

## 技术与方法

## 新型冠状病毒假病毒制备方法的优化及应用

黄楠 郎巧利 李莉萍 杨希\*

(重庆市畜牧科学院, 重庆 402460)

**摘要** 该文旨在建立一种稳定高效的新型冠状病毒(SARS-CoV-2)假病毒构建方法,并将所制备的假病毒用于评估抗体中和水平。通过比较不同穿梭质粒、质粒配比以及转染试剂对假病毒滴度的影响,优化制备高滴度假病毒的条件;通过制备不同的SARS-CoV-2突变株假病毒,测试该方法的稳定性;利用所制备的假病毒对SARS-CoV-2抗体的中和能力进行评价,测试该方法的可靠性。优化结果表明,当使用Lipofectamine™ 3000作为转染试剂时,pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP:psPAX2:pcDNA3.1-S以0.300 μg:0.225 μg:0.240 μg的质量比转染获得的假病毒滴度最高。进一步,发现利用该方法包装的三种突变株的假病毒均可达到较高滴度。利用该方法制备的假病毒可以用于SARS-CoV-2抗体的中和活性检测,测得IC<sub>50</sub>值为0.126 μg/mL。该研究成功建立了一种简单高效的制备新型冠状病毒(SARS-CoV-2)假病毒的方法,其可用于体外评估SARS-CoV-2抗体中和活性,为研发SARS-CoV-2相关疫苗和药物的体外评价提供了技术基础。

**关键词** 假病毒; 中和抗体; 新型冠状病毒

## Optimization and Application of SARS-CoV-2 Pseudovirus Production System

HUANG Nan, LANG Qiaoli, LI Liping, YANG Xi\*

(Chongqing Academy of Animal Sciences, Chongqing 402460, China)

**Abstract** The aim of this study was to establish an efficient and stable SARS-CoV-2 pseudovirus production system to evaluate the neutralizing ability of antibodies to SARS-CoV-2 *in vitro*. To produce high-titer pseudovirus, transfer plasmid types, the proportion of transfected plasmid and transfection methods were investigated in this study. The optimization results showed that the highest pseudovirus titer was obtained when 293T cells were transfected with the plasmids pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP, psPAX2 and pcDNA3.1-S at a mass ratio of 0.300 μg:0.225 μg:0.240 μg using Lipofectamine™ 3000. Moreover, this optimized pseudovirus production system was also applicable to other SARS-CoV-2 variants, and three kinds of high-titer SARS-CoV-2 variants pseudoviruses were generated. Furthermore, pseudovirus neutralization assay was performed using the pseudovirus obtained in this study to test neutralizing activity of a reported antibody, and the IC<sub>50</sub> value was 0.126 μg/mL. In summary, this study successfully established a simple and efficient method to generate high-titer SARS-CoV-2 pseudovirus, which could be used to evaluate the neutralizing activity of SARS-CoV-2

收稿日期: 2022-10-26 接受日期: 2023-02-22

重庆市自然科学基金面上项目(批准号: cstc2020jcyj-msxmX0776)、重庆市科研机构绩效激励引导专项[批准号: cstc2021jxj10017(21224)、cstc2021jxj180009]和畜禽养殖关键技术与示范推广项目(批准号: 21504、22513C、22503C)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 15025383600, E-mail: 406062197@qq.com

Received: October 26, 2022 Accepted: February 22, 2023

This work was supported by the General Project of Chongqing Natural Science Foundation (Grant No.cstc2020jcyj-msxmX0776), the Performance Incentive and Guidance Project for Scientific Research Institutions in Chongqing [Grant No.cstc2021jxj10017(21224), cstc2021jxj180009], and the Research and Demonstration of Key Technologies in Livestock and Poultry Breeding (Grant No.21504, 22513C, 22503C)

\*Corresponding author. Tel: +86-15025383600, E-mail: 406062197@qq.com

antibodies *in vitro*. This study provided a good foundation for the research of SARS-CoV-2 vaccines and drugs.

**Keywords** pseudovirus; neutralizing antibodies; SARS-CoV-2

新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)是2019年底爆发的一种新的冠状病毒,导致新型冠状病毒肺炎(coronavirus disease 2019, COVID-19)大流行。该病毒自爆发以来已发生多次重大抗原表位突变,其突变株被命名为Alpha、Beta、Gamma、Delta、Lambda、Omicron<sup>[1-3]</sup>。SARS-CoV-2具有高频突变和快速传播的特性,给相关疫苗和药物的研发带来了极大的挑战。假病毒是利用生物风险等级较低的病毒如缺陷型HIV(human immunodeficiency virus)、VSV(vesicular stomatitis virus)或MLV(murine leukemia virus)表达待研究高危病毒的包膜蛋白或模拟活病毒感染过程<sup>[4]</sup>。目前假病毒模型已被应用于多种高致病性病毒如高致病性禽流感病毒<sup>[5]</sup>、SARS-CoV<sup>[6]</sup>、中东呼吸综合征冠状病毒(Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)<sup>[7]</sup>等的研究当中。已有研究表明,基于SARS-CoV-2假病毒的抗体中和检测结果与活病毒检测结果具有良好的相关性<sup>[8-9]</sup>。因此,假病毒无疑是可替代高致病性活病毒进行病毒感染相关机制研究和疫苗、抗体、小分子药物临床前效果评价的有效工具。

