

· 基础研究 ·

# 甲型肝炎病毒 SYX<sub>1</sub> 株在人二倍体细胞 MRC-5 上的适应性及遗传稳定性

李芳芳, 廖辉, 杨文腰, 周荔葆

辽宁成大生物股份有限公司, 辽宁 沈阳 110179

**摘要:** 目的 探讨甲型肝炎病毒(hepatitis A virus, HAV)SYX<sub>1</sub>株在人二倍体细胞 MRC-5 上的适应性及遗传稳定性。方法 将来源于甲肝患者粪便的 HAV SYX<sub>1</sub>株接种至 MRC-5 细胞,连续传代至第 28 代,检测第 1~26 代病毒的抗原含量和病毒滴度;镜下观察第 6 代病毒的形态,并检测其理化性质。取第 13~15 代病毒进行病毒增殖动态研究,确定病毒增殖高峰期。选择第 8、12、18、20、22、25、26 和 28 代病毒,提取病毒基因组 RNA 进行序列测定,分析其遗传稳定性。建立 HAV SYX<sub>1</sub>株主种子批和工作种子批,按照《中国药典》三部(2020 版)要求进行检定。**结果** HAV SYX<sub>1</sub>株在 MRC-5 细胞上连续传至 8 代后,抗原含量稳定在 160~320 EU/mL 之间,病毒滴度维持在 7.3~8.3 lgCCID<sub>50</sub>/mL;病毒颗粒有空心和实心两种类型,直径为 27~32 nm,呈球形,无包膜,表面无突起;可耐受低 pH 及乙醚。确定病毒增殖高峰期为 10 d,抗原含量达 160 EU/mL 以上,病毒滴度达 7.0 lgCCID<sub>50</sub>/mL 以上。HAV SYX<sub>1</sub>株为 HAV IB 亚型,传代过程中所有结构蛋白编码区基因序列未发生突变。HAV 的主种子批和工作种子批的各项检定结果均符合相关要求。**结论** HAV SYX<sub>1</sub>株在 MRC-5 上传代具有良好的适应性及遗传稳定性,可用于甲肝灭活疫苗的研究及生产。

**关键词:** 甲型肝炎病毒 SYX<sub>1</sub>株;人二倍体细胞 MRC-5;适应性;遗传稳定性

**中图分类号:** R392-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-5503(2023)01-0043-05

## Adaptability and genetic stability of hepatitis A virus SYX<sub>1</sub> strain in human diploid cell MRC-5

LI Fang-fang, LIAO Hui, YANG Wen-yao, ZHOU Li-bao

Liaoning Chengda Biotechnology Co., Ltd., Shenyang 110179, Liaoning Province, China

Corresponding author: ZHOU Li-bao, E-mail: zlb74988@163.com

**Abstract: Objective** To investigate the adaptability and genetic stability of hepatitis A virus (HAV) SYX<sub>1</sub> strain in human diploid cell MRC-5. **Methods** HAV SYX<sub>1</sub> strain isolated from feces of patients with hepatitis A was continuously propagated in MRC-5 cells for 28 passages, of which the 1st~26th passages were determined for antigen contents and virus titers, the 6th passage was observed for the morphology under microscope and detected for physicochemical properties, and the 13th~15th passages were studied for virus proliferation dynamics to determine the peak yield of virus proliferation. Genomic RNA was extracted from the 8th, 12th, 18th, 20th, 22nd, 25th, 26th and 28th passages and sequenced to analyze the genetic stability. The main seed batch and working seed batch of HAV SYX<sub>1</sub> strain were established and verified according to the requirements of Chinese Pharmacopoeia (Volume III, 2020 edition). **Results** The antigen content of HAV SYX<sub>1</sub> was stable at 160~320 EU/mL and the titer was maintained at 7.3~8.3 lgCCID<sub>50</sub>/mL after the 8th passages in MRC 5 cells; Virus particles showed two types: hollow and solid, with a diameter of 27~32 nm, spherical, without envelope and protrusions on the surface, which tolerated low pH value and ether. The peak period of virus proliferation was 10 d with an antigen content of more than 160 EU/mL and a virus titer of more than 7.0 lgCCID<sub>50</sub>/mL. HAV SYX<sub>1</sub> was a subtype of HAV IB, and no mutation in the coding region of all structural proteins during passage was observed. The verification results of main seed batch and working seed batch of HAV all met the relevant requirements. **Conclusion** HAV SYX<sub>1</sub> strain showed good adaptability and genetic stability in MRC-5, which might be used for the development and production of inactivated hepatitis A vaccine.

**Keywords:** Hepatitis A virus (HAV) SYX<sub>1</sub> strain; Human diploid cell MRC-5; Adaptability; Genetic stability

基金项目: 辽宁省科学技术计划项目(2014226004).

通信作者: 周荔葆, E-mail: zlb74988@163.com

甲型肝炎(简称甲肝)是由甲型肝炎病毒(hepatitis A virus, HAV)引起的以肝脏损害为主的肠道传染性疾病。HAV 属小 RNA 病毒科,肝炎病毒属,为单链正义 RNA 病毒,基因组长约 7 500 bp<sup>[1-3]</sup>。HAV 主要经由粪-口途径传播,6 个月以上的人群未接种疫苗且未感染 HAV 者普遍易感,潜伏期 15 ~ 50 d,平均持续 28 ~ 30 d<sup>[4-5]</sup>。甲肝为自限性疾病,治疗以一般及支持治疗为主,辅以适当药物,无慢性化,预后良好,接种甲肝疫苗是预防甲肝的有效手段<sup>[6-9]</sup>。

HAV 在多数组织培养系统中增殖缓慢,复制周期长、一般不引起细胞病变、病毒产量低<sup>[10-12]</sup>,给甲肝疫苗的制备带来较大困难,因此,提高病毒产量、缩短病毒增殖周期成为甲肝疫苗生产的关键。本研究采用分离于甲肝患者粪便的 HAV SYX<sub>1</sub> 株感染人胚肺二倍体细胞 MRC-5 株(简称 MRC-5 细胞),经传代培养,适应为甲肝灭活疫苗毒种,建立三级病毒种子批,并按照《中国药典》三部(2020 版)要求对主种子批、工作种子批毒种进行全项检定<sup>[13]</sup>,探讨 HAV SYX<sub>1</sub> 株在 MRC-5 细胞上的传代适应性及遗传稳定性,评价该毒株用于甲肝灭活疫苗研究和生产的可行性。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞及毒株** MRC-5 细胞工作库由辽宁成大生物股份有限公司建立;HAV SYX<sub>1</sub> 株分离自沈阳市第六人民医院(沈阳市传染病医院)收治甲肝患者的粪便,经多次抽提获得上清液,通过离心和聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)沉淀等处理后分装,置 -70 °C 保存。

**1.2 主要试剂** L-15 培养基购自美国 Invitrogen 公司;胎牛血清购自美国 Hyclone 公司;RNA 提取试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司;HAV 抗原 ELISA 检测试剂盒购自浙江省医学科学院;HAV 特异性抗血清(豚鼠源)由辽宁成大生物股份有限公司制备;盐酸及乙醚购自国药集团化学试剂有限公司。

