



疫苗制备及干扰素活性 的测定

Preparation of vaccine and determination of
interferon activity



汇报人：窦金萍（生物技术研究所）

实用生物信息技术博士班G4组

成员：刘尧尧 朱和权 张瑞雪 窦金萍

2021年12月19日

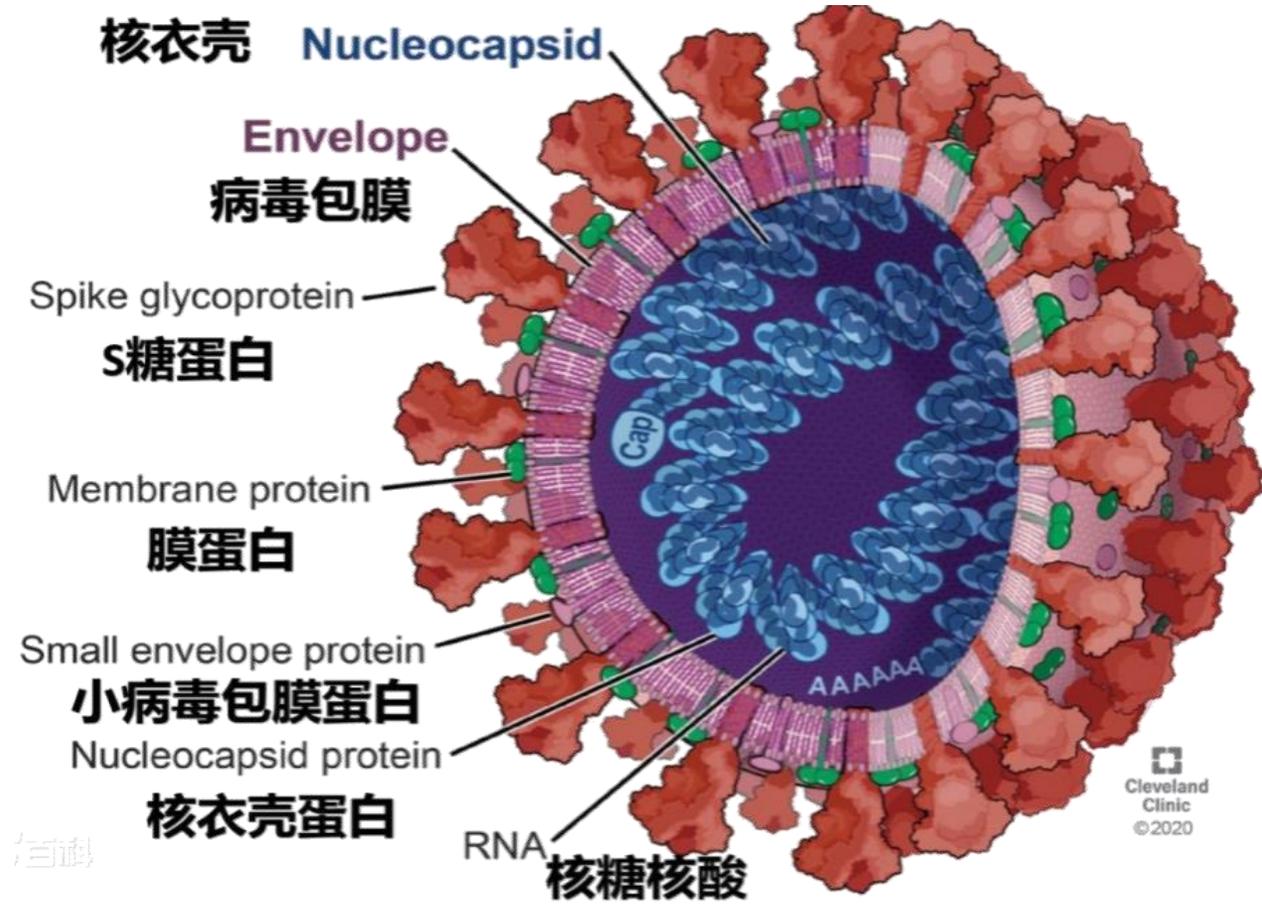
汇报提纲

- 📋· 1.新型冠状病毒突变株及疫苗
- 🛡️· 2.小反刍兽疫病毒疫苗制备
- 📄· 3.干扰素与抗体
- 👤· 4.干扰素效价的测定

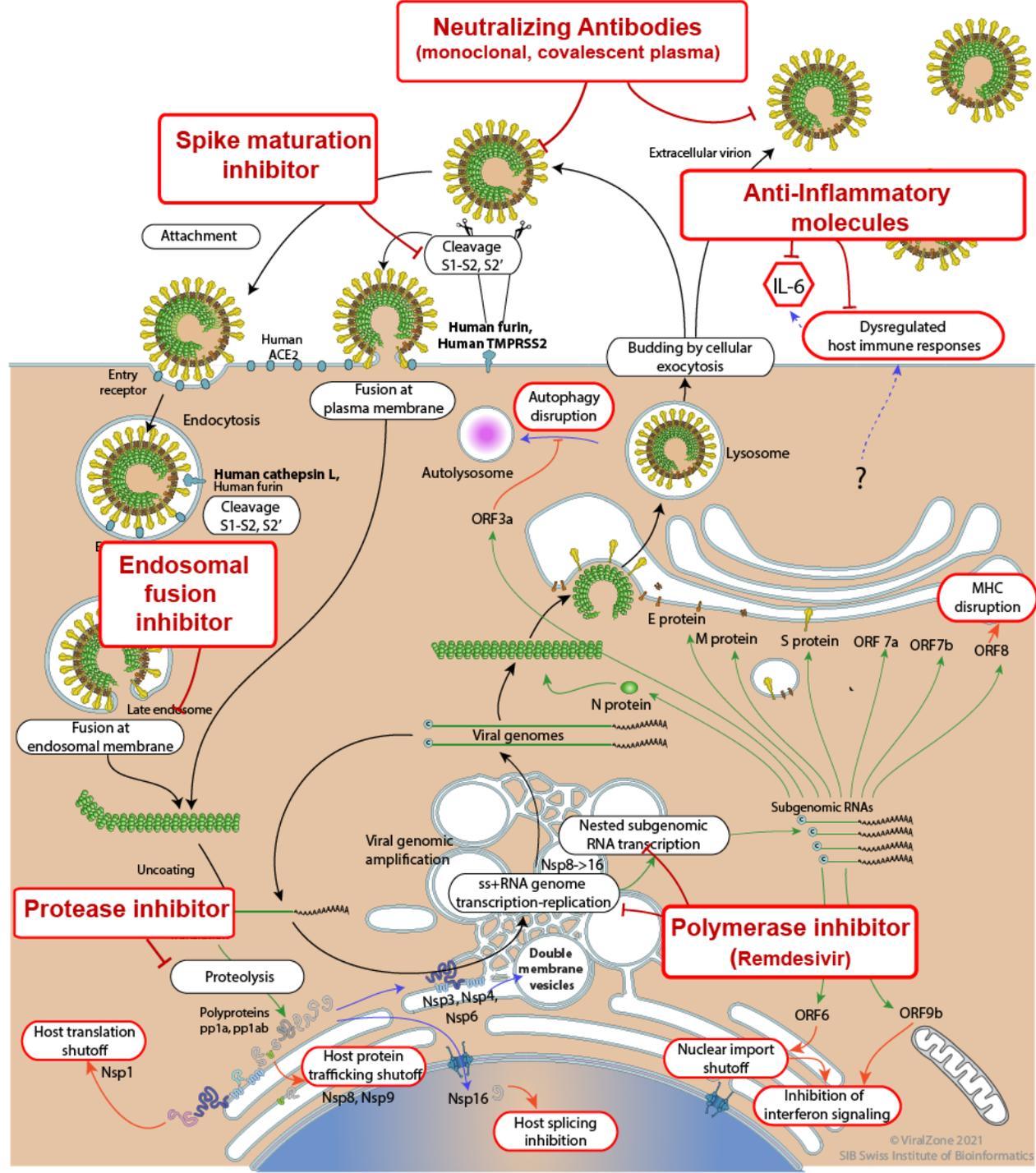
什么是新型冠状病毒肺炎

1. **主要临床表现**为发热、乏力，呼吸道症状以干咳为主，并逐渐出现呼吸困难。
2. **严重者**表现为急性呼吸窘迫综合征、脓毒症休克、难以纠正的代谢性酸中毒和出凝血功能障碍。
3. **部分患者**起病症状轻微，可无发热

新冠病毒

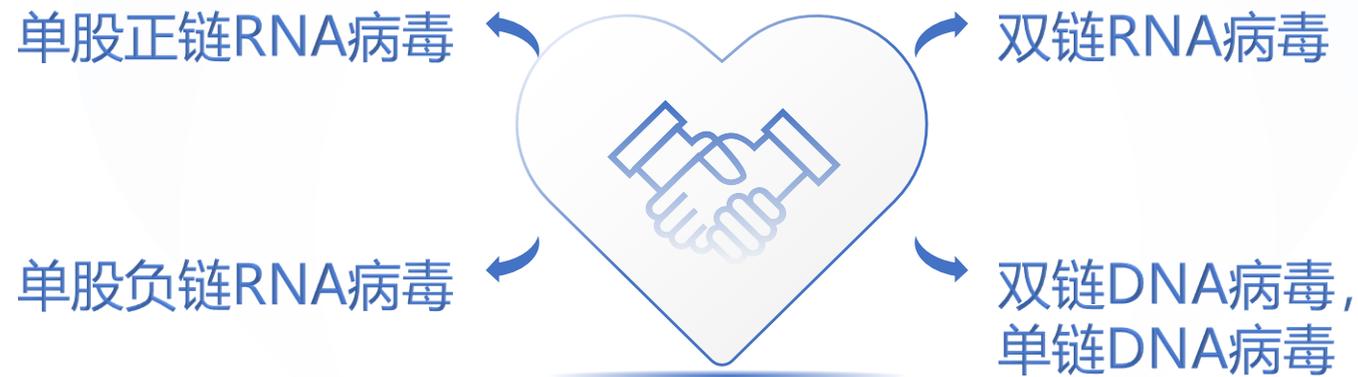


SARS-CoV-2
单股正链RNA病毒



病毒种类

病毒:DNA病毒, RNA病毒, 逆转录病毒



不同类型的病毒, 宿主也有所不同

表 1 世卫组织命名的 8 种新冠病毒重要变异株

Tab.1 The 8 SARS-Cov-2 variants labeled by WHO

等级	WHO 标签	Pango 分类	GISAID 分类	NextStrain 分类	首发时间	首发地点	WHO 定名日期
VOCs	阿尔法(α)	B.1.1.7	GRY	20I (V1)	2020 年 9 月	英国	2020 年 12 月 18 日
	贝塔(β)	B.1.351	GH/501Y.V2	20H (V2)	2020 年 5 月	南非	2020 年 12 月 18 日
		B.1.351.2					
		B.1.351.3					