HIV系统和VSV系统在SARS-CoV-2的研究中应用十分广泛,二者各有特点。NIE等<sup>[10]</sup>、ALMAHBOUB等<sup>[11]</sup>先后展示了利用VSV系统构建和优化SARS-CoV-2假病毒并进行中和测定的方法。VSV系统在病毒产量和安全性上相对于HIV系统具有一定优势,但其包装步骤操作较繁琐,且可能残留VSV-ΔG/G\*的背景,需要适量使用针对G蛋白的抗体进行降噪<sup>[12-13]</sup>。HIV系统相较于VSV系统在SARS-CoV-2的研究中应用更为广泛,其包装过程简单,能够在靶细胞中表达较长基因或多顺反子基因<sup>[14]</sup>。CRAWFORD等<sup>[15]</sup>的研究详细描述了两种带有不同报告基因的HIV系统包装SARS-CoV-2假病毒的方法,并将所构建的假病毒应用于抗体中和水平的测定;MA等<sup>[16]</sup>利用HIV系统构建的Dio和mCherry双色SARS-CoV-2实现了通过单个假病毒追踪SARS-CoV-2入侵人呼吸道上皮的过程,而VSV-G假病毒不能区分不同细胞的血管紧张素转换酶2(angiotensin converting enzyme 2, ACE2)受体水平。OU等<sup>[17]</sup>利用HIV系统构建的假病毒来确定SARS-CoV-2易感的细胞类型、病毒受体及

其进入细胞的途径。CHEN等<sup>[13]</sup>的综述中提到使用2质粒系统包装SARS-CoV-2假病毒的应用居多,然而2质粒系统在安全性上存在一定风险。相比于2质粒包装系统,3质粒包装系统的安全性更高。HIV 3质粒包装系统通常由表达gag和pol蛋白的辅助质粒,含有报告基因、顺式调节元件的穿梭质粒和表达目的蛋白的包膜质粒组成,可减少因同源重组而产生具有复制能力的重组体的机会<sup>[18-21]</sup>。

为了建立一种稳定高效的SARS-CoV-2假病毒构建方法,本研究对3质粒包装系统进行了摸索,成功建立了一种简单高效的制备SARS-CoV-2假病毒的方法,其可用于体外评估SARS-CoV-2抗体中和活性,为研发SARS-CoV-2相关疫苗和药物的体外评价提供了技术基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 质粒和细胞 慢病毒包装质粒pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP、pLentipuro3-TO-V5-GW-EGFP-Firefly Luciferase、pWPXL-EF1-EGFP、psPAX2均购自上海海吉浩格生物科技有限公司; pCMV3-SARS-CoV-2-Spike(B.1.1.7、B.1.617.2、B.1.1.529)购自北京义翘神州科技股份有限公司; 293T细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司; *Escherichia coli* DH5α感受态细胞购自TaKaRa公司; 293T-ACE2细胞系由本实验室构建。

1.1.2 主要试剂 DMEM培养基购自武汉普诺赛生命科技有限公司; 青/链霉素购自Gibco公司; 胎牛血清购自Biological Industries公司; 潮霉素B(hygromycin B)购自北京索莱宝科技有限公司; DMSO购自Sigma-Aldrich公司; EZ Trans细胞转染试剂购自上海李记生物科技有限公司; PrimeSTAR<sup>®</sup> Max DNA Polymerase、In-Fusion<sup>®</sup> HD Cloning Kit购自TaKaRa公司; 质粒提取试剂盒购自MN公司; Hind III、Xho I、Lipofectamine<sup>™</sup> 3000购自ThermoFisher公司; 11-2G新冠抗体<sup>[22]</sup>由本实验室研制。

### 1.2 方法

1.2.1 SARS-CoV-2 S蛋白表达质粒pcDNA3.1-S的获得 以pCMV3-SARS-CoV-2-Spike质粒为模板,利用设计的引物进行PCR获得S-19del基因,反应程

序: 98 °C预变性30 s; 98 °C变性10 s, 55 °C退火5 s, 72 °C延伸1 min, 共35个循环; 72 °C延伸5 min。对PCR产物进行胶回收后, 将S蛋白DNA片段无缝连接至pcDNA3.1载体上从而获得pcDNA3.1-S表达质粒(突变株B.1.1.7、B.1.617.2、B.1.1.529的表达质粒均由此方法获得)。所构建的表达质粒经Hind III、Xho I酶切鉴定并测序后用于慢病毒包装。

**1.2.2 流式分析** 将生长状态良好的293T细胞以 $1.2 \times 10^6$ 个/孔的密度接种于24孔板并培养过夜, 转染前6 h将293T细胞培养基换成无血清培养基, 6 h后, 将1.2  $\mu$ g pcDNA3.1-S瞬时转染至293T细胞中。转染48 h后, 在37 °C条件下用0.05%胰蛋白酶消化并收集293T细胞, 1 000 r/min室温离心5 min, 以 $5 \times 10^5$ 个/200  $\mu$ L管的量将293T细胞重悬于流式管中, PBS洗涤1次后加入抗体11-2G(工作浓度为4  $\mu$ g/mL), 4 °C孵育1 h, PBS洗涤2次后加入羊抗人IgG(H+L) Goat anti-Human IgG(H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, FITC(1:500), 4 °C孵育30 min, PBS洗涤2次后利用流式分析仪对SARS-CoV-2 S蛋白在293T细胞表面的表达情况进行检测。

