

## 研究论文

## 新型冠状病毒抗原表位及其特异性T细胞的筛选

戴春烨 许雯珺 刘凌峰\*

(复旦大学生命科学学院, 上海 200438)

**摘要** 该文利用MHC四聚体技术从接种新冠疫苗人群体内筛选出SARS-CoV-2特异性T细胞。该实验针对中国人群最为常见的HLA-A\*0201分型, 通过IEDB、SYFPEITHI和NetMHCpan4.0等生物信息学方法预测新冠病毒S蛋白抗原肽, 并结合UV-置换抗原肽实验验证, 确定了7个9肽抗原肽, 分别是S538、S976、S996、S1060、S1185、S1192和S1220, 其中S1220的亲合性最高, S538的亲合性最低。接着利用MHC四聚体技术合成了除S538外的6种HLA-A\*0201限制性S蛋白特异性四聚体, 并在接种疫苗的HLA-A\*0201人群PBMCs中筛出了其特异性的T细胞。这证明了接种新冠疫苗的HLA-A\*0201人群体内确实存在针对SARS-CoV-2的细胞免疫反应, 同时发现不同个体对SARS-CoV-2不同抗原肽免疫反应产生的特异性T细胞在数量和频率上存在差异性, 为后续研究新冠疫苗引起的细胞免疫作了铺垫。

**关键词** SARS-CoV-2; S蛋白; 抗原肽; MHC四聚体; T细胞

## The Screening of SARS-CoV-2 Epitopes and Their Specific T Cells

DAI Chunye, XU Wenjue, LIU Lingfeng\*

(School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China)

**Abstract** In this study, SARS-CoV-2-specific T cells were screened from COVID-19 vaccinated humans by MHC tetramer technology. In this experiment, aiming at the most common HLA-A\*0201 typing in the Chinese population, seven SARS-CoV-2 spike antigen peptides were identified through the prediction of bioinformatics methods such as IEDB, SYFPEITHI and NetMHCpan4.0 combined with the experimental test of UV-substituted antigenic peptides. The 9-peptide antigenic peptides of the protein are S538, S976, S996, S1060, S1185, S1192 and S1220, of which S1220 has the highest affinity and S538 has the lowest affinity. Six HLA-A\*0201-restricted S protein-specific tetramers except S538 were synthesized by MHC tetramer technology, and their specific T tetramers were screened in vaccinated HLA-A\*0201 population PBMCs cell. It is proved that there is indeed a cellular immune response against SARS-CoV-2 in the HLA-A\*0201 population vaccinated against SARS-CoV-2. At the same time, it is found that the specific T cells produced by different individuals in the immune response to different antigenic peptides of SARS-CoV-2 vary in number and size. There are differences in frequency, paving the way for subsequent research on cellular immunity caused by the new crown vaccine.

**Keywords** SARS-CoV-2; spike protein; antigenic peptides; MHC tetramers; T cells

收稿日期: 2022-04-20

接受日期: 2022-05-30

国家自然科学基金面上项目(批准号: KRH1322722)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 18261324645, E-mail: lingfengliu@fudan.edu.cn

Received: April 20, 2022

Accepted: May 30, 2022

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. KRH1322722)

\*Corresponding author. Tel: +86-18261324645, E-mail: lingfengliu@fudan.edu.cn

2019年末新冠疫情爆发,截至2022年3月,共造成4.45亿人感染,600多万人死亡,对全球的健康和经济造成了持久且深远的影响<sup>[1]</sup>。引发疫情的罪魁祸首:SARS-CoV-2,属于冠状病毒科,巢病毒目,冠状病毒属<sup>[2]</sup>,在电子显微镜下观察其外表呈现出一种冠状<sup>[3]</sup>、多形性等特征,大小为80~160 nm,且高度突变<sup>[4]</sup>。它与目前已知的SARS-CoV和MERS-CoV属于同一种系<sup>[5]</sup>,均为正链RNA病毒。SARS-CoV-2由16种非结构蛋白(NSP1-16)、7种辅助蛋白(ORF3a-ORF8)和4种结构蛋白[刺突糖蛋白(spike, S蛋白)、包膜糖蛋白(envelope, E蛋白)、囊膜糖蛋白(membrane, M蛋白)、核衣壳蛋白(nucleocapsid, N蛋白)]组成<sup>[6]</sup>,其中非结构蛋白的主要功能是编码相关的RNA聚合酶、解旋酶等,以及一些复制需要的成分等<sup>[7]</sup>,而辅助蛋白的功能并不是很清晰<sup>[8]</sup>。S蛋白的功能对于宿主细胞的融合起到了非常关键的作用<sup>[9]</sup>,因此被广泛用于疫苗和新冠药物开发的靶点。

CD8<sup>+</sup>T细胞在免疫应答中发挥着许多重要作用,包括在感染病毒、接种疫苗或免疫治疗期间,识别并筛选出特定抗原表位的T细胞<sup>[10]</sup>有助于研究相关病毒的致病机制或者研究疫苗的有效成分等<sup>[11]</sup>。1996年,ALTMAN等<sup>[12]</sup>合成了特异性的抗原肽-MHC多聚体,当用荧光标记这种多聚体时,可以通过流式分析或者分选证明这种特异性的抗原肽-MHC多聚体可以染色特异性的T细胞。MHC四聚体可以直接用来识别人体中特定的T细胞的数量和频率<sup>[13]</sup>。自此,MHC四聚体技术快速发展,成为了鉴定CD8<sup>+</sup>T细胞的金钥匙。目前针对SARS-CoV-2特异性的CD8<sup>+</sup>T细胞研究正在如火如荼地开展中。在70%新冠恢复期的病人体内,检测出了SARS-CoV-2特异性的CD8<sup>+</sup>T细胞<sup>[14-17]</sup>。