	伽马(γ)	P.1 (B.1.1.128.1)	GR/501Y.V3	20J (V3)	2020 年 11 月	巴西	2021 年 1 月 11 日
P.1.1 (B.1.1.128.2)							
P.1.2 (B.1.1.128.3)							
德尔塔(δ)	B.1.617.2	AY.1 (B.1.167.2.1)	G/478K.V1	21A	2020 年 10 月	印度	2021 年 5 月 11 日
		AY.2 (B.1.167.2.2)					
		AY.3 (B.1.167.2.3)					
VOIs	伊塔(η)	B.1.525	G/484K.V3	21D	2020 年 12 月	不详	2021 年 3 月 17 日
	约塔(ι)	B.1.526	GH/253G.V1	21F	2020 年 11 月	美国	2021 年 3 月 24 日
	卡帕(κ)	B.1.617.1	G/452R.V3	21B	2020 年 10 月	印度	2021 年 4 月 4 日
	拉姆达(λ)	C.37 (B.1.1.1.37)	GR/452Q.V1	21G	2020 年 12 月	秘鲁	2021 年 6 月 14 日

备注 1: 需关注的变异株 (Variants of Concern, VOCs); 待观察的变异株 (Variants of Interest, VOIs), 世界卫生组织 (WHO)

备注 2: 由于历史原因, Pango 分类组织曾经使用过 C、P 和 AY 等不规范的命名前缀。自 2021 年 7 月起, Pango 分类组织严格根据进化树对已有的新冠病毒变异株分类名称进行了规范化, 将这些不规范的前缀重新纳入 A 和 B 两大分支中。括号内是规范化的 Pango 分类名称。

王迎晨, 董妥, 张哲, 等. 新型冠状病毒变异株分类学研究进展[EB/OL]. 北京: 中国科技论文在线 [2021-08-23]. <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/202108-54>.



