

· 论著 ·

新型冠状病毒受体结合域 L452R 和 T478K 突变蛋白的免疫原性研究

安彤 李思奇 张柯欣 沈钱通 张月 张温阳 朱贇 高孟 陈刚 庄昉成

杭州医学院基础医学与法医学院, 杭州 310053

通信作者: 庄昉成, Email: fczhuang@163.com

【摘要】 目的 制备含有 L452R 和 T478K 突变位点的新型冠状病毒受体结合域 (RBD)-破伤风类毒素蛋白 (TT), 表达后蛋白免疫小鼠以了解突变体蛋白的免疫原性。方法 设计 2 对新型冠状病毒引物对 RBD 中的 L452R 和 T478K 进行突变, 并将 TT 肽的核苷酸片段嵌入 RBD 中; 利用大肠埃希菌表达系统表达蛋白, 借助离子柱层析技术纯化出目的蛋白, 复性获得空间构象后通过 ELISA、高效液相和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (SDS-PAGE) 等进行检定; 免疫小鼠后 ELISPOT 检测其细胞免疫水平; 用竞争法 ELISA 和活病毒中和试验评估其中和抗体对新型冠状病毒流行突变株的抑制能力。结果 成功构建了新型冠状病毒 RBD 的 L452R 和 T478K 突变蛋白, 蛋白相对分子质量为 26 390。小鼠免疫后产生了特异性的细胞免疫, 突变蛋白组刺激后产生的分泌 IFN- γ 的效应 T 细胞为 (21.43 \pm 11.71) 个斑点形成细胞/5 \times 10⁵ 个细胞, 高于对照组 (3.38 \pm 2.56) 个斑点形成细胞/5 \times 10⁵ 个细胞, 差异有统计学意义 ($t=4.17, P=0.003$); 同时产生了针对新型冠状病毒德尔塔、奥密克戎 (BA.1) 流行株的高滴度中和抗体, 中和滴度几何平均数分别为 3 012.28 和 1 086.12。结论 本研究所构建的 L452R 和 T478K 突变蛋白对流行的新型冠状病毒德尔塔、奥密克戎 (BA.1) 流行株有效, 为开发重组广谱的新型冠状病毒疫苗提供依据。

【关键词】 新型冠状病毒; 重组疫苗; 受体结合域突变; 免疫原性

基金项目: 浙江省科学技术厅公益研究计划 (LGF19C080001); 新型疫苗浙江省工程研究中心 (浙发改高技 [2021]389 号)

DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20220828-00180

Study on immunogenicity of L452R and T478K mutant protein in receptor-binding domain of SARS-CoV-2

An Tong, Li Siqi, Zhang Kexin, Shen Qiantong, Zhang Yue, Zhang Wenyang, Zhu Yun, Gao Meng, Chen Gang, Zhuang Fangcheng

School of Basic Medical and Forensic Medical, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053, China

Corresponding author: Zhuang Fangcheng, Email: fczhuang@163.com

【Abstract】 Objective To prepare the receptor-binding domain (RBD)-tetanus toxoid (TT) of SARS-CoV-2 containing L452R and T478K mutation sites, and to immunize to mice to understand the immunogenicity of the mutant protein. **Methods** Two pairs of primers were designed to mutate L452R and T478K in RBD, and the nucleotide fragment of TT peptide was inserted into RBD of SARS-CoV-2. The protein was expressed in *E.coli* expression system and purified by ion column chromatography, and was renatured and identified by ELISA, high performance liquid chromatography and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The cellular immune level of immunized mice was detected by ELISPOT. The inhibitory effect of neutralizing antibody on SARS-CoV-2 epidemic mutants was evaluated by competitive ELISA and live virus neutralization test. **Results** The L452R and T478K mutant protein in RBD of SARS-CoV-2 was successfully constructed. The relative molecular mass was 26 390. Specific cellular immunity was produced in mice after immunization. The number of IFN- γ secreting effector T cells in mutant protein group was (21.43 \pm 11.71) SFC/5 \times 10⁵ cells, which was significantly higher than that of (3.38 \pm 2.56) SFC/5 \times 10⁵ cells in control group ($t=4.17, P=0.003$). High titer neutralizing antibodies against Delta and Omicron (BA.1) epidemic variants were produced by the mutant protein, and the geometric mean neutralizing titers were 3 012.28 and 1 086.12, respectively. **Conclusions** The L452R and T478K mutant protein constructed in this study is effective

against SARS-CoV-2 Delta and Omicron (BA.1) epidemic variants, which provides a basis for the development of recombinant broad-spectrum COVID-19 vaccine.

