

## 新型冠状病毒 S 蛋白 RBD 的 糖基化及其长度对蛋白疫苗免疫原性的影响

张 婷, 王志荣, 许雪梅\*

(中国医学科学院基础医学研究所 北京协和医学院基础学院 生物物理及结构生物学系, 北京 100005)

**摘要:**目的 分析去糖基化及片段长度对新型冠状病毒(SARS-CoV-2)受体结合结构域(RBD)三聚体蛋白免疫原性的影响。方法 以 SARS-CoV-2 S 蛋白的 RBD 为基础,分别突变敲除长度为 220 个氨基酸的 RBD(aa. 331-550)中的 3 个 N-糖基化残基(N331、N343、N360),并分别在 C 端融合三聚化结构域,利用杆状病毒-昆虫细胞表达 3 个去糖基化的三聚体蛋白(RBDT-N1、RBDT-N2、RBDT-N3);同时构建表达 2 种糖基化位点不变的三聚体蛋白,即去糖基化蛋白的野生型对照 RBDT 和长度为 273 个氨基酸的 RBDST(aa. 319-591)。Western blot 比较蛋白表达水平,亲和层析纯化后免疫小鼠,分析血清中 RBD 特异性 IgG 及 SARS-CoV-2 假病毒中和抗体水平。结果 RBDT-N1、RBDT-N2 及 RBDT-N3 的表达水平均较 RBDT 显著提高,3 种去糖基化蛋白诱发的特异性 IgG 及假病毒中和抗体水平均与 RBDT 的相当;RBDST 诱发的特异性 IgG 抗体及假病毒中和抗体滴度较 RBDT 的显著提高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结论 去除 RBD 的 N-糖基化残基及适当延长 RBD 旁侧序列有利于提高 RBD 蛋白疫苗的表达水平及免疫原性,研究结果为以 RBD 为基础的 SARS-CoV-2 疫苗的研发策略提供了参考。

**关键词:** 新型冠状病毒;受体结合结构域;糖基化

中图分类号:R392 文献标志码:A

## Impact of glycosylation and length of RBD of SARS-CoV-2 S protein on the immunogenicity of RBD protein vaccines

ZHANG Ting, WANG Zhi-rong, XU Xue-mei\*

(Department of Biophysics and Structural Biology, Institute of Basic Medical Sciences CAMS,  
School of Basic Medicine PUMC, Beijing 100005, China)

**Abstract: Objective** To analyze the impact of deglycosylation and length of RBD of SARS-CoV-2 S protein on the immunogenicity. **Methods** Based on the RBD of the SARS-CoV-2 S protein, three N-glycosylated residues (N331, N343, N360) in the 220 amino acid RBD (aa. 331-550) were respectively mutated, and trimerization domains were fused at the C-terminus of resulted peptides. The resulted deglycosylated trimer proteins (RBDT-N1, RBDT-N2, RBDT-N3) were expressed in baculovirus-insect cell expression system. The wild-type control of deglycosylated proteins (RBDT) and RBDST (aa. 319-591) with a length of 273 amino acids were also constructed. The expression levels were analyzed by Western blot. Proteins were purified by affinity chromatography. Mice were immunized, and the sera were subjected to analysis of RBD-specific IgG and neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 pseudovirus. **Results** Deglycosylation increased the expression level of RBD trimers in insect cells. RBDT

收稿日期:2020-09-18 修回日期:2020-10-23

基金项目:中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2020-I2M-2-014;2016-I2M-3-026)

\*通信作者(corresponding author): xuemeixu@vip.sina.com; xuemeixu@ibms.pumc.edu.cn

and three deglycosylated proteins (RBDT-N1, RBDT-N2, RBDT-N3) induced similar level of RBD-specific IgG and SARS-CoV-2 pseudovirus neutralization titers. *RBDST* induced high titers of RBD-specific IgG and neutralizing antibodies, which were both significantly higher than that induced by RBDT ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusions** The results suggest that removing the N-glycosylation residues of RBD and extending the RBD flanking sequence are beneficial to increase the expression and immunogenicity of the RBD protein vaccine. The research provides a useful reference for the development strategy of RBD-based SARS-CoV-2 vaccines.

