

分类号 \_\_\_\_\_

学号 172045 \_\_\_\_\_

UDC \_\_\_\_\_

密级 公开 \_\_\_\_\_

# 军事科学院

## 博士学位论文

### 高致病冠状病毒纳米抗体的 构建与中和机制研究

The Construction and Neutralization Mechanism of  
Nanobodies against Highly Pathogenic Coronaviruses

作者姓名	李江凡
学科专业	军事预防医学
学位类型	学术学位
指导教师	秦成峰 研究员
答辩主席	杨瑞馥 研究员
学位授予单位	军事科学院
论文提交日期	2021年06月01日

# 原创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作新取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表和撰写过的研究成果，也不包含为获得军事科学院或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文题目：高致病冠状病毒纳米抗体的构建与中和机制研究

学位论文作者签名：李江凡 日期：2021 年 6 月 1 日

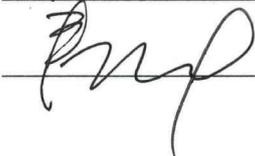
# 学位论文授权使用授权书

本人完全了解军事科学院有关保留、使用学位论文的规定。本人授权军事科学院可以保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子文档，允许论文被查阅和借阅；可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

(保密学位论文在解密后适用本授权书)

学位论文题目：高致病冠状病毒纳米抗体的构建与中和机制研究

学位论文作者签名：李江凡 日期：2021 年 6 月 1 日

作者指导教师签名： 日期：2021 年 6 月 1 日

## 目 录

摘 要 .....	I
Abstract .....	IV
前 言 .....	1
一、冠状病毒 .....	1
二、中东呼吸综合征冠状病毒 .....	2
三、严重急性呼吸综合征冠状病毒 .....	10
四、纳米抗体 .....	15
第一章 抗 MERS-CoV 纳米中和抗体的构建与鉴定 .....	19
引言 .....	19
1.1 实验材料 .....	19
1.1.1 细菌、噬菌体和质粒 .....	19
1.1.2 细胞 .....	19
1.1.3 蛋白质 .....	20
1.1.4 主要试剂（盒） .....	20
1.1.5 主要仪器 .....	20
1.2 实验方法 .....	20
1.2.1 MERS-CoV S1 蛋白特异性纳米抗体的筛选 .....	21
1.2.2 MERS-CoV S 蛋白特异性纳米抗体的筛选 .....	25
1.2.3 抗 MERS-CoV 特异性纳米抗体的选取与制备 .....	25
1.2.4 抗 MERS-CoV 特异性抗体的生物学功能评价 .....	31
1.2.5 抗 MERS-CoV 特异性抗体的中和机制研究 .....	35
1.3 实验结果 .....	40
1.3.1 抗 MERS-CoV 特异性纳米抗体的筛选和制备 .....	40
1.3.2 MERS-CoV 特异性抗体的生物学功能评价 .....	44
1.3.3 MERS-CoV 特异性抗体的中和机制研究 .....	51
1.4 讨论 .....	55
第二章 抗 MERS-CoV 双表位中和抗体的构建与鉴定 .....	58
引言 .....	58
2.1 实验材料 .....	58
2.1.1 细胞 .....	58

2.1.2	蛋白质 .....	58
2.1.3	主要试剂（盒） .....	58
2.1.4	主要仪器 .....	58
2.2	实验方法 .....	59
2.2.1	MERS-CoV 特异性双表位中和抗体的构建与制备 .....	59
2.2.2	MERS-CoV 特异性双表位抗体的生物学功能评价 .....	59
2.3	实验结果 .....	60
2.3.1	MERS-CoV 特异性双表位中和抗体的制备 .....	60
2.3.2	MERS-CoV 特异性双表位中和抗体的生物学特征分析 .....	60
2.4	讨论 .....	64
<b>第三章 抗 SARS-CoV 纳米中和抗体的构建与鉴定 .....</b>		<b>67</b>
	引言 .....	67
3.1	实验材料 .....	67
3.1.1	细菌、噬菌体、质粒 .....	67
3.1.2	细胞 .....	67
3.1.3	蛋白 .....	67
3.1.4	主要试剂（盒）与耗材 .....	67
3.1.5	主要仪器 .....	68
3.2	实验方法 .....	68
3.2.1	SARS-CoV RBD-Fc 蛋白特异性纳米抗体库的构建 .....	68
3.2.2	SARS-CoV S1 蛋白特异性纳米抗体的筛选 .....	75
3.2.3	SARS-CoV RBD 蛋白特异性纳米抗体的筛选 .....	75
3.2.4	SARS-CoV 特异性纳米抗体的选取与制备 .....	75
3.2.5	SARS-CoV 特异性纳米抗体的生物学功能评价 .....	76
3.2.6	SARS-CoV 特异性纳米抗体的中和机制研究 .....	76
3.3	实验结果 .....	76
3.3.1	SARS-CoV RBD 特异性纳米抗体库的构建 .....	76
3.3.2	SARS-CoV 特异性纳米抗体的筛选及制备 .....	80
3.3.3	SARS-CoV 特异性纳米抗体的生物学特征分析 .....	83
3.3.4	SARS-CoV 特异性纳米抗体的中和机制研究 .....	85
3.4	讨论 .....	88
<b>第四章 抗 MERS-CoV 和 SARS-CoV 双特异性抗体构建与鉴定 .....</b>		<b>91</b>
	引言 .....	91
4.1	实验材料 .....	91

---

---

4.1.1	细胞 .....	91
4.1.2	蛋白质 .....	91
4.1.3	主要试剂（盒） .....	91
4.1.4	主要仪器 .....	92
4.2	实验方法 .....	92
4.2.1	抗 MERS-CoV 和 SARS-CoV 双特异性抗体的构建与制备 .....	92
4.2.2	抗 MERS-CoV 和 SARS-CoV 双特异性抗体的生物学功能评价 .....	92
4.3	实验结果 .....	92
4.3.1	抗 MERS-CoV 和 SARS-CoV 双特异性抗体的制备与鉴定 .....	92
4.3.2	抗 MERS-CoV 和 SARS-CoV 双特异性抗体的生物学功能评价 .....	93
4.4	讨论 .....	95
第五章	结论与展望 .....	97
	参考文献 .....	99
附录 A	部分试剂及培养基配方 .....	109
附录 B	用于序列比对的 2012-2019 年 MERS-CoV 流行株 GenBank 编号 .....	110
	在学期间取得的学术成果 .....	123
	主要简历 .....	125
	致 谢 .....	126

## 表 目 录

表 1.1	M34 对 MERS-CoV 不同突变假病毒的交叉中和活性 .....	50
表 1.2	不同 MERS-CoV 抗体的比较 .....	57
表 2.1	1034-Fc 对 MERS-CoV 不同突变株假病毒的交叉中和活性.....	62
表 2.2	抗体保护作用两两比较结果.....	64
表 3.1	建库所需引物序列 .....	77
表 3.2	SARS-CoV 单克隆比较.....	89

## 图 目 录

图 1 冠状病毒结构示意图.....	1
图 2 MERS-CoV S 蛋白结构示意图.....	3
图 3 SARS-CoV S 蛋白结构图.....	11
图 4 不同类型抗体的结构示意图.....	15
图 5 VH 和 VHH 一级结构示意图.....	16
图 1.1 噬菌体抗体库筛选流程图.....	21
图 1.2 pCold 载体质粒图谱.....	25
图 1.3 MERS_RBD- pFUSE 载体质粒图谱.....	37
图 1.4 单克隆噬菌体抗体的 ELISA 鉴定.....	40
图 1.5 抗 MERS-CoV 纳米抗体 SDS-PAGE 鉴定.....	41
图 1.6 抗 MERS-CoV 纳米抗体 ELISA 鉴定.....	41
图 1.7 D539A 突变假病毒中和试验.....	42
图 1.8 竞争性 ELISA.....	43
图 1.9 生物膜层干涉实验.....	44
图 1.10 M34-Fc 与 MERS-CoV S1 蛋白的 ELISA 鉴定.....	45
图 1.11 生物膜层干涉技术.....	45
图 1.12 M34 假病毒中和试验.....	46
图 1.13 抗体不同标签的假病毒中和活性比较.....	46
图 1.14 MERS-CoV 病毒株 RBD 突变情况分析.....	49
图 1.15 空斑减少中和试验.....	51
图 1.16 竞争性 ELISA.....	51
图 1.17 流式细胞术实验.....	52
图 1.18 细胞-细胞融合实验.....	53
图 1.19 MERS-CoV RBD 突变体蛋白 SDS-PAGE 鉴定.....	54
图 1.20 M34 识别表位分析.....	54
图 1.21 M34 与 MERS-CoV 结合的空间结构预测.....	55
图 2.1 1034-Fc 抗体结构示意图.....	59
图 2.2 1034-Fc 抗体 SDS-PAGE 鉴定.....	60
图 2.3 1034-Fc 与 MERS-CoV S1 蛋白的 ELISA 测定.....	60
图 2.4 生物膜层干涉实验.....	61

---

---

图 2.5	1034-Fc 的假病毒中和实验 .....	61
图 2.6	三个抗体中和活性比较 .....	62
图 2.7	小鼠活体成像 .....	63
图 2.8	抗体体内保护作用分析 .....	64
图 3.1	羊驼免疫后血清抗体效价测定 .....	77
图 3.2	抗体基因扩增电泳图 .....	78
图 3.3	SARS-CoV RBD 特异性抗体库 VHH 插入率鉴定 .....	79
图 3.4	SARS-CoV RBD 特异性抗体库 VHH 多样性分析 .....	80
图 3.5	SARS-CoV S1 筛选的单克隆噬菌体抗体 ELISA 鉴定 .....	81
图 3.6	SARS-CoV RBD 筛选的单克隆噬菌体抗体 ELISA 鉴定 .....	82
图 3.7	SARS-CoV 特异性纳米抗体 SDS-PAGE 鉴定 .....	83
图 3.8	SARS-CoV 特异性纳米抗体 ELISA 鉴定 .....	83
图 3.9	生物膜层干涉实验 .....	84
图 3.10	S14 假病毒中和实验 .....	84
图 3.11	不同标签 S14 假病毒中和活性比较 .....	85
图 3.12	流式细胞术实验 .....	86
图 3.13	竞争性 ELISA .....	86
图 3.14	SARS-CoV RBD 野生株及突变株蛋白 SDS-PAGE 鉴定 .....	87
图 3.15	S14 识别表位分析 .....	87
图 3.16	S14 与 SARS-CoV 结合的空间结构预测 .....	88
图 4.1	1014-Fc 抗体结构示意图 .....	92
图 4.2	1014-Fc 的 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定 .....	93
图 4.3	1014-Fc 抗体与 MERS-CoV S1 和 SARS-CoV S1 蛋白 ELISA 鉴定 .....	93
图 4.4	生物膜层干涉实验 .....	94
图 4.5	MERS-CoV 和 SARS-CoV 假病毒中和试验 .....	94
图 4.6	1014-Fc 假病毒中和活性比较 .....	95

## 缩略语表

英文缩写	英文全称	中文全称
293T	293T cell line	人肾上皮传代细胞系
ACE2	angiotensin converting enzyme 2	血管紧张素转换酶 2
Amp	ampicillin	氨苄青霉素
bp	base pair	碱基对
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid	互补脱氧核糖核酸
CDR	complementary determine region	互补决定区
CoV	coronavirus	冠状病毒
DMEM	dulbecco's minimum essential medium	达尔伯克必需基本培养基
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
DPP4	dipeptidyl peptidase 4	二肽基肽酶 4
EC <sub>50</sub>	concentration for 50% of maximal effect	半最大效应浓度
ELISA	enzyme-linked immune sorbent assay	酶联免疫吸附试验
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
FITC	fluorescence isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
FR	framework region	骨架区
g	gram	克
g	gravity	重力加速度
h	hour	小时
HeLa	HeLa cell line	海拉细胞系
HRP	horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
Huh-7	Huh-7 cell line	人肝癌细胞系
IC <sub>50</sub>	half maximal inhibitory concentration	半数抑制浓度
IgG	immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
IPTG	isopropyl-1-thio- $\beta$ -galactopyranoside	异丙基-1-硫代- $\beta$ -呋喃半乳糖苷
kDa	kilodalton	千道尔顿
kV	kilovolt	千伏
L	liter	升
LB	Luria-Bertani medium	LB 培养基

MERS	Middle East respiratory syndrome	中东呼吸综合征
min	minute	分钟
mg	milligram	毫克
mL	milliliter	毫升
mM	millimole per liter	毫摩尔每升
ng	nanogram	纳克
nM	nanomole per liter	纳摩尔每升
OD	optical density	吸光度
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBMC	peripheral blood mononuclear cell	外周血单个核细胞
PBS	phosphate-buffered saline	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
PEG	polyethylene glycol	聚乙二醇
pfu	plaque forming unit	空斑形成单位
pM	picomole per liter	皮摩尔每升
RBD	receptor-binding domain	受体结合域
RNA	ribonucleic acid	核糖核酸
s	second	秒
SARS	severe acute respiratory syndrome	严重急性呼吸综合征
SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
TCID <sub>50</sub>	50% tissue culture infective dose	半数组织细胞感染量
TEA	triethylamine	三乙胺
μg	micro gramme	微克
μL	micro liter	微升
VH	variable domain of the heavy chain	重链可变区
VHH	variable domain of the heavy chain of the heavy-chain antibody	重链抗体的重链可变区
WT	wild type	野生型

## 摘要

冠状病毒传播速度快、感染后果严重，对人类生命健康构成持续的威胁。到目前为止，总共出现三次冠状病毒的暴发流行，其一是 2003 年由严重急性呼吸综合征冠状病毒（SARS-CoV）引起的非典型肺炎，其二是 2012 年由中东呼吸综合征冠状病毒（MERS-CoV）引起的中东呼吸综合征，其三是 2019 年由新型冠状病毒（SARS-CoV-2）引起的新冠肺炎（COVID-19）。遗憾的是目前仅针对 SARS-CoV-2 有上市疫苗，对 SARS-CoV 和 MERS-CoV 既无可用疫苗也无特效药。

中和抗体的应用是预防和控制传染病非常有效的手段之一。冠状病毒刺突蛋白上的受体结合域（RBD）能够强烈地诱导机体产生保护性抗体，是抗体甚至疫苗研发的重要靶点。目前，针对 SARS-CoV 和 MERS-CoV 的单克隆抗体研究较多，包括人源抗体、鼠源抗体和人源化抗体等。纳米抗体作为目前已知的可结合抗原的最小抗体，保留了较高的抗原亲和力和特异性，具有分子量低、易于制备、免疫原性低、组织渗透力强等优点，可以用于多种疾病的治疗，具有广泛的应用前景。对 MERS-CoV 纳米抗体的研究极少，对 SARS-CoV 纳米抗体的研究尚属空白。因此，本研究以 SARS-CoV 和 MERS-CoV 的受体结合域为靶点，展开了对 SARS-CoV 和 MERS-CoV 特异性纳米中和抗体的研究。

**1、抗 MERS-CoV 纳米中和抗体研究。**为了筛选 MERS-CoV 纳米中和抗体，使用 MERS-CoV S1 和 S 蛋白分别对 MERS-CoV RBD 特异性纳米抗体库进行了四轮筛选，通过酶联免疫吸附试验（ELISA）鉴定出三株亲和力较高的抗体。然后，通过竞争性 ELISA、生物膜层干涉实验等鉴定出识别位点与 NbMS10（NbMS10 为此前筛选到的一株抗 MERS-CoV 纳米抗体）不同的一株抗体 M34，并利用原核表达系统和真核表达系统制备了抗体蛋白。利用生物膜层干涉技术测定了 M34 与 MERS-CoV S1 蛋白的结合亲和力（ $K_d=222$  pM），通过假病毒中和试验验证了该抗体的中和活性（ $IC_{50}=15.2$  ng/mL）。通过竞争性 ELISA 证实 M34 与 DPP4 受体竞争性结合 MERS-CoV RBD。进一步又通过流式细胞术试验和细胞-细胞融合实验探究出该抗体通过阻断 RBD 与 DPP4 的结合而发挥作用。最后通过同源建模和分子对接预测了 M34 与 MERS-CoV RBD 结合的空间结构，结果提示 M34 可能通过其残基 G54 与 RBD 上的残基 Y523 形成氢键而相互作用。

**2、抗 MERS-CoV 双表位中和抗体研究。**为了减小单一抗体的应用导致病毒逃逸突变发生的可能性，将上一部分筛选到的抗体与此前实验室鉴定的抗 MERS-CoV 特异性抗体 NbMS10 通过一个短肽进行连接，构建了抗 MERS-CoV 双表位抗体，通过真核表达系统表达了该抗体。然后通过 ELISA 测定了该抗体与

MERS-CoV S1 的亲和力, 利用生物膜层干涉技术测定了该抗体与 MERS-CoV S1 蛋白的结合亲和力 ( $K_d=36$  pM), 通过假病毒中和试验鉴定了该抗体的中和活性 ( $IC_{50}=11.1$  ng/mL)。结果证实改造后的双表位抗体, 其亲和力、中和活性等生物学功能没有降低, 并且对 D539A/N 突变的假病毒也具有了中和能力。

**3、抗 SARS-CoV 纳米中和抗体研究。**为了筛选 SARS-CoV 纳米中和抗体, 以 SARS-CoV RBD 免疫羊驼, 免疫后利用其外周血单个核细胞建立了噬菌体展示的纳米抗体库。分别以 SARS-CoV RBD 和 S1 为抗原对抗体库进行了四轮筛选, 通过 ELISA 鉴定出了四株高结合力抗体, 选择了其中结合力最高的 S14 进行了进一步研究。利用生物膜层干涉技术测定了 S14 与 SARS-CoV S1 蛋白的亲和力 ( $K_d=143$  pM), 通过假病毒中和试验验证了该抗体的中和活性 ( $IC_{50}=10.7$  ng/mL)。通过竞争性 ELISA 证实 S14 与 ACE2 受体竞争性结合 SARS-CoV RBD。进一步又通过流式细胞术试验探究出该抗体通过阻断 RBD 与 ACE2 的结合而发挥作用。最后通过同源建模和分子对接预测了 S14 与 SARS-CoV RBD 结合的空间结构, 结果提示 S14 可能通过其残基 S33 和 P99 与 RBD 上的残基 R449 形成氢键而相互作用。

**4、抗 MERS-CoV 和 SARS-CoV 双特异性中和抗体研究。**为了实现抗体功能的多样性, 将上一部分筛选到的抗 SARS-CoV 抗体 S14 与抗 MERS-CoV 特异性抗体 NbMS10 通过一个短肽进行连接, 构建了抗 MERS-CoV 和抗 SARS-CoV 的双特异性抗体, 通过真核表达系统表达了该抗体。然后通过 ELISA 测定了该抗体与 MERS-CoV S1 和 SARS-CoV S1 蛋白的结合力, 利用生物膜层干涉技术测定了该抗体与 MERS-CoV S1 和 SARS-CoV S1 蛋白的亲和力 ( $K_d$  分别为 116 和 155 pM), 通过假病毒中和试验验证了该抗体的中和活性 ( $IC_{50}$  分别为 7.00 和 13.7 ng/mL)。结果证实改造后的双表位抗体, 其亲和力、中和活性等生物学功能没有降低, 具有同时抗 MERS-CoV 假病毒和 SARS-CoV 假病毒的能力。

本研究以 MERS-CoV 和 SARS-CoV 的 RBD 为靶点, 借助噬菌体展示技术, 通过四轮筛选, 针对两种病毒分别筛选到一株高亲和力的纳米抗体。随后通过 ELISA、生物膜层干涉技术、假病毒中和试验评价了他们的生物学功能, 通过竞争性 ELISA、流式细胞术实验、细胞-细胞融合实验探究了它们的中和机制。然后通过基因工程的方法, 将识别不同表位的抗 MERS-CoV 纳米抗体连接, 将抗 MERS-CoV 纳米抗体和抗 SARS-CoV 纳米抗体进行连接, 分别构建了抗 MERS-CoV 双表位抗体以及抗 MERS-CoV 和抗 SARS-CoV 双特异性抗体, 并同样通过 ELISA、生物膜层干涉技术、假病毒中和试验评价了他们的生物学功能, 结果显示, 经改造后的抗体分别保留着连接前各部分抗体的生物学功能, 证实改造是可行的, 为发展抗 MERS-CoV 和抗 SARS-CoV 治疗药物奠定了基础, 为发展多功能抗体提供了一种策略。

**关键词：**冠状病毒；受体结合域；中和抗体；纳米抗体；抗体改造

## Abstract

Coronaviruses continuously and severely threaten people's health due to their fast transmission and bad results after infection. Up to date, there are three outbreaks of coronaviruses, which are severe acute respiratory syndrome caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) in 2003, Middle East respiratory syndrome caused by Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) in 2012 and coronavirus disease 2019 (COVID-19) by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in 2019. Unfortunately, only vaccines against SARS-CoV-2 are available now. There is neither special drug nor vaccine against SARS-CoV and MERS-CoV.

Application of neutralizing antibody is an effective strategy of prevention and control of infectious diseases. The receptor-binding domain, RBD, in the spike protein of coronavirus, can strongly elicit protective antibody in vivo, and thus is an important target for monoclonal antibody or even vaccine research. Currently, there are many researches of monoclonal antibody against SARS-CoV and MERS-CoV, including human antibody, mouse antibody and humanized antibody. Nanobody is the smallest known antibody that can bind to antigen at present. Retaining high affinity and specificity against antigen, nanobody has the advantages of small molecular weight, easy to prepare, low immunogenicity and strong tissue permeability. It can be used for treatment of many diseases and thus has an extensive application prospect. There is little research about nanobody against MERS-CoV and none against SARS-CoV. Therefore, we performed a study of neutralizing nanobodies against MERS-CoV and SARS-CoV targeting their RBD.

**1. Study of neutralizing nanobody against MERS-CoV.** In order to screen neutralizing nanobody against MERS-CoV, four rounds of bio-panning from MERS-CoV-RBD-specific nanobody library were performed using MERS-CoV S1 and S protein. After that, three nanobodies with high binding activity were identified. Using ELISA and bio-layer interferometry, a nanobody that recognized different epitope from NbMS10 (NbMS10 was a nanobody against MERS-CoV identified previously), designated M34, was identified and expressed and prepared using protokaryon and eukaryon expression system. The binding affinity between M34 and MERS-CoV S1 was measured using bio-layer interferometry ( $K_d=222$  pM). MERS-CoV pseudovirus neutralization assay was performed to evaluate the neutralizing activity of M34 ( $IC_{50}=15.2$  ng/mL). Competitive ELSIA verified that M34 bound to MERS-CoV RBD in competition with DPP4. Further study showed that M34 blocked the binding between MERS-CoV RBD and DPP4 by flow cytometry and cell-cell fusion. Finally, molecular

---

modeling and docking analysis was performed to predict the interface structure of M34 binding to MERS-CoV RBD, which suggested that a hydrogen bond might form between the residue G54 in M34 and residue Y523 in RBD to realize the interreaction.

**2. Study of biparatope neutralizing antibody against MERS-CoV.** To reduce the possibility of virus mutation when single antibody was used, the MERS-CoV nanobody M34 was linked with another nanobody NbMS10 identified previously by a short peptide. A biparatope antibody was constructed and expressed by eukaryon expression system. The binding activity between the biparatope antibody and MERS-CoV S1 was detected by ELISA. The binding affinity was measured using bio-layer interferometry ( $K_d=36$  pM). The neutralizing activity was evaluated using pseudovirus neutralization assay ( $IC_{50}=11.1$  ng/mL). The results showed that the biological function such as affinity and neutralizing activity of the biparatope antibody was not infected. In stead, it gained neutralizing ability against D539A or D539N mutant MERS-CoV pseudovirus.

**3. Study of neutralizing nanobody against SARS-CoV.** For the screening of neutralizing nanobody against SARS-CoV, alpacas was immunized with SARS-CoV RBD. After immunization, the peripheral blood mononuclear cells were isolated for the construction of phage-displayed nanobody library. Four rounds of bio-panning from the library were performed using SARS-CoV RBD and S1. Four nanobodies were identified using ELISA and the highest binding activity nanobody, designated S14, was selected for further study. The binding affinity was measured using bio-layer interferometry ( $K_d=143$  pM). The neutralizing activity was evaluated using pseudovirus neutralization assay ( $IC_{50}=10.7$  ng/mL). Competitive ELISA verified that S14 bind to SARS-CoV RBD in competition with ACE2. Flow cytometry revealed that S14 took effect by blocking the binding between SARS-CoV RBD and ACE2. Finally, molecular modeling and docking analysis was performed to predict the interface structure of S14 binding to SARS-CoV RBD, which suggested that hydrogen bonds might form between the residue S33 and P99 in S14 and residue R449 in RBD to realize the interreaction.

**4. Study of bispecific antibody against MERS-CoV and SARS-CoV.** For the multiple functions of antibody, by linking S14 with NbMS10 using a short peptide, a bispecific antibody against MERS-CoV and SARS-CoV was constructed and expressed using eukaryon expression system. ELISA was performed to determin the binding activity between the bispecific antibody and MERS-CoV S1 or SARS-CoV S1. The binging affinity was measured using bio-layer interferometry (the  $K_d$  is 116 pM and 155 pM, respectively). The neutralizing activity was evaluated using pseudovirus neutralization assay (the  $IC_{50}$  is 7.00 ng/mL and 13.7 ng/mL, respectively). The results showed that the biological function such as affinity and neutralizing activity of the bispecific antibody was not infected. It gained the ability of neutralizing both MERS-CoV and SARS-CoV pseudovirus.

---

This study aimed at exploring the specific nanobody against MERS-CoV and SARS-CoV targeting their RBD via phage display technology. After four rounds of bio-panning, nanobodies against MERS-CoV or SARS-CoV were identified respectively. Their biological function was evaluated using ELISA, bio-layer interferometry and pseudovirus neutralization assay. Their neutralization mechanism was investigated using competitive ELISA, flow cytometry and cell-cell fusion. Via gene engineering, a biparatope antibody against MERS-CoV and a bispecific antibody against MERS-CoV and SARS-CoV were constructed by linking nanobodies of different epitope against MERS-CoV and by linking nanobody against MERS-CoV and nanobody against SARS-CoV, respectively. And their biological function was evaluated using the same methods, including ELISA, bio-layer interferometry and pseudovirus neutralization assay. The results showed that the reconstructed antibodies kept the biological function before they were reconstructed. It proved that the antibody reconstruction was successful, which laid the foundation of developing therapy against MERS and SARS and provided a strategy of development of multi-function antibody.

**Key words:** Coronavirus, receptor-binding domain, neutralizing antibody, nanobody, antibody reconstruction

## 前言

2020 年是极具灾难性的一年，新型冠状病毒肆虐着全球，给全球人民带来了巨大的经济损失，人民的生命健康受到巨大威胁，甚至造成某些国家的动荡不安。事实上，这并不是冠状病毒第一次引起全球大流行，早在 2003 年，严重急性呼吸综合征冠状病毒（Severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV）便引起过全球大流行；时隔 9 年，另一种新的冠状病毒——中东呼吸综合征冠状病毒（Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV）再次严重地威胁着人类的生命健康，其致死率甚至高达 35%。时至今日，尽管新型冠状病毒疫苗已经研发成功，然而针对 SARS-CoV 和 MERS-CoV 依然没有特效药和可用的疫苗。未来，冠状病毒仍将是人类的一大威胁，因此对冠状病毒进行深入的研究，对于人类应对现阶段依然存在的 MERS-CoV 和 SARS-CoV-2 以及未来可能出现的其他高致病性冠状病毒具有十分重要的意义。

### 一、冠状病毒

#### 1、简介

冠状病毒粒子在电镜下外形酷似皇冠，因而这一类病毒根据形态学被命名为冠状病毒。冠状病毒是一类有包膜的非节段单正链 RNA 病毒，具有所有已知 RNA 病毒中最大的基因组（26.4-31.7kb）<sup>[1]</sup>。其宿主广泛，能够感染包括人、牛、猪、猫、犬、禽等多种动物，并引起上呼吸道、胃肠道、肝脏和中枢神经系统疾病等不同程度的病症。在人类和家禽中，冠状病毒主要引起上呼吸道感染，而猪和牛的冠状病毒主要引起肠道感染<sup>[2]</sup>。目前已知有七种冠状病毒感染人类并引起呼吸道疾病。

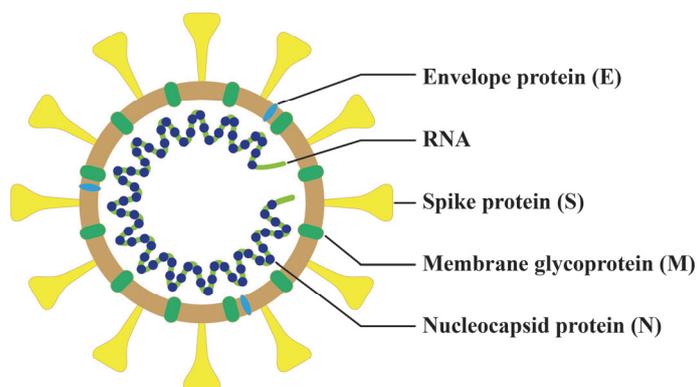


图 1 冠状病毒结构示意图<sup>[3]</sup>

## 2、冠状病毒的分类

冠状病毒属于冠状病毒科、冠状病毒属，主要分为 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 和 $\delta$ 四个属。 $\alpha$ 属包含人冠状病毒 229E、NL63，与普通感冒相关。 $\beta$ 属分四个群：A 群含人冠状病毒 OC43，与呼吸道感染相关；B 群含人冠状病毒 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2；C 群含人冠状病毒 MERS-CoV；D 群含蝙蝠冠状病毒 HKU9。 $\gamma$ 、 $\delta$  属仅感染动物，尤其是禽类。

## 3、冠状病毒的结构

$\beta$  冠状病毒属的六个功能性开放阅读框从 5' 到 3' 分别为：复制酶（ORF1a/ORF1b）、刺突蛋白(Spike, S)、包膜蛋白(Envelop, E)、膜蛋白(Membrane, M)和衣壳蛋白(Nucleocapsid, N)<sup>[4]</sup>。此外，七个推测的编码辅助蛋白的开放阅读框分散在结构基因之间。

病毒的包膜有三种蛋白质成分：S 蛋白、E 蛋白和 M 蛋白。S 蛋白通常组成三聚体<sup>[5]</sup>，在病毒表面形成凸起。其胞外域构成了 S 蛋白的大部分，在 C 端的一小部分构成了跨膜域和胞内段。S 蛋白单体在糖基化之前分子量在 128~160 kDa，糖基化后分子量在 150~200 kDa<sup>[6]</sup>。S 蛋白可以被胰蛋白酶样宿主蛋白切割成大小大致相等的两种多肽，即 S1 和 S2。通常，S1 介导病毒与宿主受体的结合，S2 介导膜融合，二者共同完成病毒的入侵。

M 蛋白是冠状病毒中最丰富的成分<sup>[7]</sup>，它是一种多聚膜蛋白，一部分在病毒外部，一部分在内质网内腔中<sup>[6]</sup>。

E 蛋白是一种多肽，分子量在 8.4~12 kDa 之间。E 蛋白在病毒组装过程中所起的作用仍然不很清楚。它可能诱导内质网-高尔基体中间区室的膜弯曲，或者在病毒颗粒出芽过程的最后阶段夹断其颈部<sup>[8]</sup>。

## 二、中东呼吸综合征冠状病毒

### 1、简介

2012 年一种新型冠状病毒首次从沙特阿拉伯王国一名死于病毒性肺炎的患者的呼吸道分泌物中分离出来，在荷兰鹿特丹伊拉斯姆斯大学医学中心（Erasmus medical center, EMC）获得其基因组序列<sup>[9]</sup>，称为 HCoV-EMC。后来国际病毒分类委员会的冠状病毒研究小组将其命名为中东呼吸综合征冠状病毒（Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV）<sup>[10]</sup>。截止到 2021 年 2 月底，据 WHO 官方网站（<http://www.emro.who.int/health-topics/mers-cov/mers-outbreaks.html>）显示，全球累计报告 2567 例实验室确诊病例，其中有 882 例死亡病例，死亡率高达 34.4%。

## 2、流行病学

尽管大多数 MERS 病例被认为是人-人传播，但 MERS-CoV 在人与人之间传播似乎受限，除非是密切接触<sup>[11]</sup>，常见于社区或医疗保健相关的疫情<sup>[12][13][14][15]</sup>。单峰驼被认为是 MERS-CoV 的动物宿主，一项研究表明从一个致命感染的人和他的骆驼体内分离出的 MERS-CoV 全基因组序列是相同的<sup>[16]</sup>。骆驼工人中，特别是在沙特阿拉伯，MERS-CoV 感染率很高<sup>[17]</sup>。骆驼和人类分离株的 MERS-CoV 基因的系统发育树分析表明，这些病毒相同或高度相似<sup>[18][19][20]</sup>。此外，在阿曼、加那利群岛的骆驼血清中检测到 MERS-CoV 抗体<sup>[21][22][23]</sup>，在埃及、突尼斯和塞内加尔同一居住区与骆驼接触的家畜血清中也检测到了 MERS-CoV 抗体<sup>[24][25]</sup>。

## 3、刺突蛋白（Spike protein, S 蛋白）及其受体

MERS-CoV S 蛋白介导病毒与细胞受体的识别，其分为 S1 和 S2 两个亚基<sup>[26]</sup>。S1 亚基与细胞受体结合，而 S2 亚基介导膜融合。S1 亚基与受体的结合主要在 S1 亚基 C 端 367-606 位氨基酸<sup>[26]</sup>，称为受体结合域（Receptor-binding domain, RBD）。在膜融合之前，S 蛋白在病毒表面呈现为天然的三聚体结构。在膜融合过程中，S2 与 S1 分离，七肽重复序列（HR1 和 HR2）形成六螺旋束融合核心，暴露插入宿主膜的疏水融合肽，使病毒和宿主膜接近并融合<sup>[27]</sup>。S 蛋白能够诱导机体产生中和抗体<sup>[28]</sup>，是目前研究 MERS-CoV 中和抗体的主要靶点。

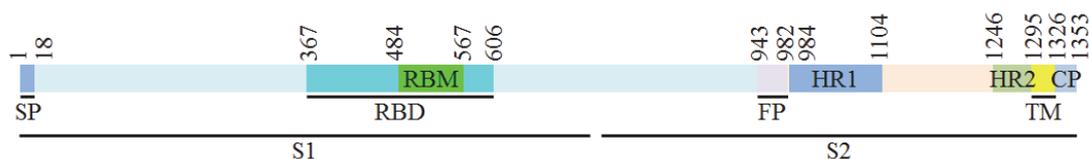


图 2 MERS-CoV S 蛋白结构示意图<sup>[29]</sup>

SP: 信号肽 (signal peptide); RBD: 受体结合域 (receptor-binding domain); RBM: 受体结合基序 (receptor-binding motif); FP: 融合肽 (fusion peptide); HR: 七肽重复序列 (heptad repeat); TM: 跨膜区 (transmembrane domain); CP: 胞内区 (cytoplasm domain)。

人类和蝙蝠来源的二肽基肽酶 (Dipeptidyl peptidase 4, DPP4) 是 MERS-CoV 的功能性受体<sup>[30]</sup>。DPP4 是一种多功能 766 个氨基酸长度的 II 型跨膜糖蛋白，以二聚体形式存在于细胞表面。它优先从激素和趋化因子中分离脯氨酸残基后的二肽，从而调节其生物活性<sup>[31]</sup>。DPP4 还通过降解肠促胰岛素而在糖代谢中发挥重要作用，并进一步参与 T 细胞活化、趋化调节、细胞粘附、凋亡和致瘤性调节。DPP4 在非纤毛支气管上皮细胞上的表达以及在肾脏中的表达与 MERS-CoV 感染的临床表现一致。

## 4、MERS-CoV 单克隆抗体研究现状

中和抗体在各种病毒感染和癌症治疗中已被证明具有显著的临床应用能力，尤其是在用单克隆抗体鸡尾酒疗法治疗埃博拉的工作中<sup>[32]</sup>。目前已报道的单克隆中和抗体均靶向 S 蛋白，大多数靶向于 RBD。

#### (1) 人源单克隆抗体

Ying Tianlei 等<sup>[33]</sup>借助噬菌体展示技术，利用 40 个健康人的外周血单个核细胞 (PBMC) 建立了大库容非免疫抗体文库 ( $10^{12}$ )，并以 MERS-CoV RBD 蛋白为抗原进行了四轮筛选，从 12 个阳性克隆中挑选了亲和力较好的 3 株抗体——m336、337 和 338。转换为 IgG1 后，通过 Biacore 测得此三株抗体与 RBD 的平衡解离常数分别为 4.2、9.3、15 nM，亲和力分别达到了 99、820、560 pM。其中，m336 活病毒半数中和浓度为 0.07  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。通过检测这些抗体与 S 蛋白片段 (S18-725、S18-353、S358-588、S377-588、S377-662、S726-1295) 之间的反应性发现，3 株抗体识别表位均位于 RBD 区，尤其是 377-588 区。通过与突变 RBD 蛋白进行 ELISA 发现，m336 与 L506A、D510A、E536A、D539A、W553A 和 V555A 的结合显著降低；m337 与突变株 L506A、D510A、E553A 和 V555A 的结合显著降低；m338 与突变体 D510A 和 W553A 的结合显著降低。以此数据及现有的 RBD 晶体结构信息进行分子对接，以序列相似性最高、匹配最佳的已知模板进行建模，展示了抗体和受体结合位点的重叠之处及抗体-RBD 之间的相互作用。

Chen Zhe 等<sup>[34]</sup>以 MERS-CoV 康复者 B 细胞建立了 Fab 噬菌体抗体库，并从中筛选到一株人源 Fab 抗体 MCA1，并将其转化为 IgG1 抗体，其在 0.39  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度下能完全抑制病毒的复制。在暴露前和暴露后的被动免疫治疗均能够改善普通狨猴的预后，减少肺组织病理损伤和病毒复制。他们对 MCA1/RBD 复合物进行了结晶，在 2.7 Å 的分辨率下解析了其结构，发现该抗体 6 个互补决定区全部围绕着 RBD 上的受体结合位点 (Receptor-binding site, RBS)，两者形成直接接触，RBS 上的表位由  $\beta 7$  链上的 D539、Y540、R542 和 Q544 组成，长环为 E536 和 W535，短环为 D510。

Davide Corti 等<sup>[35]</sup>从 MERS 病人血浆中提取浆细胞，将其永生后使用假病毒和 ELISA 对细胞上清进行筛选，并成功筛选到一个 MERS-CoV 特异性浆细胞，该细胞分泌的抗体 LCA60 均有较好的中和活性，其假病毒半数抑制浓度为 10 ng/mL。针对 London1/2012、EMC/2012 等病毒株，其半数抑制浓度在 0.11~0.279  $\mu\text{g}/\text{mL}$  之间。通过表面等离子共振技术测得其解离平衡常数为 0.12 nM，其与 RBD 的亲和力比 RBD 与 CD26 的亲和力高出 50 倍。使用噬菌体抗体压力选择的单克隆抗体抗性突变体 P547S (1E9)、R542G (1F8)、Y540H (3C12) 和 L506F/T512A (3B12) 对 LCA60 测试，这些突变体被映射到 RBD 中的三个不同区域，它们都能被 LCA60 中和。以 LCA60 为压力对病毒进行三轮选择，获得 2 个独立抗性突变体，两者均

携带两个相同突变——V33A 和 E536A。为了解析 LCA60 的识别表位，他们首先通过同源建模预测了 LCA60 的三级结构，然后利用分子对接，从单个组分的分离结构预测 RBD 和 LCA60 复合物的三维结构。根据模型预测结果，他们设计了 14 个横跨 RBD 不同区域的 S 蛋白突变体，包括上述选择压力突变，然后检测 LCA60 与表达全长 S 突变体蛋白的细胞的结合能力。结果表明，LCA60 与 T489A、K493A 和 E565A 不结合，与 E536A 结合不良。表面等离子体共振交叉竞争实验结果表明，LCA60 通过阻断 MERS-CoV 与细胞受体的结合而中和 MERS-CoV。随后他们用腺病毒载体建立的表达人 DPP4 的 MERS-CoV 小鼠感染模型来评价 LCA60 的保护作用，结果表明在暴露前 1 天或暴露后 1 天，LCA60 治疗可以使小鼠在第三天病毒载量下降 2~4 log，而在第五天几乎所有小鼠检测不到病毒。该抗体不能有效预防上述突变体病毒（E536，V33），后者其在模型小鼠体内复制水平与 EMC 亲本病毒相当。

Jiang Liwei 等<sup>[36]</sup>利用磁珠激活细胞分选法和荧光激活细胞分选法从酵母展示的人单链抗体可变区片段非免疫文库中筛选到 14 株抗体，并对其中中和活性较好的 MERS-4 和 MERS-7 进行重点研究。其假病毒半数抑制浓度分别为 0.37 nM 和 63.96 nM，而活病毒半数抑制浓度分别为 3.33 nM 和 13.33 nM。他们评估这两种单克隆抗体对表达 MERS-CoV S 蛋白的细胞和表达 DPP4 受体的细胞之间形成合胞体的抑制作用，发现 MERS-4 最有效且能完全抑制合胞体形成。中位效应分析法提示 MERS-4 和 MERS-7 之间存在协同效应，提示它们识别不同的表位。他们设计了 14 个突变的 MERS-CoV 假病毒，来预测两株抗体的识别表位。他们发现，D455A、E513A 和 R542A 突变增加了假病毒对 MERS-4 的抗性，而对 MERS-27 的抗性影响很小。另外一些突变 Y499A、R511A 尤其是 W553A 则导致假病毒对 MERS-4 和 MERS-27 的中和作用更加敏感。然后将上述三个突变氨基酸（D455A、E513A 和 R542A）在已解析的 RBD 晶体结构上进行标识，发现三者形成一个三角形且位于 RBD 和受体 DPP4 相互作用面的中心。

Tang Xianchun 等<sup>[37]</sup>依次以含 S 蛋白的顺磁性脂蛋白体和表达 S 蛋白的 293T 细胞对人单链抗体可变区片段非免疫噬菌体库进行筛选，得到 7 株代表性抗体（3B11、1E9 等）。通过检测这些抗体与不同的截短的 S1 蛋白的反应性，发现所有 7 个抗体的表位均位于 S 蛋白的 349-590 氨基酸片段内，该片段含有 MERS-CoV 的 RBD。竞争性结合实验表明 1E9 识别一个独特的表位（第 1 组）；1F8、3A1 和 3B12 识别另一个表位或相互重叠的表位（第 2 组）；3B11、3C12 和 M14D3 识别第三个不同的表位或表位组（第 3 组）。此外，第 2 组抗体能阻断其余所有抗体与 RBD 结合的能力表明表位 2 最有可能位于 RBD 中心，而表位 1 和表位 3 则位于侧翼。他们将这些 scFv 进行了 IgG1 转化，结果发现这种转化对他们与 S1

