

DOI:10.13350/j.cjpb.230202

• 论著 •

信号肽类型对新布尼亚病毒 SFTSV Gn 蛋白 靶向表达特征影响的研究*

张凡,张娟,徐家馨,吴玉龙,李波清**,乔媛媛**

(滨州医学院基础医学院病原生物学教研室,山东烟台 264003)

【摘要】 目的 研究不同类型信号肽对新布尼亚病毒(SFTSV)包膜蛋白 Gn 表达的影响。方法 以 SFTSV(SD4 毒株)M 段为模板 PCR 扩增 Gn 基因,双酶切后分别连接至 A16H 和 pHL 表达载体,连接产物转染 293T 细胞,收集细胞和上清进行 Western blot、免疫荧光以及质谱检测,分析 Gn 重组蛋白的表达情况;ELISA 检测 Gn 重组蛋白的结合活性。

结果 成功构建缺失载体信号肽的 pA16H-Gn 质粒和包含信号肽的 sp-pA16H-Gn 质粒,以及携带另一种载体信号肽的 pHL-Fc-Gn 质粒。缺失载体信号肽的 pA16H-Gn 质粒在细胞内外均不表达 Gn 重组蛋白(rGn-Fc),包含 A16H 载体信号肽的 sp-pA16H-Gn 质粒在细胞内表达 Gn 重组蛋白(rGn-Fc),但不能分泌表达,包含 pHL 载体信号肽的 pHL-Fc-Gn 质粒可将 Gn 重组蛋白(rGn-Fc)分泌表达胞外,且具有结合活性。结论 载体本身携带的信号肽会影响 SFTSV Gn 重组蛋白的表达,不同信号肽影响重组蛋白的表达定位。该研究为 SFTSV Gn 重组蛋白的开发奠定了基础,同时也为 SFTSV 重组疫苗的研究提供了新思路。

【关键词】 发热伴血小板减少综合征病毒;信号肽;分泌;重组蛋白

【中图分类号】 R373.3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)02-0132-04

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Feb;18(2):132-136,140.]

Study on the effect of signal peptide type on the target expression characteristics of severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus' glycoprotein Gn

ZHANG Fan, ZHANG Juan, XU Jia-xin, WU Yu-Long, LI Bo-qing, QIAO Yuan-yuan (Department of Pathogen Biology, College of Basic Medicine, Binzhou Medical University, Yantai 264003, Shandong, China)

【Abstract】 **Objective** To study the effect of different types of signal peptides on the expression of glycoprotein Gn of SFTSV. **Methods** The gene of Gn was amplified by PCR using the M segment of SFTSV (SD4 strain) as template, and then was ligated into A16H and pHL expression vectors after double digestion, and the ligated products were transfected into 293T cells. The cells and supernatant were collected for western blot, immunofluorescence detection or mass spectrometry to analyze the expression of three recombinant protein Gn. The binding activity of recombinant protein Gn was detected by ELISA. **Results** The plasmid pA16H-Gn lacking the vector signal peptide, the plasmid sp-pA16H-Gn containing the vector signal peptide, and the plasmid pHL-Fc-Gn containing another vector signal peptide were successfully constructed. The recombinant protein (rGn-Fc) from the plasmid pA16H-Gn lacking the signal peptide of the vector was not expressed. The rGn-Fc from the plasmid sp-pA16H-Gn containing the signal peptide of the A16H vector was expressed intracellularly, but not secreted to extracellular expression. The rGn-Fc of plasmid pHL-Fc-Gn containing the signal peptide of pHL vector can be secreted to extracellular with binding activity. **Conclusion** The signal peptide carried by the vector itself will affect the expression and the expression location of SFTSV rGn. This study lays the foundation for the development of SFTSV rGn, and also provides new ideas for the research of SFTSV recombinant vaccine.

