

DOI:10.13350/j.cjpb.220101

• 论著 •

表达 SARS-CoV-2 的 RBD 基因及多表位基因重组 DNA 候选疫苗的构建及小鼠免疫效果评价^{*}

孙世宇^{1,2}, 李卓昕², 哈卓², 陈璐儿², 刘宇梦^{1,2}, 李晓宁¹, 鲁会军^{2**}, 金宁一^{1,2**}

(1 广西大学动物科学技术学院, 广西南宁 530004; 2. 中国农业科学院长春兽医研究所)

【摘要】 目的 构建针对新型冠状病毒的重组核酸疫苗, 评价其与佐剂联合免疫 BALB/c 小鼠的效果。 **方法** 选择新型冠状病毒 S 蛋白的受体结合域蛋白基因(RBD)和新冠病毒 S、M、N、E 4 个结构蛋白的抗原表位基因(EPI)为主要抗原基因, 以 pVAX1 为载体, 分别构建 pVAX-RBD-EPI 质粒和 pVAX-RBD 质粒。用 2 种重组质粒和 pVAX 空载体质粒分别与 PIKCA 佐剂联合免疫或无佐剂免疫 BALB/c 小鼠, 共免疫 3 次, 间隔 21 天免疫, 每 7 d 对小鼠特异性抗体进行检测; 对三免后 21 d 小鼠脾淋巴细胞进行 T 淋巴细胞亚类检测。 **结果** 成功构建了重组质粒 pVAX-RBD-EPI 和 pVAX-RBD。用重组质粒转染 BHK 细胞, Western blot 显示重组核酸质粒稳定表达目的蛋白。BALB/c 小鼠免疫结果表明, 三免后 14 d 时 pVAX-RBD-EPI+PIKCA 组 IgG 抗体水平为无佐剂组的 3.65 倍($P<0.01$)。三免后 21 d, pVAX-RBD-EPI+PIKCA 组 $CD3^{+}/CD4^{+}$ T 达到 55.71%, 是阴性对照组的 1.52 倍($P<0.01$); 三免后 21 d, $CD3^{+}/CD8^{+}$ T 数量 pVAX-RBD-EPI+PIKCA 组为 7.07%, 是阴性对照组的 1.83 倍, 是 pVAX-RBD-EPI 组(5.86%)的 1.2 倍($P<0.05$)。 **结论** 成功构建重组 DNA 候选疫苗 pVAX-RBD-EPI 和 pVAX-RBD-EPI。两种疫苗均具有良好的免疫原性, 其中 PIKCA 免疫佐剂的加入可增强小鼠细胞免疫和体液免疫水平。

【关键词】 新型冠状病毒; 受体结合域蛋白; 抗原表位蛋白; 免疫原性

【中图分类号】 R373.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)01-0001-04

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Jan;17(1):1-4, 8.]

Construction of RBD vaccine and multi-epitope gene recombinant DNA vaccine candidate expressing SARS-CoV-2 and mouse immunization evaluation

SUN Shi-yu^{1,2}, LI Zhuo-xin², HA Zhuo², CHEN Lu-er², LIU Yu-meng^{1,2}, LI Xiao-ning¹, LU Hui-jun², JIN Ning-yi^{1,2} (1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Guangxi University, Nanning 530004, China; 2. Changchun Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences) ^{***}