### 1.3 HAV SYX<sub>1</sub> 株在 MRC-5 细胞上适应性的检测

MRC-5 细胞复苏后,采用含 10% 胎牛血清的 L-15 培养基于 37 °C 培养至长满单层,将 HAV SYX<sub>1</sub> 株按 MOI = 0.05 ~ 1.0 接种至 MRC-5 细胞,37 °C 培养至细胞长满单层,降温至 35 °C,培养 4 ~ 5 d,更换含 5% 胎牛血清的 L-15 培养液,继续培养至细胞出现老化脱落开始传代。传代时将细胞培养物反复冻融 2 ~ 3 次,3 000 × g 离心 10 min,取上清,接种 MRC-5 细胞,连续传代培养至第 28 代。随着传代代次的提高,培养时间逐渐缩短,1 ~ 8 代培养 35 d,9 ~ 12 代培养 28 d,

13 ~ 17 代培养 21 d,18 ~ 28 代培养 10 d。

**1.3.1 抗原含量测定** 取 1 ~ 8 代培养 35 d,9 ~ 12 代培养 28 d,13 ~ 17 代培养 21 d,18 ~ 26 代培养 10 d 的病毒收获液各 1 mL,用 PBS 进行 2 倍系列稀释(原倍 ~ 1 : 32),采用 HAV 抗原 ELISA 检测试剂盒检测抗原含量。

**1.3.2 病毒滴度测定** 同 1.3.1 项取各代病毒收获液各 1 mL,用 PBS 进行 10 倍系列稀释( $10^{-3}$  ~  $10^{-8}$ ),加入 24 孔板,200 μL / 孔,滴加  $5 \times 10^4$  个 / mL 的 MRC-5 细胞悬液,1 mL / 孔,于 37 °C 培养至细胞铺满孔底部,更换病毒培养液,降温至 35 °C 继续培养,每隔 4 ~ 5 d 更换 1 次培养液,21 d 后收获。采用 HAV 抗原 ELISA 试剂盒检测 HAV 抗原的  $A_{450}$ ,用 Reed-Muench 法计算 HAV 滴度。

**1.3.3 形态学观察** 取第 6 代培养 35 d 的病毒收获液 1 mL,加入等体积特异性 HAV 抗血清,37 °C 中和 1 h;用 2% 磷钨酸负染,电镜下观察病毒形态,并拍照。

**1.3.4 理化性质检测** 取第 6 代培养 35 d 的病毒收获液 1 mL,分别加入盐酸(调节至 pH 3.0)和 0.2 mL 乙醚,均于 4 °C 处理 12 ~ 18 h;对处理前后的样品按照 1.3.2 项方法测定病毒滴度。

**1.4 病毒增殖动态评价** 取第 13 ~ 15 代培养 21 d 的病毒收获液,按 1.3 项方法分别再次接种至 MRC-5 细胞,并于接种后 5、10、15、17、19、21、23、25、28 d 收获,分别按 1.3.1 和 1.3.2 项方法测定抗原含量及病毒滴度,确定病毒增殖高峰期。

**1.5 HAV SYX<sub>1</sub> 株在 MRC-5 细胞上遗传稳定性的检测** 分别取第 8、12、18、20、22、25、26、28 代病毒收获液(各代病毒培养时间同 1.3.1 项),RNA 提取试剂盒提取病毒基因组 RNA,委托宝生物工程(大连)有限公司进行 RT-PCR 扩增及序列测定。根据 HAV 基因分型特点,从 GenBank 中选取国内外共 10 个代表株:DL3 I A 型(AF512536.1)、FH2 I A 型(AB020568.1)、GBM I A 型(X75215.1)、LU38 I A 型(AF357222.1)、HM175 I B 型(M14707.1)、MBB I B 型(M20273.1)、CF53 II A 型(AY644676.1)、SLF88 II B 型(AY644670.1)、Kor-HAV-F III A 型(JQ65151.1)、HA-JNG06-90F III B 型(AB258387.1),应用 NCBI 在线序列分析软件进行序列分析和基因型 BLAST 比对,评价 HAV SYX<sub>1</sub> 株与其他 10 株 HAV 基因序列的同源性,及不同代次 HAV SYX<sub>1</sub> 株的核酸序列变异情况。根据结构-非结构蛋白 VP1-2A 连接处 168 核苷酸序列,应用 DNAMAN 9.0 软件建立不同型别 HAV VP1-2A 区基因系统进化树,确定 HAV SYX<sub>1</sub> 株基因型(同一基因型间核苷酸差

异 ≤ 15%，同一基因亚型间核苷酸差异 ≤ 7.5%<sup>[14-16]</sup>。

### 1.6 HAV SYX<sub>1</sub>株主种子批及工作种子批的建立

**1.6.1 主种子批** 取第21代毒种，接种至MRC-5细胞，于37℃培养3 d，至长满单层；更换含5%胎牛血清的L-15培养液，于35℃培养7 d；反复冻融2次，收获病毒，3 000 × g离心10 min，去除细胞碎片，补加10% ~ 15%胎牛血清，摇匀，分装，-60℃保存，以第22代病毒作为主种子批。按照《中国药典》三部(2020版)要求进行鉴别试验、病毒滴定、无菌检查、支原体检查、外源病毒因子检查及免疫原性检查<sup>[13]</sup>。

**1.6.2 工作种子批** 将主种子批病毒接种至MRC-5细胞，培养传代至25代，收获液即为工作种子，接种、培养、收获方法同1.6.1项。按照《中国药典》三部(2020版)要求对工作种子批进行鉴别试验、病毒滴定、无菌检查及支原体检查<sup>[13]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 HAV SYX<sub>1</sub>株在MRC-5细胞上的适应性

**2.1.1 抗原含量及病毒滴度** HAV SYX<sub>1</sub>株在体外增殖慢，盲传3代未检测到HAV抗原(图略)。第4代病毒收获液中检出HAV抗原，且随代次的增加，抗原含量及病毒滴度均逐渐升高，于第8代后，抗原含量稳定在160 ~ 320 EU/mL之间，病毒滴度维持在7.3 ~ 8.3 lgCCID<sub>50</sub>/mL。见图1。

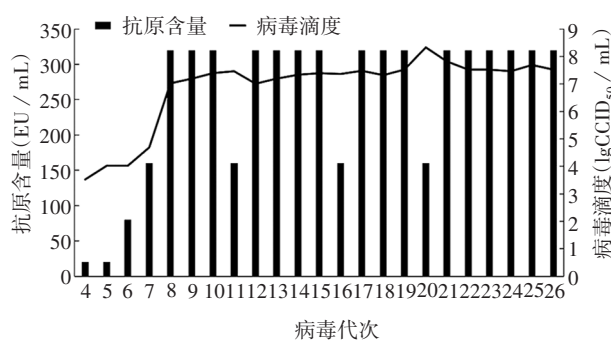


图1 各代HAV SYX<sub>1</sub>株收获液的抗原含量及病毒滴度

Fig. 1 Antigen content and virus titer of harvested solution of various passages of HAV SYX<sub>1</sub> strains

**2.1.2 形态学观察** 第6代病毒收获液经镜下观察，可见免疫凝集的HAV，病毒颗粒有空心和实心两种类型，与HAV典型形态学描述相符；病毒颗粒直径27 ~ 32 nm，呈球形，无包膜，表面无突起。见图2。

**2.1.3 理化性质** 第6代病毒收获液经盐酸(pH 3.0)和乙醚处理后，滴度分别为4.03和3.93 lgCCID<sub>50</sub>/mL，

与未经处理的收获液(4.20 lgCCID<sub>50</sub>/mL)比较，下降幅度均 < 1.0 lgCCID<sub>50</sub>/mL，表明HAV SYX<sub>1</sub>株具有耐受低pH及乙醚的特性。