**1.2.3 假病毒制备及条件优化** 不同穿梭质粒的比较: 将生长状态良好的293T细胞以 $2.4 \times 10^5$ 个/孔的密度接种于24孔板并培养过夜, 转染前6 h将293T细胞培养基换成无血清培养基, 37 °C孵育6 h后, 进行假病毒的包装, 选取三种常用的带有GFP(green fluorescent protein)荧光的穿梭质粒pWPXL-EF1-EGFP、pLenti-puro3-TO-V5-GW-EGFP-Firefly Luciferase、pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP进行比较, 辅助质粒为psPAX2, 包膜质粒为pcDNA3.1-S。质粒混合液37 °C孵育16 h后, 更换含10% FBS的DMEM完全培养基, 48 h后收集细胞上清, 2 000 r/min室温离心10 min, 收集上清, 用假病毒感染293T-ACE2, 使用荧光显微镜DMi8记录GFP荧光, ImageJ软件统计假病毒感染的GFP阳性细胞的数量, 确认感染滴度。

假病毒包装3质粒比例的优化: 将生长状态良好293T细胞以 $2.4 \times 10^5$ 个/孔的密度接种于24孔板并培养过夜, 转染前6 h将293T细胞培养基换成无血清培养基, 6 h后, 进行假病毒的包装, 转染试剂为EZ Trans, 质粒转染比例如表1所示。将质粒和转染试剂的混合液加入细胞后37 °C孵育16 h, 更换含10% FBS的DMEM完全培养基, 48 h后收集细胞上清, 2 000 r/min室温离心10 min, 收集上清, 用假病毒感染293T-ACE2, 使用荧光显微镜DMi8记录GFP荧光, ImageJ软件统计假病毒感染的GFP阳性细胞的数量, 确认感染滴度。

假病毒包装转染试剂的优化: 将生长状态良好的293T细胞以 $2.4 \times 10^5$ 个/孔的密度接种于24孔板并培养过夜, 转染前6 h将293T细胞培养基换成无血清培养基, 6 h后, 使用最优的质粒转染比例, 用两种常用的转染试剂: EZ Trans和Lipofectamine™ 3000在相同质粒比的条件下进行假病毒的包装, 质粒混合液37 °C孵育16 h后, 更换含10% FBS的DMEM完全培养基, 48 h后收集细胞上清, 2 000 r/min室温离心10 min, 收集上清, 用假病毒感染293T-ACE2, 使用荧光显微镜DMi8记录GFP荧光, ImageJ软件统计假病毒感染的GFP阳性细胞的数量, 测定感染滴度。不同突变株的假病毒包装: 将生长状态良好的293T细胞以 $2.4 \times 10^5$ 个/孔的密度接种于24孔板并培养过夜, 转染前6 h将293T细胞培养基换成无血清培养基, 6 h后, 使用最优的质粒转染比例, 以Lipofectamine™ 3000为转染试剂对突变株B.1.17、B.1.617.2、B.1.1.529进行假病毒包装, 质粒混合液37 °C孵育16 h后, 更换含10% FBS的DMEM完全培养基, 48 h后收集细胞上清, 2 000 r/min室温离心10 min, 收集上清, 用假病毒感染293T-ACE2, 使用荧光显微镜DMi8记录GFP荧光, ImageJ软件统计假病毒感染的GFP阳性细胞的数量, 测定感染滴度。

**1.2.4 假病毒在新型冠状病毒中和抗体药物检测中的应用** 将11-2G抗体从100  $\mu$ g/mL进行10倍梯度稀

表1 假病毒包装系统的质粒配比

Table 1 The proportion of plasmids in pseudovirus packaging system

组别 Group	穿梭质粒(pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP) Transfer plasmid (pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP)	辅助质粒(psPAX2) Packing plasmid (psPAX2)	包膜质粒(pcDNA3.1-S) Envelope plasmid (pcDNA3.1-S)
1	0.300 $\mu$ g	0.225 $\mu$ g	0.100 $\mu$ g
2	0.300 $\mu$ g	0.225 $\mu$ g	0.240 $\mu$ g
3	0.300 $\mu$ g	0.225 $\mu$ g	0.300 $\mu$ g
4	0.350 $\mu$ g	0.175 $\mu$ g	0.240 $\mu$ g
5	0.420 $\mu$ g	0.105 $\mu$ g	0.240 $\mu$ g

释,加入96孔板,每孔终体积为50  $\mu\text{L}$ 。细胞对照孔和病毒对照孔不参与倍比稀释。取20  $\mu\text{L}$ 假病毒加至抗体稀释液中混匀,37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h后,将生长状态良好的293T-ACE2细胞按 $2 \times 10^4$ 个/30  $\mu\text{L}$ 孔铺至96孔板,孔内液体总体积为100  $\mu\text{L}$ ,37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育16 h后,更换含10% FBS的DMEM完全培养基,37  $^{\circ}\text{C}$ 培养48 h后,通过荧光显微镜DMi8记录GFP荧光,ImageJ软件统计假病毒感染的GFP阳性细胞的数量,用于评估抗体中和活性。假病毒中和百分率的计算公式:假病毒中和百分率=(TU<sub>假病毒对照孔</sub>-TU<sub>实验孔</sub>)/(TU<sub>假病毒对照孔</sub>-TU<sub>细胞对照孔</sub>) $\times 100\%$ 。

1.2.5 统计学分析 采用GraphPad Prim6对抗体中和水平进行分析,并计算抗体的半数抑制率(half maximal inhibitory, IC<sub>50</sub>)。