突变株

PAGE ONE



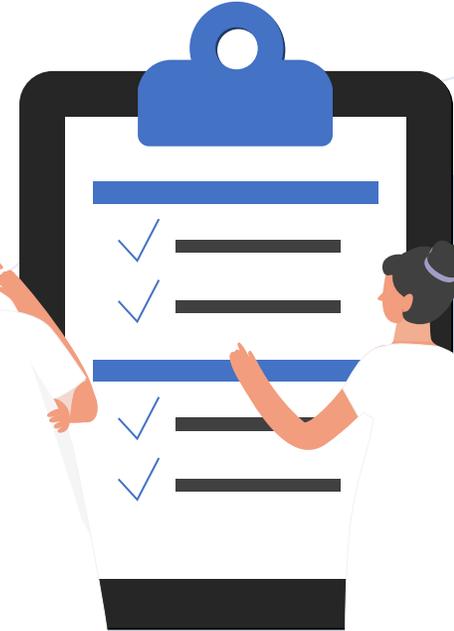
Alphacoronavirus

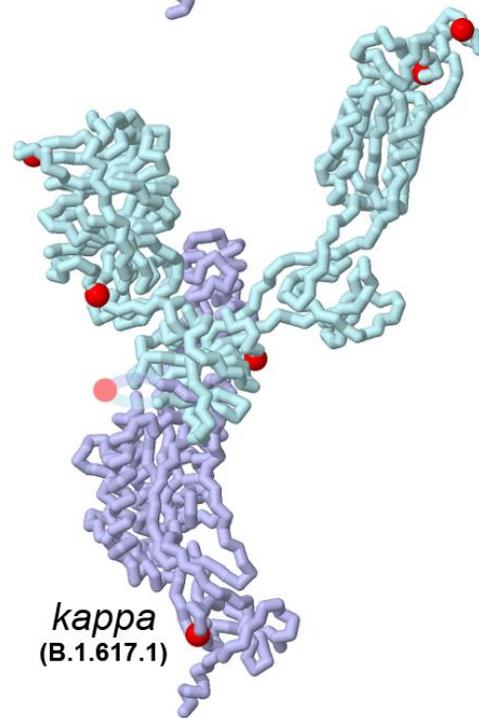
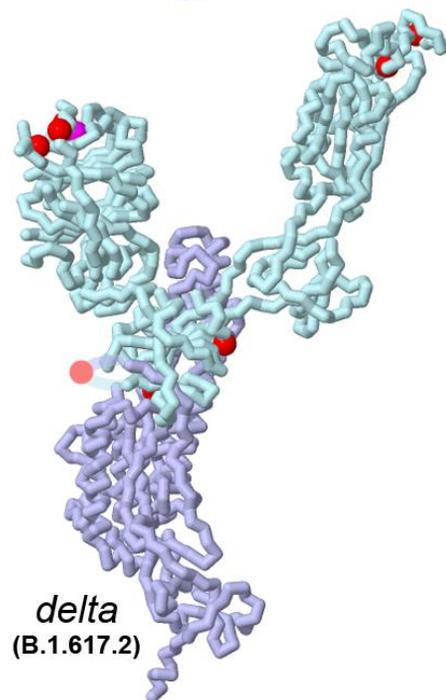
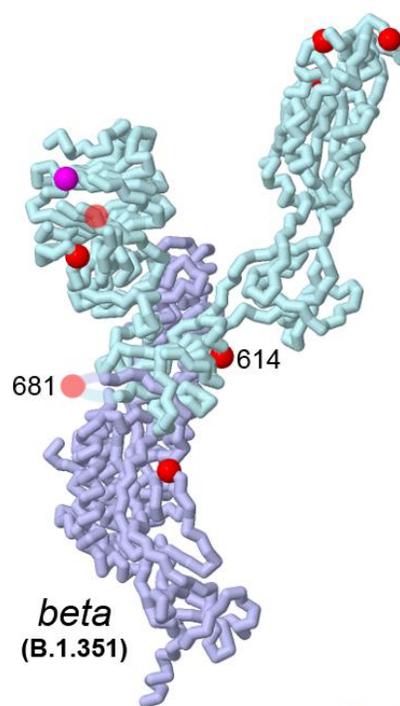
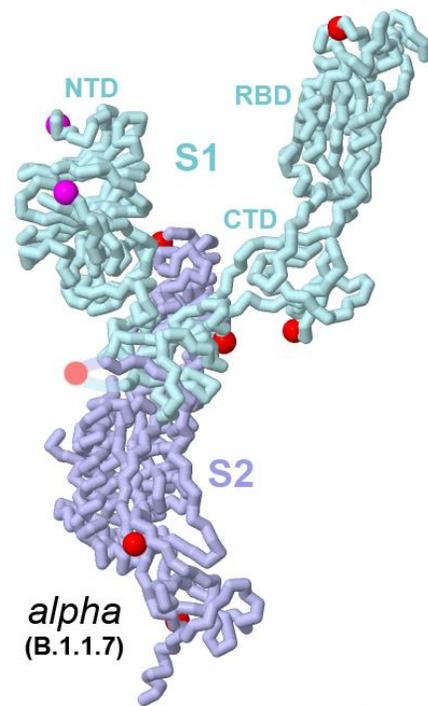
Betacoronavirus

