

本科毕业论文



论文题目:基于 2-36 的广谱抗冠状病毒中和抗体优化和功能验 证

- 姓 名: 陈彦嘉 学 号: 18307110107
- 院 系: 生命科学学院
- 专 业: 生物科学
- 指导教师: 王鹏飞 职 称: 青年研究员
- 单 位: 复旦大学生命科学学院
- 完成日期: 2022年05月27日

论文撰写人承诺书

本毕业论文是本人在导师指导下独立完成的,内容真实、 可靠。本人在撰写毕业论文过程中不存在请人代写、抄袭或者 剽窃他人作品、伪造或者篡改数据以及其他学位论文作假行 为。

本人清楚知道学位论文作假行为将会导致行为人受到不 授予/撤销学位、开除学籍等处理(处分)决定。本人如果被 查证在撰写本毕业论文过程中存在学位论文作假行为,愿意 接受学校依法作出的处理(处分)决定。

承诺人签名:

日期: 2022年05月27日

指导教师对论文	指导教师对 论文学术规范的 审查 意见:						
■ 本人经过尽职電	■ 本人经过尽职审查,未发现毕业论文有学术不端行为。						
□ 本人经过尽职官	F查,发现毕业论文有如下	学术不端行为:					
指导教师签名: F期: 2022 年 5 月 21 日							
指导教师评语:		答辩委员会(小	组)评语:				
陈彦嘉同学在本科毕 掌握了分子克隆、细胞 假病毒制备以及中和 完成了我们的论文设 定向优化了一种广谱 36,并利用多种冠状病 优化抗体和研究中和 初积极主动,勤于思 题组期间参与了两篇 邀为英文杂志审稿。 文完成过程中表现优 本科毕业论文。	业论文的完成过程中 包培养、蛋白表达纯化、 实验等技能。他出色地 计,按照预定的计划, 冠状病毒中和抗体 2- 病毒的假病毒完成了对 毒的假病毒完成了对 累发现,某些突变确能 和活性,为后续进一步 机制提供了基础。他学 考,善于总结,在我课 SCI论文的发表,并受 总体说来,陈彦嘉在论 异,收获了一篇优秀的	陈彦嘉同学在毕业设 抗体用定点突变方法 验结果表明响,可定 影响,正规, 比较了的 不同病未之间中 。 流达流畅; 答辩环环 经全体答辩, 建议授予 签名 :	计期间完成了对一种 优化评测的实验,实 变对于抗体中和能力 把实验结果以热力图 化抗体与原抗体对相 和能力的差异。 整,撰写清晰,是一 答辩可思路清晰、是一 答理有据、回答全面。 贡露同学学士学位。				
2022年5月21日		2022 年 6 月 6 日					
学分	4	成绩 92 (P)					
备注:							

教务处制

基于 2-36 的广谱抗冠状病毒中和抗 体优化和功能验证

完成人

陈彦嘉

指导小组成员

王鹏飞 青年研究员

目	录	
目	录	

摘要	Ē		۰·I
Abs	tract		11
<i>-</i> ,	前言	ā ·····	1
	1.1	研究背景	1
	1.2	立题依据、研究内容及研究意义	6
<u> </u>	材料	4与方法	8
	2.1	实验材料	8
	2.2	实验试剂	8
	2.3	实验仪器	9
	2.4	实验软件	9
	2.5	实验方法1	.0
三、	研究	飞结果1	.8
	3.1	载体构建及测序验证1	.8
	3.2	扩增载体,提取质粒1	.9
	3.3	表达抗体,并纯化1	.9
	3.4	制备假病毒	20
	3.5	中和实验荧光读值数据	:0
	3.6	抗体中和曲线、IC50计算2	21

	3.7	改造的 5 种抗体与原 2-36 对病毒中和能力的比较	1
	3.8	不同细胞表达 2-36 抗体中和能力的差异	5
四、	讨i	全27	7
	4.1	本实验的科学意义	7
	4.2	实验的局限性	3
	4.3	研究展望28	3
参考	令文南	伏)
毕业	化论	文期间科研成果	1
致谢	寸	35	5

摘要

2019年底,由新型冠状病毒(SARS-CoV-2)引发的疫情在中国武汉市爆发, 并迅速蔓延全球,造成数以百万计的死亡病例,对人类的生命健康和经济发展造 成了极大威胁。中和抗体可同时用于预防和治疗,是应对这种传染病(COVID-19)的有效武器。我们课题组之前发现了一个广谱中和抗体 2-36,可以中和 SARS-CoV-2 原始和突变毒株,以及包括非典病毒(SARS-CoV)在内的属于 Sarbecovirus 的冠状病毒,但其中和能力仍有提高空间。本研究根据结构预测和定点突变的方 法对 2-36 抗体进行优化,得到 5 种 2-36 抗体突变体,并比较了它们与野生型 2-36 对多种冠状病毒假病毒的中和能力。研究发现,重链 S32R 的突变对 2-36 中 和 SARS-CoV 的能力提高了近 20 倍,而轻链 A56K 的突变会显著降低 2-36 对所 测病毒的中和能力。有意思的是,S32R 等突变对一些病毒会提高抗体的中和能 力,但对另一些病毒则起到相反作用,提示我们后续从结构上进一步研究这些突 变与不同病毒的结合能力。此外本研究还初步证明了两种哺乳动物细胞表达的抗 体在中和能力上的一致性。总的来说,我们证实了结构预测定向优化抗体方法的 可行性,后续将会继续优化 2-36 抗体,以期发现更加广谱、高效的中和抗体作 为预防或治疗新冠的候选药物。

关键词:新冠病毒、冠状病毒、中和抗体、抗体优化

Abstract

At the end of 2019, a pandemic caused by a novel coronavirus (SARS-CoV-2) broke out in Wuhan, China and had spread rapidly around the world, damaging the economic and posing great menace to the public health with millions of death cases. Neutralizing antibodies, which could be used as both prophylaxis and therapeutics, are considered as an effective weapon against the current COVID-19 pandemic. We previously isolated a human antibody, 2-36, which showed broadly neutralizing activities against SARS-CoV-2 and its variants, as well as other Sarbecoviruses, including SARS-CoV. However, its neutralizing potency needs to be improved. Here in this study, we introduced mutations into 2-36 by site-directed mutagenesis based on our previous structural guided prediction, and tested the neutralizing potency against different coronaviruses of the engineered 2-36 mutants, in comparison with that of the parental antibody 2-36. We found that mutation S32R in 2-36 heavy chain increased its neutralizing potency against SARS-CoV nearly 20-fold, while mutation A56K in 2-36 light chain significantly dampened its neutralizing potency against all the tested viruses. Intriguingly, while S32R and some other mutations improved the neutralizing efficacy against some viruses, they showed an opposite effect on others. We will try to find out the structural explanation for these discrepancies in our further investigations. In addition, this study our preliminary results also proved the similarity in neutralizing potency of antibodies produced in two different mammalian cell lines. To sum up, we have proved the feasibility of improving antibodies by structural guided direct evolution, which we will continue to use to further optimize 2-36 as well as other antibodies, hoping to obtain neutralizing antibodies with enhanced potency and breadth for the prevention and treatment of COVID-19.

Key words: SARS-CoV-2, coronavirus, neutralizing antibodies, antibody engineering

一、前言

本实验主要是测试 5 种由 2-36 (原抗体)通过定点突变的方法,优化抗体序 列,通过假病毒中和实验,比较这些改造后的抗体对 SARS-CoV-2 及其他 Sarbecovirus 属中冠状病毒和中和能力,我们期待发现能在保留原 2-36 中和广谱 性基础上,对一些病毒中和效率更高的新抗体。

前言部分的研究背景将重点对与本实验相关的 SARS-CoV-2 和冠状病毒 (coronavirus)及 2-36 中和抗体进行详述;并在最后结合国内外研究现状,阐释 立题依据、介绍本实验的主要研究内容及研究意义。

1.1 研究背景

1.1.1 新冠病毒及疫情的命名

2019年底开始,一种新型冠状病毒席卷全球,这是继 2003年大规模爆发的 严重急性呼吸道综合征冠状病毒(SARS-CoV)和 2012年中东呼吸道综合征冠 状病毒(MERS-CoV)后第三个在全球大规模流行的冠状病毒^[1,2]。这种新型病毒 在 2019年被最早发现,因此世界卫生组织(WHO)也把因这种病毒引起的疫情 称为 COVID-19(Coronavirus Disease 2019)。此外,根据对病毒基因组的分析,这 种新型病毒与 2003年的 SARS-CoV 高度同源,因此也被国际病毒分类委员会 (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)命名为严重急性呼吸道 综合征冠状病毒 2,简写为 SARS-CoV-2(severe acute respiratory syndrome coronavirus-2);与 SARS-CoV 和 MERS-CoV 相比,SARS-CoV-2 的致死率远低 于前两者,但由于其传播能力更强,传播速度更快,因此也给全世界人民带来严 重的灾难^[3-7]。

1.1.2 冠状病毒进化分枝

人类冠状病毒(Human coronavirus, HCoV)是指可以感染人类的冠状病毒, HCoV 被归类为亚科冠状病毒科冠状病毒科(subfamily Coronavirinae of family Coronaviridae),其在基因型和血清学上被 ICTV 划分为四个主要属: AlphaCoV、 BetaCoV、GammaCoV 和 DeltaCoV^[5,8]。根据相应的分类依据,历史上出现过的