## 2 结果

### 2.1 SARS-CoV-2 S蛋白表达情况分析

为获得pcDNA3.1-S重组表达质粒并确认其表达情况,本实验以pCMV3-SARS-CoV-2-Spike质粒为模板,利用设计的引物进行PCR获得S蛋白DNA序列(不包含最后19个氨基酸),将该序列无缝连接至pcDNA3.1载体上,提取质粒后通过Hind III、Xho I酶切鉴定获得大小分别为5 354 bp和3 774 bp的两个条带(图1A),pcDNA3.1-S重组表达质粒经北京擎科生物有限公司测序确认后,瞬时转染至293T细胞。293T细胞在转染48 h后,用流式分析确认其表

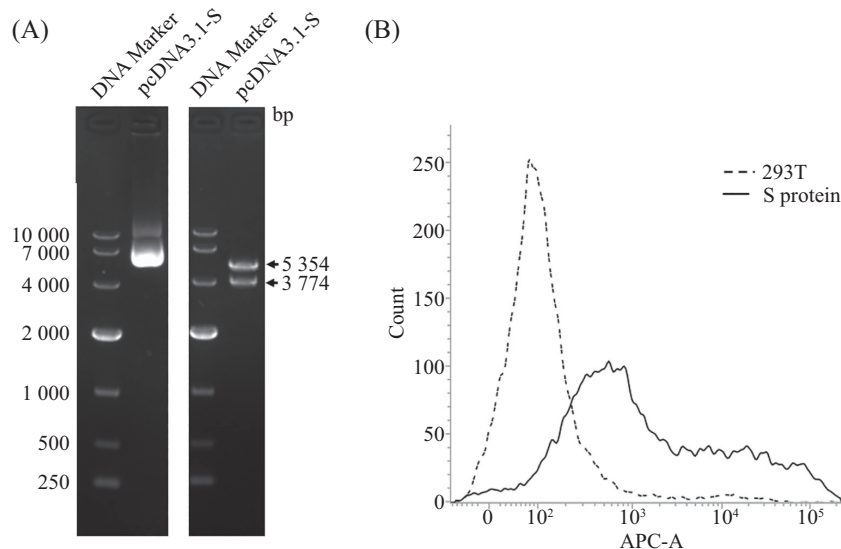
面能够表达SARS-CoV-2 S蛋白(图1B)。

### 2.2 假病毒制备条件优化

2.2.1 假病毒穿梭质粒的优化 为了探索3质粒包装系统中最佳的穿梭质粒,本研究以psPAX2为辅助质粒,pcDNA3.1-S为包膜质粒,选取了三种假病毒穿梭质粒(分别命名为pWPXL-EF1-EGFP、pLenti-puro3-TO-V5-GW-EGFP-Firefly Luciferase、pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP)进行比较。在相同的EZ Trans转染条件下,发现穿梭质粒为pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP时的荧光强度最高(图2)。

2.2.2 假病毒包装质粒比例的优化 为了获得更高的病毒滴度,本研究进一步对psPAX2(辅助质粒)、pcDNA3.1-S(包膜质粒)、pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP(穿梭质粒)的比例进行了摸索。在相同的EZ Trans转染条件下,如图3中实验组2所示,当穿梭质粒和辅助质粒的比例为0.300  $\mu\text{g}$ :0.225  $\mu\text{g}$ (即4:3),包膜质粒pcDNA3.1-S为0.240  $\mu\text{g}$ 时,所包装的假病毒滴度最高,TU值为 $2 \times 10^5$  TU/mL。如图3中实验组5所示,当包膜质粒pcDNA3.1-S为0.240  $\mu\text{g}$ 时,改变穿梭质粒和辅助质粒用量后,荧光强度均有所下降。

2.2.3 转染试剂的优化 为了进一步提高假病毒滴度,我们尝试了不同的转染方法。结果发现当使用Lipofectamine™ 3000作为转染试剂时可以获得高滴度的假病毒(图4),其转染效率明显高于EZ Trans,所包



A: Hind III和Xho I双酶切鉴定重组质粒pcDNA3.1-S; B: 流式分析SARS-CoV-2 S蛋白在293T细胞表面的表达情况。

A: the graph of pcDNA3.1-S digested by Hind III and Xho I; B: flow cytometry analysis of S protein expression on 293T cell surface.