【Key words】 SARS-CoV-2; Recombinant vaccine; Receptor-binding domain mutation; Immunogenicity

Fund program: Public Welfare Plan of Science Technology Department of Zhejiang (LGF19C080001); Novel Vaccine Engineering Research Center of Zhejiang Province (Zhe Fa Gai Gao Ji[2021] No. 389)

DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20220828-00180

新型冠状病毒表面的刺突 S 蛋白在病毒侵染宿主细胞过程中发挥着重要作用。S 蛋白由 S1 亚基和 S2 亚基构成, 其中 S1 亚基上的受体结合域 (RBD) 与细胞表面的血管紧张素转化酶 2 (ACE-2) 识别并结合^[1], 随后 S1、S2 亚基解体, S2 亚基介导病毒包膜与细胞内体膜的融合^[2-3] 病毒侵入细胞。目前新型冠状病毒正在不断变异, 尤其是 RBD 发生的突变可能会改变蛋白构象, 影响与宿主 ACE-2 受体的相互作用模式^[4], 增强病毒的感染能力。研究报道新型冠状病毒德尔塔 (Delta) 变异株存在 L452R、T478K 的突变, 奥密克戎 (Omicron) 变异株存在 T478K 的突变^[5]。本研究筛选 T478K 和 L452R 两个突变位点来进行突变蛋白表达, 并对突变蛋白与不同新型冠状病毒变异株进行免疫原性的研究, 为开发重组广谱的新型冠状病毒疫苗提供依据。

材料与方 法

一、材料

限制性内切酶 Xho I 和 Nco I 购自赛默飞世尔科技公司; 感受态细胞 BL21 (DE3) 由杭州医学院基础医学与法医学院保存; 高纯度质粒小提试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司; ACE-2 蛋白购自金斯瑞公司; ELISPOT IFN- γ 检测试剂盒购自达科为公司; Vero 细胞和新型冠状病毒毒株由中国 CDC 病毒研究 P3 实验室所保存; 色谱柱 (TSKgel-G3000SWxl) 购自上海东曹生物科技有限公司; HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗购自北京康为世纪生物科技有限公司; BCA 试剂盒 (Pierce™ BCA Protein Assay Kit) 购自赛默飞世尔科技公司。

主要仪器包括梯度 PCR 仪 (Biometra 公司)、高效液相色谱仪 (安捷伦公司)、纯化仪 (Bio-rad 公司)、高压匀浆仪凝胶成像仪 ChemiDoc™ XRS+ (Bio-

rad 公司)、电泳仪 Powerpac™ HC (Bio-rad 公司)、酶标仪 (Molecular Devices 公司)。

二、方法

1. 构建突变株

本实验室已构建新型冠状病毒重组表达质粒 pET-28a-RBD-破伤风类毒素蛋白 (TT), 选取新型冠状病毒蛋白上的 RBD 蛋白基因 (Val308-Gly548aa) (GenBank: AF389424.2 831Q-844E) 质粒为模板, 设计 2 对引物进行 PCR 扩增加入双突变; 利用同源重组法将酶切好的 pET-28a (Xho I 和 Nco I 位点酶切) 和双突变 (T478K 和 L452R) 片段连接起来。把构建好的质粒转化入 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 筛选出具有卡那抗性的单克隆菌落, 培养后测序 (北京擎科生物科技有限公司)。

