

参赛队员姓名: 季远峤

中学: 上海市民办包玉刚实验学校

省份: 上海

国家/地区: 中国

指导教师姓名: 徐宏

指导教师单位: 上海交通大学生物医学
工程学院

论文题目: 基于单分子阵列超敏检测技
术的 SARS-CoV-2 灭活疫苗特异性中和
抗体血清转换时间研究

2022 S.-T. Yau High School Science Awards 公示

基于单分子阵列超敏检测技术的 SARS-CoV-2 灭活疫苗特异性中和抗体血清转换时间研究

季远峤

摘要

新型冠状病毒肺炎（COVID-19）威胁全人类生命健康，疫苗是现今人类防御病毒侵犯的有效手段，接种疫苗后特异性中和抗体的产生是激发人体免疫应答的标志。如果能更早期地检测出特异性中和抗体，将对推动人类通过疫苗防御病毒的后续研究意义重大。基于此，本研究引入单分子阵列技术（Simoa），以新型冠状病毒受体结合域（RBD）为探针，开发并优化了一种针对新型冠状病毒特异性中和抗体的超灵敏检测方法。结果表明，所建立的检测方法的检测灵敏度比传统的酶联免疫吸附法（ELISA）高 4~5 个数量级。采用该方法测试 8 位灭活疫苗接种志愿者从疫苗接种前到第二针疫苗接种后两周的时序血清，分析并发现特异性中和抗体 IgG 和 IgM 的血清转换时间分别从 ELISA 方法测得的 21.6 和 20.7 天缩短到 7.5 和 8.6 天。早至一周左右的血清转换时间，不仅为病毒侵犯或疫苗接种后的基础免疫学理论提供了新的认识和实验数据支撑，也为抗体克隆选择学说提供了佐证。同时，本研究所建立的超灵敏检测方法亦可以帮助新冠疫苗研发者更好地评价疫苗免疫效果，对疫苗的后续研发、迭代升级和疫苗接种管理以及疫情防控管理具有一定的现实指导意义。

关键词：新型冠状病毒 灭活疫苗 中和抗体 血清转换时间 单分子阵列超敏检测技术

目录

一、研究背景

- 1.1 新型冠状病毒 SARS-CoV-2 和新冠疫苗概述
- 1.2 抗体克隆选择学说 (clonal selection theory) 概述
- 1.3 血清转换窗口期的作用

二、研究目的

三、研究的理论基础

- 3.1 酶联免疫吸附检测 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)
- 3.2 数字式 ELISA (Digital ELISA)

四、材料与方法

- 4.1 材料与仪器
- 4.2 实验样本设计
- 4.3 磁球偶联 RBD 蛋白的制备与表征
- 4.4 商品化 ELISA 试剂的志愿者时序血清测定
- 4.5 基于 Simoa 检测技术的 SARS-CoV-2 特异性中和抗体超敏检测方法建立与志愿者时序血清测定

五、研究结果

- 5.1 基于商业化 ELISA 试剂的 SARS-CoV-2 特异性中和抗体 (IgG, IgM) 标准曲线的建立
- 5.2 基于 Simoa 检测技术的 SARS-CoV-2 特异性中和抗体 (IgG, IgM) 超灵敏检测方法的建立
- 5.3 基于商业化 ELISA 试剂的新型冠状病毒灭活疫苗特异性中和抗体血清转换时间测定
- 5.4 基于 Simoa 检测技术的新型冠状病毒灭活疫苗特异性中和抗体血清转换时间测定

六、讨论

七、结论与展望

八、参考文献

九、致谢

一、研究背景

1.1 新型冠状病毒 SARS-CoV-2 和新冠疫苗概述

新型冠状病毒肺炎（COVID-19），简称新冠肺炎，是由新型冠状病毒 SARS-CoV-2 感染而引起的肺炎，截至 2022 年 9 月 13 日，全球已有超 6 亿人感染，六百万人死亡，是近百年来全球传播范围最广、影响最大的病毒感染性流行病。SARS-CoV-2 是一种正义单链 RNA 病毒（ssRNA virus）^[1]，正义链进入宿主细胞后在 RNA 依赖的 RNA 聚合酶（RdRp）的作用下进行复制，并利用宿主核糖体翻译蛋白质^[2]。

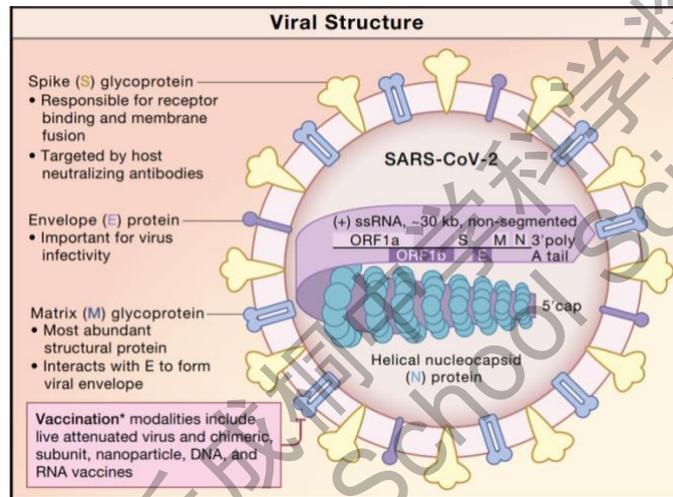


图 1. 新型冠状病毒结构示意图^[3]

SARS-CoV-2 的结构如图 1 所示^[3]，其包膜上存在许多三聚体刺突糖蛋白（S 蛋白，Spike glycoprotein）。S 蛋白是 SARS-CoV-2 进入宿主细胞的重要蛋白：S 蛋白的 S1 亚基中的受体结合结构域（RBD）与人体血管紧张素转换酶 2（ACE2）结合，从而让 SARS-CoV-2 通过细胞膜融合进入宿主细胞^[1]。正是由于 RBD 作为受体结合域，是病毒感染人体进入细胞的关键区域，因此目前的疫苗常常针对 RBD 区域进行设计与开发。

自新冠疫情爆发以来，世界各国都在快速研发与上市针对 SARS-CoV-2 的疫苗，中国更是在全球上市首款灭活疫苗，为全球新冠疫情的防控做出重大的“中国贡献”。目前，已经上市新冠疫苗的种类主要有 mRNA 疫苗，灭活疫苗和蛋白亚单位疫苗等^[4]，而在我国接种最广泛的是北京科兴中维生物技术有限公司和国药集团中国生物北京生物制品研究所研发的灭活疫苗。迄今，我国国民的两针完全免疫接种率超过 80%，灭活疫苗为我国疫情防控以及国民健康做