【Abstract】 Objective To construct the recombinant nucleic acid vaccine for novel coronavirus to evaluate the effect of immune BALB/c mice with adjuvant. **Methods** In this experiment, by selecting the receptor binding domain protein gene (RBD) of the COVID-19 S protein and the antigen epitope gene (EPI) of the four S, M, N, E structural proteins of COVID-19 as the primary study sites of pVAX1 vector. And the pVAX-RBD-EPI plasmid and the pVAX-RBD plasmid were constructed with the connection of pVAX1 and target gene, respectively. These two recombinant plasmids with adjuvant or not were immunized to BALB/c mice respectively. Specific antibodies were tested in mice every 7 days, and T lymphocyte subclasses were tested for mouse spleen lymphocytes for exemption on 21d after third inoculation. **Results** Recombinant DNA plasmid pVAX-RBD-EPI and pVAX-RBD were successfully constructed. By transfecting with BHK cells with recombinant plasmids, Western blot showed recombinant DNA plasmid stably expresses the target protein. After 14 days of third immunization, IgG antibody levels in the pVAX-RBD-EPI + PIKCA group were 3.65 times the levels of the adjuvant-free group ($P<0.01$). After 63 days of immunization, the $CD3^{+}/CD4^{+}$ T of the pVAX-RBD-EPI+PIKCA group reached 55.71%, which was 1.52 times of the negative control group. After 21 days of third immunization, $CD3^{+}/CD8^{+}$ T amount of the pVAX-RBD-EPI + PIKCA group reached 7.07%, 1.83 times of the negative control group and 1.2 times of the pVAX-RBD-EPI group (5.86%) ($P<0.05$). **Conclusion** Recombinant DNA candidate vaccine pVAX-RBD-EPI and pVAX-RBD were successfully constructed. All DNA vaccines showed good immunogenicity, among which PIKCA immunologic adjuvant could induce the cellular immunity and humoral immunity in mice.

【Key words】 SARS-CoV-2; Receptor-binding domain protein; antigen epitope; immunogenicity

^{*} **【基金项目】** 吉林省重点研发计划项目(No. 20200901001SF); 长春市发展计划项目(No. 2020RW001)。

^{**} **【通讯作者】** 金宁一, E-mail: ningyi@126.com; 鲁会军, E-mail: huijun_lu@126.com

【作者简介】 孙世宇(1996-), 男, 河北沧州人, 硕士研究生, 主要从事动物病毒学研究。E-mail: 2929202644@qq.com

截至北京时间 2020 年 6 月 25 日 22 时 12 分全球累计新型冠状病毒肺炎 (COVID-19)^[1] 确诊病例 179 686 071 例, 累计死亡病例 3 899 172 例。新冠病毒传播速度比之前的 MERS、SARS 等冠状病毒更快^[2], 世界卫生组织新冠大流行防范和应对独立小组发布报告显示, 预计到 2021 年底, 新冠疫情会给世界带来 10 亿美元的损失。

SARS-CoV-2 属于冠状病毒科正冠状病毒亚科, 该亚科包括 α 、 β 、 γ 和 δ 4 个属, 人对 α 、 β 属易感。新冠病毒的颗粒直径在 70~120 nm 之间, 是具包膜的正链单股 RNA 的 β 属冠状病毒。SARS-CoV-2 具有典型的冠状病毒基因结构, 与 SARS-CoV、MERS-CoV 的病毒结构极为相似, 与 SARS-CoV 的基因组同源性为 82%。SARS-CoV-2 主要由 S(棘突蛋白)、E(包膜蛋白)、M(包膜蛋白)和 N(核衣壳蛋白)四个结构蛋白和遗传物质 RNA 组成, 是第 7 种引发人类疾病的冠状病毒^[3]。有研究利用中国仓鼠卵巢细胞 (CHO 细胞) 表达来源于恢复期患者血浆的重组抗体, 筛选到 9 种与 COVID-19 刺突蛋白受体结合域 (RBD) 具有强结合能力的单克隆抗体, 这些抗体通过与病毒 S 蛋白 RBD 区域的结合阻止病毒与受体血管紧张素转换酶 2 (ACE2) 的相互作用, 使病毒无法入侵宿主细胞^[4-5]。

SARS-CoV-2 通过呼吸道感染, 目前尚无获批的治疗新型冠状病毒肺炎的特效药物^[6-7]。至今为止上市的新型新冠病毒疫苗有灭活疫苗、腺病毒载体疫苗、mRNA 疫苗和亚单位疫苗等^[8-10], 目前尚没有新冠 DNA 疫苗上市^[11-13]。相对其他疫苗, DNA 疫苗的提纯工艺简便, 可大批量生产; DNA 易分子克隆, 可根据要求随时更新; DNA 分子稳定的结构优势可不用佐剂^[14]。本研究用 pVAX 真核表达载体构建表达新冠病毒 RBD 基因的重组 DNA 候选疫苗并免疫小鼠, 评价其免疫效果, 为新型冠状病毒肺炎 DNA 疫苗的研制奠定基础^[16]。

