

分类号 _____

学号 201906S270

UDC _____

密级 公开

军事科学院

硕士学位论文

不同临床状态 COVID-19 患者免疫状况差异 研究及 SARS-CoV-2 N 蛋白单克隆抗体制备

Study on the difference of immunological characteristics of
COVID-19 patients with different clinical status and preparation
of monoclonal antibodies against SARS-CoV-2 N protein

作者姓名	<u>郭垚霖</u>
学科专业	<u>微生物学</u>
学位类型	<u>学术学位</u>
指导教师	<u>李林 研究员; 刘永健 助理研究员</u>
答辩主席	<u>貌盼勇 研究员</u>
学位授予单位	<u>军事科学院</u>
论文提交日期	<u>2022 年 6 月 14 日</u>

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科研成果。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：不同临床状态COVID-19患者免疫状况差异研究及 SARS-CoV-2 N蛋白单克隆结合抗体制备

学位论文作者签名：郭志霖 日期：2022年6月12日

学位论文版权使用授权书

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：不同临床状态 COVID-19 患者免疫状况差异研究及 SARS-CoV-2 N 蛋白单克隆结合抗体制备

学位论文作者签名：郭志霖 日期：2022年6月12日

作者指导教师签名：李林 刘永健 日期：2022年6月12日

目 录

摘 要	I
Abstract	V
前 言	1
第一章 不同临床状态 COVID-19 患者免疫状况差异研究	7
1.1 实验材料	7
1.1.1 实验样本	7
1.1.2 实验所用细胞和病毒	8
1.1.3 实验使用设备	8
1.1.4 实验主要耗材	9
1.1.5 实验主要试剂	9
1.1.6 引物和化合物合成	11
1.1.7 相关软件	11
1.2 实验方法	11
1.2.1 SARS-CoV-2 活病毒 TCID ₅₀ 检测	11
1.2.2 COVID-19 患者中和抗体滴度检测	12
1.2.3 IgG-S 抗体和 IgG-N 抗体定量检测	13
1.2.4 IgG-S 抗体和 IgG-N 抗体分型检测	14
1.2.5 BDG、LPS、iFABP、GP73 检测	14
1.2.6 细胞因子检测	16
1.2.7 COVID-19 患者血浆对变异株的中和能力检测	16
1.2.8 HERV-K (HML-2) 和干扰素诱导通路相关基因检测	17
1.3 实验结果	21
1.3.1 82 例新型冠状病毒肺炎患者的流行病学资料	21
1.3.2 普通型患者和重型患者外周血中和抗体水平	22
1.3.3 普通型患者和重型患者的 IgG-S 和 IgG-N 抗体水平	23
1.3.4 中和抗体滴度与 IgG-S 滴度的相关性分析	24
1.3.5 COVID-19 患者和 SARS-CoV-2 疫苗接种者抗体类型分析	25
1.3.6 COVID-19 患者真菌和细菌感染情况分析	28
1.3.7 COVID-19 患者细胞因子水平分析	29
1.3.8 SARS-CoV-2 既往感染者对变异株中和能力分析	31

1.3.9 COVID-19 患者 HERV-K (HML-2) 与 IFN 相关性分析	35
1.4 讨论	39
第二章 SARS-CoV-2 N 蛋白单克隆结合抗体制备	43
2.1 实验材料	43
2.1.1 实验样本	43
2.1.2 实验所用质粒、毒株、菌株及细胞	43
2.1.3 实验使用设备	43
2.1.4 实验主要耗材	44
2.1.5 实验主要试剂	45
2.1.6 引物和化合物合成	47
2.2 实验方法	48
2.2.1 滋养细胞的准备	48
2.2.2 患者 PBMC 的分离	48
2.2.3 EB 病毒感染	48
2.2.4 第一次亚克隆筛选	49
2.2.5 第二次亚克隆筛选	50
2.2.6 第三次亚克隆筛选	50
2.2.7 阳性永生化细胞 RNA 的提取	50
2.2.8 阳性永生化细胞 RNA 逆转录	51
2.2.9 抗体可变区的 PCR 扩增	53
2.2.10 抗体可变区纯化并测序鉴定	54
2.2.11 抗体可变区序列连接 T 载体	55
2.2.12 抗体表达载体构建	57
2.2.13 抗体真核表达	59
2.2.14 抗体纯化	60
2.2.15 抗体纯化检验	61
2.2.16 抗体亲和力检测	62
2.3 实验结果	62
2.3.1 EB 病毒永生化结果	62
2.3.2 亚克隆筛选获得分泌抗 N 蛋白抗体的永生化 B 细胞	63
2.3.3 抗体可变区 5'RACE 法扩增效率	63
2.3.4 抗体可变区测序和分析结果	64
2.3.5 抗体 N2E5 和抗体 N8C6 转染最佳收样时间评估	65
2.3.6 抗体 N2E5 和抗体 N8C6 纯化结果	66

2.3.7 抗体 N2E5 和抗体 N8C6 特异性鉴定	67
2.3.8 抗体 N2E5 和抗体 N8C6 亲和力分析	68
2.4 讨论	69
第三章 结论与展望	71
参考文献	73
附录	87
作者在学期间取得的学术成果	89
主要简历	90
致 谢	92

表 目 录

表 1.1 第一部分研究所使用实验设备	8
表 1.2 第一部分研究所使用实验耗材	9
表 1.3 实验试剂	9
表 1.4 培养基配置方法	11
表 1.5 去除 gDNA 反应体系	18
表 1.6 反转录反应体系	18
表 1.7 qRT-PCR 反应体系	18
表 1.8 qRT-PCR 反应程序	19
表 1.9 qRT-PCR 引物序列	19
表 1.10 二代测序样本 PCR 反应体系	20
表 1.11 二代测序样本 PCR 反应程序	21
表 1.12 82 例 COVID-19 住院患者信息	22
表 1.13 疫苗接种者和健康人基本信息	27
表 1.14 COVID-19 患者对 Wuhan 株和变异株中和能力的相关性	34
表 2.1 第二部分研究所使用实验设备	44
表 2.2 第二部分研究所使用实验耗材	45
表 2.3 第二部分研究所使用实验试剂	45
表 2.4 培养基配置方法	47
表 2.5 CpG 2006 序列	49
表 2.6 mix1 反应体系	52
表 2.7 mix2 反应体系	52
表 2.8 抗体可变区反转录反应体系	52
表 2.9 反转录引物序列	53
表 2.10 抗体可变区 PCR 反应体系	53
表 2.11 抗体可变区 PCR 反应程序	54
表 2.12 抗体可变区扩增引物序列	54
表 2.13 重组 T 载体 PCR 鉴定反应体系	56
表 2.14 重组 T 载体 PCR 鉴定反应	56
表 2.15 酶切位点引入 PCR 反应体系	57
表 2.16 酶切位点引入 PCR 反应程序	57
表 2.17 引入酶切位点的抗体可变区扩增引物	58
表 2.18 酶切反应体系	58

表 2.19 酶切反应程序	58
表 2.20 连接反应程序	59
表 2.21 转染质粒比	60
表 2.22 三次亚克隆筛选结果汇总	63
表 2.23 抗体家系	65

图 目 录

图 1.1 病毒滴定孔板设置图	12
图 1.2 正常细胞与病变细胞比较	13
图 1.3 病毒中和实验孔板设置图	13
图 1.4 中和抗体检测结果	23
图 1.5 IgG-S 和 IgG-N 抗体检测结果	24
图 1.6 中和抗体滴度与 IgG-S 的相关性分析	25
图 1.7 普通型和重型 COVID-19 患者抗体分型差异	26
图 1.8 COVID-19 患者和 SARS-CoV-2 疫苗接种者抗体分型差异	28
图 1.9 LPS、BDG、iFABP、GP73 检测结果	29
图 1.10 细胞因子浓度	30
图 1.11 野生毒株与假毒株检测血浆中和抗体滴度结果的相关性分析	31
图 1.12 感染 Wuhan 株 COVID-19 患者血浆对 8 种 SARS-CoV-2 变异株的中和能力 分析	32
图 1.13 普通型和重型 COVID-19 患者对变异株的中和水平	33
图 1.14 COVID-19 患者和 Vero E6 细胞中 HERV-K(HML-2) <i>gag</i> 、 <i>env</i> 、 <i>pol</i> 基因表 达情况	35
图 1.15 COVID-19 患者和 Vero E6 细胞中干扰素相关基因表达情况	36
图 1.16 高表达 HERV-K (HML-2) <i>gag</i> 、 <i>env</i> 、 <i>pol</i> 染色体分布图	37
图 1.17 不同样本间差异表达基因的 GO 功能分类和 KEGG 分析	39
图 1.18 SARS-CoV-2 变异株 RBD 突变位点示意图	41
图 2.1 EB 病毒感染 PBMC 细胞的病变图	63
图 2.2 抗体可变区序列扩增产物电泳鉴定图	64
图 2.3 抗体表达载体转染后 2~7 天细胞上清的 IgG 含量	66
图 2.4 纯化抗体 N2E5 和抗体 N8C6 SDS-PAGE 鉴定	67
图 2.5 抗体 N2E5 和抗体 N8C6 特异性鉴定	68
图 2.6 抗体与抗原结合动力学曲线	68

缩略语表

英文缩写	英文全称	中文全称
ADCC	Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity	抗体依赖性细胞毒性
ADCP	Antibody Dependent Phagocytosis	抗体依赖性细胞吞噬
ADE	Antibody Dependent Enhancement	抗体依赖性增强效应
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome	急性呼吸窘迫综合征
BDG	β -D-Glucan	(1-3)-D-葡聚糖
BLI	Biolayer Interferometry	生物膜层干涉技术
BP	Biological Process	生物学过程
CC	Cellular Component	细胞成分
CCL	C-C Motif Chemokine	C-C基序趋化因子
COVID-19	Corona Virus Disease 2019	新型冠状病毒肺炎
CPE	Cytopathic Effect	致细胞病变效应
CSA	Cyclosporin A	环孢霉素 A
CXCL	C-X-C Motif Chemokine	C-X-C基序趋化因子
DEGs	Differentially Expressed Genes	差异表达基因
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	酶联免疫吸附实验
EBV	Epstein-Barr virus	EB 病毒
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
GO	Gene Ontology	基因本体
GP73	Golgi protein-73	高尔基蛋白 73
HERV	Human Endogenous Retroviruses	人内源性逆转录病毒
HRP	Horseradish Peroxidase	辣根过氧化物酶
iFABP	Intestinal Fatty Acid-Binding Protein	肠型脂肪酸结合蛋白
IFN	Interferon	干扰素
IL	Interleukin	白介素
LPS	Lipopolysaccharide	脂多糖
MASP	Mannan-binding Lectin-associated Serine Proteases	甘露聚糖结合凝集素相关丝氨酸蛋白酶 2
MERS	Middle East Respiratory Syndrome	中东呼吸综合征

MERS-CoV	Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus	中东呼吸综合征冠状病毒
MF	Molecular Function	分子功能
min	Minute	分
N protein	Nucleocapsid Protein	核衣壳蛋白
NAbs	Neutralizing Antibodies	中和抗体
NGS	Next-generation Sequencing	第二代测序
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell	人外周血单核细胞
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链反应
PVDF	Poly (vinylidene fluoride)	聚偏氟乙烯
RBD	Receptor Binding Domain	受体结合域
RT-qPCR	Real-time Quantitative PCR	实时定量基因扩增检测系统
S protein	Spike Protein	刺突蛋白
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome	严重急性呼吸综合征
SARS-CoV	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus	严重急性呼吸综合征冠状病毒
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2	严重急性呼吸综合征冠状病毒2型
sec	Second	秒
SHM	Somatic Hypermutation	体细胞高频突变
SIgA	Secretory Immunoglobulin A	分泌型IgA
SUMO	Small Ubiquitin-like Modifier	泛素蛋白修饰分子
TCID ₅₀	50% Tissue Culture Infective Dose	半数组织感染量
TGF	Transforming Growth Factor	转化生长因子
TNF	Tumor Necrosis Factor	肿瘤坏死因子
VOCs	Variants of Concern	需要关注的变异株
VOIs	Variants of Interest	需要留意的变异株
VUMs	Variants under Monitoring	监测中的变异株
WB	Western Blot	蛋白免疫印迹法
WHO	World Health Organization	世界卫生组织

摘要

研究背景:

严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 型 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, SARS-CoV-2, 简称“新冠病毒”) 是新型冠状病毒肺炎 (Corona Virus Disease 2019, COVID-19, 简称“新冠肺炎”) 的病原体, 自 2019 年底被发现以来, 快速在全球传播, 截止到 2022 年 6 月, 已经感染了超过 5 亿人, 导致了 600 多万人死亡, 引发了严重的公共卫生问题。随着 SARS-CoV-2 病毒的快速播散, SARS-CoV-2 变异株不断涌现, 流行态势愈发严峻。

COVID-19 患者在感染后呈现出不同的疾病状态, 多数人表现为发热、咳嗽相关的轻度或中度症状, 少量人则发展为急性呼吸窘迫综合征、急性心脏损伤、多器官衰竭和继发性感染, 产生严重的不可逆损伤, 呈现出临床重症状态。加强 COVID-19 重症发生机制研究对于有效的减少重症发生至关重要, 也是疫情防控成功与否的关键。研究显示, COVID-19 重症患者会出现严重的细胞因子风暴, 说明重症发生与患者免疫状态密切相关。深入分析 COVID-19 患者体内的免疫状态, 特别是重症患者的体内免疫状态, 对于阐明 COVID-19 患者重症发生机制、防止重症发生以及减少 SARS-CoV-2 流行有重要意义。

研究目的:

收集不同临床状态的 COVID-19 患者信息及相关样本, 比较普通型和重型患者体内抗体、细胞因子分布差异, 确定不同患者体内抗体分型差异, 阐明不同患者体内抗体对不同 SARS-CoV-2 变异株的中和状况, 分析 COVID-19 患者体内抗体和细胞因子改变的内在机制, 并利用 B 细胞永生技术制备 SARS-CoV-2 N 蛋白单克隆结合抗体, 为 COVID-19 的诊断、治疗、防控等提供支撑。

研究方法:

(1) 样本收集: 根据我国《新型冠状病毒肺炎诊疗方案 (试行第八版)》招募不同临床分型的 COVID-19 患者、健康人对照和新冠病毒疫苗接种者, 签署知情同意书后由专业访谈人员调查流行病学信息, 并收集外周血样本。

(2) 抗体滴度检测和分型鉴定: 使用野生型 SARS-CoV-2 活病毒 (BetaCoV/Beijing/AMMS01/2020) 和 9 种假病毒, 利用有限稀释法观察细胞病变效应或检测荧光值获得研究对象血浆抗体的中和滴度, 采用抗 N 蛋白和 S 蛋白 IgG 抗体 ELISA 定量检测试剂盒检测不同研究对象外周血中结合抗体水平, 利用抗 IgA、IgM、IgG1~4、IgD、IgE 的二抗检测 COVID-19 患者和疫苗接种者体内抗 N 蛋白和 S 蛋白抗体分型。

(3) 细菌、真菌感染检测：通过 ELISA 检测 COVID-19 患者和健康人样本中 BDG、LPS、iFABP、GP73 含量，从而系统性分析 COVID-19 患者的免疫特征。

(4) 细胞因子检测：使用 Ella-Simple ELISA 系统和 Luminex 系统检测 COVID-19 患者和健康人样本中 IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-18、IL-33、CCL2、CCL3、CCL4、CXCL1、CXCL2、CXCL6、CXCL9、CXCL10、IFN- γ 、TNF- α 的含量。

(5) COVID-19 患者中 HERV-K 与 IFN 的相关性：采用 qPCR 方法检测 Vero E6 细胞感染 SARS-CoV-2 后 HERV-K *gag*、*env*、*pol* 基因和 IFN 相关基因 *IFNB1*、*ISG15*、*IFIT1* 的转录水平变化，并在 COVID-19 患者的外周血细胞中进行验证，利用二代测序技术和 GO 分析明确 SARS-CoV-2 感染后 HERV-K 基因转录水平。

(6) B 细胞永生技术抗体制备：从 COVID-19 患者外周血中分离获得 PBMC，用 EB 病毒感染 PBMC 使 B 细胞永生，经过多轮克隆化和抗体结合特异性分析鉴定 SARS-CoV-2 N 蛋白和 S 蛋白特异性结合抗体，提取该细胞株 RNA 并反转录后扩增抗体轻重链可变区序列，构建抗体表达载体，转染 293F 细胞，收集上清并用 protein A/G 柱纯化抗体，进行抗体特异性和亲和力分析。

研究结果：

(1) 共招募 82 例 COVID-19 患者、29 例疫苗接种者和 32 例健康对照。根据临床症状，患者包括轻型患者 1 例、普通型患者 49 例、重型患者 30 例和 2 例危重型患者，其中普通型患者和重型患者的性别构成、平均年龄、疾病史占比没有统计学差异。

(2) 使用野生型 SARS-CoV-2 病毒检测的中和抗体结果显示，重型患者体内中和抗体滴度、血浆 IgG-S 和 IgG-N 抗体浓度显著高于普通型患者 ($P<0.05$)，COVID-19 普通型患者 IgG-N 含量为 IgG-S 的 13.30 倍，重型患者 IgG-N 抗体含量为 IgG-S 抗体的 16.72 倍 ($P<0.05$)。普通型和重型 COVID-19 患者血浆 IgG-S 抗体水平与中和抗体滴度均呈正相关 ($P<0.05$)。

(3) 抗体分型结果表明，普通型和重型 COVID-19 患者抗 N 蛋白抗体阳性率为 IgA>IgM>IgG，抗 S 蛋白抗体阳性率为 IgG>IgA>IgM。COVID-19 患者的 IgA-S、IgA-N、IgM-N 抗体全为阳性，只有 2 例重型患者的 IgM-S 为阴性，所有 COVID-19 患者血浆中没有检测到特异性 IgE 阳性抗体。COVID-19 患者 IgG3-S 抗体阳性率高于 IgG3-N ($P<0.05$)，IgG4-N 抗体阳性率高于 IgG4-S 抗体 ($P<0.05$)。在 COVID-19 患者中 IgG4-N 抗体阳性率为 67.01%，而 SARS-CoV-2 疫苗接种者的 IgG4-N 抗体全为阴性。

(4) Mann-Whitney 检验结果显示，普通型和重型 COVID-19 患者的 iFABP 低于健康人 ($P<0.05$)，而 BDG、LSP、GP73 高于健康对照组 ($P<0.05$)，即

COVID-19 患者有细菌、真菌感染无肠道菌群异位。

(5) Mann-Whitney 检验结果显示, 普通型和重型 COVID-19 患者的 IL-1 β 、IL-2、CXCL1、CXCL6 低于健康人 ($P<0.05$), 而 IL-4、IL-6、CCL2、CCL4、IFN- γ 、TNF- α 含量均高于健康对照组 ($P<0.05$), 其中重型患者 IL-1 β 、IL-6、CXCL9 水平明显高于普通型患者 ($P<0.05$)。

(6) 使用 SARS-CoV-2 活毒和 Wuhan 假病毒分别检测 COVID-19 患者的血浆中和抗体滴度, 发现两者检测结果相关性高 ($r=0.9716$, $P<0.05$)。感染 Wuhan 株的 COVID-19 患者血浆对 Beta、Gamma、Kappa、Delta、Lambda、Omicron 假病毒的中和能力低于 Wuhan 毒株, 分别下降 5.30 倍、3.38 倍、3.11 倍、2.31 倍、4.02 倍、32.32 倍 ($P<0.05$)。

(7) 经 Mann-Whitney 检验, HERV-K *gag*、*env*、*pol* 三个基因和 IFN 相关基因 *IFNB1*、*ISG15*、*IFIT1* 在 COVID-19 患者和感染 SARS-CoV-2 的 Vero E6 细胞中表达增加 ($P<0.05$), GO 分析表明 HERV-K 与 IFN 的分泌有关。

(8) 获得 12 个来自于 COVID-19 患者 B 细胞的永生化细胞系, 扩增测序获得 2 对抗 SARS-CoV-2 N 蛋白的抗体轻重链可变区序列, 体外高效表达、纯化了抗 SARS-CoV-2 N 蛋白抗体, 2 个抗体动力学常数 K_D 分别为 1.42×10^{-8} M 和 1.31×10^{-8} M。

研究结论:

(1) COVID-19 患者感染后血浆中抗体和细胞因子水平明显变化, 且重型患者中免疫因子失衡现象更为常见, 表明免疫反应失衡可能是重症患者的内在机制, 深入分析 COVID-19 患者的免疫特征对于防止重症发生、减少 SARS-CoV-2 流行具有重要意义。

(2) 疫苗接种者和 SARS-CoV-2 感染者体内抗体分型存在明显差异, 提示疫苗免疫和天然感染免疫诱导机制存在差异, SARS-CoV-2 特异性抗体分型检测有可能用于新近感染及疫苗接种者甄别。

(3) 感染武汉株的 COVID-19 患者血浆对 8 种全球流行的 SARS-CoV-2 变异株的中和力降低, 且新出现的突变株免疫逃逸能力更强, 提示抗 SARS-CoV-2 疫苗设计和研发应进一步增加针对性。

(4) COVID-19 患者中高转录水平的 HERV-K 基因可能参与了激活 IFN 的 cGAS-STING 通路, 这为进一步研究 SARS-CoV-2 病毒感染过程中的天然免疫产生机制研究提供了切入点。

(5) 成功制备了抗 SARS-CoV-2 N 蛋白的特异性人源化单克隆抗体, 说明通过永生化患者体内 B 细胞可以实现抗体的快速制备, 该技术的应用为未来可能出现的新发病原体防控提供了技术支撑。

关键词：新型冠状病毒肺炎；中和抗体；细胞因子；抗体制备

Abstract

Background:

Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 (SARS-CoV-2) is the pathogen of Corona Virus Disease 2019 (COVID-19). Since it was discovered at the end of 2019, it has spread rapidly around the world. By June 2022, it had infected more than 500 million people and caused more than 6 million deaths. SARS-CoV-2 caused serious public health problems. With the rapid spread of SARS-CoV-2 variants, the epidemiological situation has become increasingly serious.

COVID-19 patients showed different disease states after infection. Most COVID-19 patients showed mild or moderate symptoms such as fever and cough, while a small number of patients developed acute respiratory distress syndrome, acute heart injury, multiple organ failure, and secondary infection, resulting in serious irreversible injury. Strengthening the research on the mechanism of severe illness of COVID-19 is very important to effectively reduce the occurrence of severe illness, and it is also the key to the success of epidemic prevention and control. Studies have shown that severe cytokine storms will occur in severe COVID-19 patients, indicating that the occurrence of severe illness is closely related to the immune status of patients. In-depth analysis of the immune status of COVID-19 patients in vivo, especially of severe COVID-19 patients, is important for elucidating the mechanism of serious illness in COVID-19 patients, preventing the occurrence of serious illness, and reducing the SARS-CoV-2 epidemic.

Objective:

In this study, moderate and severe COVID-19 patients were enrolled to compare the distribution of antibodies and cytokines, determine the difference of antibody typing in different COVID-19 patients, clarify the neutralization of antibodies to different SARS-CoV-2 variants in different COVID-19 patients, and analyze the internal mechanism of the changes of antibodies and cytokines in COVID-19 patients. The monoclonal binding antibody against SARS-CoV-2 N protein was prepared by B cell immortalization technique to provide support for the diagnosis, treatment, prevention, and control of COVID-19.

Methods:

(1) Sample collection. According to the Chinese Government Diagnosis and Treatment Guideline (8th edition), different clinical types of COVID-19 patients, healthy controls and vaccine vaccinators were recruited. After signing the informed consent forms, professional interviewers investigated the epidemiology information and collected peripheral blood samples.

(2) Antibody titer detection and typing. Using wild type SARS-CoV-2 live virus (BetaCoV/Beijing/AMMS01/2020) and 9 pseudoviruses, the neutralization titer of plasma antibody was obtained by limited dilution method to observe cytopathic effect or

detect fluorescence value. The level of binding antibody in peripheral blood of different subjects was detected by anti-N protein and anti-S protein IgG antibody ELISA quantitative detection kit. The second antibodies against IgA, IgM, IgG1~4, IgD, and IgE were used to detect the typing of anti-N protein and anti-S protein antibodies in patients with COVID-19 and vaccine recipients.

(3) Detection of bacterial and fungal infection. The contents of BDG, LPS, iFABP, GP73 in COVID-19 patients and healthy people were detected by ELISA, to systematically analyze the immune characteristics of COVID-19 patients.

(4) Detection of cytokine. The contents of IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, IL-33, CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1, CXCL2, CXCL6, CXCL9, CXCL10, IFN- γ and TNF- α in COVID-19 patients and healthy people were detected by Ella-Simple ELISA system and Luminex system.

(5) Correlation between HERV-K and IFN in COVID-19 patients. The transcriptional levels of HERV-K *gag*, *env*, *pol* genes and IFN related genes *IFNB1*, *ISG15*, *IFIT1* in VeroE6 cells infected with SARS-CoV-2 were detected by qPCR method and verified in peripheral blood cells of COVID-19 patients. The transcriptional level of HERV-K gene after SARS-CoV-2 infection was confirmed by next-generation sequencing and GO analysis.

(6) Antibody preparation of B cell immortalization technique. PBMCs were isolated from peripheral blood of COVID-19 patients, and B cells were immortalized by EBV infection. The specific binding antibodies to SARS-CoV-2 N protein and S protein were identified by multiple rounds of cloning and antibody binding specificity analysis. The RNA of the cell line was extracted, and reverse transcribed to amplify the light and heavy chain variable region sequence of the antibody. The antibody expression vector was constructed and transfected into 293F cells. The supernatant was collected and the antibody was purified by protein A/G column, and the specificity and affinity of the antibody were analyzed.

Results:

(1) A total of 82 COVID-19 patients, 29 vaccinated populations, and 32 healthy controls were recruited. According to the clinical symptoms, the COVID-19 patients included 1 mild COVID-19 patient, 49 moderate COVID-19 patients, 30 severe COVID-19 patients, and 2 critical COVID-19 patients. There was no statistical difference in gender composition, average age, and disease history between moderate COVID-19 patients and severe COVID-19 patients.

(2) The results of neutralization antibody detected by wild type SARS-CoV-2 showed that the titer of neutralization antibody and the concentration of plasma IgG-S and IgG-N antibodies in severe patients were significantly higher than those in moderate patients ($P < 0.05$). The content of IgG-N in moderate COVID-19 patients was 13.30 times higher than that of IgG-S antibody, and the content of IgG-N antibody in severe

COVID-19 patients was 16.72 times higher than that of IgG-S antibody ($P < 0.05$). The level of plasma IgG-S antibody was positively correlated with the titer of neutralizing antibody in both moderate and severe COVID-19 patients ($P < 0.05$).

(3) The results of antibody typing showed that the positive rate of anti-N protein antibody in moderate and severe COVID-19 patients was IgA > IgM > IgG, and that of anti-S protein antibody was IgG > IgA > IgM. IgA-S, IgA-N, and IgM-N antibodies were all positive in COVID-19 patients, but IgM-S was negative in 2 severe patients. No specific IgE positive antibodies were detected in plasma of all COVID-19 patients. The positive rate of IgG3-S antibody in COVID-19 patients was higher than that of IgG3-N, and the positive rate of IgG4-N antibody was higher than that of IgG4-S antibody ($P < 0.05$). The positive rate of IgG4-N antibody in COVID-19 patients was 67.01%, while the IgG4-N antibodies of SARS-CoV-2 vaccinated patients were all negative.

(4) Mann-Whitney test showed that the iFABP of moderate and severe COVID-19 patients was lower than that of healthy subjects, while the levels of BDG, LSP, and GP73 were higher than those of healthy controls ($P < 0.05$). So COVID-19 patients had bacterial and fungal infections without intestinal flora ectopic.

(5) Mann-Whitney test showed that the levels of IL-1 β , IL-2, CXCL1, and CXCL6 in moderate and severe COVID-19 patients were lower than those in healthy controls, while the contents of IL-4, IL-6, CCL2, CCL4, IFN- γ and TNF- α were higher than those in healthy controls ($P < 0.05$). The levels of IL-1 β , IL-6, and CXCL9 in severe COVID-19 patients were significantly higher than those in moderate COVID-19 patients ($P < 0.05$).

(6) The plasma neutralizing antibody titers of COVID-19 patients were detected by SARS-CoV-2 live virus and Wuhan pseudovirus, respectively, and the results showed that there was a high correlation between them ($r = 0.9716$, $P < 0.05$). The plasma neutralization ability of Wuhan SARS-CoV-2 infected patients to Beta, Gamma, Kappa, Delta, Lambda, and Omicron pseudoviruses was lower than that of Wuhan strains, which respectively decreased by 5.30, 3.38, 3.11, 2.31, 4.02, 32.32 times ($P < 0.05$).

(7) By Mann-Whitney test, the expression of HERV-K *gag*, *env*, *pol* genes and IFN related genes *IFNB1*, *ISG15*, *IFIT1* increased in COVID-19 patients and Vero E6 cells infected with SARS-CoV-2 ($P < 0.05$). GO analysis showed that HERV-K was related to the secretion of IFN.

(8) 12 immortalized cell lines from B cells of COVID-19 patients were obtained. The light and heavy chain variable region sequence of 2 antibodies against SARS-CoV-2 N protein was obtained by amplification and sequencing. Anti-SARS-CoV-2 N protein antibody was efficiently expressed and purified in vitro. The kinetic constants of the 2 pairs of antibody K_D respectively were 1.42×10^{-8} M and 1.31×10^{-8} M.

Conclusion:

(1) The levels of antibodies and cytokines in plasma of COVID-19 patients changed

significantly after infection, and the imbalance of immune factors was more common in severe patients, indicating that the imbalance of immune response may be the internal mechanism of severe patients. In-depth analysis of the immune characteristics of COVID-19 patients is important for preventing severe diseases and reducing SARS-CoV-2 epidemic.

(2) There was a significant difference in antibody typing between vaccinated patients and COVID-19 patients, suggesting that there is a difference in the mechanism of immune induction between vaccine immunization and innate infection. SARS-CoV-2 specific antibody typing may be used to identify newly infected and vaccinated people.

(3) Plasma from COVID-19 patients infected with the Wuhan strain showed reduced neutralization of 8 globally prevalent SARS-CoV-2 variants, and the newly emerged variants had stronger immune escape ability, suggesting that anti-SARS-CoV-2 vaccine design and development should further increase targeting.

(4) The high transcriptional level of the HERV-K gene in COVID-19 patients may be involved in the activation of IFN by the cGAS-STING pathway, which provides a starting point for further study of the mechanism of innate immunity in the process of SARS-CoV-2 virus infection.

(5) The specific humanized monoclonal antibody against SARS-CoV-2 N protein was successfully prepared, indicating that the antibody can be rapidly prepared by immortalized B cells in patients. The application of this technique provides technical support for the prevention and control of possible emerging pathogens in the future.