出重大贡献。所谓灭活疫苗，就是利用化学、物理等方法，使病毒失去在人体生长复制的能力，完全丧失对原来靶器官的致病力，但却能保留相应抗原的免疫原性，接种后刺激体内产生相应可中和病毒的特异性中和抗体，起到防止病毒感染或者降低感染后重症率的作用。以 S 蛋白为抗原的灭活疫苗为例：接种疫苗后，疫苗表面 RBD 表位与 B 淋巴细胞上的抗原受体（BCR）进行特异性结合，刺激 B 淋巴细胞分化为浆细胞分泌特异性中和抗体——免疫球蛋白 M（IgM）和免疫球蛋白 G（IgG）^[5]（图 2）。同时，部分 B 淋巴细胞被诱导在生发中心分化为记忆 B 细胞，记忆 B 细胞在人体中长期存在，当病毒再次入侵人体时，记忆 B 细胞迅速地增殖并分化为浆细胞，进而快速分泌特异性中和抗体，通过二次免疫应答高效地保护人体^[5]。

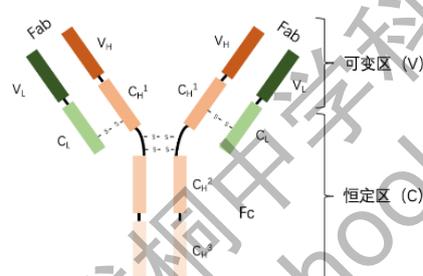


图 2. 中和抗体结构示意图

1.2 抗体克隆选择学说（clonal selection theory）概述

抗体克隆选择学说由澳大利亚免疫学家 F.M.伯内特于 1957 年提出。该学说认为包括人类在内的动物体内，天然存在着许多免疫活性细胞克隆，不同克隆的细胞具有不同的表面受体，能够识别特定病原微生物的蛋白、核酸、多糖等抗原。如图 3 所示，当某种病原微生物侵入人体后，与相应克隆的受体发生结合便会选择性地激活相应的克隆；克隆增殖、分化而产生大量能识别、结合该病原微生物的抗体。

克隆选择学说虽然得到了沙门氏菌鞭毛抗原、荧光抗原实验、尤其是 1975 年由阿根廷学者 C.米尔斯特的单克隆抗体实验的证明，但其具体分子机制等尚未完全揭示。

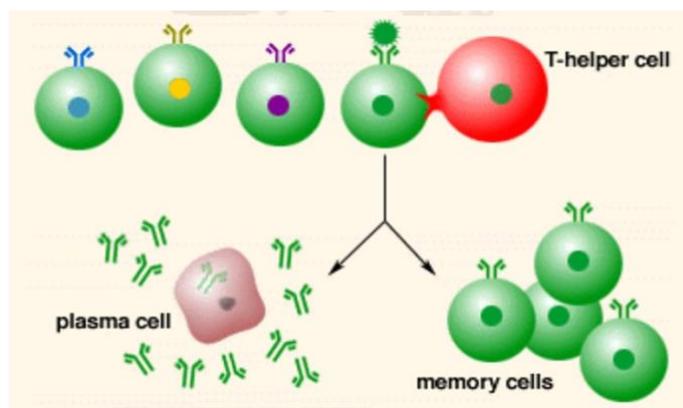


图 3. 抗体克隆选择学说示意图^[6]

1.3 血清转换窗口期的作用

血清转换窗口期是指从感染病毒到血清中可以检测出特异性中和抗体的时间，是评价疫苗功效的重要指标之一。目前大量的研究认为，感染 SARS-CoV-2 后患者的 IgG 和 IgM 的血清转换窗口期中位数时间为出现症状后两周左右；IgM 早于 IgG，出现症状后一周左右通常可检出^[7]。除 SARS-CoV-2 病毒以外，临床上常见的病毒引起的传染病均存在长短不等的窗口期，例如艾滋病的窗口期一般为 2-6 周，丙肝的窗口期为 4-6 周等等。血清转换窗口期的长短对临床早期介入起到了至关重要的作用，血清转换窗口期滞后往往会引起病毒感染者因未被及时确诊而仍不断传播病毒，另外也会错过最佳的病毒阻断或干预时点。

二、研究目的

IgG 和 IgM 的血清转换真的需要这么久的时间吗？当我和我身边的家人、朋友接种了新冠灭活疫苗后，我们经常会议论：保护人体的特异性中和抗体是在什么时候产生呢？为什么需要 14 天或者更久？会不会是因为我们现有的检测方法的灵敏度不够，而导致抗体已经产生，但是不能被精准检测到呢？如果使用更灵敏的抗体检测技术在早期检测到特异性中和抗体，是否能在一定程度上为克隆选择学说提供佐证呢？这些疑问随着新冠疫情的不断蔓延也一直萦绕在我的脑海中。

怀着这些疑问，我回想起 3 年前参加上海交通大学生物医学工程学院中学生夏令营时接触过一种目前最先进的超灵敏的单分子阵列检测方法，这种检测方法的灵敏度是目前常规酶联免疫（ELISA）检测方法的 1000 倍以上。在收集了相关的基础信息后，我成功联系到了上海交通大学生物医学工程学院的徐宏

老师。当我向徐老师提出我的疑问后，徐老师告诉我她正带领她的博士生欧飞洋开展基于超灵敏单分子阵列检测技术在新冠病毒抗体检测的相关研究，并告诉我如果我感兴趣，可以利用自己的业余时间和她的学生一起共同来对这个问题开展研究和探索。于是我有幸加入了此项工作，在这个工作中，我承担的主要研究任务和目标是：尝试设计并建立基于单分子阵列的新冠灭活疫苗接种后特异性中和抗体的超灵敏检测方法，并利用这种方法检测接种新冠灭活疫苗后特异性中和抗体产生的时间，确认血清转换窗口期。