图1 SARS-CoV-2 S蛋白的表达分析

Fig.1 Expression analysis of SARS-CoV-2 S protein

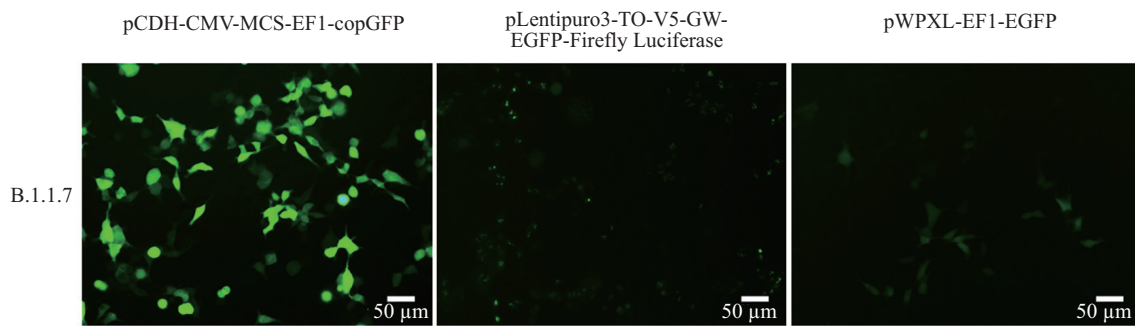
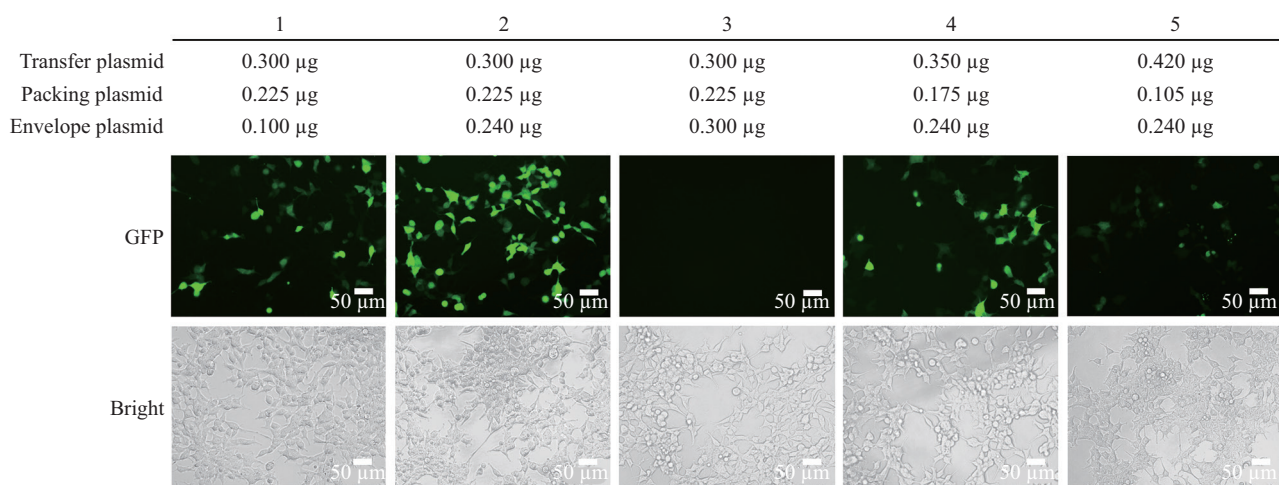


图2 不同穿梭质粒对假病毒滴度的影响

Fig.2 The effect of different transfer plasmids on pseudovirus production titers



1~5为实验组别编号。

1-5 were the numbers of the experimental groups.

图3 不同质粒比例对假病毒滴度的影响

Fig.3 The effect of different ratios of plasmids on pseudovirus production titers

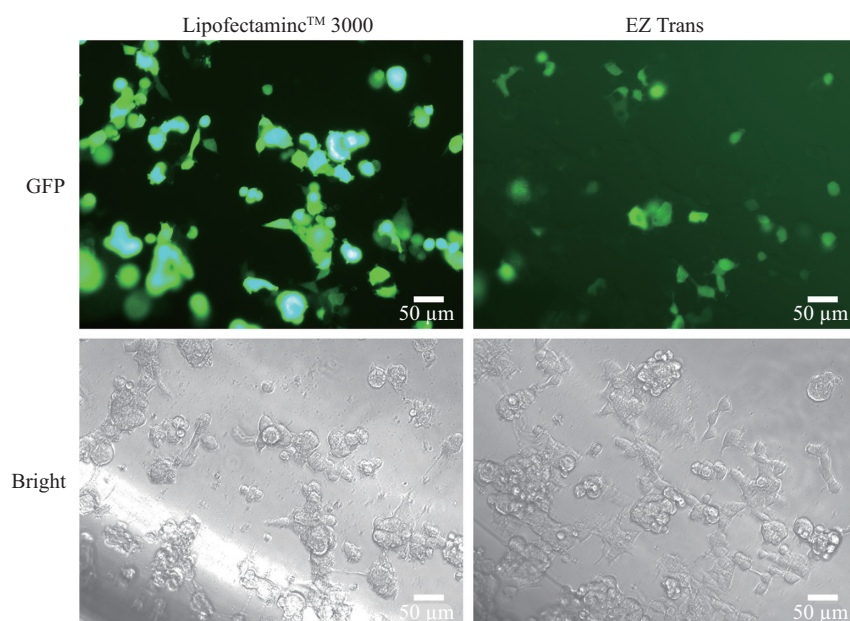
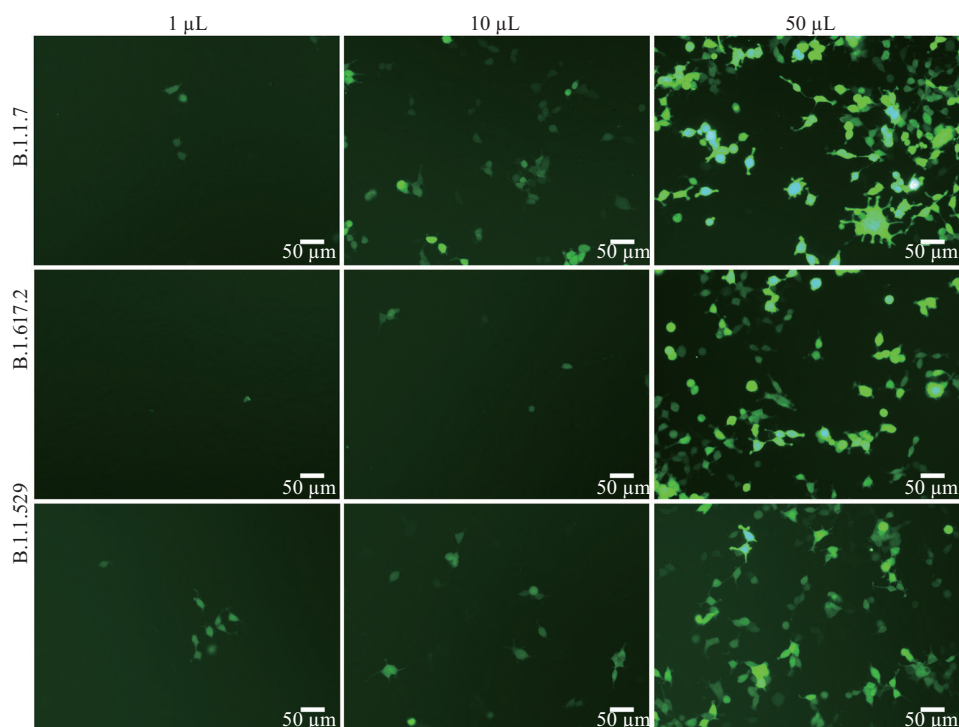