2. 诱导表达

挑取单克隆菌落在含卡那抗性的 LB 培养基中进行过夜增菌, 加入诱导剂 IPTG 使其表达目的蛋白。4 h 后以 4 ℃, 6 000 转/min 转速离心菌液 20 min (离心半径为 92 mm), 弃去上清后得到菌体沉淀。用 Tris 缓冲液重悬菌体沉淀, 800 bar 左右高压匀浆破菌 3 次后 4 ℃, 9 900 转/min 离心 30 min (离心半径为 92 mm) 弃去上清后多次洗涤得到包涵体蛋白。

3. 蛋白制备及鉴定

包涵体用 9 mol/L Urea 溶解过夜, 离心后收集上清, 用 0.45 μ m 滤膜过滤。利用离子交换柱 S 柱与 DEAE 柱进行纯化。利用 SDS-PAGE 分析蛋白纯度, Bradford 法测定蛋白浓度。用密理博 mini Pellicon 进行切向流超滤透析复性, 利用 SDS-PAGE、粒径测定以及紫外荧光光谱检测来观察蛋白复性情况, BCA 法测定蛋白浓度。

采用 SDS-PAGE, 将样本与上样缓冲液按 1:3 的比例混匀, 根据蛋白的迁移率计算出蛋白分子

量。采用离子交换色谱系统检测蛋白纯度。每次上样量为 40 μL 。采用面积归一化法计算除溶剂峰以外的各色谱峰的面积,计算各峰面积占总峰面积的百分率。

4. 结构验证

粒径检测:将透析过程中不同时间点的蛋白样本 14 000 转/min 离心 5 min 后(离心半径为 50 mm),取得上清,使用预热好的粒径仪进行检测。

荧光光谱:将透析过程中的不同时间点样本以三复孔,每孔 200 μL 加入黑色酶标板中,用酶标仪读取 280 nm 处的最大发射波长。

蛋白抗原活性:将制备好的突变蛋白用缓冲液按 1:40~1:5 120 进行倍比稀释,然后按双复孔,每孔 100 μL 蛋白加入预包被好 ACE-2 的酶标板中,设置蛋白缓冲液作为阴性对照。用蛋白与 ACE-2 的亲合力来衡量,OD₄₅₀ 读数大于 cut-off 值(阴性对照平均 OD₄₅₀ 值 2.1 倍)的最大稀释倍数即为其抗原效价(EU)。

5. 小鼠免疫及细胞免疫功能检测

用 0.22 μm 滤膜过滤制备好的蛋白,然后加入 10 mg/mL 的 Al(OH)₃ 吸附过夜,KH₂PO₄ 调节蛋白溶液 pH,将蛋白浓度稀释至 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,作为免疫用突变蛋白制剂。Balb/c 小鼠 6~8 周龄,随机分成 2 组:制剂组(8 只)和对照组(4 只),雌雄各半。免疫 3 次,按 0-28-56 d 程序,50 $\mu\text{g}/\text{只}$,腹腔注射;至第 89 天,小鼠眼眶采血,离心血清检测中和抗体,取脾脏检测特异性 IFN- γ 。

酶联免疫斑点实验(操作见试剂盒说明)检测特异性 IFN- γ ,每只小鼠设双孔实验组,并设计正、负对照孔各 1 个。实验孔加入肽刺激物 10 μL ,正负对照孔分别加入 10 μL 佛波酯(phorbol myristate acetate, PMA)和培养基。记录斑点数。

6. 中和试验-竞争 ELISA 法

经预实验发现血清抗体对 3 种毒株的抑制效果有差异,故将稀释到一定倍数的血清与 HRP 标记的 RBD 蛋白孵育,再加入已包被 ACE-2 蛋白的酶标板内,反应结束后按公式计算抑制率。HRP 标记的 RBD 蛋白(野生株、Delta 株、Omicron 株均购自

金斯瑞公司)稀释 1 000 倍。按 ELISA 法操作。

7. 活病毒中和试验

随机选取 6 份小鼠血清 56 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 30 min,用 DMEM 进行倍比系列稀释;活病毒用 DMEM 稀释至 10⁴ CCID₅₀,将两者等体积混合,孵育接种于 Vero 细胞,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 7 d,观察细胞病变效应,以能完全抑制细胞病变的血清最高稀释倍数作为中和抗体效价。此实验委托中国医学科学院医学生物学研究所 BSL-3 实验室进行。