三、研究的理论基础

3.1. 酶联免疫吸附检测（Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA）

ELISA，由 Eva Engvall 和 Peter Perlmann 于 1971 年发明以来已成为临床蛋白类生物标志物最主流的检测技术。新冠病毒抗体检测常用的是间接 ELISA 法，其检测原理如图 4 所示：将抗原连接到固相载体上制成预制酶标板，然后加入待测样本，样本中的抗体与抗原发生反应而结合到酶标板上；随后加入酶标记的检测抗体，从而形成“抗原-待测抗体-检测抗体”的免疫复合物；最后加入底物，检测抗体上标记的酶催化底物显色。颜色的深浅与“抗原-待测抗体-检测抗体”免疫复合物的浓度成正比，使用酶标仪可以测出 OD 值，即被检测物吸收掉的光密度值。OD 值越高，被检测物浓度越高，就代表待测抗体浓度越高。



图 4. 夹心 ELISA 检测原理示意图

3.2 数字式 ELISA（Digital ELISA）

单分子阵列免疫检测技术（Single-molecule array, Simoa）^[8, 9]是基于全新的数字化检测原理，亦被称为数字 ELISA（digital ELISA），拥有着比传统 ELISA 方法高 1000 倍的灵敏度，是当前最灵敏的一种免疫检测技术。目前，Simoa 检测技术已经实现对肿瘤标志物，细胞因子，阿尔兹海默病病理相关蛋白等的高灵敏检测^[8, 10, 11]，极大程度帮助研究者更全面，更准确地研究疾病发病机理、病理过程。

因此，本研究引入 Simoa 检测技术，构建针对新冠病毒特异性中和抗体的超灵敏检测方法，并拟在构建的超敏检测方法基础上，通过对接种疫苗后早期的时序血清进行系统测量与分析，探究血清转换时间是否可以通过检测灵敏度的提升而大大提前，从而缩短检测窗口期。Simoa 对新冠病毒抗体的检测原理如图 5 所示，与传统的 ELISA 不同，digital ELISA 以磁性微珠为载体，首先将 RBD 共价固定在磁性微珠表面，加入待测样本后，调节反应体系的浓度，保证磁性微珠的数量远高于样本中的待测 IgM 和 IgG 的个数，此时反应过程将遵从于经典的泊松分布理论，即每个磁性微珠最多捕获一个待测抗体。随后加入检测抗体与酶标记物，从而形成“磁性微珠-单个待测抗体-单个检测抗体-单个酶”的免疫复合物（称为“1”磁珠）或者没有捕获抗体的“空白磁性微珠”（称为“0”磁珠）这两类磁性微珠。然后将两类磁性微珠封入 Simoa 的单分子阵列中，由于单分子微孔阵列的微孔尺寸仅略大于磁性微珠，因此使得每个微孔中只能容纳一个磁性微珠。封在微孔中的“1”磁珠可以催化微孔中的底物产生荧光，而封装了“0”磁珠的微孔不会产生荧光。最后，分别统计“1”磁珠和“0”磁珠的绝对数量，根据泊松分布公式（公式 1, 2），计算出平均每个磁性微珠上酶的个数（average number of enzyme-labeled protein molecules per bead, AEB），最终得到待测抗体的浓度。

$$P_{\mu}(v) = e^{-\mu} \left(\frac{\mu^v}{v!}\right) \quad (\text{公式 1}) [8]$$

$$\mu = -\ln [P_{\mu}(0)] \quad (\text{公式 2}) [8]$$

其中， μ 等于捕获和标记的蛋白分子与磁珠数目的比率， v 为单个磁珠上捕获的蛋白分子数目。

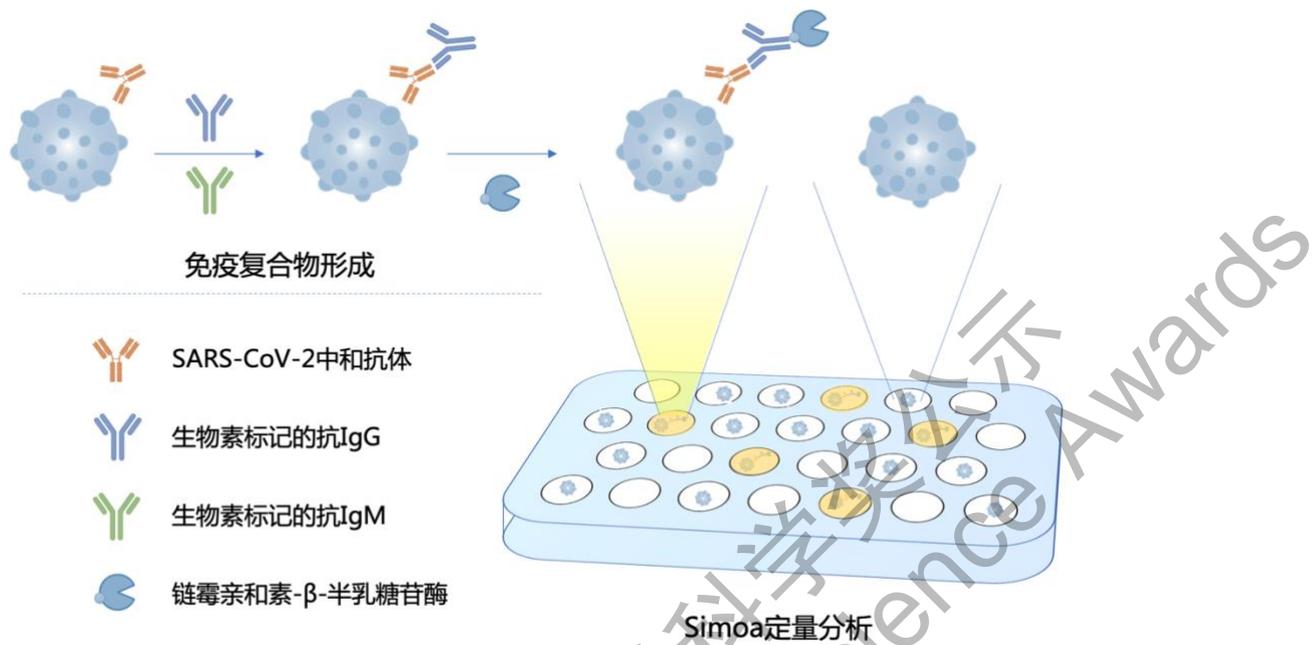


图 5. Simoa 检测原理示意图

四、材料与amp;方法

4.1 材料与amp;仪器

实验共分为三大版块，磁珠表面 RBD 蛋白的偶联、Simoa 测试及 ELISA 测试。分别用到的材料与amp;仪器如下表所示。

表 1. 磁珠偶联 RBD 蛋白的试剂与amp;仪器

试剂/amp;仪器名称	提供厂家	试剂编号/amp;仪器型号
RBD 蛋白	Sanyou Biopharmaceuticals Co., Ltd, China	Cat No. LZQ20200809
EDC	Sigma-Aldrich, USA	Cat No. E1769
NHS	Thermo Fisher Scientific Inc., USA	Cat No. 24500
Proclin 300	Sigma-Aldrich, USA	Cat No. 48914-U
酶标仪	Molecular Devices, USA	SpectraMax i3X