**Key words:** SARS-CoV-2; receptor binding domain; glycosylation

鉴于目前尚无新型冠状病毒 (severe acute respiratory coronavirus 2, SARS-CoV-2) 特效治疗药物, 疫苗是控制 SARS-CoV-2 大流行的关键措施。目前已有多种不同形式的疫苗进入临床试验<sup>[1]</sup>, 包括灭活疫苗、病毒载体疫苗、核酸疫苗及蛋白疫苗, 其中蛋白疫苗诱发产生的中和抗体水平较高<sup>[2]</sup>。迄今上市的采用非传统技术生产的疫苗均为蛋白疫苗, 如乙型肝炎病毒样颗粒 (virus-like particle, VLP) 疫苗、HPV VLP 疫苗、带状疱疹病毒糖蛋白疫苗及流感蛋白疫苗, 该类疫苗安全性好, 且在诱发中和抗体方面具有优势。

SARS-CoV-2 为有包膜的正链 RNA 病毒, 与 SARS-CoV 及中东呼吸道综合征冠状病毒 (Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV) 同属冠状病毒  $\beta$  属, 均可诱发急性呼吸系统综合征, 其中 SARS-CoV-2 和 SARS-CoV 的同源性很高<sup>[3]</sup>。病毒有 4 种结构蛋白 (S、M、N、E), 其中 S 蛋白是感染入侵的关键蛋白, 以三聚体形式分布在包膜表面, 其 N 端含有细胞受体结合域 (receptor binding domain, RBD), 是冠状病毒疫苗研究的主要靶抗原<sup>[4]</sup>。RBD 与宿主细胞的血管紧张素转化酶 2 (angiotensin converting enzyme 2, ACE2) 结合后, S 蛋白发生变构, 启动病毒感染入侵<sup>[5-6]</sup>。SARS-CoV-2 的 S 蛋白高度糖基化, 其 RBD 中至少有 4 个潜在糖基化位点<sup>[7]</sup>。目前, SARS-CoV-2 的 S 蛋白糖基化水平对其免疫原性的影响尚不清楚。

SARS-CoV 的病毒学及疫苗学研究为 SARS-CoV-2 疫苗的研发提供了有力的技术支持。首先, 研究发现, 与 SARS-CoV 一样, SARS-CoV-2 的 S 蛋白融合前状态的维持也有利于 RBD 依赖的中和抗体的诱发。目前, 进入临床试验的以 S 全长蛋白为基础的 S 蛋白不同形式 SARS-CoV-2 疫苗均采用可保持融合前状态的 S 蛋白突变体基因 (S-2P)<sup>[2,8]</sup>, 即将

aa. 986-987 置换为 2 个脯氨酸。其次, SARS-CoV 的研究发现, 单独表达 RBD 片段也可诱发高滴度的中和抗体和保护反应<sup>[9-10]</sup>, 且不受 S 蛋白融合前状态的限制。与全长 S 蛋白相比, RBD 片段的长度适中, 易于改造和在多种不同表达体系进行高水平的表达及纯化。目前分离了多种 RBD 依赖的中和单抗<sup>[11-12]</sup>, 其识别表位是构象依赖的, 表明 RBD 的中和表位具有一定的空间构象, 其旁侧序列对表位构象的维持可能有一定的影响, 目前有关不同长度 RBD 的报道较少。

酵母及 CHO 细胞表达 SARS-CoV 的 RBD (aa. 318-536) 蛋白的研究目前已有报道<sup>[10,13]</sup>, 尚未见在昆虫表达体系的报道。昆虫细胞表达体系具有表达量高、易于悬浮培养、操作简单、表达蛋白的糖基化与哺乳动物接近等优点, 特别适于真核来源的蛋白表达。本研究采用三聚体蛋白疫苗的形式, 利用杆状病毒-昆虫细胞表达体系, 表达获得 3 种不同的去除 N-糖基化残基的 SARS-CoV-2 RBD (aa. 331-550) 蛋白及糖基化位点正常的 2 种不同长度的 RBD 蛋白。结果显示, N-糖基化的去除可提高 RBD 三聚体蛋白在昆虫细胞中的表达水平, 且免疫原性不受影响, 长片段的 RBD 三聚体蛋白的免疫原性比短片段的好。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