接种新冠疫苗,建立针对SARS-CoV-2的持久免疫记忆是当今面临的一项不可避免的任务<sup>[18]</sup>。随着全球已大范围接种新冠疫苗,接种人群体内会引起强烈的针对SARS-CoV-2的T细胞免疫反应。研究SARS-CoV-2病毒被人类免疫系统如何感知并且对抗的机制是一项难题,目前并没有清晰的解释。为了解SARS-CoV-2在体内引起的免疫反应,需要找出SARS-CoV-2的致病抗原肽部分,并在人体内找到其抗原肽所对应的特异性T细胞,再进行进一步的研究。本研究针对覆盖中国人群最广的HLA基因型:HLA-A\*0201,预测并鉴定出SARS-CoV-2的S蛋白抗

原表位,根据其表位合成特异性MHC-肽四聚体,进而在接种新冠疫苗的人群中寻找体内SARS-CoV-2特异性T细胞并研究其数量和频率。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

抗原肽购于Sango Biotech公司。本实验所用抗体均购于Biolegend公司。pp65 MHC四聚体和新冠特异性MHC四聚体实验采用的PBMCs来源于接种新冠疫苗且为HLA-A\*0201分型的志愿者。AFP<sub>158</sub> MHC四聚体实验采用的T细胞由中山医院捐赠。本文中所有人体实验均通过复旦大学伦理委员会审查,伦理批准号为FE20005。

### 1.2 MHC的合成(50 mL体系)与纯化

100 mL的烧杯于100 °C的水浴锅中加热煮沸10 min,此目的是去除烧杯中的杂菌和蛋白酶等。向烧杯中加入50 mL 4 °C重折叠缓冲液(refolding buffer)[400 mmol/L L-精氨酸单盐酸盐、100 mmol/L Tris-HCl (pH8.3)、2 mmol/L EDTA],加入磁力搅拌子。将烧杯转移至4 °C的磁力搅拌机上。依次加入77 mg 5 mmol/L的还原型谷胱甘肽、15.6 mg 0.5 mmol/L的氧化性谷胱甘肽、终浓度为0.5 mmol/L的PMSF溶液、终浓度为10 μg/mL的抗原肽。待其完全溶解后,逐滴加入0.5 μmol的β<sub>2</sub>M蛋白和1/3的0.25 μmol的HLA-A2.1 α链蛋白。每隔3 h,逐滴分批次加入1/3的0.25 μmol的HLA-A2.1 α链蛋白。保持整个反应体系在磁力搅拌机上进行,环境温度为4 °C。2天后,用内管体积为7.5 mL的30 kDa的超滤管浓缩50 mL的反应体系,每次加入7.5 mL的样品离心,离心参数为4 000 r/min、4 °C、10 min。样品浓缩至500 μL左右后,离心(条件同上)去除样品中的沉淀。使用Superdex 200 increase 10/300GL预装柱在AKTA avant机器上通过分子筛层析进行纯化,根据纯化结果收集MHC。

### 1.3 UV-置换抗原肽实验

用更换缓冲液(exchange buffer)[20 mmol/L Tris-HCl (pH7.0)、150 mmol/L NaCl]将抗原肽溶液稀释至0.8 mg/mL,取12 μL稀释后的抗原肽装在PCR管中备用。避光向新的PCR管中加入15 μL exchange buffer、8.76 μL稀释后的抗原肽以及UV敏感性MHC。打开紫外灯,将混合了待置换的抗原肽和UV敏感性MHC的PCR管置于冰上,在紫外灯下照射15 min或30 min。紫外照射完毕后的PCR管放在37 °C PCR仪

中1 h。从PCR仪中拿出PCR管将其转移至4 °C冰箱中1 h, UV-置换抗原肽实验完成。

#### 1.4 HLA-A2.1 $\alpha$ 链和 $\beta_2$ M在大肠杆菌中表达

将含有HLA-A2.1  $\alpha$ 链质粒和 $\beta_2$ M质粒的*Escherichia coli*分别划线到新的含50  $\mu$ g/mL氯霉素和50  $\mu$ g/mL氨苄青霉素的LB固体培养基上, 再将平板倒置于37 °C培养箱中培养12 h。挑取单克隆HLA-A2.1  $\alpha$ 链和 $\beta_2$ M的*E. coli*接种到10 mL含50  $\mu$ g/mL氯霉素和50  $\mu$ g/mL氨苄青霉素的LB液体培养基中, 于37 °C培养箱、200 r/min过夜培养。挑取部分菌种进行测序, 鉴定其序列是否与HLA-A2  $\alpha$ 链和 $\beta_2$ M序列一致。次日将2管10 mL菌液接种到2瓶100 mL含50  $\mu$ g/mL氯霉素和50  $\mu$ g/mL氨苄青霉素的LB液体培养基中, 于37 °C培养箱、200 r/min培养3 h, 记录D值, 保存部分菌液。3 h后分别将2瓶100 mL菌液接种到2瓶500 mL含50  $\mu$ g/mL氯霉素和50  $\mu$ g/mL氨苄青霉素的LB液体培养基中。当菌液D值为0.5时, 加入1 000 $\times$  1 mol/L的IPTG溶液, 继续培养3 h。4 000 r/min、4 °C离心30 min。去上清, 加入10 mL重悬缓冲液(resuspension buffer)重悬菌体。液氮速冻菌体后, 于-80 °C中保存。

#### 1.5 包涵体纯化HLA-A2.1 $\alpha$ 链和 $\beta_2$ M蛋白

在-80 °C储存的菌体融化后, 加入溶菌酶, 使其终浓度为1 mg/mL, 混合时间为5 min。向菌体中加入Triton X-100, 使其终浓度为1.5%, 室温孵育30 min。冰上超声重悬菌体, 超声机开启5 s, 停止1 s, 重复此操作5 min。直至其黏稠性大幅度降低。此步骤的目的是裂解菌体的细胞膜。向破膜后的菌体中加入30 mmol/L的MgCl<sub>2</sub>、30  $\mu$ g/mL的DNase I, 室温孵育30 min。10 000 r/min、4 °C离心菌体10 min。去上清, 加入20 mL洗涤剂缓冲液(detergent buffer)。冰上超声重悬菌体, 超声机开启5 s, 停止1 s, 重复此操作5 min。去上清, 加入20 mL清洗剂I(wash buffer I)。重复步骤。去上清, 重复该步骤, 直至上清澄清透明后, 加入20 mL wash buffer II。去上清, 此时的包涵体应为白色。加入1.25 $\times$  变性缓冲液(denaturing buffer)(如有必要, 可于超声条件下使蛋白完全溶解于1.25 $\times$  denaturing buffer中), 15 000 r/min、4 °C离心30 min。取上清收集, 测量蛋白浓度。将HLA-A2  $\alpha$ 链蛋白和 $\beta_2$ M蛋白以1  $\mu$ mol/L浓度储存于-80 °C中。

