

产品手册

SARS-CoV-2 Spike(K417N+E484K+N501Y)

Pseudotyped Virus (GFP-Luciferase)

SARS-CoV-2 Spike(K417N+E484K+N501Y)

Pseudotyped Virus (GFP-Luciferase)S 蛋白假病毒

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V6.0.1

目录

一、	产品基本信息及组分.....	3
二、	包装、运输及储存.....	3
三、	原理描述.....	3
四、	产品简介.....	4
五、	感染能力.....	4
六、	使用方法.....	5
七、	结果示例.....	8
八、	相关产品.....	9
九、	常见问题.....	10
十、	参考文献.....	11
十一、	附录.....	11

Genomeditech

一、产品基本信息及组分

基本信息

产品编号	产品名称
	SARS-CoV-2 Spike(K417N+E484K+N501Y)Pseudotyped Virus (GFP-Luciferase)
GM-0220PV31	SARS-CoV-2 Spike(K417N+E484K+N501Y)Pseudotyped Virus (GFP-Luciferase) S 蛋白假病毒

组成成分

组分编号	产品名称	储存	编号/规格		
			GM-0220PV31	GM-0220PV31	GM-0220PV31
			-96T	-480T	-960T
GM-28162LV	SARS-CoV-2 Spike (K417N+E484K+N501Y)Pseudotyped Virus (GFP-Luciferase)	-80°C	50μL/管*1 管	50μL/管*5 管	50μL/管*10 管
GM-28162LV-R20	SARS-CoV-2 Spike (K417N+E484K+N501Y) Pseudotyped Virus (GFP-Luciferase)	-80°C	20μL/管*1 管	20μL/管*1 管	20μL/管*1 管

二、包装、运输及储存

1. 假病毒产品干冰运输，-80°C储存。（保存时间以 12 个月以内为宜，如保存时间过长，使用前请重新检测病毒滴度）
2. 请收到产品立即确认产品是否为冻存状态，并立即存入-80°C冰箱。

三、原理描述

S 蛋白是冠状病毒最重要的表面膜蛋白，含有 S1 和 S2 两个亚基。其中 S1 包含受体结合域（receptorbinding domain, RBD），负责识别细胞的受体。S2 含有膜融合过程所需的基本元件。研究发现，S 蛋白介导受体结合和膜融合，对病毒感染宿主细胞起重要作用，此外，S 蛋白上含有刺激中和抗体的主要抗原及细胞毒性淋巴细胞的重要靶标，是疫苗设计、治疗性抗体和诊断方法的关键靶标(Walls et al., 2020; Wang et al., 2020; Zhang et al., 2020)。

为避免传统的 SARS-CoV-2 病毒中和试验需要操作活毒而存在的生物安全隐患，吉满生物建立了基于假病毒系统的操作较安全的 SARS-CoV-2 中和试验技术平台。本产品以 HIV 慢病毒载体和 SARS-CoV-2 S 蛋白为基础，将 SARS-CoV-2 S 蛋白替换慢病毒包膜蛋白 VSVG，与慢病毒包装质粒和 CMV- ZsGreen1-T2A-Luciferase 质粒共转染 293T 细胞，包装 SARS-CoV-2 S 假病毒，表面表达 SARS-CoV-2 S 蛋白，并且同时携带 ZsGreen1 荧光和 Luciferase 荧光素酶报告基因，可通过观察荧光和检测荧光素酶活性评价假病毒感染细胞的活性，该假病毒无自主复制能力，安全性高。

K417N+E484K+N501Y 氨基酸突变型假病毒是根据南非的 501Y.V2 突变株改造而来，可用于 K417N+E484K+N501Y 突变型的 SARS-CoV-2 受体药物筛选、中和抗体检测及疫苗效果评价等。

ZsGreen1 相较于传统 GFP 的主要优势在于：本身量子产率更高、荧光更亮，同时 ZsGreen1 对 pH 和环境条件相对更稳定，有利于提高检测的灵敏度和信噪比。