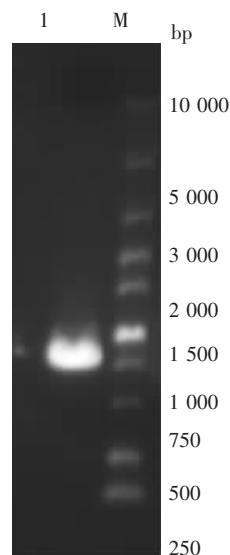
三、统计学方法

采用 GraphPad Prism 5.01 进行统计学分析,活病毒中和试验中抗体滴度数据采用几何平均数表示,符合正态分布的计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

一、蛋白表达

琼脂糖凝胶电泳验证双突变 RBD-TT 质粒大小在 750~1 000 bp 之间,与预期大小 777 bp 相符,如图 1 所示。质粒进行转化,测序结果与构建质粒比对相一致。



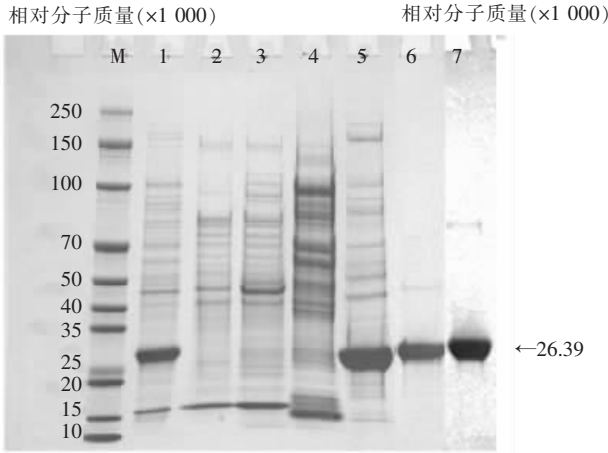
注: M 为 DNA 标记物;1 为 RBD (含 T478K 和 L452R 双突变) DNA 片段;RBD:受体结合域;TT:破伤风类毒素蛋白

图 1 PCR 验证双突变 RBD-TT 质粒

二、蛋白纯化和复性

SDS-PAGE 电泳结果(图 2)显示:在经过 S 柱

(泳道 5)与 DEAE 柱(泳道 6)纯化后得到了纯度较高的目的蛋白。最终得到的蛋白经相对分子质量验证后为 26 390。



注:M 为蛋白标记物;1:诱导所得菌液;2~4:S 柱洗脱杂蛋白;5:初步纯化所得蛋白;6:DEAE 柱纯化所得蛋白;7:分子筛纯化所得蛋白

图 2 重组新型冠状病毒受体结合突变蛋白制备过程

三、蛋白鉴定

根据蛋白电泳的迁移率行线性拟合,得到相关性方程为 $y = -1.394x + 2.372$, 所得标准曲线相关性为 $R^2=0.980$, 最终计算出得到蛋白相对分子质量为 26 390。用离子交换色谱系统检测蛋白纯度,扣除溶液带来的本底峰,以及聚体所占的 9.49%,蛋白纯度为 90.51%(见图 3)。

四、蛋白结构验证

粒径结果显示见图 4。在复性过程中,随着透析

体积的增加(蓝色、橙色、绿色、红色分别为复性前和复性透过缓冲液体积为 0.7、1.6 和 2.0 L 的蛋白粒径结果),蛋白的粒子直径由分散的峰而逐渐变得稳定均一,最终形成 12 nm 左右的分子,且有聚体形成。荧光光谱显示蛋白在复性过程中出现了蓝移现象,由复性前的(366.33±0.94) nm 到复性后的(333.00±1.63) nm,提示蛋白形成了相应构象。蛋白抗原活性用蛋白与 ACE-2 的亲合力来衡量,ELISA 结果显示蛋白的 EC_{50} 为 0.312 $\mu\text{g/mL}$ 。