#### 1.6 生物素化pMHC

利用PD-10脱盐柱对MHC进行置换缓冲液

(10 mmol/L Tris-HCl, pH8.0)处理, 检测每管中的蛋白浓度, 根据蛋白浓度收集含MHC部分, 目的是使得MHC处于与BirA酶的最佳反应条件。根据溶液中MHC的浓度, 加入相应的BirA酶(Avidity公司)以及其他该反应所需的溶液: 10 $\times$  Biomix-A、10 $\times$  Biomix-B、生物素等。室温反应30 min后, 转移到4 °C储存。由于生物素的分子量仅为220 Da, 因此采用分子筛层析法去除溶液中游离的生物素。根据纯化的结果收集生物素化的MHC, -20 °C短期储存, -80 °C长期储存。

#### 1.7 四聚体化MHC

用内径为500  $\mu$ L的超滤管对生物素化的MHC进行浓缩, 离心参数为12 000 r/min、5 min、4 °C。直至体积浓缩至0.5 mL左右。Nanodrop测量浓缩后的生物素化MHC浓度。按照摩尔质量比链霉亲和素-PE:生物素化的MHC=0.9:4.0, 加入链霉亲和素-PE的量。用锡纸包裹样品管, 在冰上向样品管中加入链霉亲和素-PE, 分10次加入, 每次间隔10 min。确保每个生物素化的MHC都能结合上链霉亲和素-PE。加入MHC合成过程中所用到的抗原肽, 使其终浓度为10  $\mu$ mol/L。加入1 000 $\times$  PMSF溶液和1 000 $\times$  leupeptin抑制剂, 链霉亲和素和生物素是强共价结合, 反应速度很快, 因此整个反应应置于冰上进行。合成好的MHC四聚体于4 °C避光储存。

#### 1.8 流式分析实验

根据实验设计向样品中加入抗体: 抗HLA-A2抗体、抗CD8抗体和pMHC-tetramer-PE。抗HLA-A2抗体每个样品加入2  $\mu$ L/次, 抗CD8抗体每个样品加入1  $\mu$ L/次。pMHC-tetramer-PE稀释在50  $\mu$ L流式buffer中, 使得pMHC-tetramer-PE的浓度为30 nmol/L, 再加40  $\mu$ L混合后的流式buffer至样品中。室温下避光孵育抗体30 min后, 向样品中加入1~2 mL流式buffer, 混匀。1 200 r/min离心样品5 min。去掉大部分上清, 再加入1~2 mL流式buffer, 混匀。重复该步骤, 去掉大部分上清, 将样品过300目细胞筛网, 确保样品为单细胞悬液上机检验样品染色情况, 设置FL1通道对应FITC(HLA-A2)、FL2通道对应PE(tetramer)、FL9通道对应blue(CD8)。

#### 1.9 统计分析

各实验均独立重复3次以上, 使用预测软件IEDB、SYFPEITHI、NetMHCpan 4.0预测SARS-CoV-2抗原肽, 对3种预测软件的结果进行统一。根据HLA分型的不同, 按照亲和性高低排序, 筛选出

SARS-CoV-2 S蛋白平均排名前15以内,且在2个或3个预测软件排名均前10名的多肽。

## 2 结果与分析

### 2.1 生物信息学方法预测SARS-CoV-2抗原表位

使用IEDB、SYFPEITHI、NetMHCpan 4.0等3种数据库预测抗原肽。由于不同预测软件的算法之间存在差异性,导致抗原肽在不同数据库中的排名会有所不同。为了寻找出预测的最佳抗原肽,对3种数据库得到的预测抗原表排名进行权重处理。结果如表1所示,3种HLA分型针对S蛋白的抗原肽没有完全重叠的氨基酸序列,这反映出不同HLA分型对SARS-CoV-2起免疫原性的抗原肽差异性极大,故SARS-CoV-2的免疫原性研究需要根据不同HLA分型来进行。

### 2.2 UV-置换抗原肽实验验证SARS-CoV-2预测表位的亲和性

为了进一步确定SARS-CoV-2 S蛋白预测抗原的准确性,选取中国人群最常见的HLA分型:HLA-A\*0201的预测抗原肽进行实验验证。本实验采用UV敏感性多肽(KILGFVJFV,其中J为光不稳定氨基酸)合成MHC,在UV光照下UV敏感性多肽分解,导致HLA-A\*0201的两条链解体,此时如果能与稳定的抗原表位多肽片段重新结合,可形成新MHC复合物。SARS-CoV-2抗原表位多肽与HLA的结合力和稳定性可通过重构MHC复合物的数量和效率来体现,从而筛选出具有较强亲和性的多肽片段。通过

图1可以看到使用AKTA avant仪器进行分子筛层析后,在15 mL处有一个峰值达到100 mAU的峰。UV敏感性MHC的分子量大约在55 kDa处,根据Superdex200 increase 10/300GL说明书提供的数据,15 mL左右处为55 kDa,将此峰对应的溶液收集,初步认定为UV敏感性MHC,体积2 mL,浓度为0.719 mg/mL,因此合成的UV敏感性MHC的总质量为1.438 mg。

MHC复合物的分子量约在55 kDa处,HLA-A2  $\alpha$ 链的分子量大约为34 kDa,  $\beta_2$ M链的分子量大约为12 kDa。对纯化收集的溶液进行Western blot,在55 kDa处有一条明显的条带(图2A),对应MHC复合物;进行SDS-PAGE验证,可观察到在35 kDa附近处有一条带(图2B),10~15 kDa之间有一条带,对应 $\beta_2$ M链,因此鉴定纯化收集的溶液为UV敏感性MHC。两张图的背景干净,证明合成好的UV敏感性MHC纯度很高,适合进行下一步的UV-置换抗原肽的实验。