1

HCoV-229E 和 HCoV-NL63 被归类为 AlphaCoV,而 HCoV-HKU1、HCoV-OC43、 SARS-CoV 和 MERS-CoV 被归类为 BetaCoV,两组主要感染哺乳动物;而 GammaCoV 和 DeltaCoV 是鸟类特有的。而最新出现的 SARS-CoV-2 也隶属于 BetaCoV 中的 Sarbecovirus,与 SARS-CoV 一致;而 MERS-CoV 稍有不同,其属 于 BetaCoV 中的 Merbecovirus; HCoV-HKU1、HCoV-OC43 这两种属于 BetaCoV 中的 Embecovirus^[8-11]。此外科学家们通过对 SARS-CoV-2 的核酸序列分析,确 定了与一种蝙蝠来源的 SARS 样冠状病毒(BatCoV RaTG13)的全基因组序列有 超 96%的一致性;而与 SARS-CoV 的全基因组似性约为 79%^[12](图 1)。



图 1 冠状病毒及 7 种 HCoV 的部分进化概览

1.1.3 SARS-CoV-2 的基因组特征

由于进化距离接近,SARS-CoV、MERS-CoV和SARS-CoV-2这三种HCoV的基因序列组成上也极具相似性。SARS-CoV基因组全长约29.7kb、MERS-CoV为30.1kb,SARS-CoV-2为29.8kb。三者基因序列从5'到3'端都有以下几个重要组成,ORF1a、ORF1b、S、E、M、N六大主要结构基因区及若干辅助基因^[8,13,14]。 SARS-CoV-2基因组编码16种非结构蛋白、4种结构蛋白和6种辅助蛋白,其中ORF1a、ORF1b占病毒全基因组长度约为2/3,二者有部分重叠,负责编码病毒完成其生命周期的重要蛋白,需要注意的是ORF1a和ORF1b直接的翻译产物是一类多蛋白,这类多蛋白在一些蛋白酶的帮助下会发生相应的水解活性,帮助其 生成对应的非结构蛋白 nsps(non-structural proteins)及 RNA 复制的核心酶依赖 RNA 的 RNA 聚合酶(RdRp)等^[6,14](图 2a, 2b)。



图 2 SARS-CoV-2 病毒结构、基因及结构蛋白主要结构

Fig 2a 为 SARS-CoV-2 病毒结构示意图; Fig 2b 为 SARS-CoV-2 基因主要组成结构 示意图; Fig 2c 为 SARS-CoV-2 S 蛋白结构细分示意图, S1 中包含 NTD 与 RBD 两个主要结构区

1.1.4 SARS-CoV-2 的结构蛋白

SARS-CoV-2 基因组中 S、E、M、N 基因分别编码该病毒的四种结构蛋白 Spike (S), Membrane (M), Envelope (E), Nucleocapsid (N) proteins,其中 S、M、E 三种蛋白位于病毒膜上,而 N 蛋白则包裹病毒的 RNA 在病毒颗粒内部^[6,14](图 2a)。S 蛋白是高度糖基化的三聚体蛋白,每个单体有 22 个糖基化位点^[15],并含 有受体结合结构域(RBD),相比于 N 蛋白,S 蛋白发生突变的概率很高,自疫 情爆发至今,被 WHO 列为需要关注的变异株(variant of concern, VOC)的 5 种 变体 S 蛋白的氨基酸序列均有插入、替换等突变发生;M 蛋白顾名思义会和其 它膜成分相互作用,对于病毒的组装起到至关重要的作用,并且其也决定了病毒 包膜的形状^[16];E 蛋白是几种蛋白中结构最小的,通常认为其在病毒组装、释放 及发病机制中起重要作用,形成"病毒孔蛋白"的离子通道的结构^[11,17];N 蛋白具 有较高的免疫原性,除了负责参与病毒 RNA 的包装外,还在调节病毒生命周期 过程中起作用,并且可以抑制宿主细胞对病毒的免疫反应,相当于 RNAi 的抑制 剂^[18,19]。此外也有研究表明这几种蛋白除了在组装病毒过程中发挥作用外,也会相互调节其在宿主细胞内的加工转运过程,如E、M蛋白对于S蛋白前体在细胞内的定位起作用^[20]。

1.1.5 SARS-CoV-2 感染宿主细胞

SARS-CoV-2 与进化距离接近的 SARS-CoV 和 MERS-CoV 有着相似的病毒 结构和进入细胞方式。它们都含有磷酸化的 N 蛋白,以基因组 RNA 为核心,由 磷脂双层包裹,形成大小为 80-120 nm 的球形或多形颗粒^[6,8]。HCoV 的 S 蛋白是 其主要识别宿主细胞并与之相互作用的关键,S 蛋白又可以细分为 S1 和 S2 两个 亚单位。S1 主要负责和细胞表面对应受体相结合,S1 上含有受体结合域(receptor binding domain, RBD),负责识别宿主细胞表面对应的受体。现己证实血管紧张素 转化酶 2 (Angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)是 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 的最主要受体,也广泛表达与人体的多种细胞中^[6,21-23]。而 dipeptidyl peptidase-4 (DPP4)则是 MERS-CoV 的识别的细胞表面相应受体^[23,24]。S2 则主要负责后续病 毒与细胞膜相融合,帮助其进入宿主细胞。S1 与 S2 连接处含有特定切割位点, 即弗林酶切位点(furin cleavage site, FCS)^[25],在病毒与宿主细胞接触时,会发生 前后两次对 S 蛋白的切割,第一次是 S 蛋白在 FCS 处被弗林蛋白酶切成 S1 和 S2 两个部分,之后 S2 会被宿主细胞膜表面的跨膜丝氨酸蛋白酶 2 (TMPRSS2)在 S2'位点处进一步切割成一大一小两个部分,分子量大的那部分会促进细胞膜与 病毒包膜的融合过程^[26](图 2c)。

1.1.6 中和抗体 2-36

2-36 是一个从 COVID-19 康复者体内分离出的单克隆抗体(mAb), 靶向结 合 SARS-CoV-2 S 蛋白的 RBD 区域^[27,28]。按照 Barnes 等人对 RBD 的划分, 2-36 结合的表位属于 Class 4, 也即被 CR3022 识别并结合在 RBD 中定义的较为隐蔽 的位点^[29,30]。这一区域相比 RBD 与 ACE2 相互作用的 RBM (receptor binding motif)即 Class 1 和 Class 2 区域氨基酸序列更保守^[31],在新的突变毒株中该区域 携带可以逃逸原抗体中和的突变概率很低,因此 Class 4 中的抗体更有可能具有 广谱中和 SARS-CoV-2 及其变种(variants)的能力。

4

与 CR3022 类似, 2-36 也仅识别并结合"up"构象的 RBD,通过冷冻电镜, 其 CDR H3 通过与包含残基 369-385 的 RBD 上的环相互作用形成大部分相互作 用,而 CDR H1 与 CDR L2 也与 RBD 有少量相互作用^[28,30]。由于 CDR H3 含有 大量疏水氨基酸,相互作用主要也是疏水的相互作用。由于 Class 4 的表位在 SARS-CoV 与 SARS-CoV-2 有着约 86%的序列保守性^[30], 2-36 因而可以交叉中 和 SARS-CoV-2 (LV: IC₅₀~0.1µg/ml)和 SARS-CoV (LV: IC₅₀~7.5µg/ml);此 外, 2-36 还可以广泛中和可以用 ACE2 作为受体的 Sarbecovirus,并且对多种 Sarbecovirus (真病毒和假病毒) IC₅₀<0.1µg/ml^[28];对于近期出现的 Omicron 毒 株,其 RBD 虽然含有 15 个氨基酸位点突变^[32],众多 RBD 抗体丧失对 Omicron 的中和能力,但 2-36 依然可以检测出中和效果(假病毒 IC₅₀~1µg/ml),并且对 Omicron 的一些 sub-lineages 也保留中和活性^[33,34]。通过抗体病毒共培养筛选耐 药株的方法,我们发现仅当 SARS-CoV-2 存在 K378T 突变时,其才能逃逸 2-36 的中和^[28],但目前尚未发现存在 K378T 的突变株,这些都表明 2-36 作为针对 SARS-CoV-2 的广谱中和抗体可以在适当优化后单独、或与其他不同靶位抗体联 用,发挥协同作用,成为治疗或预防新冠的特效药^[28]。

C	2-36	COVA1-16	S309	CR3022	
229E	>20	>20	>20	>20	IC ₅₀ (µg/mL)
MERS-CoV	>20	>20	>20	>20	< 0.01
SARS-CoV-2	0.029	0.178	0.007	>20	0.01-0.1
GDPangolin	0.025	0.040	0.024	>20	1-20 >20
GXPangolin	0.073	0.053	>20	>20	
RaTG13	0.003	0.007	>20	3.553	
SARS-CoV	0.224	15.116	0.020	1.494	
WIV1	0.020	1.888	0.047	0.668	
SHC014	0.025	1.062	>20	>20	
LYRa11	0.016	1.275	0.011	>20	
Rs7327	0.658	>20	>20	>20	
Rs4231	0.002	1.179	0.141	>20	
Rs4084	1.041	1.183	>20	>20	

图 3 2-36 对冠状病毒广谱的中和能力

图片引自 Wang et al. A monoclonal antibody...^[28]; 左侧红色标注的冠状病毒为 Sarbecovirus 中与 SARS-CoV-2 进化距离更接近的一个分枝; 蓝色标注的冠状病毒

为 Sarbecovirus 中与 SARS-CoV 进化距离更接近的一个分枝。MERS、229E 不属于 Sarbecovirus。四列为 2-36 与其他 3 中 mAb 对这些病毒中和能力的比较

1.2 立题依据、研究内容及研究意义

1.2.1 立题依据

本实验以抗体优化、病毒中和实验为主,目的是通过比较原 2-36 抗体与改造后的几种抗体对一些假病毒的中和效率,判断抗体序列中一些关键位点的突变 会不会对抗体中和特定病毒的能力产生影响,包括判断 2-36 这个抗体对一些 Sarbecovirus 是否有提高中和效率的空间,期待发现中和效率更高的抗体。