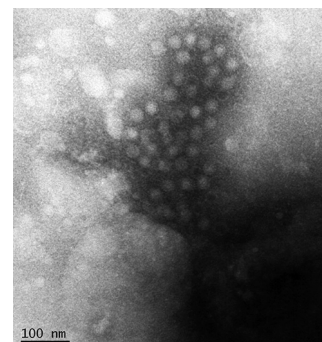


图2 HAV SYX<sub>1</sub>株形态的镜下观察

Fig. 2 Immune electronic micrograph (IEM) of morphology of HAV SYX<sub>1</sub>

**2.2 病毒增殖动态评价** 第13 ~ 15代的病毒培养液接种至MRC-5细胞后，培养约5 d时，各代病毒的抗原含量和滴度均较低；培养10 d，各代病毒抗原含量和滴度上升，分别达160 EU/mL和7.0 lgCCID<sub>50</sub>/mL以上，且较稳定。见表1。确定病毒增殖高峰期为10 d。

表1 第13 ~ 15代病毒不同培养时间的抗原含量和病毒滴度  
Tab. 1 Antigen content and virus titer of 13th ~ 15th passages at various culture durations

培养时间(d)	抗原含量(EU/mL)			病毒滴度(lgCCID <sub>50</sub> /mL)		
	13代	14代	15代	13代	14代	15代
5	160	80	160	5.37	6.03	6.20
10	320	320	320	6.70	7.70	7.70
15	160	320	320	6.47	7.93	8.20
17	160	320	320	6.70	7.37	8.03
19	320	160	320	6.70	7.20	8.20
21	320	320	320	7.20	7.26	7.37
23	160	320	320	7.10	7.53	7.53
25	320	320	320	7.03	7.53	7.37
28	320	320	320	7.20	7.37	7.37

**2.3 HAV SYX<sub>1</sub>株在MRC-5细胞上的遗传稳定性** HAV SYX<sub>1</sub>株cDNA序列长为7 402 bp，涵盖部分5'非编码区和3'编码区及全部编码区，可编码2 225个氨基酸。经BLAST比对，HAV SYX<sub>1</sub>株与其他10株HAV基因序列的同源性达90%以上，8个代次HAV SYX<sub>1</sub>株间存在9处核苷酸差异，差异点位于5'-NCR及非结构蛋白2A、2B、3D的编码区；整个结构蛋白区域的

核苷酸未发生改变。HAV SYX<sub>1</sub> 株属于 I B 亚型, 与 MBB 株亲缘最近, HM175 株次之, 见图 3。

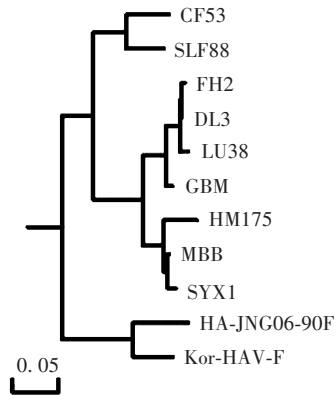


图 3 不同型别 HAV VP1-2A 区基因系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of VP1-2A region genes of various types of HAV

2.4 HAV SYX<sub>1</sub> 株主种子批及工作种子批的检定  
HAV SYX<sub>1</sub> 株主种子批及工作种子批的病毒滴度分别为 7.53 和 7.70 lgCCID<sub>50</sub> / mL, 鉴别试验、无菌试验、支原体检查结果均符合规定。HAV SYX<sub>1</sub> 株主种子批外源病毒因子检查结果符合规定; 以主种子批制备甲肝灭活疫苗进行恒河猴免疫原性试验, 接种疫苗的恒河猴甲肝抗体全部阳转, 证明采用 HAV SYX<sub>1</sub> 株制备的甲肝灭活疫苗具有良好的免疫原性。

### 3 讨论

甲型肝炎灭活疫苗是将 HAV 进行连续传代, 增强其分裂繁殖能力, 在细胞达到较强的繁殖能力后, 经提纯并灭活等步骤制备而成<sup>[17]</sup>, 具有良好的安全性及稳定性。但 HAV 体外组织培养增殖缓慢、产量较低, 因此获得高产、稳定、增殖周期短的 HAV 对甲型肝炎灭活疫苗研发具有重要意义。本研究将分离自甲肝患者粪便的 HAV SYX<sub>1</sub> 株在 MRC-5 细胞上进行传代, 获得的子代病毒呈 HAV 的典型形态, 具有耐受低 pH 和乙醚溶剂的特性。HAV 主要抗原决定簇位于结构蛋白 VP1、VP3 及 VP2 区<sup>[18]</sup>, 本研究结果表明, 在整个结构蛋白区域核苷酸序列均未发生变异, 适应性传代对 HAV SYX<sub>1</sub> 株抗原性未产生影响, 发生变异的位点均在 5'-NCR 和非结构蛋白的编码区, 推测可能与细胞培养适应性有关<sup>[19]</sup>。

本研究培养过程中, HAV 悬浮吸附感染细胞, 待细胞于 37 °C 生长为单层后, 降低培养温度、更换低血清含量的病毒培养液, 防止细胞过度生长老化, 给病毒增殖

提供适宜条件, 经多代次细胞适应性培养, HAV 在感染 10 d 后即可进入病毒增殖平台期, 即达到病毒增殖高峰, 缩短了生产周期。选择第 22 代培养 10 d 的毒种建立疫苗生产主种子批和工作种子批, 并按《中国药典》三部(2020 版)的要求进行检定<sup>[14]</sup>, 检测结果表明, 病毒滴度分别为 7.53 和 7.70 lgCCID<sub>50</sub> / mL, 符合疫苗制备需求; 其他项目检定均符合要求, 其中免疫原性试验结果表明, 用检定合格的 HAV 培养液制备甲肝灭活疫苗, 免疫恒河猴, 恒河猴体内 HAV 抗体全部阳转, 证明 HAV SYX<sub>1</sub> 株制备灭活疫苗具有良好的免疫原性, 有望用于后续疫苗研究及生产, 今后还将对疫苗生产过程中病毒培养的各种条件进行进一步优化和验证。

### 参考文献

- [1] WANG Y B, SUN X Y, XU Y L, *et al.* Research status of hepatitis A virus and vaccine [J]. Chin J Biologicals, 2018, 31 (3): 315-318. (in Chinese)  
王艺博, 孙小雨, 徐艳玲, 等. 甲肝病毒及其疫苗研究现状 [J]. 中国生物制品学杂志, 2018, 31 (3): 315-318.
- [2] WASSENAAR T M, JUN S R, ROBESON M, *et al.* Comparative genomics of hepatitis A virus, hepatitis C virus, and hepatitis E virus provides insights into the evolutionary history of *Hepatovirus* species [J]. Microbiology, 2020, 9 (2): e973. DOI: 10.1002/mbo3.973.
- [3] PINTO R M, PEREZ-RODRIGUEZ F J, COSTAFREDA M I, *et al.* Pathogenicity and virulence of hepatitis A virus [J]. Virulence, 2021, 12 (1): 1174-1185.
- [4] CZUMBEL I, QUINTEN C, LOPALCO P, *et al.* Management and control of communicable diseases in schools and other child care settings: systematic review on the incubation period and period of infectiousness [J]. BMC Infect Dis, 2018, 18 (1): 199.
- [5] SHIN E C, JEONG S H. Natural history, clinical manifestations, and pathogenesis of hepatitis A [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2018, 8 (9): a031708. DOI: 10.1101/cshperspect.a031708.
- [6] ZHANG L. Hepatitis A vaccination [J]. Hum Vaccin Immunother, 2020, 16 (7): 1565-1573.
- [7] HEZOG C, HERCK K V, DAMME P V. Hepatitis A vaccination and its immunological and epidemiological long-term effects - a review of the evidence [J]. Hum Vaccin Immunother, 2021, 17 (5): 1496-1519.
- [8] CAO G Y, JING W Z, LIU J, *et al.* The global trends and regional differences in incidence and mortality of hepatitis A from 1990 to 2019 and implications for its prevention [J]. Hepatol Int, 2021, 15 (5): 1068-1082.
- [9] SHOUVAL D. Immunization against hepatitis A [J]. Cold Spring