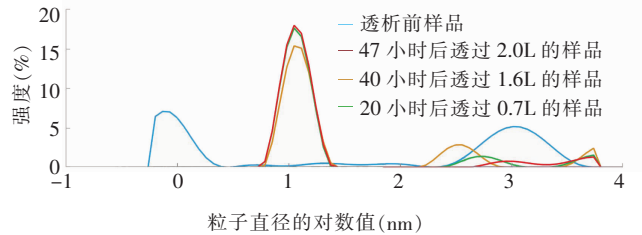


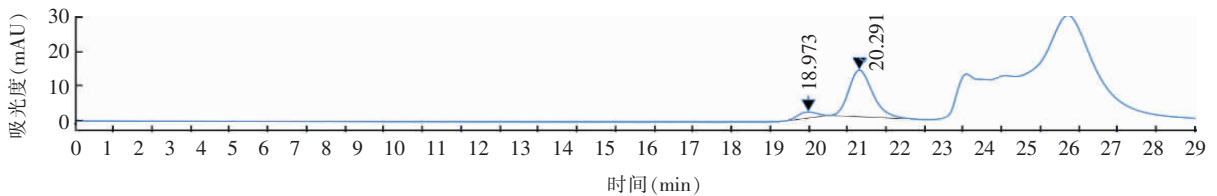
图 4 动态光散射法测重组蛋白粒子直径结果

五、突变蛋白的细胞免疫效果

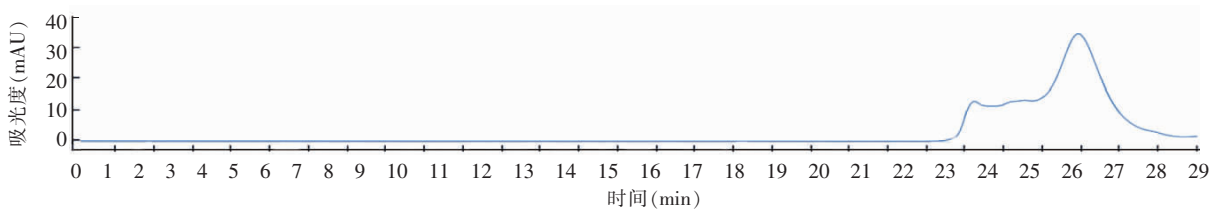
50 μg 免疫组分泌特异性 IFN- γ 的效应 T 细胞数(21.43±11.71)个斑点形成细胞/5×10⁵ 个细胞,高于对照组(3.38±2.56)个斑点形成细胞/5×10⁵ 个细胞,差异有统计学意义($t=4.17, P=0.003$)。

六、中和试验-竞争 ELISA 法

小鼠血清稀释 1 000 倍后,对野生毒株的抑制率为(70.69±3.74)%,高于阴性血清的(9.50±3.44)%,差异有统计学意义($t=27.35, P<0.001$);稀释 5 000



Ⓐ



Ⓑ

注:Ⓐ为 T478K、L452R 突变株蛋白;Ⓑ为蛋白缓冲液

图 3 凝胶排阻色谱检测新型冠状病毒重组蛋白纯度的结果

倍后,对 Delta 株的抑制率($52.46\pm 13.25\%$),高于阴性血清的($5.60\pm 4.98\%$),差异有统计学意义($t=6.70, P<0.001$);稀释 150 倍后,对 Omicron(BA.1)株的抑制率为($65.85\pm 9.06\%$),高于阴性血清的($-19.40\pm 2.35\%$),差异有统计学意义($t=18.09, P<0.001$)。

七、活病毒中和试验

活病毒中和试验结果显示,突变蛋白对野生株免疫所产生的中和抗体的滴度几何平均数为 586.09,对 Delta 株为 3 012.28,对 Omicron(BA.1)株为 1 086.12,均有效果。