自从新冠疫情爆发以来,众多科学家研究团队在对特定抗体中和能力研究时, 都用到过病毒中和实验^[35-39]。从原理上讲,假病毒(pseudovirus)作为一种新的 技术手段,可以有效展示真实病毒的特定抗原表位,并且模拟真病毒感染宿主细 胞的过程,由于其本身并不能在宿主细胞内产生子代病毒,因而失去了传染性, 对研究者来讲也是一个有效代替真病毒,降低危害,减小实验风险的好办法。此 外,假病毒实验允许在 BSL2 级实验室进行,但真病毒 SARS-CoV-2 则需要在 BSL3 级实验室进行^[40]。大量的已发表文章表明,假病毒中和实验数据与真病毒 中和实验数据(IC₅₀)呈现出极强的对应关系,进一步证明了抗体-假病毒中和实 验得出结果的可靠性^[28,35-39]。因此假病毒也常作为评价抗体及疫苗保护作用的手 段^[40]。

此外,抗体中和特定的抗原也是二者先结合,再中和的过程^[41]。抗原与抗体的结合主要是特定位点之间氨基酸残基的相互作用,如氢键、盐桥、疏水相互作用等。SARS-CoV-2的一些突变株中,由于其在与抗体相互作用的表位内带有新的突变位点,可能会导致免疫逃逸即对抗体中和产生抗性。已经证实一些突变位点如 E484K、N501Y 会导致抗体对新的突变株中和能力完全丧失或者相比于SARS-CoV-2 大幅下降^[42]。同样,也有研究团队通过对抗体序列建库优化,得到的新抗体可以更有效率中和特定的病原体,都强调了抗原、抗体上一些重要的氨基酸一旦突变会影响抗体中和抗原的能力^[43-46]。

本实验基于本课题组先前已经解析的 2-36 与 S 蛋白的复合体结构,预测 2-36 与抗原互作的关键位点,并在这些位点上引入点突变,将含有突变的抗体在 体外制备纯化后,通过对比新抗体与原抗体对病毒的中和能力,验证这些预测的

6

关键位点是否是真正的影响抗体结合和中和能力的关键位点,并初步判断 2-36 是否具有优化的空间。

1.2.2 研究内容

通过之前冷冻电镜解析的 2-36Fab 片段与 SARS-CoV-2 S trimer 结合图^[28], 我们预测了 2-36 抗体序列中 5 个关键位点,并预测这 5 个位点对应的突变可能 影响 2-36 与病毒的中和能力。这 5 个位点及对应突变分别是重链上的 S32R、 V101L 和轻链上的 L47F、A56F、A56K。通过在 2-36 表达载体(质粒)引入相 应的核酸突变,进而使其在哺乳动物细胞中表达出含有对应突变的 5 种新抗体, 同时制备所需要的假病毒,最后通过抗体-假病毒中和实验,对比新抗体与原 2-36 的中和数据,得出结论。

1.2.3 研究意义

自 2019 年爆发至今,新冠病毒由于其强大的感染能力,已迅速蔓延全球; 并且由于 RNA 病毒易于突变的天然属性,产生了大量的突变株,几乎每种被 WHO 列为 VOC 的突变株均在全球主导了新一波的疫情。病毒的变异仍在继续, 今年 3 月, BA.2 毒株 (Omicron sub-lineage 的一个变异株)在吉林、上海先后传 播,打破了人们正常的生活秩序。

单克隆抗体是预防或治疗 COVID-19 有效的方法,WHO 也将单克隆抗体疗法作为对轻症患者的推荐用药;而我们实验室发现的 2-36 这个抗体因其广谱性也具有作为候选单抗类药物的潜力。

我们实验室有着在抗体制备、工程化、性能评价等相关方面的长期经验;如 果顺利,我们改进后的新抗体中和效果、生物化学稳定性等都要比原先 2-36 优 秀,而且具有大规模生产等可以促进研究成果转化的条件,那么我们也可以与相 关的政府部门、生产企业合作,促进我们的研究成果转化,为全球抗击新冠疫情 贡献出属于我们擅长领域的一点微薄之力。

7

二、材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 细胞

本实验共需要 3 种细胞: Vero-E6(ATCC, #CRL-1586)、293T(ATCC, #CRL-3216)、Expi293F(ThermoFisher, #A14527)

2.1.2 菌株

本实验用到两种型号化学感受态 *E.coli*: Efficom 5 a (北京金沙生物科技有限公司, #SCC01)、Trans5 a (北京全式金生物技术股份有限公司, #CD201)

不用型号感受态 E.coli 在本实验中的使用不会对实验结果产生影响

2.1.3 载体

本实验目的基因片段构建于 pcDNA3.4 与 pCMV3 两种载体上

2.1.4 其他

本实验还需要 VSV-G pseudo-typed ΔG-luciferase (G*ΔG-luciferase, Kerafast) 用于包装假病毒(pseudovirus)、杂交瘤抗体 20% I1 hybridoma (ATCC, #CRL-2700)

2.2 实验试剂

2.2.1 LB 培养基(培养 E.coli)

	表1 LB培养基	
成分	LB液体培养基(1L)	LB 固体培养基(1L)
Tryptone	10 g	10 g
Yeast Extract	5 g	5 g
NaCl	10 g	10 g
Agar	—	10 g
ddH ₂ O 定容至	1L	1L
瓶口扎紧,	放入灭菌锅, 121℃, 高压蒸	汽灭菌 20 min

之后液体培养基灭菌后,待冷却直接使用或放入4度冷柜暂存待用;固体培养基灭菌后于超净台中倒平板,待其凝固后直接使用或放入4度冷柜暂存待用。 2.2.2 细胞培养试剂

OPM-293 CD05 培养基(上海奥浦迈生物科技有限公司,#81075-001)、

SMM293-TII 无血清培养基(北京义翘神州生物技术有限公司,#M293TII)、PBS (WISENT Inc., #311010091)、FBS(ThermoFisher, #10100147)、DMEM 培养 基(ThermoFisher, #11965092)、Trypsin-EDTA(ThermoFisher, #25200056)、 Pen-Strep(ThermoFisher, #15070063)

2.2.3 细胞实验试剂

PEI (Polysciences Inc, #02371-500)、opti-MEM 培养基(ThermoFisher, # 31985070)、杂交瘤抗体 I1 hybridoma supernatant (ATCC, #CRL-2700)

2.2.4 分子实验试剂(盒)

Vazyme PCR 试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,#P525-01/02/03)、 BBI SpeedyCut DpnI 快切酶(BBI LIFE SCIENCES CORPORATION, #B600735)、 Omega 质粒提取试剂盒 E.Z.N.A.® Endo-Free Plasmid DNA Midi Kit (Omega Biotek,Inc, #D6915-03)

2.2.5 抗体纯化试剂(盒)

Pierce[™] Protein A IgG Binding Buffer (ThermoFisher, #21007), Pierce[™] IgG Elution Buffer (ThermoFisher, #21009), Trizma® hydrochloride solution (Sigma-Aldrich, #T3038), rProtein A Sepharose Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences, # 17-1279-02)

2.2.6 荧光读数试剂(盒)

Renilla-Lumi[™] Plus 海肾萤光素酶报告基因检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司, #RG066S)

2.3 实验仪器

PCR 仪、超净台、高速微量离心机(ThermoFisher,#MICRO17)、Luciferase Assay System (Beyotime)、一层大容量叠加式震荡培养箱(上海旻泉仪器有限公司,#MQD-BIT)、低速冷冻离心机(湘仪离心机仪器有限公司,#L530R)

2.4 实验软件

本实验共需 3 个专业软件: SnapGene (6.0.2)、GraphPad Prism (9.3.0) 和 BioEdit Sequence Alignment Edito (7.2.5.0)

2.5 实验方法



图 4 实验方法概述图

2.5.1 5种 2-36 定点突变载体的构建

①2-36 抗体序列已在之前上传 GenBank, HC 序列号: MT712289.1; LC 序列号: MT712308.1。下载 2-36 原始 DNA 序列。

②分别构建 2-36 HC 与 LC 的原始载体于 pcDNA3.4 中,送公司合成。下图 展示 2-36 HC 载体示意图; 2-36 LC 仅替换图中 HC 序列,其余一致。



图 5 2-36 HC 载体示意图

③找到 2-36 原始序列上找到前述 5 个预测的关键位点,准备构建 HC S32R、 HC V101L、LC L47F、LC A56F 和 LC A56K,五种突变抗体表达载体。分别设 计对应的 PCR 引物(含有相关突变),送公司合成。引物详见表 2

表 2 5 对含有特定突变的 2-36 PCR 引物

引物名	对应突变	引物序列(突变碱基红色标出)	长度
1-F	S32R HC	5'-CAAGACCAATAGTAGTTA <mark>CG</mark> GGAGCTCACGGAGCCGC-3'	37nt
1-R		5'-GCGGCTCCGTGAGCTCCCGTAACTACTATTGGTCTTG-3'	
2-F	V101L HC	5'-GATCTATCGTAATAGTACAACTCCCGGGCACAATAGTA-3'	38nt
2-R		5'-TACTATTGTGCCCGGGAGTTGTACTATTACGATAGATC-3'	
3-F	L47F LC	5'-GGCTCCGTAGATCAGGAACCTAGGTGCCTGTCC-3'	33nt
3-R		5'-GGACAGGCACCTAGGTTCCTGATCTACGGAGCC-3'	
4-F	A56F LC	5'-GGGGATGCCGGTGAACCTGGAGCTGGCT-3'	28nt
4-R		5'-AGCCAGCTCCAGGTTCACCGGCATCCCC-3'	
5-F	A56K LC	5'-GTCGGGGATGCCGGTCTTCCTGGAGCTGGCTCC-3'	33nt
5-R		5'-GGAGCCAGCTCCAGGAAGACCGGCATCCCCGAC-3'	

④配置 PCR 反应所需体系。选用 Vazyme 的 PCR 试剂盒,体系详见表 3。

表 3 25µl PCR 反应体系

试剂名称	用量
模板 DNA(原始载体)	0.5µl
2x Phanta Max Master Mix	12.5µl
正向引物(Forward)预先浓度制成 10uM	1µl
反向引物(Reverse)预先浓度制成 10uM	1µl
ddH2O	10µl