- Harb Perspect Med, 2019, 9 (2): a031682. DOI: 10.1101 / cshperspect.a031682.
- [10] LI H K, XU Y L, LIU L J. Research progress of hepatitis A vaccine [J]. Int J Virol, 2018, 25 (4): 286-288. (in Chinese)  
李昊堃, 徐艳玲, 刘令九. 甲型肝炎疫苗研究进展 [J]. 国际病毒学杂志, 2018, 25 (4): 286-288.
- [11] MCKNIGHT K L, LEMON S M. Hepatitis A virus genome organization and replication strategy [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2018, 8 (12): a033480. DOI: 10.1101 / cshperspect.a033480.
- [12] CHAVARRIA-MIRO G, DE CASTELLARNAU M, FUENTES C, *et al.* Advances for the hepatitis A virus antigen production using a virus strain with codon frequency optimization adjustments in specific locations [J]. Front Microbiol, 2021, 12: 642267.
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (三部) [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 159-161.
- [14] COHEN J I, TICEHURST J R, PURCELL R H, *et al.* Complete nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus: comparison with different strains of hepatitis A virus and other picornaviruses [J]. J Virol, 1987, 61 (1): 50-59.
- [15] ROBERTSON B H, JANSEN R W, KHANNA B, *et al.* Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions [J]. J Gen Virol, 1992, 73 (6): 1365-1377.
- [16] DU F X, CAO J Y, ZHOU W T, *et al.* Analysis of the whole genome characteristics of 9 hepatitis A virus strain in China [J]. Chinese J Exp Clin Virol, 2020, 34 (2): 140-144. (in Chinese)  
杜风雪, 曹经媛, 周文亭, 等. 9 株甲型肝炎病毒流行株全基因组特征分析 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2020, 34 (2): 140-144.
- [17] LI G Y, LIU D, BAO X F, *et al.* Progress in the research of viral hepatitis vaccine [J]. Genomics Applied Biol, 2019, 38 (8): 3893-3900. (in Chinese)  
李国亚, 刘达, 鲍秀峰, 等. 病毒性肝炎疫苗的研究进展 [J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38 (8): 3893-3900.
- [18] CAO L, LIU P, YANG P, *et al.* Structural basis for neutralization of hepatitis A virus informs a rational design of highly potent inhibitors [J]. PLoS Biol, 2019, 17 (4): e3000229. DOI: 10.1371 / journal.pbio.3000229.
- [19] KRISHNAMURTHY K, GERARDO G K. Stable growth of wild-type hepatitis A virus in cell culture [J]. J Virol, 2006, 80 (3): 1352-1360.

收稿日期: 2022-02-15 编辑: 李靓

## (上接第 42 页)

- [7] REIMER S L, BENIAC D R, HIEBERT S L, *et al.* Comparative analysis of outer membrane vesicle isolation methods with an Escherichia coli tolA analysis of outer membrane vesicle isolation methods with mutant reveals a hypervesiculating phenotype with outer-inner membrane vesicle content [J]. Front Microbiol, 2021, 12: 628801.
- [8] GERRITZEN M J H, MARTENS D E, WIJFFELS R H, *et al.* Bioengineering bacterial outer membrane vesicles as vaccine platform [J]. Biotechnol Adv, 2017, 35 (5): 565-574.
- [9] WANG J X, WANG Y, MOU J H, *et al.* Decoration of bacterial outer membrane vesicles with liposomes [J]. J Chin Pharm Sci, 2019, 28 (8): 571-578. (in Chinese)  
王佳星, 王雨, 牟家慧, 等. 脂质体对细菌外膜囊泡的修饰及其体外评价 [J]. 中国药学: 英文版, 2019, 28 (8): 571-578.
- [10] LIU Q, TAN K, YUAN J H, *et al.* Flagellin-deficient outer membrane vesicles as adjuvant induce cross-protection of Salmonella typhimurium outer membrane proteins against infection by heterologous Salmonella serotypes [J]. Int J Med Microbiol, 2018, 308 (7): 796-802.
- [11] AYED Z, CUVILLIER L, DOBHAL G, *et al.* Electroporation of outer membrane vesicles derived from Pseudomonas aeruginosa with gold nanoparticles [J]. SN Appl Sci, 2019, 1 (12): 1600.
- [12] ALFONSO O A, RAFAEL P R, MICHAEL J M, *et al.* Characterization of protective extracellular membrane-derived vesicles produced by Streptococcus pneumoniae [J]. J Proteomics, 2014, 106 (1): 46-60.
- [13] WANG X G, CHRISTOPHER D T, CHRISTOPHER W, *et al.* Release of Staphylococcus aureus extracellular vesicles and their application as a vaccine platform [J]. Nat Commun, 2018, 9 (1): 1379-1391.
- [14] MOHAMMADZADEH R, GHAZVINI K, FARSIANI H, *et al.* Mycobacterium tuberculosis extracellular vesicles: Exploitation for vaccine technology and diagnostic methods [J]. Crit Rev Microbiol, 2021, 47 (1): 13-33.
- [15] IRENE C, FANTAPPIÈ L, CAPRONI E, *et al.* Bacterial outer membrane vesicles engineered with lipidated antigens as a platform for Staphylococcus aureus vaccine [J]. Proc Natl Acad Sci, 2019, 116 (43): 21780-21788.
- [16] LI R Z, LIU Q. Engineered bacterial outer membrane vesicles as multifunctional delivery platforms [J]. Front Mater, 2020, 7 (202): 1-18.
- [17] HAYS M P, HOUBEN D, YANG Y, *et al.* Immunization with Skp delivered on outer membrane vesicles protects mice against enterotoxigenic Escherichia coli challenge [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2018, 8 (132): 1-5.
- [18] NEVERMANN J, SILVA A, OTERO C, *et al.* Identification of genes involved in biogenesis of outer membrane vesicles (OMVs) in salmonella enterica serovar typhi [J]. Front Microbiol, 2019, 10 (104): 1-17.
- [19] SCHETTERS S T T, JONG W S P, HORREVORTS S K, *et al.* Outer membrane vesicles engineered to express membrane-bound antigen program dendritic cells for cross-presentation to CD8<sup>+</sup> T cells [J]. Acta Biomater, 2019, 91: 248-257.
- [20] TAN K, LI R Z, HUANG X T, *et al.* Outer membrane vesicles: current status, and future direction, of these novel vaccine adjuvants [J]. Front Microbiol, 2018, 9 (783): 1-12.
- [21] HUANG W L, MENG L X, CHEN Y, *et al.* Bacterial outer membrane vesicles as potential biological nanomaterials for anti-bacterial therapy [J]. Acta Biomater, 2022, 140: 102-115.