Key words: SARS-CoV-2, Neutralizing antibody, Cytokines, Antibody preparation

前言

新型冠状病毒肺炎（Corona Virus Disease 2019, COVID-19, 简称“新冠肺炎”）是感染严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 型（Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, SARS-CoV-2, 简称“新冠病毒”）后引起的严重呼吸道疾病，患者多表现为发热、咳嗽相关的轻度或中度症状，而重度患者可发展为急性呼吸窘迫综合征、急性心脏损伤、多器官衰竭和继发性感染^[1-4]。COVID-19 疫情自 2019 年底爆发以来，全球已有超过 5 亿人感染，导致 600 多万人死亡，在全球引发了严重的公共卫生问题。

根据我国卫生健康委员会办公厅发布的《新型冠状病毒肺炎诊疗方案（试行第八版 修订版）》，COVID-19 患者可根据临床症状分为轻型、普通型、重型、危重型四类。轻型 COVID-19 患者的临床症状轻微，影像学未见肺炎表现；普通型 COVID-19 患者具有发热、上呼吸道感染症状等，影像学可见肺炎表现；重型 COVID-19 患者会出现呼吸频率 ≥ 30 次/分，或静息时吸气的指氧饱和度 $\leq 93\%$ ，或动脉血氧分压（PaO₂）/氧浓度（FiO₂） ≤ 300 mmHg（1 mmHg=0.133 kPa），或肺部影像学显示 24~48 小时内病灶明显进展大于 50% 其中之一症状；危重型 COVID-19 患者会出现呼吸衰竭且需要机械通气，或出现休克，或合并其他器官功能衰竭需 ICU 监护治疗其中之一症状。研究显示，约 14% 的患者会出现重型症状，我国重症患者病死率为 1.4%~4.5%，而且重症患者可能会发生不可逆转的肺部纤维化，甚至造成生殖系统和造血系统的潜在损害^[5-8]。研究 COVID-19 重症发生的内在机制已经成为减少重症发生进而实现新冠肺炎有效防控的关键。

一、SARS-CoV-2 基因组结构和蛋白功能

SARS-CoV-2 属于冠状病毒科正冠状病毒亚科 β 属 Sarbecovirus 亚属，与严重急性呼吸综合征冠状病毒（Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus, SARS-CoV）、中东呼吸综合征冠状病毒（Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus, MERS-CoV）属于同属的不同亚属^[9]。与其他 β 冠状病毒类似，SARS-CoV-2 单链核糖核酸基因组大小约为 29.9 kb，由 11 个基因组成，基因组按 5'-复制酶(orf 1/ab)-结构蛋白{(S)-(E)(M)-(N)}-3' 的顺序排列^[10,11]。

1. 刺突蛋白（Spike, S）

包膜锚定的 S 蛋白能介导病毒和宿主结合，由胞外结构区、单跨膜锚定区、胞内区三个部分组成^[12]。胞外结构区由 S1 和 S2 两个亚基组成，S1 亚基与宿主细胞表面受体结合，S2 亚基介导病毒膜和宿主膜融合，S1 和 S2 交界处的碱性延伸结构环易被水解，从而激活 S 蛋白融合^[11,13,14]。S1 包含 N-末端结构域（S1-

NTD)、C-末端结构域(S1-CTD)和受体结合域(Receptor Binding Domain, RBD),其中RBD结构域能够识别宿主受体,可以独立发挥作用^[15,16]。研究显示,RBD结构域能够诱导宿主发生免疫应答反应,因此是抗SARS-CoV-2亚单位疫苗研发的重要抗原表位^[17]。

2. 包膜蛋白(envelope, E)和膜蛋白(membrane, M)

E蛋白和M蛋白共同参与了SARS-CoV-2病毒组装及包膜形成、出芽过程^[18,19]。E蛋白由76~109个氨基酸组成,包含5个结构相同的亚基,每个亚基的N端和C端为亲水区,中间部分的7个 α -螺旋和8个环是疏水跨膜区,可以形成离子导电孔,调整离子通道活性可参与致病过程,引起宿主发病^[1,20]。SARS-CoV-2 M蛋白由222个氨基酸组成,其N端位于病毒外表面,能与S蛋白结合参与病毒组装过程,其C端位于病毒内表面,能与N蛋白结合维持结构稳定、参与病毒侵染和释放过程^[21,22]。研究表明,M蛋白是宿主先天免疫反应的阴性调节因子,能够减弱宿主的抗病毒反应^[23]。

3. 核衣壳蛋白(Nucleocapsid, N)

N蛋白是包裹病毒基因组的衣壳蛋白,与S蛋白相比,不易发生变异。SARS-CoV-2和SARS-CoV的N蛋白相似性高达90%,因此两者的抗N蛋白抗体常出现交叉反应^[24-26]。SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV-2的N蛋白能结合补体活化凝集素途径中的关键丝氨酸蛋白酶MASP-2,导致补体异常激活,这在COVID-19患者中加重了炎性肺损伤^[27]。

二、COVID-19 患者的免疫特征

针对SARS和MERS的研究显示,免疫反应在机体抵御冠状病毒感染方面具有重要作用,在COVID-19患者中体液免疫和细胞免疫都与患者状态密切相关^[28-32],深入这些免疫反应发生和变化过程有助于确定疾病进展内在机制,为COVID-19疫情防控和临床治疗提供思路。

1. COVID-19 患者抗体水平

针对COVID-19患者体内结合抗体的研究显示,患者通常会在症状出现后的1~2周内产生针对SARS-CoV-2 S蛋白或N蛋白的特异性抗体,并在病毒清除后5个月内依然保持较高稳定水平^[33-42]。无症状感染者的体液免疫反应水平较低,体内具有抗病毒作用的IgG抗体滴度很低,这可能是其出院时间显著长于有症状感染者的原因^[43]。

中和抗体(Neutralizing Antibodies, NAbs)可以与病毒颗粒结合,阻止它们进入宿主细胞,为感染患者提供免疫屏障。因此,中和抗体常作为抗体药用于阻断病毒感染,在治疗COVID-19患者时中和抗体也表现出较好的治疗效果^[44-46]。研究显示,SARSCoV-2感染者通过天然免疫产生的中和抗体可维持数月,较高的

Nabs、IgG 和 IgM 抗体滴度与较差的临床分型独立相关，即病情越严重的患者抗体水平越高，这可能是患者过度免疫应答的结果^[47-54]。深入了解 COVID-19 患者抗体水平，尤其是特异性的中和抗体水平，对挖掘机体抗病毒机制、改进治疗方案、增加疫情防控具有重要意义。

2. COVID-19 患者细胞因子

COVID-19 患者体内免疫细胞有时能够分泌大量促炎细胞因子，导致机体产生过度免疫反应，诱发细胞因子风暴（Cytokine Storm）。在 COVID-19 患者中，细胞因子风暴是由轻症向重症、危重症转换的一个重要标志，也是造成重症和危重症患者死亡的原因之一^[55,56]。

在宿主的抗病毒过程中，不同细胞因子发挥着不同的免疫功能^[57-60]。IL-2 可刺激自然杀伤细胞增殖，分泌多种细胞因子，增强细胞毒作用^[61,62]。IL-4 能特异性地诱导 Th2 细胞和活化的 B 细胞和 T 细胞增殖^[63-66]。IL-10 可确保宿主免受病原体和微生物过度兴奋反应的影响^[67-69]。IL-6 作为高诱导性促炎细胞因子，可诱导 IL-8 和 MCP-1 的分泌，在炎症早期增加患者血管的通透性^[70-75]。研究表明 COVID-19 患者中 IL-2、IL-4、IL-6、IL-10 均异常激活，且 IL-6 水平与疾病严重程度相关^[76]。IL-1 β 和 IL-18 被炎症小体 NLRP3 切割后激活，使 COVID-19 患者出现强烈炎症反应^[76]。趋化因子能诱导免疫细胞和细胞因子迁移至感染部位，临床上发现 CXCL10 能在 COVID-19 患者急性呼吸窘迫综合征（Acute respiratory distress syndrome, ARDS）发生时驱动更长时间的机械通气^[77-79]。TNF- α 和 IFN- γ 能参与介导炎症细胞死亡的信号通路，限制 COVID-19 患者的组织损伤^[80]。因此，确定 COVID-19 患者疾病进展中代表性的细胞因子，或许可以解释 ARDS 产生的内在机制，为疾病的防治和炎症监控治疗提供基础。

三、SARS-CoV-2 变异株的免疫逃逸能力

SARS-CoV-2 作为单股正链 RNA 病毒，因缺少 DNA 病毒的校正过程在人传人时基因组易发生突变，但少数突变能够改变毒株的传播和致病能力^[81,82]。WHO 根据变异株对全球公共卫生构成的威胁的程度将其分为三种：需要留意的变异株（Variants of Interest, VOIs）、需要关注的变异株（Variants of Concern, VOCs）、监测中的变异株（Variants under Monitoring, VUMs）。其中 VOCs 是引起广泛的流行的突变株。截止 2022 年 2 月 3 日，WHO 发布的 VOCs 包括 Alpha（B.1.1.7）、Beta（B.1.351）、Gamma（P.1）、Delta（B.1.617.2）、Omicron（B.1.1.529），VOIs 包括 Lambda（C.37）、Mu（B.1.621），VUMs 包括 B.1.1.318、C.1.2、B.1.640。

SARS-CoV-2 变异株的出现使毒株的免疫逃逸能力增加，尤其是在 S 蛋白编码区出现的突变位点增加了变异株的致病性或传播性。早期出现的 D614G 变异株

在 S 蛋白 CTD2 结构域发生了 1 个氨基酸改变, 导致了该毒株传染性和稳定性显著提升, 在后续出现的多种变异株中都保留了 D614G 突变位点 [83-86]。Alpha、Beta、Delta 变异株在 RBD 结构域分别出现 1、3、2 个突变位点, 这些位点能够提高 S 蛋白与 ACE2 受体的结合力, 增加合胞体形成, 提高变异株增殖能力 [87,88]。Kappa 和 Lambda 变异株在 RBD 结构域上出现的 2 个突变位点, 能使病毒逃避部分单克隆抗体、恢复期患者血清、疫苗免疫者血清的中和 [89,90]。Omicron 变异株在 RBD 结构域上出现了 15 个突变位点, 明显提高了新毒株的传播性, 显著增强了毒株的免疫逃逸的能力 [91-97]。这些变异株的不断出现, 不仅影响了前期研发的单克隆抗体和疫苗的保护效能, 也增加了既往感染者再次感染变异株的风险, 使得自然免疫和疫苗免疫无法完全达到疫情防控目标 [98-102]。

四、单克隆抗体制备技术进展

单克隆抗体是由单个 B 细胞受到一种抗原刺激产生的高度均一的抗体, 能与靶蛋白特异性结合, 抗体效价高, 极少出现交叉反应。人单克隆抗体具有免疫原性低、半衰期长等优点, 已成为疾病防控、诊断、治疗中不可或缺的生物制剂。

1. 杂交瘤单克隆抗体技术

1975 年, 杂交瘤技术的出现实现了从多克隆抗体技术转向单克隆抗体技术的新里程 [103]。杂交瘤单克隆抗体技术是通过融合免疫动物的 B 淋巴细胞与骨髓瘤细胞, 形成分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞, 经过选择性培养、克隆化筛选、扩大培养、纯化获得特异性单克隆抗体。杂交瘤单克隆抗体技术操作简便、成本低, 但产生的抗体只能是鼠源抗体, 鼠源抗体半衰期短、补体效应的激活不完全, 因此会使人产生严重过敏反应而不被临床治疗使用 [104,105]。

2. 抗体库技术

抗体库技术是通过将全套抗体轻重链可变区基因重组到原核表达载体上, 经过表达后利用不同抗原进行筛选, 获得特异性抗体。抗体库技术包含噬菌体展示技术、酵母细胞表面展示技术、核糖体展示技术、细胞内组合抗体展示技术等, 其中噬菌体展示技术的应用最广泛 [106-111]。

1985 年噬菌体展示技术首次被提出, 次年 Huse 等基于 λ 噬菌体构建了鼠源 Fab 抗体库, 1990 年 Mccafferty 利用噬菌体展示技术建立了第一个 scFv 抗体库 [112-115]。噬菌体展示技术是将外源基因插入到噬菌体外壳蛋白上, 形成融合蛋白, 随子代噬菌体的重新组装呈现于噬菌体表面, 再通过筛选、洗脱、富集获得噬菌体表面特异的多肽。噬菌体展示技术可表达特异性强、亲和力高的单克隆抗体, 但该技术操作复杂、制备周期长、不能获得人源化抗体。

3. 转基因小鼠技术

通过转基因小鼠技术生产人源化抗体的设想在 1985 年被提出, 在 1989 年通过转基因小鼠技术首次生产了人源化 IgM 抗体, 证实了转基因小鼠技术生产人源化抗体的可行性^[116-118]。转基因小鼠技术通过将人源抗体基因转入无内源抗体基因的小鼠体内, 使用抗原免疫获得特异性抗体的表达。转基因小鼠技术获得的抗体亲和性、稳定性、可溶性较好, 但该技术存在鼠源抗体干扰、抗原免疫困难等缺点。

4. 单个 B 细胞抗体制备技术

单个 B 细胞抗体制备技术是通过鉴定和分离单个 B 细胞、扩增和克隆抗体基因、表达和鉴定等步骤获得特异性抗体, 是近几年兴起的新技术。单个 B 淋巴细胞抗体制备技术利用全人源的单个 B 细胞进行扩增, 保留了轻重链可变区的天然配对, 具有基因多样性好、效率高、全人源、所需细胞量少等优势, 但仍因人源供体需求量大、目标抗原制备困难、高通量 PCR 抗体基因扩增技术不完善等方面的技术限制, 单个 B 细胞抗体制备技术还需进一步完善^[119,120]。

5. 人类 B 细胞永生生化技术

人类 B 细胞永生生化技术主要有杂交瘤技术、EB 病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) 转化、慢病毒介导的遗传修饰、CD40L 联合多种细胞因子的体外诱导等, 各方法可独立或并行使用。EB 病毒转化人类 B 细胞永生生化是最常用的方法, 其原理是利用 EB 病毒识别 B 细胞的 CD21 受体进入 B 细胞, 通过 EB 病毒潜伏基因表达产物改变 B 细胞生命周期, 形成永生生化 B 细胞^[121,122]。对永生化的记忆 B 细胞进行亚克隆筛选, 扩增抗体轻重链可变区序列, 构建表达载体, 再进行表达鉴定, 能获得人源化的特异性单克隆抗体。EB 病毒使 B 细胞永生生化抗体制备技术具有效率高、周期短、抗体全人源等优点, 但由于影响 EB 病毒永生生化 B 细胞的因素较多, 且永生化的 B 细胞生长状况较差, 目前没有得到广泛应用^[123-129]

五、本研究的主要内容和目的

本研究以感染 SARS-CoV-2 Wuhan 株的普通型和重型患者为研究对象, 系统比较不同 COVID-19 患者外周血中抗体水平和细胞因子分布差异, 阐明不同患者外周血浆对 SARS-CoV-2 变异株的中和状况, 分析不同 COVID-19 患者外周血中免疫因子分布差异的内在机制, 利用 B 细胞永生生化技术进行病毒抗体制备, 为 COVID-19 的防控提供理论与技术支撑。

1. 不同临床状态 COVID-19 患者免疫状况差异研究

以普通型和重型 COVID-19 患者、疫苗接种者为研究对象, 收集其人口统计学信息, 获得其外周血, 检测外周血内中和抗体、IgG-S 抗体、IgG-S 抗体、细胞因子水平, 分析 COVID-19 患者和疫苗接种者体内抗 S 蛋白抗体和抗 N 蛋白抗体分型差异。阐明不同临床状态的 COVID-19 患者的免疫特征, 探索 COVID-19 患

者和疫苗接种者体内抗体分型差异，确定与 COVID-19 患者不同临床状态相关的细胞因子，为 COVID-19 患者临床治疗和防控提供新思路。

2. SARS-CoV-2 既往感染者血浆抗体对不同变异株的中和活性研究

使用 VSV 假病毒系统检测同一批 Wuhan 株感染者血浆对 8 种 SARS-CoV-2 关键变异株的中和能力，分析不同临床状态的 COVID-19 患者对变异株中和活性的差异，评估每种变异株的免疫逃逸能力，为疫情防控政策调整提供信息。

3. COVID-19 患者外周血细胞中 HERV-K (HML-2) 转录水平研究

研究表明，皮肤中高表达的 ERVs 基因能够反转录形成的 cDNA，从而激活 cGAS-STING 通路，诱导 IFN-I 的生成，介导机体天然免疫应答^[130]。本研究前期发现 COVID-19 患者外周血中 IFN- γ 升高，我们进一步阐明了不同患者外周血中 HERV-K 基因转录水平，分析了其与 cGAS-STING 通路中部分蛋白基因转录水平的相关性，探索了 HERV-K 转录水平与 IFN 产生的可能关系，为进一步研究 SARS-CoV-2 病毒感染过程中的天然免疫产生机制研究提供了切入点。

4. SARS-CoV-2 N 蛋白特异性单克隆抗体制备

基于获得的 COVID-19 患者 PBMC，利用 EB 病毒实现 B 细胞永生，筛选 N 蛋白特异性抗体分泌细胞株，通过 5'RACE 技术扩增抗体轻重链可变区序列，构建 SARS-CoV-2 N 蛋白结合抗体表达载体，体外表达、纯化抗体并完成亲和力分析。通过本部分研究，最终获得了亲和力较高的抗 SARS-CoV-2 N 蛋白特异性结合抗体，完善了基于 B 细胞永生的短期内抗体快速制备技术，为新突发传染病防控提供技术支撑。

第一章 不同临床状态 COVID-19 患者免疫状况差异研究

SARS-CoV-2 主要通过呼吸道飞沫传播进入感染者上呼吸道，引发急性呼吸窘迫综合征，伴随着病毒复制，宿主免疫系统激活，过度的免疫反应使部分患者出现肺炎、肾衰竭等严重临床症状。根据我国卫生健康委员会办公厅发布的《新型冠状病毒肺炎诊疗方案（试行第八版 修订版）》，COVID-19 患者可根据临床症状分为轻型、普通型、重型、危重型四类。研究表明，COVID-19 患者会出现细胞因子风暴、抗体水平激增等免疫反应失衡现象，且临床分型严重的患者更易出现过度免疫反应，针对不同临床分型的 COVID-19 患者进行免疫状况研究至关重要。干扰素介导了机体特异性免疫产生之前的天然免疫反应，从而实现病毒感染早期的抗病毒免疫，最大限度地保护机体以减少损害。最新研究显示，小鼠皮肤感染微生物后，细胞内能够高表达 ERVs 基因并反转录形成 cDNA，激活细胞 cGAS-STING 通路，诱导 IFN-I 的生成^[130]。在本部分研究中，我们重点分析了不同临床分型的 COVID-19 患者外周血中不同免疫因子水平差异，评估了不同临床分型的既往感染者外周血中和抗体对 SARS-CoV-2 变异株的中和能力，探索了 HERV-K (HML-2) 家族基因转录水平与干扰素产生的潜在关系，进一步分析了不同临床状态的 COVID-19 患者免疫差异的可能机制。

1.1 实验材料

1.1.1 实验样本

1.1.1.1 研究对象招募及其背景信息收集

根据我国《新型冠状病毒肺炎诊疗方案（试行第八版）》招募未接种过 SARS-CoV-2 疫苗的不同临床分型的 COVID-19 患者、健康人对照和 SARS-CoV-2 疫苗接种者，签署知情同意后由专业访谈人员调查流行病学信息，并收集外周血样本。本部分研究中涉及人群血液样本相关研究内容通过北京佑安医院研究伦理委员会审核批准（第 2020-037 号）。

经流行病学调查和病毒溯源，本研究招募的 COVID-19 患者感染的毒株与引起 2019 年底武汉 COVID-19 疫情的 SARS-CoV-2 毒株同源，本研究将此毒株简称为“Wuhan 株”。

1.1.1.2 样本采集和处理

使用 EDTA 抗凝采血管采集研究对象全血样本，样本置于生物安全三级实验室（Biosafety Level-3 Laboratory, 简称“BSL-3 实验室”）中，分离血浆和外周血

淋巴细胞，血浆样本置于 56°C 水浴锅中灭活 40 min，确保生物安全后进行后续实验。

1.1.2 实验所用细胞和病毒

(1) Vero E6 细胞由本实验室保存。

(2) SARS-CoV-2 活病毒 (BetaCoV/Beijing/AMMS01/2020) 由本研究室分离获得。

1.1.3 实验使用设备

表 1.1 第一部分研究所使用实验设备

Table 1.1 The first part of the study used experimental equipment

仪器、设备名称	品牌
生物安全柜 ClassII	NuAire
二氧化碳培养箱	Thermo Fisher Scientific
DEM-III型自动酶标洗板机	北京拓普分析仪器有限公司
微生物培养箱	Thermo Fisher Scientific
台式离心机	Sigma
半自动化学发光法分析仪	北京科卫临床诊断试剂有限公司
水浴锅	Thermo Fisher Scientific
倒置显微镜	OLYMPUS
细胞计数器	Thermo Fisher Scientific
移液器	Eppendorf
多功能酶标仪	PerkinElmer EnSpire
PCR 扩增仪器	Bio-Rad
高通量全自动快速核酸纯化系统	Roche
荧光定量 PCR 仪	Roche

1.1.4 实验主要耗材

表 1.2 第一部分研究所使用实验耗材

Table 1.2 The first part of the study used experimental consumables

主要耗材	品牌
细胞培养瓶	Thermo Fisher Scientific
96 孔平底细胞培养板	Corning
96 孔 U 型底细胞培养板	Corning
96 孔平底发光板	WHB
Ep 管	Axygen
加样槽	Biologix
移液管	Thermo Fisher Scientific
0.22 μ m 过滤器	Pall
15ml/50ml 离心管	Corning

1.1.5 实验主要试剂

1.1.5.1 试剂来源

表 1.3 实验试剂

Table 1.3 Experimental reagents

试剂名称	品牌	货号
PBS	Gibco	C10010500CP
0.25% Trypsin-EDTA (1 \times)	Gibco	25200-056
DMEM	Gibco	11995-065
新生牛血清	Gibco	16010159
青霉素-链霉素	Gibco	15070063
L-谷氨酰胺	Gibco	A2916801
HRP-小鼠抗人 IgA	北京博奥龙免疫技术有限公司	BF03070X
HRP-小鼠抗人 IgM	北京博奥龙免疫技术有限公司	BF03074

HRP-小鼠抗人 IgE*	北京博奥龙免疫技术有限公司	BF03055
HRP-小鼠抗人 IgG1	北京博奥龙免疫技术有限公司	BF03069X
HRP-小鼠抗人 IgG2	北京博奥龙免疫技术有限公司	BF03066X
HRP-小鼠抗人 IgG3	北京博奥龙免疫技术有限公司	BF03070X
HRP-小鼠抗人 IgG4	北京博奥龙免疫技术有限公司	BF03068X
可溶性 TMB 单组份	北京博奥龙免疫技术有限公司	BF06007
Elisa 专用-终止液	北京博奥龙免疫技术有限公司	BTYA0106
HRP 标记抗体稀释液	北京博奥龙免疫技术有限公司	BF06208
新型冠状病毒(2019-nCoV) S 蛋白 IgG 抗体检测试剂盒(化学发光免疫分 析法)	北京科卫临床诊断试剂有限公司	合作提供
新型冠状病毒(2019-nCoV) N 蛋白 IgG 抗体检测试剂盒(化学发光免疫分 析法)	北京科卫临床诊断试剂有限公司	合作提供
人脂多糖(LPS)酶联免疫分析(ELISA)试 剂盒	Bioswamp	HM11067
人肠脂肪酸结合蛋白(iFABP)酶联免 疫分析	mlbio	m1026525
Human BDG (beta-D-glucan) ELISA Kit	武汉菲恩生物科技有限公司	EH1653
人高尔基蛋白 73 (GP-73) 联疫酶联免 疫析	mlbio	ml038317
TRIzol™ 试剂	Thermo Fisher Scientific	15596026
UltraPure™ DEPC 处理水	Thermo Fisher Scientific	750023
Bright-Glo™ Luciferase Assay System	Promega	E2550
MagNA Pure LC RNA Isolation Kit	Roche	3542394001
gDNA Removal cDNA Synthesis Kit	北京康为世纪生物科技有限公司	CW2582M
MagicSYBR Mixture	北京康为世纪生物科技有限公司	CW3008H
Premix Taq	TaKaRa	RR902A
DNA 产物纯化试剂盒	天根生化科技(北京)有限公司	DP213-02
VSV 假病毒	中研国邦(北京)科技有限公司	

1.1.5.1 培养基配置

表 1.4 培养基配置方法
Table 1.4 Medium allocation method

培养基名称	成分	操作
M-10 培养基	DMEM (Gibco) +10%热灭活胎牛血清 (FBS) +1%L-谷氨酰胺和 1%青霉素/链霉素	充分混匀 4°C保存
M-2 培养基	DMEM (Gibco) +2%热灭活胎牛血清 (FBS) +1%L-谷氨酰胺和 1%青霉素/链霉素	充分混匀 4°C保存

1.1.6 引物和化合物合成

本研究涉及的引物和化合物均由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

1.1.7 相关软件

- (1) IBM SPSS Statistics 21 软件。
- (2) GraphPad Prism 8 软件。

1.2 实验方法

1.2.1 SARS-CoV-2 活病毒 TCID₅₀ 检测

- (1) 准备细胞：用预热 M-10 培养基稀释 Vero E6 细胞为 1×10^5 个细胞/mL。
- (2) 接种细胞：向无菌 96 孔平底细胞培养板内每孔加入 100 μ L 步骤 (1) 中的细胞悬液，置于 37°C，5% CO₂ 的培养箱中孵育过夜。
- (3) 稀释病毒：24 h 后，向 96 孔 U 型底细胞培养板每孔加 135 μ L 预热 M-2 培养基。在第 1 列的所有孔 (A1~H1) 中加入 15 μ L SARS-CoV-2 病毒原液，充分混匀。从第 1 列依次向后 1 列转移 15 μ L，转移 10 次后弃第 11 列孔中病毒稀释液 15 μ L，进行 10 倍梯度稀释，在每个稀释步骤中充分混匀 (图 1.1)。
- (4) 共培养：取出步骤 (2) 培养的细胞，弃 96 孔平底细胞培养板前 11 列孔内培养基。依次吸取步骤 (3) 中的病毒稀释液 100 μ L 至含 Vero E6 细胞的 96 孔平底细胞培养板内，置于 37°C，5% CO₂ 的培养箱中孵育。
- (5) 显微观察：3 天后在倒置显微镜下观察 96 孔平底细胞培养板，将出现致细胞病变效应 (Cytopathic Effect, CPE) 的孔评为阳性，反之评为阴性 (图 1.2)。

(6) 使用 Reed–Muench 公式计算 TCID₅₀。整个过程在 BSL-3 实验室进行。

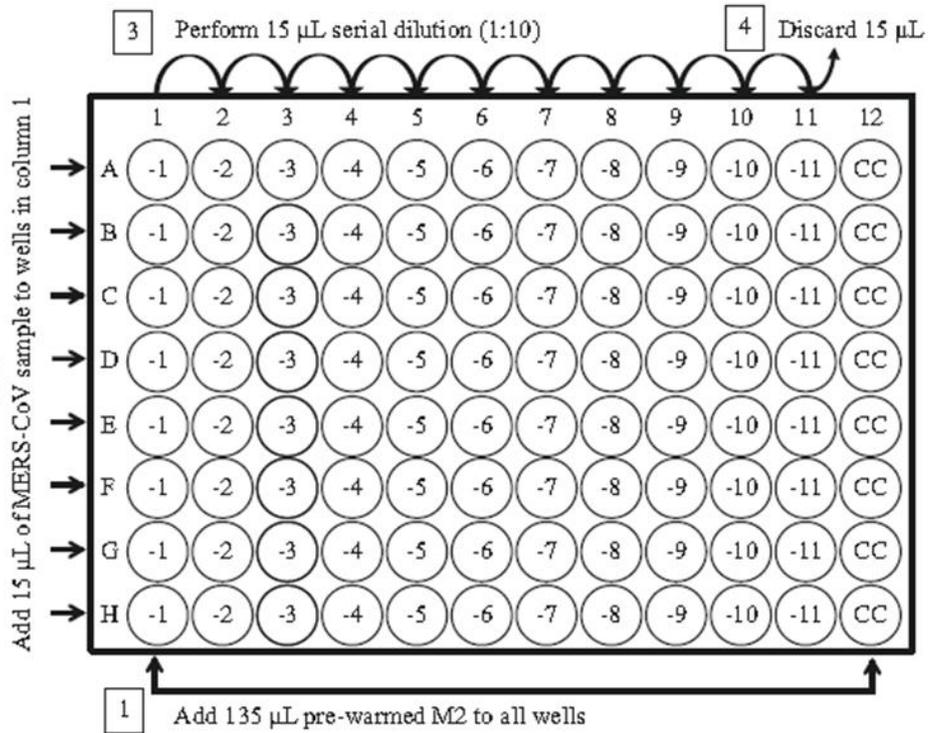


图 1.1 病毒滴定孔板设置图^[131]

Fig 1.1 Setting diagram of virus titration orifice plate

1.2.2 COVID-19 患者中和抗体滴度检测

(1) 准备细胞：用预热的 M-10 培养基稀释 Vero E6 细胞为 1×10^5 个细胞/mL。

(2) 接种细胞：向无菌 96 孔平底细胞培养板内每孔加入 100 μL 步骤 (1) 中的细胞悬液，置于 37°C ，5% CO_2 的培养箱中孵育过夜。

(3) 稀释血浆：24 h 后，在 96 孔 U 型底细胞培养板内每孔加入 60 μL 预热的 M-2 培养基。在 A 行的 A1~A10 孔中加入 48 μL 预热的 M-2 培养基，在 A 行的 A1~A10 孔中加入 12 μL 血浆样本（即 10 倍稀释），充分混匀。从 A 行依次向下 1 行转移 60 μL ，转移 7 次后弃 H 行孔中病毒稀释液 60 μL ，进行 2 倍梯度稀释，在每个稀释步骤中充分混匀（图 1.3）。

(4) 准备血浆-病毒混合物：用预热的 M-2 培养基稀释病毒原液为 2000 TCID₅₀/mL，向除第 12 列中的孔（细胞对照孔，CC 孔）以外的所有孔中添加 60 μL 病毒稀释液。将血浆-病毒混合物置于 37°C ，5% CO_2 的培养箱中孵育 1 h。

(5) 共培养：取出步骤 (2) 培养的细胞，弃 96 孔平底细胞培养板培养基，依次吸取步骤 (3) 中的病毒稀释液 100 μL 至含 Vero E6 细胞的 96 孔平底细胞培养板内，置于 37°C ，5% CO_2 的培养箱中孵育。

(6) 显微观察：3 天后在倒置显微镜下观察 96 孔平底细胞培养板，将出现 CPE 效应的孔评为阳性，反之评为阴性（图 1.2）。

(7) 计算每个血浆样品的 MN₁₀₀。整个过程在 BSL-3 实验室进行。

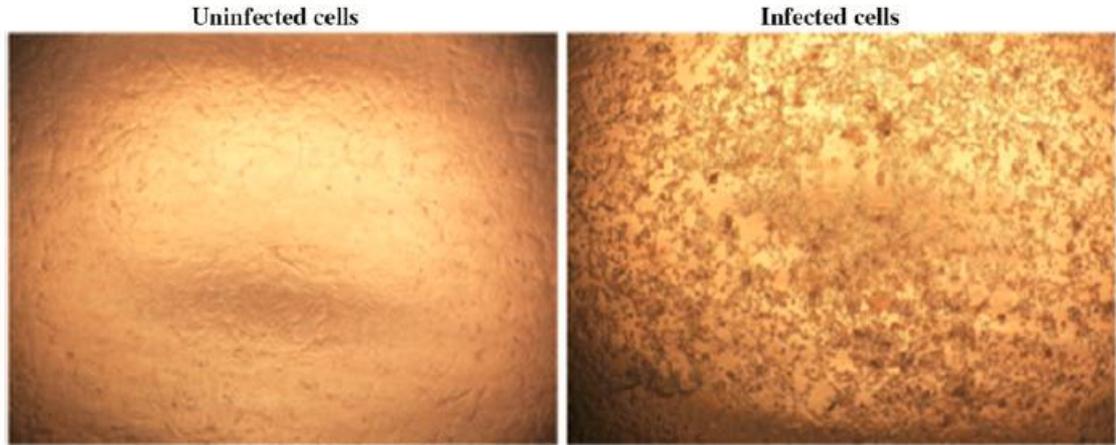


图 1.2 正常细胞与病变细胞比较 [131]

Fig. 1.2 Comparison between uninfected cells and infected cells

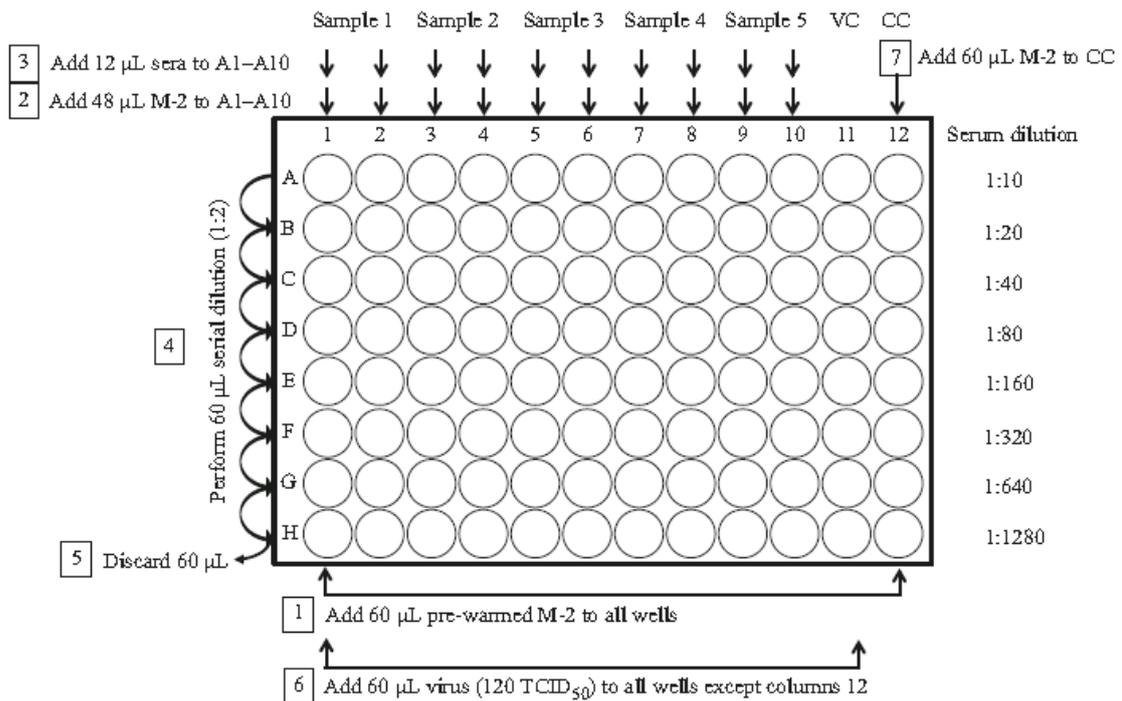


图 1.3 病毒中和实验孔板设置图 [131]

Fig. 1.3 Setting diagram of virus neutralization test orifice plate

1.2.3 IgG-S 抗体和 IgG-N 抗体定量检测

(1) 样本稀释：将样本适当稀释 100~10000 倍使其落入可信区间。

(2) 加样: 分别设置标准品孔和样本孔, 每孔加入 100 μL 样品稀释液, 样本和标准品加样 10 μL 。

(3) 孵育: 用封板膜封板后, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。

(4) 洗涤: 小心揭掉封板膜, 用洗板机洗涤 5 次。

(5) 加酶: 每孔加入酶结合物 100 μL , 振荡混匀。

(6) 孵育: 用封板膜封板后, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min。

(7) 洗涤: 同步骤 (4)。

(8) 显色: 每孔加入显色剂 A、B 液各 50 μL , 轻轻振荡混匀, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 5 min。

(9) 测定: 立即用半自动化学发光法分析仪测定结果。

1.2.4 IgG-S 抗体和 IgG-N 抗体分型检测

(1) 样本稀释: 用生理盐水将样本稀释 20 倍。

(2) 加样: 每孔加入 100 μL 样品稀释液, 再加入样本 10 μL 。

(3) 孵育: 用封板膜封板后, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。

(4) 洗涤: 小心揭掉封板膜, 用洗板机洗涤 5 次。

(5) 加二抗: 用专用稀释液将二抗稀释 1000 倍, 每孔加入二抗稀释液 100 μL , 振荡混匀。

(6) 孵育: 用封板膜封板后, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。

(7) 洗涤: 同步骤 (4)。

(8) 显色: 100 μL 可溶性 TMB, 轻轻振荡混匀, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min。

(9) 测定: 立即于 450 nm 和 630 nm 双波长下读数。

(10) 阴阳性判定: 荧光值大于 0.2 的样品为阳性, 否则为阴性。

1.2.5 BDG、LPS、iFABP、GP73 检测

1.2.5.1 BDG 检测步骤

(1) 标准品稀释: 按试剂盒说明稀释标准品浓度分别为 1000 pg/mL 、500 pg/mL 、250 pg/mL 、125 pg/mL 、62.5 pg/mL 、31.25 pg/mL 、15.125 pg/mL 、0 pg/mL 、。

(2) 加样: 分别设置标准孔和待测样品孔, 标准孔和待测样品孔均加样 100 μL 。

(3) 孵育: 用封板膜封板后, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 90 min。

(4) 洗涤: 小心揭掉封板膜, 用洗板机洗涤 2 次。

(5) 加二抗: 每孔加入 100 μL 生物素标记的二抗, 振荡混匀。

(6) 孵育: 用封板膜封板后, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min。

(7) 洗涤: 小心揭掉封板膜, 用洗板机洗涤 3 次。

-
-
- (8) 加酶: 每孔加入带 HRP 标记试剂 100 μL , 振荡混匀。
 - (9) 孵育: 用封板膜封板后, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。
 - (10) 显色: 每孔加入 90 μL TMB, 振荡混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色 10~20 min。
 - (11) 终止: 每孔加入 50 μL 终止液, 振荡混匀, 。
 - (12) 测定: 15 min 内于 450 nm 和 630 nm 双波长下读数。