【Key words】 SFTSV; signal peptide; secretion; recombinant protein

***严重发热伴血小板减少综合征(SFTS)是一种蜱媒传播性疾病,其病原体为新型布尼亚病毒(SFTSV),于2010年在中国被首次报道^[1]。SFTS的临床症状主要表现为高热和血小板减少,并伴有出血、脑炎及多器官衰竭、神经系统异常等^[2-3]。SFTSV的遗传物质是一种单链负义RNA,由大(L)、中(M)和小(S)3个片段组成。S段编码核蛋白(NP)和非结构蛋

* **【基金项目】** 山东省自然科学基金项目(No. ZR2020MH169)。

** **【通讯作者】** 李波清, E-mail: sdblboqing@163.com

乔媛媛, E-mail: qiaoyuanyuan_888@163.com

【作者简介】 张凡(1996-),男,山西大同人,在读硕士。主要研究方向:重组蛋白的表达。E-mail: f_zhangl@163.com
张凡和张娟为共同第一作者

白(NS);M段编码糖蛋白(GP),经加工形成Gc和Gn蛋白;L片段编码RNA依赖性RNA聚合酶(RdRp)。包膜蛋白Gn和Gc在受体结合和膜融合中起关键作用,是中和抗体作用的靶标^[4-5]。

信号肽序列于1975年首次被描述为可移除的N端短序列,用于引导蛋白质表达达到特定位置^[6]。每个信号肽(长度约20-30个残基)包含一个基本的“N结构域”、一个7~13个残基的疏水性“H结构域”和一个弱极性的“C结构域”^[7]。随后的研究发现,这些肽在原核生物和真核生物中均有存在,但其序列在长度和氨基酸组成上都高度多样化。一级序列高度多样化的信号肽不仅影响细胞分泌内源蛋白质的生理水平,而且在重组蛋白的表达方面也起重要作用。用已知高水平分泌的蛋白质(例如荧光素酶、组织纤溶酶原激活剂)的信号肽替代内源信号肽可显著提高重组蛋白的分泌水平^[8]。此外,信号肽作为信号识别粒子直接识别的标记,在分泌蛋白跨内质网膜的协同翻译位中起重要的作用,调控新合成的分泌蛋白的其他结构蛋白质的定位。因此,信号肽的选择及优化是增强真核系统靶蛋白表达的有效方法。

本文选用携带不同信号肽的两种带有人源抗体IgG1 Fc段的表达载体,构建重组SFTSV Gn表达质粒,利用293T细胞在体外表达相应重组蛋白,western blot、免疫荧光以及质谱分析等方法鉴定及表征重组蛋白的表达水平与定位,探讨有无载体信号肽及不同载体信号肽对SFTSV Gn重组蛋白表达的影响。

材料与方 法

1 材料

1.1 质粒、载体、细胞、目的基因 新布尼亚病毒SFTSV(SD4毒株)的M基因表达质粒由中国食品药品检定研究院王佑春提供^[9]。该表达质粒所包含的Gn全基因序列通过NCBI数据库比对并确认。A16H载体由中国医学科学院何玉先提供^[10],pHL载体购自美国addgene公司中国代理(A16H和pHL载体携带表达人IgG1的Fc片段基因)。293T细胞由本实验室保存。

1.2 主要试剂及仪器 FastPfu DNA聚合酶购自北京全式金生物技术有限公司;T4 DNA连接酶购自美国Thermo公司;质粒大提试剂盒和胶回收试剂盒购自德国QIAGEN公司;限制性内切酶EcoR I-HF、Age I-HF及Kpn I-HF购自NEB(北京)有限公司;抗His标签鼠单克隆抗体购自中国Abmart公司;FITC标记羊抗人IgG,HRP标记羊抗人IgG和HRP标记羊抗人Fab购自优宁维生物科技有限公司;10和