表 2. Simoa 测试的试剂与仪器

试剂/仪器名称	提供厂家	试剂编号/仪器型号
山羊抗人 IgG	Sangon Biotech Co, Ltd,China	Cat No. D110152
山羊抗人 IgM	Sangon Biotech Co, Ltd,China	Cat No. D110159
SARS-CoV-2 标准中和抗体	National Institutes for Food and Drug Control, China	Cat No. 280034-202001
单分子阵列 (Simoa)分析仪器	Quanterix, Inc., USA	HD-X Analyzer

表 3. ELISA 测试的试剂与仪器

试剂/仪器名称	提供厂家	试剂编号/仪器型号
RBD-IgG 测试试剂盒	Vazyme Biotech Co., Ltd, China	Cat No. DD3103
RBD-IgM 测试试剂盒	Vazyme Biotech Co., Ltd, China	Cat No. DD3111
酶标仪	Molecular Devices, USA	SpectraMax i3X

4.2 实验样本设计

八位志愿者在未接种新冠灭活疫苗 (day0) 至接种第一针 (day1), 接种第二针, 接种第二针后两周的观察周期内各个时间点进行采血, 具体时间如图 6 所示。通过对每个时间点的时序血清进行测定与分析, 对比两种检测方法检出特异性中和抗体的时间, 以验证我的猜想。

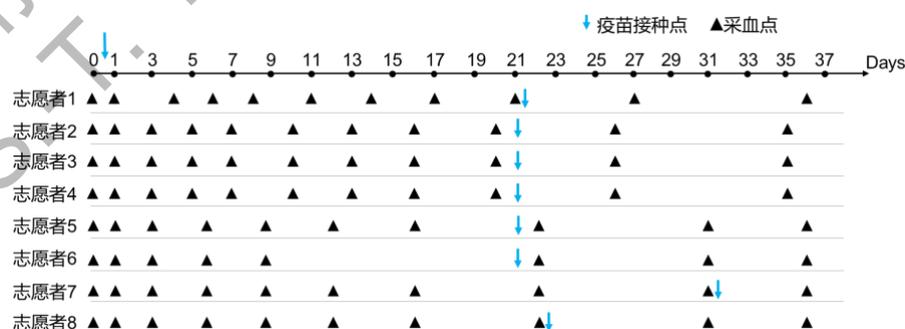


图 6. 时序样本设计示意图

4.3 磁球偶联 RBD 蛋白的制备与表征

本研究以 RBD 蛋白为检测 SARS-CoV-2 特异性中和抗体的探针, 制备共价

偶联有 RBD 蛋白的磁性微球。这里，本研究采用常用的 EDC、NHS 共价偶联策略实现新冠病毒 RBD 蛋白与磁珠表面羧基的共价偶联。反应原理如图 7 所示，具体可拆分为三步。第一步，一种可溶于水的碳二亚胺（EDC）与磁珠表面修饰的羧基（-COOH）反应生成活跃的中间体 O-acylisourea。第二步，O-acylisourea 与同样亲水的 N-羟基琥珀酰亚胺（sulfo-NHS）反应生成活跃的中间体酯（sulfo-NHS ester）。第三步，RBD 蛋白的氨基基团与 sulfo-NHS 酯发生亲核取代反应，氨基基团进攻 NHS 酯上的羰基基团并取代 N-羟基琥珀酰亚胺，形成酰胺键^[12]，进而在磁珠表面将 RBD 蛋白通过酰胺键成功结合在一起。

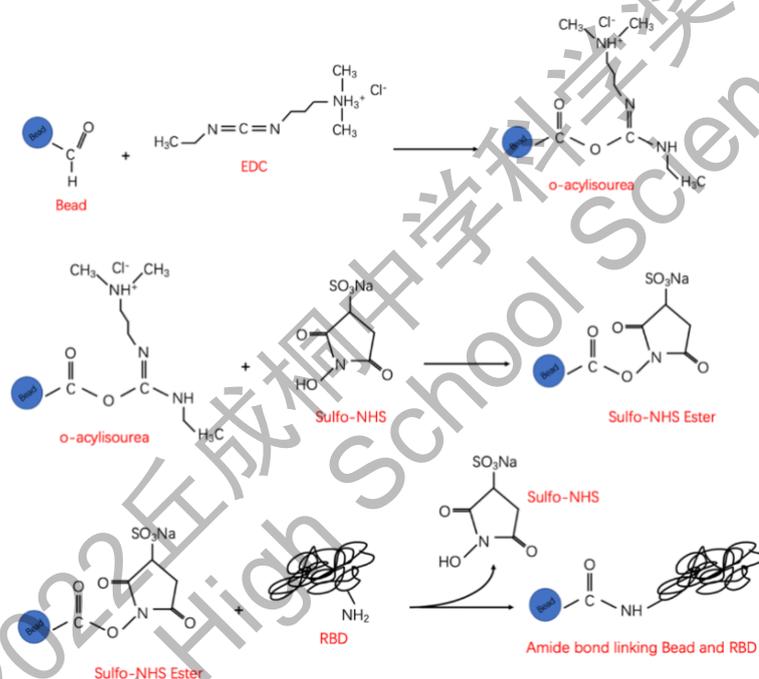


图 7. 磁珠偶联 RBD 原理示意图

具体的制备实验过程如下：2mL 离心管中加入 1mg 磁珠，选取一管做对照组。用 200 μ L MEST 溶液洗涤磁珠三次后加入 50 μ L MEST，随后加入 50 μ L EDC 溶液和 100 μ L sulfo-NHS 溶液（均为 4mg/mL），室温活化反应 30min。反应结束后使用磁力架吸附磁珠，去上清后用 200 μ L MEST 溶液洗涤一次后加入 200 μ L RBD 溶液（浓度为 0.03mg/mL），温室反应 2h 让 RBD 蛋白与磁珠通过共价键结合。反应结束后使用磁力架吸附磁珠，取上清并保留做 BCA（Bicinchoninic Acid Assay）蛋白定量测试，再用 200 μ L 封闭液（PBS，0.5% 牛血清白蛋白，0.3% 甘氨酸）洗涤三次。随后用 200 μ L 封闭液洗涤三次，加入 200 μ L 封闭液 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜。封闭完成后用 200 μ L 保存液（0.1% 牛血清白蛋白，0.03% Proclin300，