1.2.5.2 LPS 检测步骤

- (1) 标准品的稀释: 按试剂盒说明稀释标准品浓度分别为 1600 pg/mL, 800 pg/mL, 400 pg/mL, 200 pg/mL, 100 pg/mL, 0 pg/mL。
- (2) 加样: 分别设置标准孔和待测样品孔, 标准孔加入标准品 50 μL , 待测样品孔中先加 40 μL 样品, 再加 10 μL 生物素标记的抗 LPS 抗体。
- (3) 加酶: 每孔加入 50 μL 酶标试剂。
- (4) 孵育: 用封板膜封板后置 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。
- (5) 洗涤: 小心揭掉封板膜, 用洗板机洗涤 5 次。
- (6) 显色: 每孔先加入 50 μL 显色剂 A, 再加入 50 μL 显色剂 B, 震荡混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色 10 min。
- (7) 终止: 每孔加终止液 50 μL , 终止反应。
- (8) 测定: 15 min 内于 450 nm 和 630 nm 双波长下读数。

1.2.5.3 iFABP 检测步骤

- (1) 标准品的稀释: 按说明书稀释标准品浓度分别为 0.8 pg/mL、0.4 pg/mL、0.2 pg/mL、0.1 pg/mL、0.05 pg/mL。
- (2) 加样: 分别设置标准孔和待测样品孔, 在酶标包装被板上标准品加样 50 μL , 待测样品孔中先加样品稀释液 40 μL , 然后再加待测样品 10 μL 。
- (3) 孵育: 用封板膜封板后, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。
- (4) 洗涤: 小心揭掉封板膜, 用洗板机洗涤 5 次。
- (5) 加酶: 每孔加入 50 μL 酶标试剂, 振荡混匀。
- (6) 孵育: 用封板膜封板后, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。
- (7) 洗涤: 同步骤 (4)。
- (8) 显色: 每孔加入显色剂 A、B 液各 50 μL , 轻轻振荡混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色 10 min。
- (9) 终止: 每孔加入终止液 50 μL , 轻轻振荡混匀。。
- (10) 测定: 15min 内于 450 nm 和 630 nm 双波长下读数。

1.2.5.4 GP73 检测步骤

- (1) 标准品的稀释: 按说明书稀释标准品浓度分别为 800 ng/L、400 ng/L、200 ng/L、100 ng/L、50 ng/L。
- (2) 加样: 分别设标准孔和待测样品孔, 标准孔加样 50 μL , 待测样品孔中先加样品稀释液 40 μL , 然后再加待测样品 10 μL 。

-
-
- (3) 孵育：用封板膜封板后置 37°C 孵育 30 min。
 - (4) 洗涤：小心揭掉封板膜，用洗板机洗涤 5 次。
 - (5) 加酶：每孔加入酶标试剂 50 μ L。
 - (6) 孵育：操作同步骤 (3)。
 - (7) 洗涤：操作同步骤 (4)。
 - (8) 显色：每孔先加入显色剂 A 50 μ L，再加入显色剂 B 50 μ L，震荡混匀，37°C 避光显色 10 min。
 - (9) 终止：每孔加终止液 50 μ L，终止反应。
 - (10) 测定：15 min 内于 450 nm 和 630 nm 双波长下读数。

1.2.6 细胞因子检测

交付北京拓普百奥科技有限公司公司，用 Ella 全自动多样本多因子免疫检测系统 (Protein Simple, Revision 1.1, Mar 2020) 和 Luminex 平台的 ProcartaPlex 免疫检测系统测定普通型和重型 COVID-19 患者和健康人血浆中 IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-18、IL-33、CCL2、CCL3、CCL4、CXCL1、CXCL2、CXCL6、CXCL9、CXCL10、IFN- γ 、TNF- α 这 18 种细胞因子的浓度。

1.2.7 COVID-19 患者血浆对变异株的中和能力检测

使用 VSV 假病毒报告系统对感染 Wuhan 株 SARS-CoV-2 的患者血浆的中和能力进行测定，具体步骤如下^[132]。

(1) 封边：将 96 孔平底发光板边缘孔 (A1~A12, H1~H12, B1~G1, B12~G12) 中加入 260 μ L 高压灭菌水封边，减少边缘效应。

(2) 稀释血浆：向第 2 列 (细胞对照 CC) 和第 3 列 (病毒对照 VC) 分别加入 DMEM 培养基 150 μ L 和 100 μ L，向 B4~B11 孔中加入 142.5 μ L DMEM 培养基，其余孔加入 100 μ L DMEM 培养基。向 B4~B11 孔中加入 7.5 μ L 待测样品，充分混匀，依次向下 1 行转移 50 μ L 液体，共转移 5 次后弃 G 行孔中液体 50 μ L，进行 3 倍梯度稀释，在每个稀释步骤中充分混匀。稀释倍数为：30、90、270、810、2430、7290。

(3) 血浆-病毒共培养：室温水浴 VSV-SARS-CoV-2 假病毒化冻，用 DMEM 完全培养基将假病毒稀释至 1.3×10^4 TCID₅₀/mL，向第 3~11 列每孔加 50 μ L 稀释病毒液，置于 37°C，5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 1 h。

(4) 准备细胞：待孵育 30 min 后，开始消化 Vero 细胞，将细胞浓度稀释至 2×10^5 个细胞/mL。

(5) 细胞共培养：孵育结束后，每孔加入 100 μ L 步骤 (4) 中细胞稀释液，使每孔细胞为 2×10^4 个。置于 37°C，5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 24 h。

(6) 测定: 24 h 后, 样品孔弃 150 μL 上清, 加入 20 μL 荧光素酶检测试剂, 室温避光反应 2 min, 使用多功能成像酶标仪读取发光值 (RLU) 并计算 ID_{50} 值。

1.2.8 HERV-K (HML-2) 和干扰素诱导通路相关基因检测

1.2.8.1 感染 SARS-CoV-2 的 Vero E6 细胞准备

(1) 准备细胞: 在 2 瓶 25 cm^2 细胞培养瓶中用 5 mL M-10 培养基稀释 2×10^6 个 Vero E6 细胞, 分别编号为病毒组和细胞组。

(2) 病毒感染: 在 BSL-3 实验室向病毒组细胞培养瓶中加入 0.01 MOI 的病毒液 5 mL, 轻柔混匀。同时, 向细胞组加入 5 mL M-10 培养基, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 的培养箱中孵育。

(3) 收集并裂解细胞: 培养 48 h 后, 将细胞上清转移至 50 mL 的离心管, 病毒组和细胞组的上清均置于 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅灭活 30 min, 冻存。向含有细胞的培养瓶中加入 6 mL Trizol, 充分混匀使细胞完全裂解, 转移至 6 个 1.5 mL 的 Ep 管中。

1.2.8.2 Trizol 法提取核酸

(1) 异丙醇、75% 乙醇、DEPC 处理水提前置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷 30 min。

(2) 向 1.2.8.1 中裂解后的细胞中加入 0.2 mL 氯仿, 剧烈振荡 15 s, 充分混合不分层, 冰上放置 10 min。

(3) 4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 g 离心 20 min 后样品分三层, 吸上层水相 450 μL 转移至洁净的 1.5 mL Ep 管内。

(4) 每管加入 0.5 mL 预冷的异丙醇, 使 RNA 沉淀, Ep 管上下慢速混匀, 冰上放置 10 min。

(5) 4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 g 离心 20 min, 缓慢吸弃上清。

(6) 每管缓慢加入 1 mL 预冷 75% 乙醇, 洗涤沉淀。

(7) 4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 g 离心 5 min, 缓慢吸弃上清。

(8) Ep 管开盖置于超净工作台下干燥 15~20 min, 用 20 μL DEPC 处理水溶解 RNA。

(9) 超微量分光光度计检测 RNA 浓度, 并置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.8.3 qRT-PCR 及 GO 分析

(1) 样本 RNA 提取: 使用高通量全自动快速核酸纯化系统提取 COVID-19 患者和健康对照的全血 RNA, 每个样本全血用量为 200 μL , 用超微量分光光度计检测 RNA 浓度, 并置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

(2) 去除基因组 DNA (gDNA): 按表 1.5 配置去除 gDNA 的反应体系, 放置于 PCR 扩增仪器, 42 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 min。

表 1.5 去除 gDNA 反应体系
Table 1.5 Remove gDNA reaction system

组分	60 μL 反应体系
10 \times gDNA Eraser Buffer	6 μL
gDNA Eraser	3 μL
RNA Template	51 μL

(3) RNA 定量：将样本 RNA 浓度定量到 200 ng/ μL 。

(4) 反转录：按表 1.6 配置反转录反应体系，放置于 PCR 扩增仪器，42 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min，85 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 min。

表 1.6 反转录反应体系
Table 1.6 Reverse transcription reaction system

组分	20 μL 反应体系
去除 gDNA 的反应液	10 μL
HIFIScript	1 μL
Primer Mix	1 μL
5 \times ScriptRT Buffer	4 μL
RNase-Free Water	4 μL

(5) qRT-PCR：按表 1.7 配置 qRT-PCR 反应体系，按表 1.8 设置反应程序。根据文献在对 HERV-K (HML-2) 相关基因进行 qRT-PCR 检验时选择 *β -actin* 作为内参基因，对于干扰素相关基因进行 qRT-PCR 检验时选择 *GAPDH* 作为内参基因，引物序列见表 1.9。

表 1.7 qRT-PCR 反应体系
Table 1.7 qRT-PCR reaction system

试剂	20 μL 体系
2 \times MagicSYBR Mixture	10 μL
Forward Primer	0.4 μL
Reverse Primer	0.4 μL
Template DNA	2 μL
ddH ₂ O	7.2 μL

表 1.8 qRT-PCR 反应程序
Table 1.8 qRT-PCR reaction procedure

反应温度	反应时间	循环数
95 °C	30 s	1
95 °C	5 s	} ×40 cycles
60 °C	30 s	
95 °C	5 s	1
60 °C	60 s	1
95 °C 到 60 °C 每 5 °C 读数一次		1
42 °C	50 s	1

表 1.9 qRT-PCR 引物序列
Table 1.9 Primer sequences of qRT-PCR

名称	序列 (5'-3')
<i>β-actin</i> -F	CCACGAAACTACGTTCAACTCC
<i>β-actin</i> -R	GTGATCTCCTTCTGCATCCTGT
HERV-K (HML-2) <i>env</i> -F	CTGAGGCAATTGCAGGAGTT
HERV-K (HML-2) <i>env</i> -R	GCTGTCTCTTCGGAGCTGTT
HERV-K (HML-2) <i>pol</i> -F	TCACATGGAAACAGGCAAAA
HERV-K (HML-2) <i>pol</i> -R	AGGTACATGCGTGACATCCA
HERV-K (HML-2) <i>gag</i> -F	AGCAGGTCAGGTGCCTGTAACATT
HERV-K (HML-2) <i>gag</i> -R	TGGTGCCGTAGGATTAAGTCTCCT
<i>GAPDH</i> -F	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
<i>GAPDH</i> -R	TGCACCACCAACTGCTTAGC

<i>IFNβ</i> -F	ACGCCGCATTGACCATCTAT
<i>IFNβ</i> -R	TAGCCAGGAGGTTCTCAACA
<i>ISG15</i> -F	GAGAGGCAGCGAACTCATCT
<i>ISG15</i> -R	CTTCAGCTCTGACACCGACA
<i>IFIT1</i> -F	TACAGCAACCATGAGTACAA
<i>IFIT1</i> -R	TCAGGTGTTTCACATAGGC

(6) HERV-K (HML-2) *gag*、*env*、*pol* 二代测序样本准备：按表 1.10 反应体系进行加样，按表 1.11 反应程序进行扩增。

表 1.10 二代测序样本 PCR 反应体系
Table 1.10 PCR reaction system of Next-generation sequencing samples

组分	所需含量	终浓度	所需体积
Premix Ex Taq 酶	-	-	25 μL
RT 反应合成的 cDNA	-	-	5 μL
barcode 引物 F/R	10 pM	10 μM	1 μL
H ₂ O	-	-	18 μL

表 1.11 二代测序样本 PCR 反应程序
Table 1.11 PCR reaction program of Next-generation sequencing samples

反应温度	反应时间	循环数
95 °C	180 s	1
95 °C	15 s	} x 40 cycles
67 (<i>gag</i> 、 <i>env</i>) /65 (<i>pol</i>) °C	15 s	
72 °C	10 s	
72 °C	10 min	1
4 °C	Holding	1

(6) 送测：使用纯化试剂盒纯化 PCR 产物后送北京诺赛基因组研究中心有限公司，使用 illumina 平台进行二代测序。

(7) 分析：将 HERV-K (HML-2) *gag*、*env*、*pol* 高表达片段的二代测序序列与在线网站 UCSC (www.genome.ucsc.edu) 上参考基因组 GRCh38/hg38 进行比对，筛选出同源性大于 97% 的目标序列并记录染色体位置，并筛选处于该位置的基因，参照二代测序结果的 *uniqueseqs* 值统计目标序列的克隆率，利用 R 包 *RIdigraph* 构建目标序列在染色体上的分布位置，使用在线网站 *the Great Input: Genome Regions Enrichment of Annotation Tool* (<http://great.stanford.edu/public/html/>) 鉴定高表达基因的功能类别、基因富集分析^[133-136]。

1.3 实验结果

1.3.1 82 例新型冠状病毒肺炎患者的流行病学资料

共招募到未接种 SARS-CoV-2 疫苗的 82 例 COVID-19 患者，根据我国《新型冠状病毒肺炎诊疗方案（试行第八版）》，包括轻型患者 1 例、普通型患者 49 例、重型患者 30 例和 2 例危重型患者；47 名女性和 35 名男性；年龄中位数为 63 岁，其中年龄超过 60 岁的患者为 56 例（68.29%）；有疾病史的为 48 例（58.54%），其中高血压、糖尿病和心脏相关疾病所占比例最大，分别为 45.83%、35.42%、18.75%。普通型和重型患者的性别构成、平均年龄、疾病史占比没有统计学差异^[137]。

表 1.12 82 例 COVID-19 住院患者信息
Table 1.12 Characteristics of 82 COVID-19 patients

分组	轻型患者 (n=1)	普通型患者 (n=49)	重型患者 (n=32)	危重型患者 (n=2)	总计 (n=81)
性别					
女	1	30	15	1	47
男	0	19	15	1	35
年龄					
35-39	1	2	2	0	5
40-49	0	3	0	0	3
50-59	0	10	6	2	18
60-69	0	20	16	0	36
70-79	0	11	4	0	15
80-89	0	3	2	0	5
中位数 (IQR)	36	63.6	63	56.5	63(57-69)
疾病史					
高血压	0	13	8	1	22
糖尿病	0	11	6	0	17
心脏病	0	7	2	0	9

1.3.2 普通型患者和重型患者外周血中和抗体水平

利用 SARS-CoV-2 活病毒共培养观察病变方法检测血浆抗体中和活性，通过有限稀释法分析 COVID-19 患者血浆样本中和抗体滴度，当患者血浆样本在 1:10 的初始稀释浓度下未观察到中和反应则认为该患者中和抗体效价为 0。检测结果显示，轻型患者中和抗体滴度中位数为 20，普通型患者中和抗体滴度中位数为 79.59，重型患者中和抗体滴度中位数为 164.4，危重型患者中和抗体滴度中位数为 120。Mann-Whitney 检验分析表明重型患者的血浆中和抗体滴度显著高于普通型患者（图 1.4 A， $P=0.039$ ）。

中和抗体滴度为 20、40、80、160 的样本通常认为是低滴度，320 是中等滴度，640 是高滴度，只有中高等滴度的抗体才能用于血浆治疗 [138]。本研究招募的 49 例普通型患者中，血浆中和抗体滴度为 0、20、40、80、160、320 的分别有 10 例（20.41 %）、3 例（6.12 %）、12 例（24.49%）、10 例（20.41%）、12 例（24.49 %）、2 例（4.08%）；30 例重型患者中，血浆中和抗体滴度为 20、40、80、160、320、640 的分别有 2 例（6.67 %）、7 例（23.33 %）、7 例（23.33 %）、6 例（20 %）、5 例（16.67 %）、3 例（10 %）。在 82 例 COVID-19 患者中 87.34% 的患者血浆能检测到中和抗体，12.66% 的患者血浆中含有中高滴度（ ≥ 320 ）的中和抗体。

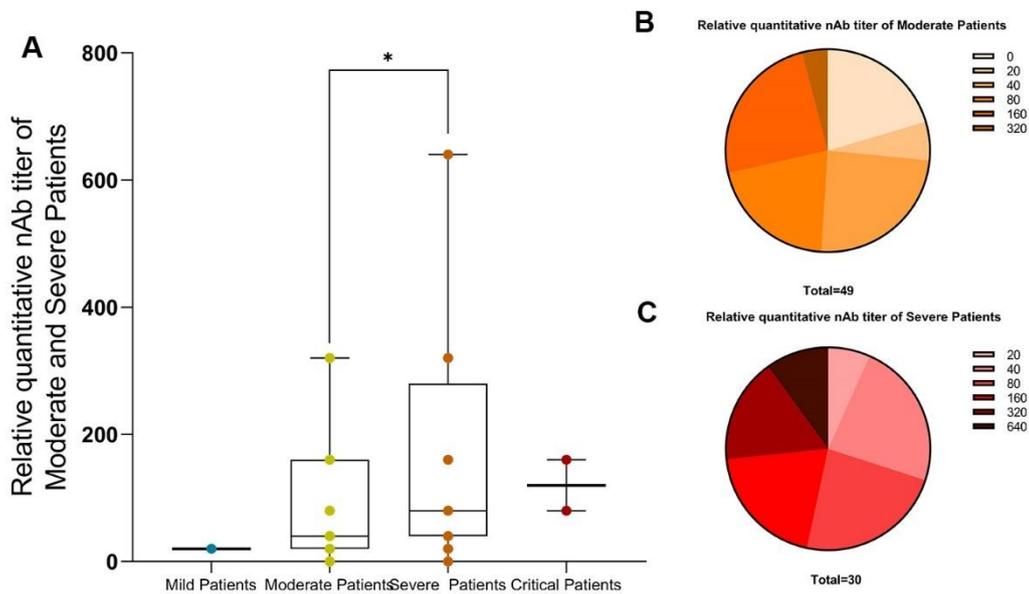


图 1.4 中和抗体检测结果

Fig. 1.4 Neutralizing antibody titer results

注：A：不同临床分型 COVID-19 患者血浆中和抗体滴度；B：普通型 COVID-19 患者血浆中和抗体滴度的分布情况；C：重型 COVID-19 患者血浆中和抗体滴度的分布情况。* 表示经 Mann-Whitney 检验存在显著差异 ($P < 0.05$)

1.3.3 普通型患者和重型患者的 IgG-S 和 IgG-N 抗体水平

利用抗体定量检测试剂盒，本研究分析了 COVID-19 普通型患者 ($n=49$) 和重型患者 ($n=30$) 血浆中抗 SARS-CoV-2 S 蛋白和抗 SARS-CoV-2 N 蛋白 IgG 抗体的浓度。如图 1.5 A 所示，重型患者血浆 IgG-S 抗体浓度（中位数为 22748 ng/mL）高于普通型患者（中位数为 14403 ng/mL） ($P < 0.05$)，重型患者血浆 IgG-N 抗体浓度（中位数为 380249 ng/mL）高于普通型患者（中位数为 191578

ng/mL) ($P<0.05$)。普通型患者 IgG-N 浓度中位数为 IgG-S 的 13.30 倍, 重型患者 IgG-N 浓度中位数为 IgG-S 的 16.72 倍 ($P<0.0001$)。

为研究发病时间(即核酸确诊日与采样日的间隔时间)与患者体内抗体产生的关系, 本研究以 IgG-S 和 IgG-N 抗体浓度的中位数为界, 将普通型和重型患者分别划分为高抗体浓度组和低抗体浓度组。如图 1.5 B 所示, 普通型和重型患者 IgG-S 低抗体浓度组的患者其发病时间均低于高抗体浓度组 ($P<0.05$)。如图 1.5 C 所示, 普通型患者和重型患者 IgG-N 低抗体浓度组的患者其发病时间均与高抗体浓度组无差异 ($P>0.05$)。

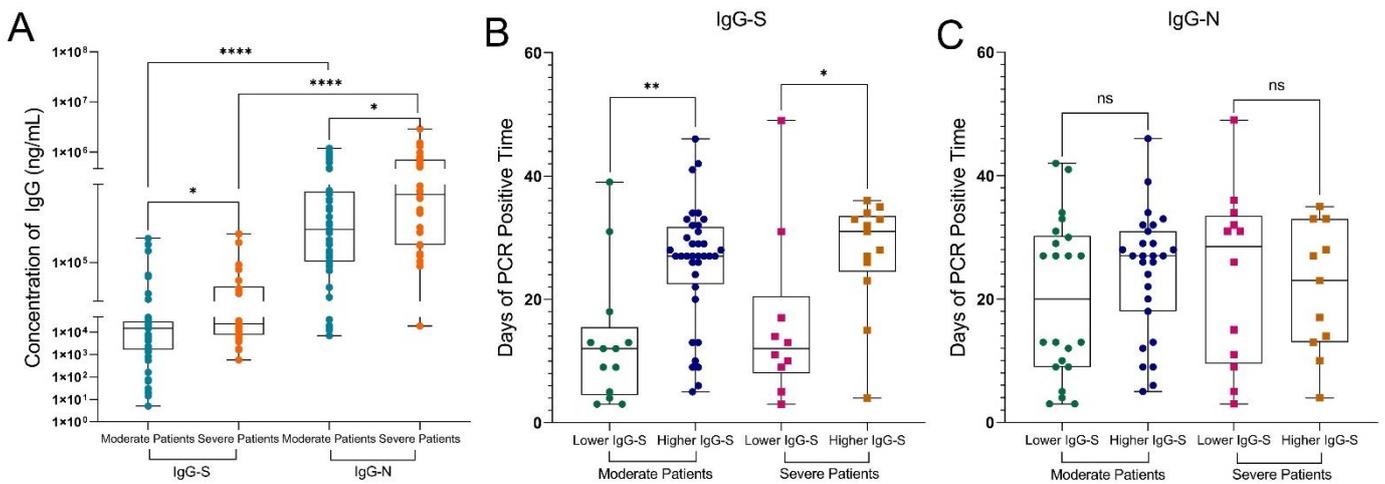


图 1.5 IgG-S 和 IgG-N 抗体检测结果

Fig 1.5 IgG-S and IgG-N antibody titer results

注: A: 不同临床分型 COVID-19 患者抗 S 蛋白和抗 N 蛋白 IgG 抗体含量; B: IgG-S 抗体高水平 and 低水平的 COVID-19 患者发病时间; C: IgG-N 抗体高水平 and 低水平的 COVID-19 患者发病时间。*表示经 Mann-Whitney 检验存在显著差异 ($P<0.05$), ** 表示经 Mann-Whitney 检验存在极显著差异 ($P<0.01$), *** 表示经 Mann-Whitney 检验存在极显著差异 ($P<0.001$), **** 表示经 Mann-Whitney 检验存在极显著差异 ($P<0.0001$)

1.3.4 中和抗体滴度与 IgG-S 滴度的相关性分析

将普通型和重型 COVID-19 患者以不同中和抗体滴度进行分组(依次是 0、20、40、80、160、320、640), 分析 IgG-S 抗体和 IgG-N 抗体在不同组的滴度水平变化。如图 1.6 A-B 所示, 在普通型和重型 COVID-19 患者中 IgG-S 抗体浓度随中和抗体滴度的升高出现升高的趋势, 而 IgG-N 抗体浓度变化趋势并不显著。

如图 1.6 C-D 所示, 普通型和重型 COVID-19 患者血浆中 IgG-S 抗体浓度与中和抗体滴度呈正相关, 线性回归方程分别为 $Y=0.0002665*X+0.00357$ ($R^2=0.7266$, $P<0.05$) 和 $Y=0.0001065*X+0.02778$ ($R^2=0.6593$, $P<0.05$)。

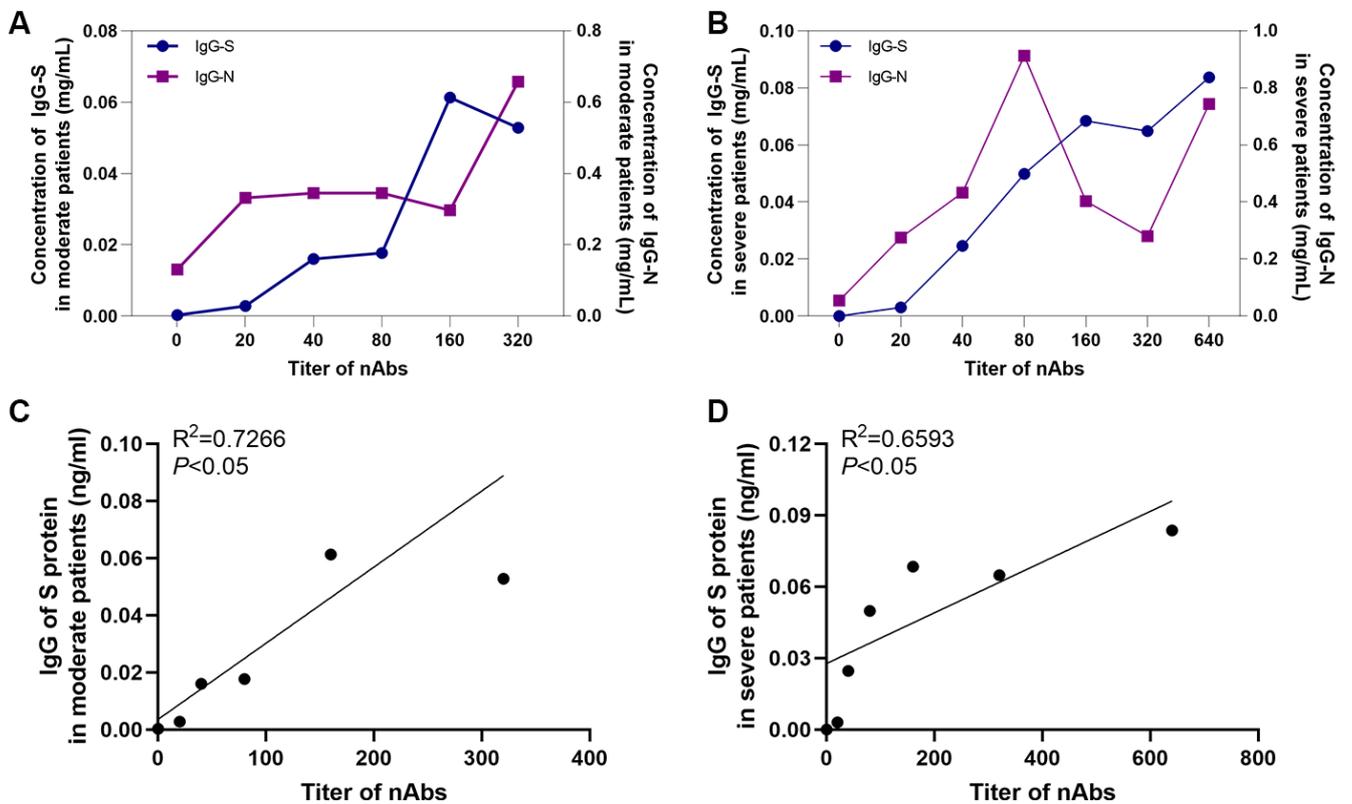


图 1.6 中和抗体滴度与 IgG-S 的相关性分析

Fig. 1.6 Analysis of the correlation between neutralizing antibody and IgG-S titer

注：A：普通型 COVID-19 患者 IgG-S 和 IgG-N 抗体浓度随中和抗体滴度的变化趋势；B：重型 COVID-19 患者 IgG-S 和 IgG-N 抗体随中和抗体滴度的变化趋势；C：普通型 COVID-19 患者 IgG-S 和中和抗体滴度的线性关系；D：重型 COVID-19 患者 IgG-S 和中和抗体滴度的线性关系

1.3.5 COVID-19 患者和 SARS-CoV-2 疫苗接种者抗体类型分析

1.3.5.1 普通型和重型 COVID-19 患者抗体分型差异比较

如图 1.7 所示，COVID-19 患者血浆抗 N 蛋白抗体的阳性率从大到小依次为 IgA、IgM、IgG，抗 S 蛋白抗体的阳性率从大到小依次为 IgG、IgA、IgM；所有重型患者血浆都能检测到 IgA-S、IgA-N、IgM-N 抗体，仅 2 例重型患者血浆未检测到 IgM-S 抗体；仅有 1 例普通型患者血浆中检测到了 IgE 抗体。

进一步分析 COVID-19 患者血浆 IgG 抗体亚型，结果显示 IgG1 抗体是 COVID-19 患者血浆中含量最高的 IgG 亚类，IgG2 抗体是含量最低的 IgG 亚类，患者血浆 IgG3-S 抗体阳性率高于 IgG3-S 抗体阳性率，IgG4-N 抗体阳性率高于 IgG4-S 抗体 ($P<0.05$)。普通型患者 IgG4-N 抗体阳性率为 67.35%，重型患者 IgG4-N 抗体阳性率为 66.67%，而两组患者中均未检测到 IgG4-S 抗体。

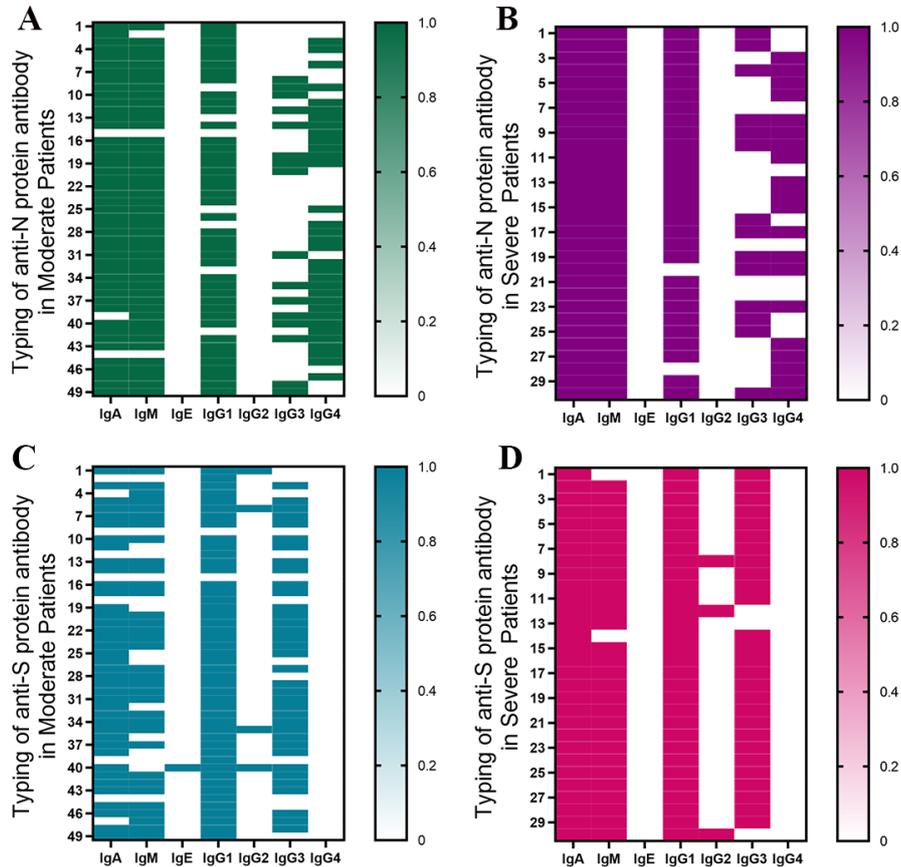


图 1.7 普通型和重型 COVID-19 患者抗体分型差异

Fig. 1.7 Difference of antibody typing between moderate and severe COVID-19 patients

注：A：普通型 COVID-19 患者抗 N 蛋白抗体分型；B：重型 COVID-19 患者抗 N 蛋白抗体分型；C：普通型 COVID-19 患者抗 S 蛋白抗体分型；D：重型 COVID-19 患者抗 S 蛋白抗体分型

1.3.5.1 COVID-19 患者和 SARS-CoV-2 疫苗接种者抗体分型差异分析

通过前期研究，发现抗 SARS-CoV-2 N 蛋白和 S 蛋白的 IgG4 抗体存在显著差异，考虑到 SARS-CoV-2 疫苗大多以 S 蛋白作为抗原位点，我们推测 COVID-19 患者和 SARS-CoV-2 疫苗接种者的 IgG4 抗体可能存在差异。为了证实上述猜想，本研究招募了完成 2 剂北京科兴中维生物技术有限公司的 SARS-CoV-2 疫苗接种者 29 例，疫苗接种者均无疾病史，背景信息如表 1.13 所示。对 COVID-19 患者和疫苗接种者血浆抗 SARS-CoV-2 S 和 N 蛋白抗体的分型结果进行比较，结果显示 SARS-CoV-2 疫苗接种者血浆能检测到 IgA-N、IgM-N、IgG1-N、IgG3-N、

IgM-S 抗体，未能检测到 IgE-N、IgG2-N、IgG4-N、IgE-S、IgG2-S、IgG4-S 抗体。在疫苗接种者中 IgA-S 抗体阳性率为 27.59%，IgG1-S 抗体阳性率为 96.55%，IgG3-S 抗体阳性率为 58.62%。与 COVID-19 患者的抗体分型结果比较，最为明显的差异是 67.01% 的 COVID-19 患者血浆中 IgG4-N 抗体为阳性，而疫苗接种者血浆未能检测到 IgG4-N 抗体，这种差异可用于甄别 COVID-19 患者和疫苗接种者的指标（专利受理号：202110895268.6）^[139]。

表 1.13 疫苗接种者和健康人基本信息

Table 1.13 Characteristics of vaccinated population

分组	疫苗接种者 (n=29)
性别	
女	21
男	8
年龄	
20-29	10
30-39	10
40-49	6
50-59	3
中位数 (IQR)	29 (28-41)
疾病史	
高血压	0
糖尿病	0
心脏病	0