的结合率的影响是不同的：这种转化使 3A1、3B12 和 M14D 的  $K_d$  高出 11~34 倍，而使其余抗体的  $K_d$  降低。接着他们用假病毒和活病毒评价了他们的中和活性，结果显示 3B11、3A1、3B12 和 3C12 具有较强的中和活性，其  $IC_{50}$  值在 1.25~2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  之间。他们发现，抗体中和病毒的效力与抗体的亲和力呈正相关。通过 Octet 技术，他们发现所有单链抗体都能阻段 S1(349-590)-hFc 与 hDPP4 蛋白或表达 hDPP4 蛋白的 293T 细胞的结合，同样 DPP4 蛋白也能阻断单链抗体与 S1(349-590)-hFc 的结合。为了研究中和抗体压力下病毒的进化，他们对所有 7 个单链抗体和 3 个全长 IgG1 抗体进行了病毒逃逸研究。在每个抗体单独存在的情况下，经过三轮选择，除了 3B11-IgG1 全长抗体外，其余抗体均产生了逃逸突变体。经过空斑纯化及 S 蛋白编码区域测序，他们发现除了 1F8-IgG1 的突变株的突变部位位于 S2，其余突变株的突变部位均为 RBD 中 RBM 与 hDPP4 结合的 patch2 区，这些突变与前述的抗体竞争性研究相呼应，进一步证实了三个表位（组）的存在。他们依此设计了 7 个 RBD 突变体，并进行了 Octet 分析，发现 S1 特异性抗体与大多数 RBD 突变体的亲和力均有明显地降低。他们进一步利用空斑减少中和试验研究了抗体对突变株的交叉中和能力，结果表明，大多数从一个抗体表位群产生的逃逸病毒对同一抗体表位群内的中和反应具有抵抗力，但对不同的抗体表位群没有抵抗力。通过分析突变对 RBD 与 hDPP4 亲和力的改变以及突变株在 Vero 细胞中增值效率与野生株相比较，发现多数逃逸突变会导致病毒的适应能力下降。他们对 RBD-hDPP4 接触界面进行了分析，认为病毒的这些突变会改变 RBD 的局部构象，进而导致其与 hDPP4 的亲和力下降。

Kristen E. Pascal 等<sup>[38]</sup>借助 VelocImmune 技术平台（表达人抗体可变区重链和  $\kappa$  轻链的转基因小鼠平台），以编码 S 蛋白的 DNA 和纯化的 S 蛋白免疫转基因小鼠，用常规杂交瘤方法和 B 细胞分选技术采集脾脏并分离单克隆抗体，筛选到两株高亲和力单克隆抗体——REGN3051 和 REGN3048，其平衡解离常数为 43~48 pM，活病毒半数抑制浓度分别为 460 pM 和 180 pM。他们对 2012~2013 年 NCBI 上的录入的 MERS-CoV S 蛋白序列进行比对分析，确定了七种不同氨基酸突变株——A431P、S457G、S460F、A482V、L506F、D509G 和 V534A。REGN3051 能够中和上述七种 S 蛋白突变型假病毒，REGN3048 类似，仅 V534A 表现出对 REGN3048 的部分抗性，而此突变仅在一个 MERS-CoV 分离株（Riyadh\_2）中观察到，后者是 MERS-CoV 进化树的一个死分支的一部分。他们使用 VelociGene 技术将 79 kb 的小鼠 DPP4 基因替换为 82 kb 的人类同源基因，结果小鼠在调控元件的控制下完全表达人 DPP4，维持了正常的表达调控和组织分布。使用该模型小鼠评价该抗体时发现，在攻毒前注射 200  $\mu\text{g}/\text{只}$  的 REGN3051 或 REGN3048 均能显著降低肺内 MERS-CoV 特异性 RNA 水平；在感染后 24 小时注射也能降低小鼠肺部

的病理变化。

## (2) 鼠源单克隆抗体及其人源化改造抗体

Li Yan 等<sup>[39]</sup>以 MERS-CoV 重组蛋白免疫小鼠, 通过杂交瘤技术获得 2 株单克隆抗体 (4C2 和 2E6), SPR 测得其平衡解离常数分别为 162 nM 和 60.3 nM。活病毒半数中和浓度分别为 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 1.56  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。Octet 分析显示 4C2 和 2E6 相互竞争结合到 MERS-CoV RBD 上, 表明两个单克隆抗体可能识别相近的表位或重叠的表位。他们分别为 4C2 和 2E6 制备了 Fab/MERS-CoV RBD 复合物, 并进行了广泛的结晶筛选。然而, 他们无法使 2E6/MERS-CoV RBD 复合物结晶, 仅获得了 4C2/MERS-CoV RBD 复合物, 并以 2.4 Å 的分辨率解析了复合物的结构, 发现 4C2 通过强烈的空间阻位和竞争 hCD26 界面残基来干扰 RBD 与 hCD26 的相互作用。他们接着制定了人源化策略: 第一, 找到与 4C2 序列一致性最高的人抗体; 第二, 保留所有 4C2 界面残基。他们以抗恶性疟原虫裂殖子表面蛋白 3 (aPFP3) 为模板将 4C2 进行了人源化改造, 名为 4C2h。与 4C2 相比, 4C2h 与 MERS-CoV 的亲合力并无明显改变, 其半数中和浓度为 1.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。他们使用腺病毒转导的小鼠模型评价该人源化抗体, 在攻毒前一天或后一天静脉注射单剂量抗体, 并在感染后 3 天和 5 天监测肺内病毒滴度, 结果表明 4C2h 无论是在预防还是治疗方面都具有较好的效果。

Du Lanying 等<sup>[40]</sup>以 MERS-CoV S1 重组蛋白免疫小鼠 3 次, 借助杂交瘤技术筛选到一株高亲和力抗体, Mersmab1。通过测定经 DTT 处理的 MERS-CoV RBD 蛋白与 Mersmab1 的反应性, 发现 Mersmab1 通过识别 RBD 上的构象表位与 MERS-CoV-RBD 结合。突变 RBD 株 L506A、D510A、R511A、E513A 和 W553A 与 Mersmab1 的反应性大幅下降。其中 R511A 突变株更是完全丧失了与 Mersmab1 的结合能力。而 D539A、E536A 和 E565A 突变则不影响 Mersmab1 与 RBD 的结合。接着, 他们将 Mersmab1 可变区基因构建到 pRBO/Ig 载体上, 该载体含人 IgG1-Fc 和  $\kappa$  链恒定区基因, 表达形成人源化抗体 hMS-1<sup>[41]</sup>, 其半数中和浓度为 3.34  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。通过突变 RBD 和突变假病毒证实 RBD 的 R511 残基是 hMS-1 识别的一个关键中和表位。在致死剂量感染下, hMS-1 能够保护 hDPP4 转基因小鼠免于死亡。

Wang Lingshu 等<sup>[42]</sup>设计了五种疫苗结构, 包括 3 种核酸和 2 种蛋白: ①编码 S 蛋白全长的 DNA; ②编码剔除了跨膜区、包含整个胞外段的 DNA; ③编码 S1 亚基的 DNA; ④剔除跨膜区、包含整个胞外段的蛋白; ⑤S1 蛋白。对此五种疫苗进行不同组合设计了八种免疫方案。他们使用产生中和抗体效果最好的免疫方案, 即 S-DNA 初免、S1 蛋白加强免疫的方式免疫小鼠, 制备了杂交瘤细胞, 并最终筛选出 4 个中和活性较好的单克隆抗体: D12、F11 识别 S1 亚基的 RBD, G2 识别

S1 亚基 RBD 之外的区域, G4 识别 S2 亚基。抗体的细胞吸附实验提示, RBD 在全长 S 蛋白和截短的蛋白中的构象可能不同, S2 在细胞膜上独立表达的构象为融合后构象, 而非 S 蛋白在自然状态下的构象。流式细胞术试验结果与其一致。他们分别用假病毒和活病毒对抗体进行了评价, 发现假病毒比活病毒敏感 10 倍。在所有免疫方案中, 单纯的蛋白质的免疫诱导的中和抗体主要靶向 RBD。S-DNA 免疫主要诱导 IgG2a 亚型抗体, S1 蛋白免疫主要诱导 IgG1 亚型抗体。这种亚型反应模式似乎是由初次免疫决定的, 因为 S-DNA 初次免疫、S1 加强免疫与单纯的 S-DNA 免疫方案诱导的亚型相似, 均为 IgG2a 偏倚。IgG2a 和 IgG1 亚类反应分别反映了小鼠体内 Th1 细胞和 Th2 细胞偏倚的免疫反应模式。由含 DNA 方案引起的 IgG2a 或 Th1 偏倚可能是由于能产生  $\gamma$  干扰素的 CD8 T 细胞的诱导作用, 后者调节 CD4 T 细胞分化。免疫荧光显示, 四种单抗均能结合活病毒感染的细胞。蛋白竞争中和实验结果与细胞吸附试验的结果一致。F11 对 Bisha1 毒株 (D509G) 中和作用消失, 对引入 D509G 突变的野生 England1 假病毒株的中和作用也消失, ELISA 也显示 F11 与 RBD 509G 的结合力丢失; 而这些改变对 D12 无影响。对 D12 的 Fab 形式与 RBD 复合物进行结晶分析, 发现无论是单独还是与 DPP4 结合状态, England1 株 RBD 与 EMC 株的 RBD 几乎相同, 两者一级结构只有一个氨基酸差异 (F506L)。W535 和 E536 结合于 DPP4 的保守区域, 其突变导致 RBD 与 D12 的结合能力丧失。EMC 毒株的 532 位丝氨酸突变为脯氨酸或色氨酸时会逃逸 D12 的中和。定点突变和竞争结合研究显示, F11 在 D12 结合位点的对侧、残基 509 处及附近与 RBD 接触。竞争结合研究还显示 D12 和 F11 可以同时与 RBD 结合, 表明两者可能存在加性中和效应。对非人灵长类用 S-DNA 或 S1 蛋白初次免疫、S1 蛋白加强免疫产生抗体滴度最高。在加强免疫后 19 周对其用 JordanN3 毒株进行攻毒实验, 与未免疫组相比, 肺浸润峰时间提前, 峰值减小。

Chen Yingzhu 等<sup>[43]</sup>以重组 S 蛋白免疫小鼠, 借助杂交瘤技术, 从 37 个克隆中筛选到 9 株 S 蛋白的结合性抗体, 5 个 (1F4、3A2、4A6、4F8 和 4C5) 结合 RBD, 1 个 (1B5) 结合 S2, 3 个 (5F9、2B4 和 7D7) 结合 NTD, 通过中和试验选择活性较好的 NTD 结合单抗 5F9 作进一步研究。通过 SPR 测得 5F9 与 NTD 的平衡解离常数为 5.42 nM, 假病毒和活病毒半数中和浓度均约为 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。WB 提示该抗体识别的表位可能为线性表位。他们设计了一系列多肽, 但与 5F9 结合能力均很弱, 因此其具体识别区域未明确。他们认为, MERS-CoV 的 NTD 是糖基化的, 5F9 可能结合到聚糖上或 NTD 的其他氨基酸残基上, 固定了 S 蛋白和 S1-S2 相互作用的融合前构象, 从而排除了 DPP4 和/或共受体诱导的膜融合所需的构象变化。

### (3) 纳米抗体

我们前期以 MERS-CoV RBD 蛋白免疫羊驼, 建立了特异性纳米抗体库, 并从

中筛选到一株中和活性较好的纳米抗体 NbMS10<sup>[44]</sup>。为了克服纳米抗体半衰期的短的缺点,在纳米抗体的 N 端融合表达 IgG1-Fc,称为 NbMS10-Fc。通过 SPR 测定 NbMS10 与 RBD-Fc 的平衡解离常数为 0.87 nM, NbMS10-Fc 和 S1 的平衡解离常数为 0.35 nM。两者对 EMC2012 毒株的半数中和浓度的依次为 3.52  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 2.33  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。流式细胞术试验提示两种抗体均以剂量依赖的方式显著阻断 RBD 与细胞表面 DPP4 的结合。ELISA 也得到一致的结果。通过 ELISA 测定一系列突变 RBD 蛋白与两种抗体的反应性发现, D539A 突变 RBD 蛋白不能与抗体结合,表明 RBD 残基 Asp539 在抗体的结合中起重要作用。假病毒中和试验进一步验证了这一结果。以 DTT 处理 RBD,通过 ELISA 检测发现该抗体识别 RBD 上的构象表位。随后我们又进行了结构建模来分析抗体、DPP4 和 RBD 之间的竞争性作用关系,发现该抗体与 RBD 上一个包含 Asp539 的区域紧密结合,从而阻止了 RBD 与 DPP4 的结合。我们研究了该纳米抗体对不同 MERS-CoV 分离株的假病毒交叉中和活性,两种抗体均能有效中和多个 MERS-CoV 假病毒,  $\text{ND}_{50}$  值分别在 0.003~0.979  $\mu\text{g}/\text{mL}$  之间和 0.003 到 0.067  $\mu\text{g}/\text{mL}$  之间。为了评价该纳米抗体在小鼠体内的半衰期,我们将抗体注射到小鼠体内,收集不同时间间隔的血清,然后用 ELISA 检测纳米抗体浓度。结果显示, NbMS10 在体内浓度迅速下降,而与 Fc 融合的 NbMS10-Fc 则能长时间(10 天)保持高浓度,且能在攻毒前 3 天、1 天和攻毒后 3 天保护受致死剂量感染的小鼠免于死亡,表明该抗体具有很好的预防和治疗效果。

本课题在此基础上使用 MERS-CoV S 和 S1 蛋白对 MERS-CoV RBD 特异性抗体库重新进行了筛选,对筛选到的纳米抗体通过 D539A 突变假病毒中和试验、抗体竞争性 ELISA、生物膜层干涉技术鉴定出一株识别表位不同的纳米抗体,命名为 M34。通过 ELISA 发现 M34-Fc 与 MERS-CoV S1 蛋白有较好的反应性,其  $\text{EC}_{50}$  为 8.28  $\text{ng}/\text{mL}$ 。通过生物膜层干涉技术测得 M34-Fc 与 MERS-CoV S1 蛋白的平衡解离常数为 222 pM,说明两者具有较高的亲和力。M34-Fc 能够较好地中和 MERS-CoV 假病毒,其  $\text{IC}_{50}$  为 15.2  $\text{ng}/\text{mL}$ 。此外,该抗体对不同的突变株假病毒均具有较好的中和活性。我们通过空斑减少中和试验评价了该抗体对 MERS-CoV (EMC2012 毒株)的中和活性,通过计算得到其半数中和浓度为 2.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。为了探究 M34 的中和机制,我们首先通过竞争性 ELISA 发现 M34 与 DPP4 竞争性结合 MERS-CoV RBD,随后通过流式细胞术发现 M34 能够阻断 MERS-CoV RBD 与细胞表面 DPP4 受体的结合。进一步通过 S 蛋白介导的细胞-细胞融合发现 M34 能够抑制合胞体的形成。为了明确 M34 的识别位点,我们制备了 9 个突变 RBD 蛋白(L506A、D510A、R511A、E513A、E536A、D539A、W553A、V555A、E565A),通过 ELISA 分别检测突变蛋白与 M34 的反应性,发现 M34 与这些突变蛋白均具有较好的反应性,说明其识别位点可能不在前述 9 个位点之列。然后我们通过基

因工程的方法,将 NbMS10 与 M34 通过短肽 GGGGS 进行连接,并在其 C 端加上人 IgG-Fc 片段,通过 293T 细胞进行了表达和纯化,得到名为 1034-Fc 的抗体。我们发现改造后的抗体与 MERS-CoV S1 蛋白反应性良好,其  $EC_{50}$  为 10.7 ng/mL;两者之间具有较高的亲和力,其平衡解离常数为 36 pM。通过假病毒中和试验发现该抗体不仅对常见的突变株假病毒具有交叉中和活性,对 D539N/A 突变的假病毒也具有较好的中和活性。最后我们通过人 DPP4 Knock-in 小鼠模型评价了该抗体的体内保护作用。在注射抗体或 PBS 后 6 h,注射 MERS-CoV 假病毒,并在 10 d 后通过荧光素酶底物对小鼠进行成像,结果显示注射了抗体的小鼠其发光强度明显比 PBS 组低,表明该抗体对小鼠能够起到很好的预防作用。

V. Stalin Raj 等<sup>[45]</sup>则用编码 S 蛋白的改良痘苗病毒免疫骆驼,建立了来自骨髓细胞 mRNA 的纳米抗体文库,筛选出具有较高中和活性的纳米抗体 VHH-1、VHH-4、VHH-83 和 VHH-101,空斑减少中和试验测得  $PRNT_{50}$  在 0.0014 至 0.012  $\mu\text{g/mL}$  之间。他们将这四株纳米抗体转换为 IgG2 亚型抗体,形成嵌合重链抗体 HCAb。嵌合抗体在体外表现出与纳米抗体 VHH 大致相同的中和能力。通过 Octet 测定 VHH 与 S1 结合力,发现所有四个 VHH 竞争一个表位。通过 ELISA 测定 VHH 与一系列突变 S1 蛋白的结合力,发现四株纳米抗体均不与 D539N 突变 RBD 结合,其他不结合的突变株则各有差别:VHH-1 还不与突变体 E536K 结合,而 VHH-4 和 VHH-101 显示与另外三种突变体 I529T、V534A 和 E536K 部分结合。此结果与结合竞争试验结果一致。然后他们选择中和能力最好的 VHH83 进行进一步研究,使用 K18 转基因小鼠模型对其进行评价。攻毒前 6 h 腹腔注射抗体,无关抗体对照组和 VHH83 组体重减轻,第四天肺部观察到大体病理变化,7 天内死亡;而同剂量 HCAb-83 治疗小鼠的肺在任何测试时间点均未显示任何病理变化。他们还探究了 VHH-83 或 HCAb-83 治疗的小鼠血清中的药代动力学。注射抗体 2 天后 VHH-83 或对照 VHH-p2E6 治疗小鼠的血清中未观察到病毒的中和作用。200  $\mu\text{g}$  HCAb-83 治疗的小鼠在治疗 8 天后仍然具有高水平的 HCAb-83,明显的血清半衰期约为 4.5 天。

### 三、严重急性呼吸综合征冠状病毒

#### 1、简介

2002 年 11 月,中国广东省佛山市出现了一例非典型肺炎患者。随后,这种肺炎传播到香港,然后传播到越南、新加坡、加拿大等地方<sup>[46]</sup>。截止到 2003 年 7 月 3 日,全球共报道 8439 例 SARS 病例,其中 812 例死亡<sup>[47]</sup>,病死率为 9.6%。在最初的大流行于 2003 年 6 月结束后,2003 年 9 月至 2004 年 5 月又发生了四次疫情

<sup>[48]</sup>，这四次疫情中有三次与实验室获得性感染相关或可能相关<sup>[49][50]</sup>。“非典”引起的临床表现主要有急性呼吸道疾病、肺炎、腹泻等<sup>[46]</sup>。

## 2、流行病学

研究人员在广东一个活的动物市场中的果子狸、浣熊等动物体内分离到了 SARS-CoV 样病毒<sup>[51]</sup>，说明这些市场上的动物可能是人类感染的源头，于是导致了大规模的扑杀果子狸。然而，随后的研究发现，广州一个动物市场上约 80% 的动物含有显著水平的 SARS-CoV 抗体，然而农场上的果子狸基本上没有感染 SARS-CoV<sup>[52]</sup>，表明野生或养殖的果子狸并没有广泛感染 SARS-CoV。用两种不同的 SARS-CoV 分离株对果子狸进行的实验性感染导致了明显的临床症状，使它们不太可能成为自然宿主<sup>[53]</sup>。通过对在中国的广东、广西、湖北和天津采集的蝙蝠样品（血液、粪便和咽拭子等）进行分析，研究人员认为 SARS 样冠状病毒的自然宿主是蝙蝠<sup>[54]</sup>。

## 3、刺突蛋白（Spike protein, S 蛋白）及其受体

SARS-CoV S 蛋白属于 I 型病毒融合蛋白，呈三聚体结构。S 蛋白前体共包含 1255 个氨基酸，通过与其他冠状病毒 S 序列比对，其各区域预测如下：信号肽（1-12 位氨基酸）、胞外结构域（13-195 位氨基酸）、跨膜结构域（1196-1215 位氨基酸）和胞内结构域（1216-1255 位氨基酸）。S 蛋白在蛋白酶的作用下可以裂解成 S1 和 S2 两个亚基。在适宜浓度下，胰蛋白酶可将 S 蛋白在 667 和 668 位氨基酸之间进行切割<sup>[55]</sup>，组织蛋白酶 L 则可在 678 和 679 位氨基酸之间切割<sup>[56]</sup>，此外 Xa 因子也可以对其进行切割<sup>[57]</sup>。与许多 I 型融合蛋白不同，包括其他冠状病毒的 S 蛋白，SARS-CoV S 蛋白在病毒粒子组装前不被切割<sup>[58]</sup>。



图 3 SARS-CoV S 蛋白结构图<sup>[59]</sup>

SP: 信号肽 (signal peptide); RBD: 受体结合域 (receptor-binding domain); RBM: 受体结合基序 (receptor-binding motif); FP: 融合肽 (fusion peptide); HR: 七肽重复序列 (heptad repeat); TM: 跨膜区 (transmembrane domain); CP: 胞内区 (cytoplasm domain)。

SARS-CoV S 蛋白的受体为血管紧张素转换酶 2 (Angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)<sup>[60]</sup>。S1 亚基的 193 个氨基酸片段 (318 到 510 位氨基酸) 比完整的 S1 结构域 (13-672 位氨基酸) 能更有效地结合 ACE2，而其他小片段 (327-510, 318-490) 则不能与 ACE2 结合<sup>[61]</sup>。Fang Li 等解析了 RBD 与 ACE2 结合的空间结

构<sup>[62]</sup>, RBD 残基 445 至 460 将整个受体结合环(424 至 494 位氨基酸)锚定在 RBD 的核心, 他们将这个环称为受体结合基序(Receptor-binding motif, RBM)。他们还发现 479 和 487 位氨基酸在结合界面起着非常重要的作用。鉴于 RBD 是病毒和其受体相互作用的关键因素, 因此也是病毒宿主范围和向性的决定性因素。

#### 4、SARS-CoV 单克隆抗体研究进展

##### (1) 人源抗体

Jianhua Sui<sup>[63]</sup>等使用 293T 细胞表达了与 Fc 融合的 SARS-CoV S1 蛋白, 然后又从 57 个未免疫供体的 B 细胞构建了两个人非免疫库单链抗体可变区片段(single-chain antibody variable region fragment, scFv)文库, 以 S1 蛋白从文库中筛选特异性单链可变区片段。经过三轮筛选, 通过 ELISA 鉴定, 他们挑取了阳性克隆进行测序分析。选择了 8 个单链抗体可变区片段, 利用大肠杆菌进行了表达和纯化。通过活病毒的中和试验发现, 8 个片段中, 单价的 80R 具有中和活性, 其半数中和浓度低于 7.43 nM, 这表明 SARS-CoV 的中和不需要二价结合。然而, 单价的片段会在血液中快速清除, 于是他们将 80R 与人 IgG1 进行了融合表达, 制成双价的 80R IgG1。80R IgG1 与 S1 蛋白的结合亲和力( $K_d=1.59$  nM)是 80R 的 20 倍( $K_d=32.3$  nM), 同 ACE2 与 S1 蛋白的结合亲和力( $K_d=1.70$  nM)相当。80R IgG1 的半数中和浓度低于 0.37 nM。通过抑制合胞体形成试验, 他们发现 80R 和 80R IgG1 均能阻断 SARS-CoV S 与 ACE2 的结合, 且后者阻断能力比前者强。流式细胞术试验进一步验证了这一点。因此 80R 中和活性的主要机制可能是通过阻断 SARS-CoV S 与 ACE2 的结合。他们对 S1 进行变性、还原、去糖基化操作, 以及使用不同片段的 S1(12-327、261-672), 通过免疫印迹发现, 80R 识别的表位对还原更敏感, 更耐变性, 并且不依赖于糖基化, 定位到 S1 N 端末端的 330 个氨基酸。随后通过进一步的实验, 他们发现预防性地给予 80R IgG1 可以有效地保护小鼠免受 SARS-CoV 感染<sup>[64]</sup>。通过更加截短的 S1 片段, 他们发现 80R 识别的结构域位于 324-503 内。通过一些关键氨基酸的分析, 他们使用一系列突变 S1 蛋白与 80R 反应, 发现 R344、E452、D454、D480 和 T487 有助于 80R 识别 S 蛋白, D463 不影响其识别, 其中 D480 对其识别至关重要。

Ponraj Prabakaran 等<sup>[65]</sup>利用 10 名健康供者外周血 B 细胞构建了人 Fab (Fragment of antigen binding) 噬菌体展示库, 以 SARS-CoV RBD 蛋白为抗原进行了三轮筛选, 并从中选择高亲和力的克隆进行了测序, 发现所有选择的克隆序列均相同, 将其命名为 m396, 并转化成了完全抗体 IgG1 m396。通过表面等离子共振技术测得 Fab 和完全抗体与 RBD 的平衡解离常数分别为 20 nM 和 4.9 pM。IgG1 m396 能有效抑制 S 蛋白介导的细胞融合和假病毒的进入, 其  $IC_{50}$  分别为 0.6  $\mu\text{g/mL}$  和 0.01  $\mu\text{g/mL}$ 。该抗体能够抑制 GD03T0013 分离株进入细胞, 而后者不能

被 80R 和 S3.1 所抑制。该抗体还能够中和从 Urbani 和 Tor2 分离的活病毒, 其  $IC_{50}$  分别为  $0.1 \mu\text{g/mL}$  和  $1 \mu\text{g/mL}$ 。他们解析了 SARS-CoV RBD-Fab m396 复合物的晶体结构, 发现 m396 主要识别 RBD 表面由 10 个残基 (482-491) 构成的  $\beta 6$ - $\beta 7$  环。该环突出于 RBD 表面, 并且与 m396 的互补决定区 H1、H2、H3 和 L3 相互接触。H1 与疏水性残基 Y484、T486、T487 和 G488 相互接触, H2 与 Y491 相互作用, H3 与 Q492 相互作用, L3 则与 R395、I489 等相互作用。

Elisabetta Traggiai 等<sup>[66]</sup>利用改进的 Epstein-Barr 病毒转化法, 将一名 SARS 康复者的记忆 B 细胞永生, 并在体外和体内分离出几种具有高病毒中和活性的单克隆抗体。其中一个名为 S3.1 的克隆产生的 IgG1 抗体能够在  $300 \text{ ng/mL}$  的浓度下中和 75  $TCID_{50}$  的 SARS-CoV, 中和效价比恢复期血清高 300 倍。在小鼠接受  $10^4$   $TCID_{50}$  病毒攻击前给予高剂量的 S3.1 单克隆抗体治疗, 能够观察到小鼠在上呼吸道中病毒的复制明显降低。

Melissa Coughlin<sup>[67]</sup>等使用编码人免疫球蛋白的基因取代了小鼠免疫球蛋白基因, 建立了转基因鼠。他们使用 S 蛋白的胞外域免疫转基因小鼠, 制备了杂交瘤细胞, 并从中筛选出 666 个能够产生与 SARS-CoV S 蛋白有特异性反应抗体的杂交瘤细胞。通过中和试验, 他们发现了 27 个针对 S1 的抗体具有较好的中和活性, 57 个针对 S1 以外的区段也具有较好的中和活性, 其中识别 S1 的大多数抗体与 RBD 反应良好。接着他们对这些抗体进行了纯化和鉴定, 对其进行了测序分析, 推测这些抗体中至少有 8 种不同的结合特异性。

Jan ter Meulen 等<sup>[68]</sup>从非免疫人抗体库中筛选到了一株 IgG1 抗体, 名为 CR3014, 通过电子显微镜观察到该抗体与 SARS-CoV 颗粒的结合。该抗体在体外具有较好的中和 SARS-CoV 的能力, 在体内能够显著降低雪貂肺部的病毒载量, 消除了 SARS-CoV 在咽分泌物中的脱落, 并完全防止了病毒诱导的肉眼可见的肺病理学的发展。通过与截短的 S 蛋白反应, 他们发现 CR3014 特异性结合到 S 蛋白的 1-565 位氨基酸之间<sup>[69]</sup>, 更确切的是 318-510 位氨基酸之间。通过竞争性 ELISA 发现, CR3006、CR3013 和 CR3014 识别相同或重叠的表位, 但亲和力不同。进一步通过与不同突变 RBD 的反应性表明, Y442 和 F360、L472、D480 或 T487 可能对 CR3006 的表位有贡献, N479 可能对 CR3013 和 CR3014 的表位有贡献, 尤其是 CR3014 与 N479S 变体的反应性显著降低, 说明该抗体识别的表位可能是 N479。

Thomas C. Greenough 等<sup>[70]</sup>也使用了人免疫球蛋白转基因小鼠。他们设计并表达了 SARS-CoV S 蛋白的胞外段 (1-1190), 并免疫转基因小鼠, 以此制备了杂交瘤细胞。通过流式细胞术, 他们分选出了 36 个与 S 蛋白 (1-1190) 结合的杂交瘤细胞, 其中 2 个抗体 (MAb201 和 MAb68) 具有较好的中和活性。通过肽序列分

析发现, MAb201 是全人源的 IgG1 抗体, MAb68 是嵌合分子, 具有人重链和鼠轻链。在流式细胞术分析中, MAb201 能够特异性阻断 S590 (1-590) 与 Vero E6 细胞的结合, 而 MAb68 没有这种作用。两个抗体与 S590 (1-590) 的平衡解离常数分别为 34 nM 和 83 nM。通过活病毒中和试验发现两个抗体的 ND<sub>50</sub> 在 1 nM 左右, 且在高浓度 MAb68 的情况下也能观察到微小的细胞病变效应 (CPE) 病灶, 而在高浓度 MAb201 的情况下没有观察到 CPE, 说明后者能够提供完全保护。通过一系列截短的 S 蛋白的免疫沉淀实验发现, MAb68 识别表位在 S 蛋白的 130-150 区域, MAb201 识别的表位在 S 蛋白的 490-510 区域, 两者识别的都是线性表位。他们使用已建立的 SARS-CoV 感染小鼠模型对两个抗体进行了评价, 发现经 MAb201 预防的小鼠的血清能够完全中和病毒, 而经 MAb68 预防的不能。攻毒后 48 h 肺和鼻甲组织中病毒滴度显著减少。此外, 暴露后用 MAb201 可以显著减轻 SARS-CoV 感染的仓鼠模型的病毒载量和病理损伤<sup>[71]</sup>。

### (2) 鼠源抗体

Szu-Chia Lai 等<sup>[72]</sup>以截短的 SARS-CoV S 蛋白 (268-1255) 免疫 BALB/c 小鼠, 四次免疫完成后 5 天取小鼠脾细胞制备杂交瘤细胞, 并用 ELISA 和有限稀释的方法获得了抗 S 抗体的单克隆杂交瘤细胞。经验证, 大部分单克隆抗体为 IgG1 抗体。部分抗体 (编号 1、3、5、7、8) 对病毒具有显著的中和能力 (<10 μg/10<sup>4</sup> pfu/10<sup>5</sup> cells)。进一步通过不同肽段探究这些抗体的识别表位, 他们发现抗体 1、3、5、8 结合到 S 蛋白的跨膜区, 所有的这些抗体均特异性结合一个 15 氨基酸短肽, 该肽位于 S 蛋白的第二个七肽重复区 (HR2) 的顶端, 能够以剂量依赖的方式特异性地抑制中和单克隆抗体和 S 蛋白的相互作用。此外, 中和单克隆抗体也可以以剂量依赖的方式与该肽特异性相互作用。这项研究成果表明, S 蛋白的第二个七肽重复区 (HR2) 可能是研制抗 SARS-CoV 疫苗的良好靶点。

Tong Zhou<sup>[73]</sup>等对 S 蛋白进行了抗原表位预测, 将不同的表位段利用原核表达系统进行了表达, 通过流式细胞术分析发现其中一个短片段 S-II (485-625) 与表达 ACE2 的 Vero 细胞具有较强的结合。然后以该片段免疫 BALB/c 小鼠, 制备了杂交瘤细胞, 并筛选到四个高亲和力的克隆 S26、S34、S78 和 S84。四种单抗能够以剂量依赖的方式抑制 S-II 与 Vero E6 细胞结合, 且都能抑制 SARS-CoV 的感染, 这种中和活性也通过空斑减少中和试验得到证实。通过与截短的 S-II 反应, 他们发现 S26 和 S78 识别位点在 C 末端的 20 个氨基酸之内 (607-627), 而 S34 和 S84 识别 RBD 附近的位置 (548-567)。

### (3) 纳米抗体

我们以 SARS-CoV RBD 重组蛋白免疫羊驼, 通过其外周血单个核细胞建立了 SARS-CoV RBD 特异性纳米抗体库。然后分别以 SARS-CoV RBD 和 S1 蛋白对该

抗体库进行了筛选，最终鉴定出 3 株结合力较高的抗体，并对其  $EC_{50}$  最低 (4.76 ng/mL) 的 S14 进行了进一步研究。通过生物膜层干涉技术测定了 S14 与 SARS-CoV RBD 的亲合力，其平衡解离常数为 143 pM。S14 能够较好地抑制 SARS-CoV 假病毒进入靶细胞，其  $IC_{50}$  为 5.04 ng/mL。随后我们又进一步探究了 S14 的中和机制。首先通过竞争性 ELISA 发现 S14 与 ACE2 竞争性结合 SARS-CoV RBD，通过流式细胞术实验发现 S14 能够阻断 SARS-CoV RBD 与细胞表面 ACE2 受体的结合。为了明确 S14 的识别表位，我们制备了一系列突变 RBD 蛋白(Y442A、L472A、N479A、D480A 和 T487A)，通过 ELISA 鉴定突变 RBD 蛋白与 S14 的反应性。结果发现，S14 与这些突变 RBD 蛋白均具有较好的反应性，说明 S14 的识别表位可能不在前述 5 个位点之列。

## 四、纳米抗体

### 1、简介

1993 年，C.Hamers-Casterman 等<sup>[74]</sup>首次报道了在骆驼体内天然存在的一种新型抗体，该抗体的轻链和重链第一恒定区缺失，被称为重链抗体 (Heavy-chain antibody, HCAb)。重链抗体广泛存在于多种偶蹄目胼足亚目骆驼科动物体内，如单峰驼、原驼、羊驼等<sup>[75]</sup>。克隆重链抗体的重链可变区 (Variable domain of the heavy chain of the heavy-chain antibody, VHH) 得到只由重链可变区组成的单域抗体 (Single domain antibody, sdAb)，其晶体直径 2.5 nm，长 4 nm，相对分子质量仅 15 kDa 左右，因此又称为纳米抗体 (Nanobody, Nb)，是目前可与抗原结合的最小片段。几种类型抗体的结构示意图如图所示：

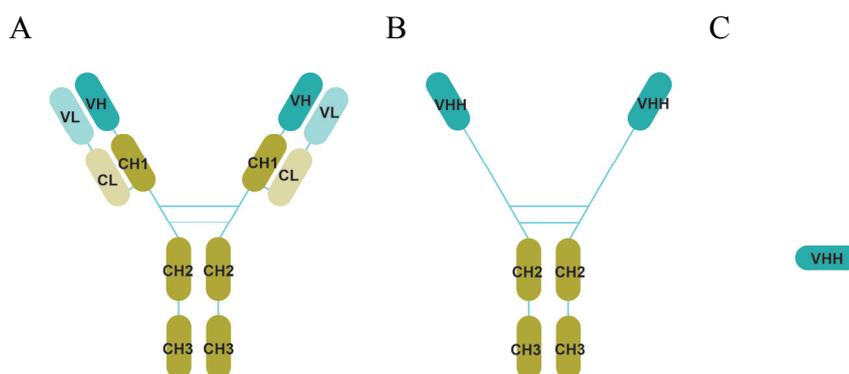


图 4 不同类型抗体的结构示意图

A: 常规抗体; B: 重链抗体; C: 纳米抗体。

此后，在一些软骨鱼类<sup>[76]</sup>如护士鲨等体内也发现了类似的轻链缺失的重链抗体，称为新抗原受体 (New antigen receptor, NAR)。

## 2、纳米抗体的结构特点

纳米抗体的晶体结构一般呈椭圆形,直径 2.5 nm,长 4 nm,分子量在 10~15 kDa 左右,是目前存在的具有完全功能的分子最小的抗体。与常规抗体的重链可变区结构类似,纳米抗体也由四个骨架区(Framework region, FR)和三个互补决定区(Complementary-determining region, CDR),两者的一级结构示意图如下:

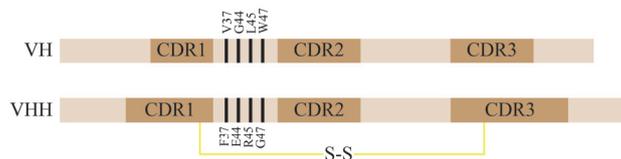


图 5 VH 和 VHH 一级结构示意图

骆驼源 VHH 基因和人 VH 基因的相似度达到 80%~90%<sup>[77]</sup>,两者的主要区别有:(1)多数纳米抗体在 CDR3 和 CDR1(或者 FR2)之间有一个额外的二硫键,后者能够稳定 CDR3 形成的凸环结构,从而降低其与抗原的结合能<sup>[78]</sup>;(2)VHH 的 CDR1 和 CDR3 比 VH 的更长,人和鼠 VH 的 CDR3 的平均长度分别为 14 和 12 个,而 VHH 的为 16~18 个<sup>[78]</sup>,这为 VHH 深入抗原分子内部、识别隐匿抗原奠定了结构基础;并且纳米抗体的 CDR3 通常在抗体-原相互作用中起核心作用<sup>[79]</sup>;(3)传统抗体 FR2 中有 4 个疏水性氨基酸(V37、G44、L45 和 W47)在进化中是相当保守的,而在 VHH 中则为亲水性氨基酸(F37、E44、R45 和 G47),这增加了 VHH 的溶解性<sup>[78]</sup>,使得 VHH 在溶液中相对稳定,不易发生聚集。

## 3、纳米抗体的理化性质和生物学特性

与传统抗体相比,纳米抗体具有以下几个特点:

(1)分子量小,渗透性强。纳米抗体是目前世界上已知相对分子质量最小的抗体,完整的常规抗体分子的相对分子质量约 150 kDa,单链可变区片段(single-chain variable fragment, scFv)相对分子质量约 30 kDa,而纳米抗体相对分子质量约为 15 kDa。其较小的相对分子质量使之具有较强的组织渗透性,能够渗透到细胞间隙和组织中<sup>[80]</sup>,还能通过血脑屏障等<sup>[81][82]</sup>。

(2)水溶性好。由于纳米抗体的 FR2 中一些亲水性氨基酸取代疏水性氨基酸,使纳米抗体的水溶性增加,在溶液中具有较好的亲水性<sup>[83]</sup>,且不易发生聚集反应。

(3)稳定性好。纳米抗体可在-20℃ 环境下保持活性数年,4℃ 条件下稳定储存数月,也可在 37℃ 的 PBS 缓冲液中保持活性>1 周<sup>[84]</sup>。Dumoulin 等<sup>[85]</sup>对纳米抗体进行 90℃ 高温处理,检测高温对其结合活性的影响,结果发现纳米抗体活性并未受到影响,而同样处理的传统抗体却已失活。这个优点对于抗体的保存和运输具有十分重要的价值。

除了具有热稳定性外,纳米抗体对于蛋白变性剂,如尿素、盐酸胍和乳酸胺

等也表现出较高的耐受性。在化学及热变性后，纳米抗体能够重新折叠，并且在 CDR1 与 CDR3 间重新形成一个二硫键，提高了其结构的稳定性，保障了其功能活性的稳定<sup>[86]</sup>。

(4) 抗原识别能力强。与 VH 相比，VHH 的 CDR1 和 CDR3 均较长。从纳米抗体的晶体结构看，突出的 CDR3 环非常稳定，因为它通过半胱氨酸残基与 CDR1 或 FR2 上的半胱氨酸残基形成二硫键<sup>[85]</sup>，这个额外的二硫键也是纳米抗体稳定性好的原因之一。传统抗体的抗原结合位点是凹陷或平面的，所以只能识别平面或凸起的抗原。而纳米抗体由于这个突出的 CDR3 环，使得它能够结合凹进去的抗原表位，因此纳米抗体能够特异性识别一些隐匿的抗原表位，而这是传统抗体无法实现的<sup>[87]</sup>。

(5) 易于表达。除了哺乳动物细胞，纳米抗体还可以在细菌、酵母等生物体大量表达，即便是在细菌中也能够形成二硫键，也无需考虑轻重链配对的问题，因此可保证目标纳米抗体结构的正确性和功能的完整性<sup>[88]</sup>。如在大肠埃希菌表达系统中，其表达量在培养基中可以达到 1~10 mg/L，并且在酵母、植物、昆虫和哺乳动物细胞中的表达效率也非常高<sup>[89]</sup>。

#### 4、纳米抗体的应用

(1) 用于科学研究。蛋白质是高度动态的分子，有时候很难形成晶体<sup>[90]</sup>。可以针对要解析结构的蛋白质，筛选其纳米抗体，当纳米抗体与靶蛋白相互作用时，能够降低靶蛋白的动态状态，将其固定在两者的相互作用的构象中，有助于晶体的形成。例如，Tobias Kromann-Hansen 等<sup>[91]</sup>筛选出了尿激酶型纤溶酶原激活剂的活性位点纳米抗体和变构位点纳米抗体，两种抗体将尿激酶型纤溶酶原激活剂固定在不同的状态，从而解析了其在不同状态下的构象。

带有特殊标签的纳米抗体在细胞内可以将抗原重新定位到特定的细胞区域。Ulrich Rothbauer<sup>[92]</sup>等筛选出了一个绿色荧光蛋白 (GFP) 抗体，该抗体可以与细胞蛋白融合，异位召集 GFP 融合蛋白，从而达到靶向操纵活细胞中的细胞器（或细胞结构）及其活动的作用。

(2) 用于疾病诊断。目前已经报道了很多基于纳米抗体的体内外诊断研究。Francisco J Morales-Yanez 等<sup>[93]</sup>开发了弓形体特异性纳米抗体，通过 ELISA 的方法能够检测低至 0.65 ng/mL 的弓形体抗原。纳米抗体分子量小，穿透力强，因此以放射性元素标记的纳米抗体可以作为显影剂<sup>[94]</sup>，能够在血液中快速清除，减少辐射；纳米抗体还能穿过致密组织，对深层的病变进行显影定位。

(3) 用于治疗。纳米抗体可以用于多种疾病的治疗。卡普赛珠单抗 (Caplacizumab) 是第一个基于纳米抗体的治疗药物，其分别于 2018 年底和 2019 年初获得欧洲药品管理局和美国食品药品监督管理局的批准。该抗体靶向血管性血友

病因子 (von willebrand factor, vWF)，防止 vWF 介导的血小板粘附<sup>[90]</sup>，从而达到治疗疾病的效果。Laursen N 等<sup>[95]</sup>筛选了靶向流感多个表位的多结构域的纳米抗体，将它们组合后表现出增强的病毒交叉反应性和效力。与腺相关病毒介导的基因递送技术相结合，是一种预防流感病毒和其他高度可变病原体感染的有效策略。

# 第一章 抗 MERS-CoV 纳米中和抗体的构建与鉴定

## 引言

2012年9月，MERS-CoV席卷全球，使全球经济遭受巨大损失，给全世界人民的生命健康带来严重威胁，其致死率高达35%。然而到目前为止，仍没有针对MERS-CoV的特效药和可用的疫苗。