图3结果证明,高亲和性抗原肽pp65可以成功地置换出被UV光降解的抗原肽,低亲和性抗原肽EBNA3B则不能置换。基于此证明了UV-置换抗原肽模型的可行性。在对HLA-A\*0201分型SARS-CoV-2 S蛋白抗原肽置换实验中,预测排名靠前的4条抗原肽可合成明显的特异性MHC,而S538作为预测亲和性较低的抗原肽并未合成MHC,这与预期结果一致。总体来说,预测软件的结果具有较高的可靠性。通过预测软件和UV-置换实验证明此抗原肽为接下来的SARS-CoV-2特异性MHC的合成提供了

表1 SARS-CoV-2 S蛋白最佳抗原肽预测结果

Table1 Prediction results of SARS-CoV-2 S protein optimal antigenic peptide

肽段排名 Peptides rank	HLA-A*1101		HLA-A*0201		HLA-A*2402	
	起始位点 Start	序列 Sequence	起始位点 Start	序列 Sequence	起始位点 Start	序列 Sequence
	Position		Position		Position	
1	939	SSTASALGK	1 220	FIAGLIAIV	1 208	QYIKWPWYI
2	975	SVLNDILSR	976	VLNDILSR	379	CYGVSPTKL
3	757	GSFCTQLNR	1 192	NLNEGLIDL	1 137	VYDPLQPEL
4	1 020	ASANLAATK	1 060	VVFLHVTYV	635	VYSTGSNVF
5	550	GVLTESNKK	996	LITGRLQSL	448	NYNLYRLF
6	89	GVYFASTEK	1 185	RLNEVAKNL	350	VYAWNKRRI
7	94	STEKSNIR	821	LLFNKVTLA	268	GYLQPRFTL
8	1 065	VTYVPAQEK	1 000	RLQSLQTYV	507	PYRVVLSF
9	370	NSASFSTFK	417	KIADYNYKL	706	AYSNNIAI
10	142	GVYYHKNNK	1 048	HLMSFPQSA	755	QYGSFCTQL

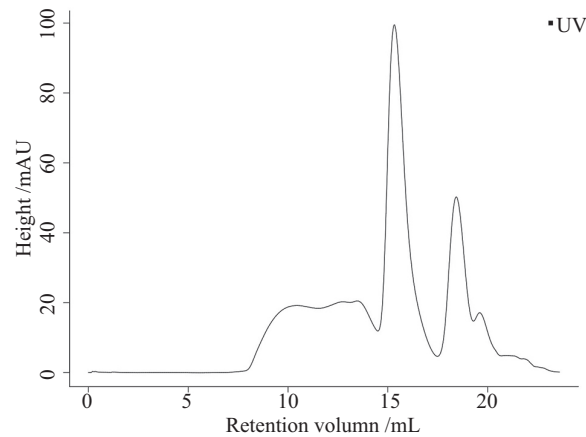
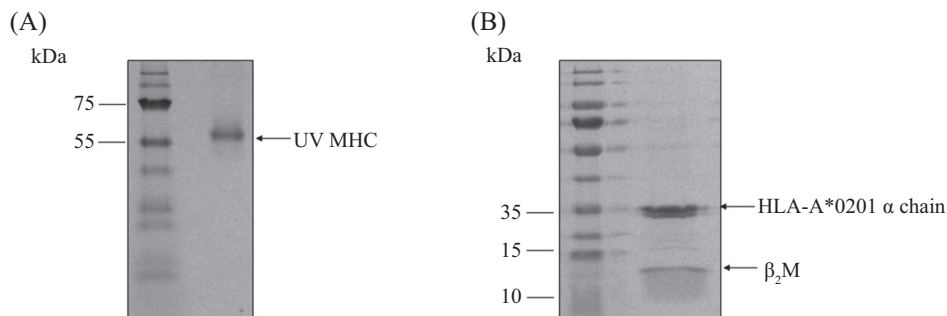


图1 UV敏感性MHC的分子筛层析图

Fig.1 Molecular sieve chromatography of UV-sensitive MHC

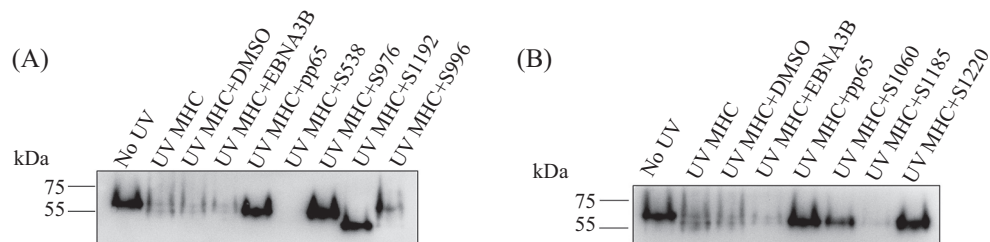


A: UV敏感性MHC的Western blot图, 一抗为抗HLA-A2的抗体, 55 kDa处的条带对应UV敏感性MHC; B: UV敏感性MHC的SDS-PAGE图, 35 kDa处的条带对应HLA-A\*0201的 $\alpha$ 链(36 kDa), 10~15 kDa之间的条带对应 $\beta_2$ M(12 kDa)。

A: the Western blot of UV-sensitive MHC, the primary antibody is anti-HLA-A2 antibody, and the band at 55 kDa corresponds to UV-sensitive MHC; B: SDS-PAGE of UV-sensitive MHC, the band at 35 kDa corresponds to the  $\alpha$  chain (36 kDa) of HLA-A\*0201, and the band between 10-15 kDa corresponds to  $\beta_2$ M (12 kDa).