收稿日期: 2022-02-07 编辑: 李靓

· 治疗制剂 ·

# 利用单个 B 细胞制备人源 SARS-CoV-2 刺突蛋白单克隆抗体

冯泽众, 路阳, 李佳莹, 马平, 王英楠, 朱瑾琪, 孙金福  
东北大学生命科学与健康学院, 辽宁 沈阳 110169

**摘要:** **目的** 利用单个 B 细胞制备人源严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 刺突蛋白 (S 蛋白) 单克隆抗体, 并检测其中和活性。 **方法** 采集经 2 次 SARS-CoV-2 灭活疫苗 (Vero 细胞) 免疫, 且抗体水平较高的人静脉血, 用人外周血淋巴细胞分离液分离外周血单核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 经偶联 S 蛋白的磁珠分选表达 S 蛋白抗体的单个 B 细胞。将单个 B 细胞反转录后, 用套式 PCR 法扩增 IgG 重链、轻链可变区基因; 通过重叠 PCR 法将可变区基因与 CMV 启动子及 IgG leader 序列 DNA 片段、IgG 恒定区及 PolyA 序列 DNA 片段连接, 构建抗体线性表达盒。将同一 B 细胞的重链、轻链线性表达盒转染 HEK293T 细胞, 表达人源 SARS-CoV-2 S 蛋白单克隆抗体。免疫荧光法检测抗体免疫反应活性, 假病毒中和试验检测抗体中和活性。 **结果** 共表达了 26 株 SARS-CoV-2 S 蛋白单克隆抗体, 经 Western blot 检测, 于相对分子质量约 55 000 和 25 000 处可见 IgG 抗体重链、轻链的蛋白条带。表达的单克隆抗体具有 S 蛋白特异性抗体免疫反应活性。26 株单克隆抗体中, 20 株具有中和活性, 抗体半数抑制浓度 (half-maximal inhibitory concentrations,  $IC_{50}$ ) 在 0.040 ~ 0.545  $\mu\text{g} / \text{mL}$  之间。 **结论** 制备的人源 SARS-CoV-2 S 蛋白单克隆抗体具有较高的中和活性, 有望应用于新型冠状病毒肺炎 (Coronavirus Disease 2019, COVID-19) 治疗药物和检测试剂的研发。

**关键词:** 严重急性呼吸综合征冠状病毒 2; 单个 B 细胞; 单克隆抗体; S 蛋白

**中图分类号:** TQ464.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-5503(2023)01-0048-05

## Preparation of human monoclonal antibody against SARS-CoV-2 spike protein using single B cell

FENG Ze-zhong, LU Yang, LI Jia-ying, MA Ping, WANG Ying-nan, ZHU Jin-qi, SUN Jin-fu  
College of Life and Health Sciences, Northeastern University  
Shenyang 110169, Liaoning Province, China

Corresponding author: SUN Jin-fu, E-mail: sunjinfu@mail.neu.edu.cn

**Abstract:** **Objective** To prepare human monoclonal antibody against spike protein (S protein) of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by using single B cell, and determine its neutralizing activity. **Methods** Venous blood with high antibody level was collected from people immunized with inactivated SARS-CoV-2 vaccine (Vero cells) twice, of which peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by lymphocyte stratified fluid and used to isolate single B cell expressing S protein antibody by magnetic beads coupled with S1 protein. Variable region genes of IgG heavy chain and light chain were amplified by nested PCR after reverse transcription of single B cell, which were connected with CMV promoter, IgG leader sequence, IgG constant region and polyA sequence by overlapping PCR to construct antibody linear expression cassette. Linear expression cassette of the heavy chain and light chain from the same B cell was transfected to HEK293T cells to express human monoclonal antibody of SARS-CoV-2 S protein. Immunoreactivity was detected by immunofluorescence while neutralizing activity by pseudovirus neutralization test. **Results** A total of 26 monoclonal antibodies against SARS-CoV-2 S protein were expressed, which showed heavy chain and light chain protein bands of IgG antibody at

基金项目: 国家自然科学基金(31972677); 沈阳市社会治理科技专项(20-206-4-25).

通信作者: 孙金福, E-mail: sunjinfu@mail.neu.edu.cn

relative molecular masses of about 55 000 and 25 000 as detected by Western blot. The expressed monoclonal antibodies showed S protein specific antibody immunoreactivity, among which 20 showed neutralizing activity and half-maximal inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ) of 0.040 ~ 0.545  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . **Conclusion** The prepared human monoclonal antibodies against SARS-CoV-2 S protein showed high neutralizing activity and may be used in the development of therapeutic drugs and detection reagents of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19).

**Keywords:** Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2); Single B cell; Monoclonal antibody; S protein

严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 感染引起的新型冠状病毒肺炎 (Coronavirus Disease 2019, COVID-19) 严重威胁人类健康和生命安全, 截至 2022 年 5 月 25 日, 全球确诊病例累计超过 5.2 亿, 死亡病例超过 630 万<sup>[1]</sup>。SARS-CoV-2 表面带有刺突蛋白 (S 蛋白), 可与宿主细胞表面的人血管紧张素转换酶 2 (human angiotensin-converting enzyme 2, hACE2) 受体结合, 介导病毒包膜与细胞膜融合, 使病毒侵入细胞<sup>[2]</sup>。靶向 S 蛋白的单克隆抗体可有效干扰 S 蛋白与细胞受体结合, 阻断病毒感染<sup>[3-4]</sup>, 因此, S 蛋白成为疫苗开发和抗体治疗的重要靶点<sup>[5-6]</sup>。本研究利用单个 B 细胞通过 RT-PCR 技术克隆 S 蛋白单克隆抗体重链、轻链可变区基因, 再经重叠 PCR 法将可变区基因与 CMV 启动子及 IgG leader 序列 DNA 片段、IgG 恒定区及 PolyA 序列 DNA 片段连接, 构建抗体线性表达盒, 转染 HEK293T 细胞表达抗体, 并检测抗体的中和活性, 以期应用于治疗 COVID-19 新型药物和检测试剂的研发。

## 1 材料与方法

**1.1 病毒、质粒及细胞** SARS-CoV-2 假病毒、SARS-CoV-2 S 蛋白表达质粒 PMD2. G-S 及过表达 ACE2 的 A549 细胞均由东北大学生命科学与健康学院费腾教授惠赠; 质粒 pCDNA3.1-myc-His 购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; HEK-293T 细胞购自北纳创联生物科技有限公司。

**1.2 血液** 人静脉血液样品采自经 2 次 SARS-CoV-2 灭活疫苗 (Vero 细胞) 免疫, 且 SARS-CoV-2 抗体水平较高的志愿者。所有志愿者均知情同意, 本研究获得东北大学生物与医学伦理委员会批准 (文件批号: NEU-EC-2022A049S)。

**1.3 主要试剂及仪器** 偶联 SARS-CoV-2 S1 蛋白的磁珠购自北京百普赛斯生物科技有限公司; TritonX-100 及 FITC 标记的山羊抗人 IgG 均自美国 Sigma 公司; HRP 标记的山羊抗人 IgG 多克隆抗体购自武汉三鹰生物科技有限公司; First-Strand cDNA Synthesis

SuperMix 及  $2\times$ Taq Plus Master Mix 均购自美国 APEX BIO 公司; 萤火虫荧光素酶报告基因检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 人外周血淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品科技有限责任公司; Protein A 亲和层析介质购自金斯瑞生物科技有限公司; 天能全自动化学发光/荧光图像分析系统 (Tanon-5500) 购自上海天能生命科学有限公司; Eppendorf 显微操作系统购自德国 Eppendorf 公司。