四、 产品简介

此假病毒产品是以 NCBI Reference Sequence: NC_045512.2 中的 Spike 蛋白为假病毒刺突蛋白，具体突变位点为：K417N、E484K、N501Y，并基于 HIV 慢病毒包装体系，构建的将 ZsGreen1 绿色荧光和 Luciferase 萤火虫荧光素酶基因表达质粒包裹在内的具备感染 293T-ACE2 细胞能力的复制缺陷型假病毒，可以通过荧光和 Luciferase 值的测定假病毒感染的能力。

五、 感染能力

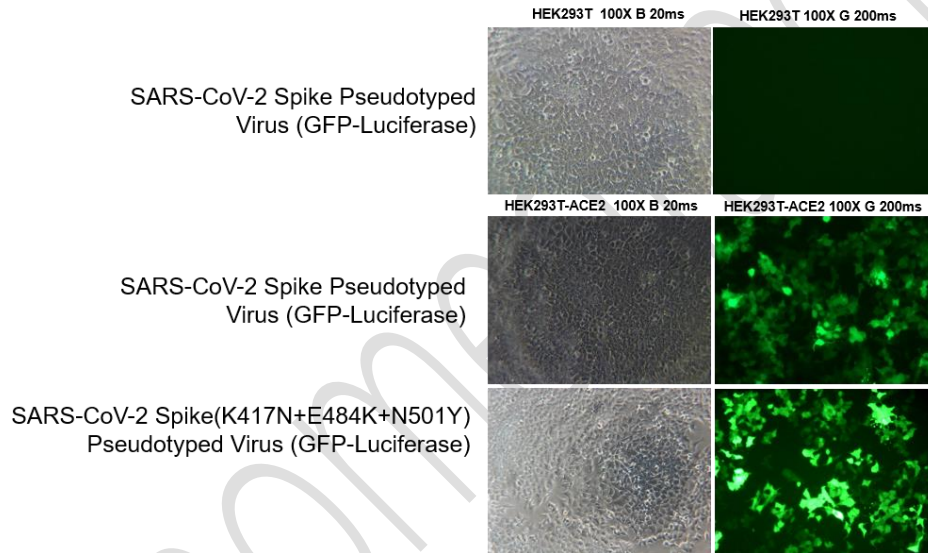


图 1 SARS-CoV-2 Spike S 蛋白及突变型假病毒感染 HEK293 与 HEK293T-ACE2 荧光图片

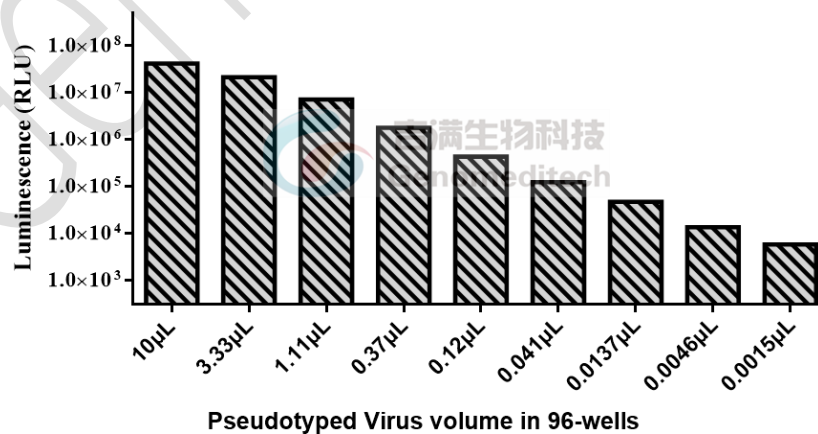


图 2 吉满 SARS-CoV-2 Spike S 蛋白(K417N+E484K+N501Y)突变型假病毒感染 HEK293T-ACE2 测定 Luciferase 数值

六、使用方法

(以 VF9436 批号假病毒为例进行中和抗体检测, 如果病毒保存温度正确并使用我公司细胞系 (GM-C12968), 研究人员可使用 Certificate of Analysis 上标注的推荐量直接进行正式实验)

1. 病毒量预实验:

使用流式细胞仪 (ACEA/NovoCyte) 测定不同体积的假病毒感染效率 (假病毒对不同细胞的感染效率不同, 正式实验前建议进行预实验确定最合适病毒量, 以免造成由病毒量过少或过多导致的测定数据失真)

a) 细胞铺板:

实验前一天, 将待感染 HEK293T- ACE2 细胞 (Cat. GM-C12968) 细胞接种于 96 孔细胞培养板中, 接种量约为 1×10^4 个细胞/孔, 次日进行病毒感染时, 细胞密度在 30% 左右为佳。

b) 假病毒感染液稀释

取出预实验所需假病毒 (20 μ L) 置于冰上融化或 4 $^{\circ}$ C 条件下自然融化, 待其完全融化后, 按下列稀释条件进行假病毒感染液的 3 倍浓度梯度稀释:

S1: 第一个 96 孔, 20 μ L 病毒原液+180 μ L 完全培养基, 混匀后, 100 μ L 每孔换液;

S2: 60 μ L S1+120 μ L 完全培养基, 混匀后, 100 μ L 每孔换液;

S3: 60 μ L S2+120 μ L 完全培养基, 混匀后, 100 μ L 每孔换液;

.....

S11: 60 μ L S10+120 μ L 完全培养基, 混匀后, 100 μ L 每孔换液;

S0: 直接加入 100 μ L 完全培养基



图 3 假病毒感染液稀释示例图

c) 假病毒感染:

从培养箱取出提前铺好 HEK293T- ACE2 细胞的 96 孔板, 在镜下观察细胞是否污染, 密度, 状态, 用排枪将上层培养基吸去 (注意枪头不要碰到 96 孔板底部的细胞, 可将 96 孔板倾斜后吸去)。

将稀释好的病毒感染液加入铺好 HEK293T- ACE2 细胞的 96 孔板中, 注意沿孔壁加入避免冲起细胞。

病毒感染后 6 小时 更换新鲜完全培养基继续培养 48 小时。

d) 流式测定感染效率:

吸去 S0-S11 孔的上清, 加入 PBS 润洗后, 每孔加入 20 μ L TE 消化, 细胞脱落后, 加入 80 μ L 完全培养基终止消化, 并重悬在原孔, 以 S0 为对照, 使用 488 通道检测荧光。

2. 正式实验:

a) 细胞铺板:

同病毒量预实验。

b) 抗体稀释

本实验使用文献中(Zeng et al., 2020) 中和抗体效果较好的 rRBD-15 抗体进行假病毒中和实验, 根据抗体母液的浓度, 将其按 3 倍梯度连续稀释。

抗体原始浓度为 3mg/mL。第一孔 S1 稀释浓度是 60 μ g/mL, 中和孵育的终浓度是 30 μ g/mL。

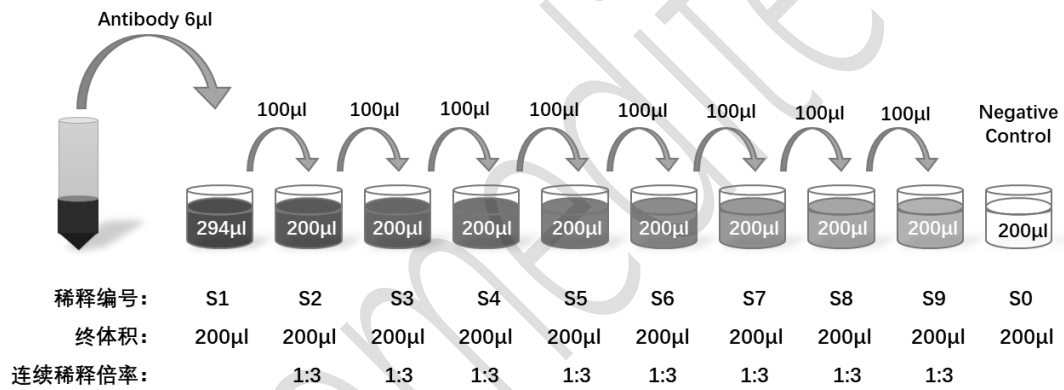


图 4 抗体稀释示例图

c) 假病毒感染液稀释

假病毒解冻步骤同预实验, 并根据预实验测定假病毒使用量配置稀释液:

➢ 0.37 μ L 假病毒:

取 595.56 μ L 完全培养基, 加入 4.44 μ L 病毒原液混匀, 55 μ L 分装 10 个 EP 管 (预留 5 μ L)。

➢ 0.13 μ L 假病毒:

取 598.44 μ L 完全培养基, 加入 1.56 μ L 病毒原液, 混匀, 55 μ L 分装 10 个 EP 管 (预留 5 μ L)。

d) 假病毒中和抗体孵育

按下表将连续稀释的抗体 (盛世君联: rRBD-15) 与上述假病毒液等体积混合

表 假病毒抗体孵育液配置方式

组分	体积
假病毒感染稀释液	55 μ L
抗体稀释液	55 μ L
Total	110 μ L

混合液在室温孵育 1 小时 (Ou et al., 2020)。

e) 感染检测:

从培养箱取出提前铺好 HEK293T- ACE2 细胞的 96 孔板, 在镜下观察细胞是否污染, 密度, 状态, 用排枪将上层培养基吸去 (注意枪头不要碰到 96 孔板底部的细胞, 可将 96 孔板倾斜后吸去)。

吸取 100 μ L 稀释好的假病毒抗体混合液加入铺好 HEK293T- ACE2 细胞的 96 孔板中, 注意沿孔壁加入避免冲起细胞。

处理 6H 更换新鲜完全培养基继续培养 48 小时。

f) 荧光素酶检测:

感染假病毒换液后 48 小时, 通过荧光素酶检测试剂盒 (Luciferase Assay Kit 100 tests Genomeditech/GM-040513A) 在酶标仪 (Moleculardevices/SpectraMax L) 上检测荧光素酶的活性判定抗体中和效率。

g) 数据分析:

感染抑制率(Sun et al., 2020)

$$\text{Inhibition}(\%) = \left(1 - \frac{\text{处理组 RLU} - \text{空白}}{\text{SO RLU} - \text{空白}} \right) \%$$

GraphPad Prism 6.0 计算 50%中和剂量。

使用注意事项:

- 1、冻融会导致假病毒稳定性降低, 从而影响检测结果, 使用时应避免反复冻融。
- 2、病毒操作时请在生物安全柜中进行。
- 3、病毒操作时请穿好实验服, 戴口罩和乳胶手套。
- 4、如果使用时本品不慎溅到眼睛、皮肤或其他身体部位请立即使用大量清水冲洗。
- 5、使用本品所产生的实验废弃物需要通过高压灭菌处理后按照医疗废弃物处理要求进行处理。

七、 结果示例

(以 VF9436 批号假病毒为例进行中和抗体检测, 如果病毒保存温度正确并使用我公司细胞系 (GM-C12968), 研究人员可使用 Certificate of Analysis 上标注的推荐量直接进行正式实验)

1. 病毒量预实验:

10%-40%的荧光效率是合适的假病毒量范围。所以选取 0.37 μ L 和 0.13 μ L 进行正式实验。



图5 不同 SARS-CoV-2 Spike S 蛋白假病毒体积感染 HEK293T-ACE2 细胞后荧光检测结果

2. 正式实验:

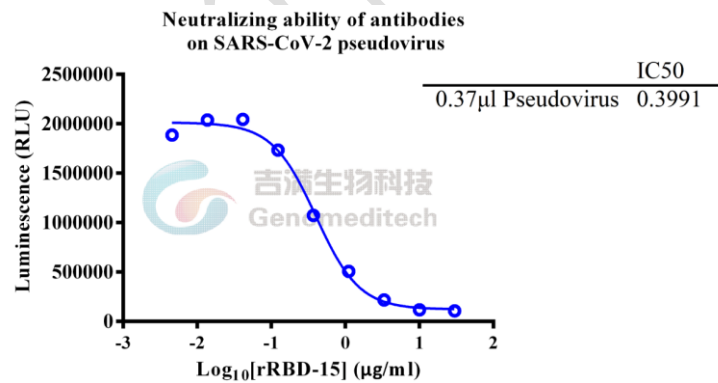


图6 抗体 rRBD-15 抗体的中和验证结果 (0.37 μ L 假病毒)