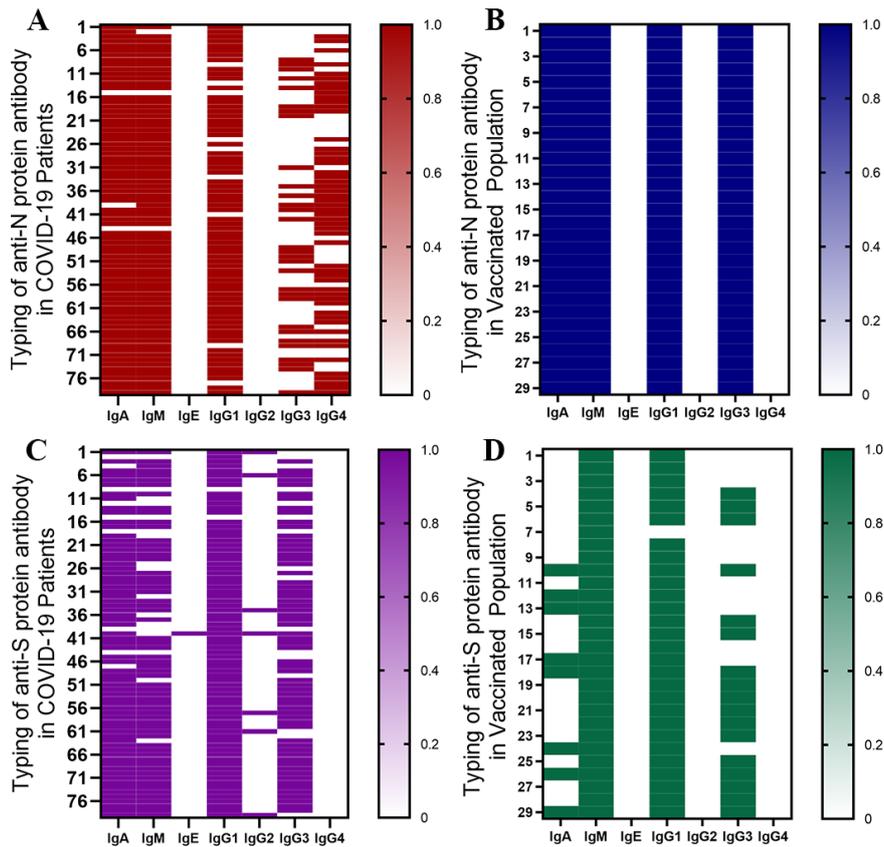


图 1.8 COVID-19 患者和 SARS-CoV-2 疫苗接种者抗体分型差异

Fig. 1.8 Difference of antibody typing between COVID-19 patients and SARS-CoV-2 vaccinated population

注：A：COVID-19 患者抗 N 蛋白抗体分型；B：SARS-CoV-2 疫苗接种者 N 蛋白抗体分型；C：COVID-19 患者抗 S 蛋白抗体分型；D：SARS-CoV-2 疫苗接种者抗 S 蛋白抗体分型

1.3.6 COVID-19 患者真菌和细菌感染情况分析

脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 是革兰氏阴性细菌细胞壁外壁的组成成分, 是由脂质和多糖构成的物质, 可以作为细菌感染的标志物。(1-3)-D-葡聚糖 (β -D-Glucan, BDG) 是一种真菌细胞壁成分, 可作为肠道屏障完整性破坏、微生物和真菌易位的生物标志物。肠型脂肪酸结合蛋白 (Intestinal Fatty Acid-Binding Protein, iFABP) 仅存在于肠道黏膜, 具有器官特异性, 占细胞蛋白总量的 2%~3%, 含量丰富。高尔基蛋白 73 (Golgi protein-73, GP73) 能参与细胞分化、细胞间信息传导和细胞凋亡, 在多种消化系统疾病异常表达^[140]。

本研究分析了上述 4 种指标在 COVID-19 患者外周血中的分布状况, 以推断 SARS-CoV-2 感染可能引发的肠道菌群异位及消化道系统疾病。检测结果显示, 普通型和重型 COVID-19 患者血浆中 LPS、BDG、GP73 含量高于健康人

($P < 0.05$)，iFBAP 低于健康人 ($P < 0.05$)，但普通型患者和重型患者之间没有差异 ($P > 0.05$)，说明 COVID-19 患者存在细菌真菌感染，可能会诱发消化道疾病，但无肠道菌群异位发生。

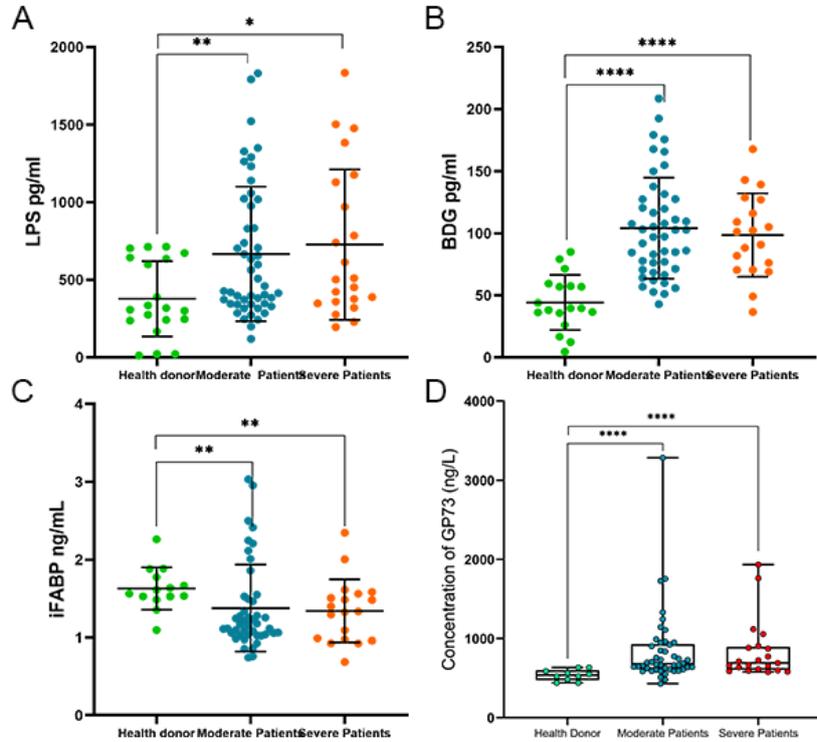


图 1.9 LPS、BDG、iFABP、GP73 检测结果

Fig. 1.9 Detection results of LPS, BDG, iFABP and GP73

注：A：不同临床分型 COVID-19 患者 LPS 含量；B：不同临床分型 COVID-19 患者 BDG 含量；C：不同临床分型 COVID-19 患者 iFABP 含量；D：不同临床分型 COVID-19 患者 GP73 含量。*表示经 Mann-Whitney 检验存在显著差异 ($P < 0.05$)，**表示经 Mann-Whitney 检验存在极显著差异 ($P < 0.01$)，****表示经 Mann-Whitney 检验存在极显著差异 ($P < 0.0001$)

1.3.7 COVID-19 患者细胞因子水平分析

为了分析 SARS-CoV-2 感染对机体免疫因子表达的影响，我们通过比较了普通型和重型 COVID-19 患者与健康人外周血中细胞因子水平。结果显示：普通型和重型 COVID-19 患者中 IL-1 β 、IL-2、CXCL1、CXCL6 低于健康人 ($P < 0.05$)；普通型和重型 COVID-19 患者中 IL-4、IL-6、IL-8、CCL2、CCL3、CCL4、IFN- γ 、TNF- α 高于健康人 ($P < 0.05$)；普通型 COVID-19 患者 IL-18 低于健康人 ($P < 0.05$)；COVID-19 普通型患者 IL-1 β 、IL-6、CXCL9 低于重型患者 ($P < 0.05$)。

Concentration of cytokine (pg/mL)

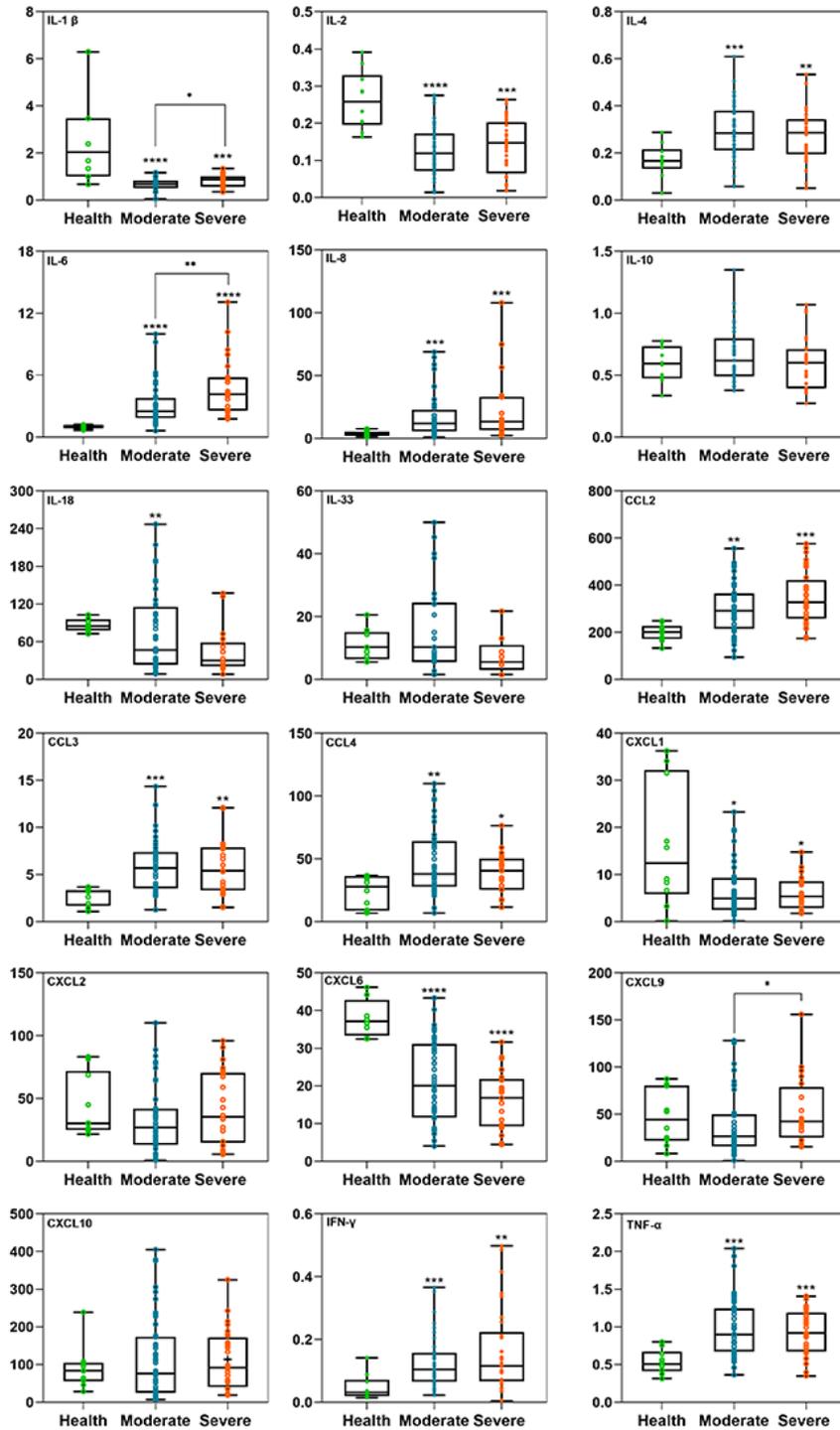


图 1.10 细胞因子浓度

Fig 1.10 The concentrations of cytokine

注：* 表示经 Mann-Whitney 检验存在显著差异 ($P < 0.05$)，** 表示经 Mann-Whitney 检验存在极显著差异 ($P < 0.01$)，*** 表示经 Mann-Whitney 检验存在极显著差异 ($P < 0.001$)，**** 表示经 Mann-Whitney 检验存在极显著差异 ($P < 0.0001$)

1.3.8 SARS-CoV-2 既往感染者对变异株中和能力分析

1.3.8.1 VSV-SARS-CoV-2 假病毒系统评价

本研究首先验证了基于 VSV-SARS-CoV-2 假病毒方法和基于野生型病毒共培养方法检测 COVID-19 患者血浆中和抗体滴度的相关性。Spearman 相关性分析结果显示使用 Wuhan 株活病毒与使用 VSV-SARS-CoV-2 假病毒 Wuhan 株的检测同一批 COVID-19 患者血浆抗体滴度的相关系数高达 0.9716 ($P < 0.05$)，证实 VSV-SARS-CoV-2 假病毒系统与野生毒株检测患者血浆中和抗体的结果一致，假病毒系统能用于后续实验。

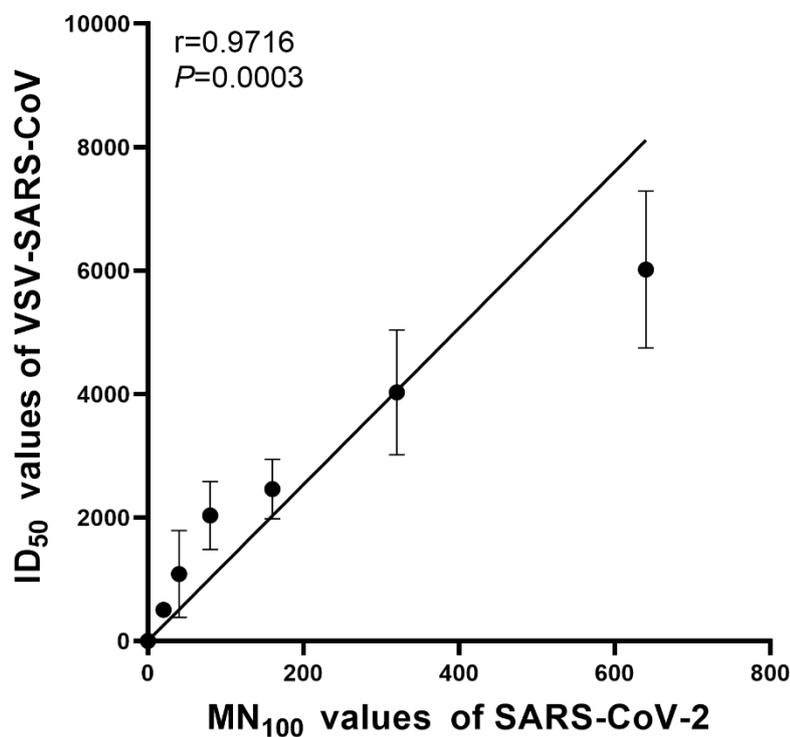


图 1.11 野生毒株与假毒株检测血浆中和抗体滴度结果的相关性分析

Fig. 1.11 Correlation analysis of plasma neutralization antibody titer between wild type virus and pseudoviruses strains

1.3.8.2 COVID-19 患者血浆对变异株的中和能力分析

本研究基于 VSV-SARS-CoV-2 假病毒方法检测了普通型和重型 COVID-19 患者血浆对最早出现的 D614G 变异株和最流行的 7 种变异株 Alpha、Beta、Gamma、Kappa、Delta、Lambda、Omicron 的中和能力。经 Mann-Whitney 检验发现感染早期 Wuhan 株 COVID-19 患者的血浆对 Wuhan 株假病毒的 ID₅₀ 中位数为 1616，对 D614G 变异株的 ID₅₀ 中位数为 1488，对 Alpha 变异株的 ID₅₀ 中位数为 940，对 Beta 变异株的 ID₅₀ 中位数为 305 ($P < 0.05$)，对 Gamma 变异株的 ID₅₀ 中位数为

478 ($P<0.05$)，对 Kappa 变异株的 ID_{50} 中位数为 520 ($P<0.05$)，对 Delta 变异株的 ID_{50} 中位数为 701 ($P<0.05$)，对 Lambda 变异株的 ID_{50} 中位数为 402 ($P<0.05$)，对 Omicron 变异株的 ID_{50} 中位数为 50 ($P<0.05$)。

以 ID_{50} 中位数作为 COVID-19 患者血浆对突变株的中和能力的衡量标准，与对 Wuhan 株假病毒的敏感性相比，D614G 变异株敏感性下降 1.09 倍，Alpha 变异株敏感性下降 1.72 倍，Beta 变异株敏感性下降 5.30 倍，Gamma 变异株敏感性下降 3.38 倍，Kappa 变异株敏感性下降 3.11 倍，Delta 变异株敏感性下降 2.31 倍，Lambda 变异株敏感性下降 4.02 倍，Omicron 变异株敏感性下降 32.32 倍。

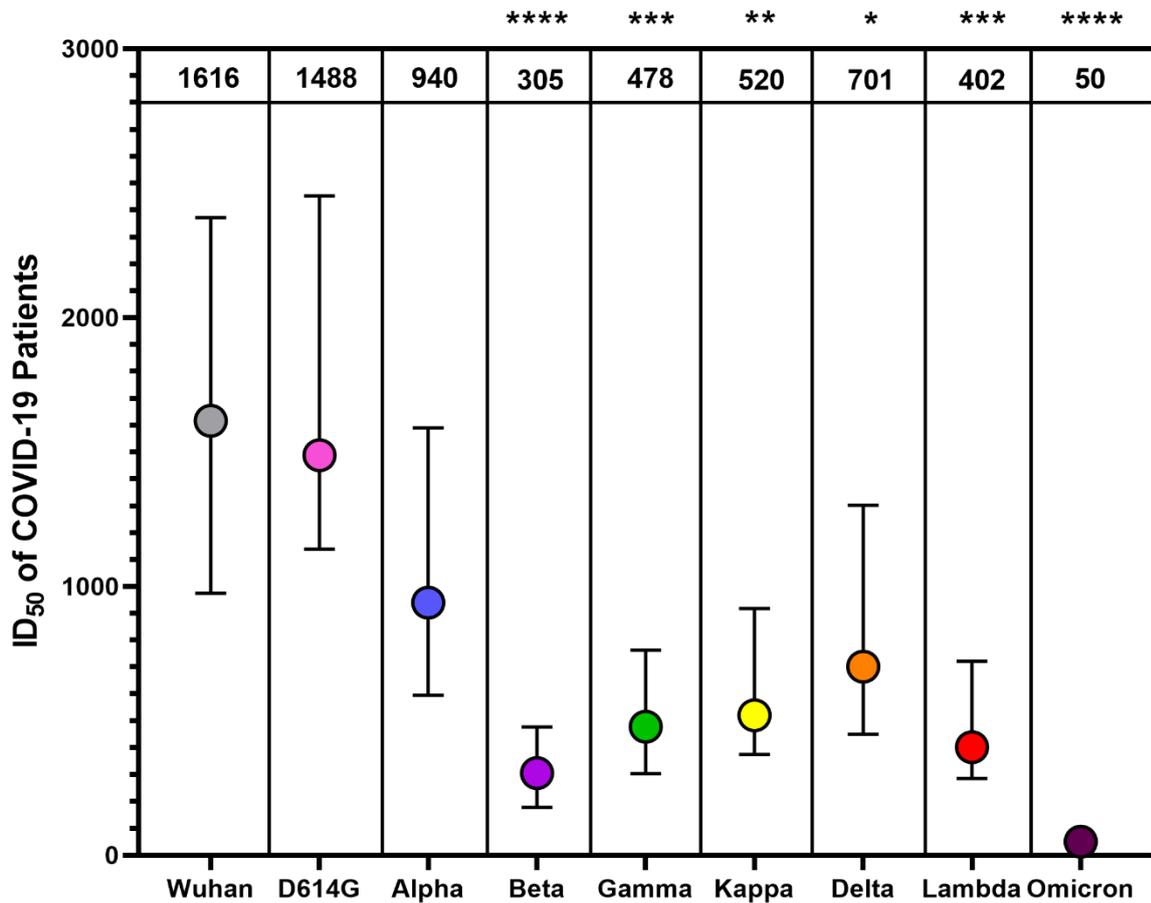


图 1.12 感染 Wuhan 株 COVID-19 患者血浆对 8 种 SARS-CoV-2 变异株的中和能力分析

Fig. 1.12 Analysis of neutralization ability of Wuhan strain infected COVID-19 patients' plasma to 8 SARS-CoV-2 variants

注：Mann-Whitney 检验变异株被中和的 ID_{50} 中位数和 P 值显示在每根条形图的顶部。* 表示经 Mann-Whitney 检验存在显著差异 ($P<0.05$)，** 表示经 Mann-Whitney 检验存在极显著差异 ($P<0.01$)，*** 表示经 Mann-Whitney 检验存在极显著差异 ($P<0.001$)，**** 表示经 Mann-Whitney 检验存在极显著差异 ($P<0.0001$)

1.3.8.3 普通型患者和重型患者血浆中和变异株差异分析

本研究分析了普通型和重型 COVID-19 患者血浆对 8 种 SARS-CoV-2 变异株的中和能力差异。如图 1.13 A 所示，COVID-19 普通型患者血浆对 8 个变异株的中和能力全部降低，下降幅度从大到小依次是 Omicron（降至 0.074 倍）、Beta（降至 0.262 倍）、Lambda（降至 0.381 倍）、Kappa（降至 0.419 倍）、Delta（降至 0.441 倍）、Gamma（降至 0.451 倍）、D614G（降至 0.746 倍）、Alpha（降至 0.830 倍）。如图 1.13 B 所示，COVID-19 重型患者血浆对其他 8 种变异体的中和能力下降幅度从大到小依次是 Omicron（降至 0.055 倍）、Lambda（降至 0.266 倍）、Alpha（降至 0.295 倍）、Kappa（降至 0.325 倍）、Beta（降至 0.333 倍）、Gamma（降至 0.369 倍）、Delta（降至 0.572 倍）、D614G（降至 1.035 倍）。

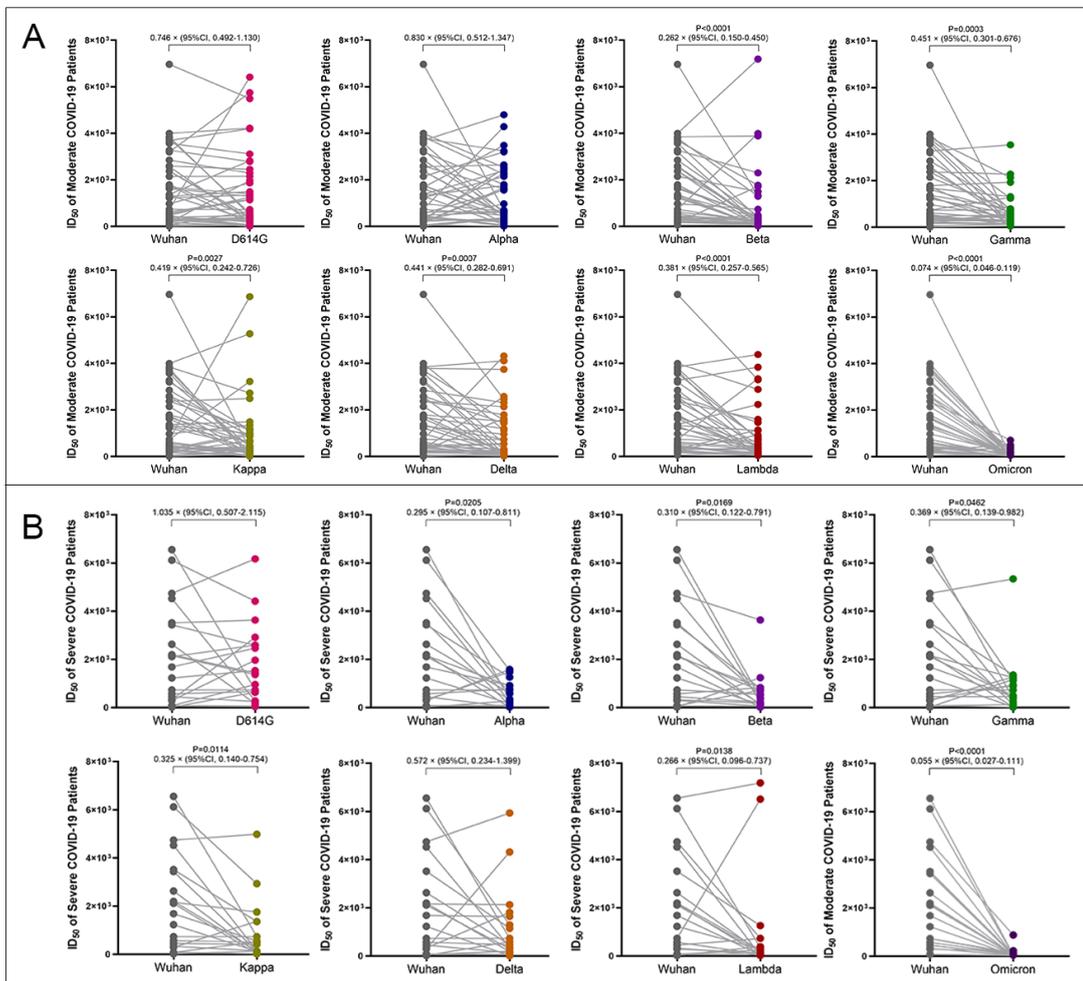


图 1.13 普通型和重型 COVID-19 患者对变异株的中和水平

Fig. 1.13 Neutralization level of variants in moderate and severe COVID-19 patients

注：A：普通型 COVID-19 患者对变异株的中和水平；B：重型 COVID-19 患者对变异株的中和水平。图 A 和图 B 只显示小于 0.05 的 P 值

1.3.8.4 COVID-19 患者对 Wuhan 株和变异株中和能力相关性分析

本研究通过 Spearman 检验分析了 COVID-19 患者血浆对 8 个变异假病毒株与 Wuhan 假病毒株中和能力的相关性, 探索不同 COVID-19 患者血浆中和能力对不同变异株的一致性。如表 1.14 所示, 感染 Wuhan 毒株的 71 例 COVID-19 患者血浆对 Wuhan 假病毒株的中和能力和 D614G、Alpha、Beta、Gamma、Kappa、Delta、Lambda 假病毒的中和能力均呈强相关 ($r \geq 0.670$, $P < 0.0001$); 感染 Wuhan 毒株的 47 例普通型 COVID-19 患者血浆对 Wuhan 株假病毒的中和能力和 D614G、Alpha、Beta、Gamma、Kappa、Delta、Lambda 假病毒的中和能力相关性更强 ($r \geq 0.757$, $P < 0.0001$), 而在 21 例重型患者中相关性较弱 ($r \geq 0.453$, $P < 0.0001$); COVID-19 患者血浆中和 Wuhan 毒株的能力与中和 Omicron 变异株的能力无相关性。结果证实, 感染早期 Wuhan 毒株的 COVID-19 患者血浆中和能力在多种变异株中基本保持一致, 即抗体滴度高的患者血浆抗变异株的能力强, 但 Omicron 毒株是个例外。

表 1.14 COVID-19 患者对 Wuhan 株和变异株中和能力的相关性

Table 1.14 Correlation between neutralization ability of Wuhan strain and variant strain in COVID-19 patients

毒株	Wuhan 假病毒株						
	分组	全部患者 (n=71)		普通型患者 (n=47)		重型患者 (n=21)	
	统计值	r	P 值	r	P 值	r	P 值
D614G 假病毒株		0.937	<0.0001	0.961	<0.0001	0.93	<0.0001
Alpha 假病毒株		0.689	<0.0001	0.806	<0.0001	0.517	0.02
Beta 假病毒株		0.67	<0.0001	0.757	<0.0001	0.453	0.045
Gamma 假病毒株		0.77	<0.0001	0.827	<0.0001	0.678	0.001
Kappa 假病毒株		0.806	<0.0001	0.866	<0.0001	0.693	0.001
Delta 假病毒株		0.831	<0.0001	0.871	<0.0001	0.78	<0.0001
Lambda 假病毒株		0.762	<0.0001	0.842	<0.0001	0.559	0.01
Omicron 假病毒株		0.167	0.165	0.258	0.079	0.173	0.0453

1.3.9 COVID-19 患者 HERV-K (HML-2) 与 IFN 相关性分析

1.3.9.1 COVID-19 患者 HERV-K (HML-2) 的激活研究

本研究检测了 COVID-19 患者全血和感染 SARS-CoV-2 的 Vero E6 细胞中 HERV-K (HML-2) *gag*、*env*、*pol* 基因的转录水平变化，如图 1.14 所示，HERV-K (HML-2) *gag*、*env*、*pol* 在普通型和重型 COVID-19 患者中表达均升高 ($P < 0.05$)，在两种临床分型之间无差异 ($P > 0.05$)。在感染 SARS-CoV-2 Wuhan 株的 Vero E6 细胞中，HERV-K (HML-2) *gag*、*env*、*pol* 基因的转录水平也升高，HERV-K (HML-2) *gag* 基因无统计学差异 ($P > 0.05$)，HERV-K (HML-2) *env*、*pol* 基因有统计学差异 ($P < 0.05$)。

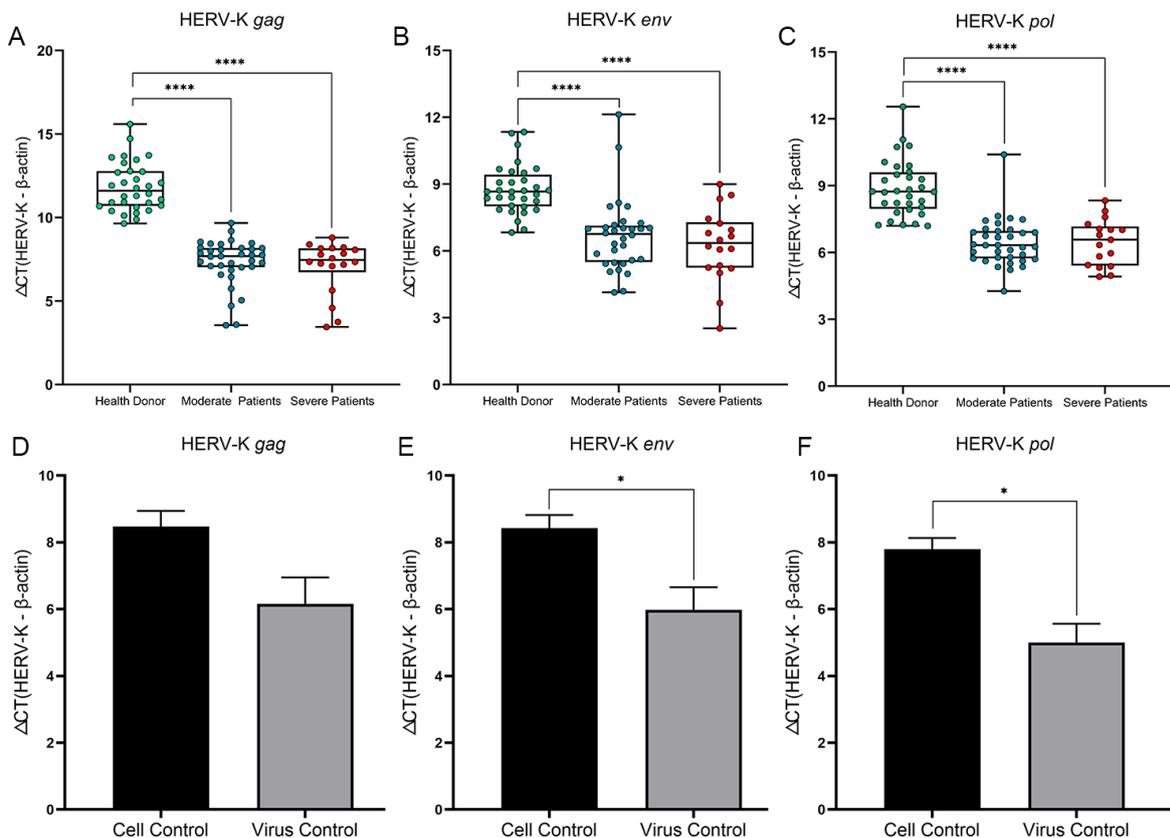


图 1.14 COVID-19 患者和 Vero E6 细胞中 HERV-K(HML-2) *gag*、*env*、*pol* 基因表达情况

Fig. 1.14 Expression of HERV-K (HML-2) *gag*, *env* and *pol* genes in Vero E6 cells and COVID-19 patients

注：图 A-C 分别表示 HERV-K (HML-2) *gag*、*env*、*pol* 基因在 COVID-19 患者中的表达情况；图 D-F 分别表示 HERV-K (HML-2) *gag*、*env*、*pol* 基因在感染 SARS-CoV-2 的 Vero 细胞中的表达情况。每个点代表三次重复，* 表示经 Mann-Whitney 检验存在显著差异 ($P < 0.05$)，**** 表示经 Mann-Whitney 检验存在极显著差异 ($P < 0.0001$)

1.3.9.2 COVID-19 患者 IFN-I 相关基因激活研究

本研究分析了 COVID-19 患者全血和感染 SARS-CoV-2 的 Vero E6 细胞中干扰素激活通路相关基因的转录水平。如图 1.15 所示，干扰素 $\beta 1$ (interferon beta 1) 基因 *IFNB1*、干扰素刺激基因 (interferon-stimulated genes, ISGs) *ISG15* 和四肽重复序列 (tetra-tyrosine repeats, IFITs) 基因 *IFIT1* 在普通型和重型 COVID-19 患者中表达均升高 ($P < 0.05$)，但在两种临床分型之间无差异 ($P > 0.05$)。在感染 SARS-CoV-2 Wuhan 株的 Vero E6 细胞中，*IFIT1* 基因的表达增加 ($P < 0.05$)，*ISG15* 基因在感染和未感染的 Vero E6 细胞中表达没有差异，*IFNB1* 基因在两组 Vero E6 细胞中没有检测到。提示 COVID-19 患者外周血中上调转录的干扰素激活通路蛋白基因可能是血液细胞刺激后的应激反应所致。

