

用噬菌体随机肽库筛选 SARS 冠状病毒 S 蛋白单克隆抗体 2C5 的模拟表位

Identification of Mimotope Peptides Which Bind to the SARS-CoV Spike Protein Specific Monoclonal Antibody 2C5 with Phage-Displayed Peptides Library

华荣虹, 吴东来, 童光志*, 王云峰, 田志军, 周艳君

HUA Rong-Hong, WU Dong-Lai, TONG Guang-Zhi*, WANG Yun-Feng, TIAN Zhi-Jun and ZHOU Yan-Jun

中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室 哈尔滨 150001

National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural of Science, Harbin 150001, China

摘要 SARS-CoV S 蛋白特异的单克隆抗体 2C5 具有病毒中和作用。以单克隆抗体 2C5 为筛选靶分子, 筛选噬菌体展示随机 7 肽库。经三轮淘洗后随机挑选 20 个噬菌体克隆进行 ELISA 分析和序列测定。在 10 个 ELISA OD 值大于 0.2 的阳性噬菌体克隆中, 有 8 个噬菌体克隆展示有共同的 7 肽序列 TPEQQFT。展示有该序列的噬菌体克隆能竞争抑制 SARS-CoV S 蛋白抗原与单抗 2C5 的结合。结果表明 TPEQQFT 为单克隆抗体 2C5 的模拟表位。该结果可对进一步研究 S 蛋白结构与功能和设计 SARS 疫苗有一定的参考意义。

关键词 SARS 冠状病毒(SARS-CoV) S 蛋白, 单克隆抗体, 噬菌体随机肽库, 模拟表位

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)05-0701-06

Abstract To identify the epitope of SARS-CoV spike protein specific neutralizing monoclonal antibody(MAb) 2C5. The antibody was used as target and three rounds of bio-panning were conducted with phage-display peptide library. After the third panning, 20 phage-plague clones were randomly picked and analyzed for the binding ability with the MAb 2C5 by ELISA. The display sequence analysis demonstrated that among the twenty phage clones, eight clones displayed the same seven-peptide TPEQQFT. All these eight phage-clones showed strongest binding activity with 2C5 in phage ELISA analysis. Furthermore, phages displaying peptide TPEQQFT could specifically inhibit the binding of MAb 2C5 with SARS-CoV spike protein. The results demonstrated that TPEQQFT is a mimic epitope peptide containing neutralizing MAb 2C5. This study may provide information for further structural and functional analysis of spike protein and development vaccine for severe acute respiratory syndrome.

Key words severe acute respiratory syndrome coronavirus virus (SARS-CoV), spike protein, monoclonal antibody, phage-displayed peptides library, mimotope

Received: March 9, 2006; Accepted: April 27, 2006.

This work was supported by a Heilongjiang postdoctoral grant (No. HPD2003045)

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-451-82734181; E-mail: gztong@hvri.ac.cn

黑龙江省博士后基金资助 (No. HPD2003045)

SARS 冠状病毒的 S 蛋白是病毒粒子表面一种重要的结构蛋白,负责与宿主细胞受体相结合,决定病毒的细胞嗜性^[1-4]。S 蛋白具有良好的免疫原性,可诱导机体产生病毒中和抗体,在机体的免疫保护中发挥重要作用,是设计研究 SARS 疫苗的候选靶标^[5-8]。SARS 冠状病毒 S 蛋白单克隆抗体的制备,特别是中和性单克隆抗体制备,对 SARS 的治疗和诊断具有重要意义,而且已经有数个实验室在从事单克隆抗体的制备工作^[9-12]。对 S 蛋白结构与功能的研究方面,抗原表位的鉴定是一项重要的工作,特别是对中和性抗原表位的鉴定,将有助于 SARS 基因工程疫苗的设计研究。目前已经有多个对 SARS 冠状病毒结构蛋白线性表位的报道^[13-16],特别是 S 蛋白中还鉴定出了一些具有中和活性的线性抗原表位。但是 S 蛋白中,特别是受体结合结构域部分在免疫保护中发挥重要作用的主要还是构象型表位^[17],而对构象表位难以鉴定。用噬菌体随机肽库筛选抗原表位是抗原表位鉴定中常用的一种方法。该方法不仅可以鉴定线性抗原表位,而且可以得到其它方法很难鉴定的蛋白抗原构象表位的模拟表位。本研究以具有中和活性的单克隆抗体 2C5 为靶分子,用噬菌体展示的 7 肽随机肽库进行淘洗,以鉴定单抗 2C5 的表位。以期为进一步研究 S 蛋白的结构与功能提供依据。

1 材料与方法

1.1 噬菌体随机肽库、菌株和单克隆抗体

噬菌体随机 7 肽库 ph. D.-C₇CTM 购自 New England Biolabs 公司,库容量为 1.2×10^9 。大肠杆菌 ER2378 为本实验室保存。SARS-CoV S 蛋白单克隆抗体 2C5 为解放军军事医学科学院提供,此单克隆抗体具有病毒中和活性。