A2抗体由本实验室纯化自SFTSV患者血清并保存。

2 方法

2.1 引物设计及合成 通过Primer5.0软件设计缺失载体信号肽的pA16H-Gn质粒和包含信号肽的sp-pA16H-Gn质粒Gn基因的特异性引物,以及包含另一种载体信号肽的pHL-Fc-Gn质粒Gn基因的特异性引物,由生物工程(上海)有限公司合成。引物名称、序列见表1。

表1 Gn基因引物
Table 1 Primers for Gn Gene

引物 Name of primers	引物序列 Primer sequence(5'-3')
pA16H-Gn/sp	F:CCGGAATTCTTTCTTGGCGGGGTAAC
-pA16H-Gn	R:GCACCGGTGACATTCTGACTCCGACCCATCATC
pHL-Fc-Gn	F:GCACCGGTGACTCCGACCCATCATC R:GGGGTACCTTTCTTGGCGGGGTAACA

2.2 目的基因扩增 以SFTSV SD4 M基因的表达质粒为模板PCR扩增Gn基因序列。PCR体系(50 μL):FastPfu DNA Polymerase 1 μL,模板1 μL,上、下游引物各1 μL,2.5 mmol/LdNTPs 4 μL,5 × FastPfu Buffer 10 μL,加水补至50 μL。PCR反应程序:98 °C 2 min;98 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 1 min,共35个循环;72 °C延伸10 min后4 °C保存。PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳分析后切胶回收。凝胶回收按照Qiagen QIAquick Gel Extraction Kit试剂盒说明进行。

2.3 重组质粒的构建及鉴定

2.3.1 pA16H-Gn质粒及sp-pA16H-Gn质粒的构建 使用限制性内切酶EcoR I-HF和Age I-HF对Gn基因的PCR产物及载体A16H进行酶切,酶切片段16 °C连接4 h。将两种连接产物分别转入*E. coli* DH5α感受态细胞,活化后接种于含卡那霉素的LB固体培养基。

2.3.2 pHL-Fc-Gn质粒的构建 使用限制性内切酶Kpn I-HF和Age I-HF对Gn基因的PCR产物及载体pHL进行酶切,酶切片段16 °C连接4 h,连接产物转入*E. coli* DH5α感受态细胞,活化后接种于含氨苄抗生素的LB固体培养基。

37 °C过夜恒温培养转入3种重组质粒的大肠埃希菌,次日挑取单克隆进行PCR验证。将含有目的蛋白的重组质粒送生物工程(上海)股份有限公司测序。

2.4 重组蛋白的表达 转染前18~24 h将293T细胞接种于细胞培养皿中,待细胞贴壁生长至80%时,重组质粒与转染试剂按12 μg:24 μL比例分别稀释于500 μL OPTI-MEM。将稀释的转染试剂加入到质粒中,混匀室温孵育25 min后加入到细胞培养基中,于

37 °C、5% CO₂ 孵箱中孵育 12 h, 更换新鲜培养基继续培养 36 h。分别收集细胞和上清, 纯化重组蛋白。

2.5 重组蛋白的鉴定 转染 pA16H-Gn 重组质粒的细胞及上清经 protein A 柱纯化超滤浓缩后, 通过 Western blot 方法进行蛋白鉴定。细胞及上清蛋白经 10% SDS-PAGE 分离, 转移至 PVDF 膜上, 以含 6% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 用 HRP 标记的羊抗人 IgG 抗体(1:50000)显色。

sp-pA16H-Gn 重组质粒转染 12 h 后的细胞用 4% 多聚甲醛固定, 100 μL 0.01% Triton-x-100 通透, PBS 冲洗 3 遍, 每次 5 min, 然后滴加 100 μL 山羊血清室温封闭孵育 30 min。以 FITC 标记的羊抗人 IgG (1:400) 进行免疫荧光检测。

sp-pA16H-Gn 转染细胞的上清经上述方法纯化后使用质谱仪分析 rGn-Fc 重组蛋白的表达情况。取纯化的样品 100 μg 于离心管中, 加入盐酸胍变性, 同时加入 DTT 使样品还原, 随后加入 20 μg 胰蛋白酶处理, 使样品水解为肽段; 离心, 取上清, 采用液质联用的方法进行肽图分析, 通过计算肽段的序列覆盖度来分析样品中的目的蛋白。