PBST) 洗涤三次, 最后加入 200 μ L 保存液保存以备后续使用。

偶联反应完成后, 采用 BCA 蛋白定量试剂对磁珠表面 RBD 蛋白偶联量进行测定, 使用 OriginLab 软件, 运用四参数逻辑回归模型将标准品的浓度和所对应的 OD 值拟合出磁珠偶联标准曲线, 标准曲线为图 8A 所示。随后使用标准曲线, 运用差减法计算出每毫克磁珠表面 RBD 蛋白偶联量分别是 11.0 μ g 和 10.8 μ g (图 8B)。从图 8B 结果可以看出, RBD 蛋白已经成功偶联至磁球上。同时, RBD 的偶联量在不同管之间的差异小, 表明偶联方法稳定、重复性好。

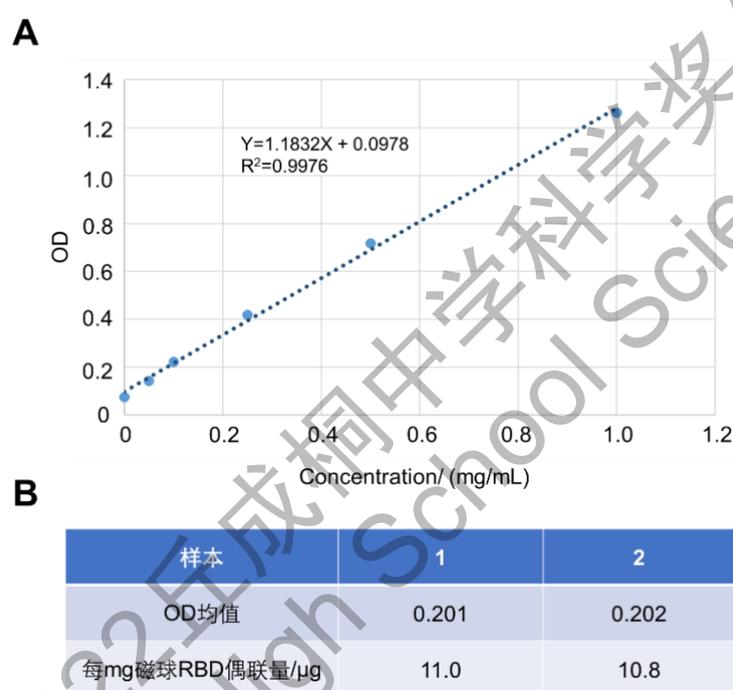


图 8. 磁珠的 RBD 偶联量计算。

A. BCA 标准曲线。B. 2 组 1mg 磁珠 RBD 偶联量

4.4 商品化 ELISA 试剂的志愿者时序血清测定

本研究以传统 ELISA 作为对比方法, 对比两者检测灵敏度的差异及检出特异性中和抗体时间的差异。实验过程如下: 按照试剂盒操作说明书, 配置洗涤液, 使用去离子水将浓缩洗涤液稀释 80 倍。随后取出预制板, 每孔加入 100 μ L 样本稀释剂和 10 μ L 不同浓度的抗 SARS-CoV-2 标准抗体 (IgM 和 IgG, 国家食品和药物监督局, 初始浓度为 1000U/mL) 的待测样本。用封板膜封板后 37 $^{\circ}$ C 温育 30min。温育结束后吸去孔内液体并使用洗涤液连续洗板 5 次。洗涤结束后每孔加入 100 μ L 酶标检测抗体。再用封板膜封板后 37 $^{\circ}$ C 温育 30min。温育结束后吸去孔内液体并使用洗涤液连续洗板 5 次。然后每孔再加入 100 μ L 显色剂,

用封板膜封板后 37°C 温育 10min。温育结束后每孔加入 50 μ L 终止液，轻轻混匀。最后使用酶标仪检测每孔在 450nm 和 630nm 处的吸光值（OD 值）。

测量志愿者时序血清时，方法与上述相同。

4.5 基于 Simoa 检测技术的 SARS-CoV-2 特异性中和抗体超敏检测方法的建立与志愿者时序血清测定

数字式单分子免疫阵列分析仪可以通过两步法或是三步法建立针对 SARS-CoV-2 特异性中和抗体的超敏检测方法。采用基于 Simoa 检测原理的 HD-X 全自动检测技术，优化并确认选择两步法为反应方法学，其反应过程如下：数字式单分子免疫阵列全自动分析仪（HD-X）自动向反应试管中加入 25 μ L 包被有 RBD 蛋白的磁珠，随后加入 100 μ L 不同浓度的 SARS-CoV-2 标准抗体样本（IgM 和 IgG，国家食品和药物监督局，初始浓度为 1000U/mL）和 20 μ L 检测抗体（0.5 μ g/mL）并孵育 35.25 分钟。孵育结束后磁铁吸附磁珠，自动吸去上清并用洗涤缓冲液洗涤 6 次。完成第一个洗涤周期后，仪器再自动加入 100 μ L 链霉亲和素偶联的 β -半乳糖苷酶（S β G, 150pM）并孵育 5.25 分钟，孵育结束后自动重复第二个洗涤周期。随后，获得的磁珠在 50 μ L 的酶反应发光底物（RGP）溶液内重悬后被封入微孔阵列中，油封后使用 CCD 相机拍摄荧光图像，随后将图像进行分析并计数“on”微孔（包含“1”磁珠）和“off”微孔（包含“0”磁珠）的数量。最后使用泊松分布公式计算出 AEB，也就是每个微珠上酶的平均个数。