材料与方 法

1 材料

1.1 抗体、细胞及实验动物 小鼠抗 SARS-CoV-2 IgG-HRP 抗体由金斯瑞公司制备; SARS-CoV-2 RBD 蛋白的鼠多抗由本实验室保存; 山羊抗鼠 IgG-HRP 抗体由碧云天公司制备; 实验动物为雌性 6 周龄 BALB/c 小鼠, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司; BHK-21 细胞株由本实验室保存; 1640 培养基, 牛血清 (FBS) 和 DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司; 转染试剂 LipofectamineTM 3000 Transfection Kit 购自美国 Thermo Fisher 公司; pVAX1 由本室保存; Transl-T1 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司; 无

内毒素质粒大提试剂盒购自 TIAGEN 公司 (北京); 小鼠抗 SARS-CoV-2 IgG 抗体 ELISA 检测试剂盒购自达瑞生物公司。Mouse IL-4 Uncoated Elisa 检测试剂盒购自美国 Thermo Fisher 公司; 质粒 DNA 小量提取试剂盒购自美国 Axygen 公司; 凝胶回收试剂盒购自杭州博日公司。Q5 高保真聚合酶购买自英国 NEB 公司。无缝克隆 DNA 连接酶购买自中国 Vazyme 公司。引物 (表 1) 合成及测序由吉林省库美生物科技有限公司完成。

表 1 引物
Table 1 primer

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence
LZX-RBD-F	GGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGCCACCATG TTTGTGTTCTCGTGCTGCTGCCCTCGG
LZX-RBD-R	GGTTTAAACGGGCCCTCTAGATTAATTAATA TTCACACACTTATTCTTCACACAG
LZX-RBD-EPI-F	GGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGCCACCATG TTTGTGTTCTCGTGCTGCTGCCCTCGG
LZX-RBD-EPI-R	GGTTTAAACGGGCCCTCTAGATTAGGCGTAG TCAGGCACATCATAAGG

1.2 重组质粒的构建 以 RBD、RBD-EPI 基因为模板, 使用 LZX-RBD-F、LZX-RBD-R 和 LZX-RBD-EPI-F、LZX-RBD-EPI-R 两对引物进行 PCR 扩增。使用胶回收试剂回收目的片段, 用限制性内切酶 *Nhe* I、*Xba* I 双酶切胶回收后连接至双酶切的 pVAX 真核表达载体上, 构建重组质粒 pVAX-RBD 和 pVAX-RBD-EPI。将构建的质粒转化到 Transl-T1 感受态菌内进行培养。小提质粒, 经双酶切鉴定条带大小正确后, 送吉林省库美生物科技有限公司测序。

1.3 重组 DNA 疫苗的大量制备 根据无内毒素质粒大提试剂盒说明书将培养的重组菌液提取质粒, 交由吉林省库美生物科技有限公司测序。

1.4 重组 DNA 疫苗蛋白表达鉴定 取生长良好的 BHK 细胞培养至 70%~80% 单层, 按转染试剂盒说明书操作程序将测序验证无误的 pVAX-RBD-EPI、pVAX-RBD 重组质粒转染至 BHK 细胞, 转染 4 h 换液, 第 48 h 收集细胞, 提取蛋白, 进行 Western Blot 验证: 回收的细胞胞内蛋白样品经 SDS-PAGE 80 V 电泳 30 min, 120 V 电泳直至样品迁移至凝胶底部, 再经 15 V 转膜; 室温封闭液封闭 2 h, PBST 洗膜 3 次 (10 min/次); 加入 RBD 蛋白鼠多抗 (一抗) 4 °C 过夜, PBST 洗膜 3 次 (10 min/次); 加入山羊抗鼠 IgG-HRP (二抗) 室温孵育 40 min, PBST 洗膜 3 次 (10 min/次); 在膜上滴加显影液, 使用 GE 公司显影仪显影。