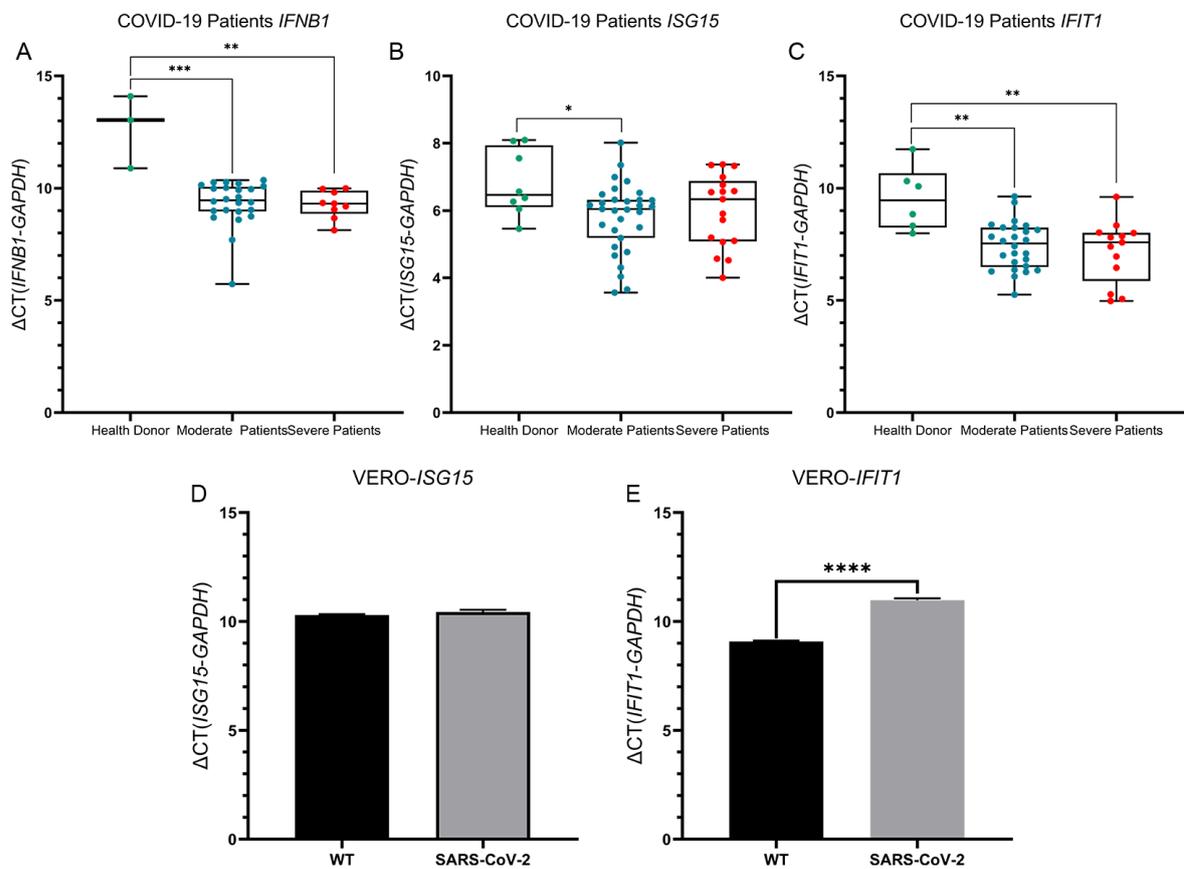


图 1.15 COVID-19 患者和 Vero E6 细胞中干扰素相关基因表达情况

Fig. 1.15 Expression of Interferon-related genes in Vero E6 cells and COVID-19 patients

注：图 A-C 分别表示 *IFNB1*、*ISG15*、*IFIT1* 基因在 COVID-19 患者中的表达情况；图 D-E 分别表示 *ISG15*、*IFIT1* 基因在感染 SARS-CoV-2 的 Vero 细胞中的表达情况。每个点代表三次重复，* 表示经 Mann-Whitney 检验存在显著差异 ($P < 0.05$)，** 表示经 Mann-Whitney 检验存在极显著差异 ($P < 0.01$)，*** 表示经 Mann-Whitney 检验存在极显著差异 ($P < 0.001$)

1.3.9.3 高表达 HERV-K (HML-2) *gag*、*env*、*pol* 基因的染色体分布研究

鉴于 HERV-K (HML-2) *gag*、*env*、*pol* 基因转录水平检测针对的是多个位点，本研究使用 illumina 平台对 COVID-19 患者全血中高表达的 HERV-K (HML-2) *gag*、*env*、*pol* 基因进行二代测序，测序结果与参考基因组 GRCh38/hg38 进行比对，挑选出同源性大约 97% 的染色体位点汇总成图 1.16。结果显示，在 COVID-19 患者中高表达的 HERV-K (HML-2) *gag* 位于 25 个不同的人染色体位点，HERV-K (HML-2) *env* 位于 36 个不同的人染色体位点，HERV-K (HML-2) *pol* 位于 37 个不同的人染色体位点。HERV-K (HML-2) *gag* 的最高表达位点在 12 号染色体上（约 58335037~58335251 处），最低表达位点在 1 号染色体（约 75378750~75378940 处）；HERV-K (HML-2) *env* 的最高表达位点在 3 号染色体（约 101699823~101699990 处），最低表达位点在 19 号染色体（约 22580569~22580735 处）；HERV-K (HML-2) *pol* 的最高表达位点在 7 号染色体（约 4586046~4586188 处），最低表达位点在 1 号染色体（约 13212726~13212855 处）

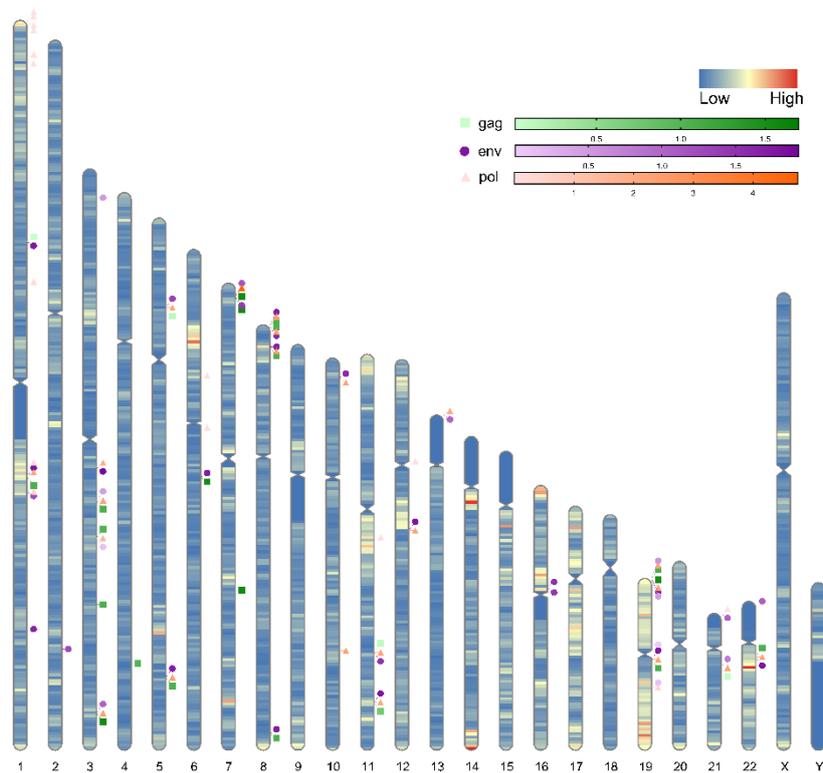


图 1.16 高表达 HERV-K (HML-2) *gag*、*env*、*pol* 染色体分布图

Fig1.16 Chromosome distribution map of high expression of HERV-K (HML-2) *gag*, *env* and *pol*
注：HERV-K (HML-2) *gag* 高表达位点用绿色正方形表示，HERV-K (HML-2) *env* 高表达位点用紫色圆圈表示，HERV-K (HML-2) *pol* 高表达位点用橙色三角形表示，热图表示不同位点的相对基因表达百分比。

1.3.9.4 HERV-K (HML-2) 高表达基因的 GO 分析

GO 分析能提供基因产物的相关生物学过程 (Biological Process, BP)、细胞成分 (Cellular Component, CC)、分子功能 (Molecular Function, MF) 的描述^[141,142]。本研究将筛选到的高表达 HERV-K (HML-2) *gag*、*env*、*pol* 基因进行基因注释和 GO 分析, 结果如图 1.17 所示。HERV-K (HML-2) *gag* 高表达的 34 个单基因位点可以分为 39 个 GO term, 包括 12 个 BP term, 17 个 CC term 和 10 个 MF term, 其中最具代表性的 GO term 参与了生物调节 (biological regulation, GO: 0065007)、膜 (membrane, GO: 0016020) 和蛋白质结合 (protein binding, GO: 0005488); HERV-K (HML-2) *env* 高表达的 48 个单基因位点可以分为 42 个 GO term, 包括 12 个 BP term、18 个 CC term 和 12 个 MF term, 其中最具代表性的 GO term 参与了生物调节 (biological regulation, GO: 0065007)、膜 (membrane, GO: 0016020) 和蛋白质结合 (protein binding, GO: 0005488); HERV-K (HML-2) *pol* 高表达的 51 个单基因位点可以分为 42 个 GO term, 包括 12 个 BP term、18 个 CC term 和 12 个 MF term, 其中最具代表性的 GO term 参与了生物调节 (biological regulation, GO: 0065007)、膜 (membrane, GO: 0016020) 和蛋白质结合 (protein binding, GO: 0005488)。

京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 数据库中收录了细胞内各种信号通路集合, 代表了细胞蛋白分子相互作用和反应网络^[143]。为了阐明 COVID-19 患者外周血细胞中高表达的 HERV-K (HML-2) *gag*、*env*、*pol* 基因可能参与的细胞信号转导途径, 本研究绘制了 COVID-19 患者差异表达基因图谱 (Differentially Expressed Genes, DEGs), 发现所有基因在 30 条 DEG 中富集 ($P \leq 0.05$), 前 10 条富集途径的气泡图如图 1.17 D 所示。DEG 高度聚集在“SUMO 蛋白水解”、“配体-受体相互作用”、“ β 防御素”、“防御素”和“Netrin-1 信号”这几条信号通路中。值得注意的是, IFN- γ 信号通路是 KEGG 分析中第二个显著富集途径 (富集率为 8.0898, $P < 0.05$)。

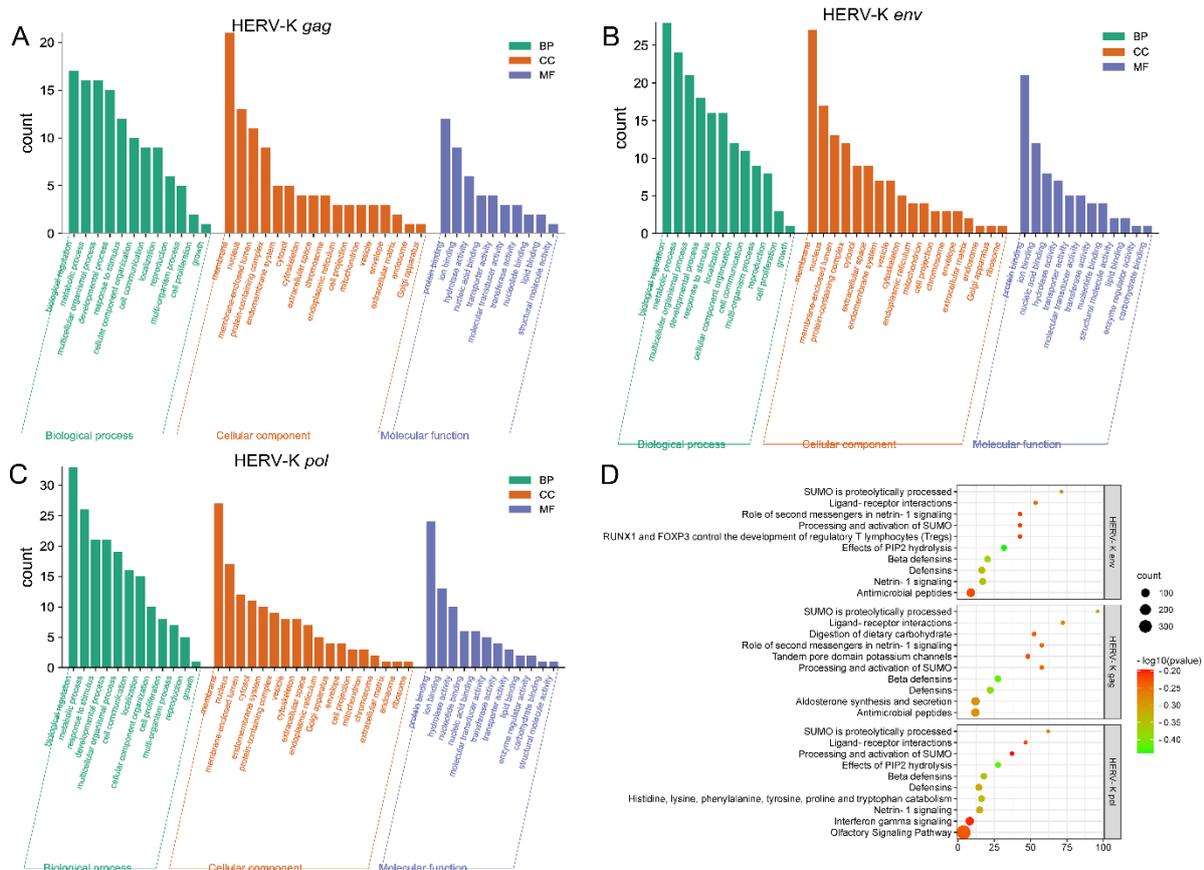


图 1.17 不同样本间差异表达基因的 GO 功能分类和 KEGG 分析

Fig 1.17 GO functional classification and KEGG analysis of DEGs among different samples

注：图 A-C 分别表示高表达 HERV-K (HML-2) *gag*、*env*、*pol* 基因染色体位点的靶基因 GO 分析结果；D：HERV-K (HML-2) *gag*、*env*、*pol* 的 KEGG 气泡图。图 D 点的颜色和大小分别代表 Q 值的范围和映射到指定路径上的 DEG 数。

1.4 讨论

本部分以 82 例 COVID-19 住院患者为研究对象进行不同临床状态免疫状况差异研究，探索 COVID-19 患者重症发生的相关机制，发现，COVID-19 重型患者比普通型患者的免疫因子失衡现象更常见，自然免疫与疫苗免疫存在明显差异，且 COVID-19 患者中高转录水平的 HERV-K 基因可能参与了激活 IFN 的 cGAS-STING 通路，为 COVID-19 患者重症发生的内在机制提供了研究基础。

研究显示，病毒载量越高、抗体反应越强的 COVID-19 患者病情往往越严重，提示 COVID-19 患者的免疫过激反应可能影响了疾病进程 [49,144]。在本研究中，我们发现重症患者的平均中和抗体滴度、IgG-S 和 IgG-N 抗体含量显著高于普通型患者，进一步证实临床分型越严重的 COVID-19 患者对病毒的免疫反应越强 [145]。

中和抗体在病毒感染早期可以阻断病毒感染，在临床上已经证实其对 COVID-19 患者有良好疗效，然而在重症患者中中和抗体以较高水平存在，说明在感染后期中和抗体已经对机体没有保护性作用^[146,147]。该结果也提示，中和抗体滴度高的 COVID-19 重症患者在疾病进展后期出现严重临床症状不是 SARS-CoV-2 本身造成的，而可能是机体过度免疫反应损伤所致。

SARS-CoV-2 S 蛋白上存在与靶细胞受体结合的位点，是诱导抗病毒免疫的主要抗原^[148-150]。本研究结果显示普通型和重型 COVID-19 患者血浆的中和抗体滴度与 IgG-S 抗体浓度呈正相关关系，表明深入研究 SARS-CoV-2 S 蛋白对解释机体抗病毒免疫反应具有重要作用。SARS-CoV-2 N 蛋白往往诱发 COVID-19 患者早期免疫反应，产生大量无中和活性的 IgG-N 抗体，导致免疫系统过度反应而产生抗体依赖性增强效应（Antibody Dependent Enhancement, ADE）^[151,152]。我们发现早期 COVID-19 患者血浆中的 IgG-N 抗体浓度均显著高于 IgG-S 抗体浓度，且早期患者血浆 IgA-N 和 IgM-N 抗体阳性率高于 IgA-S 和 IgM-S 抗体，提示使用 SARS-CoV-2 N 蛋白制备的血清检测试剂盒更易检测到早期 COVID-19 患者。血浆中 IgA 可以传递激活信号，导致细胞吞噬、抗体依赖性细胞毒性作用（Antibody-dependent Cell-mediated Cytotoxicity, ADCC）、抗原提呈增加、细胞因子释放，早期的 COVID-19 患者血浆中 IgA 抗体随发病时间增加而升高从而进行抗病毒反应^[153-157]。

IgG 抗体不同的亚型往往参与调控不同的免疫途径，IgG3 和 IgG1 表现出经典补体级联中最有效的激活，而 IgG4 通常不能激活这一级联^[158]。在 COVID-19 患者抗 SARS-CoV-2 N 和抗 SARS-CoV-2 S 蛋白抗体中，IgG1 是最常见的 IgG 亚类，IgG3-S 抗体阳性率明显高于 IgG3-N 抗体的阳性率。因此，SARS-CoV-2 的 S 蛋白更有可能触发包括补体激活、抗体依赖性细胞吞噬（Antibody-dependent Phagocytosis, ADCP）或 ADCC 在内的效应功能，而 SARS-CoV-2 的 N 蛋白作为一种慢性抗原刺激大多数终末 IgG4 亚类的产生^[158,159]。

本研究发现既往感染 SARS-CoV-2 Wuhan 毒株的患者血浆对含有多 RBD 突变位点的 SARS-CoV-2 变异株中和能力低，变异株更容易发生免疫逃逸。如图 1.18 所示，在 RBD 结构域分别只有 0 个和 1 个突变位点的 D614G 变异株和 Alpha 变异株对 COVID-19 患者血浆中和抗体最敏感，在 RBD 结构域有 15 个突变位点的 Omicron 变异株对 COVID-19 患者血浆中和抗体最不敏感。大多既往感染者血浆对 Omicron 变异株假病毒中和能力骤减，导致 COVID-19 患者血浆对 Omicron 变异株假病毒和 Wuhan 株假病毒的中和抗体滴度相关性差。SARS-CoV-2 S 蛋白上 RBD 结构域的变异是影响既往感染患者血浆对变异株中和能力的关键因素。

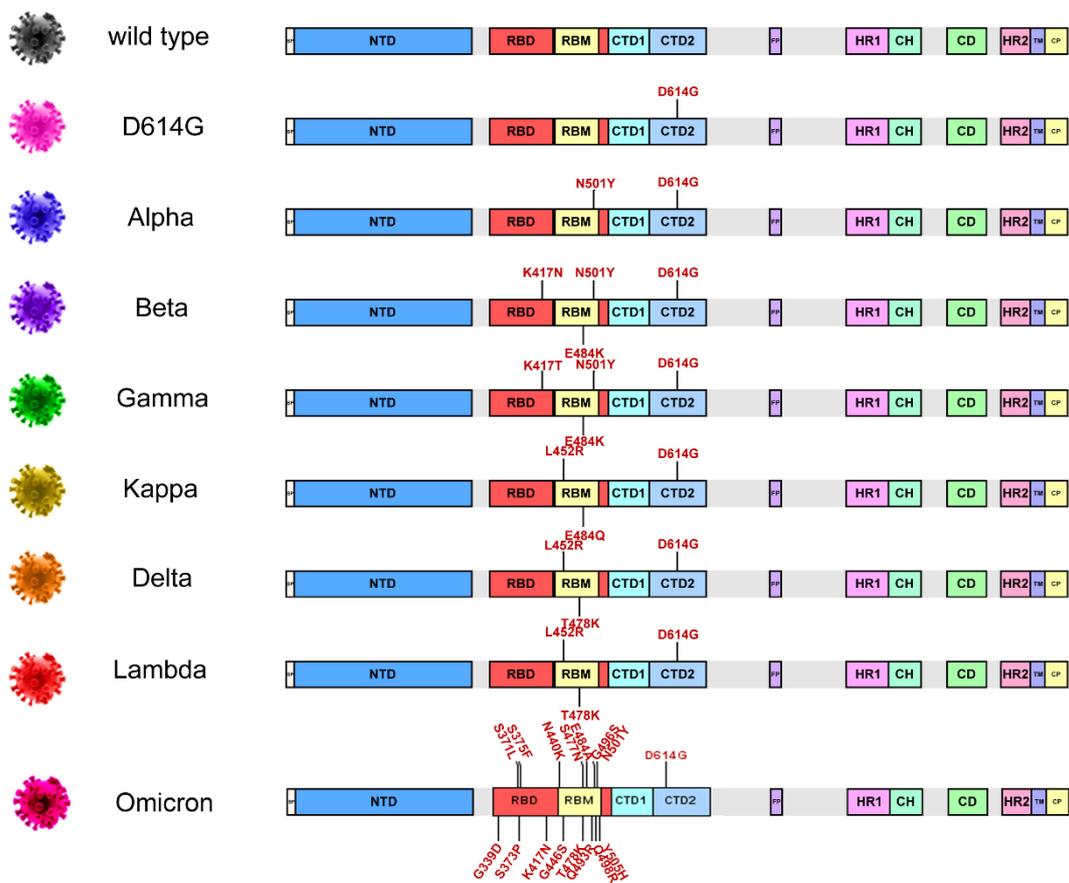


图 1.18 SARS-CoV-2 变异株 RBD 突变位点示意图

Fig. 1.18 Schematic map of RBD mutation sites on SARS-CoV-2 variants

本研究发现 COVID-19 患者血浆中细胞因子出现紊乱，部分细胞因子在不同的临床分型的患者中出现差异。COVID-19 重型患者血浆中 IL-1 β 、IL-6、CXCL9 浓度高于普通型患者，IL-1 β 、IL-6、CXCL9 有潜力作为 COVID-19 患者重症发生的诊断指标^[160,161]。以往的研究发现 COVID-19 患者血浆 IL-2 浓度高于健康人，本研究的结果与之相反，造成这种差异可能与样本来源和临床治疗有关，提示感染同一病原体的不同人群免疫反应存在差异^[162,163]。细胞因子能参与调控机体的不同生理过程，例如 TGF- β 和 IL-10 的激活能调控 IgA 抗体水平，从而促进 SARS-CoV-2 感染中抗体的转换^[164,165]。IL-1、IL-2、IFN- γ 、TNF- α 等作为 Th1 类细胞因子的主要炎症因子主要起免疫杀伤作用，可诱导发病，IL-4、IL-6 和 IL-10 等作为 Th2 类细胞因子具有抗炎、预防发病、减轻疾病等免疫保护作用。而在 COVID-19 患者中起拮抗作用的 Th1 类和 Th2 类细胞因子会同时激活或抑制，例如 IL-4、IL-6、IFN- γ 、TNF- α 在 COVID-19 患者中均升高，可能是机体的免疫拮抗维持了患者的免疫平衡。细胞因子的种类繁多，单一细胞因子就能参与多种免疫调控通路，仍需进一步挖掘免疫机制与 COVID-19 患者的内在联系^[166,167]。

本研究发现 HERV-K (HML-2) 可以激活 cGAS-STING 通路, 促进干扰素表达, 为 COVID-19 患者的免疫机制提供了新的切入点。COVID-19 患者全血中 HERV-K (HML-2) *gag*、*env*、*pol* 基因和干扰素激活通路相关基因的转录激活, 感染 SARS-CoV-2 的 Vero E6 细胞 HERV-K (HML-2) *gag*、*env*、*pol* 基因激活, 但因基因缺陷 Vero E6 细胞检测不到 IFN- β 的表达, *ISG15* 基因转录没有显著变化, 而具有抑制病毒诱导的先天免疫信号转导的负反馈剂 *IFIT1* 基因表达明显升高^[168,169]。SARS-CoV-2 能与干扰素产生拮抗作用, 因而具有完整分泌干扰素的细胞系产生的疫苗效果或许更好。对本研究将筛选到的高表达 HERV-K (HML-2) *gag*、*env*、*pol* 基因进行基因注释和 GO 分析, 发现高表达的 HERV-K (HML-2) *gag*、*env*、*pol* 基因能参与调节 β 防御素和泛素蛋白修饰分子 (Small Ubiquitin-like Modifier, SUMO) 的水解。 β 防御素具有直接的杀菌功能, 是一类重要的抗菌肽, 在 COVID-19 患者中的表达与患者年龄相关^[170,171]。SUMO 是一种可逆的翻译后修饰, 它能调节干扰素的合成、干扰素信号传递和干扰素刺激基因产物的表达, 在干扰素途径和抗病毒防御中起着关键作用^[172,173]。因而, HERV-K (HML-2) 不仅可以激活 cGAS-STING 通路, 还可通过调节 SUMO 途径、 β 防御素来控制干扰素的分泌, 促进免疫防御。

通过探索 HERV-K 与干扰素的关系, HERV-K 在调节人类疾病中的作用可能是双向的。以往的证据表明 HERV-K 有拮抗抗病毒药物的活性, HERV 在多种癌症中被激活, 大多数学者认为 HERV 存在的意义是消极的, 常开发 HERV 作为疾病发生的生物标志物^[174,175]。本研究发现 COVID-19 患者体内被激活的 HERV-K 能促进激活 cGAS-STING 通路, 调节 SUMO 通路和 β 防御素产生, 从而诱导 IFN-I 的生成, 因而 HERV-K 在人体内能发挥积极的影响。遗憾的是本研究没有充足的 COVID-19 患者全血样本用于蛋白水平的验证。

第二章 SARS-CoV-2 N 蛋白单克隆结合抗体制备

SARS-CoV-2 疫情的突然爆发给全世界都带来了严重的公共卫生危机，而这种突发的未知病原感染并非小概率事件，根据 WHO 统计过去 30 年已有数十种未知病原体出现。对未知病原体感染者的治疗常常使用抗病毒药物，其中抗体是重要的组成部分。目前主要使用的单克隆抗体制备方法有杂交瘤单克隆抗体技术、噬菌体展示技术、转基因小鼠技术、单个 B 细胞抗体制备技术、人类 B 细胞永生生化技术等。杂交瘤单克隆抗体技术的操作步骤繁琐且抗体是鼠源的，使用在人体治疗上极易产生排异。噬菌体展示技术制备抗体的容量和多样性有限，其表达的蛋白与真核细胞折叠、转运机制不同，因此抗体的功能受限。单个 B 细胞抗体制备技术在鉴定和分离单个 B 细胞时采用随机分离或抗原特异性分离，随机分离不需要鉴定抗原但后期工作量大，而抗原特异性分离前期需要在鉴定未知病原体抗原。如果采用 EB 病毒永生生化 B 细胞的原理制备抗体就可从第 1 例病人被发现时开展抗体制备工作，并在 2 个月内就能获得全人源的抗体。因此针对这一需求本研究计划使用 COVID-19 患者全血样本通过 EB 病毒使 B 细胞永生化的原理制备特异性全人源的抗 SARS-CoV-2 N 蛋白单克隆结合抗体，同时初步搭建抗体快速制备技术，为未知病原体的防控及提供技术基础。

2.1 实验材料

2.1.1 实验样本

样本招募及其背景信息收集同 1.1.1.1，收集 COVID-19 患者和健康人全血。

2.1.2 实验所用质粒、毒株、菌株及细胞

(1) 抗体重链表达载体 $\gamma 1$ HC、抗体轻链表达载体 κ LC 和 λ LC 由中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心传染病预防控制国家重点实验室提供。

(2) EB 病毒 (B95-8) 由本实验室提供。

(3) 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自北京天根生化科技有限公司。

(4) HEK293F 细胞由中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心传染病预防控制国家重点实验室提供。

(5) Vero E6 细胞由本实验室提供。

2.1.3 实验使用设备

表 2.1 第二部分研究所使用实验设备
Table 2.1 The second part of the study used experimental equipment

仪器、设备名称	品牌
生物安全柜 ClassII	NuAire
二氧化碳培养箱	Thermo Fisher Scientific
DEM-III型自动酶标洗板机	北京拓普分析仪器有限公司
微生物培养箱	Thermo Fisher Scientific
超微量分光光度计	Implen
电泳仪	北京市六一仪器厂
电子天平	Mettler Toledo
凝胶成像仪	Thermo Fisher Scientific
FluorChem System	ProteinSimple
PCR 扩增仪器	Bio-Rad
台式离心机	Sigma
制冰机	SANYO
水浴锅	Thermo Fisher Scientific
倒置显微镜	OLYMPUS
细胞计数器	Thermo Fisher Scientific
移液器	Eppendorf

2.1.4 实验主要耗材

表 2.2 第二部分研究所使用实验耗材

Table 2.2 The second part of the study used experimental consumables

主要耗材	品牌
细胞培养瓶	Thermo Fisher Scientific
384 孔平底细胞培养板	Thermo Fisher Scientific
96 孔平底细胞培养板	Corning
24 孔平底细胞培养板	Corning
6 孔平底细胞培养板	Corning
96 孔 U 型底细胞培养板	Corning
Ep 管	Axygen
PCR 扩增 8 连管	Axygen
细胞冻存管	Corning
加样槽	Biologix
移液管	Thermo Fisher Scientific
125mL 细胞摇瓶	BIOFIL
0.22 μ m 过滤器	Pall
15mL/50mL 离心管	Corning

2.1.5 实验主要试剂

(1) 本次实验所涉及的实验试剂及实验耗材如表 2.3 所示:

表 2.3 第二部分研究所使用实验试剂

Table 2.3 The second part of the study used experimental reagents

试剂名称	品牌	货号
人淋巴细胞分离液	Sigma	10771
PBS	Gibco	C10010500CP
0.25% Trypsin-EDTA (1 \times)	Gibco	25200-056

DMEM	Gibco	11995-065
FreeStyle™293	Gibco	12338-018
PRMI Medium 1640 (1×)	Gibco	22400-089
新生牛血清	Gibco	16010159
青霉素-链霉素	Gibco	15070063
L-谷氨酰胺	Gibco	A2916801
DMSO	Innochen	D3855
环孢霉素 A (CSA)	Solarbio	C8780
新型冠状病毒 (2019-nCoV) S 蛋白 IgG 抗体检测试剂盒 (化学发光免疫分析法)	北京科卫临床诊断试剂有限公司	合作提供
新型冠状病毒 (2019-nCoV) N 蛋白 IgG 抗体检测试剂盒 (化学发光免疫分析法)	北京科卫临床诊断试剂有限公司	合作提供
MiniBEST Universal RNA Extraction Kit	TaKaRa	9767
dNTPs	Clontech	639125
SMARTScribe Reverse	Clontech	639537
RNase inhibitor	Takara	2311A
Phusion 聚合酶	Thermo Fisher Scientific	F530S
Gel and PCR Clean-Up	Promega	A9282
琼脂糖	上海贝晶生物技术有限公司	BY-R0100
Premix Taq	TaKaRa	RR902A
T4 DNA 连接酶	NEB	#M0202T
pEASY®-T1 Cloning Kit	北京全式金生物技术有限公司	CT101-01
大肠杆菌感受态	北京全式金生物技术有限公司	CD511
<i>Age</i> I-HF	NEB	R3552S
<i>Sal</i> I-HF	NEB	R3138S
<i>Xho</i> I	NEB	R0146S

Opti-MEM 无血清培养基	Gibco	11058021
FreeStyle™ 293 表达培养基	Gibco	12338026
293fetin™转染试剂	Gibco	12347019
人 IgG (Fc 片段) 快速检测卡	北京博奥龙免疫技术有限公司	BF06200-10
HRP-山羊抗人 IgG(H+L)	北京博奥龙免疫技术有限公司	BF03027
考马斯亮蓝染色套装	Solarbio	P1305
蛋白电泳 marker	Thermo Fisher Scientific	26616
Nab™ Protein A/G	Thermo Fisher Scientific	89980
BeyoGel™ Plus PAGE 预制胶	上海碧云天生物技术有限公司	P0455S/P0456S
SARS-CoV-2N 蛋白	上海碧云天生物技术有限公司	P2328-1mg
Human IgG ELISA Kit	北京博奥龙免疫技术有限公司	BDEL-0254-96T
10×TBST 缓冲液	Solarbio	T1081
10×电泳转移缓冲液 (转膜液)	Solarbio	D1060
1×Tris-tricine-SDS-PAGE 电泳缓冲液	Solarbio	T1225

(2) 本次实验所涉及的溶液配置如表 2.4 所示:

表 2.4 培养基配置方法
Table 2.4 Medium allocation method

培养基名称	成分	操作
细胞冻存液	10% DMSO + 90% FBS	充分混匀
1640-10 培养基	1640 培养基 (Gibco) +10% 热灭活胎牛血清 (FBS) +1% 青霉素/链霉素	充分混匀 4°C 保存
CpG 培养基	1640 培养基 (Gibco) +20% 热灭活胎牛血清 (FBS) +1% 青霉素/链霉素+2.5 µg/mL CpG 2006	充分混匀 4°C 保存

2.1.6 引物和化合物合成

本研究涉及的引物和化合物均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

2.2 实验方法

2.2.1 滋养细胞的准备

- (1) 将 50 mL 健康人全血转移至离心管，3000 r/min 离心 10 min，弃上层血浆。
- (2) 加 PBS 将每份血补至 20 mL，彻底混匀，缓慢匀速转移至含有 20 mL 分离液的 50 mL 离心管中，整个过程保持分界线的清晰。
- (3) 设置离心机升速为 8，降速为 2，400 g 离心 30 min。
- (4) 吸取中层白膜，置于洁净的 50 mL 离心管，加 PBS 使总体积为 50 mL，充分混匀。
- (5) 250 g 离心 10 min，弃上清。
- (6) 用 50 mL PBS 重悬，250 g 离心 10 min，弃上清，收集 PBMC。
- (7) 获得的 PBMC 用 1640-10 培养基置于 37°C，5% CO₂ 的二氧化碳培养箱培养。
- (8) 将 PBMC 进行钴 60 照射，照射剂量率 (cGy/min) 为 90.24，照射剂量 (cGy) 为 2000。
- (9) 冻存滋养细胞：用细胞计数仪对滋养细胞计数，250 g 离心 10 min 收集滋养细胞。用新配置的细胞冻存液重悬细胞，并转移至冻存管。每个冻存管含 1×10^7 个滋养细胞，转至细胞冻存盒，梯度降温至 -80°C，24 h 后转移至液氮罐中保存。

2.2.2 患者 PBMC 的分离

在 BSL-3 实验室进行以下操作。

- (1) 取患者全血 500 μ L 冻存，剩余血液约 9 mL 全部转移至 15 mL 离心管，3000 r/min 离心 10 min，取上层血浆冻存。
- (2) 用 PBS 将每份样本总体积补为 10 mL，充分混匀，缓慢匀速地转移至含有 10 mL 分离液的 50 mL 离心管中，整个过程保持分界线的清晰。
- (3) 设置离心机升速为 8，降速为 2，400 g 离心 30 min。
- (4) 吸取中层白膜，置于洁净的 50 mL 离心管，加 PBS 使总体积为 20 mL，充分混匀。
- (5) 250 g 离心 10 min，弃上清。
- (6) 用 20 mL PBS 重悬 PBMC，250 g 离心 10 min，弃上清，收集 PBMC。
- (7) 获得的 PBMC 计数后平均分为两份，其中一份同 2.2.1 步骤 (9) 进行冻存；另一份准备用于 EB 病毒感染。

2.2.3 EB 病毒感染

(1) 取冻存的 EB 病毒培养液，水浴解冻。

(2) 准备试剂：

CpG 2006：用 1640-10 培养基溶解 CpG 2006，使其终浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

CSA：用 1640-10 培养基溶解 CSA，使其终浓度为 3 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。

(3) 每 2×10^6 个 PBMC 用 0.85 mL 上述含有 CSA 的培养基重悬，并转移至 24 孔平底细胞培养板。每孔加 150 μL 上述 CpG 2006 和 0.5 mL EB 病毒培养液。