MERS-CoV RBD能够强烈刺激机体产生中和抗体，是很多MERS-CoV单克隆抗体以及疫苗的研究靶点。前期本实验室使用MERS-CoV RBD蛋白免疫羊驼，借助噬菌体展示技术建立了MERS-CoV RBD蛋白特异性纳米抗体库，并从该库中成功筛选到一株高亲和力纳米中和抗体NbMS10，其改造后的抗体NbMS10-Fc能够对受致死剂量MERS-CoV感染的DPP4转基因小鼠起到预防感染和治疗疾病的效果。解析了该抗体的识别表位为MERS-CoV RBD D539位氨基酸，因此当该抗体遇上此位点突变的MERS冠状病毒，便可能无法起效。因此本部分研究的设计思路是筛选出另一识别表位的纳米中和抗体，以期能够识别并中和D539位氨基酸突变的病毒株。

## 1.1 实验材料

### 1.1.1 细菌、噬菌体和质粒

MERS-CoV RBD-Fc蛋白特异性纳米抗体库初级文库菌由本实验室构建并保存于-80°C。TG1菌株、KM13辅助噬菌体由西北农林科技大学杜恩岐教授提供并在本实验室保存和使用。

大肠杆菌DH5 $\alpha$  (BC102)、BL21 (DE3) (BC201)购自北京博迈德基因技术有限公司。

pCold I原核表达载体 (TAKARA)质粒在本实验室保存和使用。pFUSE-IgG1-Fc2真核表达载体 (ThermoFisher)在本实验室保存和使用。MERS RBD-pFUSE重组表达载体在本实验室保存和使用。

### 1.1.2 细胞

293T (人肾上皮细胞)细胞由本实验室保存。Huh-7 (人肝癌细胞)细胞由本实验室保存。在无明确说明的情况下，细胞均使用10%高糖DMEM完全培养基培养 (配方见附件)。仅在表达蛋白和包装假病毒时使用无任何额外添加物的高糖

---

---

DMEM 培养基。

### 1.1.3 蛋白质

MERS-CoV RBD-Fc 蛋白由基础医学研究所使用 CHO 表达系统进行表达并分离纯化, MERS-CoV S1 蛋白(40069-V08H)和 S 蛋白(40069-V08B)购自北京义翘神州科技有限公司。

### 1.1.4 主要试剂(盒)

PCR Master Mix (Thermofisher, K1072)、胶回收试剂盒(全式金, EG101)、无缝克隆试剂盒(全式金, CU201)、*Bam* HI 等快切酶及 Buffer (Thermofisher)、普通 DNA 纯化试剂盒(天根 DP204)、T4 DNA 连接酶(Thermofisher, EL0016)、无 DNase/RNase 水(天根, RT121)、质粒小提试剂盒(全式金, EM101)、点突变试剂盒(全式金, FM111)、质粒大提试剂盒(天根, DP117)、96 孔酶标板(CORNING, 9018)、ELISA 包被液(索莱宝, C1050)、牛血清白蛋白(索莱宝, A8020)、单组份 TMB 显色液(索莱宝, PR1200)、终止液(索莱宝, C1058)、Ni-NTA 琼脂糖凝胶(江苏康为世纪生物科技股份有限公司, CW0010)、Protein A 预装重力柱(生工生物工程股份有限公司, C600951)、PBS(Gibco, C10010500BT)、DMEM 高糖培养基(Gibco, 11995081)、胰酶(Gibco, 25200056)、青霉素/链霉素(Gibco, 15070063)、胎牛血清(PAN, P30-3302)、荧光素酶底物(Perkin Elmer, 6066761)。

FITC 偶联的兔抗人 IgG-Fc 抗体(北京博奥龙免疫技术有限公司, BF05010)、HRP 偶联的山羊抗人 IgG-Fc 抗体(ImmunoResearch, 109-035-008)、HRP 偶联的抗 M13 抗体(北京义翘神州科技有限公司, 11973-MM05T-H)、HRP 偶联的鼠抗 His 抗体(江苏康为世纪科技有限公司, CW0285)。

### 1.1.5 主要仪器

恒温摇床(太仓)、恒温孵箱(志成)、超净工作台、电子秤、蓝光切胶仪(生工生物工程股份有限公司, G500312)、PCR 仪(Applied BioSystems, Veriti)、超速离心机。分子相互作用分析仪(Probe life, Gator)、流式细胞仪(Millipore, easyCyte HT)、酶标仪(Bio Teck)、洗板机(Bio Teck)、高内涵系统(Perkin Elmer, Operetta CLS)。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 MERS-CoV S1 蛋白特异性纳米抗体的筛选

#### 1、MERS-CoV S1 蛋白特异性纳米抗体的第一轮筛选

噬菌体抗体库的筛选主要包括噬菌体的扩增、拯救、吸附、洗脱和感染等步骤，其流程图如下所示：

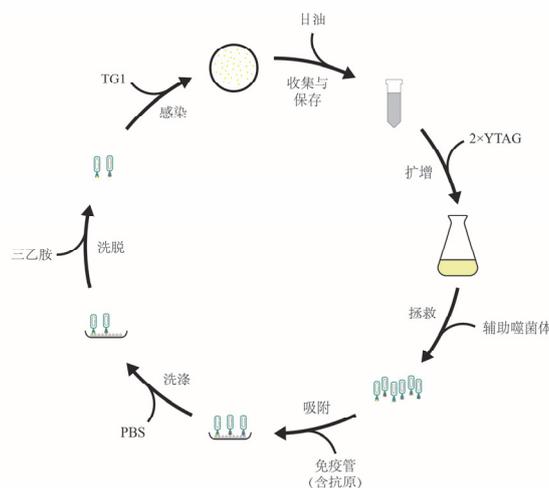


图 1.1 噬菌体抗体库筛选流程图

首先将含噬菌粒的 TG1 进行扩增，然后加入辅助菌体协助噬菌体抗体的包装，然后从中分离出噬菌体抗体，具体步骤为：

- (1) 第一日晚，取 400  $\mu\text{L}$  MERS-CoV RBD-Fc 蛋白特异性纳米抗体文库菌接种于 100 mL 2×YTAK 液体培养基中，于 37°C 振荡培养至菌液  $\text{OD}_{600}$  约为 0.5；
- (2) 加入 KM13 辅助噬菌体，先于 37°C 静置 30 min，然后相同温度振荡 30 min；
- (3) 将菌液转移至离心瓶中离心（3300×g，室温，10 min），弃去培养基上清；
- (4) 用 100 mL 2×YTAK 液体培养基重悬细菌沉淀，然后置于 30°C 振荡培养过夜；
- (5) 第二日上午将菌液转移至离心瓶中离心（3300×g，室温，10 min），然后将上清转移至新的离心瓶中；
- (6) 向上清中加入 1/5 体积（20 mL）的 PEG/NaCl 溶液，混合均匀后置于冰上静置 70 min；
- (7) 待冰浴完成后离心（12000×g，4°C，30 min），离心完毕可在底部看到少许白色沉淀，此沉淀即为噬菌体；
- (8) 小心弃去上清，然后再次离心（12000×g，4°C，2 min），尽量吸弃残留

液体;

(9) 使用 2.6 mL PBS 重悬白色沉淀, 然后转移至 1.5 mL 离心管中继续离心 (12000×g, 4°C, 10 min);

(10) 将上清转移至新的离心管中, 此即为拯救噬菌体, 将其置于 4°C 待用。

其次是将噬菌体抗体吸附到包被有 MERS-CoV S1 蛋白的免疫管上, 经过洗涤去掉非特异性结合、亲和力较低的噬菌体抗体, 然后使用强力的洗脱试剂将特异性结合、亲和力较高的噬菌体抗体洗脱下来, 并用后者感染 TG1, 具体步骤如下:

(1) 第一日晚 (复苏纳米抗体文库菌的同一夜), 使用 MERS-CoV S1 蛋白包被免疫管, 使用的缓冲液为 ELISA 包被液, 包被浓度为 20 μg/mL, 体积为 2 mL, 条件为 4°C 静置过夜;

(2) 第二日上午, 弃去免疫管内液体, 使用 PBS 洗涤免疫管 3 次;

(3) 免疫管中加入 4 mL MPBS, 室温孵育 2 h;

(4) 取出 2.4 mL 拯救噬菌体 (剩余拯救噬菌体置于 4°C 保存用于测定其滴度) 同 1.6 mL MPBS 混匀, 室温孵育 1 h;

(5) 再次使用 PBS 洗涤免疫管 3 次, 然后在免疫管中加入 2 mL 上述经 MPBS 封闭过的拯救噬菌体;

(6) 将免疫管置于室温孵育 2 h;

(7) 使用 PBST 洗涤免疫管 10 次, 再使用 PBS 洗涤免疫管 10 次;

(8) 向免疫管中加入 2 mL 100 mM TEA (三乙胺) 溶液 (现时配制, 现时使用), 室温轻轻摇晃 15 min;

(9) 再向免疫管中加入 2 mL Tris-HCl 溶液混合均匀, 此即为洗脱噬菌体;

(10) 将洗脱噬菌体转移至 50 mL 圆底离心管, 加入 16 mL OD<sub>600</sub> 约 0.5 的 TG1 菌液, 免疫管中也加入 4 mL 该菌液;

(11) 将离心管和免疫管置于 37°C 水浴 30 min;

(12) 将两管菌液混合, 取 100 μL 用于洗脱噬菌体滴度的测定, 剩余菌液离心 (3300×g, 室温, 10 min) 并弃上清;

(13) 用 500 μL 2×YT 液体培养基重悬细菌沉淀, 然后均匀涂布于 5 个 150 mm 大小的 2×YTAG 固体培养板, 倒置于 30°C 孵箱培养过夜;

然后是收集经噬菌体抗体感染的 TG1, 此即为下一轮筛选所使用的的抗体库, 具体步骤如下:

(1) 至第三日, 固体培养板上已经长出十分密集的菌落, 形成一层“菌膜”, 向培养板上添加 5 mL 2×YT 液体培养基, 使用细胞刮刀刮落菌落, 将其收集到 50 mL 离心管中;

(2) 再次向培养板上添加 5 mL 2×YT 液体培养基, 将剩余菌落冲洗干净并收

集到上述离心管中；

(3) 将离心管离心 (3300×g, 室温, 10 min) 并弃去上清；

(4) 使用 4 mL 2×YT 液体培养基重悬沉淀, 然后加入适当体积的 60% (v/v) 甘油, 使得甘油的终浓度为 15% (v/v);

(5) 将上述菌液分装并保存于-80°C, 待下一轮筛选时使用。

筛选过程中用到了 TG1 菌液, 其操作流程大致如下:

(1) 第一日上午, 使用接种环蘸取 TG1 甘油菌, 在 M9 固体培养板上划线, 将其倒置于 37°C 孵箱静置培养;

(2) 第二日上午, 挑取 TG1 单克隆接种于 5 mL 2×YT 液体培养基, 置于 37°C 摇床振荡培养;

(3) 待菌液 OD<sub>600</sub> 达到约 0.5 时, 取适量菌液接种到 25 mL 2×YT 液体培养基, 置于 37°C 摇床振荡培养, 使其在使用时 OD<sub>600</sub> 约为 0.5。

筛选过程中需要对拯救噬菌体和洗脱噬菌体进行滴度测定, 计算输入输出比以评估筛选终点。拯救噬菌体滴度测定步骤如下:

(1) 使用 2×YT 液体培养基将保留的拯救噬菌体进行十倍连续梯度稀释;

(2) 选择 10<sup>-7</sup>~10<sup>-11</sup> 五个稀释度 (后续筛选过程中该稀释度可根据实际情况进行调整), 每个稀释度取 10 μL 与 190 μL OD<sub>600</sub> 约为 0.5 的 TG1 菌液混合均匀并于 37°C 水浴 30 min;

(3) 取 100 μL 混合液均匀涂布于 90 mm 大小的 2×YTAG 固体培养板, 倒置于 30°C 孵箱培养过夜。

洗脱噬菌体滴度的测定步骤如下:

(1) 使用 2×YT 液体培养基将保留的用于测定洗脱噬菌体滴度的菌液进行十倍连续梯度稀释;

(2) 一般选择 10<sup>-1</sup>~10<sup>-5</sup> 五个稀释度 (后续筛选过程中该稀释度可根据实际情况进行调整), 每个稀释度取 100 μL 均匀涂布于 90 mm 大小的 2×YTAG 固体培养板, 倒置于 30°C 孵箱培养过夜。

## 2、MERS-CoV S1 蛋白特异性纳米抗体的后三轮筛选

后续几轮筛选步骤基本类似, 有如下改变:

(1) 第二轮、第三轮、第四轮包被抗原的浓度分别调整为 10 μg/mL、5 μg/mL、5 μg/mL;

(2) 后一轮筛选所用的文库菌为前一轮从固体培养板收集并分装冻存的文库菌;

(3) 噬菌体与免疫管共孵育后, 使用 PBST 和 PBS 洗涤免疫管的次数均调整为 20 次;

(4) 第四轮筛选过程中, 将离心管和免疫管的菌液混合后, 使用 2×YT 液体培养将菌液进行十倍连续梯度稀释, 选择  $10^{-3}$ ~ $10^{-6}$  四个稀释度, 每个稀释度各取 3 份 100  $\mu\text{L}$  均匀涂布于 3 个 150 mm 大小的 2×YTAG 固体培养板, 倒置于 30°C 孵箱培养过夜, 用作后续单克隆的挑取与鉴定。

### 3、MERS-CoV S1 蛋白特异性纳米抗体筛选的单克隆噬菌体制备

在第四轮筛选过后需要挑取单克隆菌落进行单克隆噬菌体的制备, 以作后续的 ELISA 鉴定, 具体步骤如下:

(1) 在第四轮筛选时, 当固体培养板培养过夜后, 不同稀释度的培养板菌落的密集程度不同, 随机选择菌落相对稀疏的培养板, 选择培养板上相对孤立的单克隆菌落, 随机挑取 192 个菌落, 接种于 2 个 96 孔深孔板, 每孔内已预先加入 180  $\mu\text{L}$  2×YTAG 液体培养基, 于 37°C 振荡培养 8 h;

(2) 从每孔中取 20  $\mu\text{L}$  菌液转接到新的 96 孔深孔板中, 每孔内已预先加入 180  $\mu\text{L}$  2×YTAG 液体培养基, 于 37°C 振荡培养;

(3) 原 96 孔深孔板则加入 60  $\mu\text{L}$  60%甘油, 甘油终浓度约为 15%, 然后冻存于 -80°C;

(4) 新的 96 孔深孔板振荡 1 h 后, 加入经 2×YT 液体培养基作 1:200 稀释的 KM13 辅助噬菌体, 每孔 50  $\mu\text{L}$ ;

(5) 先于 37°C 静止 30 min, 然后于 37°C 振荡培养 30 min;

(6) 将深孔板离心 (1800×g, 室温, 10 min), 吸弃上清, 每孔加入 400  $\mu\text{L}$  2×YTAK 液体培养基重悬细菌沉淀, 于 30°C 振荡培养过夜;

(7) 第二日将深孔板离心 (2500×g, 室温, 10 min), 从每孔中吸取 250  $\mu\text{L}$  上清转移到新的深孔板中;

(8) 加入等体积含 6% BSA 的 PBS, 室温孵育 1 h, 用于下一步的鉴定。

### 4、MERS-CoV S1 蛋白特异性纳米抗体筛选的单克隆噬菌体鉴定

单克隆噬菌体制备完毕后, 需要通过 ELISA 鉴定 MERS-CoV S1 蛋白与噬菌体抗体的反应性, 具体步骤如下:

(1) 在挑取单克隆的同日晚, 分别使用 MERS-CoV S1 和 BSA 蛋白包被 96 孔酶标板, 包被浓度 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 每孔 50  $\mu\text{L}$ , 静置于 4°C 过夜;

(2) 第二日弃板内液体, 使用 PBST 洗涤一次并拍干, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  封闭液, 置于 37°C 孵育 1 h;

(3) 弃板内液体, 使用 PBST 洗涤一次并拍干, 每孔加入 50  $\mu\text{L}$  经封闭液封闭的噬菌体上清, 置于 37°C 孵育 1 h;

(4) 弃板内液体, 使用 PBST 洗涤六次并拍干, 每孔加入 50  $\mu\text{L}$  抗 M13 噬菌体抗体 (稀释度 1:5000), 置于 37°C 孵育 45 min;

(5) 弃板内液体, 使用 PBST 洗涤六次并拍干, 每孔加入 50  $\mu\text{L}$  显色液, 室温孵育约 2 min;

(6) 每孔加入 50  $\mu\text{L}$  终止液, 在酶标仪上读取  $\text{OD}_{450}$ 。

### 5、MERS-CoV S1 蛋白特异性纳米抗体基因的获取

以 MERS-CoV S1 蛋白包被的噬菌体 ELISA  $\text{OD}_{450}$  值减去对应的以 BSA 蛋白包被的噬菌体 ELISA  $\text{OD}_{450}$  值, 将差值较高者对应的菌液送至测序公司进行测序并要求返还质粒, 作为后续扩增纳米抗体基因时使用的模板。取测序结果合格的序列信息, 去掉载体部分的序列后得到纳米抗体基因序列。

### 1.2.2 MERS-CoV S 蛋白特异性纳米抗体的筛选

以 MERS-CoV S 蛋白对抗体库进行筛选, 步骤基本同前, 将包被抗原替换为 MERS-CoV S 蛋白。

### 1.2.3 抗 MERS-CoV 特异性纳米抗体的选取与制备

#### 1、代表性纳米抗体氨基酸序列的选择

将纳米抗体基因翻译成氨基酸序列, 部分纳米抗体基因存在缺失突变, 需要将核酸序列与其他纳米抗体基因进行比对, 在缺失突变的位置添加相同或相似的碱基以得到正确翻译的氨基酸序列。将通过 MERS-CoV S1 和 S 蛋白筛选获得的纳米抗体氨基酸序列进行比对分析, 将序列相同或相似的归为一类, 每一类选择一个进行蛋白的制备。

#### 2、用于扩增纳米抗体基因的引物的设计

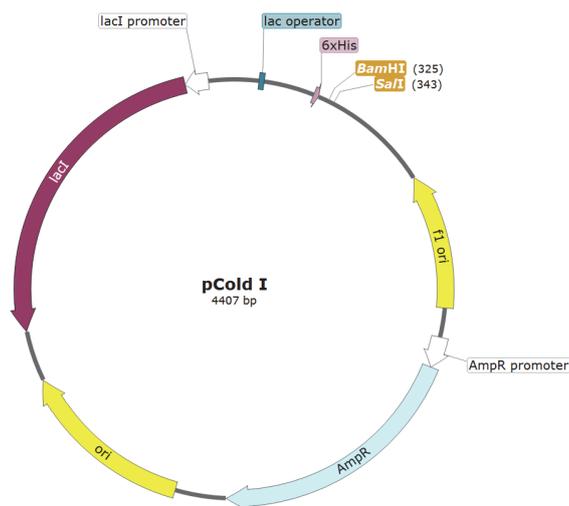


图 1.2 pCold 载体质粒图谱

以 pCold I 质粒构建重组表达载体, 选择 *Bam* H I、*Sal* I 两个酶切位点。在基

因上游加上 *Bam* H I 酶切位点，下游加上 *Sal* I 酶切位点。此外，由于纳米抗体基因前五个氨基酸变异较大，在建库时去掉了，因此在构建表达载体时要加上 15 个碱基：CAGGTGCAGCTGGTG。

### 3、纳米抗体基因的扩增与分离

首先通过 PCR 扩增纳米抗体基因，PCR 体系为：

组分	体积
模板	1 $\mu$ L
上游引物	1 $\mu$ L
下游引物	1 $\mu$ L
PCR Master Mix	25 $\mu$ L
无 DNase/RNase 水	25 $\mu$ L

PCR 条件为：

温度	时间	循环数
95°C	3 min	1
95°C	30 s	35
62°C	30 s	
72°C	1 min	
72°C	10 min	1

PCR 完成后通过琼脂糖凝胶电泳对扩增的条带进行鉴定和分离。配制 1% (w/v) 的琼脂糖凝胶[含 0.1% (v/v) 的核酸染料]，将样品加入胶孔中，在 120 V 恒压下进行电泳。待黄色染料带 (<10 bp) 移动至核酸胶边缘时终止电泳。

### 4、纳米抗体基因片段的回收

核酸经琼脂糖凝胶电泳分离后，在蓝光灯下切取 300~400 bp 大小片段的凝胶于离心管中，使用胶回收试剂盒进行片段回收。胶回收方案参照说明书，具体步骤如下：

(1) 称量切取的凝胶的净质量，加入三倍体积(w/v)的 GSB 溶液，于 55°C 金属浴溶胶，金属浴过程中上下颠倒离心管，确保胶块完全融化；

(2) 待离心管中的液体温度降至室温，将液体加入到离心柱中静置 1 min，然后离心 (10000 $\times$ g, RT, 1 min) 并弃流出液；

(3) 向离心柱中加 650  $\mu$ L WB 溶液，然后离心 (10000 $\times$ g, RT, 1 min) 并弃流出液；

(4) 继续离心 (10000 $\times$ g, RT, 2 min) ；

(5) 将离心柱置于干净离心管中，开盖静置 1 min；

(6) 在离心柱的中央加入 50  $\mu\text{L}$  的无 DNA 酶水（预先加热至 65 $^{\circ}\text{C}$ ），静置 1 min；

(7) 再次离心（10000 $\times\text{g}$ ，RT，1 min）即得到回收的核酸。

#### 5、纳米抗体基因片段与载体的酶切和回收

使用 *Bam* HI 和 *Sal* I 分别对回收的纳米抗体基因片段和 pCold I 空载体进行双酶切，酶切体系为：*Bam* HI 和 *Sal* I 快切酶各 1  $\mu\text{L}$ ，10 $\times$ 酶切 Buffer 4  $\mu\text{L}$ ，待切片或载体 34  $\mu\text{L}$ ；酶切条件为 37 $^{\circ}\text{C}$  水浴 2 h。

使用普通 DNA 纯化试剂盒对酶切产物进行纯化。纯化方案依照说明书，具体步骤如下：

(1) 将酶切产物与五倍体积的 BB 溶液混匀后加入到离心柱中，静置 1 min，离心（10000 $\times\text{g}$ ，RT，1 min）并弃流出液；

(2) 向离心柱中加 650  $\mu\text{L}$  WB 溶液，然后离心（10000 $\times\text{g}$ ，RT，1 min）并弃流出液；

(3) 继续离心（10000 $\times\text{g}$ ，RT，2 min）；

(4) 将离心柱置于干净离心管中，开盖静置 1 min；

(5) 在离心柱的中央加入 30  $\mu\text{L}$  的无 DNA 酶水（预先加热至 65 $^{\circ}\text{C}$ ），静置 1 min；

(6) 再次离心（10000 $\times\text{g}$ ，RT，1 min），使用 NanoDrop 测定其浓度，置于 4 $^{\circ}\text{C}$  待用。

#### 6、连接产物的连接和转化

使用 T4 DNA 连接酶将目的片段与载体连接，连接体系为：T4 DNA 连接酶 1  $\mu\text{L}$ ，10 $\times$ 连接 Buffer 1  $\mu\text{L}$ ，目的片段 7  $\mu\text{L}$ ；连接条件为 22 $^{\circ}\text{C}$  金属浴 1 h。

然后将连接产物转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞，具体步骤如下：

(1) 取 DH5 $\alpha$  感受态细胞置于冰上自然解冻；

(2) 将 10  $\mu\text{L}$  连接产物加入其中，轻弹管底部，使二者充分混合；

(3) 将感受态细胞继续置于冰上静置 10 min；

(4) 将感受态细胞置于 42 $^{\circ}\text{C}$  金属浴加热 1 min，然后继续置于冰上静置 2 min；

(5) 将感受态细胞加到含氨苄抗性的 LB 固体培养板，用涂布棒涂抹均匀，然后倒置于 37 $^{\circ}\text{C}$  孵箱静置约 10 h。

#### 7、转化子的挑取与鉴定

待培养板上长出明显的单克隆菌落时，取 5 mL LB 液体培养基于 15 mL 离心管，使用加样枪枪头蘸取相对独立的菌落，在 LB 液体培养基（含氨苄抗生素）中吹打，盖好盖子后将离心管置于 37 $^{\circ}\text{C}$  恒温摇床振荡培养，待菌液 OD<sub>600</sub> 达到 0.6

后进行菌液 PCR 鉴定。菌液 PCR 体系为：

组分	体积
菌液	1 $\mu\text{L}$
上游引物	0.5 $\mu\text{L}$
下游引物	0.5 $\mu\text{L}$
PCR Master Mix	10 $\mu\text{L}$
无 DNase/RNase 水	8 $\mu\text{L}$

PCR 条件为：

温度	时间	循环数
95°C	8 min	1
95°C	30 s	35
62°C	30 s	
72°C	1 min	
72°C	10 min	1

将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳，将在 300~400 bp 大小处有条带者对应的菌液制备成甘油菌[甘油菌终浓度为 15% (v/v)]并保存于-20°C，然后送测序公司进行测序并要求返还质粒。

#### 8、纳米抗体的小量原核表达及鉴定

将测序公司返回的测序信息与纳米抗体基因进行比对，将构建正确的重组质粒转化至 BL21 (DE3) 中进行小量诱导表达，具体步骤如下：

(1) 将质粒转化至 BL21 (DE3) 感受态细胞并涂布于 LB 固体培养板（含氨苄抗生素）；

(2) 同步转化 pCold I 空载体，操作步骤（包括后续步骤）与之相同，作为阴性对照；

(3) 将培养板倒置于 37°C 恒温孵箱静置培养（约 10 h）；

(4) 待培养板上长出单克隆后，挑取单克隆菌落接种于 5 mL LB 液体培养基中（含氨苄抗生素），37°C 振荡培养；

(5) 在菌液 OD<sub>600</sub> 达到 0.5 后，取一小部分菌液制备甘油菌并保存于-20°C；

(6) 剩余菌液加入 1 M 的 IPTG 2  $\mu\text{L}$ ，15°C 振荡培养 24 h；

(7) 24 h 后将菌液离心（10000 $\times$ g，4°C，2 min），弃去上清；

(8) 使用 PBS 洗涤沉淀两次；

(9) 然后使用 500  $\mu\text{L}$  去离子水重悬菌体。

通过该载体进行原核表达，目的蛋白存在于胞内，需要使用超声波将细菌破碎，然后通过离心收集上清液，有上清表达的情况下，目的蛋白即存在于其中，随后即可进行鉴定，具体步骤如下：

(1) 使用超声仪破碎菌体，参数为超声 2 s、间歇 2 s，总工作时间 10 min，超声过程中保持样品在冰上孵育；

(2) 超声完毕后，将样品离心（12000×g，4℃，10 min），收集上清至新的离心管中；

(3) 配制 15% SDS-PAGE 凝胶，将收集的上清与 5×变性上样缓冲液按 4:1 体积比混匀后煮沸 10 min；

(4) 待样品冷却后将其加入到凝胶孔中，先使用 80 V 恒压电泳约 30 min，待样品带越过浓缩胶和分离胶的分界线后，将电压调至 120 V，待预染 marker 最小的条带迁移至凝胶下方边缘处时终止电泳；

(5) 取出凝胶放于小盒中，加入适当体积的考马斯亮蓝染色液，在低速摇床上轻轻摇晃 40 min；

(6) 倒出染色液，加入适当体积的脱色液，继续轻轻摇晃，当脱色液颜色变深时更换新鲜的脱色液继续摇晃。如此脱色至凝胶上能明显分辨出蛋白质的条带。

#### 9、纳米抗体的大量原核表达及纯化

通过小量表达鉴定出有上清表达的抗体株，接下来就可以将表达体系扩大，进行纳米抗体的大量制备，具体步骤如下：

(1) 选择有上清表达的抗体株复苏其 BL21 甘油菌至 5 mL LB 液体培养基中，然后转接至 500 mL LB 液体培养基中，在 37℃ 条件下振荡培养至菌液 OD<sub>600</sub> 约为 0.5；

(2) 向菌液中加入适量 IPTG，使 IPTG 终浓度为 0.4 mM，在 15℃ 条件下振荡培养 24 h；

(3) 24 h 后离心收集菌体沉淀，使用 1/10 体积（50 mL）的 PBS 洗涤沉淀两次，再用 1/10 体积（50 mL）的去离子水重悬沉淀；

(4) 使用超声仪对细菌进行破碎裂解，超声条件为超声 4 s 间歇 6 s，总时间 1 h，超声过程中保持样品在冰上孵育；

(5) 将样品离心（12000×g，4℃，30 min）收集上清至新的离心管中。

表达出的蛋白在其 N 端带有 6×His 标签，因此可以通过 Ni-NTA 树脂进行亲和层析，具体步骤如下：

(1) 将样品和纯化过程中要用到的所有溶液使用 0.22 μm 滤器过滤；

(2) 将 Ni-NTA 树脂混合液摇晃均匀，取 2 mL 加入到空柱中，静置；

(3) 待树脂自由沉降到柱底部，打开阀门使树脂保存液自由流出，控制其流

速在 1 mL/min 左右（整个纯化过程所有液体均经重力自然流出，且流速均控制在 1 mL/min 左右，每滴液体体积按 0.05 mL 计即为每三秒钟一滴）；

（4）待保存液流尽，缓缓加入 10 mL 去离子水，注意不要将树脂吹散，使液体自然流出；

（5）再缓缓加入 10 mL Buffer A（Buffer A 为自配溶液，其配方见附录），使液体自然流出；

（6）将样品分多次缓缓加入柱中，收集流出液；

（7）使用含咪唑的溶液按咪唑浓度由低到高依次进行洗脱，每个浓度洗脱体积为 10 mL（咪唑浓度为 25 mM、50 mM、100 mM、200 mM、300 mM、500 mM，由 Buffer A 与 Buffer B 按比例混合而成；Buffer B 为自配溶液，其配方见附录）。

通过使用不同浓度的咪唑进行洗脱，将与 Ni 非特异性结合的蛋白和纳米抗体分别洗脱，达到分离纯化的目的。由于不同的纳米抗体带有的 His 标签与 Ni 的亲合力不同，因此不同纳米抗体可能经不同浓度的咪唑洗脱，因此需要进一步通过 SDS-PAGE 鉴定出纳米抗体的最佳洗脱浓度，然后通过超滤管超滤的方法减少溶液中的杂质，并对抗体进行浓缩，具体步骤如下：

（1）洗脱完毕后将洗脱液进行 SDS-PAGE 凝胶电泳；

（2）用考马斯亮蓝进行染色并用脱色液进行脱色；

（3）根据 SDS-PAGE 凝胶电泳结果，选择杂蛋白较少的洗脱液，加入到 3000 Da 的超滤管中，离心（3000×g，4°C），离心时间以离心完毕超滤管内所剩液体体积为判断依据，一般控制在 1 mL 左右（蛋白质含量较多时可适当保留较大体积，避免蛋白质因浓度过高而析出）；

（4）加入适量 PBS 继续离心，如此进行多次添加 PBS 和离心，以尽量去除溶液中的咪唑、氯化钠等杂质。

#### 10、带人 Fc 片段的抗体的表达与纯化

此项工作由三优生物医药（上海）有限公司完成，其实验过程简述如下：合成抗体基因到真核表达载体上，通过转染将重组载体导入到 Expi 293 细胞进行表达，然后使用 Protein A 亲和层析进行纯化。

#### 11、纳米抗体的纯度鉴定和浓度测定

使用 Bradford 蛋白质定量试剂盒对纳米抗体的浓度进行测定，测定方案参照说明书，具体步骤如下：

（1）将 0、1、2、3、4、5、6、7  $\mu\text{L}$  牛血清白蛋白标准溶液（1 mg/mL）加入到微孔板中（设置复孔），加入 PBS 补足每孔总体积至 15  $\mu\text{L}$ ；

（2）取 2、5、10  $\mu\text{L}$  抗体加入到微孔板中（同样设置复孔），加入 PBS 补足每孔总体积至 15  $\mu\text{L}$ ；

- (3) 向所有孔中加入 285  $\mu\text{L}$  考马斯亮蓝染液, 混匀, 室温放置 5 min;
- (4) 使用分光光度计测定 595 nm 处的吸光度值;
- (5) 以 BSA 孔的吸光度值为横坐标, 蛋白质总量为纵坐标, 绘制标准曲线;
- (6) 选择纳米抗体吸光度值在 BSA 所有吸光度值范围内为有效值, 计算其浓度。

将纯化和浓缩的纳米抗体进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 然后用考马斯亮蓝进行染色并用脱色液进行脱色, 分析其纯度。最后将纳米抗体分装并保存于 $-20^{\circ}\text{C}$ 。

#### 1.2.4 抗 MERS-CoV 特异性抗体的生物学功能评价

##### 1、间接酶联免疫吸附试验

使用 ELISA 测定抗体与 MERS-CoV S1 蛋白的亲合力, 其步骤如下:

- (1) 用包被液稀释 MERS-CoV S1 蛋白, 使其浓度为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 加入 96 孔酶标板, 50  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  静置过夜;
- (2) 次日用 PBST 洗板 1 次并拍干, 加入封闭液 (含 3% BSA 的 PBS), 100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$  静置孵育 1 h;
- (3) 用 PBST 洗板 1 次并拍干;
- (4) 另取 96 孔稀释板, 将抗体进行等比梯度稀释, 然后转移至 96 孔酶标板中, 50  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$  静置孵育 45 min;
- (5) 用 PBST 洗板 3 次并拍干;
- (6) 使用封闭液稀释标签抗体, 加入 96 孔酶标板中, 50  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$  静置孵育 30 min;
- (7) 用 PBST 洗板 3 次并拍干;
- (8) 加入 TMB 单组分显色液, 50  $\mu\text{L}/\text{孔}$ , 室温或  $37^{\circ}\text{C}$  静置孵育数分钟;
- (9) 待显色至合适深度 (通常为 5~10 min), 加入终止液, 50  $\mu\text{L}/\text{孔}$ , 轻轻拍板使其混匀;
- (10) 使用酶标仪读取 450 nm 处的吸光度值。

##### 2、生物膜层干涉实验

使用生物膜层干涉技术 (Biolayer Interferometry, BLI) 测定抗体与 MERS-CoV S1 蛋白的平衡解离常数, 其步骤如下:

- (1) 将分子相互作用分析仪 Gator 开机, 打开软件, 使其自动初始化并预热 30 min;
- (2) 使用 K Buffer 将 MERS-CoV S1 蛋白稀释至 100 nM, 将纳米抗体从 50 nM 开始进行连续二倍梯度稀释, 共做 7 个稀释度;
- (3) 按照布局加好各种缓冲液、样品及 Anti-His 探针, 运行 Kinetics 模块;

(4) 在 K Buffer 中预湿探针 10 min (振荡器的振荡速度, 除了在结合抗原时为 400 rpm 外, 其余均为 1000 rpm) ;

(5) 在 Baseline 孔中平衡 120 s;

(6) 在 Loading 孔中结合 S1 蛋白至干涉波长位移约为 0.8 nm;

(7) 在 K Buffer 孔中再次平衡 60 s;

(8) 在结合孔中结合抗体;

(9) 在曲线相对平稳时在解离孔中解离 600 s;

(10) 利用软件计算平衡解离常数。

分析抗体的表位分群则使用 EP 模块, 其步骤如下:

(1) 使用 K Buffer 将 MERS-CoV S1 蛋白稀释至 100 nM, 将纳米抗体稀释至 25 nM;

(2) 按照布局加好各种缓冲液、样品及 Anti-His 探针, 运行 EP 模块;

(3) 在 Baseline 孔中平衡 120 s;

(4) 在 Loading 孔中结合 S1 蛋白至干涉波长位移约为 0.8 nm;

(5) 在 Baseline 孔中再次平衡 60 s;

(6) 在一种抗体中结合至曲线平衡;

(7) 在另一种抗体中继续结合至曲线平衡。

### 3、假病毒中和试验

使用假病毒中和试验测定抗体抑制假病毒进入细胞的能力。首先是制备相关质粒, 包括 MERS-S-pcDNA3.1 和 pNL4-3.Luc.R-.E-质粒, 制备方法参照大提试剂盒说明书, 具体步骤如下:

(1) 取 100 ng 质粒转化至 DH5 $\alpha$ , 并均匀涂布于 LB 固体培养板 (含氨苄抗生素), 倒置于 37°C 静置培养约 10 h;

(2) 挑取单克隆接种于 5 mL 含氨苄抗生素的 LB 液体培养基, 37°C 摇床振荡培养至菌液 OD<sub>600</sub> 约为 0.5;

(3) 取 300  $\mu$ L 菌液转移至 300 mL 含氨苄抗生素的 LB 液体培养基中, 37°C 摇床振荡培养约 10 h;

(4) 用离心瓶将菌液离心 (8500 $\times$ g, RT, 3 min), 弃上清, 尽量吸除上清;

(5) 用 10 mL P1 溶液重悬沉淀;

(6) 向离心瓶中加入 10 mL P2 溶液, 立即温和地上下颠倒 8 次, 室温放置 5 min;

(7) 向离心瓶中加入 10 mL P4 溶液, 立即温和地上下颠倒 8 次, 室温放置 10 min;

(8) 将离心瓶离心 (10000 $\times$ g, RT, 10 min) ;

- (9) 将上清液倒入 CS1 过滤器中, 将液体过滤到干净的 50 mL 离心管中;
- (10) 向滤液中加入 0.3 倍体积的异丙醇, 上下颠倒混匀;
- (11) 向 CP6 吸附柱中加入 2.5 mL BL 平衡液, 离心 (8500×g, RT, 2 min) 并弃去平衡液;
- (12) 将步骤 (10) 的混合液加入 CP6 吸附柱中, 离心 (8500×g, RT, 2 min) 并弃流出液 (可分多次进行离心, 每次不超过 10 mL);
- (13) 向 CP6 吸附柱中加入 10 mL PW 溶液, 离心 (8500×g, RT, 2 min) 并弃流出液, 如此洗涤共两次;
- (14) 向 CP6 吸附柱中加入 3 mL 无水乙醇, 离心 (8500×g, RT, 2 min) 并弃流出液;
- (15) 将 CP6 吸附柱再次离心 (8500×g, RT, 2 min);
- (16) 将 CP6 吸附柱放到一个干净的收集管中, 开盖放置 5~10 min;
- (17) 向 CP6 吸附柱的吸附膜的中间部位悬空滴加 1.3 mL 无 DNA 酶水 (预先加热至 65°C), 静置 5 min;
- (18) 将 CP6 吸附柱离心 (10000×g, RT, 5 min), 收集流出液于 1.5 mL 离心管, 使用 NanoDrop 测定其浓度。

其次是利用 293T 细胞包装假病毒, 其步骤如下:

- (1) 铺 293T 细胞至 T75 细胞培养瓶, 在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件静置培养 (以下若无额外说明均按此条件培养), 待其汇合度为 70%~90% 时进行转染;
- (2) 取两个 15 mL 离心管, 各加入 3 mL PBS; 其中一管加入 390 μL PEI, 另一管加入 49 μg MERS-S-pcDNA3.1 质粒和 98 μg pNL4-3.Luc.R-E-质粒, 各自混匀后室温静置 10 min;
- (3) 将两管液体轻轻混匀, 再次静置 10 min;
- (4) 弃去培养基内液体, 加入该转染混合物和 6 mL DMEM 高糖培养基 (无额外添加物, 以下若无额外说明均视为此);
- (5) 培养 6 h 后弃去培养基, 加入 15 mL DMEM 高糖培养基, 继续培养;
- (6) 24 h~36 h 后收集上清并离心 (3000×g, 4°C, 10 min) 以去掉细胞碎片, 将上清按 1 mL/管分装并冻存于 -80°C。

然后要对假病毒的滴度进行测定, 其滴度以半数组织感染量 (TCID<sub>50</sub>) 来表示, 具体步骤如下:

- (1) 取 96 孔细胞培养板, 如下表所示 (表中数字为假病毒稀释系数), 在中间 60 孔加入 90 μL DMEM 高糖完全培养基 (添加 10% FBS、1% P/S, 以下若无额外说明均按此配方);

	4	16	64	256		CC
	4	16	64	256		CC
	4	16	64	256		CC
	4	16	64	256	……	CC
	4	16	64	256		CC
	4	16	64	256		CC

(2) 化冻一管假病毒，在首列孔加入 30  $\mu\text{L}$  假病毒，充分混匀后吸取 30  $\mu\text{L}$  到后一列，依次进行连续等比梯度稀释；

(3) 最后一列孔不加假病毒，作为细胞对照 (Cell Control, 以下简称为 CC)；

(4) 然后加入 160  $\mu\text{L}$  Huh-7 细胞，每孔  $4 \times 10^4$  个。边缘孔加入 250  $\mu\text{L}$  无菌水，置于孵箱继续培养；

(5) 48 h 后，中间 60 个孔吸弃 150  $\mu\text{L}$  液体，然后加入 100  $\mu\text{L}$  底物，室温避光反应 2 min；

(6) 吹打均匀后转移 150  $\mu\text{L}$  至 96 孔白板中，在发光检测仪上使用 BrightGlo 预存程序进行检测；

(7) 以细胞孔相对光单位 (Relative light unit, RLU) 的 10 倍为阳性判定标准，使用 Reed-Muench 法计算假病毒的半数组织感染量 ( $\text{TCID}_{50}$ )。

最后用假病毒在有无抗体的存在下感染靶细胞 (Huh-7 细胞)，并检测其报告基因表达强弱，具体步骤如下：

(1) 取 96 孔细胞培养板，在中间 60 孔加入 50  $\mu\text{L}$  DMEM 高糖完全培养基；

(2) 在首列加入 25  $\mu\text{L}$  抗体 (2.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )，充分混匀后吸取 25  $\mu\text{L}$  到后一列，依次进行连续等比梯度稀释 (若进行二倍稀释则为 50  $\mu\text{L}$ )；

(3) 最后两列孔不加抗体：倒数第一列孔为细胞对照，倒数第二列孔为病毒对照 (Virus Control, 简称为 VC)；

(4) 除最后一列孔外，加 100  $\mu\text{L}$  的假病毒，每孔 1000  $\text{TCID}_{50}$ ，置于 37 $^{\circ}\text{C}$  孵箱中孵育；

(5) 1 h 后加入 100  $\mu\text{L}$  Huh-7 细胞，每孔  $4 \times 10^4$  个；

(6) 48 h 后，中间 60 孔吸弃 150  $\mu\text{L}$  液体，然后加入 100  $\mu\text{L}$  底物，室温避光反应 2 min；

(7) 吹打均匀后转移 150  $\mu\text{L}$  至 96 孔白板中，在发光检测仪上使用 BrightGlo 预置程序进行检测；

(8) 计算假病毒抑制率, 假病毒抑制率= (VC 孔 RLU-抗体孔 RLU) / (VC 孔 RLU-CC 孔 RLU) ×100%;

(9) 使用 Graph Pad Prism 软件计算抗体的半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>)。

此外, 为了验证抗体对不同 MERS-CoV 突变株的交叉中和活性, 从美国国家生物技术信息中心 (NCBI, [https:// www.ncbi.nlm.nih.gov/ genome/ viruses/ variation/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/viruses/variation/)) 网站上下载从 2012 年~2019 年收集的 MERS-CoV S 蛋白序列 (共 750 条, 见附录 B), 进行序列比对, 分析其受体结合域的氨基酸突变情况, 选择变异较多的单位点突变, 构建一系列单氨基酸突变的 MERS-mutS-pcDNA3.1 重组质粒, 依照上述方法测定抗体对不同突变假病毒的交叉中和能力。