1.5 小鼠免疫试验 将 40 只 6 周龄 SPF 级健康雌性 BALB/c 小鼠随机分为 5 组 (每组 8 只) 分别免疫

pVAX-RBD-EPI + PIKCA、pVAX-RBD + PIKCA、pVAX-RBD-EPI、pVAX+PIKCA 和 PBS 组。共免疫 3 次,均为小鼠后肢肌肉注射,100 μ g/只,每 3 周免疫一次。每 7 d 静脉采血,分离血清,共采血 9 次。

1.6 小鼠血清抗 COVID-19 IgG 抗体 ELISA 检测
按照达瑞生物公司新型冠状病毒 IgG 抗体检测试剂盒(酶联免疫法)说明书,取免疫小鼠血清进行 ELISA 检测。

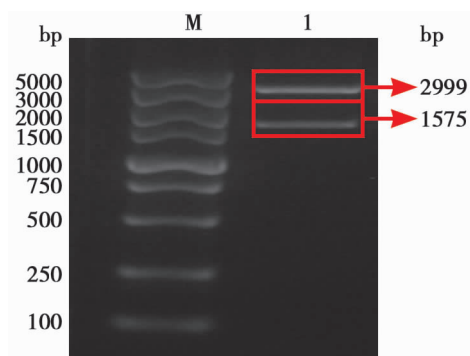
1.7 小鼠脾 T 淋巴细胞亚群检测 每组小鼠随机选择 3 只,按照 Beyonmc 公司小鼠脾细胞分离试剂盒操作,将提取的小鼠脾细胞染色后使用流式细胞仪进行检测,统计每组小鼠 CD3⁺/CD4⁺ 和 CD3⁺/CD8⁺ 变化。

1.8 统计学分析 采用 SPSS 21.0 统计软件 and Excel 进行统计学分析,计量资料的比较采用方差分析和 SPSS 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计意义。

结 果

1 pVAX-RBD-EPI、pVAX-RBD 重组质粒的构建

PCR 扩增 RBD-EPI、RBD 蛋白基因,构建重组质粒 pVAX-RBD-EPI、pVAX-RBD,通过限制性内切酶 *Nhe* I、*Xba* I 双酶切鉴定,分别获得 2 999 bp(pVAX 真核表达载体)和 1 575 bp(RBD-EPI)、759 bp(RBD) 基因片段,与预期大小相符(图 1 和图 2)。测序鉴定构建的重组质粒 pVAX-RBD-EPI、pVAX-RBD 正确无误,未见移码和碱基突变。



M DNA 标志物(DL5000) 1 重组质粒双酶切产物

图 1 重组质粒 pVAX-RBD-EPI 的酶切鉴定

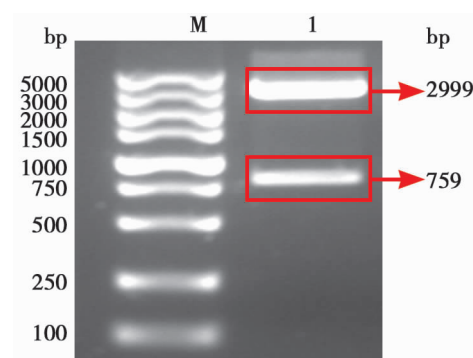
M DNA marker (DL5000) 1 Recombinant plasmid double digestion product

Fig. 1 Identification of recombinant plasmid pVAX-RBD-EPI

2 RBD-EPI、RBD 蛋白分子 Western Blot 验证

将重组质粒 pVAX-RBD-EPI、pVAX-RBD 转染至 BHK 细胞,培养 48 h 收集细胞蛋白样品,Western blot 检测 RBD-EPI 蛋白分支质量单位约为 27 ku, RBD 蛋白大小约为 20 ku,与预期一致。用 pVAX 空载体转染的 BHK 细胞对照组未检测到该蛋白。证明