Gammacoronavirus

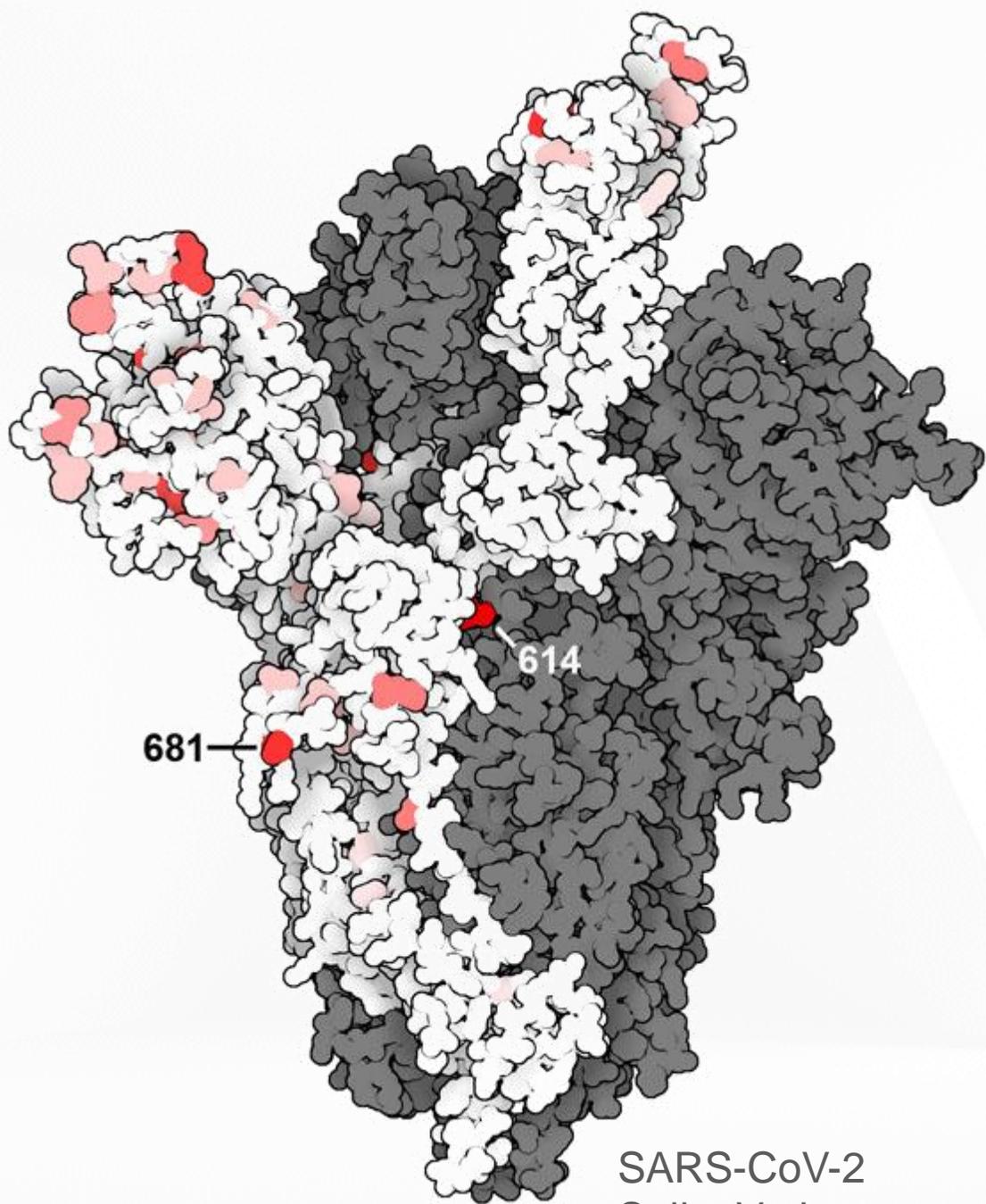
Deltacoronavirus

Omicroncoronavirus

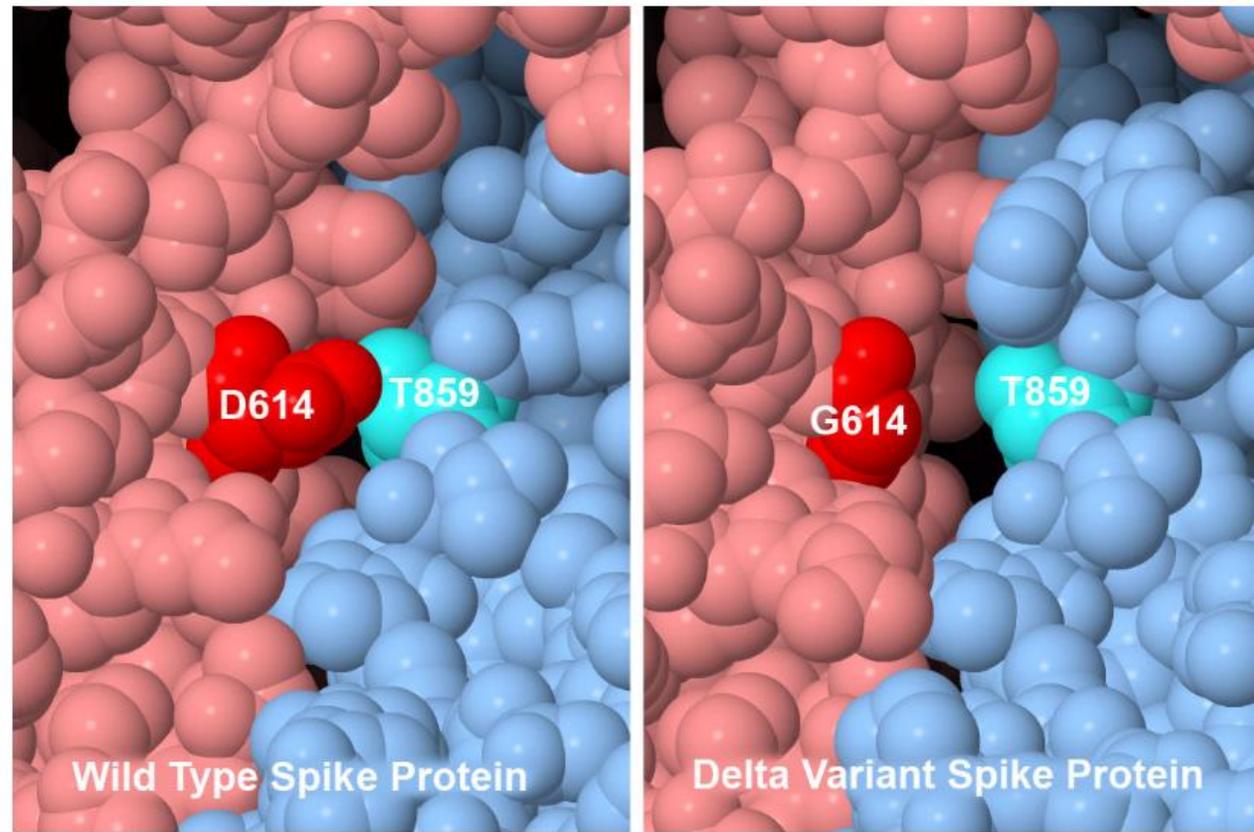




PDB ID [7lww](#), [7lyo](#), [7v7q](#), [7v7e](#)



