analytical and clinical validation of an elisa for specific sars-cov-2 igg, iga, and igm antibodies. *J Med Virol*, 93(2): 803-811. DOI: 10.1002/jmv.26303.
- UMAKANTHAN S, SAHU P, RANADE A V, BUKELO M M, RAO J S, ABRAHAO-MACHADO L F, DAHAL S, KUMAR H, KV D, 2020. Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (covid-19). *Postgrad Med J*. 96(1142):

- 753-758. DOI: 10.1136/postgradmedj-2020-138234.
- VALIZADEH H, ABDOLMOHAMMADI-VAHID S, DANSHINA S, ZIYA GENCER M, AMMARI A, SADEGHI A, ROSHANGAR L, ASLANI S, ESMAEILZADEH A, GHAEBI M, VALIZADEH S, AHMADI M, 2020. Nano-curcumin therapy, a promising method in modulating inflammatory cytokines in covid-19 patients. *Int Immunopharmacol*, 89(Pt B): 107088. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.107088.
- WALLS A C, PARK Y J, TORTORICI M A, WALL A, MCGUIRE A T, VEESLER D, 2020. Structure, function, and antigenicity of the sars-cov-2 spike glycoprotein. *Cell*, 181(2): 281-292.e286. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
- WAN Y, SHANG J, GRAHAM R, BARIC R S, LI F, 2020. Receptor recognition by the novel coronavirus from wuhan: An analysis based on decade-long structural studies of sars coronavirus. *J Virol*, 94(7). DOI: 10.1128/jvi.00127-20.
- WANG C, LI W, DRABEK D, OKBA NMA, VAN HAPEREN R, OSTERHAUS ADME, VAN KUPPEVELD FJM, HAAGMANS BL, GROSVELD F, BOSCH BJ. A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun*. 2020 May 4;11(1):2251. DOI: 10.1038/s41467-020-16256-y.
- WANG D, HU B, HU C, ZHU F, LIU X, ZHANG J, WANG B, XIANG H, CHENG Z, XIONG Y, ZHAO Y, LI Y, WANG X, PENG Z, 2020a. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in wuhan, China. *Jama*, 323(11): 1061-1069. DOI: 10.1001/jama.2020.1585.
- WANG L, LIN Z Q, WONG A, 2020b. Covid-net: A tailored deep convolutional neural network design for detection of covid-19 cases from chest x-ray images. *Sci Rep*, 10(1): 19549. DOI: 10.1038/s41598-020-76550-z.
- WANG L, MITCHELL P K, CALLE P P, BARTLETT S L, MCALOOSE D, KILLIAN M L, YUAN F, FANG Y, GOODMAN L B, FREDRICKSON R, ELVINGER F, TERIO K, FRANZEN K, STUBER T, DIEL D G, TORCHETTI M K, 2020c. Complete genome sequence of sars-cov-2 in a tiger from a U.S. Zoological collection. *Microbiol Resour Announc*, 9(22). DOI: 10.1128/mra.00468-20.
- WANG Q, ZHANG Y, WU L, NIU S, SONG C, ZHANG Z, LU G, QIAO C, HU Y, YUEN K Y, WANG Q, ZHOU H, YAN J, QI J, 2020d. Structural and functional basis of sars-cov-2 entry by using human ace2. *Cell*, 181(4): 894-904.e899. DOI: 10.1016/j.cell.2020.03.045.
- WATANABE Y, ALLEN J D, WRAPP D, MCLELLAN J S, CRISPIN M, 2020. Site-specific glycan analysis of the sars-cov-2 spike. *Science*, 369(6501): 330-333. DOI: 10.1126/science.abb9983.
- WERNIKE K, AEBISCHER A, MICHELITSCH A, HOFFMANN D, FREULING C, BALKEMA-BUSCHMANN A, GRAAF A, MULLER T, OSTERRIEDER N, RISSMANN M, RUBBENSTROTH D, SCHON J, SCHULZ C, TRIMPERT J, ULRICH L, VOLZ A,

- METTENLEITER T, BEER M, 2021. Multi-species elisa for the detection of antibodies against sars-cov-2 in animals. *Transbound Emerg Dis*, 68(4): 1779-1785. DOI: 10.1111/tbed.13926.