2.6 重组蛋白结合活性测定 纯化的 rGn-Fc 重组蛋白利用 ELISA 方法检测其结合活性。纯化的 rGn-Fc 按照 5 μg/mL 过夜包被, 次日弃去包被液, 每孔加入 5% 脱脂奶粉 37 °C 封闭 2 h, PBST 洗涤 1 次; 加入 10 μg/mL 10 和 A2 抗体作为一抗, 37 °C 孵育 1h, PBST 洗 4 次, 每次 5 min; 加入 HRP 标记羊抗人 Fab 二抗 (1:10000), 37 °C 孵育 1h, PBST 洗 4 次, 每次 5 min; 加入 TMB 显色液, 37 °C 孵育 30 min 后终止反应, 于酶标仪 450 nm 波长处读取吸光度 A 值, GraphPad Prism6 软件进行数据分析。

2.7 统计学分析 使用 IBM SPSS Statistics 25.0 进行统计学分析, 免疫荧光强度及 ELISA 结果分析采用独立样本的 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结果

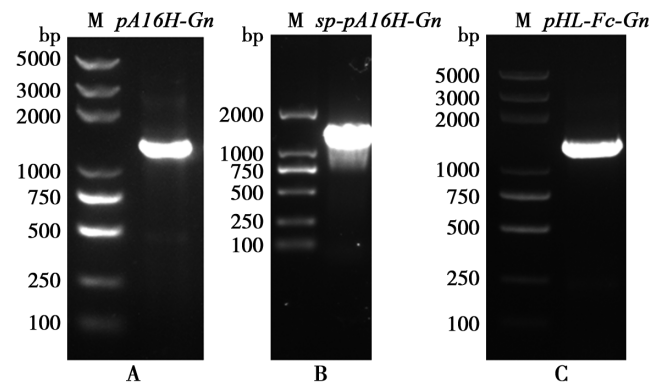
1 重组质粒的鉴定

以 Gn 上下游引物进行 PCR 反应, 检验构建的 pA16H-Gn、sp-pA16H-Gn、pHL-Fc-Gn 重组质粒的正确性。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳得到与预期一致的 1 299 bp 目的基因片段(图 1)。测序表明 3 种重组质粒构建正确。

2 A16H 载体信号肽对 Gn 重组蛋白表达的影响

由于 rGn-Fc 携带人源 IgG1 的 Fc 片段, 封闭后直接以 HRP 标记的山羊抗人 IgG 作为抗体进行 western blot 或免疫荧光法进行鉴定。结果表明, 在 A16H 没有携带载体信号肽的情况下, rGn-Fc 在细胞

内外都不表达(图 2A,B)。在 A16H 载体携带信号肽的情况下, western blot 显示在细胞内检测到 rGn-Fc (图 2C)。免疫荧光法也显示 rGn-Fc 在荧光显微镜下显示绿色荧光, 对照组未显示相应荧光(*P* < 0.05)(图 2D), 进一步证实 rGn-Fc 在细胞内或膜上表达, 与 western blot 检测结果一致。为了明确 rGn-Fc 在 A16H 携带的载体信号肽引导下能否分泌到细胞上清中, 采用质谱分析 rGn-Fc 的目标肽段在色谱柱中的保留时间, 颜色代表信号强度, 红色和黄色信号较强, 计算出序列覆盖度为 8%, 结果表明在细胞上清中未检测到对应的目的蛋白(图 2E)。以上提示 A16H 载体信号肽促进了 Gn 重组蛋白表达, 但未正确分泌到细胞外。



A pA16H-Gn 重组质粒 M DNA 标志物 5000 B sp-pA16H-Gn 重组质粒 M DNA 标志物 2000 C pHL-Fc-Gn 重组质粒 M DNA 标志物 5000

图 1 pA16H-Gn、sp-pA16H-Gn 及 pHL-Fc-Gn 3 种重组质粒的 PCR 验证

A Gn DNA fragment of recombinant plasmid pA16H-Gn M DNA marker 5000 B Gn DNA fragment of recombinant plasmid sp-pA16H-Gn M DNA marker 2000 C Gn DNA fragment of recombinant plasmid pHL-Fc-Gn M DNA marker 5000.