重组质粒 pVAX-RBD-EPI、pVAX-RBD 能在哺乳动物细胞表达 RBD-EPI、RBD 蛋白(图 3)。

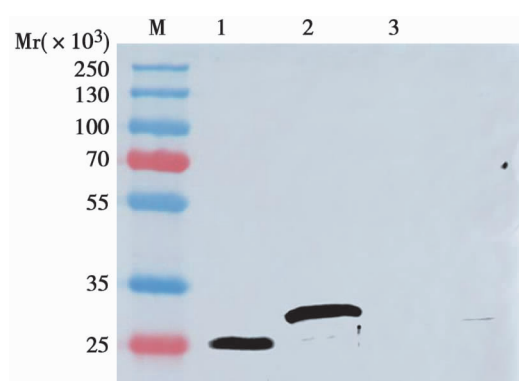


M DNA 标志物(DL5000) 1 重组质粒 *Nhe* I、*Xba* I 双酶切产物

图 2 重组质粒 pVAX-RBD 的酶切鉴定结果

M DNA markers (DL5000) 1 Recombinant plasmids *Nhe* I, *Xba* I double digestion products

Fig. 2 Results of digestion of recombinant plasmid pVAX-RBD



M 蛋白分子质量标准 1 pVAX-RBD-EPI 转染 BHK 细胞后表达的蛋白 2 pVAX-RBD 转染 BHK 细胞后表达的蛋白 3 pVAX 转染 BHK 细胞后表达的蛋白

图 3 目的蛋白的 Western blot 检测

M Molecular of Protein Molecular Quality Standard 1 Protein expressed in BHK cells transfection of BHK cells by pVAX-RBD-EPI 2 BHK cells by pVAX-RBD 3 Proteins expressed after B H K cells transfection of B H K cells by pVAX

Fig. 3 Western blot detection of the target proteins

3 免疫小鼠血清新冠病毒特异性抗体效价

重组疫苗免疫小鼠血清 IgG 抗体水平见图 4。二免后 7d, pVAX-RBD-EPI+PIKCA 组 IgG 抗体水平为阴性对照组的 12.36 倍($t = 4.30, F = 6.95, P < 0.05$), pVAX-RBD-EPI+PIKCA 组 IgG 抗体水平为 pVAX-RBD-EPI 组的 8.63 倍,差异有统计意义($t = 3.32, F = 4.95, P < 0.05$)。二免后 21d, pVAX-RBD-EPI+PIKCA 组 IgG 抗体水平为阴性对照组的 20.1 倍($t = 4.43, F = 15.67, P < 0.05$), pVAX-RBD-EPI+PIKCA 组 IgG 抗体水平为 pVAX-RBD-EPI 组的 7.54 倍,差异有统计意义($t = 4.03, F = 14.91, P < 0.05$)。三免后 14d, pVAX-RBD-EPI+PIKCA 组 IgG 抗体水平为阴性对照组的 9.41 倍($t = 3.07, F = 9.86, P < 0.05$), pVAX-RBD-EPI+PIKCA 组 IgG 抗

体水平为 pVAX-RBD-EPI 组的 3.65 倍, 差异有统计意义 ($t=2.49, F=10.22, P<0.05$) (图 4)。

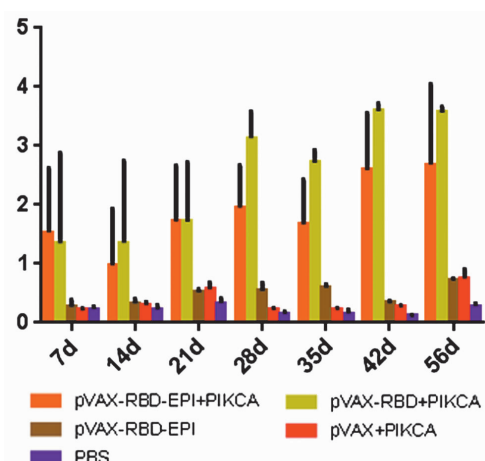


图 4 ELISA 检测重组后质粒免疫小鼠血清特异性抗体水平
Fig. 4 Serum-specific antibody levels of recombinant plasmid-immunized mice were determined by ELISA