⑤用 PCR 反应在 2-36 原载体上引入特定位点突变。PCR 具体程序见表 4。

		表 4 PCR 反应具体程序设定							
	Z时间	反应时间	反应温度	反应步骤					
_	0″	30″	98°C	预变性					
	5″	15″	98°C	变性					
变性→延 30 个循环 30 个循环 30 (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1)	5″	15″	60°C	退火					
	in/Kb	1min/K	72°C	延伸					
	min	10min	72°C	彻底延伸					

注: 2-36 原始载体长度约 7.5Kb, 故计算延伸时间为 7.5min

⑥用 BBI SpeedyCut DpnI 快切酶(#B600735)处理 PCR 产物。DpnI 反应体系见表 5

试剂名称	用量
PCR 产物	10µ1
10x SpeedyOne Buffer	2µl
SpeedyCut Dpn I	1µl
ddH ₂ O	7µl
37℃ 反应 30 分钟,之后放入 4℃ 暂存或直接	传化 E.coli

表 5 20µl DpnI 反应体系

2.5.2 假病毒载体构建

假病毒载体构建与"2.5.1 5种 2-36 定点突变载体的构建"实验方法一样,除了假病毒是以 pCMV3 为载体,连入冠状病毒的 SpikeDNA 序列。下图展示为WT SARS-CoV-2(D614G)假病毒载体;其他冠状病毒假病毒载体可以用前述PCR 定点引入突变或是直接由公司合成方式获得。



图 6 WT SARS-CoV-2 假病毒载体示意图

2.5.3 转化 E.coli

①取 50/100µl 化学感受态 E.coli, 冰浴使其融化。

②加入 10/20μl 用 DpnI 快切酶处理后的 PCR 产物(带有相应突变的载体), 混匀,冰上静置 30min。

注: Efficom 5 a 的化学感受态 E.coli 支持"快速转化", 放置冰上 5min 即可。

③放入 42℃ 水浴锅中, 热激 45″, 之后迅速放于冰浴中静置 2min。

④向感受态 *E.coli* 离心管中加入 500~700μl 无抗生素的 LB 液体培养基, 放入振荡培养箱 200rpm, 37°C, 1h。

注: Efficom 5 a 的化学感受态 *E.coli* 支持"快速转化",可以省略放入培养 箱复苏这一步,直接涂平板。

⑤之后离心,去除部分上清液;重新吹悬 E.coli,涂布于含有对应抗生素的 LB 固体(选择)培养基上,37℃培养箱,16h。

⑥之后若平板上长出菌落,挑选若干单菌落,简单培养,留样并送测序。

2.5.4 抽提质粒(载体)

抽提质粒用 E.Z.N.A.® Endo-Free Plasmid DNA Midi Kit。将过夜培养的 *E.coli* 从培养基分批离心(4000g, 5min)转移至 50ml 离心管中,去上清液,菌株沉淀 于离心管底部。

①向离心管中加入 2.5ml Solution I, 剧烈震荡, 完全使沉淀(菌株)重悬。

②加入 2.5ml Solution II,轻微上下倒置离心管,室温下静置 2-3min,期间不时上下倒置离心管。

③再加入 1.25ml N3 Buffer (预冷),轻微上下倒置离心管 10 次,静置于室 温 2min,等待絮状沉淀出现。

④将 50ml 离心管固液混合物转移至试剂盒中提供的过滤注射器中(Lysate Clearance Filter Syringe),推动活塞,将液体注射到新的 15ml 离心管中。

⑤加入 0.1 体积的 ETR Buffer, 上下倒置离心管 10 次, 溶液变浑浊。

⑥将离心管置于冰上, 孵育 10min, 期间不时倒置离心管, 溶液变澄清。

⑦将离心管放入 42℃ 水浴中,静置 5min,溶液再变浑浊。

⑧将离心管放入离心机中,4000g,5min;离心后溶液分层,吸取上方透明

澄清液体于新的15ml 离心管中;之后加入0.5体积的无水乙醇溶液,上下倒置, 室温下静置2min。

●准备 HiBind[®] DNA Midi Column (试剂盒中提供),加入 1ml GPS Buffer, 室温下放置 4min,之后 4000g, 3min 离心,润洗滤膜,弃去下方滤液。

①将15ml离心管中液体分次离心转移至HiBind®DNA Midi Column中,每次倒入3.5ml,4000g,3min离心,弃去HiBind®DNA Midi Column下方废液;
 重复直到液体全部转移完成。

向 HiBind[®] DNA Midi Column 中加入 3ml HBC Buffer, 4000g, 3min 离心,弃去下方废液。

① 再向 HiBind[®] DNA Midi Column 中加入 3.5ml DNA Wash Buffer, 4000g,
 3min 离心,弃去下方废液。并且重复此步骤一次。

(3)将 HiBind® DNA Midi Column 放入离心机中,4000g,10min 离心,甩干 上方收集管内滤膜。

① 准备一个新的 15ml 离心管,将 HiBind® DNA Midi Column 上面的收集 管转移到新离心管中。

①向上方收集管滤膜加 1ml Endo-Free Elution Buffer, 之后室温静置 3min, 然后 4000g, 5min 离心。

④将离心下来的液体(纯化的质粒)分装小离心管,做好标记,-20°C储存
待用。

2.5.5 质粒 DNA (载体) 转染细胞

本实验表达抗体用 Expi293F 细胞,对应转染抗体表达质粒;制备假病毒用 293T 细胞,对应转染含有冠状病毒 Spike 基因的质粒。两种细胞转染操作步骤总体一致,仅在个别之处有差异。下面具体转染方法以转染 Expi293F 细胞为例说明。

①提前准备 30ml 细胞密度约为 2.5million/ml 的 Expi293F 细胞于细胞培养 屏中。

14

②根据 DNA(载体)浓度,计算出所需要转染的体积。30ml 细胞需要总量 30μg 的 DNA,由于 2-36 原抗体/改造抗体含有 HC 与 LC 两条链,且均由不同载 体表达产生,因此需要 15μg HC+15μg LC 的 DNA,计算出各自用量。(如表达 2-36 原抗体,则需 15μg HC 原载体+15μg LC 原载体)

③取 3ml 细胞培养基于 15ml 离心管中,加入对应的总计 30µgDNA(质粒), 接着加入 90µl 混匀的 PEI 试剂。

④微微震荡使 PEI 与 DNA 充分接触,室温下孵育 20min。

⑤将 15ml 离心管中试剂倒入装有 30ml 细胞的培养瓶中,轻轻摇匀,将培养瓶放入对应的细胞培养箱中。

⑥第二天,向培养瓶中加入 3ml 无蛋白补料。

⑦自转染之日起,5~6天后,可以离心收集抗体。

注:转染 293T 制备假病毒时,需提前一天在 10mm 细胞培养皿中加入含有 0.5million/ml个细胞的 10ml 培养基;转染时操作基本一样,只是试剂用量(DNA、 PEI 等)按比例对应调整(均为上述步骤用量的 1/3),转染后第二天无需加任何 试剂,接下来具体步骤详见"2.5.7 包装假病毒"

2.5.6 抗体的纯化

①将转染后 5~6 天的 Expi293F 细胞液体倒入 50ml 离心管中,于离心机中 4000rpm, 10min 离心,之后转移上清液于新的 50ml 离心管中,做好标记。

②向含有抗体的离心液内加入 0.1 体积的 Protein A IgG Binding Buffer 和 0.1 体积的 Trizma® hydrochloride solution, 混匀。

③组装抗体纯化柱,向滤片上加入 100μl 的 rProtein A;接着用 Protein A IgG Binding Buffer 反复冲洗纯化柱,待 rProtein A 形成稳定的白色薄层。

④将含有抗体的离心液缓慢加入纯化柱中,上样,并收集下方滤过液体;待 液体完全滤过后,将下方收集的滤液再次缓慢加入纯化柱中,重复至少3次。

⑤离心液滤过后,向纯化柱中加入适量的 Protein A IgG Binding Buffer,冲洗 柱子。

◎准备 15ml 离心管,加入 0.3ml 的 Trizma[®] hydrochloride solution;并将纯 化柱转移至离心管上方,加入 3ml IgG Elution Buffer 洗脱结合在 rProtein A 上的 抗体,使纯化柱下方液体滴入离心管中。

⑦将 15ml 离心管中抗体洗脱液转移至 Pierce[™] Disposable Plastic Columns (ThermoFisher, #29920)离心,之后上方加 PBS 溶液,重复 3 次以上。

⑧在超净台内,向 Pierce™ Disposable Plastic Columns 上方加入 1ml 的 PBS, 用移液枪反复吹洗滤膜,之后将上方液体吸出,过 0.22μm 细菌滤膜,将纯化后 无菌的抗体溶液转移至离心管中,标记,4℃保存。

2.5.7 包装假病毒

①在 293T 转染对应质粒(载体)的第二天,用过量的 VSV-G pseudo-typed
 ΔG-luciferase (MOI~3-5) 感染这些细胞

②感染病毒 4h 后,去除培养基,并且用 10 mL DPBS+1%FBS 洗细胞三次; 之后向培养皿加 10 ml DMEM(2%FBS)培养基, 37℃ 细胞培养箱培养 24-30h。

③3000rpm, 8min, 4°C 离心,将上清液转移至新的 15ml 离心管中;将 1ml 20% I1 hybridoma (anti-VSV-G) supernatant 加到离心管内, 37°C 下孵育 1h,为了 彻底清除污染残余的 VSV-G 病毒颗粒。