讨 论

原核表达系统具有操作简单、生长周期短、生产成本低等优点,但是由于不具有蛋白折叠所需的细胞器,原核表达系统容易形成没有生物活性的包涵体,需要经过人工复性折叠蛋白恢复天然构象。本研究发现,原核表达的蛋白经过高压匀浆破菌后,将包涵体溶解于 8 mol/L 尿素中使其变性,然后分别使用 S 和 DEAE 离子交换层析柱进行纯化,得到变性的目的蛋白后,用膜包装装置梯度透析去除尿素。变性蛋白随尿素浓度降低,逐渐从变性状态恢复天然构象,SDS-PAGE 显示其相对分子质量略有减小,提示空间构象的形成;动态光散射粒径结果显示蛋白的粒子直径由杂乱无序逐渐形成均一大小的分子;另外荧光光谱结果显示蛋白在 280 nm 下的最大发射波长随复性过程而逐渐减小至稳定,提示在这一过程中芳香族氨基酸分子逐渐埋于蛋白内部,蛋白质松散结构逐步折叠为高级结构。粒径与紫外荧光光谱均提示蛋白形成了稳定的结构。复性过程形成的聚体借助分子筛去除,最终得到目的蛋白,经验证其相对分子质量为 26 390,纯度 90.51% 和活性 EC_{50} 为 0.312 $\mu\text{g/mL}$,达到重组蛋白疫苗研发的要求。

TT 由破伤风梭状芽孢杆菌产生的毒素制成,除了用作破伤风、百白破疫苗以外,TT 也可作为蛋白载体与多糖疫苗偶联,制成结合疫苗以增强其免疫原性^[6]。另外有研究表明,TT 作为 DNA 疫苗佐剂进行免疫时可以诱导更强的体液和细胞免疫应答^[7-10]。

本研究截取 TT 肽的小段序列加入至 S 蛋白序列中作为分子内免疫佐剂,希望增强蛋白的免疫原性。与早期研究比较,不加 TT 肽与加 TT 肽表达的 RBD,对新型冠状病毒的中和能力有显著差异^[11],本研究也证明了 TT 肽作为分子内免疫佐剂的增强作用。

在中和抗体研究中,竞争法 ELISA 其中抑制率结果对野生毒株、Delta 株和 Omicron 株的抑制率与阴性血清比较差异均有统计学意义。可能由于小鼠个体差异,活病毒中和试验中发现抗体对 Omicron 突变株中和抗体滴度的几何平均数为 1 086.12,而对 Delta 突变株中和抗体滴度的几何平均数为 3 012.28,活病毒中和试验结果显示产生的中和抗体对 3 种毒株均能有效中和,可认为此突变蛋白具有对新型冠状病毒不同突变株的广谱中和能力。突变蛋白免疫小鼠后检测特异性 IFN- γ ,与对照组小鼠比较有显著差异,提示该突变蛋白也可诱导特异性细胞免疫应答;且相比其它研究的重组新型冠状病毒疫苗具有较高的细胞免疫应答^[12]。

新型冠状病毒不断变异,其结构蛋白尤其是 S 蛋白上突变位点的出现影响了病毒的传播性和致病力,尤其 Omicron 突变株,由于其包含有大量突变位点,可能改变了与细胞受体的相互作用模式,传播性相比其他几种关切变异株更强,也会消除许多单克隆抗体的活性,并损害疫苗或既往感染引发的免疫保护^[13-14]。沈钱通等^[15]发现原核表达的新型冠状病毒重组 RBD 可以通过体外复性、折叠的方式获得良好的免疫原性。本研究中的 RBD 突变体蛋白诱导的中和抗体经证实能在一定程度上有效阻断 Delta 和 Omicron 株的感染。

综上所述,本研究针对新型冠状病毒的突变位点进行的研究,利用原核表达系统制备了含有 TT 肽的 L452R 和 T478K 两个突变的 RBD 突变体蛋白,经过一系列验证后通过腹腔注射免疫小鼠,证实其具有良好的免疫原性,对流行突变株 Delta 株和 Omicron(BA.1)株有一定的抑制能力。今后有待分析其对病毒与受体的亲和力以及病毒的传染性的影响,希望为药物、抗体、疫苗等研发工作提供线索。本研究仅针对 452R 和 478K 两个突变位点进行研