SARS-CoV-2
Spike Variants



病毒蛋白结构来源于ViralZone数据库

- 1.新冠病毒RNA变异来源的主要类型：RNA复制过程中突变，病毒RNA之间的重组。
- 2.突变影响S蛋白RBD区域的氨基酸组成，会改变与受体蛋白ACE2的结合能力，导致感染过程更快更牢固。
- 3.S蛋白的柔性结构，可实现与受体细胞及受体蛋白的多位点结合。
- 4.S蛋白的糖链修饰，作为伪装，使新冠病毒能够轻松躲过人体免疫系统的监视。



疫苗类型



1.腺病毒载体疫苗

只打一针的是腺病毒载体疫苗。腺病毒像货车一样，可以搭载新冠病毒核酸片段，将其高效地送到细胞内表达抗原，单针接种就可诱导免疫保护反应。



2.灭活疫苗

需要打两针的是灭活疫苗，它将活病毒灭活后作为抗原接种到人体。疫苗的成分和天然的病毒结构最接近。

14

3.重组蛋白疫苗

需要打三针的是重组蛋白疫苗，是将最有效的抗原成分通过基因工程的方法来制作成疫苗。

小反刍兽疫病毒



疫苗制备-重组亚单位疫苗

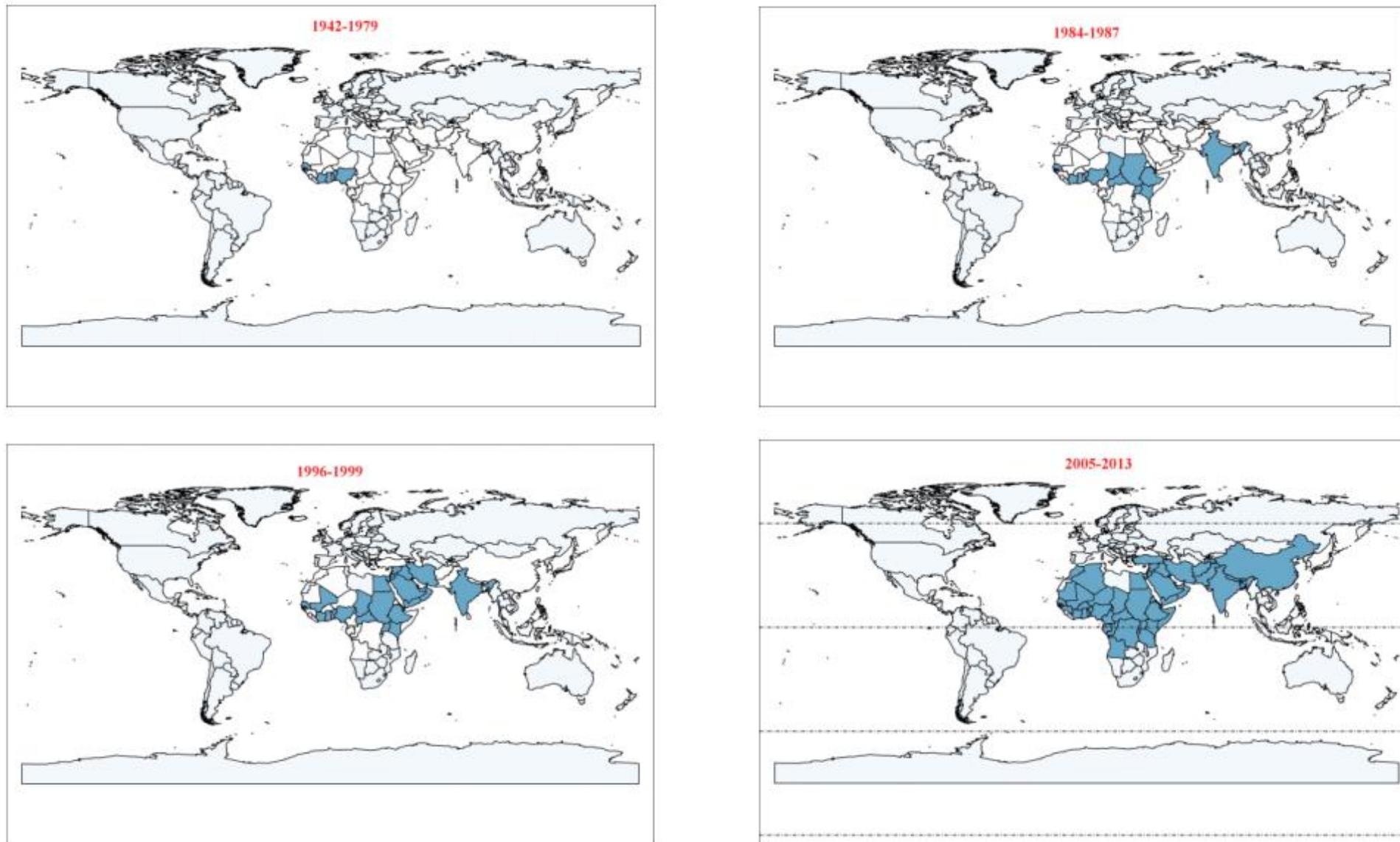
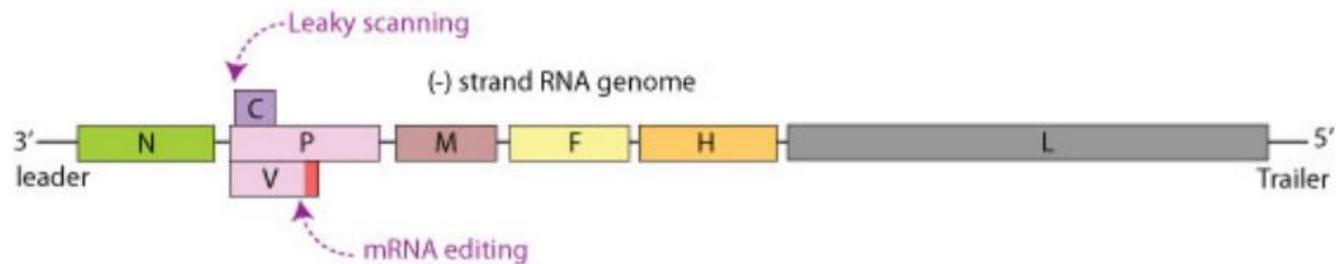