**1.4 B 细胞的分离及筛选** 采用人外周血淋巴细胞分离液进行密度梯度离心, 分离血液样品外周血单核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 于液氮中冻存; 将偶联 SARS-CoV-2 S1 蛋白的磁珠 100  $\mu\text{g}$  与 1 mL PBMC ( $6.5\times 10^6$  个细胞) 室温孵育 60 min, 用 Eppendorf 显微操作系统吸取与磁珠结合的单个 B 细胞, 加至含有裂解液 (0.5  $\mu\text{L}$  RNase Inhibitor, 1  $\mu\text{L}$  dNTP, 1.5  $\mu\text{L}$  RT 引物, 0.1  $\mu\text{L}$  TritonX-100, 6.9  $\mu\text{L}$  RNase Free  $\text{H}_2\text{O}$ ) 的 PCR 管中, 立即置冰上速冻, 于  $-80^\circ\text{C}$  保存。

**1.5 抗体可变区 (V 片段) 基因的扩增** 根据文献 [7] 设计反转录引物, 并将单个 B 细胞进行反转录。取上述冻存的含有裂解液和 B 细胞的 PCR 管,  $72^\circ\text{C}$  水浴 3 min, 再经  $65^\circ\text{C}$  水浴 5 min; 置冰上, 加入 4  $\mu\text{L}$   $5\times$  First-Strand Buffer, 1  $\mu\text{L}$  Reverse Transcriptase, 0.5  $\mu\text{L}$  RNase Inhibitor, 4.5  $\mu\text{L}$  RNase Free  $\text{H}_2\text{O}$ , 总体积为 20  $\mu\text{L}$ 。反转录条件为:  $42^\circ\text{C}$  90 min;  $50^\circ\text{C}$  2 min,  $42^\circ\text{C}$  2 min, 共 10 个循环;  $75^\circ\text{C}$  15 min。以获得的 cDNA 为模板, 利用 IgG H 链、 $\kappa$  链和  $\lambda$  链 ( $V_H$ 、 $V_\kappa$  和  $V_\lambda$ ) 外套引物进行第 1 轮 PCR 扩增, PCR 反应体系为: cDNA 5  $\mu\text{L}$ , 上下游引物各 1  $\mu\text{L}$ ,  $2\times$  Taq Plus Master Mix 25  $\mu\text{L}$ , 去离子水定容至 50  $\mu\text{L}$ 。第 2 轮 PCR 以第 1 轮 PCR 产物为模板, 参考文献 [7] 设计内套引物进行第 2 轮 PCR 扩增, PCR 反应体系为: 第 1 轮 PCR 产物 5  $\mu\text{L}$ , 上下游引物各 1  $\mu\text{L}$ ,  $2\times$  Taq Plus Master Mix 25  $\mu\text{L}$ , 去离子水定容至 50  $\mu\text{L}$ 。两轮 PCR 扩增条件均为:  $94^\circ\text{C}$  3 min;  $94^\circ\text{C}$  30 s,  $55^\circ\text{C}$  25 s,  $72^\circ\text{C}$  30 s, 共 30 个循环;  $72^\circ\text{C}$  7 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

**1.6 线性表达盒 C、H、K 和 L 片段的构建** 抗体线性表达盒由包含 CMV 启动子和 IgG leader 序列的 C 片

段、抗体可变区( $V_H$ 、 $V_K$ 或 $V_\lambda$ )片段及包含抗体恒定区基因和牛生长激素(bovine growth hormone, BGH)polyA 信号序列的  $H$ 、 $K$  或  $L$  片段 3 部分构成<sup>[7]</sup>。将 GenBank 中登录的 IgG leader 序列(E10790. 1)经 Hind III 和 EcoR I 酶切位点插入载体 pCDNA3. 1-myc-His, 与 CMV 启动子构成线性表达盒的 C 片段; 将抗体重链 H 链(BC041037)、轻链  $\kappa$  链(BC073791) 和  $\lambda$  链(BC073769)的恒定区序列经 Xho I 和 Age I 酶切位点分别插入载体 pCDNA3. 1-myc-His, 分别与载体的 BGH polyA 信号序列构成  $H$ 、 $K$  和  $L$  片段。

**1.7 抗体全长线性表达盒的构建** 以 1.6 项构建的重组质粒为模板, PCR 分别扩增  $C$ 、 $H$ 、 $K$  和  $L$  片段, 引物和方法均参照文献<sup>[7]</sup>, 用于重叠 PCR 法分别构建抗体 H 链、 $\kappa$  链和  $\lambda$  链全长线性表达盒。重叠 PCR 体系为: 可变区基因  $V_H$  与  $C$  片段和  $H$  片段各 50 ng (H 链) /  $V_K$  与  $C$  片段和  $K$  片段各 50 ng ( $\kappa$  链) /  $V_\lambda$  与  $C$  片段和  $L$  片段各 50 ng ( $\lambda$  链), 上下游引物(参考文献<sup>[7]</sup>设计)各 1  $\mu$ L, 2  $\times$  Taq Plus Master Mix 25  $\mu$ L, 去离子水定容至 50  $\mu$ L。PCR 扩增条件为: 94  $^\circ$ C 3 min; 94  $^\circ$ C 30 s, 55  $^\circ$ C 25 s, 72  $^\circ$ C 2 min, 共 30 个循环; 72  $^\circ$ C 7 min。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

**1.8 抗体表达** 将来源于同一 B 细胞的抗体重链和轻链线性表达盒共转染 HEK-293T 细胞, 37  $^\circ$ C 培养 48 h, 收集上清, 经 12% SDS-PAGE 分离蛋白后, 转移至 NC 膜, 用含 1% 牛血清白蛋白的 PBS 于室温封闭 1 h; 加入 HRP 标记的山羊抗人 IgG 多克隆抗体(1 : 5 000 稀释), 于室温孵育 1 h; PBST 洗涤 3 次, 加入 ECL 发光液, 室温放置 1 min, 采用天能全自动化学发光 / 荧光图像分析系统(Tanon-5500)生成图像。

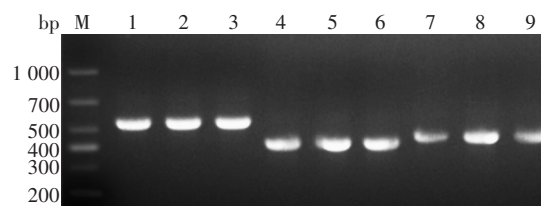
**1.9 抗体免疫反应活性的检测** 采用免疫荧光染色法。将 SARS-CoV-2 S 蛋白表达质粒 PMD2. G-S 转染 HEK-293T 细胞, 同时设对照组(未转染), 于 37  $^\circ$ C 孵育 48 h; 用 80% 冷丙酮固定细胞, PBST 洗涤 3 次, 加入 100  $\mu$ L 表达的抗体上清溶液, 室温孵育 1 h; PBST 洗涤 3 次, 加入 FITC 标记的山羊抗人 IgG(1 : 200 稀释), 室温孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次, 用荧光显微镜观察。

**1.10 抗体的纯化** 用 5 mL 平衡缓冲液平衡(20 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0. 15 mol / L NaCl, pH 7. 0)ProteinA 树脂, 将 30 mL 抗体表达上清液按约 1 mL / min 的流速上样, 用 30 mL 平衡缓冲液洗涤, 流速约 2 mL / min; 10 ~ 15 mL 洗脱缓冲液(0. 1 mol / L glycine, pH 3. 0)洗脱抗体, 流速维持约 1 mL / min, 收集含有目的抗体的洗脱液后, 立刻加入 1 / 10 洗脱液体积的中和缓冲液(1 mol / L Tris, pH 8. 5), 调节 pH 至 7. 4。纯化抗体进行 12% SDS-PAGE 分析。