#### 4、空斑减少中和试验

使用空斑减少中和试验评价了抗体的抗活病毒活性, 该试验由中国疾病预防控制中心在生物安全防护三级实验室 (P3) 完成, 所有实验步骤均严格遵照该实验室防护要求进行。实验步骤简要摘录如下:

(1) 第一日接种 Vero 细胞至 12 孔板, 每孔 10 万个细胞, 体积 1 mL, 置于孵箱培养;

(2) 第二日弃培养基, 每孔加入 500 μL 高糖 DMEM 维持液 (胎牛血清浓度为 2%);

(3) 将抗体用 DMEM 培养基 (无添加) 进行稀释;

(4) 将 MERS-CoV (HCoV-EMC/2012) 用 DMEM 高糖培养基 (无添加) 进行稀释 (0.4~0.66 pfu/μL);

(5) 将 150 μL 稀释的抗体与 150 μL 稀释的病毒混匀, 37°C 孵育 1 h;

(6) 弃去 12 孔板培养基, 加入上述混合物, 37°C 孵育 1 h;

(7) 弃去混合物, 加入 Avicel-2% FBS-DMEM 培养基, 每孔 1 mL, 培养 72 h;

(8) 72 h 后, 每孔加入 1 mL 预冷的 4%多聚甲醛, 室温固定 20 min;

(9) 弃去多聚甲醛, 每孔加入 500 μL 0.1%结晶紫染色 5 min;

(10) 弃去染色液, 用双蒸水洗涤 2 次, 晾干后计数; 中和率= (病毒孔空斑数-实验孔空斑数) /病毒孔空斑数×100%。

### 1.2.5 抗 MERS-CoV 特异性抗体的中和机制研究

#### 1、竞争性 ELISA

使用竞争性 ELISA 探究抗体的作用机制, 其具体步骤如下:

(1) 使用 MERS-CoV RBD-Fc 蛋白包被 ELISA 板, 包被浓度为 1 μg/mL, 每孔 50 μL, 4°C 静置过夜;

- (2) 弃包被液, 使用 PBST 洗板一次, 拍干;
- (3) 加入 3% BSA 封闭液, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 37°C 孵育 1 h;
- (4) 使用 PBST 洗板一次, 拍干;
- (5) 使用封闭液对 DPP4-His 蛋白进行稀释, 浓度为 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 加入到 ELISA 板中, 每孔 25  $\mu\text{L}$ ;
- (6) 对 M34-Fc 和阴性对照抗体分别进行梯度稀释, 首孔 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 进行三倍稀释, 然后取 25  $\mu\text{L}$  加入到 ELISA 板中, 37°C 孵育 45 min;
- (7) 使用 PBST 洗板三次, 拍干;
- (8) 使用封闭液稀释 HRP 偶联的抗 His 抗体, 稀释度为 1:5000, 加入到 ELISA 板中, 每孔 50  $\mu\text{L}$ , 37°C 孵育 30 min;
- (9) 使用 PBST 洗板三次, 拍干;
- (10) 加入 TMB 显色底物, 每孔 50  $\mu\text{L}$ , 室温静置数分钟;
- (11) 加入 ELISA 终止液, 每孔 50  $\mu\text{L}$ , 在轻轻拍板使其混匀;
- (12) 使用酶标仪读取 450 nm 处的吸光度值。

## 2、流式细胞术实验

使用流式细胞术探究抗体的作用机制, 具体步骤如下:

- (1) 向 96 孔细胞培养板中加入连续梯度稀释的纳米抗体 25  $\mu\text{L}$ ;
- (2) 加入等体积的 MERS-CoV RBD-Fc 蛋白, 浓度为 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;
- (3) 室温振荡 30 min, 然后 37°C 静置 10 min;
- (4) 使用胰酶消化 Huh-7 细胞, 然后用 DMEM 完全培养基终止消化, 再用 FPBS (含 3% FPS 的 PBS) 洗涤细胞两次;
- (5) 加入适量 FPBS 将细胞浓度调整为  $5 \times 10^6$  个/mL, 然后加入到上述 96 孔细胞培养板中, 50  $\mu\text{L}/$ 孔;
- (6) 室温振荡 10 min, 然后 37°C 静置 30 min;
- (7) 将每孔的混合物转移到流式管中, 加入 1 mL FPBS, 然后离心 (500 $\times$ g, 4°C, 6 min) 弃去上清, 如此洗涤细胞 3 次;
- (8) 向流式管中加入 FPBS 稀释 (稀释度 1:1000) 的 FITC 标记的抗人 IgG-Fc 二抗, 每管 200  $\mu\text{L}$ ;
- (9) 使用铝箔纸包住流式管, 室温振荡 10 min, 然后 37°C 静置 30 min;
- (10) 使用 FPBS 洗涤细胞 3 次;
- (11) 用 200  $\mu\text{L}$  FPBS 重悬细胞并转移到 96 孔细胞培养板中, 用流式细胞仪进行检测。

## 3、细胞-细胞融合实验

使用 S 蛋白介导的细胞-细胞融合实验探究抗体对其的抑制作用。具体步骤如

下:

- (1) 将 293T 细胞铺至 T25 细胞培养瓶至汇合度为 70%~90%时进行转染;
- (2) 将 20  $\mu\text{g}$  MERS\_S- GFP- pcDNA3.1 质粒用 PBS 稀释至 1.25 mL、60  $\mu\text{L}$  PEI 用 PBS 稀释至 1.25 mL, 静置 10 min;
- (3) 将两者轻轻混匀, 再次静置 10 min;
- (4) 将 T25 细胞瓶内培养基弃去, 小心加入配好的转染混合物, 然后再添加 2.5 mL DMEM 高糖培养基, 置于孵箱孵育;
- (5) 18 h 后, 铺 Huh-7 细胞于 96 孔板,  $5 \times 10^4$  个/100  $\mu\text{L}$ /孔;
- (6) 孵育 5 h 后, 加入 50  $\mu\text{L}$  抗体或 DMEM。然后将转染了 MERS\_S- GFP- pcDNA3.1 质粒的 293T 细胞用胰酶消化、然后血清终止, 计数后加入到 96 孔板中,  $1 \times 10^4$  个/100  $\mu\text{L}$ /孔;
- (7) 孵育 4 h 后弃去培养基, 用 4%多聚甲醛固定 20 min;
- (8) 弃去多聚甲醛, 用 DAPI 进行染色 5 min;
- (9) 弃去 DAPI, 加入 PBS, 使用高内涵分析成像仪观察细胞并拍摄留存。

#### 4、抗体的识别表位解析

通过文献调研, 明确 RBD 上对其与 DPP4 结合起关键作用的氨基酸为: L506、D510、R511、E513、E536、D539、W553、V555、E565。将这些重要氨基酸一一突变为丙氨酸, 构建并制备一系列突变 RBD 蛋白, 通过 ELISA 鉴定抗体的识别位点。

本实验室已有 MERS-CoV RBD 野生株的表达载体 MERS\_ RBD- pFUSE, 其图谱如下:

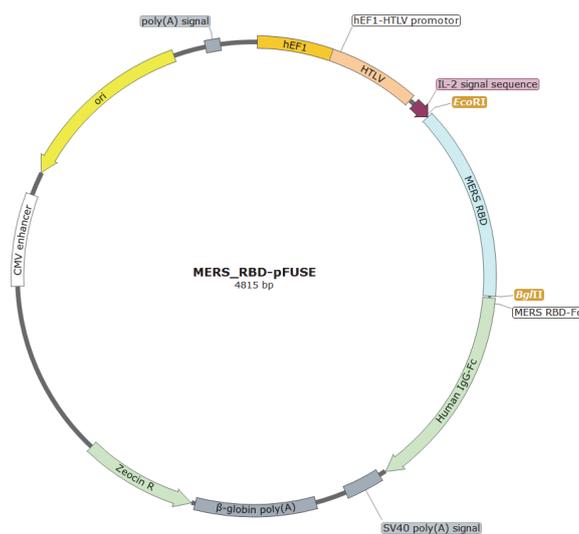


图 1.3 MERS\_ RBD- pFUSE 载体质粒图谱

首先使用无缝克隆试剂盒构建上述突变 RBD 的表达载体, 具体步骤如下:

(1) 设计引物, 思路为以突变位点为界将 RBD 分为上下游两部分, 分别扩增这两部分, D510A 突变体引物设计示例 (划线部分为突变的序列; 引物序列均为 5'→3'方向):

扩增片段	引物名称	引物序列
上游片段	MRBD-F	TCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGC
	D510A-R	GGCACTTCTGTCCT <u>AGCGT</u> CTGACAGCAGTC
下游片段	D510A-F	GACTGCTGTCAGAC <u>GCT</u> AGGACAGAAGTGCC
	MRBD-R	CTCCTCCC GCGGCTTTGTCTTGGCATT

- (2) 通过 PCR 扩增上下游片段;
- (3) 使用 *Eco* R I 和 *Bgl* II 双酶切 MERS\_RBD- pFUSE 载体质粒;
- (4) 使用琼脂糖凝胶电泳分离上下游片段和酶切后的载体;
- (5) 使用胶回收试剂盒回收片段和载体并测定其浓度;
- (6) 按照下列条件配制无缝克隆体系:

组分	体积
片段 1	15 ng
片段 2	15 ng
载体	200 ng
Basic Mix	5 $\mu$ L
无 DNase/RNase 水	将总体积补至 10 $\mu$ L

- (7) 将反应体系置于 50 金属浴反应 15 min;
- (8) 取 2  $\mu$ L 反应产物转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 转化步骤基本如前所述, 区别在于在冰浴 2 min 后需要复苏 1 h, 即冰浴 2 min 后加入 500  $\mu$ L 不含抗生素的 LB 液体培养基, 然后置于 37°C 恒温摇床振荡培养 1 h, 然后离心 (3000 $\times$ g, RT, 5 min) 弃去上清, 用 100  $\mu$ L 不含抗生素的 LB 液体培养基重悬菌体并均匀涂布于含博来霉素的 LB 固体培养板, 倒置于 37°C 孵箱培养约 10 h。

(9) 挑取单克隆进行菌液 PCR 鉴定, 将鉴定正确的菌液保菌并送测序公司进行测序;

- (10) 将测序序列与理论序列进行比对, 选择正确的菌株。

其次将正确的菌株复苏至 5 mL 含博来霉素的 LB 液体培养基, 然后如前所述大提质粒并测定浓度。

然后利用 293T 细胞表达重组 RBD 蛋白, 具体步骤为:

- (1) 将 293T 细胞铺至 T175 细胞瓶至汇合度为 70%~90%时进行转染;

(2) 将 140  $\mu\text{g}$  MERS\_RBD-pFUSE 质粒用 PBS 稀释至 6 mL、420  $\mu\text{L}$  PEI 用 PBS 稀释至 6 mL, 静置 10 min;

(3) 将两者轻轻混匀, 再次静置 10 min;

(4) 将 T175 细胞瓶内培养基弃去, 小心加入配好的转染混合物, 然后再添加 12 mL DMEM 高糖培养基, 置于孵箱孵育;

(5) 6 h 后弃去培养基并小心加入 30 mL 高糖 DMEM 培养基;

(6) 36 h 后收集培养基并添加 30 mL 新鲜高糖 DMEM 培养基, 36 h 后再次收集。

将两次收集的培养基一同使用 Protein A 亲和柱进行亲和层析, 层析方案参照说明进行, 具体步骤如下:

(1) 配制相关试剂, 样品和所有试剂均要使用 0.22  $\mu\text{m}$  滤器进行过滤;

(2) 让亲和柱中的保存液经重力自然流出, 控制其流速为 1 mL/min 左右 (整个纯化过程液体均经重力自然流出, 且流速均控制在 1 mL/min 左右, 每滴液体体积按 0.05 mL 计即为每三秒钟一滴);

(3) 加入 10 mL 洗脱缓冲液洗涤 (新启用的纯化柱无需洗脱缓冲液洗涤), 然后用 5 mL 结合/洗涤缓冲液平衡;

(4) 将样品加入到亲和柱中, 收集流出液 (大量样品分多次添加);

(5) 用 10 mL 结合/洗涤缓冲液洗脱非特异性结合的杂蛋白, 收集流出液;

(6) 用 10 mL 洗脱缓冲液洗脱目的蛋白, 收集流出液;

(7) 依次使用 3 mL 结合/洗涤缓冲液、5 mL 去离子水、5 mL 20%乙醇/PBS 洗涤树脂;

(8) 加入 5 mL 20%乙醇/PBS, 密封后保存于 4°C。

将收集的各组分液体进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 并用考马斯亮蓝染色、脱色液脱色, 分析各组分中目的蛋白的存在情况。

将洗脱缓冲液洗脱的含 RBD-Fc 蛋白成分加入 30 kDa 的超滤管中, 补足 PBS, 然后离心 (3000 $\times$ g, 4°C, 6 min)。如此重复至少 4 次以尽量去掉纯化产物中的柠檬酸等杂质。最后收集蛋白, 使用 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定其纯度、CBB 试剂盒 (Bradford 法) 测定其浓度。

以不同突变 RBD 蛋白包被 ELISA 板, 测定抗体与各突变蛋白之间的结合力。ELISA 步骤如前所述。

## 5、抗体空间结构预测

通过同源建模和分子对接的方法对 M34 和 MERS-CoV RBD 结合的结构进行了预测, 其步骤如下:

(1) 通过 SWISS-MODEL 在线网站 (<https://swissmodel.expasy.org/>)

interactive) 输入 M34 序列, 查找建模模板;

(2) 选择合适的模板对 M34 的空间结构进行预测, 并下载其 PDB 格式文件;

(3) 通过 ZDOCK 在线网站 (<http://zdock.umassmed.edu/>), 输入 M34 的结构预测结果以及已解析的 MERS-CoV RBD 结构数据 (PDB 号: 4kqz) 进行对接分析;

(4) 下载分子对接结果, 选择一个结果利用 PDBePISA 在线网站 ([https://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot\\_int/pistart.html](https://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html)) 进行结合界面分析。

## 1.3 实验结果

### 1.3.1 抗 MERS-CoV 特异性纳米抗体的筛选和制备

#### 1、抗 MERS-CoV 特异性噬菌体抗体的筛选和鉴定

分别以 MERS-CoV S 和 S1 蛋白对 MERS-CoV 纳米抗体库进行了四轮筛选, 第四轮筛选完毕后各自挑取了 192 个单克隆进行了 ELISA 鉴定, 鉴定结果如下:

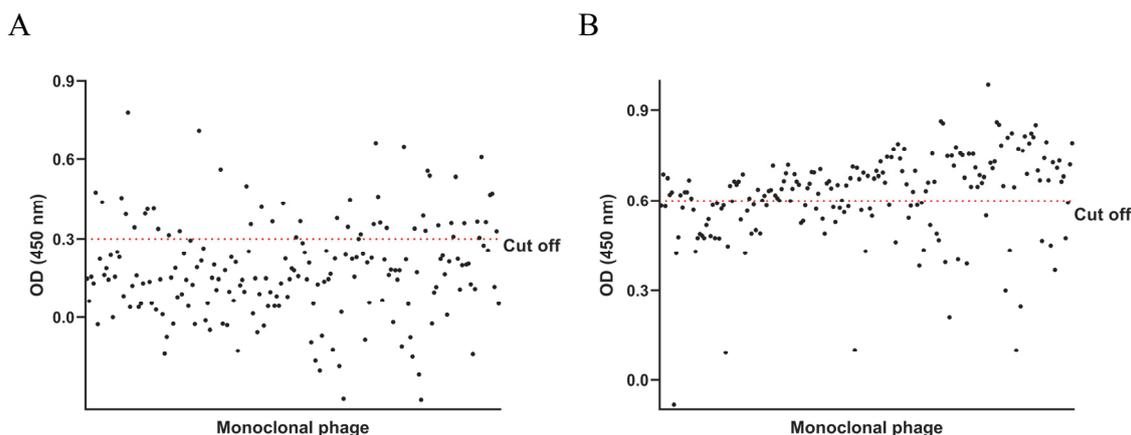


图 1.4 单克隆噬菌体抗体的 ELISA 鉴定

图 A 为 MERS-CoV S1 蛋白筛选的单克隆噬菌体 ELISA 鉴定。图 B 为 MERS-CoV S 蛋白筛选的单克隆噬菌体 ELISA 鉴定, 由于其  $OD_{450}$  值普遍较高, 因此设置了较高的 Cut off 值。

MERS-CoV S1 蛋白筛选的结果以  $OD_{450}$  值大于 0.3 为阳性克隆, 共有 48 个克隆。MERS-CoV S 蛋白筛选的结果以  $OD_{450}$  值大于 0.6 为阳性克隆, 共有 181 个克隆。

#### 2、抗 MERS-CoV 特异性纳米抗体的制备与鉴定

复苏阳性克隆对应的甘油菌, 然后将菌液送至测序公司进行测序。返回的测序结果中, MERS-CoV S1 和 S 各有 26 个和 44 个有效测序结果。将纳米抗体基因进行对比分析后, 对其进行分类, 共得到 8 类代表性氨基酸序列。取每一类的一个纳米抗体基因构建 pCold 表达载体, 转化至 BL21 进行抗体的表达, 然后使用

Ni-NTA 进行亲和层析。其中有 3 株抗体（命名为 M21、M32、M34）为上清表达且纯化后的抗体纯度相对较好，因此选择此三株抗体进行进一步研究。将纯化的三株纳米抗体进行 SDS-PAGE 电泳以初步鉴定其大小和纯度，其结果如下：

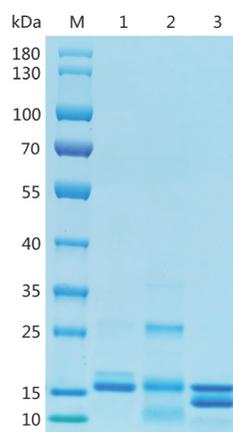


图 1.5 抗 MERS-CoV 纳米抗体 SDS-PAGE 鉴定

泳道 M: Marker; 泳道 1: M21; 泳道 2: M32; 泳道 3: M34。

可以看到，大部分纳米抗体的电泳条带大小与 Marker 的 15 kDa 条带相近，说明其分子量略大于 15 kDa，与预期相符。

### 3、抗 MERS-CoV 特异性纳米抗体的结合活性鉴定

对纳米抗体进行了 ELISA 分析，以测定纳米抗体与 MERS-CoV RBD-Fc 蛋白的结合活性，其结果如下：

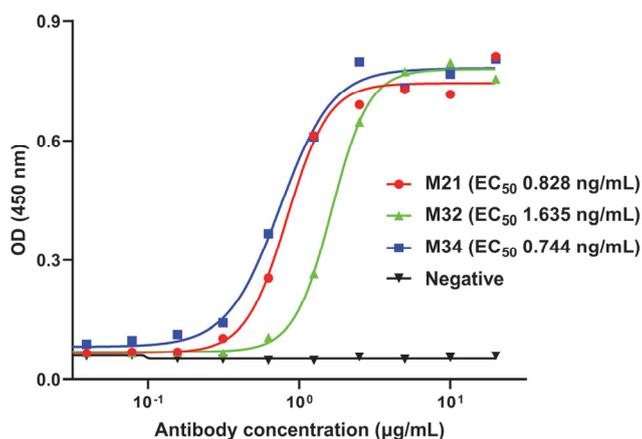


图 1.6 抗 MERS-CoV 纳米抗体 ELISA 鉴定

可以看到筛选的几株抗体与 MERS-CoV RBD 均具有较好的反应性，其半数效应浓度（ $EC_{50}$ ）分别为 0.828  $\mu\text{g/mL}$ （M21）、1.635  $\mu\text{g/mL}$ （M32）和 0.744  $\mu\text{g/mL}$ （M34）。

#### 4、通过突变假病毒中和试验鉴定抗体识别表位

选择其中亲和力较高的 M21、M32、M34 进行进一步的假病毒中和试验。这里使用了比较常用的突变成丙氨酸的方法来制备的突变假病毒，即 D539A，以此鉴定能够中和该突变假病毒的纳米抗体。

该假病毒携带有 MERS-CoV S 突变蛋白 (D539A 突变)，能够与表达人 DPP4 受体的 Huh-7 细胞结合，并介导假病毒进入细胞内，释放基因组，表达其基因组中的荧光素酶报告基因。当荧光素酶与其底物结合时，能够发光并被仪器检测到，其发光强弱与荧光素酶的表达量成正相关，间接反映了进入细胞的假病毒的数量。当抗体有效时，在一定范围内，抗体作用越强（或浓度越高），进入细胞内的假病毒越少，发光强度越弱，以此计算出的抑制率越高。其结果如下：

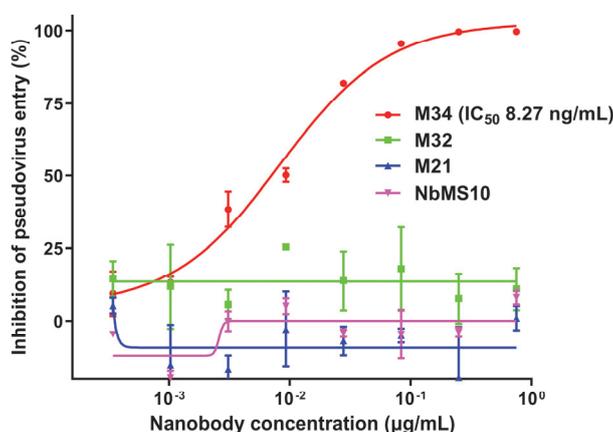


图 1.7 D539A 突变假病毒中和试验

抑制率以平均值±标准差 (n=2) 显示。

可以看到，M21、M32 和阴性对照 NbMS10 三株纳米抗体都不能有效阻止 D539A 突变假病毒进入细胞，而 M34 能够有效中和该假病毒（半数抑制浓度为 8.27 ng/mL），说明 M32 和 M21 的识别位点与 NbMS10 相同，而 M34 的识别位点不同。因此选择了 M34 进行后续研究。

#### 5、通过竞争性 ELISA 鉴定抗体识别表位差异

为了进一步验证 M34 与 NbMS10 识别表位的差异，进行了竞争性 ELISA。使用 MERS-CoV RBD-Fc 为包被抗原，与固定浓度的 NbMS10（带 His 标签）和梯度稀释的 M34-Fc（或 M21-Fc）共同孵育后，使用抗 His 抗体检测与 MERS-CoV RBD 结合的 NbMS10 的量。实验结果如下：

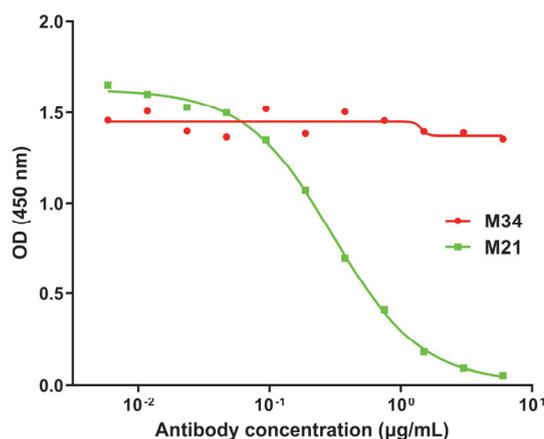


图 1.8 竞争性 ELISA

结果显示,随着 M34-Fc 浓度的升高,OD<sub>450</sub> 基本保持不变,说明与 MERS-CoV RBD 结合的 NbMS10 未受到明显影响;而随着 M21-Fc 浓度的升高,OD<sub>450</sub> 逐渐减小,说明与 MERS-CoV RBD 结合的 NbMS10 逐渐减少。此实验表明 M21 与 NbMS10 竞争性结合 MERS-CoV RBD,而 M34 不与 NbMS10 竞争性结合 MERS-CoV RBD,因此, M34 和 NbMS10 应该结合在 MERS-CoV RBD 上不同的位置,进一步证实 M34 与 NbMS10 识别 MERS-CoV RBD 上的不同表位。

#### 6、通过生物膜层干涉技术鉴定抗体识别表位

为了进一步验证 M34 与 NbMS10 识别表位的差异,通过生物膜层干涉技术探究了 NbMS10 和 M34 抗体同时与 MERS-CoV S1 相互作用的情况。将 MERS-CoV S1 蛋白结合到光纤材质抗 His 探针末端时会形成一层生物膜,入射光到达该膜层后会透射和反射形成干涉光波。当抗体与 S1 蛋白结合时会引起探针末端生物膜厚度发生改变,导致干涉光波发生相对位移,此位移被光谱仪检测到,形成干涉光谱,以干涉图谱的实时位移显示出来,然后就可以分析两者之间的相互作用。

先用探针吸附 MERS-CoV S1 蛋白,然后与第一个抗体结合至饱和,再与第二个抗体结合。其结果如下:

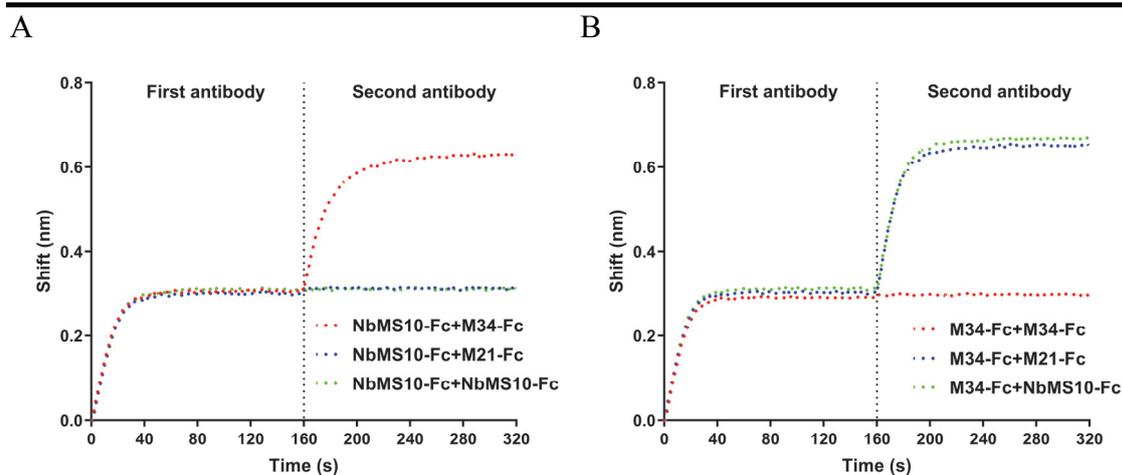


图 1.9 生物膜层干涉实验

图 A 为探针吸附 MERS-CoV S1 蛋白后先与 NbMS10-Fc 结合, 然后每个探针再各自与 M34-Fc、M21-Fc 或 NbMS10-Fc 结合。图 B 为探针吸附 MERS-CoV S1 蛋白后先与 M34-Fc 结合, 然后每个探针再各自与 M34-Fc、M21-Fc 或 NbMS10-Fc 结合。

在前面 MERS D539A 突变假病毒中和实验结果中, M21 并不能有效中和该突变假病毒, 说明该抗体识别的表位可能也是 Asp539。而在此处的结果可以看到, 当 MERS-CoV S1 与抗体 NbMS10-Fc 结合至饱和时, 还能继续与抗体 M34-Fc 结合, 而不能与 M21-Fc 结合。而当 MERS-CoV S1 与抗体 M34-Fc 结合至饱和时, 还能继续与抗体 NbMS10-Fc 或 M21-Fc 结合。说明 M34-Fc 与 NbMS10-Fc (以及 M21-Fc) 识别位点不同且相距较远, 两者与 MERS-CoV S1 蛋白结合时不存在空间阻位, 能够同时与后者结合。

### 1.3.2 MERS-CoV 特异性抗体的生物学功能评价

#### 1、结合活性测定

将纳米抗体进行了 ELISA, 以测定 M34-Fc 抗体和 MERS-CoV S1 蛋白的结合力。使用 MERS-CoV S1 为包被抗原, 与梯度稀释的 M34-Fc 共孵育后, 通过抗 Fc 标签抗体检测结合的 M34-Fc 的量, 其结果如下:

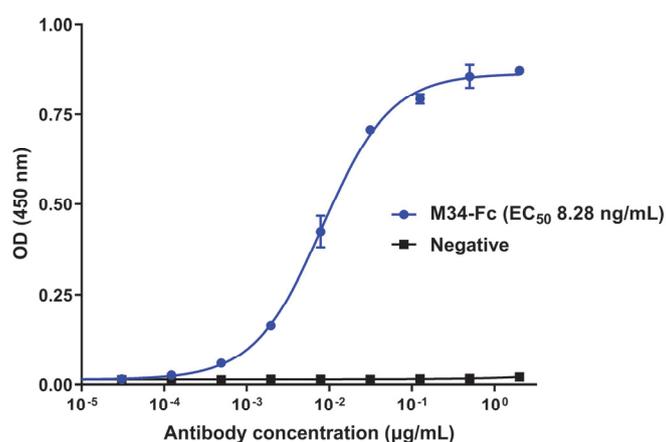


图 1.10 M34-Fc 与 MERS-CoV S1 蛋白的 ELISA 鉴定

OD (450 nm)以平均值±标准差 (n=2) 显示。

可以看到，M34-Fc 抗体与 MERS-CoV S1 蛋白具有较好的结合活性，使用 Graph Pad Prism 算得其半数效应浓度 ( $EC_{50}$ ) 为 8.28 ng/mL。

## 2、亲和力测定

通过生物膜层干涉技术测定了 M34-Fc 抗体与 MERS-CoV S1 的平衡解离常数。将 MERS-CoV S1 蛋白结合到光纤材质抗 His 探针末端时会形成一层生物膜，入射光到达该膜层后会透射和反射形成干涉光波。当 M34 与 S1 蛋白结合时会引起探针末端生物膜厚度发生改变，导致干涉光波发生相对位移，此位移被光谱仪检测到，形成干涉光谱，以干涉图谱的实时位移显示出来，通过 Gator 软件对测定结果进行曲线拟合，拟合成的曲线如下图所示：

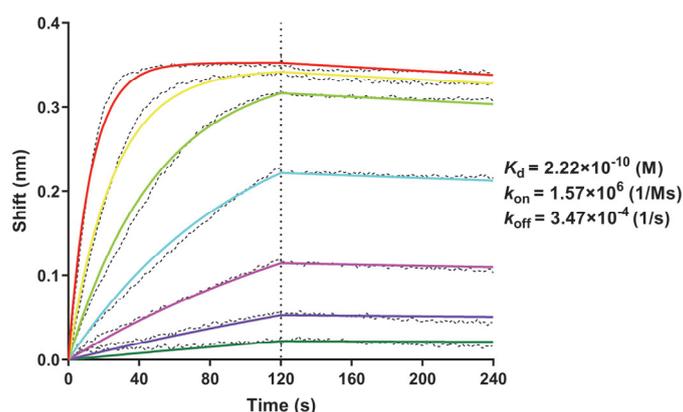


图 1.11 生物膜层干涉技术

通过 Gator 软件计算得两者之间的平衡解离常数为 222 pM，说明 M34-Fc 与 MERS-CoV S1 具有较高的亲和力。

### 3、假病毒中和活性测定

使用 MERS-CoV 假病毒中和试验测定了抗体的中和活性。MERS-CoV 假病毒携带有 MERS-CoV S 蛋白，能够与表达人 DPP4 受体的 Huh-7 细胞结合，并介导假病毒基因组进入细胞内，表达其基因组中的荧光素酶报告基因。当荧光素酶与其底物结合时，能够发光并被仪器检测到，其发光强弱与荧光素酶的表达量成正比，间接反映了进入细胞的假病毒的数量。其结果以抑制率表示，计算方法为扣除细胞背景值后，加抗体孔与不加抗体孔相对光单位的减少率。在这里，我们对带有两种标签的 M34（His 标签和 Fc 标签）进行了假病毒中和活性，结果如下：

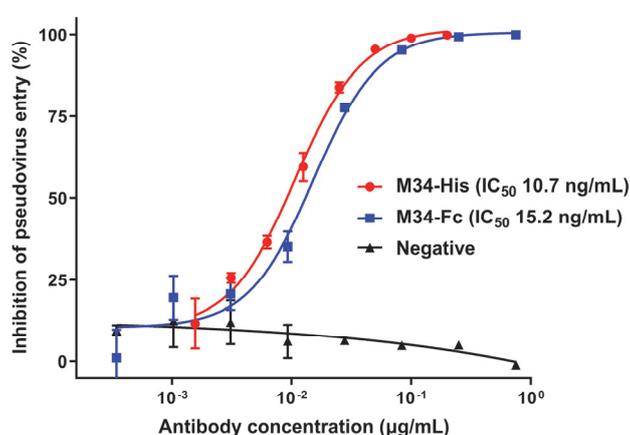


图 1.12 M34 假病毒中和试验

抑制率以平均值±标准差 (n=2) 显示。

使用 Graph Pad 算得 M34-His 和 M34-Fc 的半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 分别为(10.69 ± 0.375) ng/mL 和(15.20 ± 0.825) ng/mL (n=2)，而作为阴性对照的抗 SARS-CoV 抗体其抑制率基本在 0 左右，表明其不能抑制假病毒进入细胞。然后我们使用成组 t 检验对不同标签的 M34 的假病毒中和活性进行了分析，其结果如下：

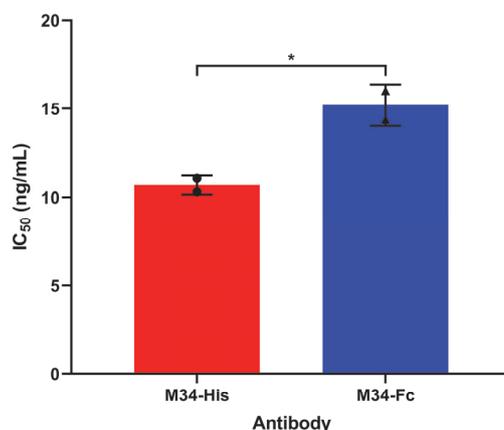


图 1.13 抗体不同标签的假病毒中和活性比较

半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 以平均值±标准差 (n=2) 显示。计算得到 p 值为 0.0381, \*表示 p<0.05。

通过 GraphPad 算得其 p 值为 0.0381, 差异具有统计学意义, 说明 M34-His 的假病毒活性比 M34-Fc 要好。分析其原因, 可能是由于 M34-His 的分子量较小所致 (M34-His 分子量在 15 kDa 左右, M34-Fc 分子量在 42 kDa 左右, 后者分子量是前者的 2.8 倍), 相同质量的情况下, 较小分子量的抗体具有更多的摩尔数量, 因而具有更好的中和能力。

此外, 还验证了 M34 抗体对不同突变株的交叉保护作用。从美国国家生物技术信息中心病毒数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/viruses/variation/>) 上下载了从 2012 年到 2019 年收集的 MERS-CoV S 基因序列数据, 共收集到 750 条序列 (其 GenBank 编号见附录 B), 分析其 RBD 突变情况, 结果如下表所示:

	483	53	31	29	26	19	9	8	7	4	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1		
379	E																														D		
381	V										F																						
387	P																															L	
390	S									F	F	F																				F	
399	F																																
400	K																																
406	N																																
411	L	F																															
413	K																																
419	S																																
424	T					I																											
426	S																																
431	A																																
434	A																																
443	L																																
448	Y																																
450	L											F																					
457	S													G																			
459	S	T																															T
460	S																	F															
461	A																																
465	S						F																										
473	F		S																														
482	A																																
485	P																		S														
495	L							F																									
501	N																						D										
503	C																																
506	L																						F										
507	L																						P										
509	D													G																			
510	D								G																								
511	R																																
513	E																																
514	V																																L
515	P																																
520	A																																
522	Q																																
528	S									P																							
529	I				T																												
530	V																						A	L									
532	S																																
534	V																								A								
536	E														K																		
537	D																																
539	D																																
553	W																											R					
556	A																												V				
559	S																																
560	T																I																
575	V																																F
582	N																																
584	V																																
585	C																																
588	L							F									I																



图片中左侧竖列数字为 MERS-CoV RBD 有突变位点的氨基酸 IMGT (the international ImMunoGeneTics, 国际免疫遗传学) 位置编号, 顶端横列数字为病毒株数量。以 HCoV-EMC/2012 株 (GenBank 号: NC\_019843) 为野生株参照, 有 483 株未发生突变, “|” 表示该位置无突变。

选择了 8 个代表性突变位点, 即 L411F、T424I、S459T、S465F、F473S、L495F、D510G、I529T, 制备相应的突变假病毒, 然后检测抗体对假病毒的中和活性。选择的突变株序列和测定的半数抑制浓度平均值 ( $n=2$ ) 如下表所示:

表 1.1 M34 对 MERS-CoV 不同突变假病毒的交叉中和活性

Mutations	IC <sub>50</sub> (ng/mL)
L411F	16.45
T424I	12.30
S459T	12.54
S465F	1.192
F473S	6.974
L495F	8.549
D510G	8.119
I529T	8.659

可以看到, M34-Fc 对选择的各个突变株假病毒均具有较好的中和活性。

#### 4、活病毒中和活性测定

活病毒中和活性测定采用空斑减少中和试验, 由中国疾病预防控制中心在生物安全防护三级实验室完成。将 MERS-CoV 活病毒与梯度稀释的抗体等体积混合孵育, 然后将混合物加到 Vero 中继续孵育, 再加入覆盖液继续培养。72 h 后对细胞进行固定和染色。当病毒感染了细胞, 病毒会在细胞中大量复制、增殖, 使细胞破解死亡。由于固体介质的限制, 释放的病毒只能由最初感染的细胞向临近有限扩展, 经过几个增殖周期, 便形成一个局限性病变细胞区, 经染色后即为一个空斑。当 M34 对病毒有中和效果时, 会使病毒无法进入细胞, 导致空斑数目减少甚至无法形成空斑, 以空斑减少的数量评价抗体的中和能力。空斑结果如下图所示:

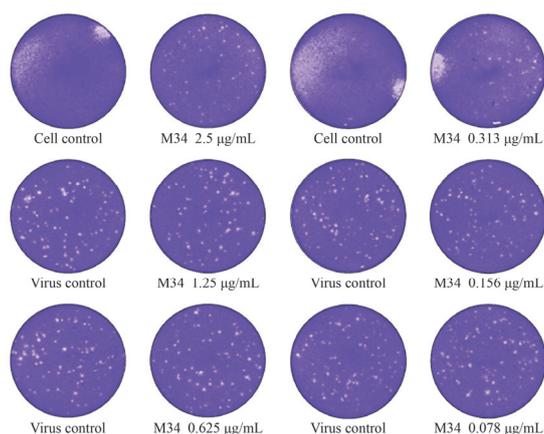


图 1.15 空斑减少中和试验

各孔对应空斑数目为:

0	41	0	80
80	67	94	82
113	74	83	83

计算得到 M34 的半数中和浓度为 2.25 µg/mL。

### 1.3.3 MERS-CoV 特异性抗体的中和机制研究

#### 1、与受体竞争性结合抗原探究

使用竞争性 ELISA 探究了 M34-Fc 对 MERS-CoV RBD 与 DPP4 结合的影响。以 MERS-CoV RBD-Fc 蛋白包被 ELISA, 然后加入梯度浓度的 M34-Fc 和固定浓度的 DPP4 蛋白 (His 标签) 共同孵育, 再用抗 His 抗体检测与 RBD 结合的 DPP4 的量, 其结果如下:

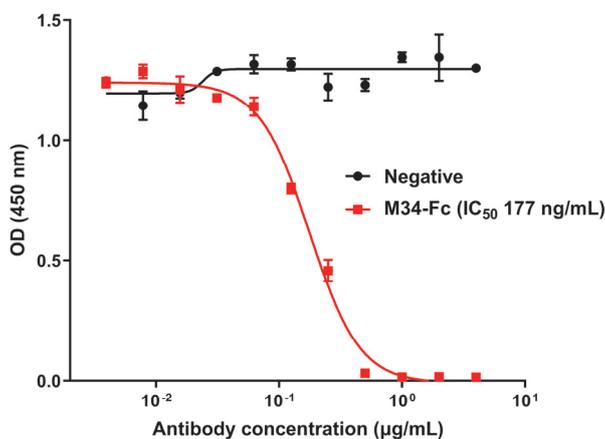


图 1.16 竞争性 ELISA

OD (450 nm)以平均值±标准差 (n=2) 显示。

从图上可以看到，随着 M34-Fc 浓度的升高，OD<sub>450</sub> 值逐渐减小，表明与 RBD 结合的 DPP4 在减少；而随着阴性对照抗体浓度的升高，OD<sub>450</sub> 值几乎没有变化，表明与 RBD 结合的 DPP4 没有变化；这些结果说明 M34-Fc 与 DPP4 竞争性结合 MERS-CoV RBD。

## 2、阻断抗原与细胞受体结合探究

使用流式细胞术实验探究抗体对 MERS-CoV RBD 与细胞表面受体 DPP4 之间相互作用的影响。将 M34 与 RBD（带人 IgG-Fc 标签）共同孵育后，再与表达 DPP4 受体的 Huh-7 共同孵育，再通过 FITC 标记的抗人 IgG-Fc 抗体间接检测与细胞结合的 RBD 的数量。其结果如下图所示：

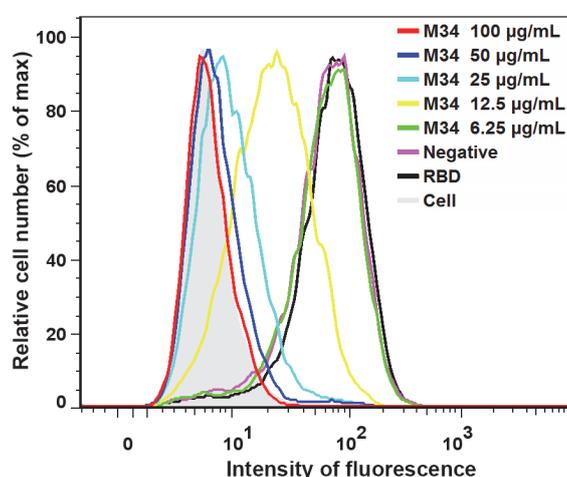


图 1.17 流式细胞术实验

从图上可以看到，当 M34 浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时，从对应的细胞检测到的荧光强度与细胞背景相差无几，说明此时 RBD 几乎不能与细胞表面受体结合。当 M34 浓度减小时，荧光强度逐渐增强，说明与细胞结合的 RBD 逐渐变多。当 M34 浓度减小至 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时，荧光强度与阴性对照相似，说明此时 M34 几乎不影响 RBD 与细胞受体的结合。以上结果说明 M34 通过阻断 RBD 与受体的结合发挥作用。

## 3、抑制细胞-细胞融合探究

通过抑制合胞体形成实验探究了 M34 的作用机制。首先以携带 MERS-CoV S-GFP 的基因质粒转染 293T 细胞，使其融合表达 MERS-CoV S 蛋白和 GFP，其中 MERS-CoV S 蛋白表达在细胞表面，GFP 表达在细胞内。然后与 Huh-7 细胞在有/无抗体的条件下共同孵育，一定时间后观察细胞的融合情况，其结果如下图所示：