测量志愿者时序血清时，方法与上述相同。不同的是，首先对时序血清稀释 200 倍后，再上机测试得到结果。

五、研究结果

5.1 基于商业化 ELISA 试剂的 SARS-CoV-2 特异性中和抗体（IgG, IgM）标准曲线的建立

为建立 ELISA 标准曲线，经过前期对浓度的初步探究，将标准的 IgG 与 IgM 分别设置了 5 个稀释梯度和一个空白对照组，稀释倍数分别是 100 倍，400 倍，1600 倍，6400 倍，25600 倍，每个浓度均设置平行样品。使用 OriginLab 软件对数据进行处理，运用四参数逻辑回归模型拟合出基于商业化 ELISA 试剂的 SARS-CoV-2 的 IgG（图 9A）和 IgM（图 9B）的标准曲线。随后，根据空白浓度的测量值加 3 倍标准偏差，带入建立的标准曲线，分别计算得到 IgG, IgM 的

最低检出限 (Limit of Detection, LOD); 结果表明基于 ELISA 方法检测的 SARS-CoV-2 特异性 IgG 的 LOD 是 1.16 U/mL, SARS-CoV-2 特异性 IgM 的 LOD 是 0.41 U/mL。

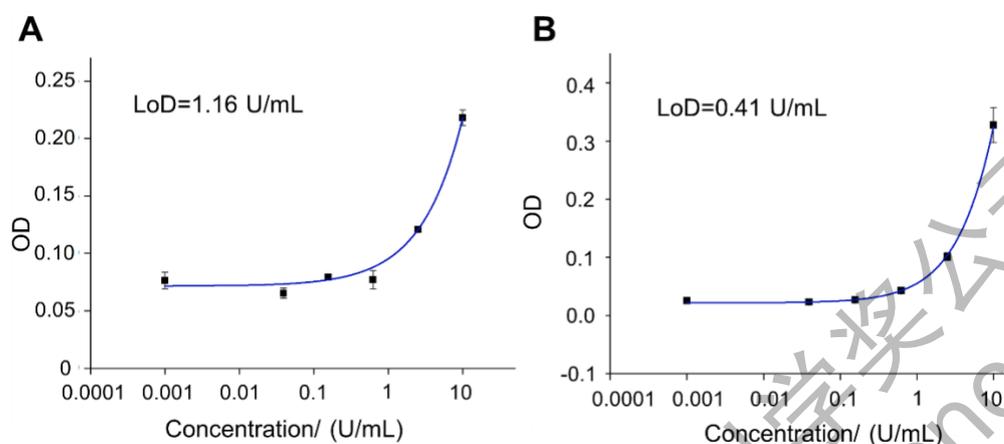


图 9. 基于商业化 ELISA 试剂的 SARS-CoV-2 的特异性中和抗体的标准曲线。

A. IgG 标准曲线, B. IgM 标准曲线。

5.2. 基于 Simoa 检测技术的 SARS-CoV-2 特异性中和抗体 (IgG, IgM) 超敏检测方法的建立

基于 Simoa 检测技术, 首先以 RBD 为 SARS-CoV-2 特异性中和抗体的生物探针, 将其共价偶联在磁珠表面。其次, 根据 Simoa 自建检测试剂的指导说明, 通过对磁珠用量、检测抗体浓度、反应时间、酶浓度等反应条件的系列优化, 同时采用梯度稀释的 SARS-CoV-2 标准抗体 (IgM 和 IgG, 国家食品和药物监督管理局, 初始浓度为 1000U/mL), 建立了针对 SARS-CoV-2 特异性中和抗体 (IgG, IgM) 的标准曲线。本研究将标准的 IgG, IgM 分别设置了 5 个稀释梯度和一个空白对照组, 稀释倍数分别是 20 万倍, 100 万倍, 500 万倍, 2500 万倍和 12500 万倍, 每个浓度均设置平行样本。使用 OriginLab 软件对数据进行处理并运用四参数逻辑回归模型拟合出 IgG (图 10A) 和 IgM (图 10B) 的标准曲线。随后, 根据空白浓度的测量值加 3 倍标准偏差, 带入建立的标准曲线, 分别计算得到 IgG, IgM 的最低检出限 (Limit of Detection, LOD); 结果表明基于 Simoa 检测技术的 SARS-CoV-2 特异性 IgG 的 LOD 是 5.2×10^{-6} U/mL, SARS-CoV-2 特异性 IgM 的 LOD 是 1.1×10^{-5} U/mL。

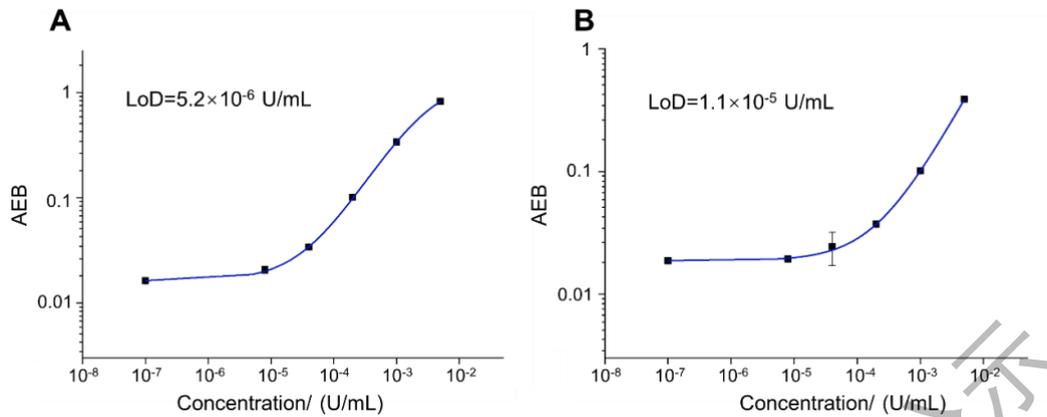


图 10. 基于 Simoa 检测技术的 SARS-CoV-2 特异性中和抗体的标准曲线。

A. IgG 标准曲线, B. IgM 标准曲线。

5.3 基于商业化 ELISA 试剂的新型冠状病毒灭活疫苗特异性中和抗体血清转换时间测定

采用当前主流商业化 ELISA 试剂盒测定 8 位志愿者的时序血清。再计算出每个样本的每个时间的抗体浓度相对于前一个时间点抗体浓度的变化率。结果显示, 使用 ELISA 试剂检测得到的新型冠状病毒灭活疫苗特异性中和抗体血清转换时间, 分别为 IgG 检出时间是 Day21.6 (图 11A), IgM 检出时间是 Day20.7 (图 11B), 且均在志愿者接种第二针疫苗后才能检出, 与大量文献报告结果一致^[13-15]。