(4) 37°C 5% CO_2 的二氧化碳培养箱过夜培养，24 h 后将细胞转入 1.5 mL Ep 管，250 g 离心 10 min，弃上清，用 CpG 培养基重悬细胞，尽量分离为单个细胞状态，转入 6 孔平底细胞培养板，置于 37°C 5% CO_2 的二氧化碳培养箱中孵育。

(5) 培养 7 天后，弃上清 4 mL，加 4 mL 新配置的 1640-10 培养基，再置于 37°C ，5% CO_2 的二氧化碳培养箱中孵育 7 天，期间进行显微镜观察并拍照记录。

表 2.5 CpG 2006 序列

Table 2.5 CpG 2006 sequences

名称	序列 (5'-3')
CpG 2006	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T

注：*表示 Phosphorothioate

2.2.4 第一次亚克隆筛选

(1) 准备滋养细胞：复苏冻存的滋养细胞，用 CpG 培养基将滋养细胞稀释至 5×10^5 个/mL。

(2) 准备永生化细胞：将永生化成功的细胞稀释至 200 个/mL，向 384 孔平底细胞培养板内每孔加入 45 μL 稀释的永生化细胞悬液和 45 μL 稀释的滋养细胞悬液。

(3) 共培养：将 384 孔平底细胞培养板用锡箔纸裹紧，倾斜置于 37°C 5% CO_2 的二氧化碳培养箱中孵育。

(4) 扩大培养：观察含有永生化细胞的 384 孔平底细胞培养板，发现超 2/3 孔出现细胞增殖情况时，将含有增殖细胞的孔编号后转入 96 孔平底细胞培养板，置于 37°C 5% CO_2 的二氧化碳培养箱中孵育。

(5) 阳性孔检测：培养 6 天后取细胞上清，用科卫公司提供的 SARS-CoV-2 S、N 蛋白 ELISA 检测试剂盒检测确定阳性孔。

(6) 扩大阳性细胞：对步骤 (5) 中的阳性孔扩大培养，分别转入 6 孔平底细胞培养板中，每孔加入 3 mL 新鲜配置的 CpG 培养基，置于 37°C 5% CO_2 的二氧化碳培养箱中孵育 14 天。

2.2.5 第二次亚克隆筛选

(1) 准备滋养细胞：复苏冻存的滋养细胞，用 CpG 培养基将滋养细胞稀释至 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 。

(2) 稀释永生化细胞：离心收集 2.2.4 中 SARS-CoV-2 抗体检测阳性值前 3 的阳性细胞，剩余阳性细胞全部冻存，用含 CpG 的培养基进行稀释并计数，稀释细胞至 10、20、40、80 个细胞/mL。

(3) 共培养：向 96 孔平底细胞培养板每孔加入 100 μL 步骤 (1) 中稀释的滋养细胞悬液，再加入 100 μL 步骤 (2) 中稀释的永生化细胞悬液，每种永生化细胞稀释梯度设置 96 个复孔。用锡箔纸裹紧，倾斜置于 37°C 5% CO_2 的二氧化碳培养箱中孵育。

(4) 扩大培养：培养 14 天后，将出现细胞增殖情况的孔编号后分别从 96 孔平底细胞培养板依次向 24 孔平底细胞培养板、12 孔平底细胞培养板、6 孔平底细胞培养板转移并扩大培养。

(5) 阳性孔检测：取培养上清用科卫公司提供的 SARS-CoV-2 S、N 蛋白 ELISA 检测试剂盒确定阳性细胞。

2.2.6 第三次亚克隆筛选

(1) 准备滋养细胞：复苏冻存的滋养细胞，用 CpG 培养基将滋养细胞稀释至 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 。

(2) 稀释永生化细胞：离心收集 2.2.5 中 SARS-CoV-2 抗体检测为阳性的细胞，用含 CpG 的培养基进行稀释并计数，稀释细胞至 10、20、40、80 个细胞/mL。

(3) 共培养：向 96 孔平底细胞培养板每孔加入 100 μL 步骤 (1) 中稀释的滋养细胞悬液，再加入 100 μL 步骤 (2) 中稀释的永生化细胞悬液，每种永生化细胞稀释梯度设置 96 个复孔。用锡箔纸裹紧，倾斜置于 37°C 5% CO_2 的二氧化碳培养箱中孵育。

(4) 扩大培养：培养 14 天后，将出现细胞增殖情况的孔编号后分别从 96 孔平底细胞培养板依次向 24 孔平底细胞培养板、12 孔平底细胞培养板、6 孔平底细胞培养板转移并扩大培养。

(5) 阳性孔检测：取培养上清用科卫公司提供的 SARS-CoV-2 S、N 蛋白 ELISA 检测试剂盒确定阳性细胞。

2.2.7 阳性永生化细胞 RNA 的提取

-
-
- (1) 将 2.2.6 中阳性永生化细胞计数后转入 15mL 离心管中, 4 °C 8000 g 离心 2 min, 弃上清。
 - (2) 加入 10mL 1×PBS 重悬细胞, 4 °C 8000 g 离心 2 min, 弃上清, 收集细胞。
 - (3) 加入 350μL Buffer RL 至收集的细胞中, 充分混匀直至裂解液中无明显沉淀, 室温静置 2 min。
 - (4) 将步骤 (3) 中液体全部转移至 gDNA Eraser Spin Column 中, 12000 r/min 离心 1 min, 弃 gDNA Eraser Spin Column, 保留 2 mL 管中滤液。。
 - (5) 向滤液加入 350 μL 70% 乙醇, 充分混合后立即将混合液全部转入至 RNA Spin Column。
 - (6) 12000 r/min 离心 1 min, 弃滤液。将 RNA Spin Column 放回至 2 mL Collection Tube 中。
 - (7) 将 500 μL 的 Buffer RWA 加入至 RNA Spin Column 中, 12000 r/min 离心 30 s, 弃滤液。
 - (8) 将 600 μL 的 Buffer RWB 加入至 RNA Spin Column 中, 12000 r/min 离心 30 s, 弃滤液。重复此步骤一次。
 - (9) 将 RNA Spin Column 置于 2 mL Collection Tube 上, 12000 r/min 离心 2 min。
 - (10) 将 RNA Spin Column 置于洁净的 1.5 mL RNase Free Collection Tube, 在 RNA Spin Column 膜中央处加入 50μL 的 RNase Freed H₂O, 室温静置 5 min。
 - (11) 12000 r/min 离心 2 min, 洗脱 RNA。
 - (12) 超微量分光光度计检测 RNA 浓度。

2.2.8 阳性永生化细胞 RNA 逆转录

- (1) 将 2.2.7 中提取的 RNA 稀释至 50 ng/μL。
- (2) 准备逆转录反应体系 mix 1, 引物序列见表 2.10, mix 1 的配方见表 2.6。

表 2.6 mix1 反应体系
Table 2.6 mix1 reaction system

组分	所需含量	终浓度	所需体积/ μL
RNA	100 ng	50 ng/ μL	2
hIGK RT/ hIGL RT/ hIGHG RT	10 pM	10 μM	1
dNTPs	10 nM	10 mM	1

(3) 将 mix1 混合液置于 72 °C 反应 3 min, 去 RNA 二级结构。

(4) 准备逆转录反应体系 mix 2, mix 2 的配方见表 2.7。

表 2.7 mix2 反应体系
Table 2.7 mix2 reaction system

组分	所需含量	终浓度	所需体积/ μL
H ₂ O	-	-	1.7
5×SMARTS Scribe Buffer	-	-	2
DDT	20 nM	20 mM	1
Template-switch oligo	30 pM	100 μM	0.3
RNAse inhibitor	20 U	40 U/ μL	0.5
SMARTScribe Reverse Transcriptase	50 U	100 U/ μL	0.5

(5) 将 6 μL mix 2 混合液加到变性后的 mix1 混合液中。

(6) 将混合液放置于 PCR 扩增仪中进行逆转录, 逆转录程序如表 2.8。

表 2.8 抗体可变区逆转录反应体系
Table 2.8 Antibody variable region reverse transcription reaction system

反应温度	反应时间	反应目的
42 °C	60 min	孵育
70 °C	5 min	终止反应
4 °C	5 min	保持反应

表 2.9 反转录引物序列

Table 2.9 Reverse transcription primers sequences

名称	序列 (5'-3')
Template-switch oligo	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACAT/rG//rG//rG/
GK RT	GATTGGAGGGCGTTATCCACC
GL RT	ACGGCTCCCGGGTAGAAGTCAC
GHG RT	GCCGGGAAGGTGTGCACG

注: /rG/表示鸟嘌呤核苷酸

2.2.9 抗体可变区的 PCR 扩增

第 1 轮巢氏 PCR 扩增时, 5' 端采用通用引物 Template-switch oligo, 3' 端使用抗体重链恒定区特异性引物 GHG RT、抗体 κ 轻链恒定区特异性引物 GK RT、抗体 λ 轻链恒定区特异性引物 GL RT。第 2 轮巢氏 PCR 扩增时, 使用通用引物 ISPCR、抗体重链恒定区特异性引物 GHG PCR、抗体 κ 轻链恒定区特异性引物 GK PCR、抗体 λ 轻链恒定区特异性引物 GL PCR。

(1) 按表 2.10 准备 PCR 扩增体系, 引物序列见表 2.12。

表 2.10 抗体可变区 PCR 反应体系

Table 2.10 Antibody variable region PCR reaction system

组分	所需含量	终浓度	所需体积/ μ L
5 \times PCR Buffer	-	-	10
dNTPs	10 nM	10 mM	1
RT 反应合成的 cDNA	-	-	3
通用正向引物 ISPCR	25 pM	10 μ M	2.5
抗体链反向引物	25 pM	10 μ M	2.5
H ₂ O	-	-	30.5
Phusion 聚合酶	1 U	2 U/ μ L	0.5

(2) 按表 2.11 进行 PCR 扩增反应。

表 2.11 抗体可变区 PCR 反应程序

Table 2.11 Antibody variable region PCR reaction program

反应温度	反应时间	循环数
98 °C	30 s	1
98 °C	15 s	} ×10 cycles
63°C~57.5°C (每循环降温 0.5°C)	30 s	
72 °C	30 s	
98 °C	15 s	} ×15 cycles
56 °C	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	7 min	1
4 °C	Holding	1

(3) 用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳鉴定, PCR 产物上样量为 5 μ L, 电泳槽电压为 90 V。抗体重链目的片段大小约 750 bp, 抗体轻链目的片段大小约 500 bp。

表 2.12 抗体可变区扩增引物序列

Table 2.12 Antibody variable region amplification primer sequences

名称	序列 (5'-3')
ISPCR	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAG
GK PCR	TTTGGCCTCTCTGGGATAGAAG
GL PCR	CTCAGAGGAGGGCGGGAACAG
GHG PCR	AGGGCGCCTGAGTTCCACG

2.2.10 抗体可变区纯化并测序鉴定

(1) 将 2.2.9 中 PCR 产物全部进行琼脂糖凝胶电泳, 电压为 90 V, 将目的片段切下 (抗体重链约 750 bp, 抗体轻链约 500 bp), 并置于洁净的 1.5 mL Ep 管内。

(2) 用天平称量每块胶的重量, 并按每 10 mg 胶加入 10 μ L 膜结合液的比例, 向样品中加入膜结合液。

(3) 65 $^{\circ}$ C 水浴, 间隔混匀直至胶融化。

(4) 将溶解的凝胶混合物全部转移至纯化柱上, 室温孵育 1 min。

(5) 16000 g 离心 1 min, 弃滤液。

(6) 加入 700 μ L 膜洗脱液, 16000 g 离心 1 min, 弃滤液。

(7) 加入 500 μ L 膜洗脱液, 16000 g 离心 5 min, 弃滤液。

(8) 16000 g 开盖离心 1 min, 使残留酒精彻底去除, 将柱子转移到洁净的 1.5 mL Ep 管上。

(9) 向膜中央加 50 μ L 无核酸水, 室温孵育 1 min, 16000 g 离心 1 min, 收集滤液。

(10) 用超微量分光光度计检测浓度。

(11) 取 20 μ L 纯化产物送北京诺赛基因组研究中心有限公司进行 Sanger 测序, 将测序结果用 IMGT 数据库进行比对, 确定抗体轻重链可变区序列结构。

2.2.11 抗体可变区序列连接 T 载体

为了使测序鉴定成功的可变区序列长久保存并扩大浓度, 本研究选择将其连接到 T 载体上, 步骤如下。

(1) 加 ploy A 尾: 使用 Premix Ex Taq 酶按 1: 1 体积对纯化后的 PCR 产物加 ploy A 尾, 置于 72 $^{\circ}$ C 孵育 10 min。

(2) 纯化: 加 ploy A 尾产物同 2.2.10 进行纯化, 并测浓度。

(3) 连接: 用 1 μ L T4 DNA 连接酶和 4 μ L poly A 产物室温孵育 10 min, 冰上终止反应。

(4) 转化:

① 将 DH 5 α 大肠杆菌感受态置于冰上融化。

② 将 5 μ L 步骤 (2) 中反应液缓慢加入至 50 μ L 的大肠杆菌中, 轻柔混匀, 冰上孵育 30 min。

③ 置于 42 $^{\circ}$ C 水浴锅内, 热击 45 s, 立即转置冰上孵育 2 min。

④ 加入 900 μ L 的 SOB, 置于摇床, 37 $^{\circ}$ C 振荡孵育 1 h。

⑤ 6000 r/min 离心 5 min, 将菌体均匀涂布到含有 100 μ g/mL Amp 抗性的 LB 平板上, 置于 37 $^{\circ}$ C 孵箱培养 16 h。

⑥ 获得菌落后，每条重组抗体 T 载体挑选 5~10 个菌落进行菌液 PCR 鉴定。反应体系见表 2.13，反应程序见表 2.14。

(6) 扩大培养：将阳性单菌落接种于 13 mL Amp 霉素培养基中，置于 37 °C 250 r/min 摇床培养。

(7) 保存菌液并提取质粒：培养 16 h 后用 400 μ L 50% 甘油保存 600 μ L 菌液，剩余菌液用于质粒提取。使用 M13 正向引物送北京诺赛基因组研究中心有限公司进行 Sanger 测序，再次验证抗体可变区序列。

表 2.13 重组 T 载体 PCR 鉴定反应体系

Table 2.13 Identification of Recombinant T-Vector by PCR reaction system

组分	所需含量	终浓度	所需体积/ μ L
5 \times PCR Buffer	-	-	10
dNTPs	10 nM	10 mM	1
菌液	-	-	1
正向引物	25 pM	10 μ M	2.5
反向引物	25 pM	10 μ M	2.5
H ₂ O	-	-	32.5
Phusion 聚合酶	1 U	2 U/ μ L	0.5

表 2.14 重组 T 载体 PCR 鉴定反应

Table 2.14 Identification of Recombinant T-Vector by PCR reaction program

反应温度	反应时间	循环数
94 °C	5 min	1
94 °C	30 s	} \times 30 cycles
55 °C	30 s	
72 °C	60 s	
72 °C	5 min	1
4 °C	∞	1

2.2.12 抗体表达载体构建

(1) 以连接到 T 载体上的抗体可变区作为模板, 用带有酶切位点的特异性引物 (表 2.17) 扩增抗体可变区, PCR 反应体系见表 2.15, 反应程序见表 2.16。

表 2.15 酶切位点引入 PCR 反应体系

Table 2.15 Introduction of restriction site into PCR reaction system

组分	所需含量	终浓度	所需体积/ μL
5 \times PCR Buffer	-	-	10
dNTPs	10 nM	10 mM	1
含目的序列的重组 T 载体	-	-	1
正向引物	25 pM	10 μM	2.5
反向引物	25 pM	10 μM	2.5
H ₂ O	-	-	32.5
Phusion 聚合酶	1 U	2 U/ μL	0.5

表 2.16 酶切位点引入 PCR 反应程序

Table 2.16 Introduction of restriction site into PCR reaction program

反应温度	反应时间	循环数
94 $^{\circ}\text{C}$	5 min	1
94 $^{\circ}\text{C}$	30 s	} $\times 50$ cycles
58 $^{\circ}\text{C}$ (IgH) 或 60 $^{\circ}\text{C}$ (Ig λ)	30 s	
72 $^{\circ}\text{C}$	60 s	
72 $^{\circ}\text{C}$	5 min	1
4 $^{\circ}\text{C}$	∞	1

(2) 将 PCR 产物全部跑电泳鉴定, 并进行切胶纯化, 同时进行浓度测定 (同 4.2.10)。

表 2.17 引入酶切位点的抗体可变区扩增引物

Table 2.17 Primers for amplification of antibody variable regions with restriction sites

Primer 名称	序列 (5'-3')
N2E5H5'AgeI	TTTTA <u>ACCGGT</u> GTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAG (Age I)
N2E5H3'SalI	CCCTT <u>GTCGAC</u> GCTGAGGAGACGGTGACCGTG (Sal I)
N2E5L5'AgeI	CTGC <u>ACCGGT</u> TCTGAGGCCTCCTATGAGCTGACACAA (Age I)
N2E5L3'XhoI	GCATCTT <u>CTCGAG</u> ACTAGGACGGTCAGCTTGGT (Xho I)
N8C6H5'AgeI	TTCTC <u>ACCGGT</u> ATCTGTGCCGAGGTGCAGCTGGTGCAG (Age I)
N8C6H3'SalI	CCCTT <u>GTCGAC</u> GCTGAGGAGACGGTGACCAG (Sal I)
N8C6L5'AgeI	ACTGC <u>ACCGGT</u> TCCTGGGCCAGTCTGTGCTGACGCAG (Age I)
N8C6L3'XhoI	AGCTTG <u>CTCGAG</u> CCTAGGACGGTCAGCCTGGT (Xho I)

注: 下划线表示酶切位点

(3) 酶切: 将纯化后的 PCR 产物和抗体表达载体 $\gamma 1$ HC 和抗体轻链表达载体 λ L 在 C 低温冰盒上建立如表 2.18 和表 2.19 体系。

表 2.18 酶切反应体系

Table 2.18 Enzyme digestion reaction system

组分	质粒 DNA/ μ L	PCR 纯化产物/ μ L
ddH ₂ O	38	8
10×Buffer	5	5
底物 DNA	5	35
单种酶	1+1	1+1
总计	50	50

表 2.19 酶切反应程序

Table 2.19 Enzyme digestion reaction program

反应过程	质粒 DNA	PCR 纯化产物
酶切反应条件	37 °C 3h	37 °C 3 h
终止酶切反应	80 °C 20 min	80 °C 20 min

(4) 琼脂糖凝胶电泳检测酶切效率。

(5) 用 T4 DNA 连接酶在 37 °C 下孵育 3 h，将目的片段连接到抗体表达载体上，连接体系见表 2.20。

表 2.20 连接反应程序
Table 2.20 Connection response program

组分	体积/ μL
PCR 小片段	15
质粒酶切片段	2
T4 DNA Ligase	1
T4 DNA Ligase Buffer	2
总计	20

(6) 转化：将连接产物转化到 DH 5 α 大肠杆菌感受态上，步骤同 2.2.11。

(7) 扩大培养与保藏菌液：将上一步的单克隆菌落按 2.2.11 的步骤扩大培养并保存菌种。

(8) 产物鉴定：提取菌液的质粒，并进行酶切鉴定，反应条件同步骤 (3)，将鉴定后的质粒送公司进行测序鉴定。

2.2.13 抗体真核表达

(1) 复苏 293F 细胞：用 FreeStyle™ 293 表达培养基复苏冻存于液氮罐的 293F 细胞，置于 125 r/min 37°C 5% CO₂ 细胞培养箱孵育。

(2) 准备细胞：使用 28 mL 新鲜的、预热的无血清 293™ 表达培养基稀释 3×10^7 个 293F 细胞至 125 mL 无菌细胞摇瓶。

(3) 脂质-DNA 复合物的制备：

① 在 Opti-MEM®I 中稀释 30 μg 质粒，质粒比例如表 2.21。

② 在 Opti-MEM 无血清培养基中稀释 60 μL 的 293fectin™ 转染试剂，使血清培养基总量为 1 mL。轻轻搅拌，室温下孵化 5 min。

③ 将稀释后的 DNA 加入稀释试剂中，总体积为 2 mL，轻柔混匀。

④ 在室温下孵育 20~30 min，使 DNA-试剂复合物形成。

表 2.21 转染质粒比
Table 2.21 Transfection plasmid ratio

编号	重链质粒总量/ μg	轻链质粒总量/ μg	重链: 轻链
抗体 N2E5	15	15	1: 1
抗体 N2E5	10	20	1: 2
抗体 N8C6	15	15	1: 1
抗体 N8C6	10	20	1: 2

(4) 向细胞添加脂质-DNA 复合物: 在每个细胞悬浮瓶中加入 2 mL 复合物。每个摇瓶的总体积应为 30 mL, 并含有约 1×10^6 个活细胞/mL。在阴性对照培养瓶中, 加入 2 mL 无血清培养基。

(5) 培养细胞: 在 125 r/min 37°C 5% CO₂ 细胞培养箱里培养细胞。

(6) 收集样本: 在转染后大约 2~7 天每天取上清 200 μL 用于人总 IgG 检测。

(7) 检测人总 IgG: 用博奥龙公司的人总 IgG ELISA 试剂盒对转染后上清进行非特异性抗体检测, 检测步骤如下。

① 浸泡酶标板: 拆卸板条, 洗板机洗版一次, 在吸水纸上将微孔板拍干。

② 加样: 设置标准品孔和样本孔, 标准品孔加入 100 μL 倍比稀释的标准品, 样本孔加入 100 μL 细胞培养上清。使用封板膜封板, 300 r/min 振荡, 室温孵育 2 h。

③ 洗涤: 弃掉液体, 每孔加入 300 μL 洗液洗板, 洗涤 6 次。每次洗板, 在吸水纸上拍干。

④ 加检测抗体: 每孔加入 100 μL 1: 100 稀释的辣根过氧化物酶标记的抗体。

⑤ 孵育: 使用新的封板膜封板。300 r/min 振荡, 室温孵育 1 h。

⑥ 洗涤: 重复步骤 ③。

⑦ 加底物显色: 每孔加入 100 μL 显色底物 TMB, 避光, 室温孵育 10 min。

⑧ 加终止液: 每孔加入 100 μL 终止液。颜色由蓝色变为黄色。

⑨ 检测读数: 在 30 min 之内, 测定 450 nm 最大吸收波长和 630 nm 参考波长下的 OD 值。

2.2.14 抗体纯化

使用 Thermo 的 protein A/G 抗体纯化试剂盒对上清进行纯化。

(1) 将色谱柱和缓冲液平衡至室温。将离心机调至 1000 g。

(2) 将细胞和培养液转入离心管中，400 g 离心 10 min 收集上清。用 0.22 μm 过滤器过滤细胞上清。

(3) 用结合缓冲液等体积稀释样品。

(4) 松开旋转柱上的顶盖，拉开底部封口。将柱子放入 15 mL 收集管中，400 g 离心 1 min，弃储存液。

(5) 加 2 mL 结合缓冲液平衡色谱柱。1000 g 离心 1 min，弃滤液。重复此步 1 次。

(6) 将稀释后的样品加到柱子上，收集流水为“Flow Through”。

(7) 用 15 mL 结合缓冲液洗涤色谱柱，将柱子放入洁净的 15 mL 收集管中，1000 g 离心 1 min，弃滤液。

(8) 将 100 μL 的中和缓冲液加入 5 个 1.5 mL Ep 管中，向色谱柱中加入 1 mL 洗脱缓冲液，1000 g 离心 1 min。将滤液转移到含中和缓冲液的 Ep 管中，将收集的溶液保存为“纯化产物-1”。重复此步骤 4 次以获得 5 个梯度的纯化产物，置于 4℃ 保存。

2.2.15 抗体纯化检验

2.2.15.1 人总 IgG 检测

采用博奥龙的人总 IgG ELISA 试剂盒对纯化产物进行非特异性抗体检测，检测同 2.1.13 步骤 (7)。

2.2.15.2 SDS-PAGE 检测

其次采用 SDS-PAGE 对纯化后的抗体进行检测，实验步骤如下。

(1) 蛋白变性：把 32 μL 纯化产物置于 8 μL 凝胶加样缓冲液中，于 99 °C 加热 10 min，使蛋白变性。

(2) 将预制板凝胶固定于电泳装置上，加入电泳液验漏后在外侧加入电泳液，排出凝胶底部两玻璃板之间的气泡，小心移出梳子。

(3) 样品孔上样 40 uL 样品混合液，marker 孔上样 10 μL。

(4) 设置电压为 180 V 电泳 40~50 min。

(5) 从电泳装置上卸下玻璃板，轻启玻璃板，加入适量考马斯亮蓝染色液浸没凝胶，摇床孵育 4 h 进行染色，移除染色液。

(6) 用等体积脱色液于摇床上孵育 16 h，期间更换 3~5 次脱色液。

(7) 用 FluorChem System 拍照留作永久实验记录。

2.2.15.3 Western blot 检测

采用 Western blot 对纯化后的 SARS-CoV-2 N 蛋白特异性抗体进行检测。

(1) 取 SARS-CoV-2 N 蛋白各 5 μg 、10 μg 、15 μg 、20 μg 到 Ep 管内。用 ddH₂O 补充体积到 20 μL ，加入 4 μL loading buffer，充分混合后，99 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min 使蛋白失活。

(2) 将预制板凝胶固定于电泳装置上，加入电泳液验漏后在外侧加入电泳液，排出凝胶底部两玻璃板之间的气泡，小心移出梳子。

(3) 样品孔上样 40 μL 样品混合液，marker 孔上样 10 μL 。

(4) 设置电压为 180 V 电泳 40~50 min。

(5) 取下凝胶，将凝胶平铺于预先用电转液浸润的海绵和滤纸上，铺上甲醇激活的 PVDF 膜。设置电流为 200 mA 电泳 90 min 进行转膜。

(6) 将 PVDF 膜过甲醇后干燥，置于 5% 的封闭液，室温摇床孵育 60 min。

(7) 用 1 \times TBST 在摇床上洗膜 5 min，重复 3 次。置于 20 mL 1% 封闭液稀释 1000 倍的抗体中，4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜震荡孵育。

(8) 用 1 \times TBST 在摇床上洗膜 5 min，重复 3 次。置于 20 mL 1% 封闭液稀释 10000 倍稀释的 HRP-山羊抗人 IgG (H+L) 中，室温摇床孵育 60 min。

(9) 显色：用 1 \times TBST 在摇床上洗膜 5 min，重复 3 次。显色液 A 和显色液 B 以 1: 1 混合，均匀涂抹至 PVDF 膜上，于 FlourChem System 下拍照留存。

2.2.16 抗体亲和力检测

将纯化后的 SARS-CoV-2 N 蛋白抗体送到北京拓普百奥科技有限公司，使用生物膜层干涉技术 (Biolayer interferometry, BLI) 进行亲和力检测。

2.3 实验结果

2.3.1 EB 病毒永生生化结果

用 EB 病毒感染新鲜获得的 COVID-19 患者的 PBMC 细胞，每隔 3 天在显微镜下观察细胞形态并拍照，结果如下图 2.1。可以清晰地看到从 EB 病毒感染的第 6 天开始出现非细胞聚集性的、球形、透亮的细胞团，是由细胞增殖形成的细胞团。EB 病毒感染的第 9 天增殖细胞团个数变多、体积变大；EB 病毒感染的第 12 天增殖细胞团个数持续变多、体积持续变大；EB 病毒感染的第 15 天增殖细胞团个数未增加，出现大体积的增殖细胞团。至此，能被 EB 病毒永生化的 B 细胞基本已被激活，应进行下一步亚克隆筛选实验。

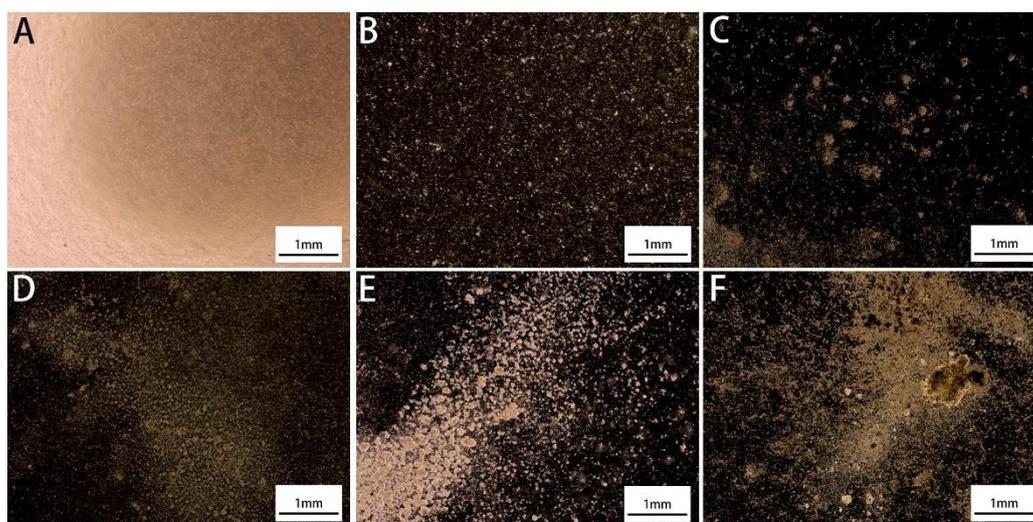


图 2.1 EB 病毒感染 PBMC 细胞的病变图

Fig 2.1 Pathological changes of PBMC cells infected by EB virus

注：图 A~F 分别表示 EB 病毒感染 COVID-19 患者 PBMC 后第 0、3、6、9、12、15 天。比例尺：1 mm。

2.3.2 亚克隆筛选获得分泌抗 N 蛋白抗体的永生化 B 细胞

本研究进行了 3 次亚克隆筛选，确保获得的永生化 B 细胞系由同一个单细胞增殖而来，每次亚克隆筛选均采用北京科卫公司提供的检测 SARS-CoV-2 S 蛋白和 N 蛋白 ELISA 试剂盒挑选阳性的永生化 B 细胞。如表 2.22 所示，第 1 次亚克隆筛选鉴定到 1 个抗 SARS-CoV-2 S 蛋白抗体阳性孔，45 个抗 N 蛋白抗体阳性孔；将第 1 次亚克隆筛选到的 3 个阳性细胞进行第 2 次亚克隆筛选，最终鉴定到 19 个抗 SARS-CoV-2 N 蛋白抗体阳性孔；将第 2 次亚克隆筛选到的阳性细胞进行第 3 次亚克隆筛选，最终鉴定到 12 株分泌抗 SARS-CoV-2 N 蛋白抗体的永生化 B 细胞系。

表 2.22 三次亚克隆筛选结果汇总

Table 2.22 Summary of three subclonal screening results

	抗 SARS-CoV-2 S 蛋白抗体阳性孔数	抗 SARS-CoV-2 N 蛋白抗体阳性孔数
第一次亚克隆筛选	1	45
第二次亚克隆筛选	0	19
第三次亚克隆筛选	0	12

2.3.3 抗体可变区 5'RACE 法扩增效率

本研究采用 5'RACE 法扩增抗体轻重链可变区序列^[176]，扩增结果如下图 2.2。在 12 个永生化的单个 B 细胞增殖细胞系中能扩增出来抗体重链可变区为 6 个、抗体 λ 轻链可变区为 8 个、抗体 κ 轻链可变区为 4 个。抗体重链可变区阳性扩增率为 50%，抗体轻链可变区阳性扩增效率约为 91.67%。因为抗体扩增引物 5' 并非特异性，所以电泳图中有非特异性条带。但是抗体重链目的片段（大小约 750 bp）和抗体轻链目的片段（大小约 500 bp）处的条带显著亮于其他条带，采用切胶纯化来去除非特异性的条带的影响。

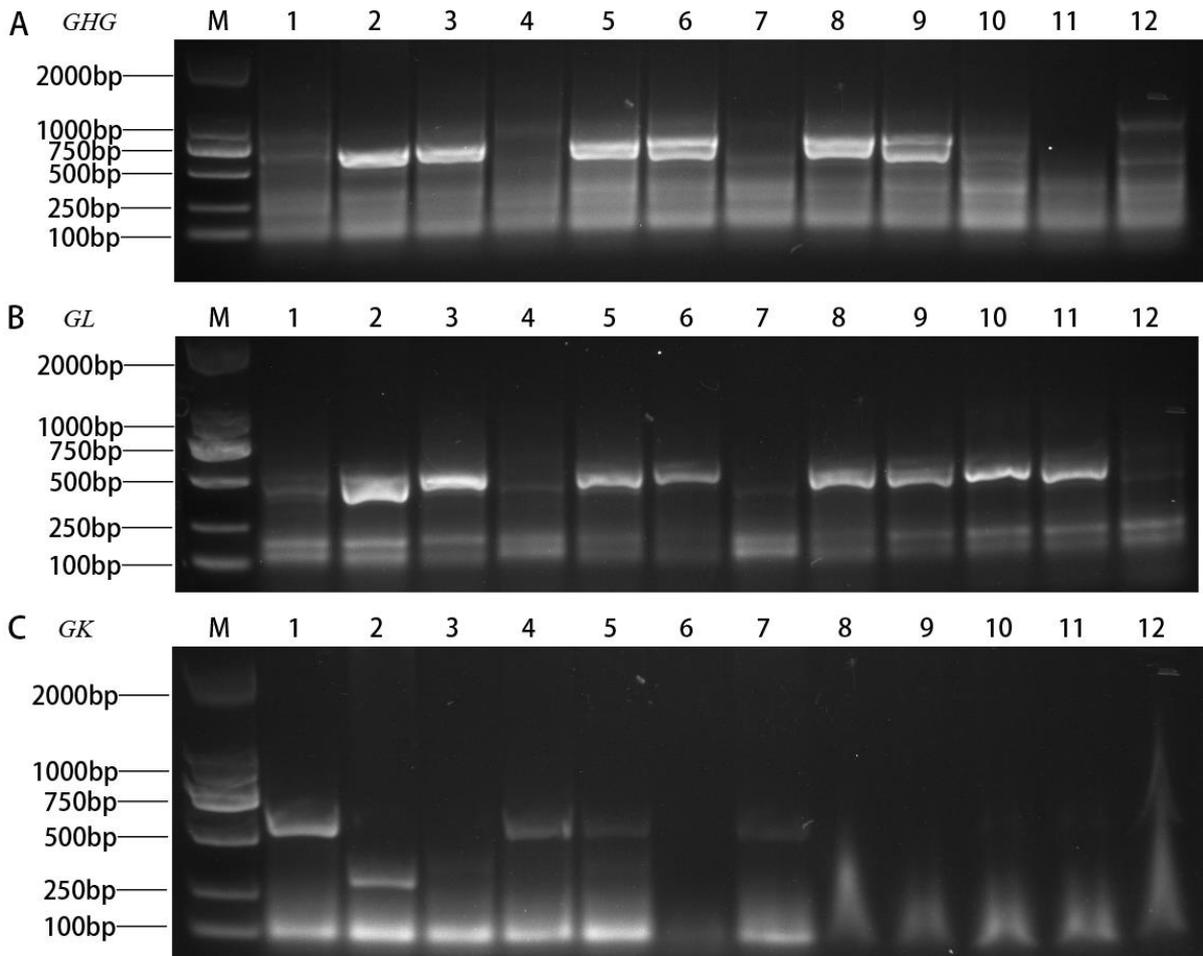


图 2.2 抗体可变区序列扩增产物电泳鉴定图

Fig. 2.2 Electrophoretic identification map of antibody variable region sequence amplification products