④分装离心管中含有假病毒的液体,标记并测量滴度(titer),于-80°C冻存。

2.5.8 抗体-假病毒中和

抗体-假病毒中和实验在 96 孔板上完成,下图是 96 孔板示意图。每个孔总体积为 200μl;每三纵列前六排加入同一种抗体,相当于重复实验三次。G 排为 阴性对照:无抗体,只有细胞和假病毒,理论上为病毒感染细胞最严重的一排; Η 排为阳性对照:仅有细胞,理论上为 0 病毒感染的一排。

i	1	2	3	4	5	6		8	9	10	11	12	Ab Conc ug/ml
А													20
В		Ab1			Ab2			Ab3					4
С	nco	+ wdowi	iruc	nco	+ wdowi	iruc		+	iruc				0.8
D	pse	uuuuvi +	iius	pse	+	iius	pse	+ 4000	iius				0.16
Е	V	ero-E	6	V	ero-E	6	V	′ero-E	6				0.032
F													0.0064
G	Vero-E6+pseudovirus [-]												
н	Vero-E6 [+]												
	周月一次过长中的快速入												

图 7 96 孔板中和实验示意图

①准备抗体:将之前纯化过的抗体测浓度,按上图最右侧抗体浓度(总体积 200µl)计算每种用量,分别加入对应孔中。

②准备假病毒:按照之前制备假病毒时测的病毒滴度,取 200~1000TCID₅₀ 体积的假病毒,加入到前七排各孔中。

③之后将96孔板放入37°C培养箱中孵育30min。

④准备细胞:本实验用到 Vero-E6 细胞,每个孔加入 20000~30000 个 Vero-E6 细胞,之后用培养基将每孔体积补齐到 200μl。

⑤96 孔板放入 37°C 细胞培养箱中, 16~30h 后, 取出 96 孔板, 准备读数。

2.5.9 荧光读数

荧光反应使用 Renilla-Lumi[™] Plus 海肾萤光素酶报告基因检测试剂盒。使用 前从-20℃ 冰箱中取出,置于室温解冻,并按 1:100 比例混合海肾萤光素酶检测 底物(100X)与海肾萤光素酶检测缓冲液制成海肾萤光素酶检测工作液。

①将中和实验 96 孔板每孔液体吸去,每孔加入 70μl 海肾萤光素酶报告基因裂解液,放置 5min。

②每孔再加入 30μl 海肾萤光素酶检测工作液, 放置 3-5min。

③之后将 96 孔板放到 Luciferase Assay System (Beyotime)机器上读取荧光值 (确保在加入工作液后 30min 内完成读数),保存原始数据于 Excel 中。

2.5.10 中和曲线绘制、数据计算、比较

抗体中和曲线、IC₅₀计算等(中和 50%病毒所需要抗体浓度)均在 GraphPad Prism 软件上完成。将 Excel 原始数据简单整理,换算成中和病毒百分比形式, 复制到 GraphPad Prism 中,新建 XY 表,自变量选取 3 组重复,Transform 转化 纵坐标(抗体浓度)为对数形式,选用 Non linear Regression 即可作出中和曲线, 并同时计算出中和半数病毒所需抗体浓度 IC₅₀ 的值。

三、研究结果

3.1 载体构建及测序验证

用设计的 5 对 PCR 引物 (表 2) 经 PCR 反应, 后用 DpnI 酶处理 PCR 产物; 然后转化 *E.coli*, 翌日观察到所涂平板均长有菌落(图 8),分别挑选适量单克隆 送测。之后在 SnapGene 软件或 BioEdit 软件上比对 DNA 或翻译成氨基酸的序列 (原始 vs 突变),确认经 PCR 反应,是否构建出目的载体(图 9 以 BioEdit 比对 结果为例说明)。



图 8 转化 E.coli 结果图



图 9 LC 构建载体与原模板氨基酸序列比对结果示意图

序列比对结果正确后,可以扩增培养对应的送测菌株,转移至 200ml 液体 LB 培养基中,过夜培养;若序列比对结果错误,或是突变未引入新载体,则重 复 PCR→转化送测。最终,5 种定点突变均成功引入新载体中,得到 HC S32R、 HC V101L、LC L47F、LC A56F 和 LC A56K 五种改造的 2-36 抗体表达载体。

另构建 2 种假病毒质粒: SARS-CoV 与 RaTG-13,同上述实验流程,最终得 到含有对应冠状病毒 Spike 基因序列(去掉 C 端编码的 18 个氨基酸)。

3.2 扩增载体,提取质粒

用 200ml LB 液体培养基接种测序结果正确的菌株(菌株内的质粒为目的扩 增产物),过夜培养,第二天提取质粒,方法见 2.5.4

并直接转化, 扩增原始 2-36HC、LC 模板、及实验室已合成的假病毒表达载体; 并在提取质粒前均保存甘油菌(-80°C 冻存待用)

之后测量各种质粒浓度,然后于-20°C储存待用。下表为扩增提取的各种质 粒浓度、体积明细。

质粒 (载体)命名	浓度(ng/µl)	总体积 (ml)
S32R HC	307	1.2
V101L HC	252.3	1.2
L47F LC	196	1.2
A56F LC	119.6	1.2
A56K LC	120	1.2
2-36 HC	277.6	2
2-36 LC	446.3	2
SARS-CoV-PV	240.8	2
RaTG13-PV	198.6	2
BA.1.1-PV	31.4	2
BA.2-PV	92	2

表 6 提取质粒浓度体积等明细表

3.3 表达抗体,并纯化

抗体表达用 Expi293F(悬浮 293 细胞系)表达,在转染后 5~6 天收获,之 后纯化抗体,并测量浓度,于4℃保存。

其中带有 HC V101L 突变的 2-36 抗体三次重复实验表达量均极低(表 7), 由于其浓度过低,会对中和实验结果产生较大影响,故舍弃该点突变。作为弥补, 用 HC S32R+LC A56F 双突变抗体代替原有 HC V101L 单突变抗体。

表 7 HC V101L 突变抗体低表达, 3 次重复实验数据

	第一次	第二次	第三次
HC V101L	0.03mg/ml	0.07mg/ml	0.078mg/ml

19

其他含有对应突变即定向改造的 2-36 抗体均正常表达,一并表达 2-36 原始 抗体,纯化,测量浓度,数据见下表。

抗体命名	浓度(mg/ml)	总体积 (ml)	A260/280
S32R HC 2-36	0.217	1.2	0.6
L47F LC 2-36	0.228	1.2	0.68
A56F LC 2-36	1.654	1	0.51
A56K LC 2-36	1.612	1	0.5
S32R+A56F 2-36	0.543	1	0.52
WT 2-36	0.967	1.2	0.51

表 8 2-36 系列各抗体表达情况

3.4 制备假病毒

假病毒制备用 293T 细胞,转染后第二天感染 VSV-G pseudo-typed ΔG-luciferase,第三天可以收病毒。下表列出制备的各种假病毒并用其直接感染 Vero-E6 细胞后计算的滴度(用 TCID₅₀/ml 表示)。

假病毒命名	总体积(ml)	TCID ₅₀ /ml
PV: SARS-CoV	10	7029.3
PV: RaTG13	10	35146.3
PV: BA.1.1	20	3952.8
PV: BA.2	20	11114.2

表9 假病毒制备情况

另,实验室有已制备好冻存的假病毒 PV: SARS-CoV-2 D614G 和 PV: SARS-CoV-2 Delta VOC,一并用于后续中和实验。

3.5 中和实验荧光读值数据

在 96 孔板中和实验第二天,按 2.5.9 方法准备上机读数,使用 Luciferase Assay System (Beyotime)软件及配套硬件设备,每个 96 孔板各个孔荧光值保存到 Excell 中,即为原始中和实验数据。

下图展示的是正常结果,对应 S32R HC 2-36、L47F LC 2-36、A56F LC 2-36 与 A56K LC 2-36 四种抗体对 RaTG13 假病毒的中和数据。

		S32R			L47F		A56F		A56K				
Α	60	81	133	132	189	85	68	269	117	128	444	166	Lum
В	142	119	73	82	63	88	57	165	79	904	947	907	Lum
С	244	182	405	353	81	245	154	187	188	3421	4428	1517	Lum
D	3019	1375	1231	1066	1404	1856	2179	1482	1705	8009	9289	7735	Lum
E	7767	7056	4580	6045	6224	5975	5417	7331	6366	9065	9792	10823	Lum
F	9606	9151	7623	10040	7852	9658	8992	9881	10568	10214	10748	9755	Lum
G	10682	8368	10245	10928	10001	8399	9035	10616	9643	10399	10327	10028	Lum
Н	68	81	78	69	69	55	72	70	92	84	67	60	Lum

图 10 正常结果中和原始数据示意图

本实验一共测了 S32R HC 2-36、L47F LC 2-36、A56F LC 2-36、A56K LC 2-36、S32R+A56F 2-36、WT 2-36 与 2-36 293F(实验室用另一种悬浮细胞系表达的原始 2-36) 共 7 种单克隆抗体(mAb)对 SARS-CoV、SARS-CoV-2(D614G)、RaTG-13、BA.1.1、SARS-CoV-2 Delta VOC 五种假病毒的中和能力(potency)测试。其中,SARS-CoV-2(D614G)假病毒再两次重复实验中,均由于假病毒滴度TCID₅₀ 很小,导致荧光读值整体偏小,会使最后中和曲线及 IC₅₀ 计算值与真实情况存在较大差异,因此舍去 SARS-CoV-2(D614G)假病毒后续中和数据处理,下图展示第一次中和试验异常结果示意图。

1.1		S32R			L47F		A56F		A56K				
Α	47	59	51	49	62	54	49	40	41	74	100	65	Lum
В	52	70	54	94	49	46	47	109	60	360	129	240	Lum
С	51	49	65	97	196	62	77	92	106	283	927	438	Lum
D	260	344	386	439	422	216	296	240	580	847	1342	618	Lum
E	490	607	553	569	423	524	918	697	1150	1346	842	667	Lum
F	548	586	728	600	1142	527	1360	1150	635	1279	966	1134	Lum
G	675	882	977	1458	947	620	771	1000	1186	1002	1557	925	Lum
Н	53	53	74	58	54	34	40	61	53	61	51	45	Lum