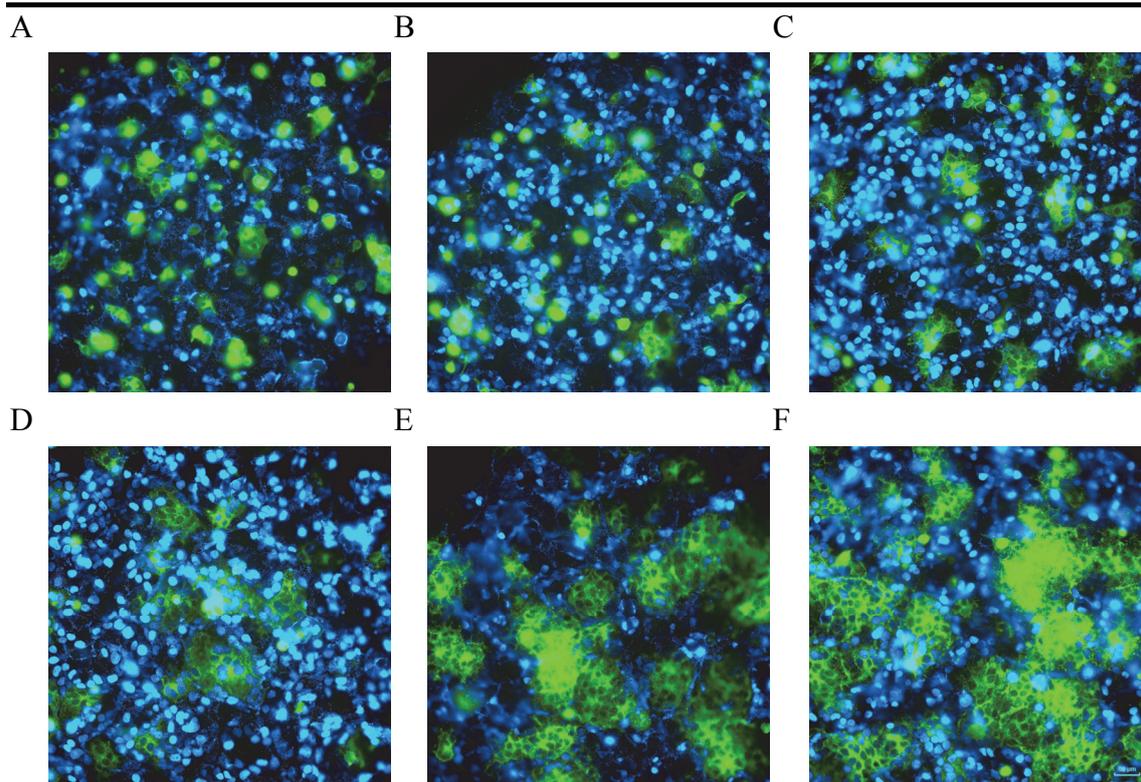


图 1.18 细胞-细胞融合实验

图 A~D: 浓度分别为 200  $\mu\text{g/mL}$ 、100  $\mu\text{g/mL}$ 、50  $\mu\text{g/mL}$ 、25  $\mu\text{g/mL}$  的 M34 抗体。图 E: 浓度为 200  $\mu\text{g/mL}$  的 SARS-CoV 抗体。图 F: 无任何抗体。

可以看到，当高浓度抗体 M34 存在时，带有 GFP 的细胞大多呈单个存在；随着 M34 浓度的降低，出现融合的细胞渐渐变多，且体积变大；而在阴性对照 SARS-CoV 抗体存在或没有任何抗体存在的情况下，可以明显看到多个带有 GFP 的细胞融合成团且体积巨大，多个被 DAPI 染成蓝色的细胞核位于其中，说明表达 MERS-CoV S 蛋白的 293T 细胞与表达 DPP4 受体的 Huh-7 相互融合，形成一个较大的合胞体，而 M34 抑制了这种合胞体的形成。这从另一方面也证明了 M34 能够抑制 RBD 与受体的结合。

#### 4、识别表位鉴定

首先通过文献调研获悉了在 RBD 上 9 个与 DPP4 结合起重要作用的氨基酸，分别为：D510、R511、E513、E536、D539、W553、V555、E565。通过已有的 MERS-CoV RBD-Fc 表达载体（带有 C 端人 IgG 标签），将上述位点的氨基酸突变为丙氨酸，构建了 9 个突变体表达载体（L506A、D510A、R511A、E513A、E536A、D539A、W553A、V555A、E565A），经测序验证正确后，大提质粒，然后使用 293T 表达了突变蛋白，并经 Protein A 柱进行了层析。将制备好的突变体蛋白进行了 SDS-PAGE 鉴定，其结果如下：

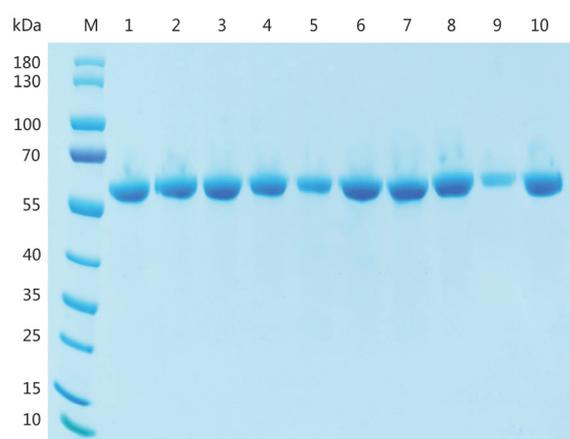


图 1.19 MERS-CoV RBD 突变体蛋白 SDS-PAGE 鉴定

泳道 1~10 分别为 MERS-CoV RBD 野生株、L506A、D510A、R511A、E513A、E536A、D539A、W553A、V555A、E565A。

可以看到，经纯化的 RBD 野生株及其突变体蛋白都具有较高的纯度，于是利用这些蛋白对 M34 进行了表位鉴定。分别使用这些突变蛋白包被 ELISA 板，然后与梯度稀释的 M34（带 His 标签）共同孵育，再用抗 His 标签检测与 RBD 野生株及其突变体结合的 M34 的量，其结果如下：

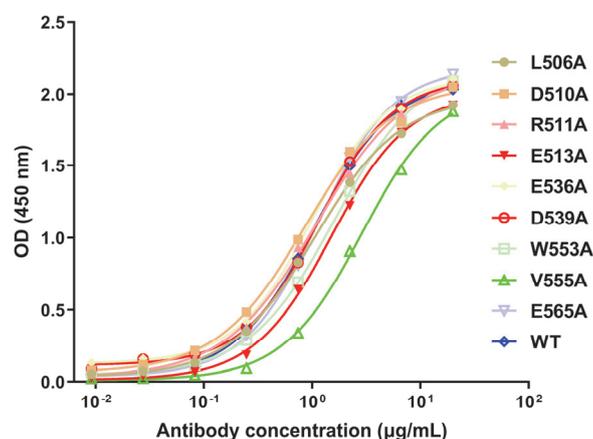


图 1.20 M34 识别表位分析

可以看到，M34 与 MERS-CoV RBD 野生株及其突变体均有较好的结合，说明 M34 识别的表位可能不在前述 9 个位置。

#### 5、空间结构预测

通过 SWISS-MOEDL 对 M34 序列进行分析查找，选取了序列相似度较和评分均较高的一个纳米抗体（结构已解析，PDB 号：6r7t）进行同源建模，然后利用 ZDOCK 对预测模型和 MERS-CoV RBD 结构数据（PDB 号：4kqz）进行对接分析，

选择其中一个对接模型利用 PDBePISA 进行交互作用位点分析，其结果如下图所示：

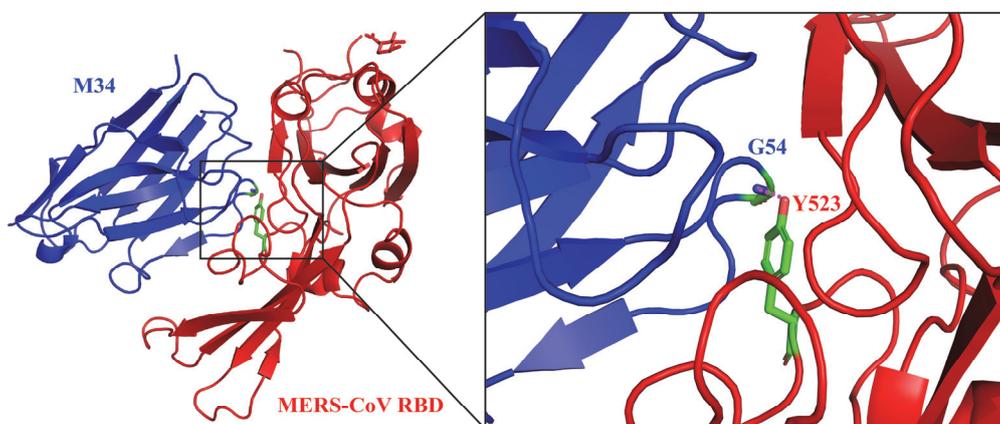


图 1.21 M34 与 MERS-CoV 结合的空间结构预测

蓝色的为 M34，红色的为 MERS-CoV RBD。M34 上的 G54 和 MERS-CoV RBD 上的 Y523 之间存在一个氢键（洋红色点）。

预测的结果为：M34 上的 G54 和 MERS-CoV RBD 上的 Y523 通过一个氢键相互作用。

## 1.4 讨论

本部分研究分别使用了 MERS-CoV S1 和 S 蛋白对 MERS-CoV RBD 特异性抗体库进行了筛选，数轮筛选完毕后挑取了单克隆菌落进行了 ELISA 鉴定，从中选取 OD<sub>450</sub> 较高者进行了测序。对测序结果进行序列对比与分析，共获得了 8 类代表性抗体。将此 8 类纳米抗体基因构建至 pCold I 载体，利用大肠杆菌进行表达，除去构建失败、上清表达量低的纳米抗体，最终制备了 3 株纳米抗体。通过突变假病毒中和试验、竞争性 ELISA 和生物膜层干涉实验鉴定出一株识别位点不同的纳米抗体。然后通过 ELISA、生物膜层干涉实验、假病毒中和试验、空斑减少中和试验等对该抗体进行了生物学功能评价，通过竞争性 ELISA、流式细胞术实验、细胞-细胞融合实验等探究了该抗体的中和机制。

通过参阅文献以及对 MERS-CoV 与 DPP4 复合物界面（PDB 号：4I72）氨基酸残基的分析，我们选择了 9 个比较突出的氨基酸（L506、D510、R511、E513、E536、D539、W553、V555 和 E565A），制备了一系列突变 RBD 蛋白，尝试通过 ELISA 的方法解析 M34 的识别表位。结果显示，M34 与这些突变 RBD 蛋白的反应性良好，说明 M34 识别的位点可能不在这 9 个氨基酸之列。随后我们又使用了

同源建模和分子对接的方法对 M34 与 RBD 结合的结构进行了预测,然而预测结果并不总是可靠。因此需要分析并制备更多的突变蛋白,通过 ELISA 解析其确切的识别表位,而不是靠预测。或者最直接的方法是通过 X 射线晶体衍射或冷冻电镜的方法解析 M34 与 RBD 结合的空间结构,通过空间结构数据分析其识别位点。事实上,我们已经和中国科学院生物物理研究所进行了合作,尝试通过冷冻电镜的方法解析 M34 与 RBD 结合的空间结构。然而截至本文成文时,仍未返回冷冻电镜的任何结果。期待这一项实验尽快完成,以便对 M34 的中和机制有一个更加深入、更加直观的理解。

纳米抗体分子量小,对于其作为治疗药物而言也有不利的一面。由于纳米抗体分子量在 15 kDa 左右,而肾清除率的临界值为 50 kDa<sup>[96]</sup>,因此纳米抗体能够通过肾小球滤膜,导致其在血液中存在的时间很短。针对这个不足,目前发展出了一些长效化的方法,主要包括聚乙二醇化、与 Fc 或人血清白蛋白融合等。本实验选择了与 Fc 融合表达,一方面 Fc 能够形成二聚体,与 Fc 融合表达后其二聚体分子量在 80 kDa 左右,另一方面 Fc 能够与血管内皮细胞表达的新生儿受体 FcRn 相互作用,保护抗体不受降解<sup>[97]</sup>。前期本实验室通过实验证实了该策略的有效性:将抗 MERS-CoV 特异性纳米抗体 NbMS10 和带人 IgG-Fc 片段的抗体 NbMS10-Fc 注射到小鼠体内<sup>[44]</sup>,在不同时间间隔后收集小鼠血清,并通过 ELISA 检测血清中与 MERS-CoV S1 结合的抗体的量;结果发现与单体 NbMS10 相比,NbMS10-Fc 的体内半衰期显著延长;并且通过进一步体内实验发现,NbMS10-Fc 能对受致死剂量 MERS-CoV 攻击的 DPP4 转基因小鼠起到很好的预防和治疗作用。

与 Fc 融合后的 M34-Fc,其与 MERS-CoV S1 的平衡解离常数为 222 pM,假病毒中和的半数抑制浓度为 15.2 ng/mL,我们将其与其他抗体进行了比较,如表 1.2 (见下页)所示。

可以看到,与已报道的众多抗 MERS-CoV 中和抗体相比,M34 的在亲和力和中和活性方面处于中等水平。值得注意的时,这种比较仅供参考,因为不同实验室的标准操作规程(SOP)不同,得出的结果也会有所差异。

此外,不少抗体的识别位点与本研究中所选择的位点大不相同,如 Y540、R542、Q544、W535、T489、K493、D455、T512、V534、Y397、K400、L495 等等,因此后续会尝试制备这些突变蛋白进行 M34 的识别位点解析。尽管我们对 M34 与 RBD 的结合界面进行了预测,但是预测结果很多,我们只是选择了其中的一个较好的结果进行了展示。通过制备不同的突变 RBD 进行表位识别是一项耗时耗力的工作。最直接的方法还是通过 X 射线晶体或者冷冻电镜的方法进行结构解析,然而大部分实验室并不具备相应的仪器设备和条件。因此,如何简单快捷地明确抗体的识别位点也是一个值得探究的科学问题。

表 1.2 不同 MERS-CoV 抗体的比较

抗体名称	来源及形式	亲和力 (pM) <sup>a</sup>	中和活性 (ng/mL) <sup>b</sup>	可能识别位点	参考文献
m336	人 IgG	99.4	5.0	L506、D510、E536、D539、W553、V555	[33]
m337	人 IgG	823	- <sup>c</sup>	L506、D510、W553、V555	[33]
m338	人 IgG	559	-	D510、W553	[33]
MCA1	人 IgG	-	-	D539、Y540、R542、Q544、E536、W535、D510	[34]
LCA60	人 IgG	120	-	T489、K493、E565、E536	[35]
MERS-4	人 IgG	980	0.37 (nM)	D455、E513、R542	[36]
MERS-27	人 IgG	71200	64.0 (nM)	-	[36]
3B11	人 IgG	57	-	T512、Y540、R542	[37]
RENG3051	人 IgG	43~48	65 (pM)	-	[38]
RENG3048	人 IgG	43~48	70 (pM)	V534	[38]
4C2	鼠 Ig	60300	710	Y397、K400、L495、P525、V527、W535、D539	[39]
2E6	鼠 Ig	162000	290	-	[39]
Mersmab1	鼠 Ig	-	-	L506A、D510A、R511A、E513A、W553A	[40]
D12	鼠 IgG	6630	13	S532、W535、E536	[42]
F11	鼠 IgG	3490	8	D509	[42]
5F9	鼠 Ig	5420	200	-	[43]
NbMS10-Fc	嵌合纳米抗体	350	67	D539	[44]
HCAb-83	嵌合纳米抗体	-	-	D539	[45]

a: 结合力以平衡解离常数计; b: 中和活性以假病毒半数抑制浓度计; c: 文中未展示具体值。

## 第二章 抗 MERS-CoV 双表位中和抗体的构建与鉴定

### 引言

前期本实验室已经筛选到识别位点为 Asp539 的抗体 NbMS10, 而在上一章我们筛选到识别位点不同的抗体 M34, 因此本部分的设计思路是通过一个短肽(氨基酸序列为 GGGGS)将两者进行连接以构建双表位抗体, 并在其 C 端添加人 IgG-Fc 标签, 通过哺乳动物细胞进行表达和纯化, 然后通过 ELISA、生物膜层干涉实验、假病毒中和试验等一系列方法对改造的抗体进行生物学功能的评价。

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 细胞

293T(人肾上皮细胞)细胞由本实验室保存。Huh-7(人肝癌细胞)细胞由本实验室保存。

#### 2.1.2 蛋白质

MERS-CoV S1 蛋白(40069-V08H)购自北京义翘神州科技有限公司。

#### 2.1.3 主要试剂(盒)

96 孔酶标板(CORNING, 9018)、ELISA 包被液(索莱宝, C1050)、牛血清白蛋白(索莱宝, A8020)、单组份 TMB 显色液(索莱宝, PR1200)、终止液(索莱宝, C1058)、PBS(Gibco, C10010500BT)、DMEM 高糖培养基(Gibco, 11995081)、胰酶(Gibco, 25200056)、青霉素/链霉素(Gibco, 15070063)、胎牛血清(PAN, P30-3302)、荧光素酶底物(Perkin Elmer, 6066761)等。

HRP 偶联的山羊抗人 IgG-Fc 抗体(ImmunoResearch, 109-035-008)等。

#### 2.1.4 主要仪器

分子相互作用分析仪(Probe life, Gator)、酶标仪(BioTeck)、洗板机(BioTeck)等。

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 MERS-CoV 特异性双表位中和抗体的构建与制备

将纳米抗体 NbMS10 和 M34 通过一个短肽 (GGGGS) 进行连接, 然后在其 C 端加上人 IgG-Fc 片段, 命名为 1034-Fc, 其结构示意图如下:

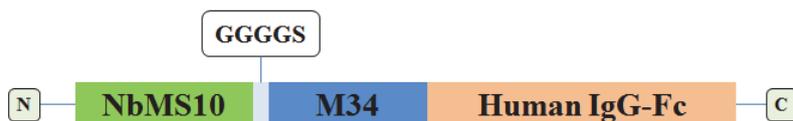


图 2.1 1034-Fc 抗体结构示意图

1034-Fc 抗体的表达及纯化由三优生物医药 (上海) 有限公司完成, 其实验过程简述如下: 合成抗体基因到真核表达载体上, 通过转染将重组载体导入到 Expi 293 细胞进行表达, 然后使用 Protein A 亲和层析进行纯化。

然后通过 SDS-PAGE 凝胶电泳对该抗体进行鉴定。

### 2.2.2 MERS-CoV 特异性双表位抗体的生物学功能评价

#### 1、酶联免疫吸附试验

通过 ELISA 测定 1034-Fc 与 MERS-CoV S1 蛋白的结合力, 其步骤基本同前。

#### 2、生物膜层干涉实验

利用生物膜层干涉技术测定 1034-Fc 与 MERS-CoV S1 蛋白的平衡解离常数, 其步骤基本同前。

#### 3、假病毒中和试验

通过假病毒中和试验测定 1034-Fc 的中和活性, 其步骤基本同前。

#### 4、动物活体成像

通过小动物活体成像对 1034-Fc 和 M34-Fc 的体内保护效果进行了评价。该实验由中国食品药品检定研究院完成, 实验步骤摘录如下:

(1) 将人 DPP4 基因敲入小鼠随机分为三组, 每组 4 只, 每组分别注射 1034-Fc、M34-Fc 和 PBS, 抗体剂量为 1 mg/kg 体重, PBS 体积与抗体等同, 为 300  $\mu$ L;

(2) 6 h 后从腹腔注射  $10^7$  TCID<sub>50</sub> 的 MERS-CoV 假病毒;

(3) 8 天后麻醉小鼠, 腹腔注射荧光素酶底物, 剂量为 150 mg/kg, 等待 10 min;

(4) 将小鼠放入活体成像仪中进行成像。

## 2.3 实验结果

### 2.3.1 MERS-CoV 特异性双表位中和抗体的制备

利用 Expi 293 细胞表达了 1034-Fc，纯化后通过 SDS-PAGE 凝胶电泳抗体进行鉴定，其结果如下：

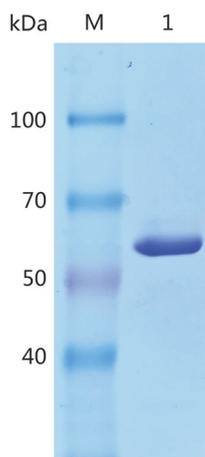


图 2.2 1034-Fc 抗体 SDS-PAGE 鉴定

可以看到，制备的 1034-Fc 抗体具有较高的纯度，其分子量在 55~60 kDa 之间，与预期相符。

### 2.3.2 MERS-CoV 特异性双表位中和抗体的生物学特征分析

#### 1、结合活性测定

通过 ELISA 测定了 1034-Fc 与 MERS-CoV S1 蛋白的结合活性，其结果如下：

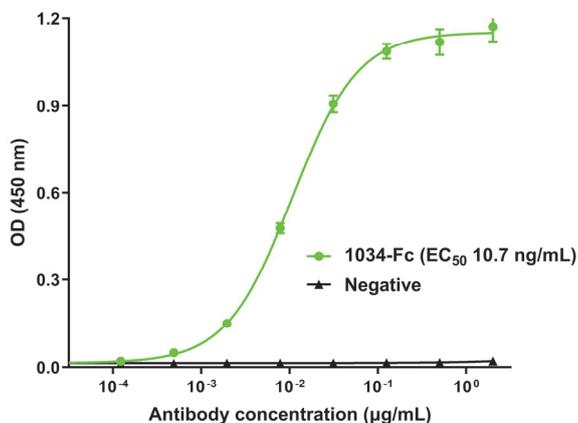


图 2.3 1034-Fc 与 MERS-CoV S1 蛋白的 ELISA 测定

OD (450 nm)以平均值±标准差 (n=2) 表示。

可以看到, 1034-Fc 与 MERS-CoV S1 蛋白具有较好的反应性, 其半数效应浓度为 10.7 ng/mL。

## 2、亲和力测定

利用生物膜层干涉技术测定了 1034-Fc 与 MERS-CoV S1 蛋白的平衡解离常数, 其结果如下:

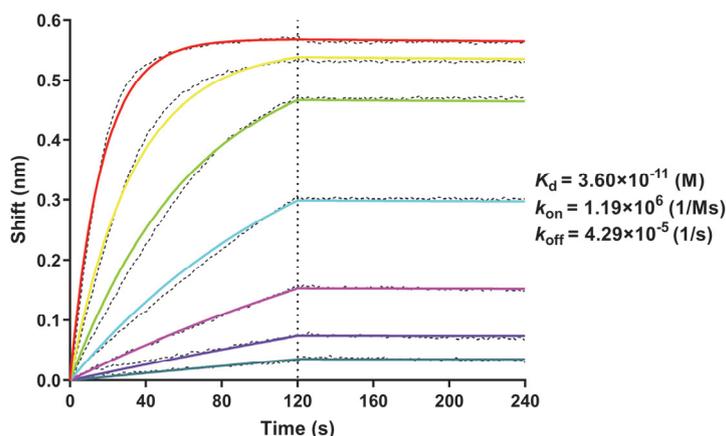


图 2.4 生物膜层干涉实验

通过 Gator 软件对干涉波长的位移进行拟合, 算得两者的平衡解离常数为 36 pM。

## 3、假病毒中和活性测定

通过假病毒中和试验测定了 1034-Fc 抑制 MERS-CoV 假病毒进入靶细胞的能力, 其结果如下:

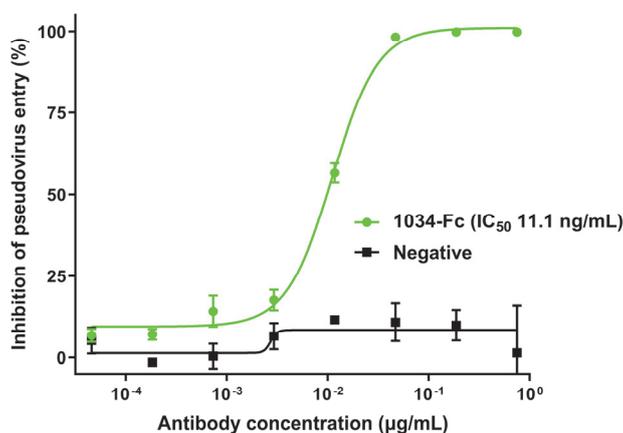


图 2.5 1034-Fc 的假病毒中和实验

抑制率以平均值±标准差 (n=2) 表示。

通过 GraphPad 计算其半数抑制浓度为  $11.07 \pm 0.485$  ng/mL (平均值 $\pm$ 标准差)。将双表位抗体 1034-Fc 与 M34-Fc 和 NbMS10-Fc 的假病毒中和活性进行了对比分析, 通过单因素方差分析 (one-way ANOVA) 比较它们之间是否存在差异。其结果如下:

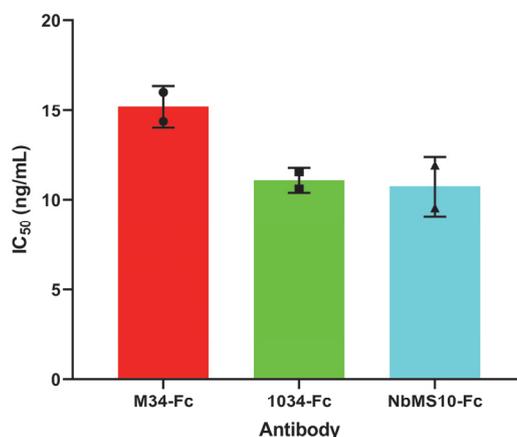


图 2.6 三个抗体中和活性比较

半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 以平均值 $\pm$ 标准差 (n=2) 显示。通过 one-way ANOVA 算得其 p 值为 0.062, 不具有统计学意义。

通过 GraphPad 计算其 p 值为 0.062 (n=2), 不具有统计学意义, 说明三者的假病毒中和活性在总体上相当, M34-Fc 与 NbMS10-Fc 之间可能不存在协同作用。

同样地, 对 1034-Fc 对不同突变株假病毒的交叉中和活性进行了评价, 其结果如下:

表 2.1 1034-Fc 对 MERS-CoV 不同突变株假病毒的交叉中和活性

Mutations	IC <sub>50</sub> (ng/mL)
L411F	10.34
T424I	11.89
S459T	14.46
S465F	9.852
F473S	10.64
L495F	12.68
D510G	8.416
I529T	14.66
D539N	15.45
D539A	9.077

可以看到，改造后的抗体除了对 8 个常见突变株的假病毒具有较好的交叉中和活性外，对自然突变型 D539N 和人工突变型 D539A 的假病毒均具有较好的中和活性。

#### 4、动物体内保护性评价

使用了人 DPP4 基因敲入的小鼠对抗体的体内保护作用进行了评价。将 MERS-CoV 假病毒注入人 DPP4 基因敲入的小鼠体内，因为小鼠表达人 DPP4 受体，假病毒能够通过该受体进入细胞内，进行基因组复制，其携带的荧光素酶报告基因得到表达。当向小鼠体内注入荧光素酶底物时，荧光素酶及其底物发生反应产生荧光，进而被活体成像仪检测到。若抗体能够中和体内假病毒，则后者不能或者很少能进入细胞，最终导致发光减少。我们在攻毒前 6 h 注射抗体，攻毒后 8 d 进行成像，其结果如下图所示：

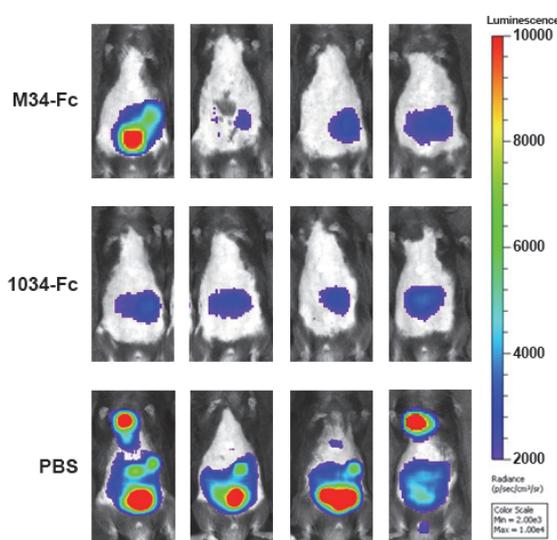


图 2.7 小鼠活体成像

使用单因素方差分析中的 Tukey's test 对三组小鼠的发光强度对数值进行两两比较，其结果如下：

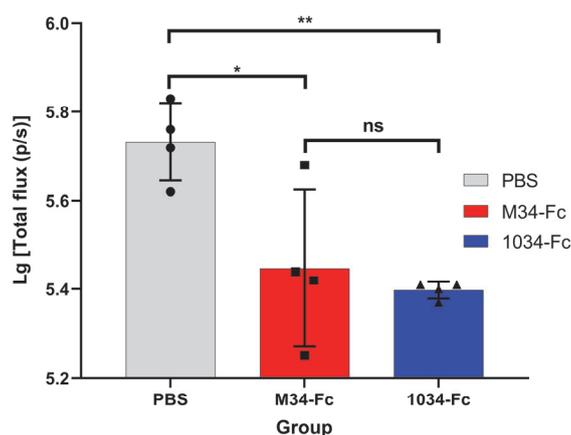


图 2.8 抗体体内保护作用分析

发光强度对数值以平均值±标准差 (n=4) 显示。使用 Turkey's test 对其进行两两比较, 其 p 值如下表所示。\*表示  $p < 0.05$ , \*\*表示  $p < 0.01$ , ns 表示 not significant。

表 2.2 抗体保护作用两两比较结果

Tukey's multiple comparisons test	p value
PBS vs. M34-Fc	0.0162
PBS vs. 1034-Fc	0.0064
M34-Fc vs. 1034-Fc	0.8144

可以看到, M34-Fc 和 1034-Fc 与 PBS 组的比较均具有显著性差异, 说明两个抗体对模型小鼠起到保护作用; M34-Fc 和 1034-Fc 的保护效果则无显著性差异, 说明两个抗体的保护作用相当。

## 2.4 讨论

本部分研究通过基因工程的方法将识别不同表位的两个 MERS-CoV 纳米抗体通过一个短肽连接到一起, 然后通过 ELISA、生物膜层干涉实验、假病毒中和试验等评价了该抗体的生物学功能。对改造后的抗体 1034-Fc 和各个单体 NbMS10-Fc 和 M34-Fc 的假病毒中和活性进行了单因素方差分析 (one-way ANOVA), 发现三者之间的差异不存在统计学意义, 表明改造后的抗体其功能没有受到明显影响。不同突变病毒株的假病毒中和试验进一步验证了这一点, 除此之外, 1034-Fc 对 D539N 和 D539A 突变假病毒也具有了中和活性, 说明改造是成功的, 达到了预期的目的。

MERS-CoV RBD 特异性单克隆抗体可以高效中和病毒, 在暴露前和暴露后模型中可以保护动物免于感染<sup>[35][38][98][99]</sup>。然而, 如果抗体仅针对 RBD 的一个位点,

那么病毒在抗体选择的压力下可能出现突变株，导致该抗体失效。联合使用两个或多个识别不同表位的抗体，将有助于减小病毒发生突变的可能性<sup>[100]</sup>。

结核病治疗是联合治疗的经典范例<sup>[101]</sup>，如联合异烟肼和利福霉素能够有效防止耐药株的出现。高活性抗逆转录病毒疗法的“鸡尾酒药物”已经降低了艾滋病毒感染死亡率，极大地改善了疾病的预后<sup>[102]</sup>。美国前总统特朗普在感染 SARS-CoV-2 之后便接受了抗体鸡尾酒的疗法，说明鸡尾酒疗法具有较高的实用价值。与鸡尾酒疗法相比，我们设计构建的双表位抗体可能具有以下优势：（1）使用剂量更小。NbMS10-Fc 和 M34-Fc 的分子量均在 40 kDa 左右，1034-Fc 的分子量在 55 kDa 左右，理论上达到相同的效果（即相同的摩尔数量），1034-Fc 可能需要的剂量更小。（2）副作用更小。此推论的依据同上，相同摩尔数量的情况下，鸡尾酒疗法使用的 Fc 片段的量是 1034-Fc 的两倍。而 Fc 片段可能会激活 Fc 受体下游的一些免疫效应，如 ADCC 等，过多的 Fc 片段也许会加重机体的免疫损伤。（3）生产和评价更简单。目前基因工程抗体多通过单一细胞株进行制备，鸡尾酒疗法中有多少个抗体就意味着要分离多少个细胞株；而双表位甚至多表位抗体只需在表达载体构建时将抗体依次连接即可，后续只需要分离一个细胞株。在安全性评价时，鸡尾酒疗法中的每个抗体都需要单独进行评价，而这种双表位甚至多表位抗体本身就是单一的成分，无需进行多次评价。

然而，据文献报道，要想减小病毒出现逃逸株的可能，这些抗体识别的表位必须是相对保守的表位<sup>[103]</sup>。由于 M34 识别的表位暂未解析，抗体 1034-Fc 是否能抑制病毒的逃逸也不得而知。因此后续仍需继续努力，解析 M34 的识别位点，并通过活病毒实验证实 1034-Fc 的实际效用。

在进行双表位抗体改造之前，本实验室已经进行过双价和多价的改造。实验室前期将筛选到的 NbMS10 通过基因工程的方法，利用短肽将两个或三个 NbMS10 串联在一起，制备了二连体形式的 Di-NbMS10 和三连体形式的 Tri-NbMS10<sup>[104]</sup>。两者在极端酸碱度、胃蛋白酶、强变性剂和高温条件下都表现出极高的稳定性，并且对不同国家和年份分离的 19 种人和骆驼 MERS-CoV 株均具有显著提高的广谱中和活性。理论上，本部分设计双表位抗体相比于单一的抗体也应该具有增强的中和活性。然而，在假病毒中和试验中，无论是双表位抗体还是应用鸡尾酒方法，两者均未表现出增强的中和活性，其原因不得而知，有待进一步研究。

本部分我们使用了 Fan Changfa 等人建立的人 DPP4-knockin 小鼠<sup>[105]</sup>对抗体进行了评价。此前他们通过实验发现，他们在所建立的人 DPP4-knockin 小鼠肺和脑组织中检测到了显著的 hDPP4 的表达，并且在肺中表达量最高。MERS-CoV 临床株 hCoV-EMC 能够有效地感染该小鼠并在小鼠体内复制，感染后第四天导致小鼠体重减轻 20% 以上，并且在肺中检测到显著的病毒载量，伴随着明显的病理改变。

一种单克隆抗体 H111-1, 能够显著降低受 hCoV-EMC 病毒攻击的基因敲入小鼠肺中的病毒载量, 减轻了肺和脑的症状, 支气管上皮细胞的变性和坏死显著改善, 表明该小鼠可能是评估体内抗 MERS-CoV 抗病毒药物的有效模型。他们比较了 hDPP4-knockin 小鼠感染 MERS-CoV 假病毒和活病毒的情况, 肺是这两种病毒感染的主要器官, 支气管上皮细胞是感染的常见部位, 两者均可以进入中枢神经系统。通过活体成像发现 H111-1 能够有效抑制假病毒感染小鼠, 他们推测 1 TCID<sub>50</sub> 假病毒相当于 0.0046 pfu 活病毒。

可以预见, 我们构建的抗体 M34 和 1034-Fc 对活病毒攻击的模型动物也应当有较好的保护效果, 但这仍需进一步的实验验证。目前常用的动物模型除了上述 hDPP4-knockin 小鼠外, 还有腺病毒转导的小鼠模型、转基因小鼠模型、恒河猴模型和普通狨猴模型等。Zhao Jincun 等<sup>[106]</sup>用携带人 DPP4 基因的腺病毒感染 BALB/c 和 C57 小鼠后, 小鼠能够感染 MERS-CoV, 并表现出以广泛性炎细胞浸润为主的肺炎, 感染后 6~8 天病毒能够被宿主清除, 但在缺乏 I 型干扰素信号的情况下, 临床表现和病理变化更严重。Zhao Guangyu 等<sup>[107]</sup>开发了一种转基因小鼠模型, 该模型在鼻内接种 MERS-CoV 后, 小鼠表现出全身性炎症, 伴有轻度至重度肺炎, 以及肝、肾、脾等多器官损伤。感染后第 5 天在肺中检测到病毒复制, 第 9 天在肺、肾和脑中检测到病毒复制。恒河猴感染 MERS-CoV 后, 表现出短暂的下呼吸道感染<sup>[108]</sup>, 引起多灶性、轻度至显著的间质性肺炎, 病毒的复制主要发生在肺泡细胞中。普通狨猴在感染 MERS-CoV 后, 肺部出现明显的广泛病变<sup>[109]</sup>, 并逐渐发展成为进行性严重肺炎, 在其肺中可以检测到较高的病毒载量。

## 第三章 抗 SARS-CoV 纳米中和抗体的构建与鉴定

### 引言

SARS-CoV 首次于 2003 年发现,是第一个引起全球大流行的冠状病毒,其致死率约为 10%。尽管多年来未有病例报告,曾经的实验室泄露事件和一次散发病例表明,未来仍有爆发 SARS-CoV 及其相关疾病的可能。但目前针对 SARS-CoV 仍无特效药和可用的疫苗。此部分,我们以 SARS-CoV RBD 蛋白免疫羊驼,建立了 SARS-CoV RBD 蛋白特异性纳米抗体库,并从中筛选到一株高亲和力抗体,然后对其生物学功能进行了评价,对其中和机制进行了探究。

### 3.1 实验材料

#### 3.1.1 细菌、噬菌体、质粒

TG1 菌株、KM13 辅助噬菌体、pCANTAB5E 载体由西北农林科技大学杜恩岐教授提供并在本实验室保存和使用。

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  (BC102)、BL21 (DE3) (BC201) 购自北京博迈德基因技术有限公司。

pCold I 原核表达载体 (TAKARA) 质粒在本实验室保存和使用。pFUSE-IgG1-Fc2 真核表达载体 (Thermofisher) 在本实验室保存和使用。SARS\_RBD-pFUSE、SARS\_S-pcDNA3.1(+)重组表达载体在本实验室保存和使用。

#### 3.1.2 细胞

稳定表达人 ACE2 分子的 HeLa-ACE2 细胞由中国科学院武汉病毒所惠赠。Huh-7 细胞由中国食品药品检定研究院惠赠。293T 细胞由本实验室保存。

#### 3.1.3 蛋白

SARS-CoV S1-His 蛋白 (40150-V08B1)、RBD-rFc 蛋白 (40150-V31B2)、rFc 蛋白 (11047-TNAH) 购自北京义翘神州科技有限公司。

#### 3.1.4 主要试剂 (盒) 与耗材

PCR Master Mix (Thermofisher, K1072)、胶回收试剂盒 (全式金, EG101)、

无缝克隆试剂盒（全式金，CU201）、*Bam* HI 等快切酶及 Buffer（Thermofisher）、普通 DNA 纯化试剂盒（天根 DP204）、T4 DNA 连接酶（Thermofisher，EL0016）、无 DNase/RNase 水（天根，RT121）、反转录试剂盒（Thermofisher，K1622）、Ficoll-Paque PLUS（GE Healthcare，17-1440-03）、TRIzol Reagent（Invitrogen，15596-026）、DNA 抽提试剂（索莱宝，P1012）、3 M 乙酸钠（索莱宝，A1070）、质粒小提试剂盒（全式金，EM101）、点突变试剂盒（全式金，FM111）、质粒大提试剂盒（天根，DP117）、96 孔酶标板（CORNING，9018）ELISA 包被液（索莱宝，C1050）、牛血清白蛋白（索莱宝，A8020）、单组份 TMB 显色液（索莱宝，PR1200）、终止液（索莱宝，C1058）、Ni-NTA 琼脂糖凝胶（江苏康为世纪生物科技股份有限公司，CW0010）、Protein A 预装重力柱（生工生物工程股份有限公司，C600951）、PBS（Gibco，C10010500BT）、DMEM 高糖培养基（Gibco，11995081）、胰酶（Gibco，25200056）、青霉素/链霉素（Gibco，15070063）、胎牛血清（PAN，P30-3302）、荧光素酶底物（Perkin Elmer，6066761）等。

FITC 偶联的山羊抗兔 IgG-Fc 抗体（江苏康为世纪科技有限公司，CW0114S）、HRP 偶联的山羊抗人 IgG-Fc 抗体（ImmunoResearch，109-035-008）、HRP 偶联的抗 M13 抗体（北京义翘神州科技有限公司，11973-MM05T-H）、HRP 偶联的鼠抗 His 抗体（江苏康为世纪科技有限公司，CW0285）等。

### 3.1.5 主要仪器

恒温摇床（太仓）、恒温孵箱（志成）、超净工作台、电子秤、蓝光切胶仪（生工生物工程股份有限公司，G500312）、PCR 仪（Applied BioSystems，Veriti）、超速离心机。分子相互作用分析仪（Probe life，Gator）、流式细胞仪（Millipore，easyCyte HT）、酶标仪（BioTeck）、洗板机（BioTeck）等。

## 3.2 实验方法

### 3.2.1 SARS-CoV RBD-Fc 蛋白特异性纳米抗体库的构建

#### 1、羊驼的免疫

以 SARS-CoV RBD-rFc 蛋白免疫羊驼。使用 PBS 将 200  $\mu$ g RBD-rFc 蛋白稀释至 1 mL，然后加入等体积佐剂（初次免疫使用完全弗式佐剂，随后的免疫使用不完全弗氏佐剂），使用乳化仪中等强度乳化 6 min。

#### 2、血清抗体滴度鉴定

每次免疫前，均从羊驼的颈静脉采血 2 mL，室温静置数小时，待其自然凝固后分离血清。血清分离步骤如下：

- (1) 将血清收集管离心 (900×g, RT, 10 min) ;
- (2) 吸取上清液至新的离心管中, 继续离心 (4000×g, RT, 10 min) ;
- (3) 小心吸取上清液至新的离心管中, 注意不要吸到底层的红细胞;
- (4) 将分离的血清分装并保存于-20°C。

通过 ELISA 对分离的血清进行 SARS-CoV RBD 特异性抗体滴度测定, 具体步骤如下:

- (1) 以 SARS-CoV RBD-rFc 蛋白包被 96 孔酶标板, 包被浓度 1 μg/mL, 包被体积 50 μL/孔, 4°C 静置过夜;
- (2) 次日弃去孔内液体, 使用 PBST 洗板一次, 每孔加入 100 μL 封闭液, 37°C 静置孵育;
- (3) 1 h 后弃去孔内液体, 使用 PBST 洗板一次, 加入梯度稀释的羊驼血清, 每孔 50 μL, 37°C 静置孵育;
- (4) 45 min 后弃去孔内液体, 使用 PBST 洗板三次, 加入封闭液稀释的 HRP 偶联的抗羊驼抗体 (稀释度 1:5000), 37°C 静置孵育;
- (5) 30 min 后弃去孔内液体, 使用 PBST 洗板三次, 加入 TMB 单组分显色液, 每孔 50 μL, 室温避光显色约 2 min;
- (6) 加入终止液终止反应, 每孔 50 μL, 轻拍酶标板混匀, 在酶标仪上读取 450 nm 处吸光度。

### 3、羊驼外周血单个核细胞 (PBMC) 的分离

最后一次免疫后 10 天, 采集羊驼抗凝血, 使用 Ficoll 密度梯度离心法分离其外周血单个核细胞, 具体步骤如下:

- (1) 使用 EDTA-K<sub>2</sub> 的抗凝管从羊驼的颈静脉采集抗凝血共约 60 mL, 轻轻上下颠倒混匀, 使血液与抗凝剂充分混合;
- (2) 加入等体积 PBS 轻轻上下颠倒混匀;
- (3) 取 6 个 50 mL 离心管, 每个离心管加入 15 mL Ficoll 淋巴细胞分离液, 将该管倾斜 45°, 小心加入上述稀释的血液 20 mL, 然后离心 (400×g, 18°C, 40 min);
- (4) 离心完毕, 取出离心管, 可以看到液体分为四层, 从上至下依次为稀释的血浆、单个核细胞、粒细胞、红细胞, 吸取第二层的单个核细胞至新的离心管中;
- (5) 使用 PBS 洗涤细胞三次;
- (6) 对外周血单个核细胞进行计数, 使用 6 mL Trizol 重悬细胞沉淀, 室温反应 5 min;
- (7) 将混合液按 1 mL/支分装并保存于-80°C。

### 4、总 RNA 的提取

使用 Trizol 法提取外周血单个核细胞的总 RNA，具体步骤如下：

- (1) 取上述经 Trizol 处理的外周血单个核细胞一份，分装成两管，每管 500  $\mu\text{L}$ ；
- (2) 每管加入 500  $\mu\text{L}$  Trizol，室温裂解 5 min；
- (3) 加入 200  $\mu\text{L}$  氯仿，剧烈振荡 15 s 后室温静置 2 min，然后离心（12000 $\times$ g，4 $^{\circ}\text{C}$ ，10 min）；
- (4) 小心吸取 500  $\mu\text{L}$  上清至新的无 RNA 酶的 1.5 mL 离心管中，加入 500  $\mu\text{L}$  异丙醇，室温静置 10 min，然后离心（12000 $\times$ g，4 $^{\circ}\text{C}$ ，10 min），弃上清；
- (5) 使用 75%酒精重悬沉淀，然后离心（7500 $\times$ g，4 $^{\circ}\text{C}$ ，5 min）弃上清，如此洗涤两次；
- (6) 最后一次洗涤弃上清后吸尽液体，将离心管开盖置于超净台晾 5 min 使乙醇充分挥发；
- (7) 在每管中加入 50  $\mu\text{L}$  55 $^{\circ}\text{C}$  的无 RNA 酶水重悬沉淀，并置于 55 $^{\circ}\text{C}$  金属浴放置 5 min；
- (8) 将两管 RNA 转移至同一管，混匀，测定其浓度。

#### 5、cDNA 的合成

使用反转录试剂盒，以所有 RNA 为模板合成 cDNA，反应体系为：

组分	体积/质量
total RNA	5 $\mu\text{g}$
Oligo(dT) <sub>18</sub> primer	1 $\mu\text{L}$
D/RNase-free water	to 12 $\mu\text{L}$

反应条件为：65 $^{\circ}\text{C}$  孵育 5 min。反应完成后，将样品放回冰上。

再按顺序加入下列试剂：

组分	体积
5 $\times$ Reaction Buffer	4 $\mu\text{L}$
RNase Inhibitor	1 $\mu\text{L}$
10 mM dNTP Mix	2 $\mu\text{L}$
RevertAid M-MuLV RT	1 $\mu\text{L}$

轻轻振荡、简短离心后，将反应体系置于 PCR 仪中，42 $^{\circ}\text{C}$  孵育 60 min，70 $^{\circ}\text{C}$  孵育 5 min，使酶失活。将合成的 cDNA 冻存于 -20 $^{\circ}\text{C}$  待用。

#### 6、重链抗体的重链可变区（VHH）基因的扩增

以 cDNA 为模板进行第一轮 PCR，反应体系为：

组分	体积
VHH-L-F	1 $\mu$ L
CH2-R	1 $\mu$ L
cDNA	2/4/6 $\mu$ L
DreamTaq Master Mix	20 $\mu$ L
D/RNase-free water	16/14/12

反应条件为:

温度	时间	循环数
95°C	3 min	1
95°C	30 s	22
55°C	60 s	
72°C	45 s	
72°C	10 min	1

将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 切取 700 bp 大小左右片段, 使用胶回收试剂盒进行回收。以上述回收产物为模板进行第二轮 PCR, 反应体系为:

组分	体积
VHH-FR1-D-F	0.5 $\mu$ L
VHH-FR4-D-R	0.5 $\mu$ L
第一轮 PCR 胶回收产物	2/4/8 $\mu$ L
DreamTaq Master Mix	15 $\mu$ L
D/RNase-free water	12/10/6 $\mu$ L

反应条件为:

温度	时间	循环数
95°C	3 min	1
95°C	30 s	10
68°C	30 s	
72°C	30 s	
72°C	10 min	1

直接以第二轮 PCR 产物为模板(PCR 完成后不进行胶回收), 进行第三轮 PCR,

反应体系为:

组分	体积
VHH-FR1-D-F	1 $\mu\text{L}$
VHH-FR4-D-R	1 $\mu\text{L}$
第一轮 PCR 胶回收产物	2/4/8 $\mu\text{L}$
DreamTaq Master Mix	15 $\mu\text{L}$
D/RNase-free water	11/9/5 $\mu\text{L}$

反应条件为:

温度	时间	循环数
95°C	3 min	1
95°C	30 s	12
68°C	30 s	
72°C	40 s	
72°C	10 min	1

将第三轮 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 切取 400 bp 左右片段, 使用胶回收试剂盒进行回收, 回收产物即为 VHH 基因片段。

#### 7、VHH 基因片段的酶切及连接

使用 *Sfi* I 快切酶对 VHH 基因片段和噬菌粒载体 pCANTAB5E 进行酶切, VHH 酶切体系为:

组分	体积
10×快切酶 Buffer	60 $\mu\text{L}$
VHH 基因片段	12 $\mu\text{g}$
<i>Sfi</i> I 快切酶	60 $\mu\text{L}$
D/RNase-free water	to 600 $\mu\text{L}$

噬菌体载体酶切体系为:

组分	体积
10×快切酶 Buffer	40 $\mu\text{L}$
pCANTAB5E 载体	35 $\mu\text{g}$
<i>Sfi</i> I 快切酶	35 $\mu\text{L}$
D/RNase-free water	to 400 $\mu\text{L}$

酶切条件为：55°C 孵育 3 h。

将酶切产物回收完毕后，测定其浓度。按照以下体系使用 T4 连接酶将 VHH 基因片段和噬菌粒载体进行连接：

组分	体积
VHH 酶切片段	2.2 $\mu\text{g}$
pCANTAB5E 酶切片段	6.2 $\mu\text{g}$
T4 DNA 连接酶	15 $\mu\text{L}$
10×T4 DNA 连接酶 Buffer	20 $\mu\text{L}$
D/RNase-free water	to 200 $\mu\text{L}$

连接条件为：22°C 孵育 1 h，16°C 孵育过夜。

#### 8、连接产物的纯化

连接完成后，需要对其进行纯化以提高后续电转化效率，其具体步骤如下：

(1) 将 DNA 抽提试剂 (25:24:1) 上下颠倒混匀，然后迅速取 200  $\mu\text{L}$  加入到连接产物中，再次上下颠倒混匀；

(2) 将混合物离心 (18000×g, 4°C, 10 min)，转移上清至新的 1.5 mL Ep 管中；

(3) 加入 1/10 体积 (20  $\mu\text{L}$ ) 的 3 M 乙酸钠和 2.5 倍体积 (500  $\mu\text{L}$ ) 的无水乙醇，混匀后置于 -80°C 冰箱静置 40 min；

(4) 离心 (18000×g, 4°C, 15 min) 并弃上清；

(5) 加入 1 mL 75% 的乙醇洗涤沉淀，离心 (18000×g, 4°C, 10 min) 并弃上清；

(6) 将离心管开盖置于超净台约 10 min，使乙醇充分挥发，用 100  $\mu\text{L}$  去离子水重悬沉淀，暂存于 4°C，待电转化。

#### 9、大肠杆菌电转感受态的制备

为了提高 TG1 感受态细胞的转化效率，感受态细胞需要现时制备、现时使用，其具体步骤如下：

(1) 取 TG1 甘油菌，在 M9 固体培养板上划线，倒置于 37°C 孵箱静置培养；

(2) 约 18 h 后，M9 固体培养板上长出了明显可见的单克隆菌落，取 15 mL 离心管，加入 5 mL 2×YT 液体培养基，用加样枪吸头蘸取相对孤立的单克隆菌落，在培养基中吹打数次；

(3) 将离心管置于 37°C 恒温摇床振荡培养约 10 h；

(4) 取 500  $\mu\text{L}$  菌液接种到 500 mL 2×YT 液体培养基中，37°C 恒温摇床振荡

培养至菌液 OD<sub>600</sub> 约为 0.5;

(5) 将菌液置于冰上孵育 1 h, 然后离心 (2200×g, 4°C, 12 min) 弃上清;

(6) 用 500 mL 经冰浴的去离子水重悬沉淀, 离心 (2200×g, 4°C, 12 min) 弃上清;

(7) 用 250 mL 经冰浴的去离子水重悬沉淀, 离心 (2200×g, 4°C, 12 min) 弃上清;

(8) 用 30 mL 经冰浴的 10% (v/v) 甘油重悬沉淀, 离心 (2200×g, 4°C, 12 min) 弃上清;

(9) 用 1 mL 经冰浴的 10% (v/v) 甘油重悬沉淀。

#### 10、TG1 感受态细胞的电转化

使用电转仪将重组噬菌粒电转化至 TG1 感受态细胞, 为了保证感受态细胞较好的转化效率, 应该保持感受态的低温状态 (冰上操作), 其具体步骤如下:

(1) 取新鲜制备的 TG1 电转感受态细胞 1625 μL 与 100 μL 纯化的连接产物小心混匀, 取 69 μL 加入到电转杯中, 轻弹杯底保证混合物沉到底部且没有气泡;

(2) 将电转杯置于冰上孵育 10 min;

(3) 擦干电转杯外围, 置于电转仪内进行电击, 电压为 1800 V;

(4) 电击完成, 迅速取出电转杯, 立即加入 940 μL 室温的 SOC, 轻轻吹匀后转移至 50 mL 离心管中;

(5) 将离心管置于 37°C 振荡培养 1 h;

(6) 取 100 μL 菌液, 用 2×YT 液体培养基作 10<sup>-1</sup>~10<sup>-6</sup> 六个稀释度稀释, 每个稀释度取 100 μL 均匀涂布于 2×YTAG 固体培养板 (90 mm), 并各设置一个重复板, 倒置于 30°C 孵箱培养过夜 (此步骤为抗体文库库容大小的测定);

(7) 将 50 mL 离心管离心 (3300×g, RT, 10 min) 弃去上清;

(8) 用 8 mL SOC 重悬沉淀, 涂布于 2×YTAG 固体培养板 (150 mm), 每个板涂 200 μL, 倒置于 30°C 孵箱培养过夜。

#### 11、文库菌的收集与保存

待 2×YTAG 固体培养板上长满菌落时, 菌落由于十分密集而形成一层“菌膜”, 收集此菌膜即为文库菌, 具体步骤如下:

(1) 在长满菌落的 2×YTAG 固体培养板上加 5 mL 2×YT 液体培养基, 然后用细胞推刮器轻轻刮落菌落, 收集菌液于 250 mL 离心瓶中;

(2) 再加 5 mL 2×YT 液体培养基洗涤培养板, 同样收集于离心瓶中, 以最大限度地减小菌落的损失;

(3) 将离心瓶离心 (3300×g, RT, 10 min) 弃去上清;

(4) 使用 40 mL 2×YT 液体培养基重悬沉淀, 然后加入适当体积的 60% (v/v)

甘油充分混匀, 使得甘油的终浓度为 15%, 此即为抗体文库菌;

(5) 取 100  $\mu\text{L}$  抗体文库菌, 用 2 $\times$ YT 液体培养基作  $10^{-4}$ ~ $10^{-9}$  六个稀释度稀释, 每个稀释度取 100  $\mu\text{L}$  均匀涂布于 2 $\times$ YTAG 固体培养板 (90 mm), 并各设置一个重复板, 倒置于 30 $^{\circ}\text{C}$  孵箱培养过夜 (此步骤为测定抗体文库丰度的测定);

(6) 将剩余菌液分装并冻存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 。

## 12、抗体文库的质量评估

抗体文库的质量主要以下几个方面评估: 文库的库容、丰度以及 VHH 插入率和多样性。库容和丰度测定步骤在前文已有描述, 在测定板培养过夜后, 对测定板上的菌落进行计数和计算即可得到文库的库容和丰度。文库 VHH 片段的插入率和多样性的测定步骤为:

(1) 从库容测定板上随机挑取共 55 个单克隆菌落接种于 5 mL 2 $\times$ YTAG 液体培养基, 并置于 37 $^{\circ}\text{C}$  振荡培养约 10 h;

(2) 取 1  $\mu\text{L}$  菌液, 使用建库时扩增 VHH 所用的引物对其进行 PCR 鉴定;

(3) 将剩余菌液进行测序;

(4) 将测序结果进行比对分析, 计算 VHH 插入率和多样性。

### 3.2.2 SARS-CoV S1 蛋白特异性纳米抗体的筛选

SARS-CoV S1 蛋白特异性纳米抗体的筛选步骤基本同前, 将包被免疫管的抗原换为 SARS-CoV S1 蛋白。

### 3.2.3 SARS-CoV RBD 蛋白特异性纳米抗体的筛选

SARS-CoV RBD 蛋白特异性纳米抗体的筛选步骤基本同前, 将包被免疫管的抗原换为 SARS-CoV RBD 蛋白。但由于其带有兔 Fc 标签, 在筛选过程中需要去掉与兔 Fc 特异性结合的噬菌体抗体, 因此有如下改动:

(1) 在每轮筛选中, 在包被 SARS-CoV RBD 的同一时间, 增加一个包被兔 Fc 蛋白的免疫管, 浓度始终为 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;

(2) 第二日使用同样的条件洗涤和封闭该免疫管;

(3) 在拯救噬菌体封闭完成后, 先与包被兔 Fc 的免疫管孵育 2 h, 再与包被 SARS-CoV RBD 的免疫管孵育 2 h, 再接着后续步骤进行;

(4) 在进行单克隆噬菌体 ELISA 鉴定的时候, 增加包被兔 Fc 蛋白的酶标板, 以相同条件进行 ELISA 鉴定;

(5) 在选取阳性单克隆噬菌体时, 需要去掉与兔 Fc 蛋白反应性较高的克隆。

### 3.2.4 SARS-CoV 特异性纳米抗体的选取与制备

---

SARS-CoV RBD 特异性纳米抗体的选取与制备参照 MERS-CoV 特异性纳米抗体的选取与制备。

### 3.2.5 SARS-CoV 特异性纳米抗体的生物学功能评价

#### 1、酶联免疫吸附试验

使用 ELISA 测定抗体与 SARS-CoV S1 蛋白的结合力，其步骤基本同前。

#### 2、生物膜层干涉实验

利用生物膜层干涉技术测定抗体与 SARS-CoV RBD 蛋白的平衡解离常数，其步骤基本同前。

#### 3、假病毒中和试验

通过假病毒中和试验评价抗体的中和活性，其步骤基本同前。

### 3.2.6 SARS-CoV 特异性纳米抗体的中和机制研究

#### 1、竞争性 ELISA

竞争性 ELISA 基本同前，略有改动：

(1) 包被的 SARS-CoV S1 的浓度为 6  $\mu\text{g/mL}$ ；

(2) ACE2-Fc 的浓度为 6  $\mu\text{g/mL}$ 。

#### 2、流式细胞术实验

流式细胞术实验基本同前，略有改动：由于使用的 SARS-CoV RBD 带兔 Fc 标签，因此使用 FITC 偶联的抗体为抗兔 Fc 抗体。

## 3.3 实验结果

### 3.3.1 SARS-CoV RBD 特异性纳米抗体库的构建

#### 1、羊驼血清 SARS-CoV RBD 特异性抗体滴度测定

在免疫前和每次免疫后两周在羊驼颈静脉处采血，以 SARS-CoV RBD 蛋白为抗原通过 ELISA 检测羊驼血清抗体滴度。以免疫前  $\text{OD}_{450}$  均值的 2.1 倍为 cut off 值，计算各次免疫后羊驼血清滴度，其结果如下：

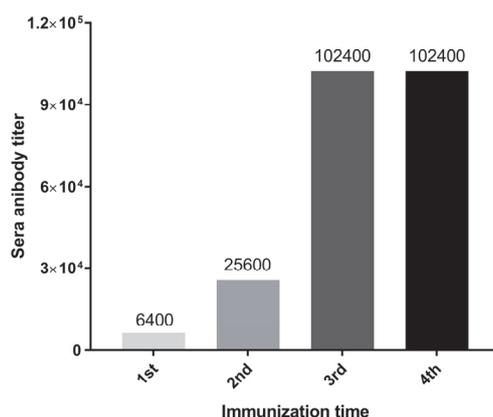


图 3.1 羊驼免疫后血清抗体效价测定

可以看到，随着免疫次数的增加，羊驼血清中 SARS-CoV RBD 特异性抗体滴度逐渐升高，第三次、第四次已经达到 1:102400，因此可以进行下一步的采血、构建抗体库。

## 2、SARS-CoV RBD 特异性纳米抗体库的构建

最后一次免疫后 10 d，从羊驼颈静脉采集 60 mL 抗凝血，分离外周血单个核细胞，共收获得到  $4.4 \times 10^8$  个细胞。然后使用 Trizol 提取了总 RNA，通过反转录合成了第一链 cDNA。通过参照文献及实验室前期研究基础，设计巢式 PCR 引物如下表所示（下划线部分碱基为 *Sfi* I 酶切位点序列）：

表 3.1 建库所需引物序列

引物名称	引物序列
VHH-L-F	GGTGGTCCTGGCTGC
CH2-R	GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC
VHH-FR1-D-F	TTTCTATTACTAGGCCAGCCGCC GAGTCTGGAGRRGCTTGGTGCA
VHH-FR4-D-R	AAACCGTTGGCCATAATGGCCTGAG GAGACGRTGACSTSGGTC

先使用 VHH-L-F 和 CH2-R 扩增抗体的重链部分基因，在琼脂糖凝胶上可以分离得到两条带：其中一条带大小在 900 bp 左右，为常规抗体的重链可变区至第二恒定区基因；另一条带在 700 bp 左右，为重链抗体的重链可变区至第二恒定区基因。回收重链抗体基因并作为模板，以 VHH-FR1-D-F 和 VHH-FR4-D-R 为引物扩增纳米抗体基因。需要指出的是，由于纳米抗体第一框架区上游的五个氨基酸变异较大，考虑到其对纳米抗体的识别抗原的空间结构影响不大，因此设计的引物

VHH-FR1-D-F 从纳米抗体的第一框架区的第六个氨基酸开始扩增，在后续构建纳米抗体表达载体时加上其常见序列（CAGGTGCAGCTGGTG）即可。

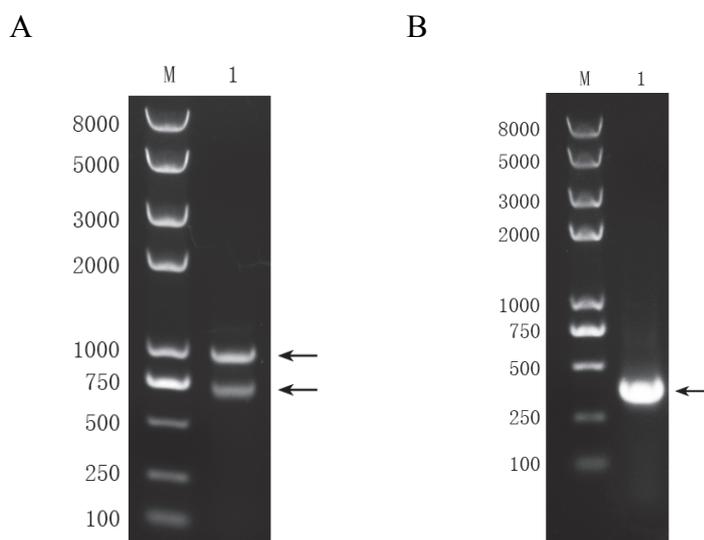


图 3.2 抗体基因扩增电泳图

图 A 为使用 VHH-L-F 和 CH2-R 扩增抗体的重链的可变区至第二恒定区基因电泳图。靠上的条带约 900 bp，为传统抗体基因；靠下的条带约 700 bp，为重链抗体基因。图 B 为使用 VHH-FR1-D-F 和 VHH-FR4-D-R 扩增的纳米抗体基因电泳图。

纳米抗体基因扩增完毕后，连同噬菌粒载体一并使用 *Sfi* I 进行酶切，使用普通产物纯化试剂盒对其进行回收。将酶切后的纳米抗体基因和噬菌粒载体使用 T4 连接酶进行连接，然后用 DNA 抽提试剂进行连接产物的纯化。新鲜制备 TG1 电转化感受态细胞，将连接产物转化至 TG1 中。在选择性培养基上孵育过夜后，收集菌落即为抗体库。

### 3、SARS-CoV RBD 特异性纳米抗体库的质量评估

电转完成时，共得到混合的菌液 23 mL。取少量菌液进行多个梯度稀释，每个稀释度取 100  $\mu$ L 涂布至选择性培养基（含一个重复测定），孵育过夜后在  $10^{-5}$  稀释度上分别得到 8 个和 6 个单克隆菌落，在  $10^{-4}$  稀释度上分别得到 81 个和 48 个单克隆菌落，以此估算该抗体库的库容为： $(80+60+81+48)\div 4\times 10^4\div 0.1\times 23=1.55\times 10^8$ （个）。

收集完抗体库后将其制备成甘油菌，取少量菌液进行多个梯度稀释，每个稀释度取 50  $\mu$ L 涂布至选择性培养基，孵育过夜后在  $10^{-10}$  稀释度上得到 36 个单克隆菌落，在  $10^{-11}$  稀释度上得到 4 个单克隆菌落，以此估算该抗体库的丰度为： $(36+40)\div 2\times 10^{10}\div 0.05=7.6\times 10^{12}$ （个/mL）。

从库容测定培养板上随机挑取 55 个单克隆菌落至培养基中振荡培养至合适浓度，取 1  $\mu$ L 菌液做菌液 PCR 鉴定，鉴定引物为 VHH-FR1-D-F 和 VHH-FR4-D-R。

其中，使用建库时扩增的 VHH 基因片段作为阳性对照 (+)，在培养板上无单克隆菌落的位置蘸取固体培养基作为阴性对照 (-)。菌液 PCR 结果如图所示：

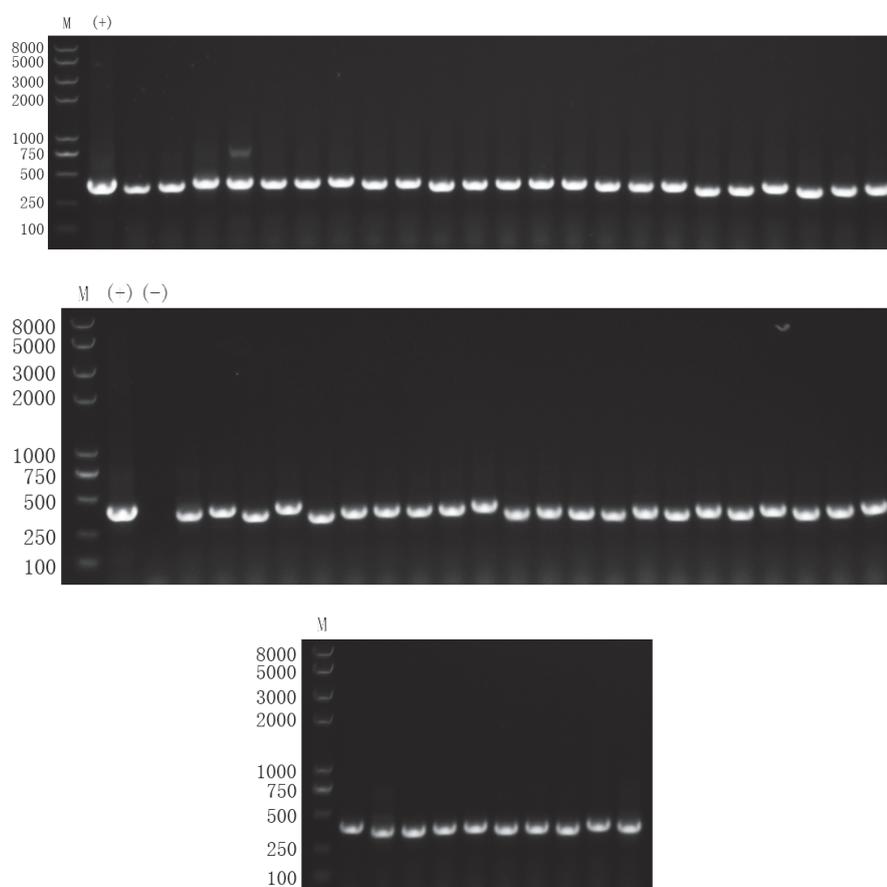


图 3.3 SARS-CoV RBD 特异性抗体库 VHH 插入率鉴定

可以看到，挑取的 55 个单克隆均可鉴定到与阳性对照大小近似的 VHH 片段，因此 VHH 片段的插入率为： $55 \div 55 \times 100\% = 100\%$  (n=55)。将剩余菌液送至测序公司进行测序，将返回的测序结果使用 Vector NTI 软件进行比对分析，其结果如下：

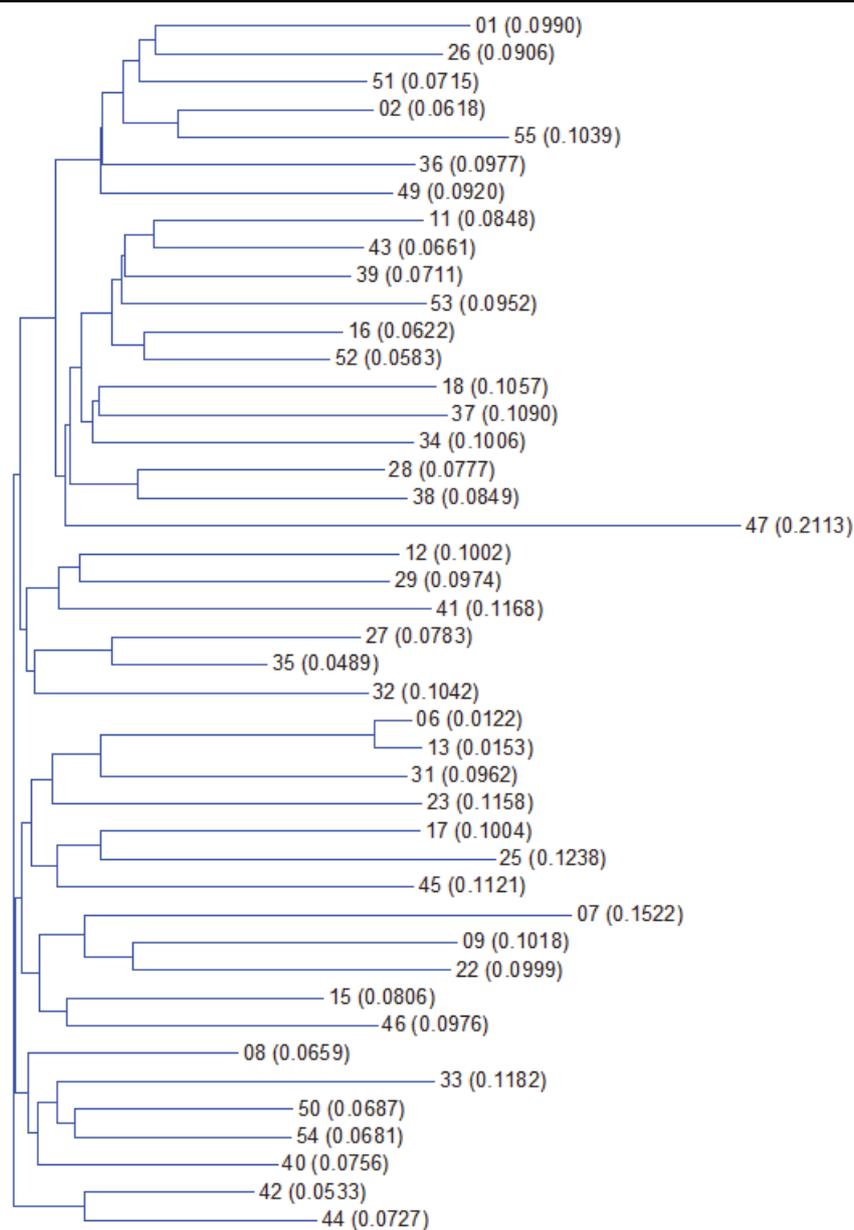


图 3.4 SARS-CoV RBD 特异性抗体库 VHH 多样性分析

靠前的数字为克隆编号，括号内数字为差异度，数字越小差异越小。

从图上可以看到，55 个单克隆中没有完全相同的序列，且大部分克隆之间的序列差异性较大，说明该抗体库的多样性较好。

综上所述，所建立的 SARS-CoV RBD 特异性纳米抗体库具有较好的质量，可以进行下一步 SARS-CoV RBD 特异性纳米抗体的筛选工作。

### 3.3.2 SARS-CoV 特异性纳米抗体的筛选及制备

考虑到 SARS-CoV S1 和 RBD 两个蛋白具有不同的长度，因此两者的受体结

合域的空间结构及其暴露情况可能存在差异；此外，由于所使用的 RBD 蛋白带有兔 Fc 片段，后者可能对抗体的筛选产生一定的干扰（即筛选出的抗体可能是抗兔 Fc 的抗体）。因此，使用了 SARS-CoV S1 和 RBD 两个蛋白分别对抗体库进行了筛选。

### 1、SARS-CoV S1 蛋白特异性噬菌体抗体的筛选

以 SARS-CoV S1 蛋白对 SARS-CoV RBD 特异性抗体库进行了四轮筛选，第四轮筛选完毕后，挑取了 192 个单克隆菌落进行了拯救，并鉴定了后者与 S1 蛋白的反应性。以噬菌体与 S1 蛋白反应的  $OD_{450}$  值减去噬菌体与牛血清白蛋白反应的  $OD_{450}$  值为判断依据，其结果如下图所示：

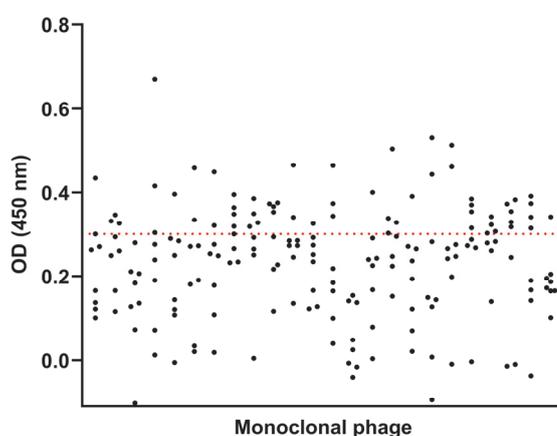


图 3.5 SARS-CoV S1 筛选的单克隆噬菌体抗体 ELISA 鉴定

将上述差值大于 0.3 者选择为阳性克隆，共选取了 59 个克隆进行测序，其中有 39 个克隆测序结果良好。

### 2、SARS-CoV RBD 蛋白特异性噬菌体抗体的筛选

以 SARS-CoV RBD 蛋白对 SARS-CoV RBD 特异性抗体库进行了四轮筛选，第四轮筛选完毕后，挑取了单克隆菌落进行了拯救，并鉴定了后者与 RBD 蛋白的反应性。总共进行了三次鉴定，每次挑取单克隆菌落 192 个。以噬菌体与 RBD 蛋白反应的  $OD_{450}$  值减去噬菌体与牛血清白蛋白反应的  $OD_{450}$  值为纵坐标（在图中简称为 RBD sub BSA），噬菌体与 RBD 蛋白反应的  $OD_{450}$  值减去噬菌体与兔 Fc 蛋白反应的  $OD_{450}$  值为横坐标（在图中简称为 RBD sub rFc）进行作图，其结果如下图所示：

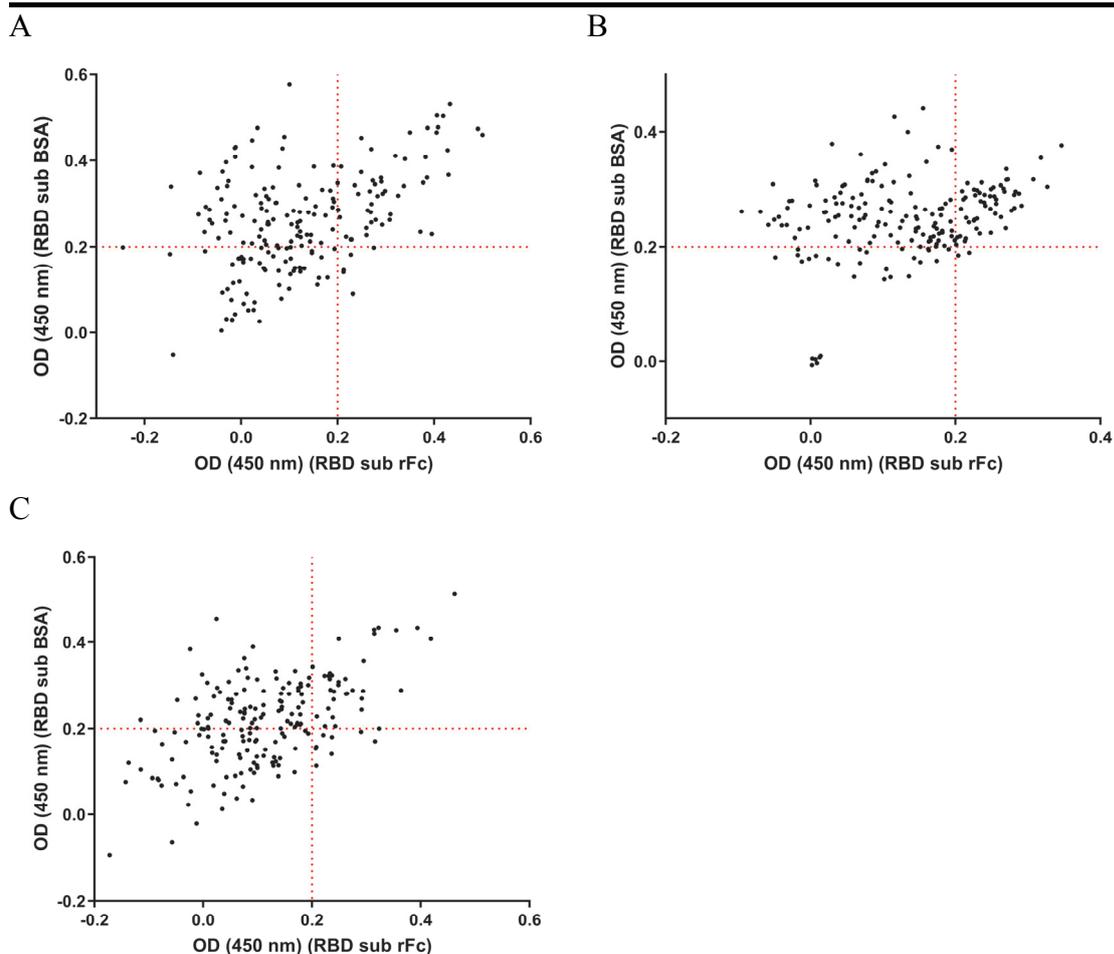


图 3.6 SARS-CoV RBD 筛选的单克隆噬菌体抗体 ELISA 鉴定

A、B、C 分别为三次挑取单克隆的 ELISA 鉴定结果。

以两个差值均大于 0.2 为作为阳性克隆，选择了 137 个阳性克隆进行测序，其中共有 58 个克隆测序结果良好。

### 3、SARS-CoV RBD 特异性纳米抗体的选取与制备

通过上述筛选，共得到 97 个测序良好的克隆。将测序结果进行比对分析，将氨基酸序列相同或相似的氨基酸归为一类，共得到 10 类代表性氨基酸序列。取每一类的一个纳米抗体基因构建 pCold I 表达载体，转化至 BL21 进行抗体的表达，然后使用 Ni-NTA 进行亲和层析。其中有 4 株抗体（命名为 S14、S15、S21 和 S22）为上清表达且纯化后的抗体纯度相对较好，因此选择这些抗体进行进一步研究。将纯化的四株纳米抗体进行 SDS-PAGE 电泳以初步鉴定其大小和纯度，其结果如下：

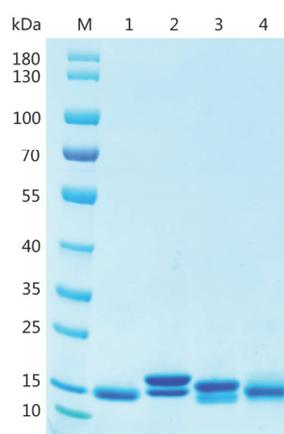


图 3.7 SARS-CoV 特异性纳米抗体 SDS-PAGE 鉴定

L1~L4 泳道分别为 S14、S15、S21、S22。

从图上可以看到，S14、S22 两个抗体条带较为单一，说明其纯度较好；而 S15 出现了明显的两条带，说明其纯度较差。纯化的四个纳米抗体电泳的位置均与 15 kDa 的 marker 条带相近，这与它们预期的分子量相符。

### 3.3.3 SARS-CoV 特异性纳米抗体的生物学特征分析

#### 1、结合力测定

通过 ELISA 测定了四株纳米抗体与 SARS-CoV RBD 的结合力，其结果如下图所示：

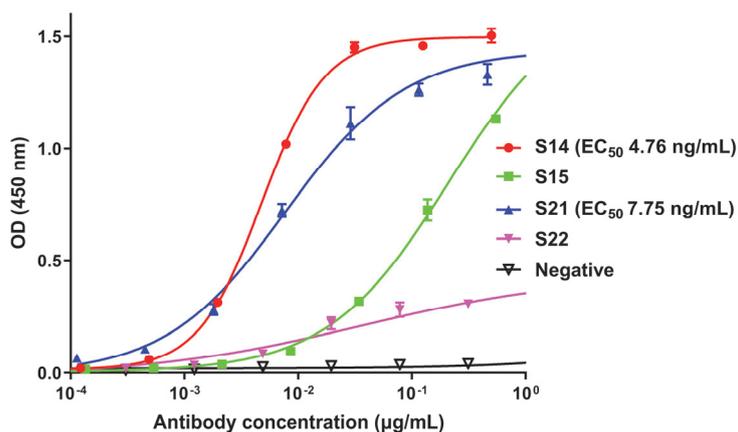


图 3.8 SARS-CoV 特异性纳米抗体 ELISA 鉴定

OD (450 nm)以平均值±标准差 (n=2) 显示。

在筛选到的四个抗体中，S14 与 SARS-CoV RBD 蛋白的结合活性最好，其半数效应浓度达到了 4.76 ng/mL；其次是 S21，其半数效应浓度为 7.75 ng/mL；S15 与 RBD 也有较好的反应性，而 S22 与之反应性较弱。因此选择 S14 进行了进一步

研究。

## 2、亲和力测定

通过生物膜层干涉技术测定了抗体与 SARS-CoV RBD 的平衡解离常数。将 SARS-CoV RBD 蛋白（带有人 IgG-Fc 标签）结合到光纤材质抗人 Fc 探针末端时会形成一层生物膜，入射光到达该膜层后会透射和反射形成干涉光波。当 S14 与 RBD 蛋白结合时会引起探针末端生物膜厚度发生改变，导致干涉光波发生相对位移，此位移被光谱仪检测到，形成干涉光谱，以干涉图谱的实时位移显示出来，通过 Gator 软件对测定结果进行曲线拟合，拟合成的曲线如下图所示：

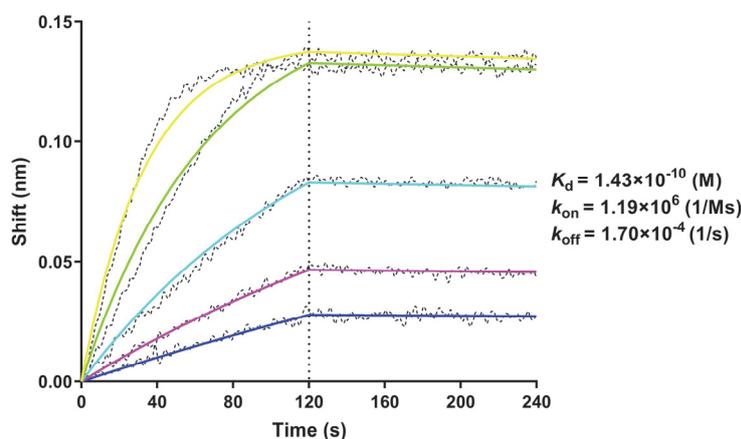


图 3.9 生物膜层干涉实验

同样通过 Gator 软件算得 S14 与 SARS-CoV RBD 蛋白结合的平衡解离常数为 143 pM，说明 S14 与 SARS-CoV RBD 具有较高的亲和力。

## 3、假病毒中和活性测定

通过 SARS-CoV 假病毒中和试验评价了 S14 不同标签形式的抗体的中和活性，以抗体抑制假病毒进入细胞的抑制率为评价标准，其结果如下图所示：

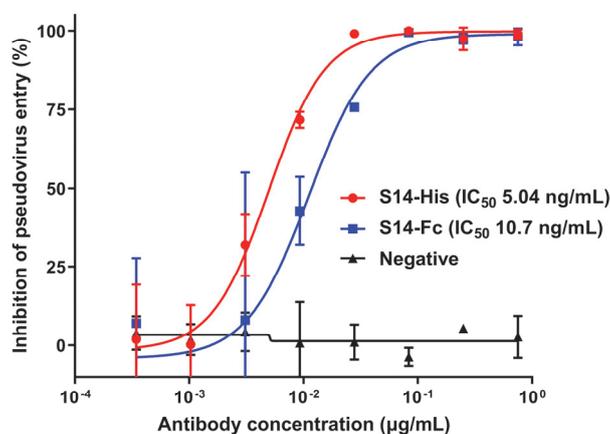


图 3.10 S14 假病毒中和实验

抑制率以平均值±标准差 (n=2) 显示。

通过 GraphPad Prism 算得 S14-His 和 S14-Fc 半数中和浓度分别为  $5.044 \pm 0.506$  和  $10.69 \pm 0.69$  ng/mL ( $n=2$ ), 说明该抗体的两种标签形式对 SARS-CoV 假病毒均具有较好的中和活性。而作为阴性对照的 MERS-CoV 抗体其抑制率基本在 0 左右, 表明其不能抑制 SARS-CoV 假病毒进入细胞。然后我们使用成组 t 检验对不同标签的 S14 的假病毒中和活性进行了分析, 其结果如下:

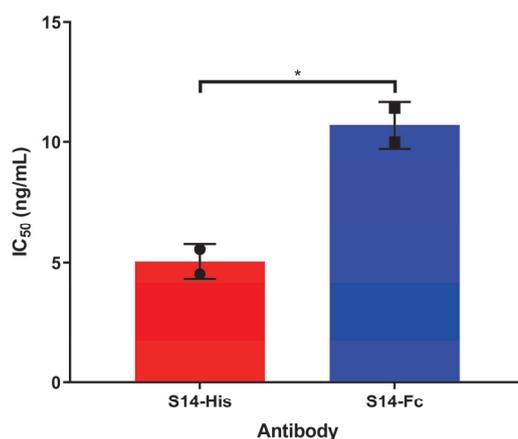


图 3.11 不同标签 S14 假病毒中和活性比较

半数中和浓度 ( $IC_{50}$ ) 以平均值 ± 标准差 ( $n=2$ ) 表示。通过成组 t 检验计算得 p 值为 0.022, \*表示  $p < 0.05$ 。