- WOO P C, LAU S K, CHU C M, CHAN K H, TSOI H W, HUANG Y, WONG B H, POON R W, CAI J J, LUK W K, POON L L, WONG S S, GUAN Y, PEIRIS J S, YUEN K Y, 2005. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus hku1, from patients with pneumonia. *J Virol*, 79(2): 884-895. DOI: 10.1128/jvi.79.2.884-895.2005.
- WRAPP D, WANG N, CORBETT K S, GOLDSMITH J A, HSIEH C L, ABIONA O, GRAHAM B S, MCLELLAN J S, 2020. Cryo-em structure of the 2019-ncov spike in the prefusion conformation. *Science*, 367(6483): 1260-1263. DOI: 10.1126/science.abb2507.
- WU F, ZHAO S, YU B, CHEN Y M, WANG W, SONG Z G, HU Y, TAO Z W, TIAN J H, PEI Y Y, YUAN M L, ZHANG Y L, DAI F H, LIU Y, WANG Q M, ZHENG J J, XU L, HOLMES E C, ZHANG Y Z, 2020. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 579(7798): 265-269. DOI: 10.1038/s41586-020-2008-3.
- XIA S, YAN L, XU W, AGRAWAL A S, ALGAISSI A, TSENG C K, WANG Q, DU L, TAN W, WILSON I A, JIANG S, YANG B, LU L, 2019. A pan-coronavirus fusion inhibitor targeting the hr1 domain of human coronavirus spike. *Sci Adv*, 5(4): eaav4580. DOI: 10.1126/sciadv.aav4580.
- XIA S, ZHU Y, LIU M, LAN Q, XU W, WU Y, YING T, LIU S, SHI Z, JIANG S, LU L, 2020. Fusion mechanism of 2019-ncov and fusion inhibitors targeting hr1 domain in spike protein. *Cell Mol Immunol*, 17(7): 765-767. DOI: 10.1038/s41423-020-0374-2.
- XIAO K, ZHAI J, FENG Y, ZHOU N, ZHANG X, ZOU J-J, LI N, GUO Y, LI X, SHEN X, ZHANG Z, SHU F, HUANG W, LI Y, ZHANG Z, CHEN R-A, WU Y-J, PENG S-M, HUANG M, XIE W-J, CAI Q-H, HOU F-H, LIU Y, CHEN W, XIAO L, SHEN Y, 2020. DOI: 10.1101/2020.02.17.951335.
- XING Y, LI X, GAO X, DONG Q, 2020. Natural polymorphisms are present in the furin cleavage site of the sars-cov-2 spike glycoprotein. *Front Genet*, 11783. DOI: 10.3389/fgene.2020.00783.
- YAO H, SONG Y, CHEN Y, WU N, XU J, SUN C, ZHANG J, WENG T, ZHANG Z, WU Z, CHENG L, SHI D, LU X, LEI J, CRISPIN M, SHI Y, LI L, LI S, 2020. Molecular architecture of the sars-cov-2 virus. *Cell*, 183(3): 730-738 e713. DOI: 10.1016/j.cell.2020.09.018.
- YESUDHAS D, SRIVASTAVA A, GROMIHA M M, 2021. Covid-19 outbreak: History, mechanism, transmission, structural studies and therapeutics. *Infection*, 49(2): 199-213. DOI: 10.1007/s15010-020-01516-2.
- ZHANG H, PENNINGER J M, LI Y, ZHONG N, SLUTSKY A S, 2020. Angiotensin-converting enzyme 2 (ace2) as a sars-cov-2 receptor: Molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Med*, 46(4): 586-590. DOI: 10.1007/s00134-020-05985-9.