293T 细胞 (本实验室保存); Huh-7 细胞 (中国医学科学院基础医学研究所刘力教授惠赠); 草地夜蛾卵巢细胞 Sf9、*E. coli* DH10Bac (Invitrogen 公司); 原核表达的 RBD 蛋白 (中国科技大学金腾川教授惠赠); 含 G 蛋白缺陷骨架的 VSV 病毒 (本实验室构建); pcDNA3.1-hS 质粒 (本实验室构建); His 标签抗体 (OriGene 公司); HisTrapTM HP 预装柱 (GE

公司);氢氧化铝凝胶佐剂、MPL 佐剂(InvivoGen 公司);雌性 Balb/c 小鼠 30 只[斯贝福(北京)生物技术有限公司,合格证号:1103242011001338]。

## 1.2 方法

1.2.1 RBD 融合基因重组穿梭质粒 Bacmid 的构建:在 SARS-CoV-2 S 蛋白序列(GenBank 序列号为 QHD43416.1)氨基酸 319-591 位(aa. 319-591)或氨基酸 331-550 位(aa. 331-550)的 N 端融合杆状病毒包膜糖蛋白 gp64 的信号肽序列(GenBank 序列号为 AIU56980.1, aa. 1-38),C 端融合 T4 噬菌体三聚化结构域(PDB 序列号为 1AVY\_A, aa. 45-71),并在下游进一步融合 His 标签序列(8 个组氨酸),分别获得长片段的 RBDST 融合蛋白及短片段的 RBDT 融合蛋白。在 RBDT 的基础上,删除 N331 氨基酸,获得 RBDT-N1 融合蛋白;进行 N343S 突变,获得 RBDT-N2 融合蛋白;进行 N360A 突变,获得 RBDT-N3 融合蛋白。根据 Sf9 偏性密码子对上述 RBD 蛋白的基因序列进行优化,合成获得的 RBD 融合基因分别插入 pFastBac1 载体,转化 DH10Bac 感受态,PCR 鉴定获得重组 Bacmid,提取备用。

1.2.2 RBD 蛋白的表达及鉴定:将携带 RBD 融合基因的重组 Bacmid 转染 Sf9 细胞,构建重组杆状病毒,感染 Sf9 细胞后(MOI=0.1),27 °C 培养约 88 h,离心收集培养上清。12% SDS-PAGE 及 Western blot 分析培养上清中的 RBD 蛋白表达情况。一抗为 His 标签抗体,二抗为 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG。

1.2.3 RBD 蛋白的纯化:表达不同 RBD 融合蛋白的培养上清在 PBS 中 4 °C 透析 24 h,经 HisTrap™ HP 亲和层析纯化,按 GE 公司说明书中提供的纯化方案纯化融合蛋白。

1.2.4 小鼠免疫:4~6 周雌性 Balb/c 小鼠 5 只/组,RBD 融合蛋白抗原 10 μg/剂,联合 50 μg/剂的氢氧化铝佐剂及 5 μg/剂的 MPL 佐剂,于第 0、3、6 周皮下免疫,设 PBS 免疫小鼠为对照组,于第 5、8 周尾静脉采集血清。

1.2.5 ELISA 检测血清中 RBD 特异性 IgG 抗体水平:用 PBS 将原核表达的 RBD 蛋白稀释至 1 μg/mL,包被 96 孔板(100 μL/孔);使用 5% BSA 封闭(200 μL/孔);用 PBS 倍比稀释待测血清,加入 96 孔板,4 °C 孵育过夜;加入 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG(1:3 000),37 °C 孵育 1 h;OPD 底

物显色(100 μL/孔),37 °C 反应 5 min;2 mol/L 硫酸(50 μL/孔)终止反应;检测  $A_{490}$ 。 $A_{490}$  数值大于 0.2 且大于阴性对照 2 倍的最大血清稀释度视为特异性 IgG 抗体滴度。