注：图 A 表示抗体重链可变区 GHG 的扩增结果；图 B 表示抗体 λ 轻链可变区 GL 的扩增结果；图 C 表示抗体 κ 轻链可变区 GK 的扩增结果；“M”代表 DL2000 DNA marker；1~12 永道表示不同的永生化的 B 细胞系

2.3.4 抗体可变区测序和分析结果

将 Sanger 测序后的抗体重链和轻链序列经过比对后总共获得 2 对单克隆抗体序列分别命名为抗体 N2E5 和抗体 N8C6，2 个抗体的轻链类型均为 λ ，将其重链可变区和轻链可变区提交到 IMGT/V-QUEST 网站进行分析，获得了抗体家系，见表 2.23。抗体 N2E5 和抗体 N8C6 的 λ 轻链 J 基因来源于同一家系 IGLJ3*02 F，其他部分来源于不同的家系。位于抗体的抗原结合部位中心的 CDR3 构象多变，抗体 N2E5 和抗体 N8C6 的重链 CDR3 长度分别为 45 bp 和 33 bp，抗体 N2E5 和抗体 N8C6 的 λ 轻链 CDR3 长度均为 33 bp。抗体 N2E5 的重链和轻链体细胞高频突变 (Somatic Hypermutation, SHM) 分别为 2.11% 和 5.73%，抗体 N8C6 的重链和轻链 SHM 分别为 4.51% 和 2.78%。

表 2.23 抗体家系

Table 2.23 Antibody pedigree

	V 基因家系	J 基因家系	D 基因家系	CDR3 长度	突变率%
N2E5 重链	IGHV3-53*04 F	IGHJ6*02 F	IGHD1-26*01 F	45bp	2.11
N2E5 轻链	IGLV3-25*03 F	IGLJ3*02 F	-	33bp	5.73
N8C6 重链	IGHV5-51*01 F	IGHJ4*02 F	IGHD2-8*02 F	33bp	4.51
N8C6 轻链	IGLV1-40*01 F	IGLJ3*02 F	-	33bp	2.78

2.3.5 抗体 N2E5 和抗体 N8C6 转染最佳收样时间评估

不同的抗体表达载体转染时最佳轻重链质粒比、转染后收样时间不同，为了获得最佳转染条件，本研究在转染时设置了抗体重链表达载体和抗体轻链表达载体的质粒比分别为 1: 1、1: 2 的两组对照，测定转染后 2~7 天细胞上清中的人总 IgG 含量。结果如图 2.3 所示，抗体 N2E5 和抗体 N8C6 转染时重链和轻链的质粒比为 1: 1 的人总 IgG 含量比质粒比为 1: 2 的含量高 ($P < 0.05$)。转染后 2~7 天内，随着转染时间的增加细胞上清的人总 IgG 含量递减。因此抗体 N2E5 和抗体 N8C6 以轻重链表达载体质粒比为 1: 1 并在转染后第 2 天收样获得的人总 IgG 抗体效率最高。

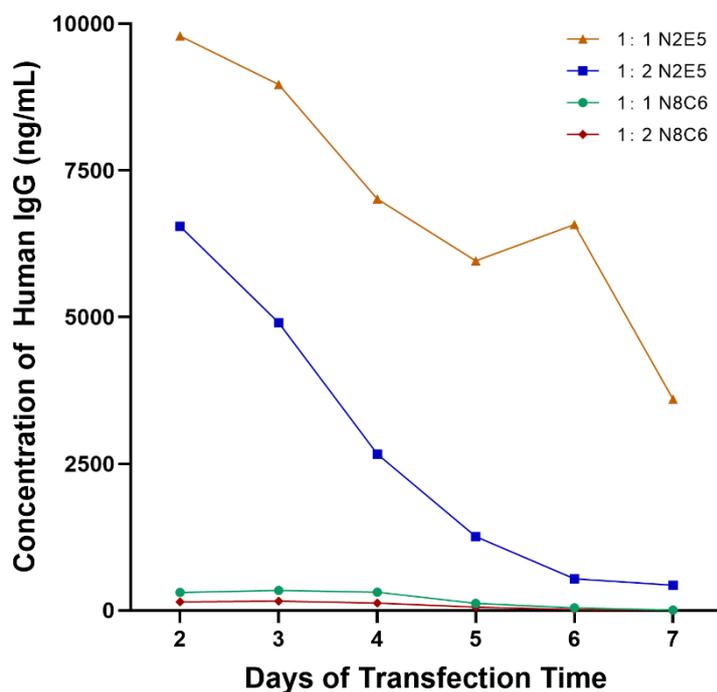


图 2.3 抗体表达载体转染后 2~7 天细胞上清的 IgG 含量

Fig. 2.3 IgG content in the supernatant of cells transfected with antibody expression vector 2-7 days after transfection

注：图中“1：1”表示转染时抗体重链和轻链的质粒比为 1：1，图中“1：2”表示转染时抗体重链和轻链的质粒比为 1：2

2.3.6 抗体 N2E5 和抗体 N8C6 纯化结果

检测纯化后抗体的人总 IgG 含量，抗体 N2E5 纯化产物 1~5 的人总 IgG 浓度分别为 6608.04 ng/mL、6222.81 ng/mL、4632.42 ng/mL、4594.73 ng/mL、3421.90 ng/mL；抗体 N8C6 纯化后产物 1~5 的人总 IgG 浓度分别为 6695.55 ng/mL、6731.94 ng/mL、5577.87 ng/mL、5547.51 ng/mL、3991.43 ng/mL。

进一步分析抗体纯度，将转染细胞上清、纯化过程中产生的“Flow Through”、抗体纯化产物进行 SDS-PAGE 蛋白电泳。结果如图 2.4 所示，抗体 N2E5 和抗体 N8C6 的转染细胞和“Flow Through”有杂蛋白的条带，纯化产物只在 55 kDa（抗体重链大小）和 25 kDa（抗体轻链大小）处有目的条带，且抗体 N2E5 比抗体 N8C6 的纯化产物条带更亮。

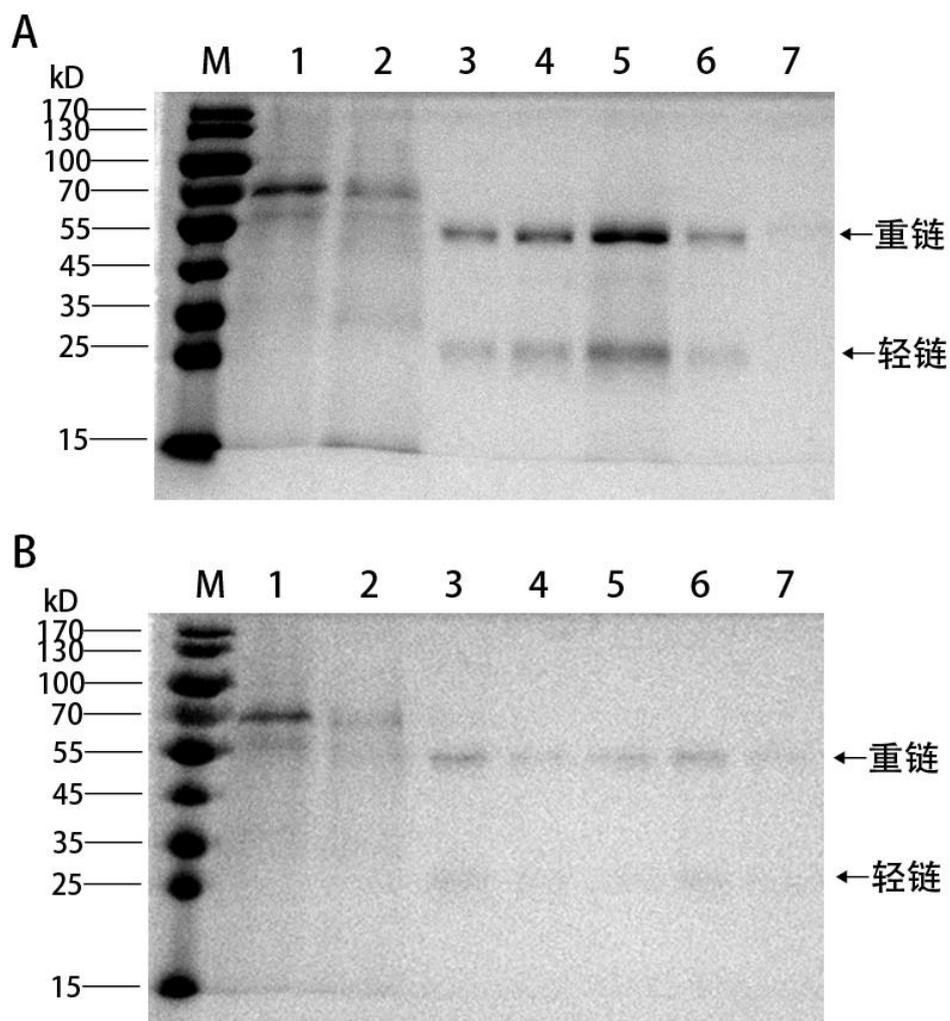


图 2.4 纯化抗体 N2E5 和抗体 N8C6 SDS-PAGE 鉴定

Fig. 2.4 SDS-PAGE Identification of purified antibody N2E5 and antibody N8C6

注：图 A 是抗体 N2E5 的 SDS-PAGE 电泳结果；图 B 是抗体 N8C6 的 SDS-PAGE 电泳结果。
图 A 和图 B 的 1 泳道是细胞上清，2 泳道是 Flow Through，3-7 泳道是纯化 1-5 号产物

2.3.7 抗体 N2E5 和抗体 N8C6 特异性鉴定

本研究将带 His 标签的 SARS-CoV-2 N 蛋白（大小约 47 kDa）以 5 μ g、10 μ g、15 μ g、20 μ g 的梯度上样，进行 SDS-PAGE 蛋白电泳，转至 PVDF 膜后与 1: 1000 倍稀释的抗体 N2E5 和抗体 N8C6 孵育。WB 结果如图 2.5 所示，抗体 N2E5 和抗体 N8C6 作为一抗能结合 SARS-CoV-2 N 蛋白，在约 47 kDa 处有特异性的两条带，即带 His 标签的 SARS-CoV-2 N 蛋白和不带 His 标签的 SARS-CoV-2 N 蛋白。

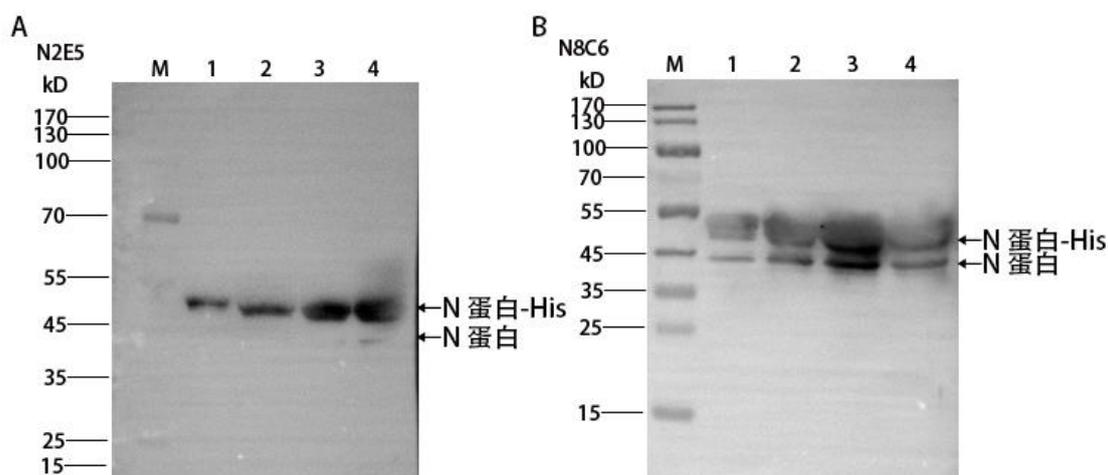


图 2.5 抗体 N2E5 和抗体 N8C6 特异性鉴定

Fig. 2.5 Specificity identification of antibody N2E5 and antibody N8C6

注：图 A 和图 B 分别是抗体 N2E5 和抗体 N8C6 的 WB 结果，1~4 泳道分别是 SARS-CoV-2 N 蛋白上样量为 5 μg 、10 μg 、15 μg 、20 μg 。“M”代表蛋白 marker。

2.3.8 抗体 N2E5 和抗体 N8C6 亲和力分析

采用生物膜层干涉技术测定了抗体 N2E5 和抗体 N8C6 的亲和力，在 Human FC 探针上固定约 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗体，在 Gator 探针上固定 SARS-CoV-2 N 蛋白作为抗原，抗原共设置 6.25 nM、12.5 nM、25 nM、50 nM、100 nM、200 nM、400 nM 7 个梯度进行检测，所得数据用 GraphPad Prism 8 软件进行拟合，抗原与 N2E5 抗体和 N8C6 抗体结合的动力学常数分别为 $K_D=1.42\times 10^{-8}$ M、 $K_D=1.31\times 10^{-8}$ M，N2E5 抗体亲和力较高。

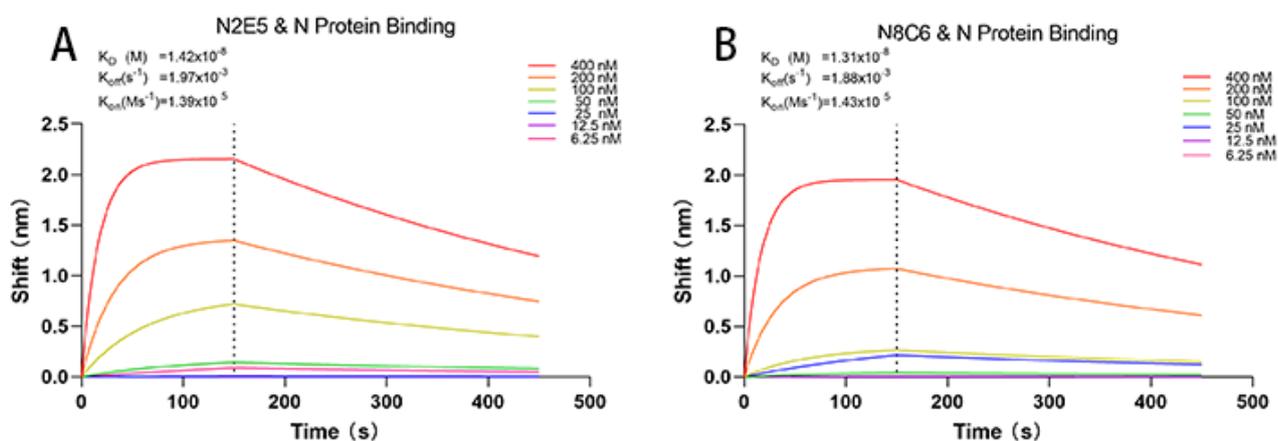


图 2.6 抗体与抗原结合动力学曲线

Fig. 2.6 Kinetic curve of antibody binding to antigen

注：图 A 和图 B 分别是抗体 N2E5 和抗体 N8C6 的结合动力学曲线。

2.4 讨论

目前单克隆抗体制备的技术主要有杂交瘤单克隆抗体技术、抗体库技术、转基因小鼠技术、单个 B 细胞抗体制备技术、人类 B 细胞永生化技术。最早出现的杂交瘤单克隆抗体技术操作简便、成本低,但产生的抗体只能是鼠源抗体,鼠源抗体半衰期短、补体效应的激活不完全,因其会使人产生严重过敏反应而不被临床治疗使用^[104,105]。抗体库技术包含噬菌体展示技术、酵母细胞表面展示技术、核糖体展示技术、细胞内组合抗体展示技术等,其中噬菌体展示技术的应用最广泛,噬菌体展示技术可表达特异性强、亲和力高的单克隆抗体,但该技术操作复制、制备周期长、不能获得人源化抗体^[106-111]。转基因小鼠技术获得的抗体亲和性、稳定性、可溶性较好,但该技术存在鼠源抗体干扰、抗原免疫困难等缺点。单个 B 淋巴细胞抗体制备技术具有基因多样性好、效率高、全人源、所需细胞量少等优势,但仍因人源供体需求量大、目标抗原制备困难、高通量 PCR 抗体基因扩增技术不完善等方面的技术限制,单个 B 细胞抗体制备技术还需进一步完善^[119,120]。人类 B 细胞永生化技术具有制备周期短、所需人源供体少、对细胞损伤小、获得抗体效率高等优点,但因目前缺乏永生化细胞生长的最适条件数据,因此永生细胞的生长周期受限。

通过比较各种单克隆抗体的优缺点,本研究用 EB 病毒感染 COVID-19 患者 PBMC 中的 B 细胞,经过 3 次亚克隆筛选,获得了 12 株抗 SARS-CoV-2 N 蛋白抗体阳性的永生化 B 细胞。对所有阳性细胞的抗体可变区进行 5'RACE 扩增并测序,获得两对抗体轻重链可变区,并成功构建表达载体。通过表达鉴定,本研究成功获得了抗 SARS-CoV-2 N 蛋白亲和力较高的 2 个抗体 N2E5 和 N8C6。证实通过永生化患者体内 B 细胞可以实现抗体的快速制备,此技术的应用为 COVID-19 患者治疗方法的精进和免疫逃逸机制的研究提供了重要基础,为未来可能出现的新发病原体防控提供了技术支撑。

SARS-CoV-2 N 是包裹病毒基因组的保守蛋白,不易产生突变,在病毒感染和病毒免疫逃逸中发挥重要作用^[177]。SARS-CoV-2 的 N 蛋白能与补体系统的凝集素途径(lectin pathway, LP)中的关键丝氨酸蛋白酶 MASP-2 结合,导致补体异常激活,部分 COVID-19 患者就因补体过度活化而产生肺损伤^[27,178]。SARS-CoV-2 N 蛋白与固有免疫密切相关,已被证实能通过抑制 RIG-I 样受体(RIG-I like receptors, RLRs)途径而抑制干扰素的产生,为 SARS-CoV-2 免疫逃逸提供便利^[179]。制备 SARS-CoV-2 N 蛋白抗体为深入研究病毒感染和免疫逃逸机制提供了技术支撑。

细胞周期检查点通路异常、端粒酶激活、原癌基因上调表达、病毒感染等是刺激细胞永生化的主要因素，其中 EB 病毒感染是获得人类永生 B 细胞的常用方法。EB 病毒能通过 B 细胞内表达潜伏基因，使细胞周期改变，产生永生 B 细胞系。在诱导 B 细胞永生中，EB 病毒核抗原 1 (EBV nuclear antigens, EBNA)、EBNA2、EBNA-LP、潜伏膜蛋白 1 (EBV latent membrane protein 1, LMP-1) 都起到了重要作用。EBNA1 是一种 DNA 结合蛋白，能将病毒基因组整合到细胞染色体上，参与细胞的有丝分裂^[180,181]。EBNA2 作为 EB 病毒感染后首先表达的基因，是重要的转录激活因子，其特殊的结构域能传递信号、激活并维持 B 细胞永生^[182]。EBNA-LP 与 EBNA2、抑癌基因 Rb 和 p53 存在相互作用，共同提高 B 细胞永生效率^[183]。LMP-1 通过激活 NF- κ B 能提高永生 B 细胞的增殖效率，抑制细胞凋亡^[184]。

目前本研究的研究尚存在不足之处。其一，永生后的 B 细胞并不表现为理想状态中的无限增殖，永生 B 细胞生长状态显著改变，培养到一定阶段会逐渐死亡，导致阳性抗体的获得率较低。造成这一结果的原因可能是携带 EB 病毒基因组的部分 B 细胞在浆细胞标记物表达阶段会沉默 EBNA 的表达，进入裂解循环，产生病毒颗粒，导致细胞死亡，从而使 B 细胞失去永生状态^[185]。研究显示，IL-2、IL-4、IL-6、IL-21 等细胞因子可以独立或联合使用促进细胞增殖活性和抗体的产生，CpG、CSA 等刺激物的浓度、加入时间等条件也会影响细胞的永生效率^[186,187]。因此，后续在优化 EB 病毒永生 B 细胞效率时需要考虑刺激物的影响，探索多种实验条件，择出最佳条件使得抗体获得效率增加。

其二，在进行亚克隆筛选和后期阳性细胞筛选的过程中，本研究使用的商品化 SARS-CoV-2 N 蛋白特异性 IgG ELISA 试剂盒检测结果常出现假阴性。导致这一结果的原因可能是商品化的 ELISA 试剂盒大多包被的都是抗原特异性的多肽，而非完整的抗原蛋白，因此使用商品化的 ELISA 试剂盒进行阳性细胞筛选容易错失阳性样本。为减少抗体制备过程中阳性永生 B 细胞系的损失，抗体制备全程应使用全病毒抗原或重组表达 SARS-CoV-2 N 蛋白包被的 ELISA 板。

第三章 结论与展望

相较于 COVID-19 轻型和普通型患者，COVID-19 重型患者常常出现不可逆的疾病损伤，研究表明 COVID-19 患者重症的发生与免疫状态密切相关。因此，系统研究不同临床状态 COVID-19 患者的免疫状态对于阐明重症发生的机制具有重要意义，深入分析免疫状态的内在机制对重症发生、预判、治疗和疫情防控十分重要。

本研究发现 COVID-19 患者感染后抗体水平升高，细胞因子紊乱，大多免疫因子更易在重症患者中失衡，提示免疫反应失衡可能是重症患者出现严重疾病进展的内在机制，重点关注 COVID-19 患者的免疫特征对于防止重症发生、减少 SARS-CoV-2 流行具有重要意义。此外，异常的免疫因子可以作为 COVID-19 患者诊断的标志物，例如 LPS、BDG、GP73 等能作为诊断 COVID-19 患者的血清标记物，以及 IL-1 β 、IL-6、CXCL9 等细胞因子含量能区分普通型患者和重症患者。

在探索 COVID-19 患者和 SARS-CoV-2 疫苗接种者的抗体类型差异时，我们发现疫苗免疫和自然免疫产生的抗体类型存在显著差异，提示仍需优化疫苗的研发以尽可能模拟天然免疫，深入探索疫苗免疫和天然免疫差异的机制对于提高疫苗的效能极其重要。

研究结果显示，早期感染 Wuhan 株的 COVID-19 患者血浆对 8 种全球流行的 SARS-CoV-2 变异株的中和能力降低，突变株免疫逃逸能力与其 RBD 结构域的突变位点个数可能存在相关性，提示广泛的保护性干预和持续的病毒监测对预防 COVID-19 大流行极其重要。

本研究结果揭示了 COVID-19 患者全血中被激活的 HERV-K(HML-2)与 IFN 的相关性，深入挖掘了免疫差异的内在机制，为 IFN 的产生机制提供新切入点。HERV-K(HML-2) 家族在 COVID-19 患者中正向调控 IFN 的免疫通路，促进患者的抗病毒免疫，加速疾病恢复，这与以往认为“HERV 诱导疾病发生”的观点大相径庭。HERV 家族究竟是“有害基因”还是“有利基因”还需要深入探索，但不论是哪种类型的基因，自远古时代就插入人体基因组的 HERV 家族定有不可或缺的作用。

相较于噬菌体展示技术和杂交瘤技术只能制备的非人源化抗体，单个 B 细胞测序技术虽能获得人源抗体，但技术尚不成熟。本研究基于 EB 病毒永生人类 B 细胞的原理，建立了可以在未鉴定到病原体时就迅速开展人源化抗体制备的技术，并在 2 个月内就能获得全人源的特异性抗体，为未来新出现的未知病原体的防控提供基础。受限于永生效率、抗体扩增效率、抗体表达效率，B 细胞永生技术制备抗体尚不成熟，需要探索更优的制备方案。

综上所述，COVID-19 患者重症发生的机制与免疫反应存在紧密联系，值得更深入地研究。SARS-CoV-2 变异株的不断出现挑战了现有的防控政策，防疫事业需要随着病毒的改变而变化。EB 病毒永生 B 细胞的抗体制备技术在预防未知病原体爆发方面占有显著优势，是一项值得被推广的抗体制备技术。但此项技术同防疫事业一样，还有很长的路需要深入探索，未来的某一天 EB 病毒永生 B 细胞的抗体制备技术也会成为抗体制备的主导技术。

参考文献

- [1] Wu F, Zhao S, Yu B, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China[J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 265-269.
- [2] Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China[J]. *The Lancet*, 2020, 395(10223): 497-506.
- [3] Chen N, Zhou M, Dong X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study[J]. *The Lancet*, 2020, 395(10223): 507-513.
- [4] Jiang S, Shi Z, Shu Y, et al. A distinct name is needed for the new coronavirus[J]. *Lancet (London, England)*, 2020, 395(10228): 949.
- [5] Zebin L, Qian F, Jinlian M, et al. The Nucleocapsid Protein of SARS-CoV-2 Abolished Pluripotency in Human Induced Pluripotent Stem Cells[J], 2020.
- [6] Yang X, Yu Y, Xu J, et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study[J]. *The Lancet. Respiratory medicine*, 2020, 8(5): 475-481.
- [7] Li Y, Hou G, Zhou H, et al. Multi-platform omics analysis reveals molecular signature for COVID-19 pathogenesis, prognosis and drug target discovery[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 155.
- [8] Wu Z, Mcgoogan J M. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention[J]. *Jama*, 2020, 323(13): 1239-1242.
- [9] Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding[J]. *The Lancet*, 2020, 395(10224): 565-574.
- [10] Chan J F, Kok K H, Zhu Z, et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1): 221-236.
- [11] Li F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins[J]. *Annu Rev Virol*, 2016, 3(1): 237-261.
- [12] Li F, Berardi M, Li W, et al. Conformational states of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein ectodomain[J]. *J Virol*, 2006, 80(14): 6794-800.
- [13] Menachery V D, Graham R L, Baric R S. Jumping species-a mechanism for coronavirus persistence and survival[J]. *Curr Opin Virol*, 2017, 23: 1-7.
- [14] Jaimes J A, André N M, Millet J K, et al. Structural modeling of 2019-novel coronavirus (nCoV) spike protein reveals a proteolytically-sensitive activation loop

-
-
- as a distinguishing feature compared to SARS-CoV and related SARS-like coronaviruses[J]. *BioRxiv : the Preprint Server For Biology*, 2020.
- [15] Li F. Evidence for a common evolutionary origin of coronavirus spike protein receptor-binding subunits[J]. *J Virol*, 2012, 86(5): 2856-8.
- [16] Li F, Li W, Farzan M, et al. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor[J]. *Science*, 2005, 309(5742): 1864-8.
- [17] 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): 7045-53.
- [18] Ashour H M, Elkhatib W F, Rahman M M, et al. Insights into the Recent 2019 Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) in Light of Past Human Coronavirus Outbreaks[J]. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 2020, 9(3).
- [19] Schoeman D, Fielding B C. Coronavirus envelope protein: current knowledge[J]. *Virology journal*, 2019, 16(1): 69.
- [20] Gupta M K, Vemula S, Donde R, et al. In-silico approaches to detect inhibitors of the human severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel[J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2020: 1-17.
- [21] Chen S-C, Lo S-Y, Ma H-C, et al. Expression and membrane integration of SARS-CoV E protein and its interaction with M protein[J]. *Virus genes*, 2009, 38(3): 365-371.
- [22] Ujike M, Taguchi F. Incorporation of spike and membrane glycoproteins into coronavirus virions[J]. *Viruses*, 2015, 7(4): 1700-1725.
- [23] Fu Y-Z, Wang S-Y, Zheng Z-Q, et al. SARS-CoV-2 membrane glycoprotein M antagonizes the MAVS-mediated innate antiviral response[J]. *Cellular & molecular immunology*, 2021, 18(3): 613-620.
- [24] Chinese S M E C. Molecular evolution of the SARS coronavirus during the course of the SARS epidemic in China[J]. *Science*, 2004, 303(5664): 1666-9.
- [25] Chang C K, Hou M H, Chang C F, et al. The SARS coronavirus nucleocapsid protein--forms and functions[J]. *Antiviral Res*, 2014, 103: 39-50.
- [26] Gralinski L E, Menachery V D. Return of the Coronavirus: 2019-nCoV[J]. *Viruses*, 2020, 12(2).
- [27] Magro C, Mulvey J J, Berlin D, et al. Complement associated microvascular injury and thrombosis in the pathogenesis of severe COVID-19 infection: A report of five cases[J]. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*, 2020, 220.
- [28] Li T, Qiu Z, Zhang L, et al. Significant changes of peripheral T lymphocyte subsets in patients with severe acute respiratory syndrome[J]. *The Journal of infectious diseases*, 2004, 189(4): 648-651.
-

-
-
- [29] Ko J-H, Park G E, Lee J Y, et al. Predictive factors for pneumonia development and progression to respiratory failure in MERS-CoV infected patients[J]. *The Journal of infection*, 2016, 73(5): 468-475.
- [30] Wölfel R, Corman V M, Guggemos W, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019[J]. *Nature*, 2020, 581(7809): 465-469.
- [31] Wen W, Su W, Tang H, et al. Immune cell profiling of COVID-19 patients in the recovery stage by single-cell sequencing[J]. *Cell discovery*, 2020, 6: 31.
- [32] Ni L, Ye F, Cheng M-L, et al. Detection of SARS-CoV-2-Specific Humoral and Cellular Immunity in COVID-19 Convalescent Individuals[J]. *Immunity*, 2020, 52(6).
- [33] Amanat F, Stadlbauer D, Strohmeier S, et al. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans[J]. *Nature medicine*, 2020, 26(7): 1033-1036.
- [34] Grzelak L, Temmam S, Planchais C, et al. A comparison of four serological assays for detecting anti-SARS-CoV-2 antibodies in human serum samples from different populations[J]. *Science translational medicine*, 2020, 12(559).
- [35] He Y, Luo J, Yang J, et al. Value of Viral Nucleic Acid in Sputum and Feces and Specific IgM/IgG in Serum for the Diagnosis of Coronavirus Disease 2019[J]. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2020, 10: 445.
- [36] Brochot E, Demey B, Touzé A, et al. Anti-spike, Anti-nucleocapsid and Neutralizing Antibodies in SARS-CoV-2 Inpatients and Asymptomatic Individuals[J]. *Frontiers in microbiology*, 2020, 11: 584251.
- [37] Sterlin D, Mathian A, Miyara M, et al. IgA dominates the early neutralizing antibody response to SARS-CoV-2[J]. *Science translational medicine*, 2021, 13(577).
- [38] Zhao J, Yuan Q, Wang H, et al. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients With Novel Coronavirus Disease 2019[J]. *Clin Infect Dis*, 2020, 71(16): 2027-2034.
- [39] Xiang F, Wang X, He X, et al. Antibody Detection and Dynamic Characteristics in Patients With Coronavirus Disease 2019[J]. *Clin Infect Dis*, 2020, 71(8): 1930-1934.
- [40] Seydoux E, Homad L J, Maccamy A J, et al. Characterization of neutralizing antibodies from a SARS-CoV-2 infected individual[J]. *bioRxiv : the preprint server for biology*, 2020: 2020.05.12.091298.
- [41] Gudbjartsson D F, Norddahl G L, Melsted P, et al. Humoral Immune Response to SARS-CoV-2 in Iceland[J]. *N Engl J Med*, 2020.
- [42] Wajnberg A, Amanat F, Firpo A, et al. Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months[J]. *Science (New York, N.Y.)*, 2020, 370(6521): 1227-1230.
- [43] Long Q X, Tang X J, Shi Q L, et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections[J]. *Nat Med*, 2020, 26(8): 1200-1204.
- [44] Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin[J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 270-273.
-

-
-
- [45] Cerutti G, Guo Y, Zhou T, et al. Potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies directed against spike N-terminal domain target a single supersite[J]. *Cell host & microbe*, 2021, 29(5).
- [46] Cao Y, Su B, Guo X, et al. Potent Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 Identified by High-Throughput Single-Cell Sequencing of Convalescent Patients' B Cells[J]. *Cell*, 2020, 182(1).
- [47] Yuchun N, Guangwen W, Xuanling S, et al. Neutralizing Antibodies in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome-Associated Coronavirus Infection[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2004, 190(6): 1119-1126.
- [48] Zhang B, Liu S, Tan T, et al. Treatment With Convalescent Plasma for Critically Ill Patients With Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection[J]. *Chest*, 2020, 158(1).
- [49] Wang Y, Zhang L, Sang L, et al. Kinetics of viral load and antibody response in relation to COVID-19 severity[J]. *The Journal of clinical investigation*, 2020, 130(10): 5235-5244.
- [50] Zhao J, Yuan Q, Wang H, et al. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients With Novel Coronavirus Disease 2019[J]. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 2020, 71(16): 2027-2034.
- [51] Ma H, Zeng W, He H, et al. Serum IgA, IgM, and IgG responses in COVID-19[J]. *Cellular & molecular immunology*, 2020, 17(7): 773-775.
- [52] Seow J, Graham C, Merrick B, et al. Longitudinal observation and decline of neutralizing antibody responses in the three months following SARS-CoV-2 infection in humans[J]. *Nature microbiology*, 2020, 5(12): 1598-1607.
- [53] Okba N M A, Müller M A, Li W, et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients[J]. *Emerging infectious diseases*, 2020, 26(7): 1478-1488.
- [54] Zhao J, Yuan Q, Wang H, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019[J]. *Clin Infect Dis*, 2020.
- [55] Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China[J]. *Lancet*, 2020, 395(10223): 497-506.
- [56] Lucas C, Wong P, Klein J, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19[J]. *Nature*, 2020, 584(7821): 463-469.
- [57] Godeau D, Petit A, Richard I, et al. Return-to-work, disabilities and occupational health in the age of COVID-19[J]. *Scandinavian journal of work, environment & health*, 2021, 47(5): 408-409.
- [58] Moore J B, June C H. Cytokine release syndrome in severe COVID-19[J]. *Science (New York, N.Y.)*, 2020, 368(6490): 473-474.
- [59] Tan M, Liu Y, Zhou R, et al. Immunopathological characteristics of coronavirus disease 2019 cases in Guangzhou, China[J]. *Immunology*, 2020, 160(3): 261-268.
-