图 11 PV: SARS-CoV-2(D614G)异常中和原始数据

图片展示的是4种抗体中和 SARS-CoV-2(D614G)第一次中和实验荧光读值原始数据。异常结果这里原因是整体荧光读值太低,即荧光读值最大的G排平均值远低于 100 倍 H 排平均值

3.6 抗体中和曲线、IC50计算

下面分别展示 S32R HC 2-36、L47F LC 2-36、A56F LC 2-36、A56K LC 2-36、 S32R+A56F 2-36 和 WT 2-36 共 6 种 mAbs 对 SARS-CoV、SARS-CoV-2(D614G)、 RaTG-13、BA.1.1 四种假病毒(pseudovirus)中和原始数据经 GraphPad Prism 软 件处理的中和曲线及 IC₅₀

3.6.1 6 种抗体中和 SARS-CoV 结果

S32R HC 2-36 的 IC50 为 0.053µg/ml、L47F LC 2-36 的 IC50 为 0.239µg/ml、

A56F LC 2-36 的 IC₅₀ 为 3.997μg/ml、A56K LC 2-36 的 IC₅₀ 为>20μg/ml(即在实 验测试的最高浓度 20μg/ml条件下,仍未检测到中和一半假病毒)、S32R+A56F 2-36 的 IC₅₀ 为 0.122μg/ml、WT 2-36 的 IC₅₀ 为 1.038μg/ml。中和曲线见下图。



3.6.2 6种抗体中和 RaTG-13 结果

S32R HC 2-36 的 IC₅₀为 0.054µg/ml、L47F LC 2-36 的 IC₅₀为 0.045µg/ml、A56F LC 2-36 的 IC₅₀为 0.047µg/ml、A56K LC 2-36 的 IC₅₀为 0.433µg/ml、S32R+A56F 2-36 的 IC₅₀为 0.044µg/ml、WT 2-36 的 IC₅₀为 0.039µg/ml。中和曲 线见下图。



3.6.3 6种抗体中和 SARS-CoV-2 Delta VOC 结果

S32R HC 2-36 的 IC₅₀为 0.161µg/ml、L47F LC 2-36 的 IC₅₀为 0.153µg/ml、A56F LC 2-36 的 IC₅₀为 0.116µg/ml、A56K LC 2-36 的 IC₅₀为 0.780µg/ml、S32R+A56F 2-36 的 IC₅₀为 0.078µg/ml、WT 2-36 的 IC₅₀为 0.083µg/ml。中和曲 线见下图。



3.6.4 6种抗体中和 BA.1.1 (Omicron sub-lineage 的一个突变株)结果

S32R HC 2-36 的 IC₅₀为 1.741µg/ml、L47F LC 2-36 的 IC₅₀为 1.309µg/ml、 A56F LC 2-36 的 IC₅₀为 2.406µg/ml、A56K LC 2-36 的 IC₅₀>20µg/ml、S32R+A56F 2-36 的 IC₅₀为 1.012µg/ml、WT 2-36 的 IC₅₀为 2.438µg/ml。中和曲线见下图。



3.7 改造的 5 种抗体与原 2-36 对病毒中和能力的比较

为了直观比较每一种改造抗体与原 2-36 对同种病毒中和能力的差异,将 3.6 中各中和曲线整合作图(图 16),并作直观图比较抗体 IC₅₀(图 17)。对于 A56K LC 这个突变抗体,其对 4 种冠状病毒中和能力(IC₅₀)均比原 2-36 弱,暗示 2-36 LC A56 是一个关键的与抗原相互作用的残基;并且 A56K LC 是一个负向突 变,不利于提高 2-36 的中和能力。另外,S32R HC 突变对 2-36 中和 SARS-CoV 的能力(IC₅₀)有明显的提升,而 S32R+A56F、L47F LC 均有不同程度提高 2-36 中和 SARS-CoV 的能力。除了 A56K LC 外,4 种改进抗体对于 RaTG-13、Delta VOC、BA.1.1 三种病毒的中和能力与原 2-36 基本相当,图中这 5 种曲线在对应 3 副图中基本重合。



图 17 改造抗体 vs 原 2-36 抗体 IC50 比较

通过抗体-病毒中和热力图(图18),更进一步详细比较每一种突变抗体对于特定病毒中和能力相较于原 2-36 中和能力的变化:与之前结果一致,A56K LC 突变大幅降低了 2-36 对 4 种病毒的中和能力(一个数量级以上);S32R HC 突变中对 2-36 中和 SARS-CoV 的能力提高了 19.4 倍,说明了 2-36 抗体可以通过定 点突变的方法优化序列,提高其中和效率,证明了定点突变方法的可行性;A56K 突变与 S32R+A56F 双突变两中抗体对 4 种病毒中和能力呈现出截然相反的变化 趋势,说明抗体中一些关键残基对抗体-病毒中和能力起到关键作用;另外像 S32R HC 突变对不同病毒中和能力变化情况、程度均不同,也强调抗原的不同微 观结构对于抗体中和能力差异的解释性。

	SARS-CoV	Delta VOC	RaTG13	BA.1.1
S32R HC	19.4	-1.93	-1.38	1.40
L47F LC	4.34	-1.85	-1.14	1.86
A56F LC	-3.85	-1.40	-1.20	1.01
A56K LC	>-20	-9.39	-11.10	>-20
S32R+A56F	8.51	1.06	1.13	2.41
上升-fold	[1,2]	[2,5]	[5,10]	>10
下降-fold	[1,2]	[2,5]	[5,10]	>10

图 18 改造抗体中和能力变化热力图

图片展示的是 5 种改造抗体中和 4 种病毒能力的变化。将原 2-36 对病毒中和的 IC₅₀ 值定义为 1 单位,改进抗体的 IC₅₀/2-36 IC₅₀ 换算成对应单位;正数表示提高 的倍数;负数表示降低的倍数;单元格颜色越深,代表改造前后抗体对病毒中和 能力变化越大

3.8 不同细胞表达 2-36 抗体中和能力的差异

通过抗体-假病毒中和实验,初步比较了用 Expi293F(本实验 5 种改造抗体与原 2-36 共计 6 种抗体表达的细胞)与 HEK-293F(实验室另一种表达抗体的细胞)两种悬浮细胞表达出同种 2-36 抗体在功能上的一致性。

图 19 为两种细胞表达的 2-36 对于 4 种病毒的中和曲线整合图。图中由 Expi293F 表达的 2-36 抗体 (2-36/WT 2-36) 与 HEK-293F 表达的 2-36 抗体 (2-36 293F) 对于 4 种病毒中和曲线几乎重叠; 计算其 IC₅₀ 数据,由 Expi293F 细胞 表达的抗体 2-36 对 SARS-CoV、Delta VOC、RaTG-13、BA.1.1 中和的 IC₅₀ 分别 为 1.038µg/ml、0.083µg/ml、0.039µg/ml、2.438µg/ml; 对应地,由 HEK-293F 细 胞表达的抗体 2-36 中和 IC₅₀ 为 1.403µg/ml、0.088µg/ml、0.039µg/ml、1.811µg/ml; 将对应数据放到直观图(图 20)上,对同一病毒每一组中和数据都很好对应,说 明这两种细胞表达出的抗体中和性能几乎无差异,初步验证了两种细胞表达出的 2-36 抗体在中和活性上的一致性。



图 19 Expi293F vs 293F 表达 2-36 抗体中和能力比较



图 20 Expi293F vs 293F 表达 2-36 抗体 IC50 比较

四、讨论

4.1 本实验的科学意义

本实验从定点突变方法开始,先是设计引物、构建新的表达载体、转化 E.coli 扩增、抽提质粒(载体)、转染哺乳动物细胞、制备抗体和假病毒,最后进行假 病毒中和实验,系统比较了由 2-36 改造的 5 种新抗体对不同病毒中和能力的变 化。我们最终的实验结果说明了我们用定点突变优化抗体序列的可行性,可以为 后续类似的优化抗体提供技术上的参考。

计算抗体中和能力 IC₅₀ 数值并用热力图系统展示每一种突变对抗体中和特定病毒影响的方向及程度时(图 18),我们发现 S32R HC 的突变可以大幅提高 2-36 对 SARS-CoV 的中和效率,并且 L47F LC 突变也有类似的效果,一方面说明 2-36 确实有提高中和能力的空间、同时也暗示这些位点很可能是抗原-抗体相互 作用的关键位点,可以进一步研究,解析抗体抗原互作结构。作为对比,A56K LC 的突变则会大幅降低 2-36 对所测 4 种病毒的中和能力,虽然没达到我们希望 看到的优化效果,但是该位点明显的负向作用也说明在原 2-36 中,轻链 A56 的 残基是接触抗原表位的关键残基;而 A56K 相比 A56F 对抗体负向作用更大,再 次强调了微观结构对于理解抗体中和效果的重要性。

另外,我们也发现一些突变位点对 2-36 中和一些病毒有提升作用,而对另 外一些病毒则呈现出降低其中和能力的结果;这与 CR3022 抗体可以较好中和 SARS-CoV 而在体外检测不到其对 SARS-CoV-2 的中和能力相似,虽然两种病毒 从进化关系来看相似度很高,但是具体表位的氨基酸差异仍然会显著影响同种抗 体的中和能力^[30]。

本实验还初步测试了实验室常用于表达抗体的两种哺乳动物细胞系 Expi293F 与 HEK-293F 表达出的抗体在结构和功能上的一致性,通过表达同种 2-36 抗体,并且分别测试有两种细胞表达的抗体对病毒的中和能力,计算并比较 两种抗体的 IC₅₀,并未观察到二者表达抗体对病毒中和能力存在明显差异(图 20); 结合真核细胞基因表达的过程,两种细胞均有加工蛋白质的糙面内质网、高尔基 体等细胞器,理论上翻译的初产物(肽链)会在这些细胞器的作用下正确形成空 间结构,原则上证明了不同真核细胞表达同种抗体具有结构与功能的一致性,是