1.2.6 假病毒的制备:制备方法如文献所述<sup>[14]</sup>,使用 S 蛋白表达质粒 pcDNA3.1-hS 转染 293T 细胞,37 °C 培养 24 h 后,用含 G 蛋白缺陷骨架的 VSV 病毒感染细胞(MOI=4),37 °C 培养 48 h。收集培养上清,检测假病毒的滴度。

1.2.7 假病毒中和实验:如文献所述<sup>[14]</sup>,使用 DMEM 完全培养基稀释假病毒,将稀释后的假病毒与倍比稀释的待测血清等体积混合,4 °C 孵育 1 h,然后加入预先铺好的 Huh-7 细胞中( $2 \times 10^4$  个/100 μL/孔,MOI=0.05)。37 °C 孵育 24 h,使用流式细胞仪检测各孔细胞的感染抑制率。感染抑制率=(1-待测血清样品中的荧光细胞百分数/阴性对照样品中的荧光细胞百分数)×100%。感染抑制率大于 50%的最高稀释倍数即为中和抗体滴度。

## 1.3 统计学分析

使用 Graphpad 软件分析实验数据并作图,ELISA 抗体及中和抗体水平以平均滴度(GMT)±SD 表示。

## 2 结果

### 2.1 RBD 蛋白的表达鉴定

取等体积(60 μL)相同表达条件的各种 RBD 蛋白的表达上清进行 12% SDS-PAGE 及 Western blot 分析。结果显示,5 种 RBD 蛋白均可在 Sf9 细胞中分泌表达,其中 RBDST 的分子质量约 40 ku(图 1,泳道 1),其余 4 种 RBD 蛋白的分子质量约 37 ku(图 1,泳道 2-5),上述 5 种 RBD 蛋白的表观分子质量均大于理论值,提示 RBD 蛋白在昆虫细胞中表达时发生了糖基化。值得注意的是,3 种去糖基化的蛋白 RBDT-N1、RBDT-N2 及 RBDT-N3 的表达水平均高于 RBDT(图 1,泳道 2-5),提示糖基化的去除可提高 RBD 蛋白在昆虫细胞中的表达水平。

### 2.2 去糖基化的 RBD 蛋白免疫血清 RBD 特异性 IgG 水平分析

为明确去糖基化对 RBD 蛋白免疫活性的影响,本研究比较了 RBDT 与 3 种去糖基化蛋白 RBDT-N1、RBDT-N2 及 RBDT-N3 诱发的 RBD 特异性 IgG

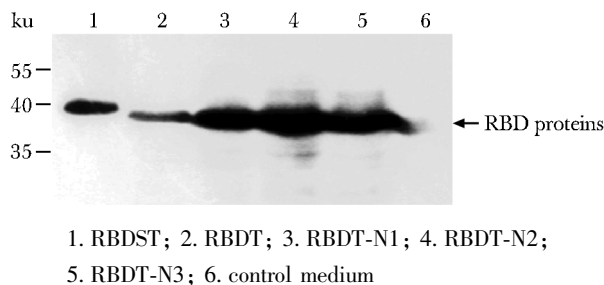


图1 Western blot 分析 Sf9 表达上清中的 RBD 蛋白

Fig 1 Western blot analysis of RBD proteins in the culture media of Sf9 cells

水平。结果显示,2次免疫后各组的 RBD 特异性 IgG 滴度在 320~560,3次免疫后各组的特异性 IgG 滴度在 6 400~11 200,组间均无统计学差异(图2)。PBS 对照组未检测到 RBD 特异性 IgG。