4 小鼠脾细胞 $CD3^+/CD4^+$ 、 $CD3^+/CD8^+$ 测定

三免后 21 d, 小鼠脾淋巴细胞 $CD3^+/CD4^+$ T 淋巴细胞检测结果见图 5。检测结果显示 pVAX-RBD-EPI+PIKCA 组 $CD3^+/CD4^+$ 达到 55.71% 是阴性对照组的 1.52 倍, 差异有统计意义 ($t=13.53, F=1.34, P<0.05$)。三免后 21 d, 小鼠 $CD3^+/CD8^+$ T 淋巴细胞检测结果见图 6, pVAX-RBD-EPI+PIKCA 组达到 7.07%, 是阴性对照组的 1.83 倍 ($t=5.82, F=3.62, P<0.05$), pVAX-RBD-EPI 组为 5.86%, pVAX-RBD-EPI+PIKCA 组是 pVAX-RBD-EPI 组的 1.2 倍, 差异有统计意义 ($t=2.74, F=1.16, P<0.05$); pVAX-RBD+PIKCA 组、pVAX-RBD-EPI 组均高于 pVAX+PIKCA 组 ($F=476.43, P<0.05$)。

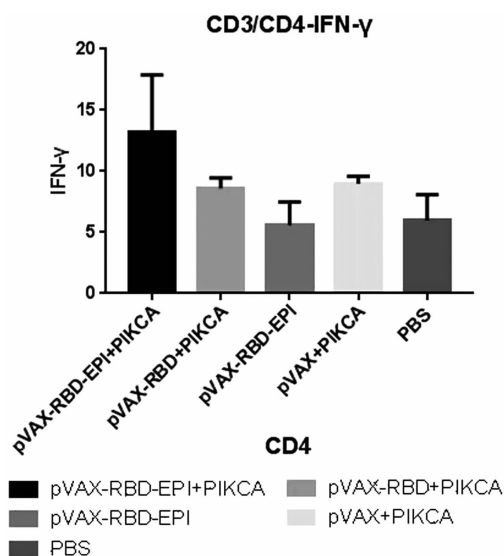


图 5 小鼠脾淋巴细胞 $CD3^+/CD4^+$ 测定结果
Fig. 5 Results of the $CD3^+/CD4^+$ assays in mouse splenic lymphocytes

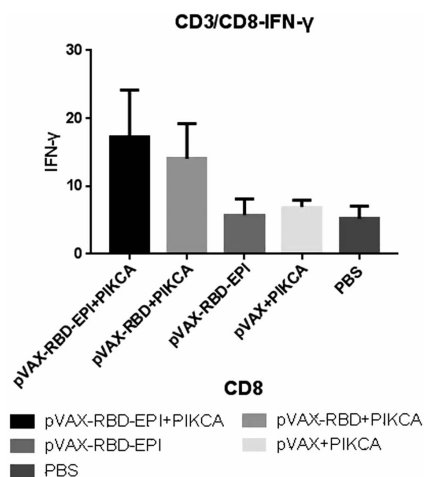


图 6 小鼠脾淋巴细胞 $CD3^+/CD8^+$ 测定结果
Fig. 6 Results of the $CD3^+/CD8^+$ assays in splenic lymphocytes of mice

讨论

目前市场上有灭活疫苗, 腺病毒载体疫苗, 等疫苗。灭活疫苗、腺病毒载体疫苗等疫苗具有制造工艺过程中需要真病毒以及病毒灭活等制造流程成本高、制造流程复杂等缺点, 而核酸疫苗制造工艺简便, 可短时间内大量生产, 成本低, 不含真病毒, 安全性稳定性更高, 是很有潜力的一种新型疫苗。

核酸疫苗能诱导高水平的细胞免疫应答, 尤其是细胞毒 T 淋巴细胞 (CTL) 反应, 被认为在病毒、细菌、寄生虫等病原体感染的防治中具有巨大的优势。已经证明核酸疫苗对多种疾病有预防效果。Yu 等^[16]制备了一系列表达各种 S 免疫原的原型 DNA 疫苗, 并评估了对恒河猴鼻内和气管内 SARS-CoV-2 攻击的保护效果, 显示全长 S 免疫原在上呼吸道和下呼吸道都实现了最佳保护, 而可溶性构建体和较小片段的保护作用降低。Brocato 等^[17]针对刺突蛋白并通过喷射注射 nCoV-S(JET)递送的 SARS-CoV-2 DNA 在仓鼠中引发中和抗体, 并且在野生型和瞬时免疫抑制仓鼠模型中均具有保护作用。