-
-
- [60] Diao B, Wang C, Tan Y, et al. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)[J]. *Frontiers in immunology*, 2020, 11: 827.
- [61] Mier J W, Gallo R C. Purification and some characteristics of human T-cell growth factor from phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte-conditioned media[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1980, 77(10): 6134-6138.
- [62] Malek T R, Bayer A L. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2[J]. *Nature reviews. Immunology*, 2004, 4(9): 665-674.
- [63] Noval Rivas M, Burton O T, Oettgen H C, et al. IL-4 production by group 2 innate lymphoid cells promotes food allergy by blocking regulatory T-cell function[J]. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 2016, 138(3).
- [64] Li Z, Chen L, Qin Z. Paradoxical roles of IL-4 in tumor immunity[J]. *Cellular & molecular immunology*, 2009, 6(6): 415-422.
- [65] Celik M Ö, Labuz D, Keye J, et al. IL-4 induces M2 macrophages to produce sustained analgesia via opioids[J]. *JCI insight*, 2020, 5(4).
- [66] Taus F, Salvagno G, Canè S, et al. Platelets Promote Thromboinflammation in SARS-CoV-2 Pneumonia[J]. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2020, 40(12): 2975-2989.
- [67] Saraiva M, Vieira P, O'garra A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10[J]. *The Journal of experimental medicine*, 2020, 217(1).
- [68] Ouyang W, Rutz S, Crellin N K, et al. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease[J]. *Annual review of immunology*, 2011, 29.
- [69] Saraiva M, O'garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells[J]. *Nature reviews. Immunology*, 2010, 10(3): 170-181.
- [70] Jirik F R, Podor T J, Hirano T, et al. Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells[J]. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 1989, 142(1): 144-147.
- [71] Laudes I J, Chu J C, Huber-Lang M, et al. Expression and function of C5a receptor in mouse microvascular endothelial cells[J]. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2002, 169(10): 5962-5970.
- [72] Carter M J, Fish M, Jennings A, et al. Peripheral immunophenotypes in children with multisystem inflammatory syndrome associated with SARS-CoV-2 infection[J]. *Nature medicine*, 2020, 26(11): 1701-1707.
- [73] Chen G, Wu D, Guo W, et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019[J]. *The Journal of clinical investigation*, 2020, 130(5): 2620-2629.
-

-
-
- [74] Chen X, Zhao B, Qu Y, et al. Detectable Serum Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viral Load (RNAemia) Is Closely Correlated With Drastically Elevated Interleukin 6 Level in Critically Ill Patients With Coronavirus Disease 2019[J]. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 2020, 71(8): 1937-1942.
- [75] Ruan Q, Yang K, Wang W, et al. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China[J]. *Intensive care medicine*, 2020, 46(5): 846-848.
- [76] Rodrigues T S, De Sá K S G, Ishimoto A Y, et al. Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients[J]. *The Journal of experimental medicine*, 2021, 218(3).
- [77] Blot M, Jacquier M, Aho Glele L-S, et al. CXCL10 could drive longer duration of mechanical ventilation during COVID-19 ARDS[J]. *Critical care (London, England)*, 2020, 24(1): 632.
- [78] Xiong Y, Liu Y, Cao L, et al. Transcriptomic characteristics of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells in COVID-19 patients[J]. *Emerging microbes & infections*, 2020, 9(1): 761-770.
- [79] Chua R L, Lukassen S, Trump S, et al. COVID-19 severity correlates with airway epithelium-immune cell interactions identified by single-cell analysis[J]. *Nature biotechnology*, 2020, 38(8): 970-979.
- [80] Karki R, Sharma B R, Tuladhar S, et al. Synergism of TNF- α and IFN- γ Triggers Inflammatory Cell Death, Tissue Damage, and Mortality in SARS-CoV-2 Infection and Cytokine Shock Syndromes[J]. *Cell*, 2021, 184(1).
- [81] Planas D, Veyer D, Baidaliuk A, et al. Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization[J]. *Nature*, 2021, 596(7871): 276-280.
- [82] Shrestha L B, Tedla N, Bull R A. Broadly-Neutralizing Antibodies Against Emerging SARS-CoV-2 Variants[J]. *Frontiers in immunology*, 2021, 12: 752003.
- [83] Huang S-Y, Kung Y-A, Huang P-N, et al. Stability of SARS-CoV-2 Spike G614 Variant Surpasses That of the D614 Variant after Cold Storage[J]. *mSphere*, 2021, 6(2).
- [84] Plante J A, Liu Y, Liu J, et al. Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness[J]. *Nature*, 2021, 592(7852): 116-121.
- [85] Jackson C B, Zhang L, Farzan M, et al. Functional importance of the D614G mutation in the SARS-CoV-2 spike protein[J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2021, 538: 108-115.
- [86] Cheng Y-W, Chao T-L, Li C-L, et al. D614G Substitution of SARS-CoV-2 Spike Protein Increases Syncytium Formation and Virus Titer via Enhanced Furin-Mediated Spike Cleavage[J]. *mBio*, 2021, 12(4): e0058721.
-

-
-
- [87] Rajah M M, Hubert M, Bishop E, et al. SARS-CoV-2 Alpha, Beta, and Delta variants display enhanced Spike-mediated syncytia formation[J]. *The EMBO journal*, 2021, 40(24): e108944.
- [88] Neerukonda S N, Vassell R, Lusvarghi S, et al. SARS-COV-2 Delta variant displays moderate resistance to neutralizing antibodies and spike protein properties of higher soluble ACE2 sensitivity, enhanced cleavage and fusogenic activity[J]. *bioRxiv : the preprint server for biology*, 2021.
- [89] Mccallum M, Walls A C, Sprouse K R, et al. Molecular basis of immune evasion by the Delta and Kappa SARS-CoV-2 variants[J]. *Science (New York, N.Y.)*, 2021, 374(6575): 1621-1626.
- [90] Wang M, Zhang L, Li Q, et al. Reduced sensitivity of the SARS-CoV-2 Lambda variant to monoclonal antibodies and neutralizing antibodies induced by infection and vaccination[J]. *Emerging microbes & infections*, 2022, 11(1): 18-29.
- [91] Zhang L, Li Q, Liang Z, et al. The significant immune escape of pseudotyped SARS-CoV-2 variant Omicron[J]. *Emerging microbes & infections*, 2022, 11(1): 1-5.
- [92] Ai J, Zhang H, Zhang Y, et al. Omicron variant showed lower neutralizing sensitivity than other SARS-CoV-2 variants to immune sera elicited by vaccines after boost[J]. *Emerging microbes & infections*, 2022, 11(1): 337-343.
- [93] Choi A, Koch M, Wu K, et al. Serum Neutralizing Activity of mRNA-1273 against SARS-CoV-2 Variants[J]. *Journal of virology*, 2021, 95(23): e0131321.
- [94] Wu J, Zhang L, Zhang Y, et al. The Antigenicity of Epidemic SARS-CoV-2 Variants in the United Kingdom[J]. *Frontiers in immunology*, 2021, 12: 687869.
- [95] Fernández J, Bruneau N, Fasce R, et al. Neutralization of alpha, gamma, and D614G SARS-CoV-2 variants by CoronaVac vaccine-induced antibodies[J]. *Journal of medical virology*, 2022, 94(1): 399-403.
- [96] Yang Y, Zang J, Xu S, et al. Elicitation of Broadly Neutralizing Antibodies against B.1.1.7, B.1.351, and B.1.617.1 SARS-CoV-2 Variants by Three Prototype Strain-Derived Recombinant Protein Vaccines[J]. *Viruses*, 2021, 13(8).
- [97] Mlcochova P, Kemp S A, Dhar M S, et al. SARS-CoV-2 B.1.617.2 Delta variant replication and immune evasion[J]. *Nature*, 2021, 599(7883): 114-119.
- [98] Harrington D, Kele B, Pereira S, et al. Confirmed Reinfection With Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Variant VOC-202012/01[J]. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 2021, 73(10): 1946-1947.
- [99] Lumley S F, O'donnell D, Stoesser N E, et al. Antibody Status and Incidence of SARS-CoV-2 Infection in Health Care Workers[J]. *The New England journal of medicine*, 2021, 384(6): 533-540.
- [100] Tillett R L, Sevinsky J R, Hartley P D, et al. Genomic evidence for reinfection with SARS-CoV-2: a case study[J]. *The Lancet. Infectious diseases*, 2021, 21(1): 52-58.
-

-
-
- [101] Harrington D, Kele B, Pereira S, et al. Confirmed Reinfection with SARS-CoV-2 Variant VOC-202012/01[J]. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 2021.
- [102] Lumley S F, O'donnell D, Stoesser N E, et al. Antibody Status and Incidence of SARS-CoV-2 Infection in Health Care Workers[J]. *The New England journal of medicine*, 2021, 384(6): 533-540.
- [103] Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. *Nature*, 1975, 256(5517): 495-497.
- [104] Shin S U, Morrison S L. Production and properties of chimeric antibody molecules[J]. *Methods in enzymology*, 1989, 178: 459-476.
- [105] Lonberg N. Fully human antibodies from transgenic mouse and phage display platforms[J]. *Current opinion in immunology*, 2008, 20(4): 450-459.
- [106] Gera N, Hussain M, Rao B M. Protein selection using yeast surface display[J]. *Methods (San Diego, Calif.)*, 2013, 60(1): 15-26.
- [107] Boder E T, Raeeszadeh-Sarmazdeh M, Price J V. Engineering antibodies by yeast display[J]. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2012, 526(2).
- [108] Boder E T, Wittrup K D. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries[J]. *Nature biotechnology*, 1997, 15(6): 553-557.
- [109] Mattheakis L C, Bhatt R R, Dower W J. An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(19): 9022-9026.
- [110] Hanes J, Plückthun A. In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(10): 4937-4942.
- [111] Jermutus L, Honegger A, Schwesinger F, et al. Tailoring in vitro evolution for protein affinity or stability[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(1): 75-80.
- [112] Huse W D, Sastry L, Iverson S A, et al. Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda[J]. *Science (New York, N.Y.)*, 1989, 246(4935): 1275-1281.
- [113] Lerner R A. Combinatorial antibody libraries: new advances, new immunological insights[J]. *Nature reviews. Immunology*, 2016, 16(8): 498-508.
- [114] Smith G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface[J]. *Science (New York, N.Y.)*, 1985, 228(4705): 1315-1317.
- [115] Mccafferty J, Griffiths A D, Winter G, et al. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains[J]. *Nature*, 1990, 348(6301): 552-554.
- [116] Weaver D, Costantini F, Imanishi-Kari T, et al. A transgenic immunoglobulin mu gene prevents rearrangement of endogenous genes[J]. *Cell*, 1985, 42(1): 117-127.
-

-
-
- [117] Storb U. Transgenic mice with immunoglobulin genes[J]. Annual review of immunology, 1987, 5: 151-174.
- [118] Brüggemann M, Osborn M J, Ma B, et al. Human antibody production in transgenic animals[J]. Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis, 2015, 63(2): 101-108.
- [119] Carbonetti S, Oliver B G, Vigdorovich V, et al. A method for the isolation and characterization of functional murine monoclonal antibodies by single B cell cloning[J]. J Immunol Methods, 2017, 448: 66-73.
- [120] Cao Y, Su B, Guo X, et al. Potent neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 identified by high-throughput single-cell sequencing of convalescent patients' B cells[J]. Cell, 2020.
- [121] Steinitz M, Klein G, Koskimies S, et al. EB virus-induced B lymphocyte cell lines producing specific antibody[J]. Nature, 1977, 269(5627): 420-422.
- [122] Villota C, Campos A, Vidaurre S, et al. Expression of mitochondrial non-coding RNAs (ncRNAs) is modulated by high risk human papillomavirus (HPV) oncogenes[J]. The Journal of biological chemistry, 2012, 287(25): 21303-21315.
- [123] 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]. Nature medicine, 2004, 10(8): 871-875.
- [124] Nogales-Gadea G, Saxena A, Hoffmann C, et al. Generation of Recombinant Human IgG Monoclonal Antibodies from Immortalized Sorted B Cells[J]. Journal of visualized experiments : JoVE, 2015(100): e52830.
- [125] Guthmiller J J, Dugan H L, Neu K E, et al. An Efficient Method to Generate Monoclonal Antibodies from Human B Cells[J]. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2019, 1904: 109-145.
- [126] Tousizadeh B, Moghim S, Chaleshtori A R S, et al. Application of Epstein-Barr Virus for Optimization of Immortalized B-lymphocyte Production as a Positive Control in Genetic Studies[J]. Advanced biomedical research, 2017, 6: 80.
- [127] Mcfadden K, Hafez A Y, Kishton R, et al. Metabolic stress is a barrier to Epstein-Barr virus-mediated B-cell immortalization[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(6): E782-E790.
- [128] Chen X, Kamranvar S A, Masucci M G. Oxidative stress enables Epstein-Barr virus-induced B-cell transformation by posttranscriptional regulation of viral and cellular growth-promoting factors[J]. Oncogene, 2016, 35(29): 3807-3816.
- [129] Hafez A Y, Messinger J E, Mcfadden K, et al. Limited nucleotide pools restrict Epstein-Barr virus-mediated B-cell immortalization[J]. Oncogenesis, 2017, 6(6): e349.

-
-
- [130] Lima-Junior D S, Krishnamurthy S R, Bouladoux N, et al. Endogenous retroviruses promote homeostatic and inflammatory responses to the microbiota[J]. *Cell*, 2021, 184(14).
- [131] Vijay R. MERS Coronavirus[M]. Springer, 2020: 107-116.
- [132] Nie J, Li Q, Wu J, et al. Quantification of SARS-CoV-2 neutralizing antibody by a pseudotyped virus-based assay[J]. *Nature protocols*, 2020, 15(11): 3699-3715.
- [133] Hao Z, Lv D, Ge Y, et al.: drawing SVG graphics to visualize and map genome-wide data on the idiograms[J]. *PeerJ. Computer science*, 2020, 6: e251.
- [134] Xue B, Zeng T, Jia L, et al. Identification of the distribution of human endogenous retroviruses K (HML-2) by PCR-based target enrichment sequencing[J]. *Retrovirology*, 2020, 17(1): 10.
- [135] Xue B, Sechi L A, Kelvin D J. Human Endogenous Retrovirus K (HML-2) in Health and Disease[J]. *Frontiers in microbiology*, 2020, 11: 1690.
- [136] Wang J, Vasaiakar S, Shi Z, et al. WebGestalt 2017: a more comprehensive, powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit[J]. *Nucleic acids research*, 2017, 45(W1): W130-W137.
- [137] Guo Y, Li T, Xia X, et al. Different Profiles of Antibodies and Cytokines Were Found Between Severe and Moderate COVID-19 Patients[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12(3344).
- [138] Wu H S, Chiu S C, Tseng T C, et al. Serologic and molecular biologic methods for SARS-associated coronavirus infection, Taiwan[J]. *Emerg Infect Dis*, 2004, 10(2): 304-10.
- [139] 李林, 李韩平, 郭垚霖等. N 蛋白特异性 IgG4 在甄别新型冠状病毒感染者和疫苗接种者中的应用[P]. 中国专利: CN113624965A 2021-08-05.
- [140] Song D, Chaerkady R, Tan A C, et al. Antitumor activity and molecular effects of the novel heat shock protein 90 inhibitor, IPI-504, in pancreatic cancer[J]. *Molecular cancer therapeutics*, 2008, 7(10): 3275-3284.
- [141] Berardini T Z, Mundodi S, Reiser L, et al. Functional annotation of the Arabidopsis genome using controlled vocabularies[J]. *Plant physiology*, 2004, 135(2): 745-755.
- [142] Ashburner M, Ball C A, Blake J A, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium[J]. *Nature genetics*, 2000, 25(1): 25-29.
- [143] Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, et al. The KEGG resource for deciphering the genome[J]. *Nucleic acids research*, 2004, 32(Database issue): D277-D280.
- [144] Zhang X, Lu S, Li H, et al. Viral and Antibody Kinetics of COVID-19 Patients with Different Disease Severities in Acute and Convalescent Phases: A 6-Month Follow-Up Study[J]. *Virologica Sinica*, 2020: 1-10.
-

-
-
- [145] Boonyaratanakornkit J, Morishima C, Selke S, et al. Clinical, laboratory, and temporal predictors of neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 among COVID-19 convalescent plasma donor candidates[J]. *J Clin Invest*, 2020.
- [146] Shi R, Shan C, Duan X, et al. A human neutralizing antibody targets the receptor binding site of SARS-CoV-2[J]. *Nature*, 2020.
- [147] Chi X, Yan R, Zhang J, et al. A potent neutralizing human antibody reveals the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2 as a site of vulnerability[J], 2020.
- [148] Gu Y, Cao J, Zhang X, et al. Interaction network of SARS-CoV-2 with host receptome through spike protein[J]. *bioRxiv*, 2020: 2020.09.09.287508.
- [149] Premkumar L, Segovia-Chumbez B, Jadi R, et al. The receptor binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients[J]. *Science immunology*, 2020, 5(48).
- [150] Tian X, Liu L, Jiang W, et al. Potent and Persistent Antibody Response in COVID-19 Recovered Patients[J]. *Frontiers in immunology*, 2021, 12: 659041.
- [151] Hashem A M, Algaissi A, Almahboub S A, et al. Early Humoral Response Correlates with Disease Severity and Outcomes in COVID-19 Patients[J]. *Viruses*, 2020, 12(12).
- [152] Arvin A M, Fink K, Schmid M A, et al. A perspective on potential antibody-dependent enhancement of SARS-CoV-2[J]. *Nature*, 2020, 584(7821): 353-363.
- [153] Olas K, Butterweck H, Teschner W, et al. Immunomodulatory properties of human serum immunoglobulin A: anti-inflammatory and pro-inflammatory activities in human monocytes and peripheral blood mononuclear cells[J]. *Clinical and experimental immunology*, 2005, 140(3): 478-490.
- [154] Leong K W, Ding J L. The unexplored roles of human serum IgA[J]. *DNA and cell biology*, 2014, 33(12): 823-829.
- [155] Oortwijn B D, Roos A, Van Der Boog P J M, et al. Monomeric and polymeric IgA show a similar association with the myeloid Fc α RI/CD89[J]. *Molecular immunology*, 2007, 44(5): 966-973.
- [156] Suhandynata R T, Hoffman M A, Kelner M J, et al. Longitudinal Monitoring of SARS-CoV-2 IgM and IgG Seropositivity to Detect COVID-19[J]. *The journal of applied laboratory medicine*, 2020, 5(5): 908-920.
- [157] Ma H, Zeng W, He H, et al. Serum IgA, IgM, and IgG responses in COVID-19[J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17(7): 773-775.
- [158] Valenzuela N M, Schaub S. The Biology of IgG Subclasses and Their Clinical Relevance to Transplantation[J]. *Transplantation*, 2018, 102(1S Suppl 1).
- [159] Damelang T, Rogerson S J, Kent S J, et al. Role of IgG3 in Infectious Diseases[J]. *Trends in immunology*, 2019, 40(3): 197-211.
-

-
-
- [160] Cheung C Y, Poon L L M, Ng I H Y, et al. Cytokine responses in severe acute respiratory syndrome coronavirus-infected macrophages in vitro: possible relevance to pathogenesis[J]. *Journal of virology*, 2005, 79(12): 7819-7826.
- [161] Okabayashi T, Kariwa H, Yokota S-I, et al. Cytokine regulation in SARS coronavirus infection compared to other respiratory virus infections[J]. *Journal of medical virology*, 2006, 78(4): 417-424.
- [162] Sattler A, Angermair S, Stockmann H, et al. SARS-CoV-2-specific T cell responses and correlations with COVID-19 patient predisposition[J]. *The Journal of clinical investigation*, 2020, 130(12): 6477-6489.
- [163] Du H, Dong X, Zhang J-J, et al. Clinical characteristics of 182 pediatric COVID-19 patients with different severities and allergic status[J]. *Allergy*, 2021, 76(2): 510-532.
- [164] Yu H-Q, Sun B-Q, Fang Z-F, et al. Distinct features of SARS-CoV-2-specific IgA response in COVID-19 patients[J]. *The European respiratory journal*, 2020, 56(2): 2001526.
- [165] Dullaers M, Li D, Xue Y, et al. A T cell-dependent mechanism for the induction of human mucosal homing immunoglobulin A-secreting plasmablasts[J]. *Immunity*, 2009, 30(1): 120-129.
- [166] Zhao Y, Qin L, Zhang P, et al. Longitudinal COVID-19 profiling associates IL-1RA and IL-10 with disease severity and RANTES with mild disease[J]. *JCI Insight*, 2020, 5(13).
- [167] Han H, Ma Q, Li C, et al. Profiling serum cytokines in COVID-19 patients reveals IL-6 and IL-10 are disease severity predictors[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1): 1123-1130.
- [168] Barrett P N, Mundt W, Kistner O, et al. Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines[J]. *Expert review of vaccines*, 2009, 8(5): 607-618.
- [169] Li Y, Li C, Xue P, et al. ISG56 is a negative-feedback regulator of virus-triggered signaling and cellular antiviral response[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(19): 7945-7950.
- [170] Gilbert C, Lefevre C, Preisser L, et al. Age-Related Expression of IFN- λ 1 IFN-I and Beta-Defensins in the Nasopharynx of SARS-CoV-2-Infected Individuals[J]. *Frontiers in immunology*, 2021, 12: 750279.
- [171] Pazgier M, Hoover D M, Yang D, et al. Human beta-defensins[J]. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 2006, 63(11): 1294-1313.
- [172] Sacks D, Baxter B, Campbell B C V, et al. Multisociety Consensus Quality Improvement Revised Consensus Statement for Endovascular Therapy of Acute Ischemic Stroke[J]. *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society*, 2018, 13(6): 612-632.
-

-
-
- [173] El-Asmi F, Mcmanus F P, Thibault P, et al. Interferon, restriction factors and SUMO pathways[J]. *Cytokine & growth factor reviews*, 2020, 55: 37-47.
- [174] Rezaei S D, Hayward J A, Norden S, et al. HERV-K Gag RNA and Protein Levels Are Elevated in Malignant Regions of the Prostate in Males with Prostate Cancer[J]. *Viruses*, 2021, 13(3).
- [175] Lemaître C, Harper F, Pierron G, et al. The HERV-K human endogenous retrovirus envelope protein antagonizes Tetherin antiviral activity[J]. *Journal of virology*, 2014, 88(23): 13626-13637.
- [176] Meyer L, López T, Espinosa R, et al. A simplified workflow for monoclonal antibody sequencing[J]. *PloS one*, 2019, 14(6): e0218717.
- [177] Le Bert N, Tan A T, Kunasegaran K, et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls[J]. *Nature*, 2020, 584(7821): 457-462.
- [178] Ali Y M, Ferrari M, Lynch N J, et al. Lectin Pathway Mediates Complement Activation by SARS-CoV-2 Proteins[J]. *Frontiers in immunology*, 2021, 12: 714511.
- [179] Chen K, Xiao F, Hu D, et al. SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein Interacts with RIG-I and Represses RIG-Mediated IFN- β Production[J]. *Viruses*, 2020, 13(1).
- [180] Ai P, Li Z, Jiang Y, et al. Tumor microenvironment contributes to Epstein-Barr virus anti-nuclear antigen-1 antibody production in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Oncology Letters*, 2017, 14(2): 2458-2462.
- [181] Deschamps T, Bazot Q, Leske D M, et al. Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 interacts with regulator of chromosome condensation 1 dynamically throughout the cell cycle[J]. *The Journal of General Virology*, 2017, 98(2): 251-265.
- [182] Mühe J, Wang F. Species-specific functions of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2) reveal dual roles for initiation and maintenance of B cell immortalization[J]. *PLoS Pathogens*, 2017, 13(12): e1006772.
- [183] Inman G J, Farrell P J. Epstein-Barr virus EBNA-LP and transcription regulation properties of pRB, p107 and p53 in transfection assays[J]. *The Journal of General Virology*, 1995, 76 (Pt 9): 2141-2149.
- [184] Wang L W, Jiang S, Gewurz B E. Epstein-Barr Virus LMP1-Mediated Oncogenicity[J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(21).
- [185] Crawford D H, Ando I. EB virus induction is associated with B-cell maturation[J]. *Immunology*, 1986, 59(3): 405-409.
- [186] Ali A I, Badran Y R, Hassuneh M R, et al. Effect of Interleukins on Antibody Production by Epstein-Barr Virus Transformed B Cells[J]. *Monoclonal Antibodies In Immunodiagnosis and Immunotherapy*, 2015, 34(3): 162-168.
- [187] Levhar N, Ungar B, Kopylov U, et al. Propagation of EBV-driven Lymphomatous Transformation of Peripheral Blood B Cells by Immunomodulators and Biologics

Used in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease[J]. Inflammatory Bowel Diseases, 2020, 26(9): 1330-1339.

附录

附表 1. 抗体 N2E5 可变区序列

Supplementary Table 1. Antibody N2E5 variable region sequence

轻重链	区域	序列 (5'-3')
N2E5 重链可变区	FR1	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTCCAGCCT GGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
	CDR1	GGGTAAACGTCAGTAGCAACTAC
	FR2	ATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTGGAGTGG GTCTCAGTT
	CDR2	ATTTATAGCGGTGGTAGTACA
	FR3	TACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAC ACACTTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTG AGACCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGT
	CDR3	GTGAGAGATCGGCGTATAGAGGGAGCCTACTACGGTATGGAC GTC
	FR4	TGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
	N2E5 轻链可变区	FR1
CDR1		GTATTGTTAAACCATTTT
FR2		TCTTATTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTCCTAG TAATATAT
CDR2		AAAGACATT
FR3		GAGAGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGCTTCTCTGGCTCCAGCT CAGAGACAACAGTCACGTTGACCATCAGTGGAGTCCAGGCAG AAGACGAGGCTGACTATTACTGT
CDR3		CAATCAGTAGACAGCAGTGGTGCTTCTCTGGGTG
FR4		TTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAG

附表 2. 抗体 N8C6 可变区序列

Supplementary Table 2. Antibody N8C6 variable region sequence

轻重链	区域	序列 (5'-3')
N8C6 重链可变区	FR1	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAATCCC GGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGACTTCT
	CDR1	GGATATTCCTTTACCACCTACTGG
	FR2	ATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGG ATGGGGATC
	CDR2	ATCTATCCTGGTGA CTCTGAGACC AGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCG
	FR3	ACAGGGCCATCAACACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGA AGGCCTCGGACACCGCCATATTTTACTGT
	CDR3	GCGAGACGGGTGCGGGTGGGCTTCCTTTGACTAC
	FR4	TGGGGCCAGGGTACCCTGGTCAACGTCTCCTCAG
	N8C6 轻链可变区	FR1
CDR1		AGCTCCAACATCGGAGCAGGTTATGAT
FR2		GTAAACTGGTACCGGCAGCTTCCAGGAACAGCCCCAAACTC CTCATCTAT
CDR2		GGTAACAAC AATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGT
FR3		CTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGGCAGA GGATGAGGCTGATTTTACTGC
CDR3		CAGTCCTATGACAGGAGCCTGAGTACCTGGGTG
FR4		TTCGGCGGAGGGACCAGGCTGACCGTCCTAG

作者在学期间取得的学术成果

1. **Guo Y**, Li T, Xia X, et al. Different Profiles of Antibodies and Cytokines Were Found Between Severe and Moderate COVID-19 Patients [J]. *Front Immunol.* 2021;12:723585. (doi:10.3389/fimmu.2021.723585. IF=7.561, 第一作者)

2. **Guo Y**, Yang C, Liu Y, et al. High Expression of HERV-K (HML-2) Might Stimulate Interferon in COVID-19 Patients. *Viruses.* 2022;14(5):996. (https://doi.org/10.3390/v14050996, IF=5.048, 第一作者)

3. Xing Y, **Guo Y**, Wang L, et al. Identification of Two Novel HIV-1 Second-Generation Recombinant Forms (CRF01_AE/CRF07_BC) in Hebei, China [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2021;37(12):967-972. (doi:10.1089/AID.2021.0057. IF=2.205, 共同一作)

4. Li X, **Guo Y**, Li H, et al. Infection by Diverse HIV-1 Subtypes Leads to Different Elevations in HERV-K Transcriptional Levels in Human T Cell Lines [J]. *Front Microbiol.* 2021;12:662573. (doi:10.3389/fmicb.2021.662573. IF=5.640, 第二作者)

5. **Guo Y**, Liu Y, Li Y, et al. Reduced sensitivity of emerging SARS-CoV-2 variants to sera from patients infected by Wuhan strain. *Infection, Genetics and Evolution.* (IF=3.342, 正在投稿, 第一作者)

6. 专利: 以第三完成人申请国家发明专利 1 项: N 蛋白特异性 IgG4 在甄别新型冠状病毒感染者和疫苗接种者中的应用 (专利申请号: 202110895268.6)

主要简历

姓 名:	郭焱霖	性 别:	女
出生年月:	1997 年 3 月	民 族:	汉
籍 贯:	四川 南充	政治面貌:	中共党员
专 业:	微生物学	导 师:	李林 研究员

主要学习经历:

2015.9-2019.6 西南科技大学大学 生物技术专业 理学学士

2019.9- 至今 军事科学院军事医学研究院微生物流行病学研究所
微生物专业 理学硕士

攻读硕士学位期间获得的奖励:

2020 年 12 月 军事科学院 获得二等学业奖学金

2021 年 12 月 军事科学院 获得一等学业奖学金

攻读硕士学位期间取得的科研成果:

1. **Guo Y**, Li T, Xia X, et al. Different Profiles of Antibodies and Cytokines Were Found Between Severe and Moderate COVID-19 Patients [J]. *Front Immunol.* 2021;12:723585. (doi:10.3389/fimmu.2021.723585. IF=7.561, 第一作者)

2. **Guo Y**, Yang C, Liu Y, et al. High Expression of HERV-K (HML-2) Might Stimulate Interferon in COVID-19 Patients. *Viruses.* 2022;14(5):996. (https://doi.org/10.3390/v14050996, IF=5.048, 第一作者)

3. Xing Y, **Guo Y**, Wang L, et al. Identification of Two Novel HIV-1 Second-Generation Recombinant Forms (CRF01_AE/CRF07_BC) in Hebei, China [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2021;37(12):967-972. (doi:10.1089/AID.2021.0057. IF=2.205, 共同一作)

4. Li X, **Guo Y**, Li H, et al. Infection by Diverse HIV-1 Subtypes Leads to Different Elevations in HERV-K Transcriptional Levels in Human T Cell Lines [J]. *Front Microbiol.* 2021;12:662573. (doi:10.3389/fmicb.2021.662573. IF=5.640, 第二作者)

5. **Guo Y**, Liu Y, Li Y, et al. Reduced sensitivity of emerging SARS-CoV-2 variants to sera from patients infected by Wuhan strain. *Infection, Genetics and Evolution*. (IF=3.342, 正在投稿, 第一作者)

6. 专利: 以第三完成人申请国家发明专利 1 项: N 蛋白特异性 IgG4 在甄别新型冠状病毒感染者和疫苗接种者中的应用 (专利申请号: 202110895268.6)

致 谢

2019年底爆发的 COVID-19 疫情给全球公共健康、经济、文化带来巨大的挑战，我国在此次疫情中的出色表现让我倍感自豪，此生无悔入华夏。感谢祖国的繁荣昌盛，让我们能全心全意投入到科研事业中，我也很荣幸能从事 COVID-19 疫情相关的研究课题，希望我的研究能为抗疫事业贡献一份绵薄之力。

在军事科学院军事医学研究院学习期间，我对军队严明的纪律和丰富的文化有了深刻的体会，这些感悟为我后续严肃活泼的科研生活奠定了基础，我很感恩能拥有这一段经历，也很感谢学校的培养。

我的导师李林研究员严谨的治学态度、渊博的专业学识、活跃的科研思维、积极的人生态度，使我受益匪浅，他身处抗疫前线时也总能抽出时间关心课题组的发展方向和学生的课题进展，是一个十分负责的老师。在硕士课题开展期间李老师的鞭策让我对课题有了更深入的看法，也对整个病毒学领域有了较深入的了解。感谢李老师这三年对我的栽培，他对事业的投入、生活的热爱和学生的宽容都是我的榜样。

我的指导老师刘永健老师对科研总是充满热情，他孜孜不倦的探索精神让我也学会了要永远对科研保存赤诚之心。在实施课题时，刘老师对我有求必应，即使是相隔 7 小时的时差，他仍能及时答复我的疑问。我的另一位指导老师李天一老师在我课题实施细节上给了我很大的帮助，她规范的实验操作、果断的办事风格使我打下了牢靠的科研基础。我时常因为我有两位指导老师而欣喜，我很感谢他们教给我的一切。

感谢课题组李敬云老师的经验支持，她从业多年的专业素质、敏锐眼光给我的课题锦上添花。感谢李韩平老师为课题组样本管理和试剂保障做出的贡献，也很感谢他在我撰写毕业论文时提出的专业建议。感谢韩婧婉老师对细胞室和 BSL-3 实验室的有序管理，在我遇到技术难点时总能从她那获得帮助。感谢贾磊老师组织的学术沙龙，让我学到了多方面的专业知识。感谢王晓林老师在财务工作上的付出，让我能专心科研。感谢张伯寒老师对我实验的帮助，在她的帮助下我的实验收获了理想的结果。感谢任永珍、刘子炜、张颖等实验室工作人员对我课题提供的帮助。感谢张昱师兄、李曦师兄、姚腾冲师兄、张冬师姐、朱国新师兄、刘梦莹师姐的包容和照顾。感谢王晓蕊师姐教导我积极乐观的人生态度，让我有足够的勇气面对实验的失败，做科研里打不倒的小强。感谢实验室日日陪伴的同窗李阳、邢颖、韩磊磊、朱博、李天夫、李思其、杨彩琴、李正阳、郭星、施玉婷、李亚婷、刘志、康倩等，希望我们共成长同进步。愿我们这个大家庭的每一个成员都能活得精彩，祝愿我们课题组越来越好。

感谢我的父母，未曾质疑我的能力、阻碍我的发展，幸得靠山，行路畅然，吾傲为其傲。感谢男友章文对我的理解、照顾、包容，得一良人，共赴顶峰。感谢十年挚友黄莉娟对我的肯定和鼓励，待白发苍苍，仍是如此亲密无间。感谢我的同窗好友张明珠、彭学芳、宋晓琳等，我们曾相互鼓舞度过了人生迷茫期。

感谢自己，纵使人生万苦千辛，保持初心，快乐成长。