**1.11 抗体中和活性的检测** 将 SARS-CoV-2 假病毒稀释至  $4 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub> / mL, 加至 96 孔板, 50  $\mu$ L / 孔; 加入纯化抗体(0 ~ 4 000 ng /  $\mu$ L), 50  $\mu$ L / 孔, 每个稀释度设 3 个复孔, 于 37  $^\circ$ C 孵育 1 h; 加入过表达 ACE2 的 A549 细胞( $2 \times 10^5$  个 / mL), 100  $\mu$ L / 孔, 37  $^\circ$ C 培养 48 h; 加入萤火虫荧光素酶检测试剂, 100  $\mu$ L / 孔, 室温孵育 10 min; 用酶标仪检测荧光强度, 并计算抗体半数抑制浓度(half-maximal inhibitory concentrations, IC<sub>50</sub>)。

## 2 结果

**2.1 抗体可变区基因扩增产物的鉴定** PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 可见 498 bp 的  $V_H$  片段、403 bp 的  $V_K$  片段和 422 bp 的  $V_\lambda$  片段基因条带, 大小与预期一致, 见图 1。表明获得抗体可变区  $V_H$ 、 $V_K$  和  $V_\lambda$  基因正确。

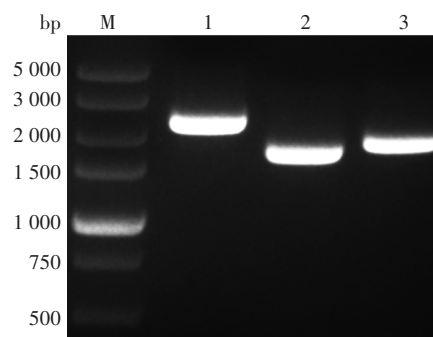


M: DNA marker DL1000; 1~3:  $V_H$  基因; 4~6:  $V_K$  基因; 7~9:  $V_\lambda$  基因。

图 1 抗体可变区  $V_H$ 、 $V_K$  和  $V_\lambda$  基因片段电泳图

**Fig. 1** Electrophoretic profile of variable region genes  $V_H$ ,  $V_K$  and  $V_\lambda$  fragments of antibody

**2.2 抗体全长线性表达盒的鉴定** 重叠 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 可见约 2 631 bp 的 H 链、1 911 bp 的  $\kappa$  链和 1 918 bp 的  $\lambda$  链, 大小与预期一致, 见图 2。表明抗体全长线性表达盒构建正确。



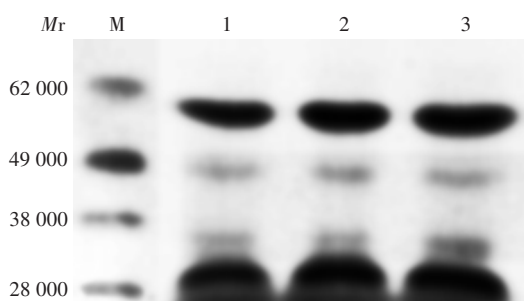
M: DNA marker DL5000; 1: H 链; 2:  $\kappa$  链; 3:  $\lambda$  链。

图 2 抗体全长线性表达盒的电泳图

**Fig. 2** Electrophoretic profile of full-length linear expression cassettes of antibody



**2.3 抗体表达产物的鉴定** 共表达了26株单克隆抗体,抗体的表达产物经Western blot检测,于相对分子质量约55 000和25 000处可见目的蛋白条带,与IgG抗体重链、轻链相对分子质量大小一致,见图3(以3株为例)。表明成功表达了IgG抗体。

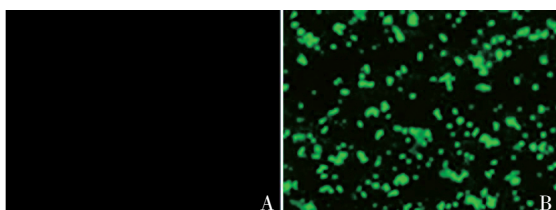


M:蛋白质 marker;1~3:3株抗体表达上清。

图3 Western blot法检测IgG抗体的表达

Fig. 3 Western blotting of expression of IgG antibodies

**2.4 抗体的免疫反应活性** 荧光显微镜下观察可见,表达S蛋白的转染组细胞呈绿色荧光,未表达S蛋白的对照组细胞未见绿色荧光,见图4。表明表达抗体具有S蛋白特异性抗体免疫反应活性。

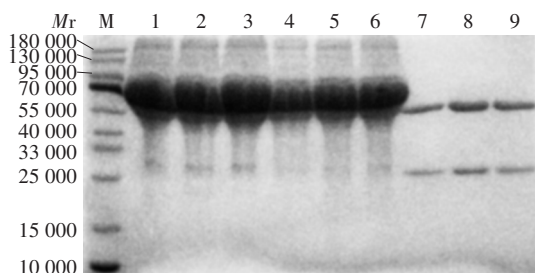


A:对照组;B:转染组。

图4 免疫荧光法检测单克隆抗体的免疫反应活性(×200)

Fig. 4 Detection of monoclonal antibody immunoreactivity by immunofluorescence(×200)

**2.5 纯化抗体的鉴定** 纯化抗体经12% SDS-PAGE分析,可见相对分子质量约55 000和25 000的重链和轻链蛋白条带,且均为单一条带,未纯化抗体未见这两条蛋白条带,见图5。表明纯化效果较好。



M:蛋白质 marker;1~3:未纯化的抗体表达上清液;4~6:抗体表达上清液上样流出液;7~9:纯化抗体。

图5 纯化抗体的SDS-PAGE分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of purified antibodies

**2.6 抗体的中和活性** 26株单克隆抗体中,有20株具有中和活性,IC<sub>50</sub>在0.040~0.545 μg/mL之间,见表1。

表1 单克隆抗体的中和活性

Tab. 1 Neutralizing activity of monoclonal antibodies

单克隆抗体	IC <sub>50</sub> (μg/mL)	单克隆抗体	IC <sub>50</sub> (μg/mL)
A02	0.076	E06	0.545
A14	0.261	E07	0.474
B06	0.094	E14	0.444
B07	0.166	E17	0.253
C08	0.297	E19	0.072
C17	0.142	E22	0.148
C21	0.129	F08	0.336
C30	0.040	G05	0.080
D11	0.367	G20	0.198
E01	0.321	G22	0.120

### 3 讨论

制备单克隆抗体的常用方法包括鼠杂交瘤单克隆技术、噬菌体展示库技术和单个B细胞抗体技术等<sup>[8-10]</sup>。源于杂交瘤技术制备的单克隆抗体用于人或异种动物时存在鼠源单克隆抗体的免疫原性问题。另外,随着时间的延长,杂交瘤细胞系会出现基因丢失、突变、遗传漂移,导致抗体产生微小变化。为了克服免疫原性问题,可将鼠单克隆抗体的可变区与人抗体的恒定区进行重组,构建人鼠嵌合抗体<sup>[11]</sup>。噬菌体展示库技术在建立抗体重链和轻链可变区随机文库的基础上,通过特定抗原筛选获得单克隆抗体。这种单克隆抗体的轻链和重链可变区随机组合,不是来源于同一B细胞的天然配对。利用单个B细胞RT-PCR技术扩增抗体基因,再克隆至表达载体,表达重组抗体,重链和轻链是天然配对,具有良好的稳定性及批间质量均一的优点。