Fig. 1 Verification of three recombinant plasmids pA16H-Gn, sp-pA16H-Gn and pHL-Fc-Gn by PCR

3 pHL 载体信号肽对 Gn 重组蛋白分泌到胞外表达的影响

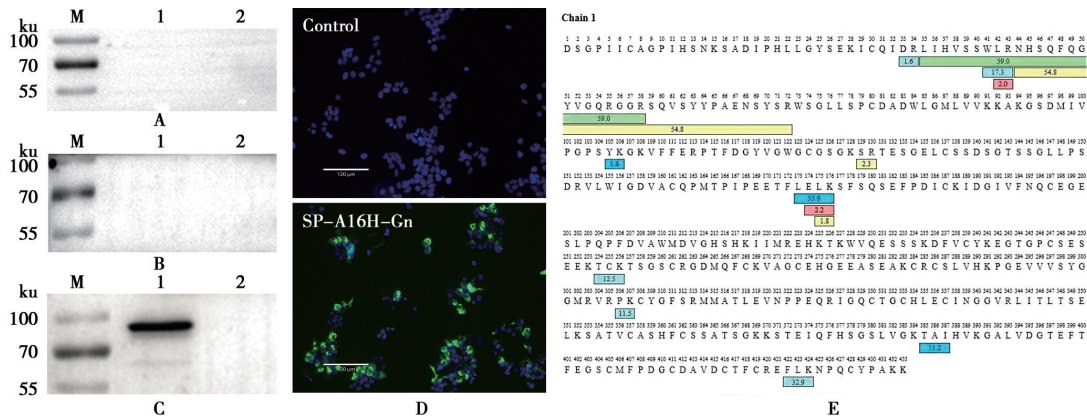
pHL-Fc-Gn 转染 293T 细胞后, 细胞上清经纯化检测到 rGn-Fc(图 3A)。ELISA 结果显示 rGn-Fc 与从 SFTSV 患者血清中纯化的 10、A2 抗体均具有较强的结合活性, 与不加一抗 No-10 和 No-A2 没有反应(图 3B)。表明 pHL 载体信号肽促进 Gn 重组蛋白分泌表达到胞外, Gn 重组蛋白为具有活性的功能蛋白。

讨论

SFTS 高发于中国东部的 4 月份到 10 月份, 目前该病广泛分布于中国、韩国、日本等国家, 并逐步成为一种全球流行性传染性疾病^[11-12]。据统计, 从 2010 年到 2019 年我国已报告超过 13 000 例 SFTS 病例, 主要分布于中部、东部和东北部多个省份, 其中河南、山