本研究以 pVAX1 为表达载体, 利用 BHK 哺乳动物真核细胞诱导表达 RBD-EPI、RBD 目的蛋白, 通过 Western blot 验证该疫苗能在哺乳动物细胞中表达。将 pVAX-RBD-EPI+PIKCA 疫苗组与 pVAX-RBD+PIKCA 疫苗组以及其他实验对照组进行免疫效果对比, 结果表明具有 RBD-EPI 序列的 pVAX-RBD-EPI 核酸疫苗可刺激小鼠的细胞免疫, 促进淋巴细胞分泌 IFN- γ 细胞因子; 同时使机体发生体液免疫且与佐剂联合使用能加强免疫效果。其中 pVAX-RBD-EPI+PIKCA 佐剂联合免疫可促进 $CD3^+/CD4^+$ 、 $CD3^+/CD8^+$ T 淋巴细胞分化水平。

(下转 8 页)

基化^[13],从而进一步修饰病毒 RNA 的“帽子”结构以帮助病毒逃避宿主的免疫反应。

本研究利用原核表达系统,通过优化诱导温度和诱导剂浓度的方法,成功在上清中获得较高产量的蛋白,并经镍柱亲和层析法纯化得到高纯度的重组 Nsp16 蛋白。用 Western blot 鉴定后的目的蛋白免疫新西兰大白兔,制备了多克隆抗体,经间接 ELISA 检测其效价为 1:409 600。Western blot 检测该多克隆抗体具有良好的免疫反应性。

目前,对 Nsp16 蛋白结构构象的了解还有待深入^[14]。本研究成功表达了重组 Nsp16 蛋白,并且制备了针对该蛋白的多克隆抗体。该抗体效价高具有免疫反应性,可为 SARS-CoV-2 疫苗的研发提供理论基础。

【参考文献】

- [1] 李沛霖,刘海英. SARS-CoV-2 入侵细胞相关分子结构与机制的研究进展[J]. 生命科学,2021,33(3):337-345.
- [2] 鹿振辉,张顺先. 新型冠状病毒的病原学和流行特征[J]. 中国人兽共患学报,2020,36(5):416-419.
- [3] 刘彬,秦照玲,戚中田. 新型冠状病毒基因组结构与蛋白功能[J]. 微生物与感染,2020,15(1):52-57.
- [4] Minasov G, Rosas-Lemus M, Shuvalova L, et al. Mn²⁺ coordinates Cap-0-RNA to align substrates for efficient 2'-O-methyl transfer by SARS-CoV-2 nsp16[J]. Sci Signal,2021,14(689):eabh2071.
- [5] 中华预防医学会新型冠状病毒肺炎防控专家组. 新型冠状病毒肺炎

(上接 4 页)

综上所述,含有 RBD-EPI 序列的 pVAX-RBD-EPI 核酸疫苗诱导小鼠产生了针对 COVID-19 的特异性抗体,PIKCA 佐剂可使 pVAX-RBD-EPI、pVAX-RBD 核酸疫苗的免疫效果增强,但关于该佐剂疫苗用于 SARS-CoV-2 的预防效果有待于进一步研究。

【参考文献】

- [1] WHO. 新冠病毒被命名为 SARS-CoV-2,疾病名称为 COVID-19 [J]. 中国医学计算机成像杂志,2020,26(1):38.
- [2] 吕亚兰,刘聪,周文正,等. 新型冠状病毒肺炎与 SARS、MERS 的流行病学特征与防控措施比较[J]. 医药导报,2020,39(3):334-337.
- [3] 赵文明,宋述慧,陈梅丽,等. 2019 新型冠状病毒信息库[J]. 遗传,2020,42(2):212-221.
- [4] 梁育玮,赖玲玲,王航. 新型冠状病毒致病机理及其疫苗的研发进展[J]. 微生物学免疫学进展,2020,48(4):68-73.
- [5] 杨吕,何庆. 血管紧张素转换酶 2 在新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 发病机制及治疗中的作用研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2020,34(8):575-583.
- [6] 张竞文,胡欣,金鹏飞. 新型冠状病毒引起的细胞因子风暴及其药物治疗[J]. 中国药理学杂志,2020,55(5):333-336.
- [7] 刘千勇,王晓良. 新型冠状病毒(2019-nCoV)的靶向药物研究策略[J]. 药学报,2020,55(2):181-188.