图2 Western blot和SDS-PAGE鉴定UV敏感性MHC

Fig.2 Western blot and SDS-PAGE identify UV-sensitive MHC



A、B: 经UV照射后置换过抗原肽的MHC Western blot图。图中No UV为未经UV照射的UV敏感性MHC。而UV MHC、UV MHC+DMSO、UV MHC+EBNA3B为阴性对照, UV MHC+pp65为阳性对照。S538、S976、S1192、S996、S1060、S1185、S1220对应的条带为预测的抗原肽置换效果。条带越明显, 置换效果越好, 抗原肽亲和性越高。

A,B: the MHC Western blot images of substituted antigenic peptides after UV irradiation. “No UV” is the UV-sensitive MHC without UV irradiation. While “UV MHC”, “UV MHC+DMSO”, “UV MHC+EBNA3B” were negative controls, and “UV MHC+pp65” is positive control. The bands corresponding to S538, S976, S1192, S996, S1060, S1185, and S1220 were the predicted replacement effects of antigenic peptides. The band were more obvious, displacement effect were better, and the affinity of the antigenic peptides were better.

图3 Western blot检验UV-置换SARS-CoV-2抗原肽的效率

Fig.3 Western blot analysis of the efficiency of UV-replaced SARS-COV-2 antigenic peptides

方向。

### 2.3 分子筛层析纯化SARS-CoV-2特异性MHC

以50 mL refolding buffer[400 mmol/L L-精氨酸单盐酸盐、100 mmol/L Tris-HCl (pH8.3)、2 mmol/L EDTA]体系合成的10种MHC的纯化结果如图4和图5所示, 其中图4作为阳性对照, 分别是AFP<sub>158</sub> MHC、LMP1<sub>125</sub> MHC和pp65 MHC。图5为7种 SARS-CoV-2 S蛋白预测抗原表位合成的MHC, 抗原表位位点分别是S538、S976、S996、S1060、S1185、S1192和S1220。图4中8~14 mL处为蛋白复性过程中的高分子聚合物, 大部分为HLA-A2  $\alpha$ 链蛋白聚集体; 15~16 mL的峰所对应的物质为MHC; 18~19 mL峰所对应的分子量约为30 kDa根据样品中的物质推测为游离的HLA-A2  $\alpha$ 链蛋白。很明显, 图5中S538在15~16 mL处仅一个很小的峰, 这与预测平均排名第141名以及UV置换抗原肽实验中未合成S538 MHC的结

果是一致的。

### 2.4 Western blot验证SARS-CoV-2特异性MHC四聚体

生物素的分子量为220 Da, 远远小于MHC的分子量, 因此可采用分子筛层析去除生物素化后的MHC溶液中游离的生物素。图6可以看出生物素化的MHC出峰位置在15~16 mL处, 生物素化后的MHC峰值远远低于上一步的MHC峰值, 最大的峰值也不超过50 mAU。很明显看到生物素化损耗很大, 效率普遍处于50%以下, 最低甚至只有16.2%。原因与其较为繁琐的实验步骤有关, 其涉及到了2~3次超滤浓缩, 1次过脱盐柱, 1次过分子筛层析。为了得到更多生物素化后的MHC, 这需要最初合成的MHC的量越多越好。

图7结果中除S1185 MHC四聚体外, 都有很明显的条带。相对而言条带都存在拖尾的情况, 其原

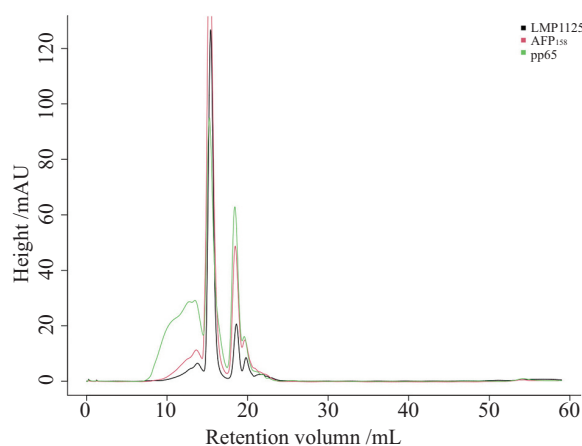


图4 AFP<sub>158</sub>、LMP1<sub>125</sub>和pp65 MHC分子筛层析图

Fig.4 Molecular sieve chromatography of AFP<sub>158</sub>, LMP1<sub>125</sub> and pp65 MHC