东、安徽、湖北、辽宁、浙江、江苏等7个省份发病率较高。近年来,我国病例数量及报告省份呈现逐年递增趋势^[13]。SFTS患者体内病毒水平以及患者年龄均影

响体内中和抗体的产生^[14]。目前,还没有针对这种病毒的特异性商品化Gn抗原被开发出来。

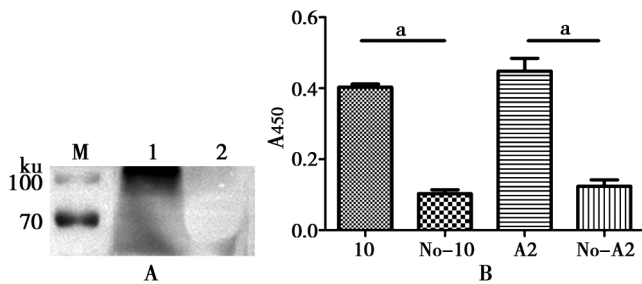


A Western blot 检测 pA16H-Gn 载体胞内表达 Gn-Fc 重组蛋白(rGn-Fc)情况 M 蛋白分子质量标准 1 rGn-Fc 与相应抗体反应条带 2 空细胞对照 B Western blot 检测 pA16H-Gn 胞外表达 rGn-Fc 情况 M 蛋白分子质量标准 1 rGn-Fc 与相应抗体反应条带 2 空细胞对照 C Western blot 检测 sp-pA16H-Gn 胞内 rGn-Fc 的表达情况 M 蛋白分子质量标准 1 rGn-Fc 与相应抗体反应条带 2 空细胞对照 D 免疫荧光法检测 sp-pA16H-Gn 胞内 rGn-Fc 的表达 E sp-pA16H-Gn 胞外表达 rGn-Fc 质谱分析

图2 A16H信号肽影响Gn-Fc重组蛋白细胞内外表达情况

A Intracellular expression of recombinant protein Gn-Fc (rGn-Fc) transfection by pA16H-Gn M Protein marker 1 The result of rGn-Fc by western blot 2 Control B Extracellular expression of rGn-Fc transfection by pA16H-Gn M Marker 1 The result of rGn-Fc by western blot 2 Control C Intracellular expression of rGn-Fc transfection by sp-pA16H-Gn M Marker 1 The result of rGn-Fc by western blot 2 Control D Intracellular expression of rGn-Fc transfection by sp-pA16H-Gn by immunofluorescence E Mass spectrometry analysis of extracellular expression of rGn-Fc transfection by sp-pA16H-Gn

Fig. 2 Intracellular and extracellular expression of Gn-Fc affected by signal peptide



A Western blot 检测 pHL-Fc-Gn 载体胞外表达 rGn-Fc 的情况 M 蛋白分子质量标准 1 rGn-Fc 与相应抗体反应条带 2 对照 B ELISA 检测 pHL-Fc-Gn 载体表达的 rGn-Fc 与受测抗体 10、A2 的结合活性 No-10、No-A2 分别为未加一抗 10 和 A2 (a 组间比较, $P < 0.01$)

图3 Gn-Fc重组蛋白的表达和活性

A Extracellular expression of rGn-Fc by pHL-Fc-Gn vector by western blot M Protein marker 1 Reaction bands of rGn-Fc with corresponding antibody 2 Control B rGn-Fc expressed by pHL-Fc-Gn vector binds to antibody 10, A2 by ELISA No-10, No-A2 represented without primary antibody 10 and A2 respectively (a comparison between groups, $P < 0.01$)

Fig. 3 Extracellular expression and binding activity of rGn-Fc

重组蛋白的成功表达不仅需要适宜的纯化标签及表达条件,更需要合适的分泌信号肽。在分泌蛋白质过程中,信号肽从核糖体中出现时被位于内质网表面的信号识别颗粒受体识别,指导多肽易位进入内质网腔,然后将其装入囊泡以进行胞吐作用^[15],信号肽通常带有 N-糖基化位点参与蛋白质的折叠和成熟。重组病毒疫苗与传统疫苗相比表现出更好的安全性和免

疫原性优势。SFTSV Gn 和 Gc 蛋白作为包膜糖蛋白,已被证明是中和抗体的靶标,基于重组病毒载体表达 SFTSV 糖蛋白的疫苗也被认为是 SFTS 的候选疫苗。已有研究表明 SFTSV Gn、Gc 重组免疫蛋白在体内体外实验中表现出较强的免疫原性,并激活免疫细胞诱导中和抗体产生^[16]。