炎流行病学特征的最新认识[J]. 中国病毒病杂志,2020,10(2):86-92.

- [6] Harapan H, Itoh N, Yufika A, et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): A literature review [J]. Infect Public Health,2020,13(5):667-673.
- [7] World Health Organization. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard [EB/OL]. [2021-7-15]. <https://covid19.who.int>.
- [8] 李珊珊,顾静文,张菁,等. 现行新型冠状病毒疫苗的临床试验进展[J]. 中国新药与临床杂志,2021,40(5):321-329.
- [9] 王璐,范俊平,徐燕,等. 新型冠状病毒疫苗的研发现状与挑战[J]. 中华结核和呼吸杂志,2021,44(5):492-496.
- [10] 于永利. 严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 的突变株及其疫苗[J/OL]. 微生物学免疫学进展,2021(3):1-4.
- [11] Morales P, Curtis N, Zárate S, et al. Interfering with mRNA Methylation by the 2'-O-Methyltransferase (NSP16) from SARS-CoV-2 to Tackle the COVID-19 Disease[J]. Catalysts,2020,10(9):1023.
- [12] Chang LJ, Chen TH. NSP16 2'-O-MTase in coronavirus pathogenesis: possible prevention and treatments strategies[J]. Viruses,2021,13(4):538.
- [13] Romano M, Ruggiero A, Squeglia F, et al. A structural view of SARS-CoV-2 RNA replication machinery: rna synthesis, proof-reading and final capping[J]. Cells,2020,9(5):1267.
- [14] Vithani N, Ward MD, Zimmerman MI, et al. SARS-CoV-2 Nsp16 activation mechanism and a cryptic pocket with pan-coronavirus antiviral potential[J]. Biophys,2021,120(14):2880-2889.

【收稿日期】 2021-10-09 【修回日期】 2021-12-15

- [8] 鲁荣光,武婧,白雪,等. 新冠病毒 SARS-CoV-2 的感染机制研究进展[J]. 病毒学报,2020,36(5):927-935.
- [9] Mathieu E, Ritchie H, Ortiz-ospina E, et al. A global database of COVID-19 vaccinations [J]. Nat Hum Behav,2021,5(7):947-953.
- [10] 陈静,李波,申硕,等. COVID-19 疫苗的研究进展[J]. 病毒学报,2020,36(4):685-691.
- [11] 桓瑜,毕玉海. 2019 新型冠状病毒疫苗研究进展及展望[J/OL]. 中国科学:生命科学:1-12[2021-06-27].
- [12] 付钰倩,芦增增,黄妙惠. 新型冠状病毒肺炎免疫反应与疫苗开发的研究进展[J]. 福建轻纺,2021(6):2-7,12.
- [13] 钱汐晶,万彩虹,赵平,等. 新型冠状病毒疫苗研究进展[J/OL]. 解放军医学杂志:1-12[2021-06-27].
- [14] 金翔,俞庆龄,张璐楠,等. 针对新型冠状病毒的 DNA 疫苗研究进展[J]. 中国新药杂志,2020,29(21):2425-2433.
- [15] 迟航. MERS DNA 疫苗和重组狂犬病毒载体疫苗的构建与实验免疫研究[D]. 长春:军事科学院,2018.
- [16] Yu J, Tostanoski LH, Peter L, et al. DNA vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques [J]. Science,2020,369(6505):806-811.
- [17] Brocato RL, Kwilas SA, Kim RK, et al. Protective efficacy of a SARS-CoV-2 DNA vaccine in wild-type and immunosuppressed Syrian hamsters [J]. NPJ Vaccines,2021,6(1):16.

【收稿日期】 2021-10-13 【修回日期】 2021-12-26