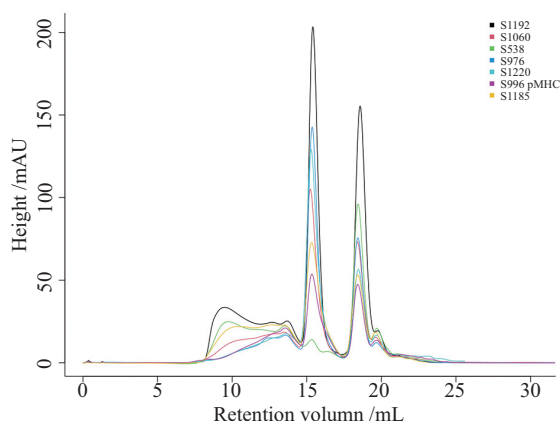


图5 SARS-CoV-2 S蛋白特异性MHC分子筛层析图

Fig.5 Molecular sieve chromatography of SARS-CoV-2 S protein specific MHC

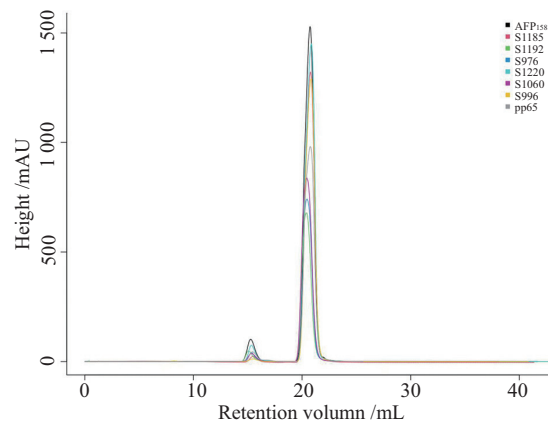
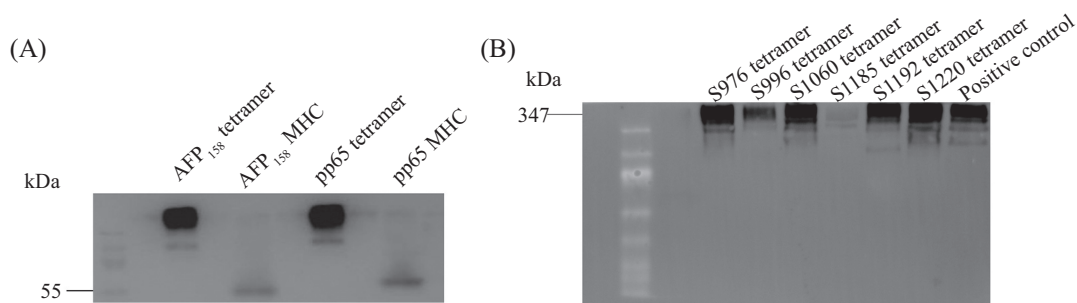


图6 生物素化的MHC分子筛层析图

Fig.6 Molecular sieve chromatography of biotinylated MHC



A: AFP<sub>158</sub> MHC、pp65 MHC和tetramer的Western blot图, AFP<sub>158</sub>和pp65作为阳性对照, MHC和tetramer的条带证明了此文合成MHC四聚体实验的可行性。B: 预测的SARS-CoV-2抗原肽合成的tetramer Western blot图。

A: the Western blot of AFP<sub>158</sub> MHC, pp65 MHC and tetramer. AFP<sub>158</sub> and pp65 were used as positive controls. The bands of MHC and tetramer proved the feasibility of the synthesis of MHC tetramer in this paper. B: Western blot of the predicted SARS-CoV-2 antigenic peptide tetramers.

图7 Western blot验证SARS-CoV-2 S蛋白特异性MHC及其四聚体

Fig.7 Western blot assay proved SARS-COV-2 S protein specific MHC and their tetramers

因一方面是四聚体分子量太大, 在胶中往远距离移动很难; 另一方面就是样品中除了有四聚体外, 还存在三聚体和二聚体等情况。

## 2.5 流式分析SARS-CoV-2特异性T细胞

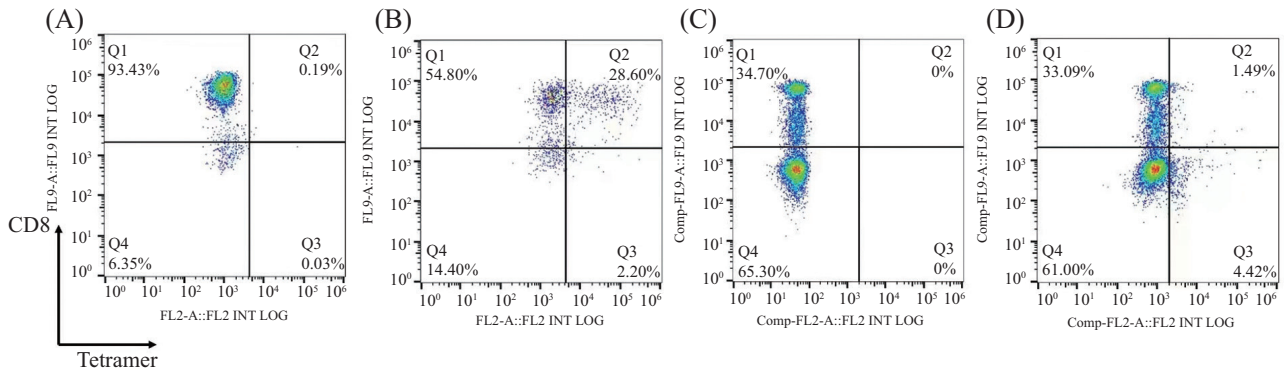
利用 SARS-CoV-2 S蛋白特异性MHC四聚体带有PE荧光染料的性质, 对接种新冠疫苗的HLA-A\*0201人群的PBMCs进行染色, 通过流式分析筛选出SARS-CoV-2特异性的T细胞。作为阴性对照组, 图8A显示能与AFP<sub>158</sub> MHC四聚体相结合的T细胞未被染色; 图8B中可以看到有28.60%的细胞是被AFP<sub>158</sub> MHC四聚体着色的T细胞。图8C作为阴性对照, 图8D证明利pp65 MHC四聚体成功将5.91%的pp65特异性的T细胞染色, 其中1.49%为pp65特异性的CD8<sup>+</sup> T细胞。上述结果证明了AFP<sub>158</sub>和pp65 MHC四聚体具有一定的生物学活性, 这为验证 SARS-

CoV-2 S蛋白特异性四聚体具有生物学活性提供了一定的保障。

图9为直接用MHC四聚体对两名HLA-A\*0201分型的新冠疫苗接种者PBMCs染色的结果。仅在图9C、图9D、图9F和图9H中可以看到明显的阳性染色结果, 其中0.70% S1192 tetramer特异性T细胞着色(图9C), 1.33% S1192 tetramer特异性T细胞着色(图9D), 0.97% S1220 tetramer特异性T细胞着色(图9F), 1.04% S976 tetramer特异性T细胞着色(图9H)。

## 3 讨论

新冠病毒S蛋白在介导SARS-CoV-2感染融合宿主细胞方面发挥关键作用, 因此针对SARS-CoV-2的S蛋白预测的抗原肽更加受到关注。可以利用来源于S蛋白的抗原肽激活体内的细胞毒性T淋巴细胞来