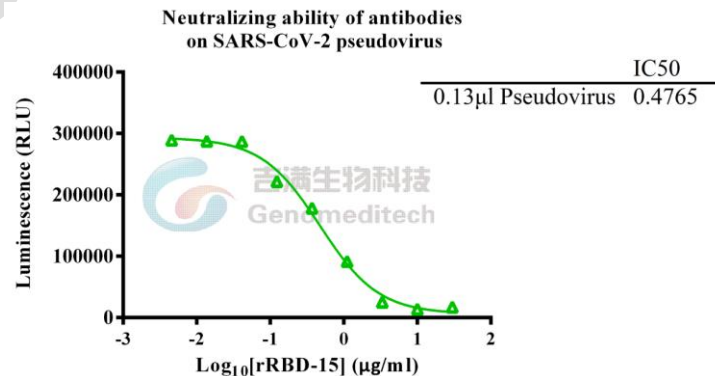


图7 抗体 rRBD-15 抗体的中和验证结果 (0.13 μ L 假病毒)

八、相关产品

SARS-CoV-2 Spike Pseudotyped Virus (可用于中和抗体筛选和评价)

货号	名称	规格
GM-0220PV07	SARS-CoV-2 Spike Pseudotyped Virus (GFP-Luciferase)	96T/480T/960T
GM-0220PV14	SARS-CoV-2 Spike(D614G) Pseudotyped Virus (GFP-Luciferase)	96T/480T/960T
GM-0220PV51	SARS-COV-2 Spike(Delta+)Pseudotyped Virus (GFP-Luciferase)	96T/480T/960T
GM-0220PV102-96T/480T/960T	SARS-COV-2 Spike(XBB.1)Pseudotyped Virus (GFP-Luciferase)	96T/480T/960T
GM-0220PV200-96T/480T/960T	SARS-COV-2 Spike(LP.8.1)Pseudotyped Virus (GFP-Luciferase)	96T/480T/960T
GM-0220PV201-96T/480T/960T	SARS-COV-2 Spike(MC.10.1)Pseudotyped Virus (GFP-Luciferase)	96T/480T/960T
GM-0220PV203-96T/480T/960T	SARS-COV-2 Spike(NB.1.8.1)Pseudotyped Virus (GFP-Luciferase)	96T/480T/960T
GM-0220PV204-96T/480T/960T	SARS-COV-2 Spike(BA.3.2)Pseudotyped Virus (GFP-Luciferase)	96T/480T/960T
GM-0220PV206-96T/480T/960T	SARS-COV-2 Spike(LP.8.1.1) Pseudotyped Virus (GFP-Luciferase)	96T/480T/960T
GM-0220PV207-96T/480T/960T	SARS-COV-2 Spike(XFG) Pseudotyped Virus (GFP-Luciferase)	96T/480T/960T
GM-0220PV208-96T/480T/960T	SARS-COV-2 Spike(XEC.4) Pseudotyped Virus (GFP-Luciferase)	96T/480T/960T

中和抗体检测用细胞系

货号	名称	规格
GM-C12968	H_ACE2 HEK-293T Cell Line	1 管 (5E6 Cell/mL)
GM-C09232	H_ACE2 CHO-K1 Cell Line	1 管 (5E6 Cell/mL)
GM-C07758	Vero E6 Cell Line	1 管 (5E6 Cell/mL)

SARS-CoV-2 abEN 假病毒 (可用做标准品)

货号	名称	规格
GM-0220PV01-1	SARS-CoV-2 abEN 假病毒(SARS-CoV-2 abEN pseudovirus)	1 mL*1 管 (>1E8 Copy/mL)
GM-0220PV08-1	SARS-CoV-abEN 假病毒(SARS-CoV-abEN pseudovirus)	1 mL*1 管 (>1E8 Copy/mL)
GM-0220PV09-1	MERS-CoV-abEN 假病毒(MERS-CoV-abEN pseudovirus)	1 mL*1 管 (>1E8 Copy/mL)

其它新冠相关产品

货号	名称	规格
GM-0220PV02-1	PGMLV-CMV-SARS-CoV-2 Spike-Luciferase Lentivirus	1E7 TU
GM-0220PV03-1	PGMLV-CMV-SARS-CoV-2 eGFP Lentivirus	1E7 TU
GM-0220PV04-1	PGMLV-CMV-H_ACE2-PGK-Puro Lentivirus	1E8 TU
GM-0220PV05-1	PGMLV-CMV-H_BSG(CD147)-PGK- Puro Lentivirus	1E8 TU
GM-0220PV06-1	PGMLV-CMV-SARS-COV-2 T2A-eGFP Lentivirus	1E7 TU