究,在现有突变位点的研究工作中只做了很少的部分,接下来还有很长的路要走,另外在突变蛋白的结构分析方面也将做进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 安彤:实验研究、采集、分析数据、起草文案、统计分析;李思奇:实验研究、采集数据;张柯欣:采集数据;沈钱通:实验设计、研究;张月:实验研究;张温阳:采集数据;朱赟:论文审阅、经费支持;高孟:经费支持、论文指导;陈刚:实验设计、指导研究;庄昉成:经费支持、论文审阅

参 考 文 献

- [1] Li F. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins[J]. *Annu Rev Virol*, 2016, 3(1): 237-261. DOI: 10.1146/annurev-virology-110615-042301.
- [2] Xu X, Chen P, Wang J, et al. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission[J]. *Sci China Life Sci*, 2020, 63(3): 457-460. DOI: 10.1007/s11427-020-1637-5.
- [3] Wang H, Yang P, Liu K, et al. SARS coronavirus entry into host cells through a novel clathrin- and caveolae-independent endocytic pathway[J]. *Cell Res*, 2008, 18(2): 290-301. DOI: 10.1038/cr.2008.15.
- [4] Harvey WT, Carabelli AM, Jackson B, et al. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19(7): 409-424. DOI: 10.1038/s41579-021-00573-0.
- [5] Emma H. CoVariants: SARS-CoV-2 mutations and variants of interest[EB/OL]. [2022-08-20]. <https://covariants.org/>
- [6] 程尊平, 郭志军, 李忠云. 精制破伤风类毒素的综合运用[J]. *预防医学情报杂志*, 2001, 17(6): 444-445. DOI: 10.3969/j.issn.1006-4028.2001.06.013.
- [7] Geethadevi A, Jadhav K, Kumar G, et al. scFv6.C4 DNA vaccine with fragment C of tetanus toxin increases protective immunity against CEA-expressing tumor[J]. *Gene Ther*, 2021, 28(6): 287-289. DOI: 10.1038/s41434-020-0161-9.
- [8] Spellerberg MB, Zhu D, Thompson A, et al. DNA vaccines against lymphoma: promotion of anti-idiotypic antibody responses induced by single chain Fv genes by fusion to tetanus toxin fragment C[J]. *J Immunol*, 1997, 159(4): 1885-1892.
- [9] Sayeed MA, Bufano MK, Xu P, et al. A cholera conjugate vaccine containing O-specific polysaccharide (OSP) of *V. cholerae* O1 inaba and recombinant fragment of tetanus toxin heavy chain (OSP:rTTHc) induces serum, memory and lamina propria responses against OSP and is protective in mice[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2015, 9(7): e0003881. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003881.
- [10] Tierney R, Beignon AS, Rappuoli R, et al. Transcutaneous immunization with tetanus toxoid and mutants of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as adjuvants elicits strong protective antibody responses[J]. *J Infect Dis*, 2003, 188(5): 753-758. DOI: 10.1086/377287.
- [11] Su QD, Zou YN, Yi Y, et al. Recombinant SARS-CoV-2 RBD with a built in T helper epitope induces strong neutralization antibody response[J]. *Vaccine*, 2021, 39(8): 1241-1247. DOI: 10.1016/j.vaccine.2021.01.044.
- [12] 钱曼云, 王继伟, 李颖泽, 等. SARS-CoV-2 重组 S1 和 S 蛋白疫苗诱导保护性免疫的研究[J]. *中国生物工程杂志*, 2022, 42(5): 106-116. DOI: 10.13523/j.cb.2203003.
- [13] Cao Y, Wang J, Jian F, et al. Omicron escapes the majority of existing SARS-CoV-2 neutralizing antibodies[J]. *Nature*, 2022, 602(7898): 657-663. DOI: 10.1038/s41586-021-04385-3.
- [14] Callaway E. Omicron likely to weaken COVID vaccine protection[J]. *Nature*, 2021, 600(7889): 367-368. DOI: 10.1038/d41586-021-03672-3.
- [15] 沈钱通, 安彤, 李思奇, 等. 原核表达新型冠状病毒受体结合蛋白的制备及免疫原性研究[J]. *国际流行病学传染病学杂志*, 2022, 49(1): 6-11. DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20211103-00210.

(收稿日期:2022-08-28)