通过 GraphPad 算得其 p 值 0.0222, 差异具有统计学意义, 说明 S14-His 的假病毒中和活性比 S14-Fc 要好。分析其原因, 可能是由于 S14-His 的分子量较小所致 (S14-His 分子量在 15 kDa 左右, S14-Fc 分子量在 42 kDa 左右, 后者分子量是前者的 2.8 倍), 相同质量的情况下, 较小分子量的抗体具有更多的摩尔数量。这种差异与 MERS-CoV 抗体 M34 相似。

### 3.3.4 SARS-CoV 特异性纳米抗体的中和机制研究

#### 1、阻断抗原与细胞受体结合探究

使用流式细胞术实验探究抗体对 SARS-CoV RBD 与细胞表面受体 ACE2 之间相互作用的影响。将 S14 与 SARS-CoV RBD (带兔 IgG-Fc 标签) 共同孵育后, 再与表达人 ACE2 受体的 Hela-ACE2 (ACE2 稳转细胞系) 共同孵育, 再通过 FITC 偶联的抗兔 IgG-Fc 抗体间接检测与细胞结合的 RBD 的数量。其结果如下图所示:

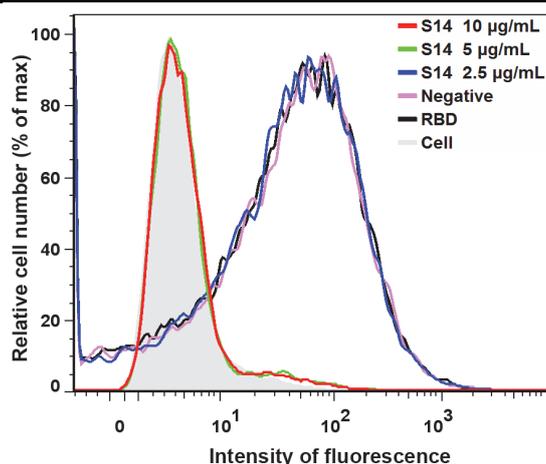


图 3.12 流式细胞术实验

从图上可以看到，当 S14 浓度为  $10\ \mu\text{g/mL}$  和  $5\ \mu\text{g/mL}$  时，从对应的细胞检测到的荧光强度与细胞背景相差无几，说明此时 RBD 几乎不能与细胞表面受体结合。当 S14 浓度为  $2.5\ \mu\text{g/mL}$  或者阴性抗体浓度为  $10\ \mu\text{g/mL}$  时，荧光强度与空白对照（仅 RBD）相似，说明此时 S14 几乎不影响 RBD 与细胞受体的结合。以上结果说明 S14 通过阻断 RBD 与受体的结合发挥作用。

## 2、与受体竞争性结合抗原研究

对 S14 进行了竞争性结合实验。以 SARS-CoV S1 蛋白包被 ELISA，然后加入梯度浓度的 S14（带 His 标签）和固定浓度的 ACE2 蛋白（带人 IgG-Fc 标签）共同孵育，再用抗人 IgG-Fc 抗体检测与 RBD 结合的 ACE2 的量，其结果如下：

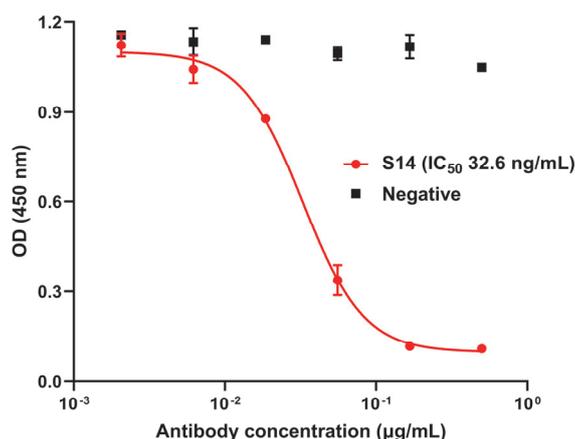


图 3.13 竞争性 ELISA

OD (450 nm) 以平均值  $\pm$  标准差 ( $n=2$ ) 显示。

从图上可以看到，当 S14 的浓度逐渐降低时，测得的  $\text{OD}_{450}$  值逐渐降低，说明与 SARS-CoV S1 结合的 ACE2 的量逐渐减少，而作为阴性对照的 MERS-CoV 抗

体并没有这种效果，表明 S14 与 ACE2 竞争性结合 SARS-CoV S1。

### 3、识别表位解析

首先通过文献调研获悉了在 SARS-CoV RBD 和 ACE2 结合界面上残基比较突出的 5 个氨基酸，分别为：Y442、L472、N479、D480 和 T487。通过已有的 SARS-CoV RBD-Fc 表达载体（C 端带有人 IgG-Fc 标签），将上述位点的氨基酸突变为丙氨酸，构建了 5 个突变体表达载体（Y442A、L472A、N479A、D480A 和 T487A），经测序验证正确后，大提质粒，然后使用 293T 表达了突变蛋白，并经 Protein A 柱进行了分离和纯化。将制备的突变体进行了 SDS-PAGE 鉴定，其结果如下：

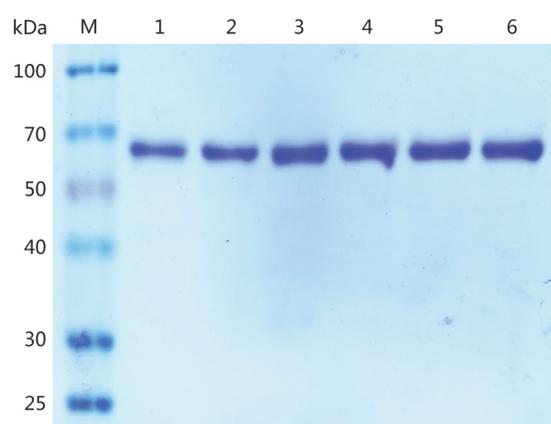


图 3.14 SARS-CoV RBD 野生株及突变株蛋白 SDS-PAGE 鉴定  
泳道 1~6 分别为 SARS-CoV RBD 野生株、Y442A、L472A、N479A、D480A 和 T487A。

可以看到，经纯化的 SARS-CoV RBD 野生株及其突变体蛋白都具有较高的纯度，于是利用这些蛋白对 S14 进行了表位鉴定。分别使用这些突变蛋白包被 ELISA 板，然后与梯度稀释的 S14（带 His 标签）共同孵育，再用抗 His 标签检测与 RBD 野生株及其突变体结合的 S14 的量，其结果如下：

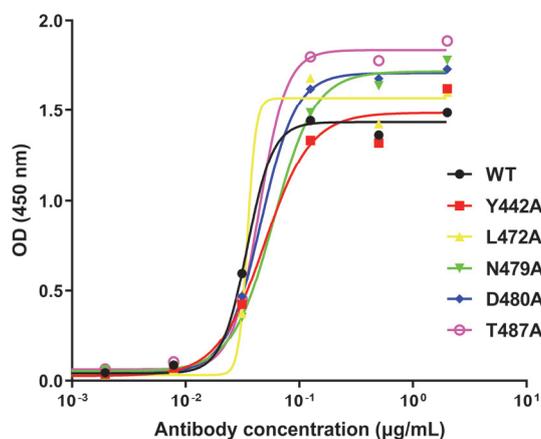


图 3.15 S14 识别表位分析

可以看到, S14 与 SARS-CoV RBD 野生株及五个突变株都具有较好的反应性, 说明 S14 识别的表位可能不在上述五个位点之列。

#### 4、空间结构预测

通过 SWISS-MOEDL 对 S14 序列进行分析查找, 选取了序列相似度较和评分均较高的一个纳米抗体 (结构已解析, PDB 号: 4tvs) 进行同源建模, 然后利用 ZDOCK 对预测模型和 SARS-CoV RBD 结构数据 (PDB 号: 2ghv) 进行对接分析, 选择其中一个对接模型利用 PDBePISA 进行交互作用位点分析, 其结果如下图所示:

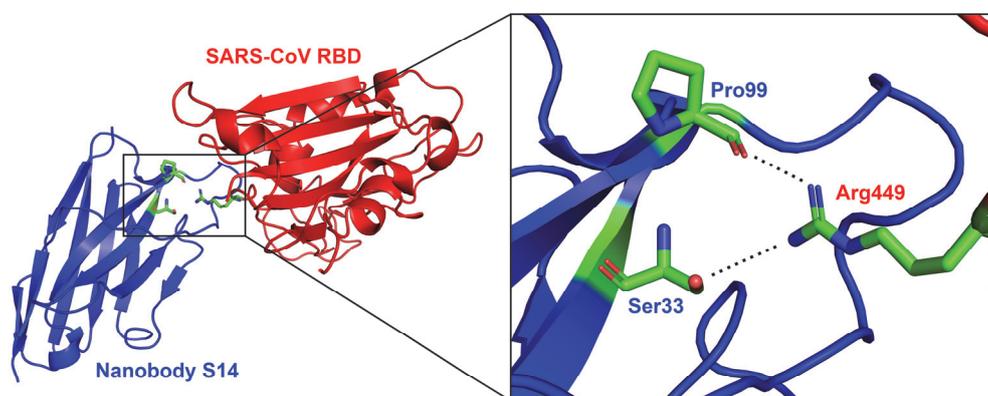


图 3.16 S14 与 SARS-CoV 结合的空间结构预测

红色为 SARS-CoV RBD, 蓝色为 S14; 黑色的点表示氢键。

预测结果为: SARS-CoV RBD 上的 R449 分别与 S14 上的 P99 和 S33 之间形成了一个氢键。

### 3.4 讨论

本部分研究以 SARS-CoV RBD 对抗原对羊驼进行了数次免疫, 借助噬菌体展示技术建立了 SARS-CoV RBD 特异性纳米抗体库。然后以 SARS-CoV RBD 和 S1 蛋白为抗原进行了筛选, 筛选完后通过 ELISA 鉴定出 10 个代表性纳米抗体。将纳米抗体构建入 pCold I 载体, 利用大肠杆菌进行表达。除去构建失败和上清表达量低的抗体株, 最终制备了 4 株纯度相对较好的纳米抗体。通过 ELISA 鉴定了抗体与 SARS-CoV RBD 的结合力, 并选择了其中结合力最高的 S14 进行进一步研究。通过生物膜层干涉实验、假病毒中和试验等表征了该抗体, 通过竞争性 ELISA、流式细胞术等探究了该抗体的中和机制。本部分通过常规的噬菌体展示技术, 展现了从羊驼免疫到抗体评价的一套完整的技术流程, 可为其他病原的纳米抗体研

究提供借鉴和参考。

本部分尝试通过细胞-细胞融合实验探究 S14 的中和机制，但在实验中发现转染了 SARS\_S-GFP-pcDNA3.1 质粒的 293T 细胞表达 GFP 的数量很少，绿色荧光强度弱，表达时间也相当延后（与转染了 MERS\_S-GFP-pcDNA3.1 质粒的 293T 细胞相比）。在与表达 ACE2 的 Huh-7 细胞或者 ACE2-HeLa 细胞混合孵育后也未见明显的细胞融合现象，因此未能成功实施细胞-细胞融合实验。分析其原因，可能是 SARS-CoV S 基因与 GFP 基因融合后，由于一些空间结构的问题，影响了融合蛋白的表达，需要设计相关实验以明确具体原因。

尽管 SARS-CoV 与 SARS-CoV-2 基因序列具有较高的相似度，并且它们识别的受体也均为 ACE2，但是通过 ELISA 发现 S14 并不能与 SARS-CoV-2 的 RBD 结合，通过假病毒中和试验发现 S14 并不能中和 SARS-CoV-2 假病毒（数据未展示），说明 S14 是特异于 SARS-CoV 的抗体。

SARS-CoV 首次在 2002 年 12 月被发现，不到两年便销声匿迹。最后一次 SARS-CoV 流行发生在 2004 年的中国北京和安徽<sup>[59]</sup>。自那以后，没有新的 SARS 病例报告，可能是因为持续的全球预警、监测和实验室的生物安全措施，以及对可能接触过 SARS-CoV 的动物实施安乐死或检疫<sup>[110][111]</sup>。因此对 SARS-CoV 单克隆抗体的研究文献也很有限，它们多为人源或鼠源抗体，暂没有相关的纳米抗体的报道。我们将这些抗体进行了比较，如下表所示：

表 3.2 SARS-CoV 单克隆比较

抗体名称	亲和力 (pM) <sup>a</sup>	中和活性 (nM) <sup>b</sup>	可能识别表位	参考文献
80R	1590	- <sup>c</sup>	R344、E452、D454、D480、 T487、D480	[63]
m396	4.6	10	Y484、T486、T487、G488、 Y491、Q492 等	[65]
S3.1	-	-	-	[66]
CR3014	-	-	N479	[68]
MAb201	34000	-	490-510 内	[70]
1、3 等	-	-	HR2 内	[72]
S26、S78	-	-	607-627 内	[73]
S34、S84	-	-	548-567 内	[73]

a: 亲和力以平衡解离常数计; b: 中和活性以假病毒半数抑制浓度计; c: 文中未明确说明。

可以看到,绝大多数抗体都靶向于 RBD,但也有抗体靶向于 HR2 内或其他区域,这为中和抗体的研究提供了一种新的视角。RBD 在在病毒与受体结合过程中起重要作用,HR 在膜融合过程起重要作用,因此可以考虑将靶向两个区域的中和抗体联合使用或制成双表位抗体,也许会起到意想不到的效果。

鉴于同一抗体假病毒中和试验结果与活病毒中和试验结果之间高度的相关性,S14 对 SARS-CoV 活病毒的中和活性也应当较好,应当进一步在动物体内进行证实。目前常用的动物模型有小鼠和非人灵长类等。C57 小鼠在鼻内接种 SARS-CoV 后可以检测到肺中病毒的瞬时高水平复制<sup>[112]</sup>,在感染后第 3 天达到高峰,第 9 天即被机体清除,病毒 RNA 主要位于支气管和细支气管上皮。病毒在肺中诱导产生多种趋化因子及其受体,其中 CXCR3 的表达被大量上调。以同样的方式感染 BALB/c,可以观察到病毒在呼吸道中大量复制<sup>[113]</sup>,在第 1 天或第 2 天达到峰值,在细支气管上皮细胞中检测到病毒 RNA 和抗原,而无临床表现,病毒在一周内被清除。Craig W. Day 等<sup>[114]</sup>将 SARS-CoV 在 BALB/c 小鼠体内连续传代 25 次,产生了对 BALB/c 高度致命的毒株,该毒株在 5~6 周龄的小鼠中引起严重的疾病,如毛发竖起和昏睡,体重显著下降,其肺中可检测到高滴度的病毒,小鼠在感染后第 6 天死亡。Chien-Te K. Tseng 等<sup>[115]</sup>建立了人 ACE2 转基因小鼠,在鼻内感染 SARS-CoV 后 3 天能够在小鼠肺和脑中检测到高滴度的病毒和炎症介质,小鼠早期出现毛发竖起、嗜睡、呼吸浅且急促等临床表现,伴有持续的体重减轻,并在 8 天内全部死亡。仓鼠经鼻内 SARS-CoV 感染时,病毒在肺部和鼻甲复制成高滴度<sup>[116]</sup>。感染后第 2 天,下呼吸道的复制达到峰值,并在第 7 天清除。早期呼吸道上皮细胞出现坏死,随后肺组织中出现局灶性实变和炎症反应,最后肺组织得到修复。

SARS-CoV 能够在恒河猴、食蟹猴和非洲绿猴呼吸道中复制,但不诱发疾病<sup>[117]</sup>。在受感染的非洲绿猴的肺中可以检测到中、高滴度的病毒,并伴有间质性肺炎,后者在感染后第四天消退。普通狨猴也能感染 SARS-CoV,感染之后会出现多灶性单核细胞间质性肺炎<sup>[118]</sup>,并多伴有水肿、毛细支气管炎以及多核合胞体细胞的形成。在多数受感染的狨猴肝脏可以观察到多灶性淋巴细胞性肝炎,伴有单个肝细胞坏死。除了肺以外,在一些受感染的狨猴支气管淋巴结和心肌细胞中也可以检测到病毒 RNA。病毒抗原主要位于感染的肺泡巨噬细胞和 I 型肺泡细胞。

## 第四章 抗 MERS-CoV 和 SARS-CoV 双特异性抗体构建与鉴定

### 引言

随着生物技术的不断发展, 抗体的体积越来越小, 人们对抗体功能多样性的需求却越来越高, 人们期望以更小的片段达到更多的功能, 这促进了抗体向多样化方向发展。传统抗体在改造和制备时常常需要考虑到轻链与重链的配对, 而去掉抗体轻链、仅保留单一的重链又常常伴随着抗体亲和力的损失。相比而言, 纳米抗体由于其轻链自然缺失, 结构域单一, 可以很容易地通过基因工程技术对其进行改造, 而不会出现亲和力丢失、抗体聚集等不良后果。本部分我们尝试将 MERS-CoV 纳米抗体 NbMS10 和 SARS-CoV 纳米抗体 S14 通过一个短肽 (氨基酸序列为 GGGGS) 进行连接, 期望达到一个抗体、两个功能的效果, 即改造后的抗体既能抗 MERS-CoV 也能抗 SARS-CoV。我们通过基因工程的方法构建和制备了双特异性抗体, 并通过 ELISA、假病毒中和试验等对其生物学功能进行了评价。

### 4.1 实验材料

#### 4.1.1 细胞

293T (人肾上皮细胞) 细胞由本实验室保存。Huh-7 (人肝癌细胞) 细胞由本实验室保存。

#### 4.1.2 蛋白质

MERS-CoV S1 蛋白 (40069-V08H)、SARS-CoV S1-His 蛋白 (40150-V08B1) 购自北京义翘神州科技有限公司。

#### 4.1.3 主要试剂 (盒)

96 孔酶标板 (CORNING, 9018)、ELISA 包被液 (索莱宝, C1050)、牛血清白蛋白 (索莱宝, A8020)、单组份 TMB 显色液 (索莱宝, PR1200)、终止液 (索莱宝, C1058)、PBS (Gibco, C10010500BT)、DMEM 高糖培养基 (Gibco, 11995081)、胰酶 (Gibco, 25200056)、青霉素/链霉素 (Gibco, 15070063)、胎牛血清 (PAN, P30-3302)、荧光素酶底物 (Perkin Elmer, 6066761) 等。

HRP 偶联的山羊抗人 IgG-Fc 抗体 (ImmunoResearch, 109-035-008)。

#### 4.1.4 主要仪器

分子相互作用分析仪(Probe life, Gator)、酶标仪(BioTeck)、洗板机(BioTeck)。

## 4.2 实验方法

### 4.2.1 抗 MERS-CoV 和 SARS-CoV 双特异性抗体的构建与制备

将纳米抗体 NbMS10 和 S14 通过一个短肽(GGGGS)进行连接,然后在其 C 端加上人 IgG-Fc 片段,命名为 1014-Fc,其基因结构示意图如下:



图 4.1 1014-Fc 抗体结构示意图

1014-Fc 抗体的表达及纯化由三优生物医药(上海)有限公司完成,此项工作由三优生物医药(上海)有限公司完成,其步骤同前。

然后通过 SDS-PAGE 凝胶电泳、考马斯亮蓝染色和脱色液脱色对该抗体进行鉴定。

### 4.2.2 抗 MERS-CoV 和 SARS-CoV 双特异性抗体的生物学功能评价

#### 1、酶联免疫吸附试验

通过 ELISA 测定 1014-Fc 与 MERS-CoV S1 和 SARS-CoV S1 的结合力,其步骤基本同前。

#### 2、生物膜层干涉实验

利用生物膜层干涉技术测定 1014-Fc 与 MERS-CoV S1 和 SARS-CoV S1 的平衡解离常数,其步骤基本同前。

#### 3、假病毒中和试验

通过 MERS-CoV 和 SARS-CoV 假病毒中和试验测定 1014-Fc 的中和活性,其步骤基本同前。

## 4.3 实验结果

### 4.3.1 抗 MERS-CoV 和 SARS-CoV 双特异性抗体的制备与鉴定

使用 Expi 293 细胞对 1014-Fc 抗体进行了表达，然后通过 Protein A 柱对该抗体进行了纯化。随后通过 SDS-PAGE 凝胶电泳对该抗体进行了鉴定，其结果如下图所示：

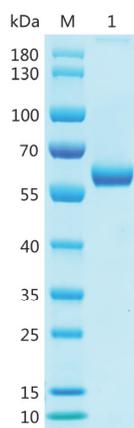


图 4.2 1014-Fc 的 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定

可以看到，制备的抗体具有较好的纯度，其分子量在 55~60 kDa 之间。

#### 4.3.2 抗 MERS-CoV 和 SARS-CoV 双特异性抗体的生物学功能评价

##### 1、结合力鉴定

通过 ELISA 测定了 1014-Fc 与 MERS-CoV S1 和 SARS-CoV S1 的结合力，其结果如下：

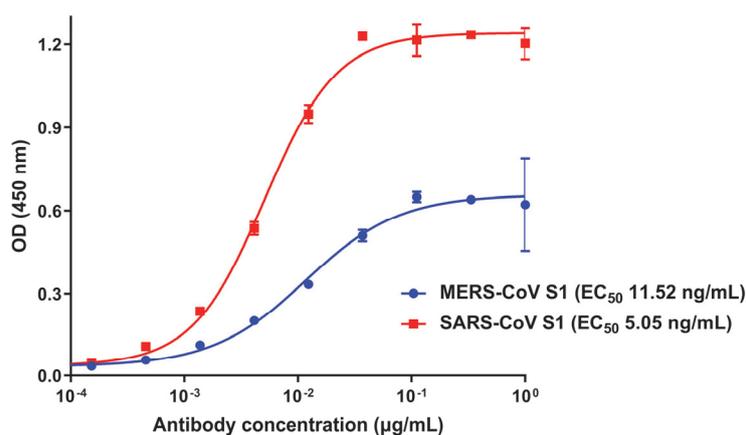


图 4.3 1014-Fc 抗体与 MERS-CoV S1 和 SARS-CoV S1 蛋白 ELISA 鉴定  
OD (450 nm)以平均值±标准差 (n=2) 显示。

可以看到，1014-Fc 与 MERS-CoV S1 和 SARS-CoV S1 的结合力均较高，其

EC<sub>50</sub> 分别为 11.52 ng/mL 和 5.052 ng/mL。

## 2、亲和力测定

利用生物膜层干涉技术分别测定了 1014-Fc 与 MERS-CoV S1 和 SARS-CoV S1 的平衡解离常数，其结果如下：

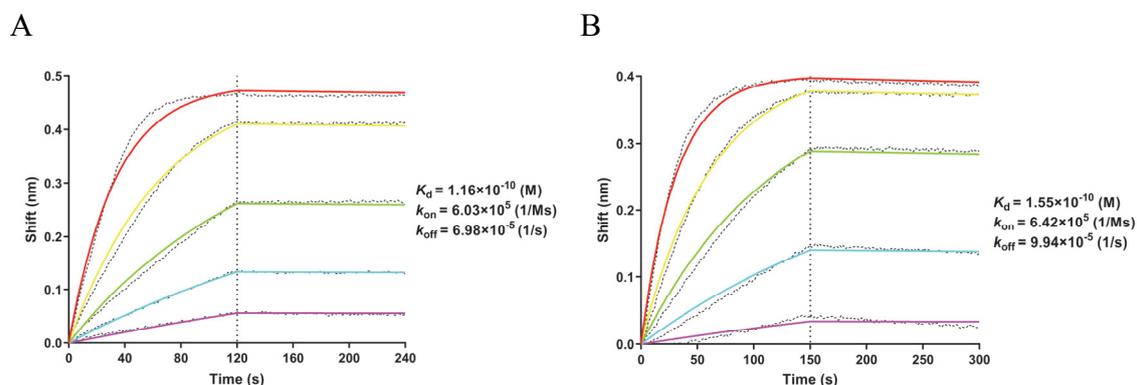


图 4.4 生物膜层干涉实验

图 A 为 1014-Fc 与 MERS-CoV S1 蛋白的平衡解离常数测定。图 B 为 1014-Fc 与 SARS-CoV S1 蛋白的平衡解离常数测定。

通过 Gator 软件对干涉波长的位移进行拟合，算得 1014-Fc 与 MERS-CoV S1 蛋白的平衡解离常数为 116 pM，与 SARS-CoV S1 蛋白的平衡解离常数为 155 pM。

## 3、假病毒中和活性测定

通过假病毒中和试验分别测定了 1014-Fc 对 MERS-CoV 和 SARS-CoV 假病毒的中和活性，其结果如下：

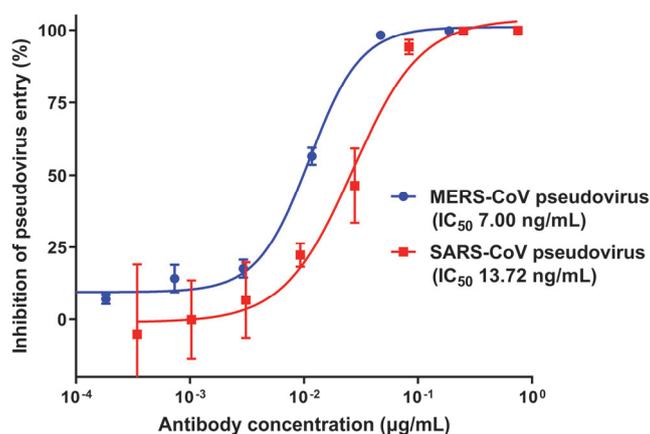


图 4.5 MERS-CoV 和 SARS-CoV 假病毒中和试验

抑制率以平均值±标准差 (n=2) 显示。

可以看到，1014-Fc 对 MERS-CoV 和 SARS-CoV 假病毒均具有较好的中和活性，其 IC<sub>50</sub> 分别为  $6.999 \pm 3.392$  和  $13.72 \pm 1.395$  ng/mL (n=2)。将 1014-Fc 和

NbMS10-Fc 对 MERS-CoV 假病毒的中和活性进行了比较, 将 1014-Fc 和 S14-Fc 对 SARS-CoV 假病毒的中和活性进行了比较, 使用成组 t 检验分别进行了分析, 其结果如下:

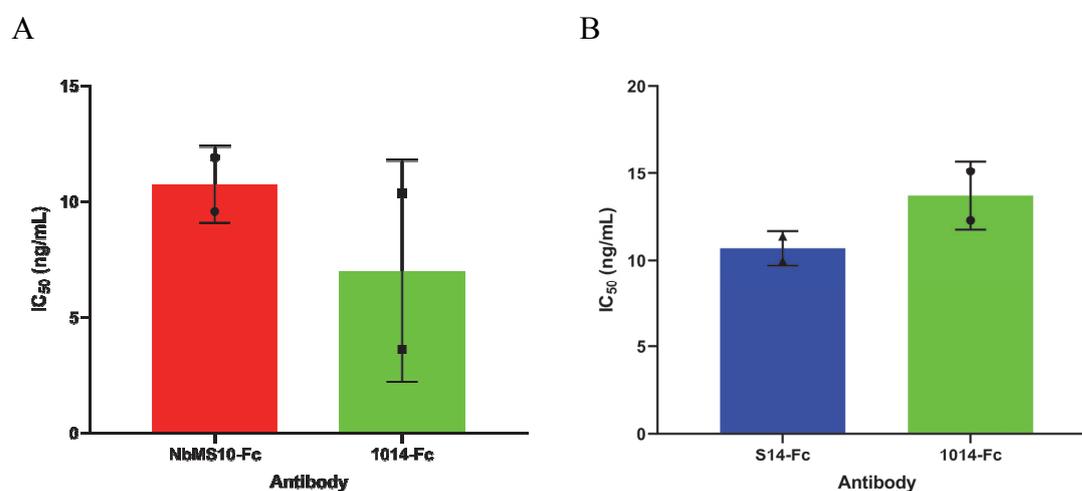


图 4.6 1014-Fc 假病毒中和活性比较

半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 以平均值±标准差 (n=2) 显示。图 A: 1014-Fc 和 NbMS10-Fc 对 MERS-CoV 假病毒的中和活性比较。图 B: 1014-Fc 和 S14-Fc 对 SARS-CoV 假病毒的中和活性比较。

结果显示, 1014-Fc 与 NbMS10-Fc 之间不存在统计学差异 ( $p=0.4070$ ,  $n=2$ ), 1014-Fc 与 S14-Fc 之间也不存在统计学差异 ( $p=0.1914$ ,  $n=2$ ), 说明改造后的抗体其假病毒中和活性没有明显改变。

## 4.4 讨论

本部分研究通过基因工程的方法将抗 MERS-CoV 纳米抗体 NbMS10 和抗 SARS-CoV 纳米抗体 S14 通过一个短肽连接到一起, 然后通过 ELISA、生物膜层干涉实验、假病毒中和试验等评价了该抗体的生物学功能。对改造后的抗体 1014-Fc 和 NbMS-Fc 抗体的抗 MERS-CoV 假病毒中和活性进行了成组 t 检验, 对 1014-Fc 和 S14-Fc 抗体的抗 SARS-CoV 假病毒中和活性进行了成组 t 检验, 结果发现它们均没有统计学差异, 表明两个抗体经短肽连接后, 仍保留着各自的生物学功能, 各部分抗体能够发挥各自的作用, 能够达到同时抗 MERS-CoV 和 SARS-CoV 的作用。

双特异性抗体有很长的历史<sup>[119]</sup>, 它始于来自两种不同多克隆血清的抗原结合片段 (Fab) 被重新结合成双特异性 (Fab')<sub>2</sub><sup>[120]</sup>。目前的生物治疗市场由抗体分子主导, 并且随着抗体技术的不断发展, 双特异性抗体在诊断和治疗应用中越来越受到关注<sup>[121]</sup>, 它代表了下一代抗体治疗的关键组成部分<sup>[122]</sup>。

目前已获批的双特异性抗体有三个：其一是 **Blinatumomab**，它由两个单链可变区片段组成，两部分均来源于鼠单克隆抗体，特异性地结合 CD3 阳性 T 细胞和 CD19 阳性 B 细胞，进而诱导恶性 B 细胞的凋亡和溶解<sup>[123]</sup>，用于治疗成人复发性或难治性 Ph 阴性急性淋巴细胞白血病；其二是 **Emicizumab**，它是一个人源化的双特异性 IgG1 抗体，特异性地结合凝血因子 IX（或 IXa）和凝血因子 X（或 Xa），从而恢复缺失的激活凝血因子 VIII 的功能<sup>[124]</sup>，用以促进血友病 A 患者的有效止血；其三是 **Catumaxomab**，它的两部分均来源于鼠单克隆抗体，特异性地结合人上皮细胞粘附分子阳性肿瘤细胞和 CD3 阳性 T 细胞，从而诱导 T 细胞对恶性肿瘤细胞的杀伤<sup>[125]</sup>，用于治疗恶性腹水。

双特异性抗体需要两条不同的重链和两条不同的轻链，在一个细胞中表达的两种抗体的重链和轻链的混杂配对理论上可以产生 16 中不同的组合（包含 10 种不同的分子），其中只有一种是双特异性的，其余配对产生无功能或单特异性的分子<sup>[126]</sup>。因此，轻重链的正确组装是生产双特异性抗体的挑战之一。在这里，我们只需通过一个短肽把不同特异性的纳米抗体通过基因工程的方法连接起来，就可以制备成双特异性抗体，这在未来的生产制备过程中，能够极大地简化生产工艺，提高抗体的生产效率。并且经过初步验证，双特异性抗体并未出现亲和力的下降，未出现生物学功能的丢失，因此基于纳米抗体的双特异性抗体具有良好的应用前景。

**Caplacizumab** 是目前唯一一个获批的人源化纳米抗体，该抗体通过三个丙氨酸接头将两个相同的人源化纳米连接，靶向于超大血管性血友病因子的 A1 结构域，抑制血管性血友病因子和血小板之间的相互作用<sup>[127]</sup>，从而防止血小板粘附，主要用于治疗获得性血栓性减少性紫癜（aTTP）发作的成年人。该抗体可以利用分泌系统在大肠杆菌中产生，从培养基中纯化出的抗体，通过活性鉴定出其纯度在 99% 以上<sup>[128]</sup>。

尽管目前获批的纳米抗体很少，但 **Ablynx** 公司有多个经改造的纳米抗体处于临床试验阶段，**Caplacizumab** 的获批证实了纳米抗体用于治疗的可行性，鉴于纳米抗体的诸多优点，相信未来纳米抗体一定会展现出良好的应用前景。

## 第五章 结论与展望

为了开发抗 MERS-CoV 和 SARS-CoV 的候选治疗药物,我们以 MERS-CoV 和 SARS-CoV 的 RBD 为靶点,利用噬菌体展示技术,开展了抗 MERS-CoV 和 SARS-CoV 的纳米中和抗体的研究。主要结论如下:

**1、开发了一株高中和活性的抗 MERS-CoV 抗体 M34。**我们以 MERS-CoV S1 和 S 蛋白为抗原对 MERS-CoV RBD 特异性纳米抗体库进行了筛选,鉴定出了 3 株纳米抗体,并从中鉴定出了识别表位不同的纳米抗体 M34。随后利用 ELISA、生物膜层干涉实验、假病毒中和试验、空斑减少中和试验对抗体的生物学特性进行了分析。通过竞争性 ELISA、流式细胞术实验、细胞-细胞融合实验等明确了该抗体通过阻断 MERS-CoV RBD 与受体的结合而发挥作用。

**2、开发了一株双表位抗 MERS-CoV 抗体 1034-Fc。**我们将识别 MERS-CoV RBD 不同表位的抗体通过短肽进行串联融合表达,构建了一株双表位抗体。随后利用 ELISA、生物膜层干涉实验、假病毒中和试验等对抗体的生物学特性进行了分析。发现改造后的抗体生物学特性没有显著变化,对包括 D539N 突变株在内的多个 MERS-CoV 突变株假病毒均具有较好的交叉中和活性。

**3、开发了一株高中和活性的抗 SARS-CoV 抗体 S14。**我们以 SARS-CoV RBD 免疫了羊驼,建立了 SARS-CoV RBD 特异性纳米抗体库。以 SARS-CoV S1 和 RBD 蛋白为抗原对 SARS-CoV RBD 特异性纳米抗体库进行了筛选,鉴定出了 4 株纳米抗体,并利用生物膜层干涉实验、假病毒中和试验等对其中结合活性最好的 S14 进行了进一步的生物学特征分析。通过竞争性 ELISA、流式细胞术实验等明确了该抗体通过阻断 SARS-CoV RBD 与受体的结合而发挥作用。

**4、开发了一株双特异性抗 MERS-CoV 和抗 SARS-CoV 抗体 1014-Fc。**我们将抗 MERS-CoV 纳米抗体和抗 SARS-CoV 纳米抗体通过短肽进行串联融合表达,构架了一株双特异性抗体。随后利用 ELISA、生物膜层干涉实验、假病毒中和试验等对抗体的生物学特性进行了分析。发现改造后的抗体生物学特性没有显著变化,能够同时中和 MERS-CoV 假病毒和 SARS-CoV 假病毒。

鉴于同一抗体的假病毒中和活性与活病毒中和活性之间的高度相关性,我们开发的这些抗体有望通过进一步的研究发展成为候选预防或治疗药物。

COVID-19 给全世界敲响了警钟,对高致病冠状病毒的预防和控制不容忽视,然而到目前为止我们对冠状病毒的认识仍不够充分。从 SARS-CoV、MERS-CoV 和 SARS-CoV-2 综合来看,高致病冠状病毒在其病毒结构、传播途径、致病机制、预防和治疗措施等许多方面具有很高的相似性。因此本研究不仅对开发抗

MERS-CoV 和 SARS-CoV 的治疗药物具有十分重要的意义，对 SARS-CoV-2 以及未来可能出现的其他高致病冠状病毒的防治措施也具有深刻的指导意义。随着人们对病毒研究的不断深入，相信未来人类一定能够从容应对包括冠状病毒在内的所有病毒。

## 参考文献

- [1] Woo PC, Lau SK, Huang Y, Yuen KY. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2009; 234(10):1117-1127.
- [2] Gallagher TM, Buchmeier MJ. Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis [J]. *Virology*. 2001; 279(2):371-374.
- [3] Peiris JS, Yuen KY, Osterhaus AD, Stöhr K. The severe acute respiratory syndrome [J]. *N Engl J Med*. 2003; 349(25):2431-2441.
- [4] Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19 [J]. *Nat Rev Microbiol*. 2021; 19(3):141-154.
- [5] Collins AR, Knobler RL, Powell H, Buchmeier MJ. Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for attachment and cell-cell fusion [J]. *Virology*. 1982; 119(2):358-371.
- [6] Masters PS. The molecular biology of coronaviruses [M]. *Adv Virus Res*. 2006; 66:193-292.
- [7] Sturman LS, Holmes KV, Behnke J. Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid [J]. *J Virol*. 1980; 33(1):449-462.
- [8] Vennema H, Godeke GJ, Rossen JW, et al. Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes [J]. *EMBO J*. 1996; 15(8):2020-2028.
- [9] Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia [J]. *N Engl J Med*. 2012; 367(19):1814-1820.
- [10] de Groot RJ, Baker SC, Baric RS, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group [J]. *J Virol*. 2013; 87(14):7790-7792.
- [11] Xu J, Jia W, Wang P, et al. Antibodies and vaccines against Middle East respiratory syndrome coronavirus [J]. *Emerg Microbes Infect*. 2019; 8(1):841-856.
- [12] Hui DS, Azhar EI, Kim YJ, Memish ZA, Oh MD, Zumla A. Middle East respiratory syndrome coronavirus: risk factors and determinants of primary, household, and nosocomial transmission [J]. *Lancet Infect Dis*. 2018; 18(8):e217-e227.
- [13] Park SH, Kim YS, Jung Y, et al. Outbreaks of Middle East Respiratory Syndrome in Two Hospitals Initiated by a Single Patient in Daejeon, South Korea [J]. *Infect Chemother*. 2016; 48(2):99-107.