图4 不同转染试剂对假病毒滴度的影响

Fig.4 The effect of different transfection reagents on pseudovirus production titers

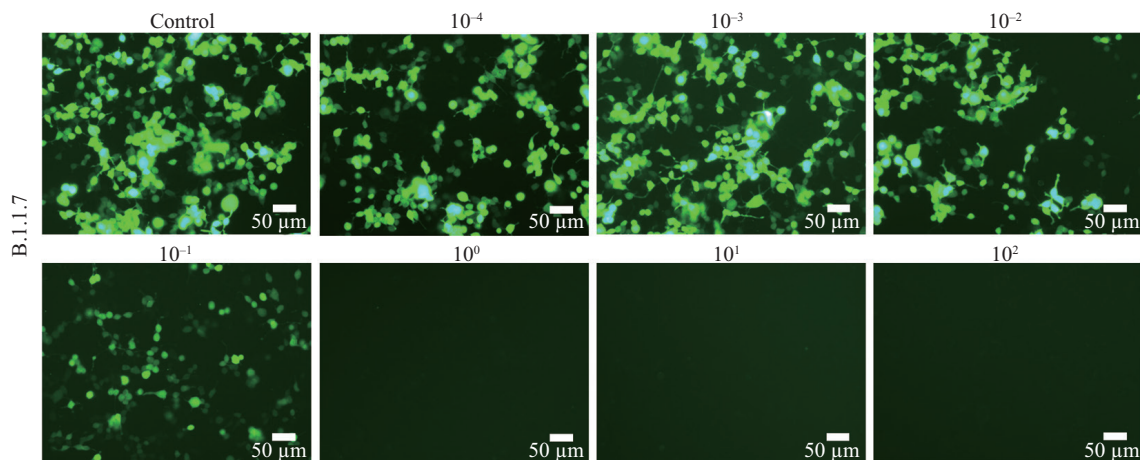


1  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{L}$ 、50  $\mu\text{L}$ 为假病毒在感染293T-ACE2时每孔的用量。

1  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$ , and 50  $\mu\text{L}$  were the amount per well of pseudovirus infected with 293T-ACE2.

图5 不同新冠突变株假病毒的获得

Fig.5 Generation of different SARS-CoV-2 variants pseudovirus



$10^{-4}$ ~ $10^2$ 为假病毒中和实验中的抗体使用浓度, 浓度单位为 $\mu\text{g/mL}$ 。Control为病毒对照孔。

$10^{-4}$ ~ $10^2$  were the antibody concentrations used in the pseudovirus neutralization experiment, and the concentration unit was  $\mu\text{g/mL}$ . Control is the virus control hole.

图6 假病毒检测SARS-CoV-2抗体的中和能力

Fig.6 Pseudovirus-based antibody neutralization assay

装的假病毒滴度达 $1 \times 10^6$  TU/mL, 是EZ Trans的5倍。

### 2.3 不同突变株假病毒的包装

使用优化后的假病毒包装方法对 SARS-CoV-2 的突变株Alpha、Delta、Omicron进行包装。结果表明, 利用该方法制备的三种假病毒均具有较高的滴度(图5)。

### 2.4 假病毒在新型冠状病毒中和抗体检测中的应用

利用本研究建立的假病毒包装方法获得 SARS-CoV-2 突变株B.1.1.7假病毒, 并利用本实验室已构建的293T-ACE2细胞系, 对 SARS-CoV-2 抗体11-2G的中和活性进行检测, 结果显示, 11-2G对所构建的假病毒具有中和能力(图6),  $\text{IC}_{50}$ 为0.126  $\mu\text{g/mL}$ , 与我们

已发表的真病毒检测结果具有一致性<sup>[22]</sup>。

### 3 讨论

截至2022年10月全球累计的新型冠状病毒肺炎确诊人数达6.19亿(<https://covid19.who.int/>)。虽然多款药物的临床数据利好,但能够有效治疗新型冠状病毒肺炎的药物种类极少,Omicron突变株的出现更是逃逸了现有的大部分抗体药物以及疫苗保护<sup>[23]</sup>,对SARS-CoV-2相关疫苗和药物的研发带来了巨大的挑战。