27

同种抗体。

最后,本实验通过抗体-假病毒中和实验,旨在加深对抗体-抗原相互作用的 了解;并且对于新发病毒,我们可以通过这套体系评估现有抗体药物的保护作用、 筛选高效中和抗体、为传染病的理解提供一个角度。

4.2 实验的局限性

本实验通过抗体-假病毒中和实验模拟真实体内抗体-病毒的中和过程,通过体外实验替代,旨在为抗体临床应用提供参考。但本实验也存在局限性。

①抗体作用的局限性:本实验均在体外完成,缺乏体内真实、复杂条件下抗体对病毒中和能力、中和机制的评价。2-36 是一个人源化的抗体^[27,28],除了有结合抗原的 Fab 结构,还有 Fc 区域,本实验由于在体外完成,仅对其 Fab 结构具有较好的真实评价,但其 Fc 的作用仍然未知。已有研究表明,抗体在体内中和病毒除了 Fab 与抗原的结合外,Fc 在后续包括病毒抗体络合物的清除等方面起到重要作用^[47,48]。就新冠病毒,Yamin 等人通过小鼠模型,证明了在体内,抗体的 Fc-FcγR 对于感染病毒患病有很好的治疗效果^[48]。故为了更全面评估 2-36 及改进抗体对病毒的中和效果,仍需要体内实验数据作为支持。

②假病毒的局限性:本实验用假病毒模拟真实病毒感染细胞的过程,保留真 实病毒特定的抗原表位,可以实现与抗体相互作用,进而可以评价抗体中和能力 或是病毒对抗体中和的抗性。但假病毒仍与真实病毒存在差异,比如本实验是将 不同冠状病毒的 Spike 蛋白构建到 VSV 假病毒载体上,但由于 SARS-CoV-2 等 冠状病毒其他结构蛋白(E、M、N)均无法在 VSV 上显示;另外,VSV 本身为 椭球形病毒,这也限制了 Spike 蛋白在其上面分布、构象与真实病毒之间的一致 性^[40]。故为了得到确切的抗体-病毒中和数据,仍需进行活病毒中和实验。

4.3 研究展望

抗体优化通过对抗体的序列进行突变、替换等,可以实现提高现有抗体对病 原体中和的效率,包括其自身的中和范围。利用这一优势,可以在出现新的传染 病时,用优化已有抗体的策略代替从康复者体内分离新抗体,缩短开发药物的时 间。除了本实验用到的定点突变方法外,更常见的筛选或优化抗体可以通过 yeast display 或 phage display 对抗体序列建库,之后用特定抗原进行筛选,同样可以获得性能优异的改造抗体^[43-46]。这些优化方法的出现,为抗体工程的发展打开了空间。

此外,对于现有抗体的改造,除了序列的优化外,还可以考虑对抗体的结构 作优化:比如应天雷团队,将人源抗体制成纳米抗体(nanobody)的结构,利用 纳米抗体更高的组织穿透能力,成功研制出可以通过鼻腔吸入的抗体雾化剂,提 高了抗体类药物在预防时的应用范围^[49];也可以将抗体制成双特异性抗体 (bispecific antibody),利用其结合抗原不同表位的协同性,提高其中和能力及广

度^[50,51]。

最后,新冠病毒由于其 RNA 的特性自 2019 年出现至今,全世界已经发现了 多种突变株 (variants),给疫情未来的发展增添了许多不确定性;作为治疗病毒 或预防感染的中和抗体备受关注,IC₅₀ 作为评价抗体的一个重要指标,可以量化 中和病毒的能力,因而在开发抗体类药物时,常常被研究人员提及。我们之前发 现的 2-36,是一个对 Sarbecovirus 有着广谱中和能力的抗体,但是相比于一些中 和能力更优的抗体,如 LY-CoV1404 中和 SARS-CoV-2 及其 VOCs 的 IC₅₀ 均在 ng/ml 级别^[39],高于 2-36^[28],说明我们的抗体仍有很大的优化空间。后续,我们 也会继续用多种方法优化我们发现的抗体,期待发现在保留原抗体中和广谱性基 础上具有更高中和效率的抗体;而这其中性能优异的抗体可以进一步开发研究, 希望可以作为治疗或预防新冠的药物,为战胜疫情做出我们的贡献。

参考文献

- Stadler K, Masignani V, Eickmann M, Becker S, Abrignani S, Klenk HD, et al. SARS--beginning to understand a new virus. Nature reviews. Microbiology vol. 1,3 (2003): 209-18.
- 2. Mackay, Ian M, and Katherine E Arden. MERS coronavirus: diagnostics, epidemiology and transmission. Virology journal vol. 12 222. 22 Dec. 2015
- Umakanthan S, Sahu P, Ranade AV, Bukelo MM, Rao JS, Abrahao-Machado LF, et al. Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19). Postgraduate medical journal vol. 96,1142 (2020): 753-758.
- 4. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. Nature reviews. Microbiology vol. 19,3 (2021): 141-154.
- Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. Nature microbiology vol. 5,4 (2020): 536-544.
- Wang MY, Zhao R, Gao LJ, Gao XF, Wang DP, Cao JM. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. Frontiers in cellµlar and infection microbiology vol. 10 587269. 25 Nov. 2020
- 7. Jaworski, Juan Pablo. Neutralizing monoclonal antibodies for COVID-19 treatment and prevention. Biomedical journal vol. 44,1 (2021): 7-17.
- Kirtipal N, Bharadwaj S, Kang SG. From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. Infection, genetics and evolution : journal of molecµlar epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases vol. 85 (2020): 104502.
- Woo PC, Lau SK, Lam CS, Lau CC, Tsang AK, Lau JH, et al. Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. Journal of virology vol. 86,7 (2012): 3995-4008.
- Fouchier RA, Hartwig NG, Bestebroer TM, Niemeyer B, de Jong JC, Simon JH, et al. A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America vol. 101,16 (2004): 6212-6.
- Llanes A, Restrepo CM, Caballero Z, Rajeev S, Kennedy MA, Lleonart R. Betacoronavirus Genomes: How Genomic Information has been Used to Deal with Past Outbreaks and the COVID-19 Pandemic. International journal of molecµlar sciences vol. 21,12 4546. 26 Jun. 2020
- 12. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Nature vol. 579,7798 (2020): 270-273.
- 13. Finkel Y, Mizrahi O, Nachshon A, Weingarten-Gabbay S, Morgenstern D, Yahalom-Ronen Y, et al. The coding capacity of SARS-CoV-2. Nature. 2021

Jan;589(7840):125-130.

- Brant AC, Tian W, Majerciak V, Yang W, Zheng ZM. SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication. Cell & bioscience vol. 11,1 136. 19 Jµl. 2021
- 15. Watanabe Y, Allen JD, Wrapp D, McLellan JS, Crispin M. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. Science. 2020 Jul 17;369(6501):330-333.
- 16. Neuman BW, Kiss G, Kunding AH, Bhella D, Baksh MF, Connelly S, et al. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. J Struct Biol. 2011;174(1):11–22.
- 17. Schoeman, Dewald, and Burtram C Fielding. Coronavirus envelope protein: current knowledge. Virology journal vol. 16,1 69. 27 May. 2019
- Bai Z, Cao Y, Liu W, Li J. The SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Its Role in Viral Structure, Biological Functions, and a Potential Target for Drug or Vaccine Mitigation. Viruses. 2021 Jun 10;13(6):1115.
- 19. Mu J, Xu J, Zhang L, Shu T, Wu D, Huang M, et al. SARS-CoV-2-encoded nucleocapsid protein acts as a viral suppressor of RNA interference in cells. Science China. Life sciences vol. 63,9 (2020): 1413-1416.
- Boson B, Legros V, Zhou B, Siret E, Mathieu C, Cosset FL, et al. The SARS-CoV-2 envelope and membrane proteins modµlate maturation and retention of the spike protein, allowing assembly of virus-like particles. The Journal of biological chemistry vol. 296 (2021): 100111
- Huang Y, Yang C, Xu XF, Xu W, Liu SW. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drµg development for COVID-19. Acta pharmacologica Sinica vol. 41,9 (2020): 1141-1149.
- Li MY, Li L, Zhang Y, Wang XS. Expression of the SARS-CoV-2 cell receptor gene ACE2 in a wide variety of human tissues. Infectious diseases of poverty vol. 9,1 45. 28 Apr. 2020
- 23. de Wit E, van Doremalen N, Falzarano D, Munster VJ. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. Nature reviews. Microbiology vol. 14,8 (2016): 523-34.
- 24. Raj VS, Mou H, Smits SL, Dekkers DH, Müller MA, Dijkman R, et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. Nature vol. 495,7440 (2013): 251-4.
- 25. Li, Wei. Delving deep into the structural aspects of a furin cleavage site inserted into the spike protein of SARS-CoV-2: A structural biophysical perspective. Biophysical chemistry vol. 264 (2020): 106420.
- 26. Bestle D, Heindl MR, Limburg H, Van Lam van T, Pilgram O, Moulton H, et al. TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells. Life science alliance vol. 3,9 e202000786. 23 Jμl. 2020
- 27. Liu L, Wang P, Nair MS, Yu J, Rapp M, Wang Q, et al. Potent neutralizing antibodies against mµltiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. Nature vol. 584,7821 (2020): 450-456.
- 28. Wang P, Casner RG, Nair MS, Yu J, Guo Y, Wang M, et al. A monoclonal antibody that neutralizes SARS-CoV-2 variants, SARS-CoV, and other sarbecoviruses.

Emerging microbes & infections vol. 11,1 (2022): 147-157.