图3 全球小反刍兽疫扩散路线布

- [小反刍兽疫诊断方法的研究进展](#) . 中国知网

小反刍兽疫病毒 (peste des petits ruminants virus) PPRV

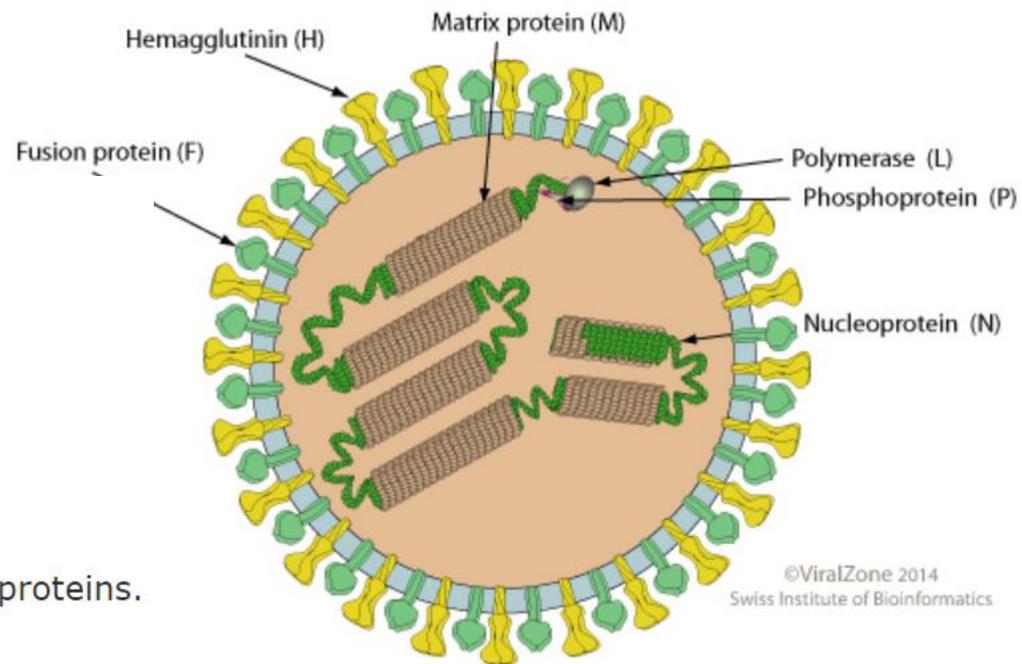
GENOME



Negative-stranded RNA linear genome, about 15-16 kb in size. Encodes for eight proteins.

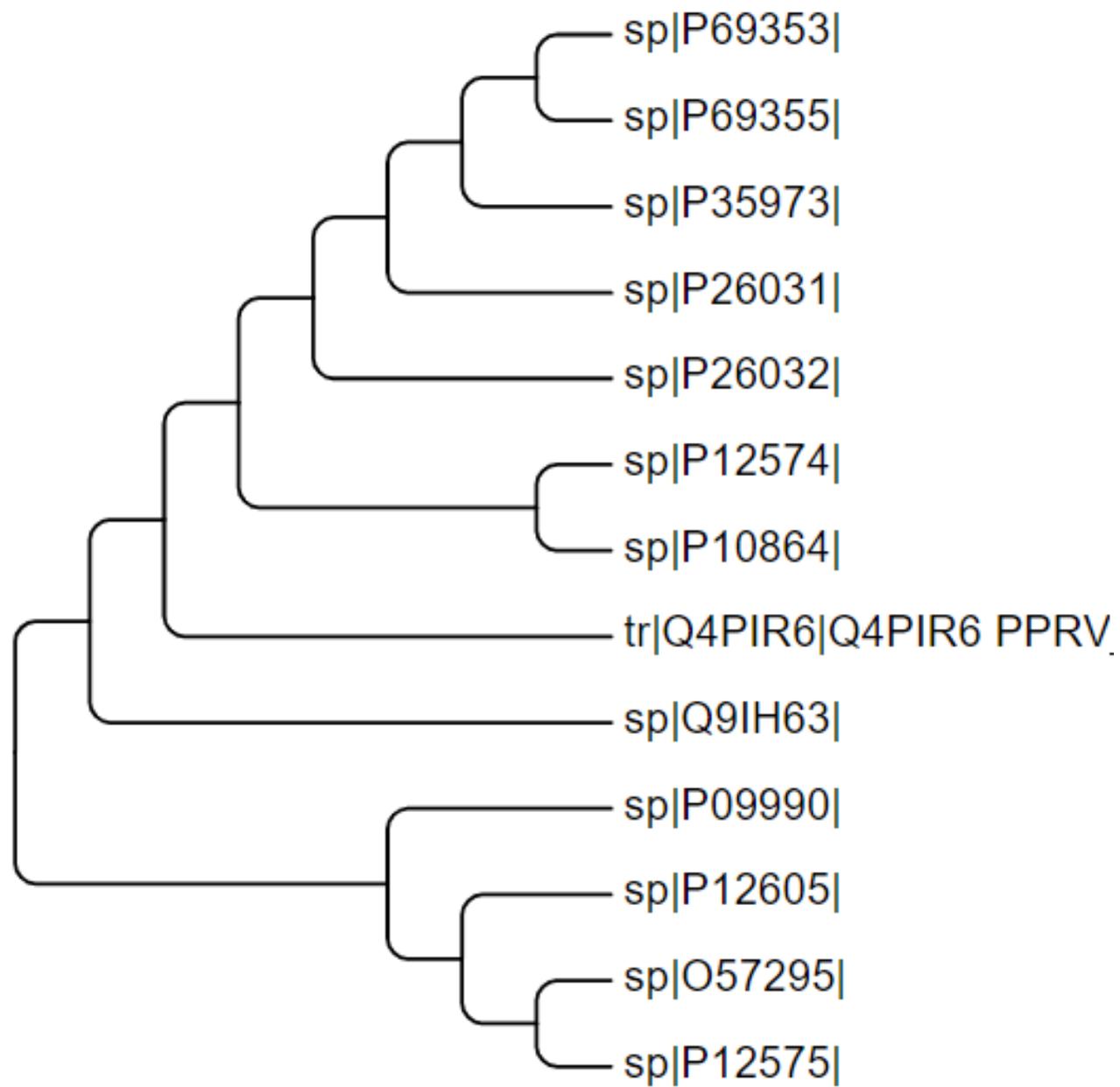
Morbillivirus

VIRION



Enveloped, spherical. Diameter from 150nm to 300nm.