载体信号肽在分泌型重组蛋白的有效表达中发挥重要作用。本研究构建了3种SFTSV Gn的重组质粒,利用western blot及免疫荧光法检测重组蛋白的表达情况,结果表明缺失载体信号肽的pA16H-Gn重组质粒不能表达目的蛋白。包含载体信号肽的sp-pA16H-Gn重组质粒在胞内表达相应的目的蛋白,但不能分泌到胞外。包含载体信号肽的pHL-Fc-Gn重组质粒可表达并将目的蛋白分泌到胞外。因此,无信号肽的Gn重组蛋白在缺失载体信号肽的情况下不能被表达。而带有不同载体信号肽的重组质粒尽管可表达目的蛋白,但是重组蛋白的定位却不同,不同载体的分泌型信号肽并不适用于所有蛋白的表达。所以,在表达蛋白时充分考虑信号肽在蛋白分泌表达中的作用对于获得有功能的重组蛋白至关重要,不同目的蛋白应根据其大小和性质选择合适的信号肽和载体。本研究为SFTSV Gn重组蛋白的开发提供了理论基础,同时也为SFTSV重组疫苗研究提供了新思路。

(下转 140 页)

本地流行毒株序列有关。可见 SARS-CoV-2 全基因组测序以及数据的及时上传可为 COVID-19 感染者溯源提供病原学依据。

新冠疫情发生以来,我国采取了一系列有效防控措施,早期本土疫情得到了迅速控制,但境外感染者输入持续影响国内疫情防控。另一方面,SARS-CoV-2 不断变异并产生如 Omicron 变异株,导致病毒传播能力更强,传播速度更快,感染后平均潜伏期缩短,迅速成为境外输入优势株^[5-6],因此境外输入性感染者导致的疫情扩散对我国的疫情防控造成严峻挑战。持续开展输入性 COVID-19 感染者的病毒基因组测序,及时了解境外输入病毒的型别变化以及变异情况,为 COVID-19 感染者溯源提供病原学依据,可助力于国内 COVID-19 疫情的防控。

【参考文献】

[1] Zhu N, Zhang DY, Wang WL, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019[J]. *New Engl J Med*, 2020,382(8):727-733.

[2] Kim D, Lee JY, Yang JS, et al. The architecture of SARS-CoV-2 transcriptome[J]. *Cell*, 2020,181(4):914-921.

[3] Viana R, Moyo S, Amoako DG, et al. Rapid epidemic expansion of the SARS-CoV-2 Omicron variant in southern Africa[J]. *Nature*, 2022,603(7902):679-686.

[4] WHO, Weekly epidemiological update on COVID-19 - 25 January 2023, <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19-25-january-2023>

(上接 135 页)

【参考文献】

[1] Yu X, Liang M, Zhang S, et al. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China[J]. *New Engl J Med*, 2011,364(16):1523-1532.

[2] Li H, Lu Q, Xing B, et al. Epidemiological and clinical features of laboratory-diagnosed severe fever with thrombocytopenia syndrome in China, 2011-2017: a prospective observational study [J]. *Lancet Infect Dis*, 2018,18(10):1127-1137.

[3] Choi SJ, Park S, Bae I, et al. Severe fever with thrombocytopenia syndrome in South Korea, 2013-2015[J]. *Plos Neglect Trop Dis*, 2016,10(12):e5264.

[4] Chung H, Kim E, Kwon B, et al. Kinetics of glycoprotein-specific antibody response in patients with severe fever with thrombocytopenia syndrome[J]. *Viruses*, 2022,14(2):256.

[5] Kim KH, Kim J, Ko M, et al. An anti-Gn glycoprotein antibody from a convalescent patient potently inhibits the infection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus [J]. *Plos Pathog*, 2019,15(2):e1007375.

[6] Matoba S, Ogrydziak DM. Another factor besides hydrophobicity can affect signal peptide interaction with signal recognition particle[J]. *J Biol Chem*, 1998,273(30):18841-18847.

[7] Gler-Gane G, Kidd S, Sridharan S, et al. Overcoming the refractory expression of secreted recombinant proteins in mammalian cells through modification of the signal peptide and adjacent amino acids[J]. *Plos One*, 2016,11(5):e155340.