更多产品或突变型详询公司官网或联系销售，电话：021-50432825。

九、常见问题

- 为何使用过表达 ACE2 基因的 HEK293T 细胞进行中和抗体实验？
这种细胞系提供了均一、高水平的 ACE2 受体，使病毒感染完全依赖于“刺突蛋白（S 蛋白）-ACE2”这一途径，从而建立了一个高度标准化和敏感的检测系统，能够更准确、更灵敏地比较不同抗体或血清的中和能力。
- 如果检测数值低或者没有数值？
 - 在添加抗体和假病毒稀释液时，确保细胞是健康的。
 - 确保使用合适的检测试剂，并按要求储存和准备。
 - 确保软件设置无误
 - 确保机器正确读取 96 孔板的数值
 - 细胞分泌的蛋白质过高可能会干扰中和抗体的检测，确保换液操作正常。
 - 应使用白色检测板，黑色检测板可能会降低信号。
- 每次测量重复性差？
 - 确保移液器等经过适当的校准，并正确使用。
 - 避免细胞结块，细胞数量的不均匀会导致重复性差。
- 如果使用患者血清如何进行检测？
血清需在 56℃ 灭活 30 分钟后使用(Sun et al., 2020)。
- 突变型的假病毒和野生型的假病毒在中和抗体实验上有什么区别么？
操作流程相同，但不同突变型伪病毒对中和抗体的敏感性可能差别很大，需要分别测定。
- 假病毒能否感染 Huh7 或 VeroE6 细胞？
经吉满测试，假病毒不能很好的感染 Huh7 或 VeroE6 细胞。建议构建过表达 ACE2 的细胞系，或增大假病毒的使用量，以上两种方法均需进行预实验测试。

十、参考文献

- Ou, X., Liu, Y., Lei, X., Li, P., Mi, D., Ren, L., Guo, L., Guo, R., Chen, T., Hu, J., et al. (2020). Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun* 11, 1620.
- Sun, C., Chen, L., Yang, J., Luo, C., Zhang, Y., Li, J., Yang, J., Zhang, J., and Xie, L. (2020). SARS-CoV-2 and SARS-CoV Spike-RBD Structure and Receptor Binding Comparison and Potential Implications on Neutralizing Antibody and Vaccine Development (bioRxiv).
- Walls, A.C., Park, Y.J., Tortorici, M.A., Wall, A., McGuire, A.T., and Velesler, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* 181, 281-+.
- Wang, C.Y., Li, W.T., Drabek, D., Okba, N.M.A., van, R., Osterhaus, A.D.M.E., van Kuppeveld, F.J.M., Haagmans, B.L., Grosveld, F., and Bosch, B.J. (2020). A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun* 11.
- Zhang, L.L., Lin, D.Z., Sun, X.Y.Y., Curth, U., Drosten, C., Sauerhering, L., Becker, S., Rox, K., and Hilgenfeld, R. (2020). Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved alpha-ketoamide inhibitors. *Science* 368, 409-+.
- Zeng, X., Li, L., Lin, J., Li, X., Liu, B., Kong, Y., Zeng, S., Du, J., Xiao, H., Zhang, T., Zhang, S., & Liu, J. (2020). Isolation of a human monoclonal antibody specific for the receptor binding domain of SARS-CoV-2 using a competitive phage biopanning strategy. *Antibody Therapeutics*, tbaa008.

十一、附录

表 IgG 抗体分子量约为 150KD 下的浓度换算

稀释编号	浓度 (μg/mL)	浓度 (nM)
S1	30μg/mL	200nM
S2	10μg/mL	66.67nM
S3	3.33μg/mL	22.22nM
S4	1.11μg/mL	7.41nM
S5	370.37ng/mL	2.47nM
S6	123.46ng/mL	0.82nM
S7	41.15ng/mL	0.27nM
S8	13.72ng/mL	0.09nM
S9	4.57ng/mL	0.03nM