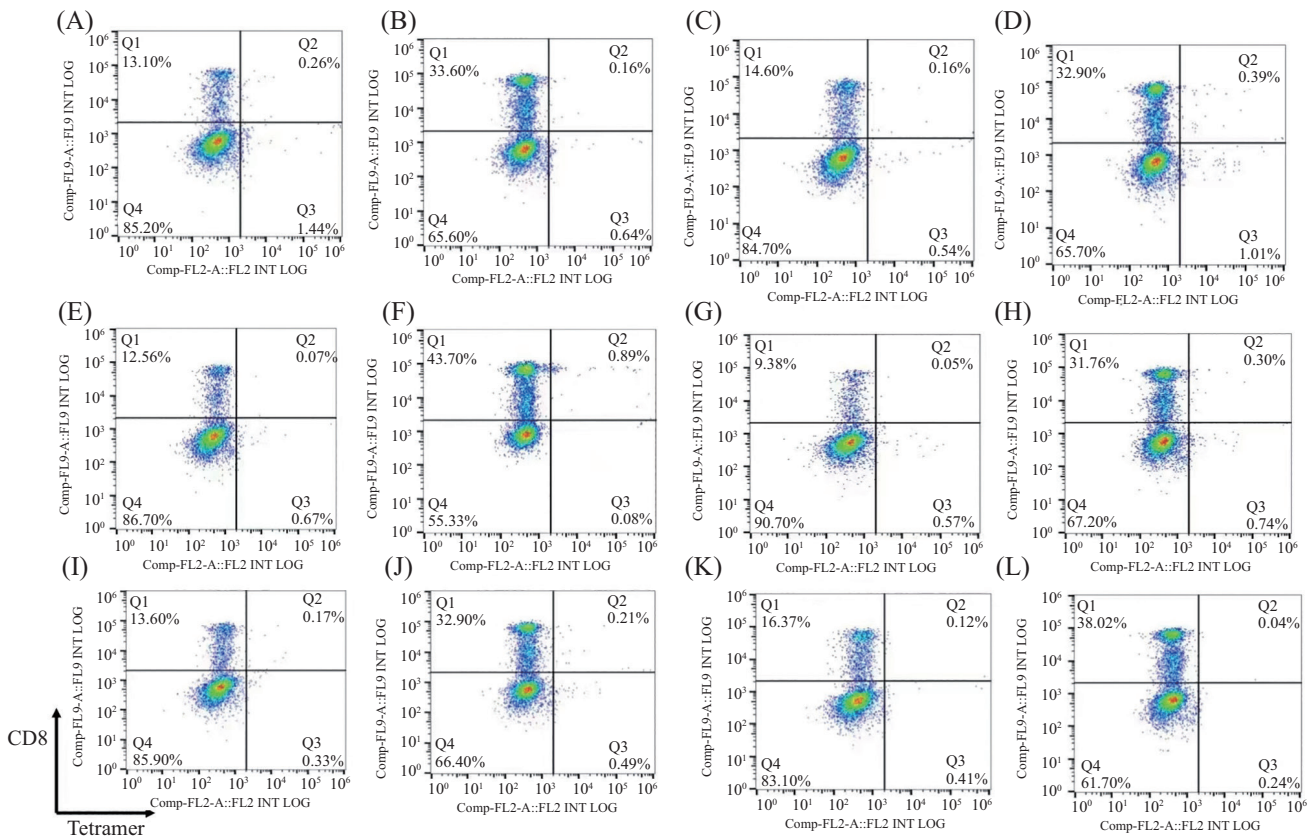


A: 不含AFP<sub>158</sub>抗原肽的T细胞染色结果; B: 针对AFP<sub>158</sub>抗原肽的T细胞染色结果; C: 不加pp65 tetramer的PBMCs的染色结果; D: 加了pp65 tetramer的PBMCs的染色结果。

A: the T cell staining result without AFP<sub>158</sub> antigen peptide; B: the T cell staining result against AFP<sub>158</sub> antigen peptide; C: the staining results of PBMCs without pp65 tetramer; D: the staining results of PBMCs with pp65 tetramer.

图8 AFP<sub>158</sub>和pp65 MHC四聚体染色流式分析结果

Fig.8 AFP158 and pp65 MHC tetramer staining results were analyzed by flow cytometry



A~L: 两位志愿者PBMCs的流式染色结果; A、B: S1185 tetramer染色结果; C、D: S1192 tetramer染色结果; E、F: S1220 tetramer染色结果; G、H: S1060 tetramer染色结果; I、J: S976 tetramer染色结果; K、L: S996 tetramer染色结果。

A~L: flow cytometry staining results of PBMCs from two volunteers. A,B: the staining results of S1185 tetramer; C,D: the staining results of S1192 tetramer; E,F: the staining results of S1220 tetramer; G,H: the staining results of S1060 tetramer; I,J: the staining results of S976 tetramer; K,L: the staining results of S996 tetramer.

图9 SARS-CoV-2 S蛋白特异性MHC四聚体流式分析

Fig.9 SARS-CoV-2 S protein specific MHC tetramer staining results were analyzed by flow cytometry



抵御新冠病毒的侵袭,本实验也正是通过合成S蛋白特异性MHC四聚体来筛选SARS-CoV-2特异性T细胞的。对抗原表位的预测,是寻找抗原特异性CTL最重要的基础。在过去的几十年中,很多免疫表型的研究工作致力于开发能够准确预测抗原表位的算法和模型。最经典的T细胞抗原表位预测软件莫过于IEDB、SYFPEITHI、NetMHCpan 4.0等,它们现在的准确率已高达90%~95%<sup>[19]</sup>。通过这3个预测软件预测出了SARS-CoV-2 S蛋白的抗原表位,在对HLA-A\*0201分型SARS-CoV-2 S蛋白抗原肽UV置换实验中,预测排名靠前的4条抗原肽可合成明显的特异性MHC,而S538作为预测亲和性较低的抗原肽并未合成MHC,这与预期结果一致。总体来说,预测结果具有较高的可靠性。

通过MHC四聚体技术合成了AFP<sub>158</sub> MHC四聚体、pp65 MHC四聚体以及SARS-CoV-2 S蛋白特异性MHC四聚体。AFP<sub>158</sub> MHC四聚体、pp65 MHC四聚体染色流式分析验证了本实验中MHC四聚体整体实验计划的可行性。接着利用预测的SARS-CoV-2抗原表位合成的四聚体,成功在PBMCs中直接筛选出了针对新冠病毒特异性的T细胞,证明了接种新冠疫苗的HLA-A\*0201人群体内存在针对SARS-CoV-2的细胞免疫反应,同时反应出不同个体对SARS-CoV-2免疫反应产生的特异性T细胞在数量和频率上存在差异性。不同志愿者体内染出的特异性T细胞的数量是不固定的,两名志愿者接种疫苗的时间间隔一周,存在个体差异性,导致体内产生的针对SARS-CoV-2的细胞免疫反应强弱有所区别。同时,观察到流式结果中非CD8<sup>+</sup>的T细胞的着色现象,不免考虑到体内还存在CD4<sup>+</sup>等T细胞,而这一部分涉及到体液免疫等,由此可见注射新冠疫苗后体内产生的免疫反应不仅是细胞免疫,而且是启动了人体内全方位的免疫保护机制。