[8] Low KO, Muhammad MN, Md IR. Optimisation of signal peptide for recombinant protein secretion in bacterial hosts [J]. *Appl*

[5] Chen Z, Deng X, Fang L, et al. Epidemiological characteristics and transmission dynamics of the outbreak caused by the SARS-CoV-2 Omicron variant in Shanghai, China: A descriptive study [J]. *Lancet Reg Health West Pac*, 2022,29:100592.

[6] Li F, Liang Z, Cui S, et al. Importation of SARS-CoV-2 Omicron variant in Beijing, China [J]. *Biosaf Health*, 2022,4(3):150-153.

[7] Yuan M, Wu NC, Zhu X, et al. A highly conserved cryptic epitope in the receptor binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV [J]. *Science*, 2020,368(6491):630-633.

[8] Lan J, Ge J, Yu J, et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor [J]. *Nature*, 2020,581(7807):215-220.

[9] Zhang BZ, Hu YF, Chen LL, et al. Mining of epitopes on spike protein of SARS-CoV-2 from COVID-19 patients [J]. *Cell Res*, 2020,30(8):702-704.

[10] Hussain A, Hasan A, Nejadi Babadaei MM, et al. Targeting SARS-CoV2 spike protein receptor binding domain by therapeutic antibodies [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020(130):110559.

[11] Chen J, Wang R, Gilby NB, et al. Omicron Variant (B. 1. 1. 529): Infectivity, Vaccine Breakthrough, and Antibody Resistance [J]. *J Chem Inf Model*, 2022,62(2):412-422.

[12] Garcia-Beltran WF, Lam EC, St Denis K, et al. Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity [J]. *Cell*, 2021,184(9):2372-2383.

[13] Gan HH, Zinno J, Piano F, et al. Omicron Spike protein has a positive electrostatic surface that promotes ACE2 recognition and antibody escape [J]. *Bio Rxiv*, 2022.02.13.480261.

【收稿日期】 2022-09-20 【修回日期】 2022-12-01

Microbiol Biotechnol, 2013,97(9):3811-3826.

[9] 陈瑞峰, 黄维金, 吴佳静, 等. 发热伴血小板减少综合征病毒不同基因型和变异株的中和特性分析 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2020,40(8):607-615.

[10] Qiao YY, Man L, Qiu Z, et al. Isolation and characterization of a novel neutralizing antibody targeting the CD4-binding site of HIV-1 gp120 [J]. *Antiviral Res*, 2016,132:252-261.

[11] 马婷, 孙继民, 施旭光, 等. 发热伴血小板减少综合征流行病学研究进展 [J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2015,26(3):327-329.

[12] Huang X, Li J, Li A, et al. Epidemiological characteristics of severe fever with thrombocytopenia syndrome from 2010 to 2019 in Mainland China [J]. *Int J Env Res Pub He*, 2021,18(6):3092.

[13] 李佳宸, 王玉娜, 赵静, 等. 发热伴血小板减少综合征流行病学研究进展 [J]. *中华流行病学杂志*, 2021,42(12):2226-2233.

[14] 曹卫友, 王欣, 刘硕, 等. 发热伴血小板减少综合征患者血清内抗体 IgG 中和活性及其影响因素分析 [J]. *病毒学报*, 2022,38(1):123-128.

[15] Celinska E, Borkowska M, Bialas W, et al. Robust signal peptides for protein secretion in *Yarrowia lipolytica*: identification and characterization of novel secretory tags [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2018,102(12):5221-5233.

[16] Zhao Z, Zheng W, Yan L, et al. Recombinant human adenovirus type 5 Co-expressing RABV G and SFTSV Gn induces protective immunity against rabies virus and severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in mice [J]. *Front Microbiol*, 2020(11):1473.

【收稿日期】 2022-08-02 【修回日期】 2022-10-25