本研究采用偶联SARS-CoV-2 S蛋白S1区域的磁珠分选S蛋白特异性的抗体阳性B细胞,与流式细胞分选比较,这种方法的成本及对设备、环境要求均较低,且方便观察B细胞完整性,但分选效率及分选准确率较低。LIAO等<sup>[7]</sup>将CMV启动子和IgG leader序列、抗体重链、轻链恒定区分别与T载体连接,构建C、H、K和L片段。本研究将IgG leader序列和抗体重链、轻链恒定区分别插入载体pCDNA3.1-myc-His,与CMV启动子、BGH polyA序列构成C、H、K和L片段,无需合成CMV启动子和BGH polyA信号序列。本研究利用重叠PCR将扩增的抗体可变区基因与C及H、

K 或 L 片段连接, 构建抗体的线性表达盒, 转染细胞表达抗体, 该方法无需构建表达质粒, 提高了克隆与筛选的效率。

抗体是治疗和预防新出现或已知病毒感染的有效方法<sup>[12]</sup>。有研究利用 COVID-19 康复患者血浆进行治疗, 可显著减少患者住院时间和病情恶化, 临床效果较好<sup>[13]</sup>。有报道表明, 获美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准用于临床的 SARS-CoV-2 中和单抗 Casirivimab / imdevimab 治疗非住院患者, 可减少住院或死亡风险 70%, 治疗严重住院病例可减少 20% 的死亡率<sup>[14]</sup>, 另一获 FDA 批准的中和单抗 Bamlanivimab 具有类似的临床效果<sup>[15]</sup>。2021 年 12 月 8 日, SARS-CoV-2 中和抗体联合治疗药物安巴韦 / 罗米司韦 (BRII-196 / BRII-198) 获国家药品监督管理局应急批准使用, 该药物可降低住院及死亡风险 78%<sup>[16]</sup>。本研究获得的 26 株 SARS-CoV-2 S 蛋白单克隆抗体中, 有 20 株具有良好的假病毒中和活性, IC<sub>50</sub> 最小为 0.040 μg / mL, 具有用于临床诊断和临床治疗的潜力。单克隆抗体作用机理包括病毒中和作用和诱导细胞免疫。抗体的中和活性可阻断病毒的感染, 抗体与病毒表面蛋白结合后, 抗体 Fab 片段阻断病毒蛋白与细胞受体结合, 阻碍病毒与宿主细胞膜融合所必需的蛋白裂解或构象改变, 从而阻止病毒进入细胞<sup>[17]</sup>。另外, 抗体 Fc 片段与免疫细胞的 Fc 受体结合, 激活细胞免疫功能, 包括单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞对病毒粒子和感染细胞的吞噬作用及 NK 细胞对感染细胞的直接杀伤作用<sup>[18]</sup>。

本研究采用磁珠法筛选特异 B 细胞, 经单细胞 RT-PCR 法制备了 SARS-CoV S 蛋白单克隆抗体, 其对假病毒 IC<sub>50</sub> 为 0.040 ~ 0.545 μg / mL, 可用于临床治疗药物及抗原检测试剂的研发。单克隆抗体具有特异性、高效力和代谢稳定性等天然优势, 因此抗体类药物是目前医药市场增长最快的药物类别<sup>[19]</sup>, 在感染性疾病、肿瘤治疗、免疫性疾病等领域具有广阔的应用前景。另外, 病毒的快速变异也对单克隆抗体的临床治疗效果提出了严峻挑战<sup>[20-21]</sup>。

#### 参考文献

- [1] World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard [EB/OL]. [2022-05-25] (2002-05-26) <https://covid19.who.int/>.
- [2] SHANG J, WAN Y, LUO C, *et al.* Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117 (21): 11727-11734.
- [3] SU H X, XU Y C, JIANG H L. Drug discovery and development targeting the life cycle of SARS-CoV-2 [J]. *Fundamental Res*, 2021, 1 (2): 151-165.
- [4] JIANG W, WANG J, JIAO S, *et al.* Characterization of MW06, a human monoclonal antibody with cross-neutralization activity against both SARS-CoV-2 and SARS-CoV [J]. *MABs*, 2021, 13 (1): 1953683.
- [5] ZHU F C, GUAN X H, LI Y H, *et al.* Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial [J]. *Lancet*, 2020, 396 (10249): 479-488.
- [6] MOMTAZI-BOROJENI A A, BANACH M, REINER Ž, *et al.* Interaction between Coronavirus S-protein and human ACE2: Hints for exploring efficient therapeutic targets to treat COVID-19 [J]. *Angiology*, 2021, 72 (2): 122-130.
- [7] LIAO H X, LEVESQUE M C, NAGEL A, *et al.* High-throughput isolation of immunoglobulin genes from single human B cells and expression as monoclonal antibodies [J]. *J Virol Methods*, 2009, 158 (1-2): 171-179.
- [8] CHAPMAN A P, TANG X, LEE J R, *et al.* Rapid development of neutralizing and diagnostic SARS-CoV-2 mouse monoclonal antibodies [J]. *Sci Rep*, 2021, 11 (1): 9682.
- [9] PAN Y, DU J, LIU J, *et al.* Screening of potent neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 using convalescent patients-derived phage-display libraries [J]. *Cell Discov*, 2021, 7 (1): 57.
- [10] JU B, ZHANG Q, GE J, *et al.* Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection [J]. *Nature*, 2020, 584 (7819): 115-119.
- [11] GUO Y, KAWAGUCHI A, TAKESHITA M, *et al.* Potent mouse monoclonal antibodies that block SARS-CoV-2 infection [J]. *J Biol Chem*, 2021, 296: 100346.
- [12] SALAZAR G, ZHANG N, FU T M, *et al.* Antibody therapies for the prevention and treatment of viral infections [J]. *NPJ Vaccin*, 2017, 2: 19.
- [13] ABOLGHASEMI H, ESHGHIP, CHERAHALI A M, *et al.* Clinical efficacy of convalescent plasma for treatment of COVID-19 infections: Results of a multicenter clinical study [J]. *Transfus Apher Sci*, 2020, 59 (5): 102875.
- [14] DEEKS E D. Casirivimab / Imdevimab: First Approval [J]. *Drugs*, 2021, 81 (17): 2047-2055.
- [15] GANESH R, PHILPOT L M, BIERLE D M, *et al.* Real-world clinical outcomes of Bamlanivimab and Casirivimab-Imdevimab among high-risk patients with mild to moderate Coronavirus Disease 2019 [J]. *J Infect Dis*, 2021, 224 (8): 1278-1286.
- [16] EVERING T H, GIGANTI M, CHEW K W, *et al.* LB2. Safety and efficacy of combination SARS-CoV-2 monoclonal neutralizing antibodies (mAb) BRII-196 and BRII-198 in non-hospitalized COVID-19 patients [J]. *Open Forum Infect Dis*, 2021, 8 (1): 807-808.
- [17] SAPHIRE E O, SCHENDEL S L, GUNN B M, *et al.* Antibody-mediated protection against Ebola virus [J]. *Nat Immunol*, 2018, 19 (11): 1169-1178.
- [18] GUNN B M, YU W H, KARIM M M, *et al.* A role for Fc function in therapeutic monoclonal antibody-mediated protection against Ebola virus [J]. *Cell Host Microbe*, 2018, 24 (2): 221-233.
- [19] GOULET D R, ATKINS W M. Considerations for the design of antibody-based therapeutics [J]. *J Pharm Sci*, 2020, 109 (1): 74-103.
- [20] SU J, LU H. Opportunities and challenges to the use of neutralizing monoclonal antibody therapies for COVID-19 [J]. *Biosci Trends*, 2021, 15 (4): 205-210.
- [21] WANG R, ZHANG Q, ZHANG R, *et al.* SARS-CoV-2 omicron variants reduce antibody neutralization and acquire usage of mouse ACE2 [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 854952.