病毒结构来源于ViralZone

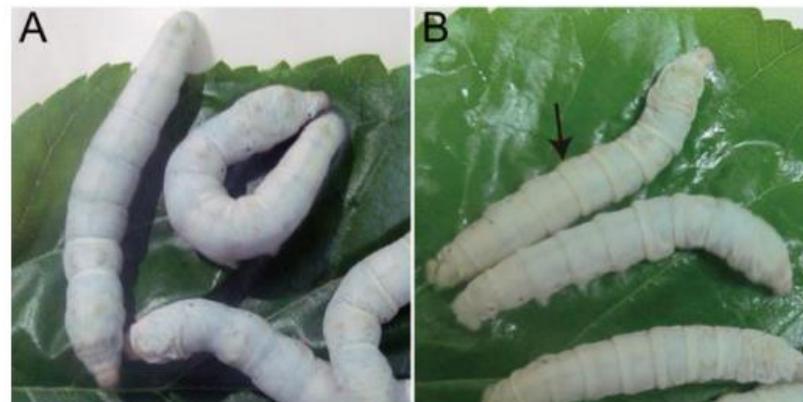




重组蛋白疫苗制备流程



干扰素效价测定



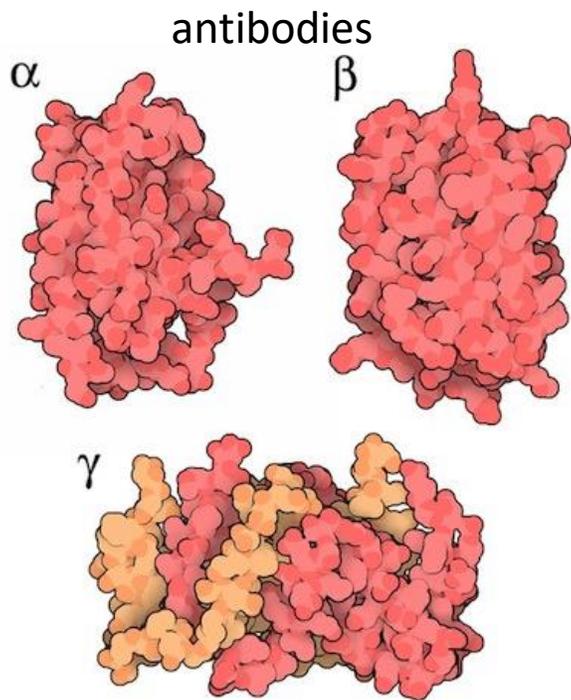
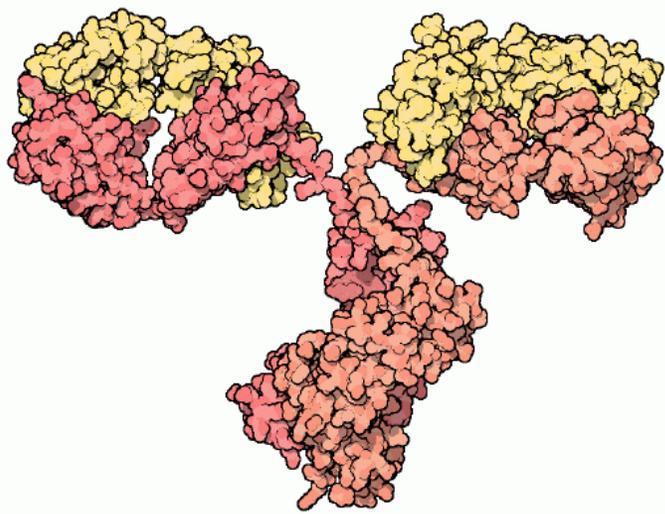
· PAGE 3

家蚕杆状病毒表达系统

干扰素在家蚕中表达并验证检测

2. 研究背景

干扰素与抗体



Interferon

单克隆抗体(monoclonal antibody, Mab)技术该技术将免疫小鼠的B淋巴细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合生成杂交瘤细胞，这种杂交瘤细胞核内含有双亲细胞的染色体，继承了亲代细胞的特征。它既具有瘤细胞在体外培养中迅速增殖的能力，又具备免疫脾细胞合成和分泌特异性抗体的特性。



HUMAN INTERFERON-BETA
CRYSTAL STRUCTURE

图片来源于PDB

-  广谱抗病毒，生物个体感染某种病毒后也会对另一种病毒的感染产生干扰抑制的作用

干扰素类型



I 型干扰素：IFN- α 、IFN- β 、IFN- ω 、IFN- δ 、
IFN- κ 、IFN- ϵ 、IFN- τ 、IFN- ξ

· 14

II 型干扰素：主要由NK细胞和T细胞产生，仅有
IFN- γ 作为单一基因存在



III 型干扰素：IFN- λ ，有4种亚型



干扰素活性检测

细胞病变抑制法，观察细胞状态并统计，筛选出高活性干扰素

干扰素的活性检测方法采用细胞病变抑制法，即VSV-GFP病毒抑制实验，以表达产物对VSV-GFP感染VERO细胞的抑制情况来评价。

VSV-GFP是在VSV病毒基因组中插入了GFP报告基因，如果干扰素有活性可以抑制VSV病毒感染细胞，那么相应孔中的细胞不会检测到绿色荧光，反之如果干扰素活性不足以抑制VSV病毒，那么细胞就会被VSV-GFP病毒感染表达绿色荧光