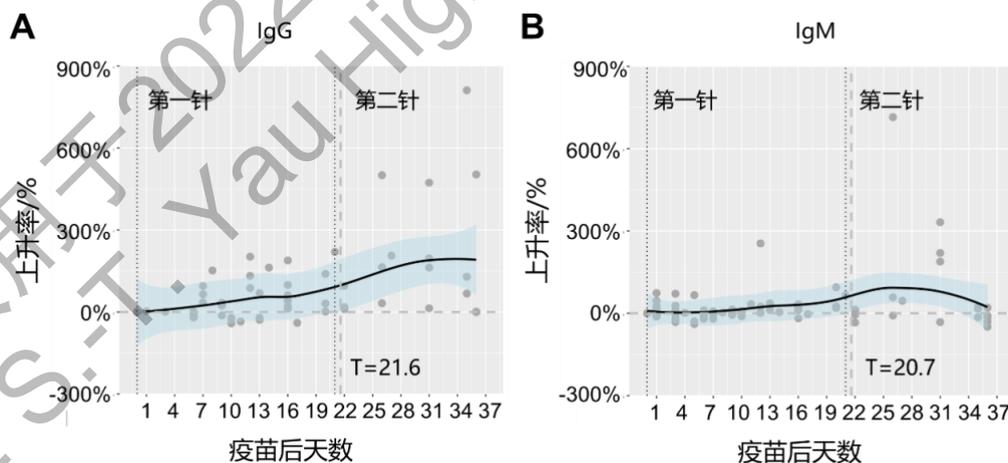


图 11. 基于商业化 ELISA 试剂的新型冠状病毒灭活疫苗特异性中和抗体血清转换时间测试。A. IgG 的血清转换时间。B. IgM 的血清转换时间。采用局部加权回归法(Locally weighted regression, LOESS) 确定血清转换的最早时间点。实线表示分布的中位数, 回归线周围的条纹为等尾 99%置信区间。如果后验分布的等尾 99%置信区间超越 0, 则认为增加率有统计学意义。

5.4 基于 Simoa 检测技术的新型冠状病毒灭活疫苗特异性中和抗体血清转换时间测定

使用 5.2 节建立的针对 SARS-CoV-2 特异性中和抗体 (IgG, IgM) 的超敏检测方法, 测定 8 位接种了科兴灭活疫苗的志愿者的接种前后每一个时间点的时序血清。计算出每个样本的每个时间的抗体浓度相对于前一个时间点抗体浓度的变化率, 并将得到的每个时间点的抗体浓度变化率进行统计分析。结果显示, 基于建立的超灵敏的检测方法, 测试得到的新型冠状病毒灭活疫苗特异性中和抗体的血清转换时间, 分别为 IgG 检出时间是 Day7.5 (图 12A), IgM 检出时间是 Day8.6 (图 12B)。

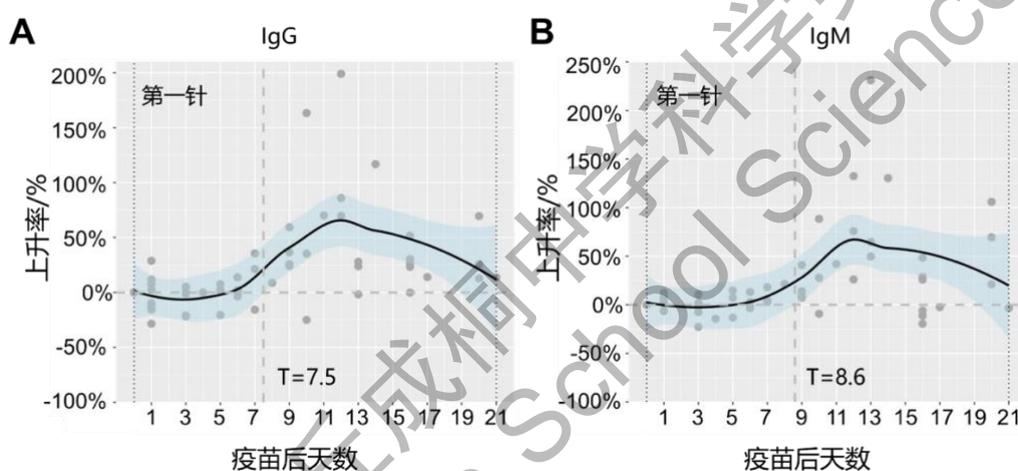


图 12. 基于 Simoa 检测技术的新型冠状病毒灭活疫苗特异性中和抗体血清转换时间测定。A. IgG 的血清转换时间。B. IgM 的血清转换时间。采用局部加权回归法(Locally weighted regression, LOESS) 确定血清转换的最早时间点。实线表示分布的中位数, 回归线周围的条纹为等尾 99%置信区间。如果后验分布的等尾 99%置信区间超越 0, 则认为增加率有统计学意义。

六、讨论

在超灵敏的方法学建立部分, 本研究采用 EDC、NHS 共价偶联策略, 成功将 RBD 偶联至磁性微珠上, 获得 RBD 包被的磁珠。通过使用不同浓度的标准抗体样品建立检测标准曲线, 比较得出对比传统的 ELISA 检测方法, Simoa 超灵敏检测技术确实在 SARS-CoV-2 特异性中和抗体的检测灵敏度上具有极大的提升。具体来看, 基于 Simoa 检测技术的 IgG 检测限比 ELISA 低 2.2×10^5 倍, IgM 检测限比 ELISA 低 3.7×10^4 倍。由此可以得出 Simoa 检测技术在 SARS-CoV-

2 特异性 IgG 和 IgM 的检测灵敏度上均比传统的 ELISA 法高 4~5 个数量级，可以检出待测样本中更低浓度的 SARS-CoV-2 特异性中和抗体，这为后续进行早期的血清转换时间的测定奠定了基础。

使用建立的 SARS-CoV-2 特异性中和抗体超灵敏检测方法，针对 8 位志愿者的时序血清进行测定与分析，发现在接种第一针灭活疫苗的一周后即可检出 SARS-CoV-2 特异性 IgG 与 IgM，即 IgG 与 IgM 的血清转换时间在接种第一针新冠灭活疫苗后一周左右。这一实验结果也证实了我的假设：血清转换是一个渐进的过程，传统方法受限于其较低检测灵敏度，因此血清转换时间通常被认为需要至少 2~3 周，而使用更为灵敏的检测方法就可以更精准、更早期地检测出新型冠状病毒特异性中和抗体。