SARS-CoV-2假病毒作为SARS-CoV-2疫苗和药物研发过程中的安全有效且快速的评估手段,在病毒相关机制研究<sup>[24-25]</sup>,治疗性抗体药物<sup>[26]</sup>和疫苗的研发中起到了重要作用。本研究通过对HIV假病毒包装条件的优化,建立了一个能够制备高滴度假病毒的方法。目前研究已证实,在SARS-CoV-2假病毒制备中去除S蛋白序列中胞质部分的19个氨基酸能够促进假病毒的出芽<sup>[17]</sup>,对利用基于假病毒进行SARS-CoV-2病毒进入细胞机制的研究具有重要意义<sup>[27]</sup>。HU等<sup>[28]</sup>在研究中比较了S蛋白全长、S蛋白去掉KXHX基序和去除S蛋白胞质部分19个氨基酸三种条件下所包装的假病毒滴度,发现去除S蛋白序列中胞质部分的19个氨基酸所包装获得的假病毒滴度最高。根据以上研究结果,本研究均采用去C-端19个氨基酸序列的S蛋白包膜质粒对假病毒进行包装,所制备的假病毒的滴度与HU等<sup>[28]</sup>的结果相近。有研究表明,与GFP的三肽发色团构象位置不同,超量绿色荧光蛋白(copepod green fluorescent protein, copGFP)采用的是顺式共面构象,这种构象被认为是获得高荧光量子产率的先决条件<sup>[29]</sup>。因此,我们对比了带有copGFP和增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)的3个常用的穿梭质粒,发现带有copGFP的穿梭质粒荧光强度明显高于其他两种EGFP穿梭质粒,这一结果与LOW等<sup>[30]</sup>的研究结果相似,这种超亮绿色荧光蛋白为后续研究带来了便利。

已发表的SARS-CoV-2假病毒3质粒包装系统中质粒配比各有不同<sup>[31-32]</sup>。本研究通过比较穿梭质粒种类、包装系统质粒的用量以及不同转染试剂对SARS-CoV-2假病毒包装的影响,从而建立了一套简单高效的SARS-CoV-2假病毒构建系统。本研究通过对质粒比的优化,将包装所用的质粒总量降低为每 $1.2 \times 10^6$ 个

293T细胞使用 $0.765 \mu\text{g}$ ,与已发表的相关研究<sup>[15,28]</sup>相比大大降低了病毒包装所需使用的质粒量。而对于转染试剂的比较发现,Lipofectamine™ 3000包装的假病毒滴度达 $1 \times 10^6$  TU/mL,虽然高于EZ Trans,但该试剂的成本相对较高,而使用EZ Trans进行病毒包装,则可能需要进行进一步的浓缩与纯化。此外,为验证这一方案是否适用于多个突变株,我们比较了B.1.1.7、B.1.617.2、B.1.1.529三种SARS-CoV-2流行突变株假病毒的包装情况。结果显示,经优化后的假病毒包装系统适用于突变株B.1.1.7、B.1.617.2、B.1.1.529,滴度均可以达到 $1 \times 10^6$  TU/mL(图5),这一滴度水平与已有研究成果一致<sup>[33-34]</sup>。随后,我们将所包装的假病毒(B.1.1.7)应用于SARS-CoV-2抗体的中和活性评价(图6),测得11-2G抗体对突变株B.1.1.7的半数抑制有效浓度为 $0.126 \mu\text{g/mL}$ ,这一检测结果与我们已发表的真病毒检测结果具有一致性<sup>[22]</sup>。这表明该体系制备的假病毒可以用于体外评价中和和抗体活性。

### 4 结论

综上所述,本研究以HIV 3质粒包装系统为基础,通过对假病毒的穿梭质粒、3质粒配比以及转染试剂的比较,成功建立了一种简单高效的制备SARS-CoV-2假病毒的方法。该方法可用于制备SARS-CoV-2假病毒,为体外评估SARS-CoV-2抗体中和活性及研发SARS-CoV-2相关疫苗和药物提供了技术基础。

### 参考文献 (References)

- [1] HU B, GUO H, ZHOU P, et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19 [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19(3): 141-54.
- [2] JACKSON C B, FARZAN M, CHEN B, et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23(1): 3-20.
- [3] MEO S A, MEO A S, AL-JASSIR F F, et al. Omicron SARS-CoV-2 new variant: global prevalence and biological and clinical characteristics [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25(24): 8012-8.
- [4] LI Q, LIU Q, HUANG W, et al. Current status on the development of pseudoviruses for enveloped viruses [J]. *Rev Med Virol*, 2018, 28(1): e1963.
- [5] LU Y, JIANG T. Pseudovirus-based neuraminidase inhibition assays reveal potential H5N1 drug-resistant mutations [J]. *Protein Cell*, 2013, 4(5): 356-63.
- [6] ZHUANG M, JIANG H, SUZUKI Y, et al. Procyanidins and butanol extract of Cinnamomi Cortex inhibit SARS-CoV infection [J]. *Antiviral Res*, 2009, 82(1): 73-81.
- [7] SHEN L, NIU J, WANG C, et al. High-throughput screening and