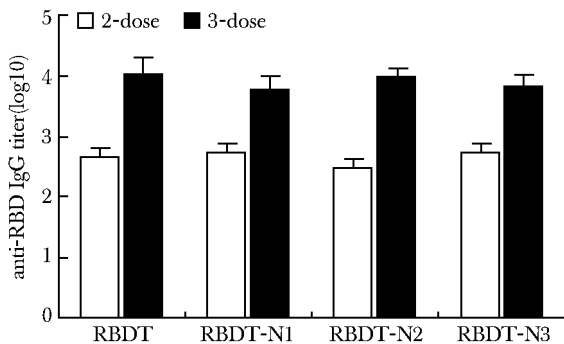


图2 糖基化不同的 RBD 蛋白诱发的血清特异性 IgG 抗体水平分析

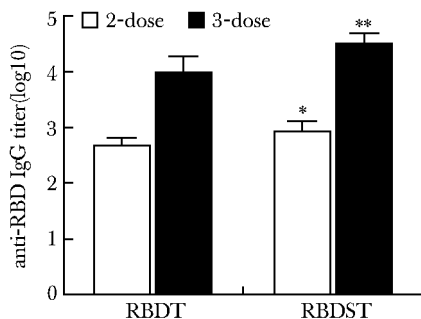
Fig 2 Analysis of RBD-specific IgG titers induced by RBD proteins with different glycosylation patterns ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

### 2.3 不同长度的 RBD 蛋白免疫血清 RBD 特异性 IgG 水平分析

为明确片段长度对 RBD 蛋白免疫活性的影响,本研究比较了较短的 RBDT 与较长的 RBDST 诱发的 RBD 特异性 IgG 抗体水平。结果显示,2次免疫及 3次免疫后,RBDST 诱发的特异性 IgG 滴度分别为 880 和 33 280,均显著高于 RBDT 免疫组 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )(图3)。

### 2.4 RBD 蛋白免疫血清中和抗体水平分析

本研究采用 VSV 骨架的 SARS-CoV-2 假病毒检测各组 RBD 蛋白 3次免疫后的血清中和抗体水平。结果显示,RBDST 诱发的中和抗体滴度最高,显著高于 RBDT ( $P < 0.01$ ) 及 3种去糖基化的 RBD 蛋白

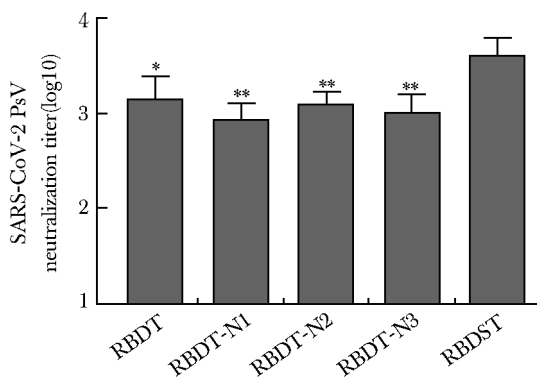


\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with RBDT group

图3 不同长度的 RBD 蛋白诱发的血清特异性 IgG 抗体水平分析

Fig 3 Analysis of RBD-specific IgG titers induced by RBD proteins with different length ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

( $P < 0.001$ ) 诱发的中和抗体(图4)。



\* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.001$  compared with RBDST group

图4 RBD 蛋白诱发的 SARS-CoV-2 假病毒中和抗体分析

Fig 4 Analysis of SARS-CoV-2 pseudovirus neutralization titers induced by RBD proteins ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

## 3 讨论

杆状病毒-昆虫细胞表达体系具有表达水平高、安全性好、易于操作等优点。目前利用该体系生产获批上市的疫苗有 HPV VLP 疫苗、甲状腺癌治疗性蛋白疫苗及赛诺菲巴斯德的四价流感蛋白疫苗。研究发现,Sf9 昆虫细胞表达的 SARS-CoV RBD 蛋白(aa. 318-510)诱发的中和抗体滴度显著高于原核表达的<sup>[15]</sup>。本研究采用昆虫细胞表达体系对 RBD(aa. 331-550)的不同糖基化敲除突变体及两种不同长度的 RBD 蛋白进行表达,分析其免疫原性。结果显示,分别去除 N331、N343 和 N360 糖基化均可