不仅是新型冠状病毒感染，本研究结论或许还可以应用于 HIV、乙肝等病毒以及其他细菌感染的研究。通过缩短检测窗口期，提前具有传染风险的患者确诊时间，从而实现临床早期确诊与干预。

七、结论与展望

SARS-CoV-2 特异性中和抗体的超灵敏检测方法的建立对于新冠病毒疫苗研发以及免疫基础理论研究具有重要意义。

创新工作 1：本研究建立并使用 SARS-CoV-2 特异性中和抗体超灵敏检测方法，在接种新冠灭活疫苗后早期检出特异性中和抗体，缩短了 SARS-CoV-2 特异性中和抗体的检测窗口期，从而完善了对于新冠灭活疫苗引发人体免疫反应的认知。同时，该检测方法克服了传统抗体检测方法灵敏度低的缺点，可以帮助新冠疫苗研发者评价疫苗免疫效果，对疫苗的研发、迭代升级具有一定的现实指导意义。此外，该检测方法可作为辅助手段验证逆转录聚合酶链反应（RT-PCR）检测出的阳性和阴性结果，同时因其有效克服了 RT-PCR 技术无法区分病毒死活的缺点，从而对制定更精准的疫情防控策略也具有一定的价值。

创新工作 2：本研究的研究成果可能为澳大利亚免疫学家 F.M.伯内特提出的克隆选择学说^[16]提供了佐证。该学说的核心论点是人体内带有各种受体的免疫活性细胞克隆早已存在，被不同的抗原选择并激活。正是由于传统的检测方

法灵敏度低，忽略了早期淋巴细胞所产生的极低浓度的抗体。本研究通过提高检测特异性中和抗体的灵敏度，实现了血清转换时间的前移，也就是说淋巴细胞在较早期就已经实现了异物识别与抗体的产生。这可能说明了，针对新冠的免疫活性细胞克隆可能是早已存在的，新冠病毒入侵人体激活了对应的克隆，因此，抗体才能在早期就得以发现。本研究还无法回答是否还可以在更早期测得血清转换的时间，但随着未来检测灵敏度的继续提高，显然这是一个有趣的课题供科研学者们探讨。

未来，Simoa 超敏检测技术还可应用于肿瘤、阿尔兹海默症等重大疾病的早期筛查、早期诊断、预后评估与复发监控等方面，为生命科学的基础研究与临床医学的发展提供创新且极具潜力的超灵敏检测工具。

八、参考文献

1. Jackson, C.B., et al., *Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2022. **23**(1): p. 3-20.
2. Machhi, J., et al., *The Natural History, Pathobiology, and Clinical Manifestations of SARS-CoV-2 Infections*. Journal of Neuroimmune Pharmacology, 2020. **15**(3): p. 359-386.
3. Oberfeld, B., et al., *SnapShot: COVID-19*. Cell, 2020. **181**(4): p. 954-954 e1.
4. 梁慧刚, et al., *全球新型冠状病毒疫苗研发进展*. 军事医学, 2022. **46**(4).
5. Seifert, M. and R. Küppers, *Human memory B cells*. Leukemia, 2016. **30**(12): p. 2283-2292.
6. <http://www.biology.arizona.edu/IMMUNOLOGY/>
7. Long, Q.-X., et al., *Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19*. Nature Medicine, 2020. **26**(6): p. 845-848.
8. Rissin, D.M., D.H. Wilson, and D.C. Duffy, *Measurement of Single Protein Molecules Using Digital ELISA*, in *The Immunoassay Handbook*. 2013. p. 223-242.
9. 蔡齐勇, 雷杨, and 李朝辉, *单分子阵列技术在疾病诊断中的应用进展*. 分析化学, 2021. **49**(7): p. 1154-1165.
10. Song, L., et al., *Single molecule measurements of tumor necrosis factor α and interleukin-6 in the plasma of patients with Crohn's disease*. Journal of Immunological Methods, 2011. **372**(1): p. 177-186.
11. Li, D. and M.M. Mielke, *An Update on Blood-Based Markers of Alzheimer's Disease Using the SiMoA Platform*. Neurology and Therapy, 2019. **8**(2): p. 73-82.
12. Hermanson, G.T., *Chapter 3 - Zero-Length Crosslinkers*, in *Bioconjugate Techniques (Second Edition)*, G.T. Hermanson, Editor. 2008, Academic Press: New York. p. 213-233.
13. tekol, s.d., *Detection and Evaluation of Antibodies to SARS CoV-2 Spike Protein in Healthcare Workers After Inactivated COVID-19 (CoronaVac) Vaccination*. Southern Clinics of Istanbul Eurasia, 2021.
14. Sauré, D., et al., *Dynamic IgG seropositivity after rollout of CoronaVac and BNT162b2 COVID-*

- 19 vaccines in Chile: a sentinel surveillance study*. *The Lancet Infectious Diseases*, 2022. **22**(1): p. 56-63.
15. Favresse, J., et al., *Neutralizing Antibodies in COVID-19 Patients and Vaccine Recipients after Two Doses of BNT162b2*. *Viruses*, 2021. **13**(7).
16. Burnet, F.M., *The Clonal Selection Theory of Immunity*. Vol. 3. 1959.

九、致谢

1. 论文的选题来源:

论文选题来源于我对新型冠状病毒灭活疫苗接种后特异性中和抗体血清转换时间的疑问，感谢徐宏老师帮助我完善和确定了最终的选题。

2. 每一个队员在论文撰写中承担的工作以及贡献:

实验和论文均由我一人完成。

3. 指导老师与学生的关系，在论文写作过程中所起的作用，及指导是否有偿:

指导老师徐宏为上海交通大学教师。非常感谢徐宏老师作为校外导师为我无偿进行选题指导、理论指导、实验指导和论文撰写指导。

4. 他人协助完成的研究成果:

非常感谢上海交通大学的欧飞洋博士为我提供实验所需的共 82 个志愿者血清样本，并给我进行了与本项目研究相关的实验技能培训，以及为我解答了许多实验操作和数据处理的问题。