- identification of potent broad-spectrum inhibitors of coronaviruses [J]. *J Virol*, 2019, 93(12): e00023-19.
- [8] LEGROS V, DENOLLY S, VOGRIG M, et al. A longitudinal study of SARS-CoV-2-infected patients reveals a high correlation between neutralizing antibodies and COVID-19 severity [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(2): 318-27.
- [9] HYSENI I, MOLESTI E, BENINCASA L, et al. Characterisation of SARS-CoV-2 lentiviral pseudotypes and correlation between pseudotype-based neutralisation assays and live virus-based micro neutralisation assays [J]. *Viruses*, 2020, 12(9): 1011.
- [10] NIE J, LI Q, WU J, et al. Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for SARS-CoV-2 [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1): 680-6.
- [11] ALMAHBOUB S A, ALGAISSI A, ALFALEH M A, et al. Evaluation of neutralizing antibodies against highly pathogenic coronaviruses: a detailed protocol for a rapid evaluation of neutralizing antibodies using vesicular stomatitis virus pseudovirus-based assay [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 2020.
- [12] XIONG H L, WU Y T, CAO J L, et al. Robust neutralization assay based on SARS-CoV-2 S-protein-bearing vesicular stomatitis virus (VSV) pseudovirus and ACE2-overexpressing BHK21 cells [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1): 2105-13.
- [13] CHEN M, ZHANG X E. Construction and applications of SARS-CoV-2 pseudoviruses: a mini review [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(6): 1574-80.
- [14] MOON J, JUNG Y, MOON S, et al. Production and characterization of lentivirus vector-based SARS-CoV-2 pseudoviruses with dual reporters: evaluation of anti-SARS-CoV-2 viral effect of Korean Red Ginseng [J]. *J Ginseng Res*, 2023, 47(1): 123-32.
- [15] CRAWFORD K H D, EGUIRA R, DINGENS A S, et al. Protocol and reagents for pseudotyping lentiviral particles with SARS-CoV-2 spike protein for neutralization assays [J]. *Viruses*, 2020, 12(5): 513.
- [16] MA Y, MAO G, WU G, et al. Dual-fluorescence labeling pseudovirus for real-time imaging of single SARS-CoV-2 entry in respiratory epithelial cells [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13(21): 24477-86.
- [17] OU X, LIU Y, LEI X, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1620.
- [18] AO Z, PATEL A, TRAN K, et al. Characterization of a trypsin-dependent avian influenza H5N1-pseudotyped HIV vector system for high throughput screening of inhibitory molecules [J]. *Antiviral Res*, 2008, 79(1): 12-8.
- [19] GUO Y, RUMSCHLAG-BOOMS E, WANG J, et al. Analysis of hemagglutinin-mediated entry tropism of H5N1 avian influenza [J]. *Virology*, 2009, 6: 39.
- [20] FERRARA F, MOLESTI E, BOTTCHEER-FRIEBERTSHAUSER E, et al. The human transmembrane protease serine 2 is necessary for the production of group 2 influenza A virus pseudotypes [J]. *J Mol Genet Med*, 2012, 7: 309-14.
- [21] KLAGES N, ZUFFEREY R, TRONO D. A stable system for the high-titer production of multiply attenuated lentiviral vectors [J]. *Mol Ther*, 2000, 2(2): 170-6.
- [22] YANG X, CHI H, WU M, et al. Discovery and characterization of SARS-CoV-2 reactive and neutralizing antibodies from humanized CAMouse(HG) mice through rapid hybridoma screening and high-throughput single-cell V(D)J sequencing [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 992787.
- [23] HOFFMANN M, KRUGER N, SCHULZ S, et al. The Omicron variant is highly resistant against antibody-mediated neutralization: implications for control of the COVID-19 pandemic [J]. *Cell*, 2022, 185(3): 447-56, e11.
- [24] ZHANG F, LI W, FENG J, et al. SARS-CoV-2 pseudovirus infectivity and expression of viral entry-related factors ACE2, TMPRSS2, Kim-1, and NRP-1 in human cells from the respiratory, urinary, digestive, reproductive, and immune systems [J]. *J Med Virol*, 2021, 93(12): 6671-85.
- [25] HOFFMANN M, KLEINE-WEBER H, SCHROEDER S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor [J]. *Cell*, 2020, 181(2): 271-80, e8.
- [26] SEPTISETYANI E P, PRASETYANINGRUM P W, ANAM K, et al. SARS-CoV-2 antibody neutralization assay platforms based on epitopes sources: live virus, pseudovirus, and recombinant S glycoprotein RBD [J]. *Immune Netw*, 2021, 21(6): e39.
- [27] WANG X, CHEN C H, BADETI S, et al. Deletion of ER-retention motif on SARS-CoV-2 spike protein reduces cell hybrid during cell-cell fusion [J]. *Cell Biosci*, 2021, 11(1): 114.
- [28] HU J, GAO Q, HE C, et al. Development of cell-based pseudovirus entry assay to identify potential viral entry inhibitors and neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 [J]. *Genes Dis*, 2020, 7(4): 551-7.
- [29] WILMANN P G, BATTAD J, PETERSEN J, et al. The 2.1A crystal structure of copGFP, a representative member of the copepod clade within the green fluorescent protein superfamily [J]. *J Mol Biol*, 2006, 359(4): 890-900.
- [30] LOW K, BLESCH A, HERRMANN J, et al. A dual promoter lentiviral vector for the *in vivo* evaluation of gene therapeutic approaches to axon regeneration after spinal cord injury [J]. *Gene Ther*, 2010, 17(5): 577-91.
- [31] NEERUKONDA S N, VASSELL R, HERRUP R, et al. Establishment of a well-characterized SARS-CoV-2 lentiviral pseudovirus neutralization assay using 293T cells with stable expression of ACE2 and TMPRSS2 [J]. *PLoS One*, 2021, 16(3): e0248348.
- [32] YAN Y, CHANG L, LUO W, et al. Comparison of seven commercial severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 nucleic acid detection reagents with pseudovirus as quality control material [J]. *J Mol Diagn*, 2021, 23(3): 300-9.
- [33] YANG P, YANG Y, WU Y, et al. An optimized and robust SARS-CoV-2 pseudovirus system for viral entry research [J]. *J Virol Methods*, 2021, 295: 114221.
- [34] HUANG S W, TAI C H, HSU Y M, et al. Assessing the application of a pseudovirus system for emerging SARS-CoV-2 and re-emerging avian influenza virus H5 subtypes in vaccine development [J]. *Biomed J*, 2020, 43(4): 375-87.