初次感染或免疫接种产生的免疫记忆是之后感染新冠的保护性免疫的来源。虽然目前很多科研人员对免疫记忆的持续时间进行了密集的研究,但仍然无法根据初始效应阶段,对感染或免疫的动力学、持续时间和进化预测<sup>[20]</sup>。感染缓解后短时间点的免疫反应对长期记忆的预测能力不高<sup>[21]</sup>。因此,通常需要评估6个月或更长时间的反应,以确定免疫记忆的持久性<sup>[22]</sup>。本次实验仅仅选取接种新冠疫苗的HLA-A\*0201志愿者,考虑到筛选过程中更多的是其

他HLA分型的人群,如果能够结合不同HLA分型进行分析,那么此项研究将更加具有现实意义。更进一步,按照没有接种、第一次接种、第二次接种、第三次接种等分批次收集志愿者的PBMCs,可以更加明显地体现出SARS-CoV-2引起的T细胞免疫反应变化情况,也更加具有对比性。那又将有助于更好地理解当新冠病毒攻击人体后,细胞免疫是如何发挥作用保护人体的。这对于应对下一次未知的冠状病毒引发新的疫情,以及设计其疫苗和对抗药具有非常重要的参考价值。在经历过SARS和新冠疫情后,如何设计出广谱的冠状病毒疫苗,或许S蛋白是一个重要的突破口。

### 参考文献 (References)

- [1] COLSON P, FOURNIER P E, CHAUDET H, et al. Analysis of SARS-CoV-2 variants from 24,181 patients exemplifies the role of globalization and zoonosis in pandemics [J]. *Frontiers Microbiol*, 2022, 12: 786233.
- [2] PAULES C I, MARSTON H D, FAUCI A S. Coronavirus infections: more than just the common cold [J]. *JAMA*, 2020, 323(8): 707-8.
- [3] KSIAZEK T G, ERDMAN D, GOLDSMITH C S, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome [J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(20): 1953-66.
- [4] SAHIN A R. 2019 novel coronavirus (COVID-19) outbreak: a review of the current literature [J]. *Vacunas*, 2020, 4(1): 1-7.
- [5] GRALINSKI L E, MENACHERY V D. Return of the coronavirus: 2019-nCoV [J]. *Viruses*, 2020, 12(2): 135.
- [6] HILLEN H S, KOKIC G, FARNUNG L, et al. Structure of replicating SARS-CoV-2 polymerase [J]. *Nature*, 2020, 584(7819): 154-6.
- [7] DA SILVA S J R, ALVES DA SILVA C T, MENDES R P G, et al. Role of nonstructural proteins in the pathogenesis of SARS-CoV-2 [J]. *J Med Virol*, 2020, 92(9): 1427-9.
- [8] CHEN L, ZHONG L. Genomics functional analysis and drug screening of SARS-CoV-2 [J]. *Genes Dis*, 2020, 7(4): 542-50.
- [9] LI F. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins [J]. *Annu Rev Virol*, 2016, 3(1): 237-61.
- [10] ORENSTEIN W A, AHMED R. Simply put: vaccination saves lives [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(16): 4031-3.
- [11] LI Y, MARIUZZA R. Structural and biophysical insights into the role of CD4 and CD8 in T cell activation [J]. *Front Immunol*, 2013, 4: 206.
- [12] ALTMAN J D, MOSS P A, GOULDER P J, et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes [J]. *Science*, 1996, 274(5284): 94-6.
- [13] ARTYOMOV M N, LIS M, DEVADAS S, et al. CD4 and CD8 binding to MHC molecules primarily acts to enhance Lck delivery [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(39): 16916-21.
- [14] GRIFONI A, WEISKOPF D, RAMIREZ S I, et al. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals [J]. *Cell*, 2020, 181(7): 1489-501.e15.

- [15] LE BERT N, TAN A T, KUNASEGARAN K, et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls [J]. *Nature*, 2020, 584(7821): 457-62.
- [16] NI L, YE F, CHENG M L, et al. Detection of SARS-CoV-2-specific humoral and cellular immunity in COVID-19 convalescent individuals [J]. *Immunity*, 2020, 52(6): 971-7, e3.
- [17] SEKINE T, PEREZ-POTTI A, RIVERA-BALLESTEROS O, et al. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19 [J]. *Cell*, 2020, 183(1): 158-68, e14.
- [18] POLUEKTOV Y, GEORGE M, DAFTARIAN P, et al. Assessment of SARS-CoV-2 specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell responses using MHC class I and II tetramers [J]. *Vaccine*, 2021, 39(15): 2110-6.
- [19] JURTZ V, PAUL S, ANDREATTA M, et al. NetMHCpan-4.0: improved peptide-MHC class I interaction predictions integrating eluted ligand and peptide binding affinity data [J]. *J Immunol*, 2017, 199(9): 3360-8.
- [20] DAN J M, MATEUS J, KATO Y, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection [J]. *Science*, 2021, 371(6529): eabf4063.
- [21] SALLUSTO F, LANZAVECCHIA A, ARAKI K, et al. From vaccines to memory and back [J]. *Immunity*, 2010, 33(4): 451-63.
- [22] NGUYEN T H O, ROWNTREE L C, PETERSEN J, et al. CD8<sup>+</sup> T cells specific for an immunodominant SARS-CoV-2 nucleocapsid epitope display high naive precursor frequency and TCR promiscuity [J]. *Immunity*, 2021, 54(5): 1066-82, e5.