-

±

+

VSV感染vero细胞

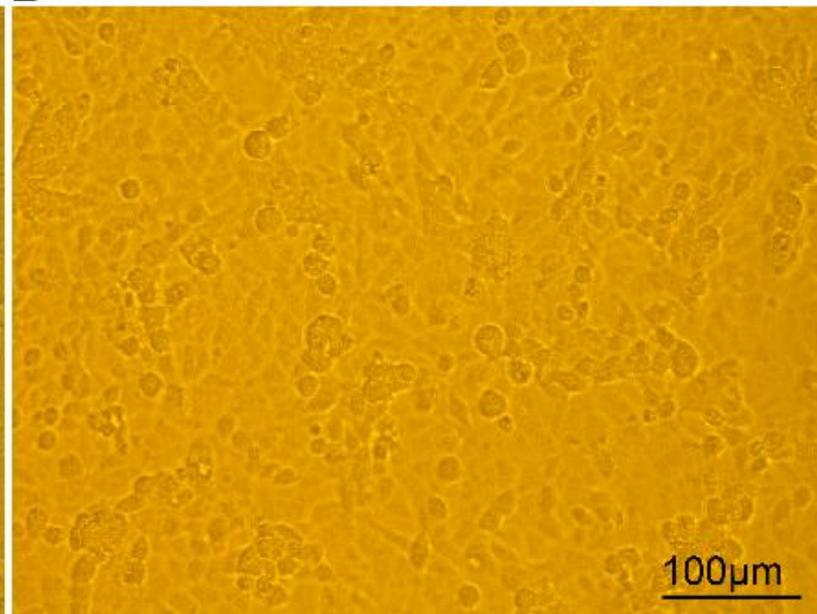
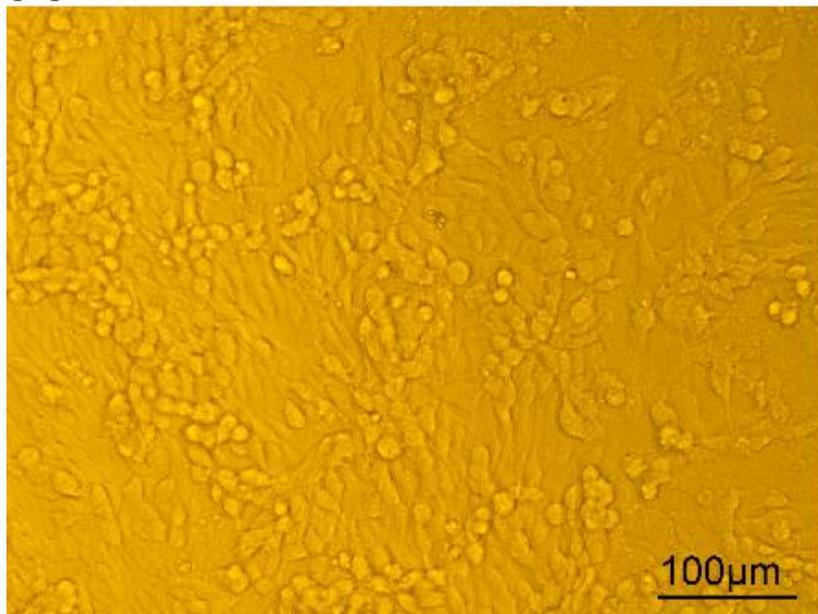
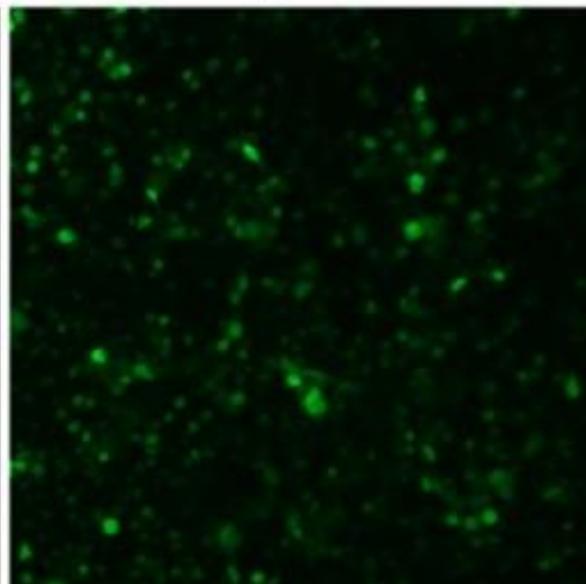
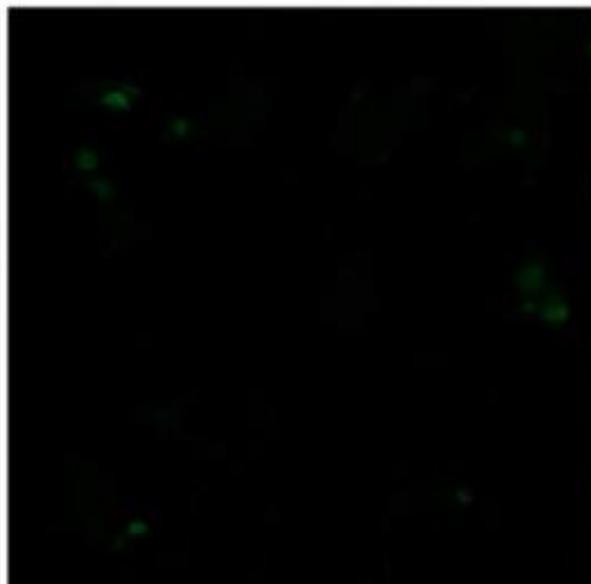
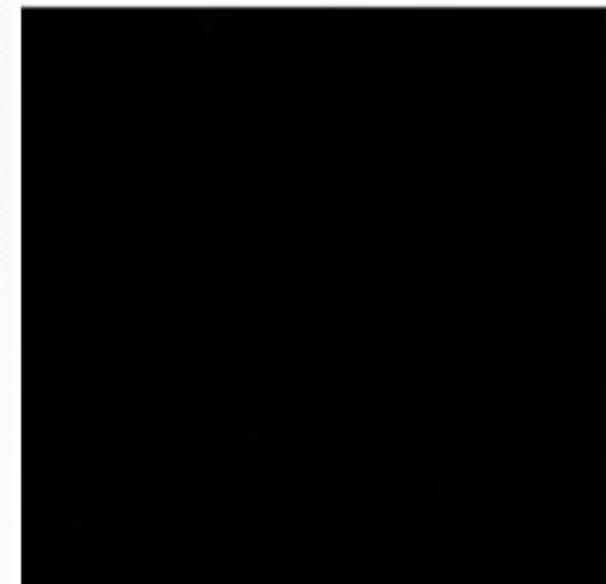
A

B

PPRV感染vero细胞

100μm

100μm



vero

样品	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	效价 (IU/0.1mL)
<i>Ovi-His-γ</i>	6	4	3	3	2	$10^{5.83}$
<i>Ovi-γ</i>	3	4	3	2	3	$10^{5.64}$
<i>Ovi-a</i>	2	3	4	3	1	$10^{5.54}$
<i>Ovi-λ</i>	6	6	2	1	0	$10^{5.61}$



图中为讨论时照片；
从左至右依次为朱和权、窦金萍、张瑞雪、刘尧尧



谢谢大家!



2021.12.19