- 
- [14] Cho SY, Kang JM, Ha YE, et al. MERS-CoV outbreak following a single patient exposure in an emergency room in South Korea: an epidemiological outbreak study [J]. *Lancet*. 2016; 388(10048): 994-1001.
- [15] Hastings DL, Tokars JI, Abdel Aziz IZ, et al. Outbreak of Middle East Respiratory Syndrome at Tertiary Care Hospital, Jeddah, Saudi Arabia, 2014 [J]. *Emerg Infect Dis*. 2016; 22(5): 794-801.
- [16] Azhar EI, El-Kafrawy SA, Farraj SA, et al. Evidence for camel-to-human transmission of MERS coronavirus [J]. *N Engl J Med*. 2014; 370(26): 2499-2505.
- [17] Alshukairi AN, Zheng J, Zhao J, et al. High Prevalence of MERS-CoV Infection in Camel Workers in Saudi Arabia [J]. *mBio*. 2018; 9(5): e01985-18.
- [18] Chu DK, Poon LL, Gomaa MM, et al. MERS coronaviruses in dromedary camels, Egypt [J]. *Emerg Infect Dis*. 2014; 20(6):1049-1053.
- [19] Haagmans BL, Al Dhahiry SH, Reusken CB, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus in dromedary camels: an outbreak investigation [J]. *Lancet Infect Dis*. 2014; 14(2):140-145.
- [20] Alagaili AN, Briese T, Mishra N, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus infection in dromedary camels in Saudi Arabia [J]. *mBio*. 2014; 5(2): e00884-14.
- [21] Perera RA, Wang P, Gomaa MR, et al. Seroepidemiology for MERS coronavirus using microneutralisation and pseudoparticle virus neutralisation assays reveal a high prevalence of antibody in dromedary camels in Egypt, June 2013 [J]. *Euro Surveill*. 2013; 18(36): pii=20574.
- [22] Reusken CB, Ababneh M, Raj VS, et al. Middle East Respiratory Syndrome coronavirus (MERS-CoV) serology in major livestock species in an affected region in Jordan, June to September 2013 [J]. *Euro Surveill*. 2013; 18(50):20662.
- [23] Reusken CB, Haagmans BL, Müller MA, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus neutralising serum antibodies in dromedary camels: a comparative serological study [J]. *Lancet Infect Dis*. 2013; 13(10): 859-866.
- [24] Kandeil A, Gomaa M, Shehata M, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus infection in non-camelid domestic mammals [J]. *Emerg Microbes Infect*. 2019; 8(1): 103-108.
- [25] Ali M, El-Shesheny R, Kandeil A, et al. Cross-sectional surveillance of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) in dromedary camels and other mammals in Egypt, August 2015 to January 2016 [J]. *Euro Surveill*. 2017; 22(11): 30487.
- [26] Lu G, Hu Y, Wang Q, et al. Molecular basis of binding between novel human coronavirus MERS-CoV and its receptor CD26 [J]. *Nature*. 2013; 500(7461): 227-231.
- [27] Du L, Yang Y, Zhou Y, Lu L, Li F, Jiang S. MERS-CoV spike protein: a key
-

- target for antivirals [J]. *Expert Opin Ther Targets*. 2017; 21(2):131-143.
- [28] Song F, Fux R, Provacia LB, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus spike protein delivered by modified vaccinia virus Ankara efficiently induces virus-neutralizing antibodies [J]. *J Virol*. 2013; 87(21):11950-11954.
- [29] hou Y, Yang Y, Huang J, Jiang S, Du L. Advances in MERS-CoV Vaccines and Therapeutics Based on the Receptor-Binding Domain [J]. *Viruses*. 2019; 11(1):60.
- [30] Raj VS, Mou H, Smits SL, et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC [J]. *Nature*. 2013; 495(7440):251-254.
- [31] Lambeir AM, Durinx C, Scharpé S, De Meester I. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV [J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2003; 40(3):209-294.
- [32] Qiu X, Wong G, Audet J, et al. Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp [J]. *Nature*. 2014; 514(7520):47-53.
- [33] Ying T, Du L, Ju TW, et al. Exceptionally potent neutralization of Middle East respiratory syndrome coronavirus by human monoclonal antibodies [J]. *J Virol*. 2014; 88(14):7796-7805.
- [34] Chen Z, Bao L, Chen C, et al. Human Neutralizing Monoclonal Antibody Inhibition of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Replication in the Common Marmoset [J]. *J Infect Dis*. 2017; 215(12):1807-1815.
- [35] Corti D, Zhao J, Pedotti M, et al. Prophylactic and postexposure efficacy of a potent human monoclonal antibody against MERS coronavirus [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112(33):10473-10478.
- [36] Jiang L, Wang N, Zuo T, et al. Potent neutralization of MERS-CoV by human neutralizing monoclonal antibodies to the viral spike glycoprotein [J]. *Sci Transl Med*. 2014; 6(234):234ra59.
- [37] Tang XC, Agnihothram SS, Jiao Y, et al. Identification of human neutralizing antibodies against MERS-CoV and their role in virus adaptive evolution [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111(19):E2018-E2026.
- [38] Pascal KE, Coleman CM, Mujica AO, et al. Pre- and postexposure efficacy of fully human antibodies against Spike protein in a novel humanized mouse model of MERS-CoV infection [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112(28):8738-8743.
- [39] Li Y, Wan Y, Liu P, et al. A humanized neutralizing antibody against MERS-CoV targeting the receptor-binding domain of the spike protein [J]. *Cell Res*. 2015; 25(11):1237-1249.
- [40] Du L, Zhao G, Yang Y, et al. A conformation-dependent neutralizing monoclonal antibody specifically targeting receptor-binding domain in Middle East respiratory syndrome coronavirus spike protein [J]. *J Virol*. 2014; 88(12):7045-7053.
- [41] Qiu H, Sun S, Xiao H, et al. Single-dose treatment with a humanized neutralizing

- 
- antibody affords full protection of a human transgenic mouse model from lethal Middle East respiratory syndrome (MERS)-coronavirus infection [J]. *Antiviral Res.* 2016; 132:141-148.
- [42] Wang L, Shi W, Joyce MG, et al. Evaluation of candidate vaccine approaches for MERS-CoV [J]. *Nat Commun.* 2015; 6:7712. Published 2015 Jul 28.
- [43] Chen Y, Lu S, Jia H, et al. A novel neutralizing monoclonal antibody targeting the N-terminal domain of the MERS-CoV spike protein [J]. *Emerg Microbes Infect.* 2017; 6(6):e60. Published 2017 Jun 28.
- [44] Zhao G, He L, Sun S, et al. A Novel Nanobody Targeting Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) Receptor-Binding Domain Has Potent Cross-Neutralizing Activity and Protective Efficacy against MERS-CoV [J]. *J Virol.* 2018; 92(18):e00837-18. Published 2018 Aug 29.
- [45] Stalin Raj V, Okba NMA, Gutierrez-Alvarez J, et al. Chimeric camel/human heavy-chain antibodies protect against MERS-CoV infection [J]. *Sci Adv.* 2018; 4(8):eaas9667. Published 2018 Aug 8.
- [46] Peiris JS, Yuen KY, Osterhaus AD, Stöhr K. The severe acute respiratory syndrome [J]. *N Engl J Med.* 2003; 349(25):2431-2441.
- [47] Kuiken T, Fouchier RA, Schutten M, et al. Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome [J]. *Lancet.* 2003; 362(9380):263-270.
- [48] Wong SS, Yuen KY. The severe acute respiratory syndrome (SARS) [J]. *J Neurovirol.* 2005; 11(5):455-468.
- [49] Lim PL, Kurup A, Gopalakrishna G, et al. Laboratory-acquired severe acute respiratory syndrome [J]. *N Engl J Med.* 2004; 350(17):1740-1745.
- [50] Orellana C. Laboratory-acquired SARS raises worries on biosafety [J]. *Lancet Infect Dis.* 2004; 4(2):64.
- [51] Guan Y, Zheng BJ, He YQ, et al. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China [J]. *Science.* 2003; 302(5643):276-278.
- [52] Tu C, Crameri G, Kong X, et al. Antibodies to SARS coronavirus in civets [J]. *Emerg Infect Dis.* 2004; 10(12):2244-2248.
- [53] Wu D, Tu C, Xin C, et al. Civets are equally susceptible to experimental infection by two different severe acute respiratory syndrome coronavirus isolates [J]. *J Virol.* 2005; 79(4):2620-2625.
- [54] Li W, Shi Z, Yu M, et al. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses [J]. *Science.* 2005; 310(5748):676-679.
- [55] Li F, Berardi M, Li W, Farzan M, Dormitzer PR, Harrison SC. Conformational states of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein ectodomain [J]. *J Virol.* 2006; 80(14):6794-6800.
-

- 
- [56] Osch BJ, Bartelink W, Rottier PJ. Cathepsin L functionally cleaves the severe acute respiratory syndrome coronavirus class I fusion protein upstream of rather than adjacent to the fusion peptide [J]. *J Virol*. 2008; 82(17):8887-8890.
- [57] Du L, Kao RY, Zhou Y, et al. Cleavage of spike protein of SARS coronavirus by protease factor Xa is associated with viral infectivity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 359(1):174-179.
- [58] Li W, Zhang C, Sui J, et al. Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2 [J]. *EMBO J*. 2005; 24(8):1634-1643.
- [59] Du L, He Y, Zhou Y, Liu S, Zheng BJ, Jiang S. The spike protein of SARS-CoV--a target for vaccine and therapeutic development [J]. *Nat Rev Microbiol*. 2009; 7(3):226-236.
- [60] Li W, Moore MJ, Vasilieva N, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus [J]. *Nature*. 2003; 426(6965):450-454.
- [61] Wong SK, Li W, Moore MJ, Choe H, Farzan M. A 193-amino acid fragment of the SARS coronavirus S protein efficiently binds angiotensin-converting enzyme 2 [J]. *J Biol Chem*. 2004; 279(5):3197-3201.
- [62] Li F, Li W, Farzan M, Harrison SC. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor [J]. *Science*. 2005; 309(5742):1864-1868.
- [63] Sui J, Li W, Murakami A, et al. Potent neutralization of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus by a human mAb to S1 protein that blocks receptor association [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(8):2536-2541.
- [64] Sui J, Li W, Roberts A, et al. Evaluation of human monoclonal antibody 80R for immunoprophylaxis of severe acute respiratory syndrome by an animal study, epitope mapping, and analysis of spike variants [J]. *J Virol*. 2005; 79(10):5900-5906.
- [65] Prabakaran P, Gan J, Feng Y, et al. Structure of severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor-binding domain complexed with neutralizing antibody [J]. *J Biol Chem*. 2006; 281(23):15829-15836.
- [66] Traggiai E, Becker S, Subbarao K, et al. An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus [J]. *Nat Med*. 2004; 10(8):871-875.
- [67] Coughlin M, Lou G, Martinez O, et al. Generation and characterization of human monoclonal neutralizing antibodies with distinct binding and sequence features against SARS coronavirus using Xenomouse [J]. *Virology*. 2007; 361(1):93-102.
- [68] ter Meulen J, Bakker AB, van den Brink EN, et al. Human monoclonal antibody as prophylaxis for SARS coronavirus infection in ferrets [J]. *Lancet*. 2004; 363(9427):2139-2141.
-

- 
- [69] van den Brink EN, Ter Meulen J, Cox F, et al. Molecular and biological characterization of human monoclonal antibodies binding to the spike and nucleocapsid proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus [J]. *J Virol*. 2005; 79(3):1635-1644.
- [70] Greenough TC, Babcock GJ, Roberts A, et al. Development and characterization of a severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus-neutralizing human monoclonal antibody that provides effective immunoprophylaxis in mice [J]. *J Infect Dis*. 2005; 191(4):507-514.
- [71] Roberts A, Thomas WD, Guarner J, et al. Therapy with a severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus-neutralizing human monoclonal antibody reduces disease severity and viral burden in golden Syrian hamsters [J]. *J Infect Dis*. 2006; 193(5):685-692.
- [72] Lai SC, Chong PC, Yeh CT, et al. Characterization of neutralizing monoclonal antibodies recognizing a 15-residues epitope on the spike protein HR2 region of severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) [J]. *J Biomed Sci*. 2005; 12(5):711-727.
- [73] Zhou T, Wang H, Luo D, et al. An exposed domain in the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein induces neutralizing antibodies [J]. *J Virol*. 2004; 78(13):7217-7226.
- [74] Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains [J]. *Nature*. 1993; 363(6428):446-448.
- [75] Muyldermans S, Lauwereys M. Unique single-domain antigen binding fragments derived from naturally occurring camel heavy-chain antibodies [J]. *J Mol Recognit*. 1999; 12(2):131-140.
- [76] Greenberg AS, Avila D, Hughes M, et al. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks [J]. *Nature*, 1995, 374(6518): 168-173.
- [77] 郭婷, 张宇昊, 马良. 纳米抗体的特性及其应用研究进展 [J]. *食品科学*. 2013, 34(3): 294-297.
- [78] 崔华清, 王清明, 基于重链抗体构建的单域抗体研究进展 [J]. *生物工程学报*. 2005, 21(3): 497-501
- [79] Khodabakhsh F, Behdani M, Rami A, Kazemi-Lomedasht F. Single-Domain Antibodies or Nanobodies: A Class of Next-Generation Antibodies [J]. *Int Rev Immunol*. 2018; 37(6):316-322.
- [80] Cortez-Retamozo V, Lauwereys M, Hassanzadeh Gh G, et al. Efficient tumor targeting by single-domain antibody fragments of camels [J]. *Int J Cancer*. 2002; 98(3):456-462.
- [81] Muruganandam A, Tanha J, Narang S, Stanimirovic D. Selection of
-

- 
- phage-displayed llama single-domain antibodies that transmigrate across human blood-brain barrier endothelium [J]. *FASEB J.* 2002; 16(2):240-242.
- [82] Abulrob A, Sprong H, Van Bergen en Henegouwen P, Stanimirovic D. The blood-brain barrier transmigrating single domain antibody: mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells [J]. *J Neurochem.* 2005; 95(4):1201-1214.
- [83] Conrath K, Vincke C, Stijlemans B, et al. Antigen binding and solubility effects upon the veneering of a camel VHH in framework-2 to mimic a VH [J]. *J Mol Biol.* 2005; 350(1):112-125.
- [84] Arbabi Ghahroudi M, Desmyter A, Wyns L, Hamers R, Muyldermans S. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies [J]. *FEBS Lett.* 1997; 414(3):521-526.
- [85] Dumoulin M, Conrath K, Van Meirhaeghe A, et al. Single-domain antibody fragments with high conformational stability [J]. *Protein Sci.* 2002; 11(3):500-515.
- [86] Govaert J, Pellis M, Deschacht N, et al. Dual beneficial effect of interloop disulfide bond for single domain antibody fragments [J]. *J Biol Chem.* 2012; 287(3):1970-1979.
- [87] Wesolowski J, Alzogaray V, Reyelt J, et al. Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity [J]. *Med Microbiol Immunol.* 2009; 198(3): 157-174.
- [88] 刘晟, 李敬, 梁兴国, 辛化伟. 单域抗体研究进展 [J]. *千人·生物.* 2015, 2(3): 26-38.
- [89] Harmsen MM, De Haard HJ. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments [J]. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007; 77(1): 13-22.
- [90] Muyldermans S. Applications of Nanobodies [J]. *Annu Rev Anim Biosci.* 2021; 9: 401-421.1,2
- [91] Kromann-Hansen T, Louise Lange E, Peter Sørensen H, et al. Discovery of a novel conformational equilibrium in urokinase-type plasminogen activator [J]. *Sci Rep.* 2017; 7(1):3385. Published 2017 Jun 13.
- [92] Rothbauer U, Zolghadr K, Muyldermans S, Schepers A, Cardoso MC, Leonhardt H. A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins [J]. *Mol Cell Proteomics.* 2008; 7(2): 282-289.
- [93] Morales-Yanez FJ, Sariego I, Vincke C, Hassanzadeh-Ghassabeh G, Polman K, Muyldermans S. An innovative approach in the detection of *Toxocara canis* excretory/secretory antigens using specific nanobodies [J]. *Int J Parasitol.* 2019; 49(8):635-645.
-

- 
- [94] Chakravarty R, Goel S, Cai W. Nanobody: the "magic bullet" for molecular imaging? [J]. *Theranostics*. 2014; 4(4):386-398. Published 2014 Jan 29.
- [95] aursen NS, Friesen RHE, Zhu X, et al. Universal protection against influenza infection by a multidomain antibody to influenza hemagglutinin [J]. *Science*. 2018; 362(6414): 598-602.
- [96] Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies [J]. *Annu Rev Biochem*. 2013; 82:775-797.
- [97] 陈丽颖, 王艳玲, 杨国宇, 胡广超. 新生儿 Fc 受体的研究进展 [J]. *河南农业大学学报*. 2007; 41(4): 469-474.
- [98] Johnson RF, Bagci U, Keith L, et al. 3B11-N, a monoclonal antibody against MERS-CoV, reduces lung pathology in rhesus monkeys following intratracheal inoculation of MERS-CoV Jordan-n3/2012 [J]. *Virology*. 2016; 490: 49-58.
- [99] Houser KV, Gretebeck L, Ying T, et al. Prophylaxis With a Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV)-Specific Human Monoclonal Antibody Protects Rabbits From MERS-CoV Infection [J]. *J Infect Dis*. 2016; 213(10): 1557-1561.
- [100] Coughlin MM, Prabhakar BS. Neutralizing human monoclonal antibodies to severe acute respiratory syndrome coronavirus: target, mechanism of action, and therapeutic potential [J]. *Rev Med Virol*. 2012; 22(1):2-17.
- [101] Daniel TM. The history of tuberculosis [J]. *Respir Med*. 2006; 100(11):1862-1870.
- [102] Ascierio PA, Marincola FM. Combination therapy: the next opportunity and challenge of medicine [J]. *J Transl Med*. 2011; 9:115.
- [103] ui J, Deming M, Rockx B, et al. Effects of human anti-spike protein receptor binding domain antibodies on severe acute respiratory syndrome coronavirus neutralization escape and fitness [J]. *J Virol*. 2014; 88(23):13769-13780.
- [104] He L, Tai W, Li J, et al. Enhanced Ability of Oligomeric Nanobodies Targeting MERS Coronavirus Receptor-Binding Domain [J]. *Viruses*. 2019; 11(2): 166.
- [105] Fan C, Wu X, Liu Q, et al. A Human DPP4-Knockin Mouse's Susceptibility to Infection by Authentic and Pseudotyped MERS-CoV [J]. *Viruses*. 2018; 10(9): 448.
- [106] Zhao J, Li K, Wohlford-Lenane C, et al. Rapid generation of a mouse model for Middle East respiratory syndrome [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111(13): 4970-4975.
- [107] Zhao G, Jiang Y, Qiu H, et al. Multi-Organ Damage in Human Dipeptidyl Peptidase 4 Transgenic Mice Infected with Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus [J]. *PLoS One*. 2015; 10(12): e0145561.
- [108] de Wit E, Rasmussen AL, Falzarano D, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) causes transient lower respiratory tract infection in
-

- 
- rhesus macaques [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110(41): 16598-16603.
- [109]Falzarano D, de Wit E, Feldmann F, et al. Infection with MERS-CoV causes lethal pneumonia in the common marmoset [J]. *PLoS Pathog*. 2014; 10(8): e1004250.
- [110]Shi Z, Hu Z. A review of studies on animal reservoirs of the SARS coronavirus [J]. *Virus Res*. 2008; 133(1):74-87.
- [111]Liang WN, Zhao T, Liu ZJ, et al. Severe acute respiratory syndrome--retrospect and lessons of 2004 outbreak in China [J]. *Biomed Environ Sci*. 2006; 19(6):445-451.
- [112]Glass WG, Subbarao K, Murphy B, Murphy PM. Mechanisms of host defense following severe acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) pulmonary infection of mice [J]. *J Immunol*. 2004; 173(6): 4030-4039.
- [113]Subbarao K, McAuliffe J, Vogel L, et al. Prior infection and passive transfer of neutralizing antibody prevent replication of severe acute respiratory syndrome coronavirus in the respiratory tract of mice [J]. *J Virol*. 2004; 78(7): 3572-3577.
- [114]Day CW, Baric R, Cai SX, et al. A new mouse-adapted strain of SARS-CoV as a lethal model for evaluating antiviral agents in vitro and in vivo [J]. *Virology*. 2009; 395(2): 210- 222.
- [115]Tseng CT, Huang C, Newman P, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of mice transgenic for the human Angiotensin-converting enzyme 2 virus receptor [J]. *J Virol*. 2007; 81(3): 1162-1173.
- [116]Roberts A, Vogel L, Guarner J, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of golden Syrian hamsters [J]. *J Virol*. 2005;79(1):503-511.
- [117]McAuliffe J, Vogel L, Roberts A, et al. Replication of SARS coronavirus administered into the respiratory tract of African Green, rhesus and cynomolgus monkeys [J]. *Virology*. 2004; 330(1): 8-15.
- [118]Greenough TC, Carville A, Coderre J, et al. Pneumonitis and multi-organ system disease in common marmosets (*Callithrix jacchus*) infected with the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus [J]. *Am J Pathol*. 2005; 167(2): 455-463.
- [119]Riethmüller G. Symmetry breaking: bispecific antibodies, the beginnings, and 50 years on [J]. *Cancer Immun*. 2012; 12:12.
- [120]NISONOFF A, RIVERS MM. Recombination of a mixture of univalent antibody fragments of different specificity [J]. *Arch Biochem Biophys*. 1961; 93:460-462.
- [121]Brinkmann U, Kontermann RE. The making of bispecific antibodies [J]. *MAbs*. 2017; 9(2):182-212.
- [122]Wang Q, Chen Y, Park J, et al. Design and Production of Bispecific Antibodies [J]. *Antibodies (Basel)*. 2019; 8(3):43.
- [123]Newman, M. J., & Benani, D. J. (2016). A review of blinatumomab, a novel immunotherapy [J]. *Journal of oncology pharmacy practice: official publication of*
-

- the International Society of Oncology Pharmacy Practitioners, 22(4), 639–645.
- [124]Blair H. A. (2019). Emicizumab: A Review in Haemophilia A [J]. *Drugs*, 79(15), 1697–1707.
- [125]Frampton J. E. (2012). Catumaxomab: in malignant ascites [J]. *Drugs*, 72(10), 1399–1410.
- [126]Schaefer W, Völger HR, Lorenz S, et al. Heavy and light chain pairing of bivalent quadroma and knobs-into-holes antibodies analyzed by UHR-ESI-QTOF mass spectrometry [J]. *MAbs*. 2016; 8(1):49-55.
- [127]Duggan S. (2018). Caplacizumab: First Global Approval [J]. *Drugs*, 78(15), 1639–1642.
- [128]Irichts H, Silence K, Schoolmeester A, et al. Antithrombotic drug candidate ALX-0081 shows superior preclinical efficacy and safety compared with currently marketed antiplatelet drugs [J]. *Blood*. 2011; 118(3): 757-765.

## 附录 A 部分试剂及培养基配方

LB 液体培养基: 称取胰蛋白胨 (10 g/L)、氯化钠 (10 g/L)、酵母粉 (5 g/L), 加去离子水充分溶解并定容至相应体积, 高压灭菌处理。

LB 固体培养基: 在 LB 液体培养基的基础上添加 15 g/L 的琼脂粉, 高压灭菌处理。

2×YT 液体培养基: 称取胰蛋白胨 (16 g/L)、氯化钠 (10 g/L)、酵母粉 (5 g/L), 加去离子水充分溶解并定容至相应体积, 高压灭菌处理。

2×YTAG 液体培养基: 称取胰蛋白胨 (16 g/L)、氯化钠 (10 g/L)、酵母粉 (5 g/L), 加去离子水充分溶解并定容至 90%相应体积, 经高压灭菌并充分冷却后, 加入 10%相应体积的 20% (w/v)的葡萄糖 (终浓度 2%) 和体积忽略不计的氨苄抗生素 (终浓度 100 μg/mL)。

2×YTAG 固体培养基培养基: 在 2×YTAG 液体培养基的基础上添加 18 g/L 的琼脂粉。

2×YTAK 液体培养基: 为在 2×YT 液体培养基的基础上加入氨苄抗生素 (终浓度 100 μg/mL) 和卡那霉素 (终浓度 50 μg/mL)。除葡萄糖和抗生素经 0.22 μm 滤器过滤除菌外, 培养基其余成分均经过 121°C 高压灭菌 20 min。

10%高糖 DMEM 完全培养基: 10%胎牛血清+1%双抗+89% 高糖 DMEM 培养基。

Buffer A (用于 His 标签蛋白纯化): 称取 HEPES (11.92 g/L)、氯化钠 (29.25 g/L), 加去离子水充分溶解, 调 pH 至 7.5 并定容至相应体积。

Buffer B (用于 His 标签蛋白纯化): 称取 HEPES (11.92 g/L)、氯化钠 (29.25 g/L)、咪唑 (34.04 g/L), 加去离子水充分溶解, 调 pH 至 7.5 并定容至相应体积。

PEG/NaCl 溶液: 称取氯化钠 (146.25 g/L)、PEG 6000 (200 g/L), 加去离子水充分溶解并定容至相应体积, 高压灭菌处理。

## 附录 B 用于序列比对的 2012-2019 年 MERS-CoV 流行株 GenBank 编号

ATG84679 ;AQZ41282 ;ASU45708 ;ASU45696 ;ALJ54500 ;AVN89313 ;AVN89291 ;AVN89302 ;ASU90791 ;QBM11748 ;AXP07355 ;QAT98898 ;AXP07345 ;QAT98909 ;QBM11737 ;AVN89365 ;AMO03401 ;ASY99842 ;AHY22545 ;ASU45807 ;AKN24830 ;AKN24803 ;AID55089 ;AMW90853 ;AKN24785 ;AKN24767 ;AMW90845 ;AKN24821 ;ALA49693 ;AMW90851 ;AID55073 ;ALA49374 ;AKN24812 ;AMW90854 ;AKN24794 ;AID55101 ;AMW90846 ;AHZ58501 ;ALA49704 ;AID55091 ;AMW90849 ;AID55093 ;AMW90852 ;AID55094 ;AMW90850 ;AMW90847 ;AKN24758 ;AID55100 ;AID55098 ;AMW90848 ;AKN24776 ;AID55103 ;AKN24749 ;ALJ54491 ;ANI69889 ;ANI69878 ;QBF80543 ;AVN89324 ;AID55090 ;ALA49341 ;QBF80532 ;ALJ54446 ;QBF80499 ;AVN89344 ;QBF80521 ;AVN89334 ;ALJ54468 ;ASU90164 ;ATG84690 ;AKO69634 ;AYM48030 ;AVV61900 ;QDP16206 ;AID55095 ;AKO69636 ;ATG84888 ;AHI48528 ;QGV13484 ;AHL18090 ;ATW75477 ;AHX00711 ;AHX00721 ;AHX00731 ;ATW75480 ;ASU90571 ;ASU91197 ;ASU91164 ;ASU91284 ;ASU90527 ;ASU90318 ;ASU91262 ;ASU90604 ;ATW75479 ;ASU90966 ;ASU90076 ;ASU91142 ;ASU91186 ;ASU90274 ;ASU91305 ;ASU91241 ;ASU91131 ;ASU91109 ;ASU91273 ;ASU91325 ;ASU90769 ;ASU91153 ;ASU91219 ;ALR69641 ;ASU90087 ;ALJ54461 ;ASU91120 ;ASU91230 ;ASU90593 ;ASU91175 ;ASU89944 ;QDP16195 ;ASU89999 ;ASU90428 ;ASU90010 ;ASU91087 ;ASU90043 ;ASU90637 ;ASU91252 ;ASU90901 ;ASU89977 ;ASU91076 ;ASU90241 ;ASU90978 ;ASU90538 ;ASU89966 ;ASU90098 ;ASU91315 ;ASU90340 ;ASU90307 ;ASU90626 ;ASU91295 ;ASU90362 ;ASU90329 ;AHC74088 ;AHC74098 ;ALA50067 ;ALJ54458 ;ANI69846 ;ASU90824 ;ANI69868 ;ANI69857 ;QFQ59587 ;ALJ54483 ;ANI69835 ;ASU90747 ;AVK87417 ;AVK87395 ;AXN92249 ;AXN73359 ;AVK87373 ;AVK87351 ;ANF29239 ;AVK87439 ;AVK87428 ;ATG84877 ;AXN92228 ;ATY74414 ;ALA49902 ;ATY74403 ;ALA49946 ;ALA49429 ;AVK87329 ;AVK87406 ;AVK87340 ;AVK87471 ;ALA49396 ;ALA49407 ;ALA49418 ;AXN92238 ;QCI31469 ;ATY74392 ;AVK87384 ;AVK87362 ;ALA49836 ;AVK87318 ;AJG44113 ;AJG44102 ;AVN89398 ;AVN89442 ;AVN89420 ;AVN89387 ;AVN89453 ;AVN89376 ;AVN89431 ;AVN89409 ;ASY99811 ;ASY99864 ;AIZ48769 ;AGG22542 ;AFY13307 ;ALJ54496 ;ALJ54518 ;ALW82691 ;AGV08379 ;ANF29261 ;AGV08408 ;ATG84855 ;ANC28645 ;ALJ54490 ;ANC28656 ;ALB08322 ;ALK80291 ;ALB08311 ;ANC28678 ;AHZ20790 ;AKM76239 ;AHY22555 ;AID55087 ;ALK80311 ;AML60270 ;AKN11073 ;ALK80202 ;AKN11072 ;ALK80222 ;AKS48062 ;ALK80301 ;ANC28689 ;ALK80251 ;AKN11074 ;ALK80232 ;ALK80281 ;ALB08289 ;ALB08300 ;ALK80271 ;ANC28700 ;ALK80261 ;ALB08278 ;ALK80192 ;ALK80212 ;ANC28

711 ;AKN11075 ;ANC28667 ;ANC28634 ;ALB08267 ;QEJ82215 ;QEJ82226 ;AKL59  
401 ;QCQ29075 ;QBF80598 ;ALJ54520 ;AGV08584 ;ALJ54501 ;QBF80488 ;ALX272  
28 ;ALJ76286 ;ALJ76277 ;ALJ54517 ;AWU59321 ;AXG21654 ;ALJ54486 ;ALJ54495  
;AHZ90568 ;ALJ76285 ;AMQ48993 ;ALJ76278 ;AID55088 ;AMW90844 ;AGV0843  
8 ;AXN92260 ;ATG84701 ;ANF29195 ;ATG84833 ;AXN73503 ;ALA49880 ;AHY225  
25 ;ASU91098 ;AXG21643 ;AYV64560 ;AID55099 ;ALJ54469 ;ALJ54507 ;AMQ490  
59 ;ALJ54499 ;ALJ54519 ;ALA49913 ;ALX27232 ;ALJ54451 ;ARQ84757 ;AKK5261  
2 ;QBF80608 ;ASU45730 ;ASU90142 ;ASY99820 ;ALT66824 ;ASU90065 ;ASU9087  
9 ;ASU90758 ;ALA49473 ;AHI48572 ;AJG44080 ;AHN10812 ;AKM76229 ;ALJ5446  
2 ;QGW51940 ;AHI48550 ;AID55081 ;ALJ54472 ;ALX27226 ;ALJ54449 ;ANF29217  
;AGV08535 ;ALA49781 ;AHB33326 ;ASU45851 ;ALJ54447 ;QBF80477 ;QBF80510 ;  
QCQ28832 ;AKJ80137 ;ASU90197 ;ALW82720 ;AID55075 ;ASY99853 ;ALJ76280 ;  
ASU45719 ;ALJ54478 ;AHI48616 ;ALA49484 ;ALA49924 ;QGW51920 ;AID55086 ;  
AXN73514 ;ALA49770 ;ASU45741 ;ALJ54487 ;ALA49561 ;ASU89933 ;ASU90615 ;  
AHI48737 ;ASY99895 ;ATG84844 ;ALJ54514 ;ALA49539 ;ALA50012 ;ATG84789 ;  
ALJ54504 ;ASU89921 ;ASU90417 ;AKI29255 ;AID50418 ;ANI69900 ;ALW82680 ;A  
XN73415 ;ATG84767 ;AYJ71481 ;QBF80565 ;AJG44124 ;AXN73393 ;QBF80554 ;A  
RQ84746 ;AKN11076 ;AQZ41296 ;AGN52936 ;QCQ28833 ;AGV08558 ;ASU90835 ;  
QCQ28828 ;AHE78108 ;ASU45840 ;ALA49517 ;ALA49528 ;ALJ54513 ;QGW51939  
;AGV08524 ;ASU90230 ;AHX71946 ;ALA49715 ;ATG84866 ;AGV08573 ;AGV0850  
5 ;AID55070 ;ASU90439 ;ALA49605 ;ALJ54475 ;AQZ41283 ;ALJ54467 ;AXN73404  
;ALX27229 ;ASU90659 ;ASY99800 ;ALA49957 ;AJG44058 ;ALJ54509 ;QEU56411  
;ALA49572 ;ASU45752 ;ALW82647 ;ASU90890 ;ATG84756 ;ALA49682 ;AIY60528  
;ASU90351 ;ASU90648 ;ATG84723 ;ALJ54453 ;ALM26400 ;ALA49825 ;ALJ54515 ;  
AID55083 ;ATG84899 ;ALW82669 ;ALJ54503 ;AIY60588 ;AGN70951 ;ASU89955 ;  
ASU90670 ;ALJ54455 ;AID55066 ;ALJ54484 ;QBF80576 ;ALW82702 ;AGV08455 ;  
ASU90186 ;ALJ54443 ;ALJ54470 ;QCQ28834 ;AHZ64057 ;ALA49979 ;AKQ21073 ;  
ALA49352 ;ALA50001 ;ALJ54510 ;ASU45785 ;ASU90560 ;QBF80611 ;AKQ21064 ;  
AGN70929 ;ALT66880 ;AVN89354 ;ALA50034 ;ASU45796 ;ANF29206 ;ALJ54476 ;  
AHI48652 ;AHI48682 ;AYO86699 ;ARQ84768 ;ASU90109 ;AXG21665 ;ALA49462 ;  
ALJ54464 ;ALJ54466 ;ATG84778 ;ALJ76282 ;AXN73459 ;QCI31480 ;ALT66802 ;A  
HI48594 ;AMQ49015 ;AYP10298 ;ALT66813 ;ALJ54450 ;QBF80455 ;QBF80466 ;A  
GV08480 ;ALJ54485 ;ALJ54516 ;AQZ41343 ;ASU90857 ;ASY99884 ;ALK80242 ;A  
LJ54506 ;ALJ54452 ;ALA49385 ;AJG44069 ;AVK87450 ;ALJ54492 ;QGW51909 ;A  
HI48626 ;AHI48561 ;AID55078 ;ASU90175 ;ANI69824 ;ALW82742 ;AQZ41354 ;AL  
X27227 ;ALJ54448 ;AGN70973 ;AKO69635 ;ASU90912 ;ASU91054 ;ALA49935 ;AL  
J54473 ;AHI48605 ;ALW82753 ;ALA49748 ;ASU90483 ;ASU90725 ;AZK15900 ;AK  
K52592 ;AHI48662 ;AIZ74450 ;ASU90846 ;AGV08444 ;ANF29162 ;QBF44115 ;AS  
U45873 ;ASU91032 ;QGW51941 ;AXN73426 ;AID55092 ;AQZ41322 ;AQZ41332 ;Q

CQ28835 ;AHI48583 ;AID55076 ;ALJ54479 ;ASU91021 ;ASY99906 ;ASU45829 ;AR  
Q84735 ;ALJ54488 ;AID55068 ;AQZ41365 ;AKA63509 ;AHI48672 ;ASU45818 ;ALS  
20350 ;AIZ74405 ;ASU90956 ;ASU90295 ;ALJ54493 ;ASU90582 ;ASU90703 ;AHI48  
539 ;AID55079 ;AID55085 ;AQZ41311 ;ALJ54482 ;ALA50023 ;AXN73525 ;AKL806  
04 ;ALJ54441 ;AXN73448 ;AXN73492 ;ALA49990 ;ASU90736 ;ALJ54445 ;ALL264  
09 ;ALA49583 ;AIY60558 ;ASU45763 ;ASU90285 ;ASU91010 ;ALA49847 ;AXN734  
37 ;AKI29275 ;AID55102 ;AGV08390 ;AID55071 ;ASU90384 ;AMQ49048 ;ASU908  
02 ;ALJ54474 ;ALJ76284 ;ATG84800 ;ASU45774 ;ASY99831 ;AHY21469 ;ASU9026  
3 ;ATG84910 ;ALD51904 ;AID55069 ;ASU90252 ;ASU90923 ;ASY99873 ;AFS88936  
;ATY74381 ;AGV08492 ;AGV08426 ;AIY60578 ;ALW82636 ;ALJ54521 ;AKK5260  
2 ;ALA50056 ;AID55096 ;ALJ54508 ;AVK87461 ;AXN73370 ;ALA49506 ;ALA4985  
8 ;ALJ54454 ;ASU90868 ;ANI69911 ;AID55082 ;ATG84745 ;QBF80607 ;AYJ71470 ;  
AID55080 ;ALJ54494 ;AIZ74417 ;ASY99789 ;AKI29265 ;ALA49792 ;AIY60518 ;AL  
J54463 ;ALJ54471 ;AKL80593 ;ASU90813 ;ASU90032 ;ASU90219 ;ALX27225 ;AJD  
81440 ;ANF29173 ;QBF44113 ;ASU91043 ;ASU90472 ;ASU90505 ;ALA49814 ;AHY  
22535 ;AWM99582 ;AKL80615 ;AQZ41285 ;ALT66870 ;QEU56412 ;AHE78097 ;AS  
U90945 ;ALA49968 ;ASU45862 ;ASU90549 ;AKI29284 ;ALA49649 ;ASU90681 ;AL  
A49550 ;ALA49451 ;ALA49737 ;ALA49869 ;AKQ21055 ;AID55097 ;ALW82731 ;A  
GH58717 ;AJG44091 ;ALJ54505 ;ASU90692 ;ASU90999 ;ALJ54480 ;AKN11071 ;AL  
J54457 ;ALA49363 ;AIZ74439 ;ALA49891 ;ALB08257 ;ALJ76279 ;AHI48517 ;ATG8  
4712 ;ALW82658 ;AID55077 ;AIY60538 ;ASY99778 ;ASU90395 ;ASU90406 ;QCQ2  
8836 ;ALB08246 ;ALJ54459 ;ALA49440 ;AMQ49070 ;QBF44114 ;ALJ54502 ;AHI48  
692 ;ALJ54512 ;QGW51938 ;ATW75478 ;ALJ54460 ;QCQ28830 ;ASU90153 ;ATG8  
4734 ;ALA49594 ;ASU90373 ;QCQ28829 ;ALA49759 ;ALA49803 ;ASU90461 ;AXN  
73481 ;AQZ41306 ;AMQ49026 ;AXN73381 ;ASU91065 ;AXN73470 ;ALA49616 ;AL  
A49627 ;ALX27243 ;AMQ49037 ;ASU90780 ;ALL26396 ;AKK52582 ;AID55067 ;AI  
Y60568 ;ASU90120 ;ALA49671 ;ALW82709 ;ASU90054 ;ALJ54498 ;QGW51898 ;Q  
BF80587 ;ATG84811 ;ANF29272 ;AHI48739 ;AID55084 ;ALJ54489 ;AHI48702 ;AL  
A49726 ;ASU90516 ;ALJ54481 ;ALA50045 ;AJD81451 ;ASU90714 ;AQZ41376 ;AT  
G84921 ;AHI48711 ;ATG84822 ;ANF29228 ;ALA49495 ;ALA49660 ;AGV08546 ;AI  
Y60548 ;AIZ48760 ;ASU89988 ;ASU90934 ;ALJ54511 ;QCQ28831 ;ASU90131 ;ALJ  
54456 ;ALA49638 ;ALJ76283 ;ALJ54442 ;AGV08467 ;AIZ74433 ;ALJ54444 ;AHY22  
565 ;ASU90494 ;ANF29184 ;ALJ54465 ;ALJ54477 ;AGN70962 ;AID55072 ;ASU902  
08 ;ALJ54497 ;ANF29250 ;ASU90021 ;ASU90988 ;ASU91208 ;ALJ76281 ;AYV6454  
9 ;AID55074 ;ANI69922 ;

## 在学期间取得的学术成果

- [1] **Li, J.**, He, L., Deng, Y., Qi, S., Chen, Y., Zhang, X., Hu, S., Fan, R., Zhao, G., Qin, C. (2021). Generation and characterization of a nanobody against SARS-CoV. *Virological Sinica*. (Accepted) (第一作者, IF=3.242)
- [2] He, L., Tai, W., **Li, J.**, Chen, Y., Gao, Y., Li, J., Sun, S., Zhou, Y., Du, L., & Zhao, G. (2019). Enhanced Ability of Oligomeric Nanobodies Targeting MERS Coronavirus Receptor-Binding Domain. *Viruses*, 11(2), 166. <https://doi.org/10.3390/v11020166> (共同第一作者, IF=3.816)
- [3] Zhao, G., He, L., Sun, S., Qiu, H., Tai, W., Chen, J., **Li, J.**, Chen, Y., Guo, Y., Wang, Y., Shang, J., Ji, K., Fan, R., Du, E., Jiang, S., Li, F., Du, L., & Zhou, Y. (2018). A Novel Nanobody Targeting Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) Receptor-Binding Domain Has Potent Cross-Neutralizing Activity and Protective Efficacy against MERS-CoV. *Journal of virology*, 92(18), e00837-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00837-18>
- [4] Jiang, Y., Li, J., Teng, Y., Sun, H., Tian, G., He, L., Li, P., Chen, Y., Guo, Y., **Li, J.**, Zhao, G., Zhou, Y., & Sun, S. (2019). Complement Receptor C5aR1 Inhibition Reduces Pyroptosis in hDPP4-Transgenic Mice Infected with MERS-CoV. *Viruses*, 11(1), 39. <https://doi.org/10.3390/v11010039>
- [5] Gu, H., Chen, Q., Yang, G., He, L., Fan, H., Deng, Y. Q., Wang, Y., Teng, Y., Zhao, Z., Cui, Y., Li, Y., Li, X. F., **Li, J.**, Zhang, N. N., Yang, X., Chen, S., Guo, Y., Zhao, G., Wang, X., Luo, D. Y., ... Zhou, Y. (2020). Adaptation of SARS-CoV-2 in BALB/c mice for testing vaccine efficacy. *Science (New York, N.Y.)*, 369(6511), 1603–1607. <https://doi.org/10.1126/science.abc4730>
- [6] Sun, S., He, L., Zhao, Z., Gu, H., Fang, X., Wang, T., Yang, X., Chen, S., Deng, Y., **Li, J.**, Zhao, J., Li, L., Li, X., He, P., Li, G., Li, H., Zhao, Y., Gao, C., Lang, X., Wang, X., ... Sun, Y. (2021). Recombinant vaccine containing an RBD-Fc fusion induced protection against SARS-CoV-2 in nonhuman primates and mice. *Cellular & molecular immunology*, 18(4), 1070–1073. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00658-z>
- [7] 何雷, **李江凡**, 任烁, 孙世惠, 郭彦, 邱洪杰, 廖远祥, 姬凯源, 范瑞文, 赵光宇, 周育森. 中东呼吸综合征冠状病毒特异性纳米抗体噬菌体展示库的构建和鉴定 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2017, 33(12): 1662-1668.
- [8] 周旋, 寇志华, 郭彦, **李江凡**, 何雷, 邱洪杰, 孙世惠, 周育森, 赵光宇, 杜恩歧. 一种不依赖于活病毒的中东呼吸综合征冠状病毒受体结合区特异性中和抗体检测方法的建立 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2018, 34(05): 447-451+471.
- [9] 郭彦, 陈月红, 何雷, 李沛, **李江凡**, 孙世惠, 赵光宇, 周育森. 表达鼠疫苗 F1

抗原的重组芽孢的制备及口服免疫效果观察 [J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(09): 785-790.

## 主要简历

姓名	李江凡	性别	男	出生年月	1992年06月
籍贯	湖北大悟	民族	汉	政治面貌	中共党员
<b>主要学习及工作经历：</b> 2010.09-2015.06 武汉大学，临床医学专业，本科 2015.09-2021.06 军事科学院，军事预防医学专业，硕博连读研究生					
<b>奖惩情况：</b> 2015年12月 原军事医学科学院研究生部“优秀学员” 2019年12月 微生物流行病学研究所嘉奖 2020年12月 微生物流行病学研究所“四有”优秀学员					

## 致 谢

光阴似箭，岁月如梭，六年的研究生学习生涯转眼就快要结束了。这六年不仅是我学习的一个重要阶段，更是我个人成长的一个重要阶段，特此向六年来关心和帮助我的各位老师、同学、实验室兄弟姐妹、朋友和家人致以衷心的感谢！

衷心感谢我的导师周育森老师，是他开启了我的科研之路，让我完成了从一个临床医学生向一个科研工作者的巨大改变。在生活中，周老师平易近人，经常对我嘘寒问暖，主动了解我遇到的困难和挫折，并热心地提供解决的方法。在科研工作中，周老师则严谨严厉，对细节问题丝毫不放过。周老师还经常鼓励我大声发言，敢于说出自己内心所想，注重对我的综合素质的培养。周老师的谆谆教诲犹在耳旁，唯有永远铭记在心。

衷心感谢我的导师秦成峰老师，在我求学的最后一年接纳了我。依稀记得第一次找秦老师的时候，秦老师就问了一个直击灵魂的问题：要轻轻松松过还是努力拼搏一番。这次的谈话以及这一年多来的种种经历，使我的思想发生了根本性的转变，让我更加坚定地朝着我的新目标迈进。秦老师和蔼可亲，从没见过他发脾气。每次跟秦老师讨论完，我都觉得受益匪浅。尽管我英文写作能力差，汇报课题表达不清，但每次秦老师都很耐心地指导我。他很看中对学生各种能力的培养和训练，为了学生的成长尽心尽力。在此衷心祝愿秦老师文章多多、成果多多。

感谢赵光宇老师对我的课题的指导，他在生活中对我也是关爱有加。

感谢邓永强老师对我的课题提出了建设性的意见，在本文成文过程中提出了宝贵的意见。

感谢孙世惠老师对我的课题提供了大量的帮助。

感谢感染免疫与防治研究室的各位老师、师兄师姐和师弟师妹：陈万荣、李军锋、寇志华、于虹、邢丽、王慧、赵忠鹏、邱洪杰、姜玉庭、郭彦、杨裔、曾扬、李丹、陈月红、朱青、陈佳唯、李浩、谷宏婧、何雷、任烁、李悄、宋年平、周旋、王月鹏、李佩、张淑婷、张孝璐、郑玉桂、杭旭东、胡童远、周重光、蒋萍萍、杨贵铖、方军、邹智慧、谢柱、董雪、王彦贺、胡国东、李崇慧、刘伟、郑田田等。

感谢病毒学研究室的各位老师、师兄师姐和师弟师妹：姜涛、李晓锋、赵慧、康晓平、户义、吴晓燕、叶青、陈奇、黄怡娇、黄星耀、李明圆、曹天舒、李裕昌、张森、王洪江、祖述龙、陈祥、周佳、李睿婷、孙梦许、徐炎鹏、程梦丽、郭晶晶、张娜娜、孙妮娜、管梦月、张蓉蓉、周超、德日、朱珠、郭妍、马青青、仇洪影、韦傢郑、刘宇、施攀登、宋广远、罗丹、张伊菲、程晓禾、黄梦婷、武

媚、黄珣、贺梦娇、王峥鉴、张颖等。

感谢山西农业大学提供羊驼的两位老师：董长生、范瑞文。感谢该校协助羊驼实验的各位师兄师姐和师弟师妹：于秀菊、姬凯元、齐淑慧、胡世雄、薛继轩等。

感谢三优生物医药（上海）有限公司的谭永聪老师帮助制备了抗体蛋白。

感谢中国疾病预防控制中心的黄保英老师帮助完成了空斑减少中和试验。

感谢中国食品药品检定研究院的范昌发老师和熊芮博士帮助完成了抗体的体内保护试验。

感谢中国科学院生物物理研究所王祥喜老师和曹磊博士帮助完成抗原-抗体复合物的结构解析。

感谢其他所有在本课题研究中提供帮助的人。

感谢所有对本文提供修改建议或予以肯定的人。

最后感谢父母、岳父母的理解、关心和支持。他们的支持是促使我永远前进的不竭动力之源，他们的关爱是我每天的幸福之源。感谢爱人姚俊祺的不离不弃，感谢她对我的生活关爱有加，对我的缺点和不足的大度包容，在我失落和遭受挫折的时候不断地鼓励着我。