提高蛋白在昆虫细胞中的表达水平而不影响其免疫原性。SARS-CoV-2 RBD(aa. 319-545)蛋白糖基化位点分析的结果<sup>[16]</sup>显示, N331、N343 位点位于 RBD 受体结合基序结构的基部, 即这 2 个位点不参与结合 ACE2。本研究的 3 个糖基化位点中, N331 和 N343 为典型的糖基化位点基序(NXT/Y)<sup>[7,17]</sup>, N360 为尚未确认的潜在糖基化位点。本研究获得的 3 个去糖基化的突变体免疫原性没有改变, 可能是由于这些位点不在与 ACE2 结合的基序中。但采用 SARS-CoV-2 假病毒变异株的体外分析显示, N331 突变增加了突变株对康复者血清的敏感性<sup>[18]</sup>, 因此 N331 突变株的抗原性值得深入研究; 另外, 酵母表达的去糖基化的 SARS-CoV RBD 蛋白分析<sup>[13]</sup>显示, 去除 N331 同源的糖基化位点后, 其表达水平显著降低, 免疫血清的中和抗体水平(假病毒中和抗体水平不变, 真病毒中和抗体水平显著提高)有待于进一步分析, 而另 2 个突变体(N343、N360 同源位点去糖基化)的表达极低, 没有深入研究, 这可能是采用的实验评价方法或表达体系不同造成的。本研究还发现, RBD 长片段(aa. 319-591)的免疫原性较短片段(aa. 331-550)的高。结构分析显示, SARS-CoV-2 S 蛋白的 RBD 区为 aa. 319-541 区域, 其中 aa. 437-508 区域为受体结合基序(receptor binding motif, RBM)。在 SARS-CoV 的前期研究中发现, 包含 RBM 的不同长度的 RBD 片段均可诱发中和抗体, 目前 SARS-CoV 报道的 RBD 蛋白有 2 种长度, 即 193 个氨基酸(aa. 318-510)<sup>[9,13]</sup>和 219 个氨基酸(aa. 318-536)<sup>[10,13]</sup>。最近又报道了两种不同长度的 RBD 蛋白疫苗, 分别是长度为 227 个氨基酸的 SARS-CoV-2 RBD(aa. 319-545)蛋白疫苗<sup>[16]</sup>, 及长度为 223 个氨基酸的 RBD(aa. 319-

541)单链二聚体的蛋白疫苗<sup>[19]</sup>。本课题组目前正在进一步比较这些不同长度 RBD 蛋白的免疫原性, 同时进行去糖基化长片段 RBD 的研究。

理想的疫苗需同时诱发体液及细胞免疫反应, 体液免疫的评价主要检测保护性抗体。康复者血清及 S 蛋白依赖的中和抗体的被动免疫试验证明, 中和抗体在阻断病毒感染中起重要作用<sup>[20-22]</sup>。目前新冠疫苗研发免疫活性的指标主要是对抗体水平进行分析, 因此本研究重点分析三聚体蛋白诱发的特异性 IgG 及中和抗体水平。结果显示, RBD 三聚体诱发的 IgG 抗体最高可达 104, 中和抗体水平较 IgG 抗体低 1 个数量级。有文献报道的 SARS-CoV-2 疫苗的 ELISA 抗体滴度较高(可达 105), 但其与假病毒中和抗体滴度的比值也很高(100:1)<sup>[16,19]</sup>, 有些文献报道的 ELISA 滴度相对较低, 但其与假病毒中和抗体的滴度比值较低(约 10:1)<sup>[2]</sup>, 这主要是不同研究采用的试验体系不同造成的, 影响因素主要包括假病毒体系的不同(假病毒的骨架、S 蛋白的密度)、分析用细胞系的不同等。因此, 目前 SARS-CoV-2 疫苗的临床研究中经常用康复者血清的中和抗体滴度作为参照。在本研究基础上, 本课题组将深入系统地优化 RBD 蛋白的结构及组成方式, 进一步筛选产量高、免疫原性强的蛋白疫苗, 届时将全面分析疫苗诱发的细胞免疫、体液免疫及体内保护活性。

总之, 本研究发现, SARS-CoV-2 RBD 去糖基化修饰可提高其在昆虫细胞中的表达水平, 同时又不影响其免疫原性; 较长片段的 RBD 蛋白疫苗(aa. 319-591)免疫活性优于短片段的 RBD 蛋白疫苗。研究结果不仅可用于蛋白疫苗的研究, 也可用于基于 RBD 蛋白抗原的病毒载体疫苗及核酸疫苗。