- 29. Barnes CO, Jette CA, Abernathy ME, Dam KA, Esswein SR, Gristick HB, et al. SARS-CoV-2 neutralizing antibody structures inform therapeutic strategies. Nature vol. 588,7839 (2020): 682-687.
- Yuan M, Wu NC, Zhu X, Lee CD, So RTY, Lv H, et al. A highly conserved cryptic epitope in the receptor binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. Science (New York, N.Y.) vol. 368,6491 (2020): 630-633.
- Chen WH, Hotez PJ, Bottazzi ME. Potential for developing a SARS-CoV receptorbinding domain (RBD) recombinant protein as a heterologous human vaccine against coronavirus infectious disease (COVID)-19. Hum Vaccin Immunother. 2020 Jun 2;16(6):1239-1242.
- 32. He X, Hong W, Pan X, Lu G, Wei X. SARS-CoV-2 Omicron variant: Characteristics and prevention. MedComm (2020). 2021 Dec 16;2(4):838–45.
- Wang X, Zhao X, Song J, Wu J, Zhu Y, Li M, et al. Homologous or heterologous booster of inactivated vaccine reduces SARS-CoV-2 Omicron variant escape from neutralizing antibodies. Emerging microbes & infections vol. 11,1 (2022): 477-481.
- Ai J, Wang X, He X, Zhao X, Zhang Y, Jiang Y, et al. Antibody evasion of SARS-CoV-2 Omicron BA.1, BA.1.1, BA.2, and BA.3 sub-lineages. Cell host & microbe, S1931-3128(22)00243-8. 8 May. 2022
- 35. Tortorici MA, Czudnochowski N, Starr TN, Marzi R, Walls AC, Zatta F, et al. Broad sarbecovirus neutralization by a human monoclonal antibody. Nature vol. 597,7874 (2021): 103-108.
- Zhou T, Wang L, Misasi J, Pegu A, Zhang Y, Harris DR, et al. Structural basis for potent antibody neutralization of SARS-CoV-2 variants including B.1.1.529. Science (New York, N.Y.), eabn8897. 24 Mar. 2022
- Pinto D, Sauer MM, Czudnochowski N, Low JS, Tortorici MA, Housley MP, et al. Broad betacoronavirus neutralization by a stem helix-specific human antibody. Science (New York, N.Y.) vol. 373,6559 (2021): 1109-1116.
- Pinto D, Park YJ, Beltramello M, Walls AC, Tortorici MA, Bianchi S, et al. Crossneutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal SARS-CoV antibody. Nature vol. 583,7815 (2020): 290-295.
- Westendorf K, Žentelis S, Wang L, Foster D, Vaillancourt P, Wiggin M, et al. LY-CoV1404 (bebtelovimab) potently neutralizes SARS-CoV-2 variants. bioRxiv : the preprint server for biology 2021.04.30.442182. 24 Mar. 2022, doi:10.1101/2021.04.30.442182. Preprint.
- 40. Chen, Minghai, and Xian-En Zhang. Construction and applications of SARS-CoV-2 pseudoviruses: a mini review. International journal of biological sciences vol. 17,6 1574-1580. 10 Apr. 2021
- 41. Moog C, Dereuddre-Bosquet N, Teillaud JL, Biedma ME, Holl V, Van Ham G, et al. Protective effect of vaginal application of neutralizing and nonneutralizing inhibitory antibodies against vaginal SHIV challenge in macaques. Mucosal immunology vol. 7,1 (2014): 46-56.
- 42. Wang P, Nair MS, Liu L, Iketani S, Luo Y, Guo Y, et al. Antibody resistance of SARS-CoV-2 variants B.1.351 and B.1.1.7. Nature vol. 593,7857 (2021): 130-135.

- 43. Zhao F, Keating C, Ozorowski G, Shaabani N, Irene M, Francino-Urdaniz, et al Engineering SARS-CoV-2 neutralizing antibodies for increased potency and reduced viral escape. bioRxiv (2022): 2022.01.06.475303. Web. 21 April. 2022.doi: 10.1101/2022.01.06.475303.Preprint.
- 44. Chen Z, Zhang P, Matsuoka Y, Tsybovsky Y, West K, Santos C, et al. Extremely potent monoclonal antibodies neutralize Omicron and other SARS-CoV-2 variants. medRxiv : the preprint server for health sciences 2022.01.12.22269023. 13 Jan. 2022, doi:10.1101/2022.01.12.22269023. Preprint.
- 45. Wellner A, McMahon C, Gilman MSA, Clements JR, Clark S, Nguyen KM, et al. Rapid generation of potent antibodies by autonomous hypermutation in yeast. Nature chemical biology vol. 17,10 (2021): 1057-1064.
- 46. Rouet R, Mazigi O, Walker GJ, Langley DB, Sobti M, Schofield P, et al. Potent SARS-CoV-2 binding and neutralization through maturation of iconic SARS-CoV-1 antibodies. mAbs vol. 13,1 (2021): 1922134.
- 47. Alter, Galit, and M Anthony Moody. The humoral response to HIV-1: new insights, renewed focus. The Journal of infectious diseases vol. 202 Suppl 2, Suppl 2 (2010): S315-22.
- 48. Yamin R, Jones AT, Hoffmann HH, Schäfer A, Kao KS, Francis RL, et al. Fcengineered antibody therapeutics with improved anti-SARS-CoV-2 efficacy. Nature vol. 599,7885 (2021): 465-470.
- Li C, Zhan W, Yang Z, Tu C, Hu G, Zhang X, et al. Broad neutralization of SARS-CoV-2 variants by an inhalable bispecific single-domain antibody. Cell, S0092-8674(22)00269-0. 10 Mar. 2022
- 50. De Gasparo R, Pedotti M, Simonelli L, Nickl P, Muecksch F, Cassaniti I, et al. Bispecific IgG neutralizes SARS-CoV-2 variants and prevents escape in mice. Nature vol. 593,7859 (2021): 424-428.
- 51. Cho H, Gonzales-Wartz KK, Huang D, Yuan M, Peterson M, Liang J, et al. Bispecific antibodies targeting distinct regions of the spike protein potently neutralize SARS-CoV-2 variants of concern. Science translational medicine vol. 13,616 (2021): eabj5413.

毕业论文期间科研成果

毕业论文期间,参与课题组发表的论文,共两篇:

- Wang, X., Zhao, X., Song, J., Wu, J., Zhu, Y., Li, M., Cui, Y., Chen, Y., Yang, L., Liu, J., Zhu, H., Jiang, S., & Wang, P. (2022). Homologous or heterologous booster of inactivated vaccine reduces SARS-CoV-2 Omicron variant escape from neutralizing antibodies. Emerging microbes & infections, 11(1), 477–481. https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2030200
- Ai, J., Wang, X., He, X., Zhao, X., Zhang, Y., Jiang, Y., Li, M., Cui, Y., Chen, Y., Qiao, R., Li, L., Yang, L., Li, Y., Hu, Z., Zhang, W., & Wang, P. (2022). Antibody evasion of SARS-CoV-2 Omicron BA.1, BA.1.1, BA.2, and BA.3 sub-lineages. Cell host & microbe, S1931-3128(22)00243-8. Advance online publication. https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.05.001

并受邀为 Emerging Microbes & Infections 审稿两次:

- Emerging Microbes & Infections Invitation to Review Manuscript ID TEMI-2022-0167
- Emerging Microbes & Infections Invitation to re-review Manuscript ID TEMI-2022-0167.R1

致 谢

四年前,有幸跻身百年复旦的星空,永远会记得,2018年9月2日,妈妈 陪着我到学校报到的那一天,带着"计划的秋天已褪去童话的色彩,一个真实的 现在可以开垦一万个美丽的未来"憧憬,走进校园,开启新一段的奇遇。

三年前,自然科学试验班分流,选择了生命科学(Life Sciences),这是一个 说不清为什么但却有着迷人魅力的专业,深深地吸引我,教会了我热爱生活、敬 畏生命、尊重自然。

同样地,四年前,来到上海,上古有城,东海之畔,这是一座时尚潮流、文 化交融、包容开放、拼搏进取、承载梦想的国际都市,记录和见证着求学四年时 光里的点点滴滴。只是今年的上海,一个春季迟迟未至。

在这里,要说的感谢有太多太多,一言难尽。感谢家人、师长、朋友、同学 及所有支持、帮助过我的人,我会永远珍存这份情谊;感谢学校的培养,"博学 而笃志,切问而近思"的谆谆教诲、我将铭记于心。

黄河落天走东海,万里写入胸怀间,这句我喜欢的诗词是我对四年大学生活的概括。复旦是一所综合性的学府,文理社工医面面俱到;复旦也是一种情怀,一个有温度的集合。这四年时间,除了专业知识的积累,还在感兴趣领域的拓展, 在学科交叉、思想碰撞中不断开拓自身视野。

当然,这四年多少也是有些遗憾的:没能遇到那个 TA,并和她谈一场甜甜的恋爱,差了点运气;也因为疫情少了两个完整的春季学期,但好在我们见过疫情之前校园的样子,记忆也算完整。

未来,是充满不确定的,大时代的转折,零落尘泥;个人的命运、时代的命运、国家的命运紧密交织。但不管未来的样子是什么,创新都是永远的主题;敢于否定、敢于探索、敢于突破,投资于自己的能力,就是最确定性的未来。

以后的路上,既然选择了生命科学,便要尊重科学,同时心怀敬畏;这句话, 深有体会,并定当恪守:

Two things fill the mind with ever-increasing wonder and awe, the more often and the more intensely the mind of thought is drawn to them: the starry heavens above me and the moral law within me. ----Immanuel Kant 给四年时间里相识的挚友、恩师、那些有趣的"灵魂"们,离别之际,正如 从小经历的每一次毕业季的那样,道声珍重。

我们不说再见,因为定会再见。

祝好!



2022年5月24日星期二

复旦·南区