## 参考文献:

- [1] Kaur SP, Gupta V. COVID-19 vaccine: a comprehensive status report[J]. *Virus Res*, 2020, 288:198114. doi: 10.1016/j.virusres.2020.198114.
- [2] Keech C, Albert G, Cho I, *et al.* Phase 1-2 trial of a SARS-CoV-2 recombinant spike protein nanoparticle vaccine[J]. *N Engl J Med*, 2020. doi: 10.1056/NEJ-Moa2026920.
- [3] Xu J, Zhao S, Teng T, *et al.* Systematic comparison of two animal-to-human transmitted human coronaviruses: SARS-CoV-2 and SARS-CoV[J]. *Viruses*, 2020, 12: 244-260.
- [4] Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, *et al.* Structure, func-

- tion, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein[J]. *Cell*, 2020, 181:281-292.
- [5] 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, 368:630-633.
- [6] Wang Q, Zhang Y, Wu L, *et al.* Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2[J]. *Cell*, 2020, 181:894-904.
- [7] Shajahan A, Supekar NT, Gleinich AS, *et al.* Deducing the N- and O-glycosylation profile of the spike protein of novel coronavirus SARS-CoV-2[J]. *Glycobiology*, 2020. doi: 10.1093/glycob/cwaa042.
- [8] Jackson LA, Anderson EJ, Roupael NG, *et al.* An mRNA vaccine against SARS-CoV-2 - preliminary report[J]. *N Engl J Med*, 2020. doi: 10.1056/NEJMoa2022483.
- [9] Wong SK, Li W, Moore MJ, *et al.* A 193-amino acid fragment of the SARS coronavirus S protein efficiently binds angiotensin-converting enzyme 2[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279:3197-3201.
- [10] Du L, Zhao G, Chan CC, *et al.* A 219-mer CHO-expressing receptor-binding domain of SARS-CoV S protein induces potent immune responses and protective immunity[J]. *Viral Immunol*, 2010, 23:211-219.
- [11] Wang C, Li W, Drabek D, *et al.* A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection [J]. *Nat Commun*, 2020, 11:1-6.
- [12] Jiang S, Hillyer C, Du L. Neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 and other human coronaviruses[J]. *Trends Immunol*, 2020, 41:355-359.
- [13] Chen WH, Du L, Chag SM, *et al.* Yeast-expressed recombinant protein of the receptor-binding domain in SARS-CoV spike protein with deglycosylated forms as a SARS vaccine candidate[J]. *Hum Vaccines Immunother*, 2014, 10:648-658.
- [14] 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, 9:680-686.
- [15] Du L, Zhao G, Chan CCS, *et al.* Recombinant receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein expressed in mammalian, insect and E. coli cells elicits potent neutralizing antibody and protective immunity [J]. *Virology*, 2009, 393:144-150.
- [16] Yang J, Wang W, Chen Z, *et al.* A vaccine targeting the RBD of the S protein of SARS-CoV-2 induces protective immunity[J]. *Nature*, 2020. doi: 10.1038/s41586-020-2599-8.
- [17] Watanabe Y, Allen JD, Wrapp D, *et al.* Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike [J]. *Science*, 2020, 369:330-333.
- [18] Li Q, Wu J, Nie J, *et al.* The impact of mutations in SARS-CoV-2 spike on viral infectivity and antigenicity [J]. *Cell*, 2020, 182:1284-1294.
- [19] Dai L, Zheng T, Xu K, *et al.* A universal design of beta-coronavirus vaccines against COVID-19, MERS, and SARS[J]. *Cell*, 2020, 182:722-733.
- [20] Shen C, Wang Z, Zhao F, *et al.* Treatment of 5 critically ill patients with COVID-19 with convalescent plasma[J]. *JAMA*, 2020, 323:1582-1589.
- [21] Pooladanda V, Thatikonda S, Godugu C. The current understanding and potential therapeutic options to combat COVID-19[J]. *Life Sci*, 2020, 254:117765. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117765.
- [22] Zost SJ, Gilchuk P, Case JB, *et al.* Potently neutralizing and protective human antibodies against SARS-CoV-2[J]. *Nature*, 2020, 584:443-449.