1.2 其它试剂与材料

质粒 pGEX-6P-1、大肠杆菌 DH5 α 及 BL21 均为本实验室保存。真核表达 SARS 冠状病毒 S 蛋白抗为哈尔滨兽医研究所步志高研究员提供。抗噬菌体 M13 抗体为 Promega 公司产品。

1.3 噬菌体的滴定

噬菌体的滴定参照试剂盒说明书进行操作。主要过程如下:从大肠杆菌 ER2378 平板上挑一个单菌落,接种于 5~10mL LB 培养基中,于 37℃ 振荡培养至对数生长期 (OD_{600} 约为 0.5)。细菌长好后将上层琼脂在微波炉中加热融化后于 50℃ 水浴中备用。用 LB 培养基将待滴定的噬菌体进行 10 倍系列稀

释。每个稀释度取 10 μ L 加入到分装有 200 μ L 细菌培养物中,混匀后室温感作 5min。将感作好的混合液全部转入上层琼脂中,迅速混匀后到入 LB/Tet/IPTG/X-Gal 平板上,摇动平板使琼脂平铺于平板上层。室温放置 5min,37℃ 过夜培养。计数蓝色噬斑,计算噬菌体的噬斑形成单位。

1.4 噬菌体肽库的亲筛选

亲和筛选过程参照说明书进行,简述如下:将单克隆抗体 2C5 以 0.1mol/L NaHCO₃ (pH8.6) 溶液包被 ELISA 孔板,4℃ 过夜。湿盒中于 4℃ 封闭 2h。TBST 洗涤 ELISA 板孔 5 次。立即进入淘选过程,注意不要让孔干燥。用 100 μ L TBST 将噬菌体肽库稀释至 2×10^{11} 个噬菌体,加入至板孔中,置于封闭、湿润的盒中,室温振荡摇动 60min。弃去未结合的噬菌体,在洁净的吸水纸上拍干。用 TBST 将板孔洗 10 次,注意每一次都要更换一块干净的纸巾,以防交叉污染。往冲洗后的板孔中加入 100 μ L 洗脱液,室温轻轻摇动 15min;将洗脱液吸入一个无菌的 eppendorf 离心管中,立即加入 15 μ L 的 1mol/L Tris·HCl (pH9.1) 中和洗脱液,混匀后溶液的 pH 值在 7~8.5 之间。取 1 μ L 洗脱下的噬菌体按照上文所述方法进行滴定噬菌斑形成单位。剩余的噬菌体洗脱物用细菌 ER2378 培养物进行扩增。用扩增后的噬菌体进行下一轮筛选,在 LB/IPTG/X-Gal 平板上滴定第三轮筛选后洗脱获得的噬菌体。在第三轮筛选后洗脱噬菌体滴定板中,选择噬菌斑少于 100 个的平板,从该平板中用灭菌的吸头随机挑取 20 个单个噬斑,每挑取一个噬斑换一个吸头。加入到装有 100 倍稀释的过夜培养的 ER2378 的试管中,一个克隆一个试管。于 37℃ 剧烈振荡培养 4.5h。后将培养物收到离心管中,离心 30s。上清转移到新的离心管中,再离心。吸取 80% 上清至一个新的离心管中,即为扩增后的噬菌体,可以在 4℃ 数周,如长期保存可以按 1:1 加入灭菌甘油, -20℃ 保存。这些噬菌体克隆依次命名为 2C5P1、2C5P2 至 2C5P20。

1.5 噬菌体序列的测定

将挑取的 20 个噬菌体制备单链噬菌体 DNA 进行序列测定分析。单链 DNA 模板的制备按以下步骤进行:将 1.4 中扩增的噬菌体各取 500 μ L 于新的离心管中,每管中加入 200 μ L PEG/NaCl 混合后室温静置 10min,12000g 离心 10min,沉淀溶于 100 μ L 碘化钠缓冲液,再向其中加入 250 μ L 无水乙醇,室温静置 10min,12000g 离心 10min 弃尽上清,用 70% 乙醇洗沉淀一次,用 30 μ L 灭菌去离子水将沉淀悬起,即可

作为噬菌体测序模板。测序引物为 M13-96 引物,序列为 5'-GCCCTCATAGTTAGCGTAACG-3'。序列测定由上海博亚生物技术有限公司完成。

1.6 噬菌体 ELISA

将单克隆抗体 2C5 用包被液稀释成 $10\mu\text{g}/\text{mL}$,按每孔 $100\mu\text{L}$ 加入 96 孔 ELISA 板中 4°C 包被过夜。用洗液(TBST, 0.5% Tween-20)洗涤 3 次后,加入封闭液 37°C 封闭 1h,洗涤 3 次。将纯化的噬菌体用 TBS 稀释成 10^{12} pfu/mL,取 $100\mu\text{L}$ 加入到每孔中,每个样品重复 3 孔,室温感作 2h 后,用洗液洗涤 5 次,每孔加入 $100\mu\text{L}$ 1:5000 稀释的 HRP 标记-鼠抗 M13 噬菌体抗体(Pharmacia) 37°C 感作 1h;用洗液洗涤 5 次,OPD 显色 20min 后,用 $2\text{mol}/\text{L}$ H_2SO_4 终止。

1.7 噬菌体竞争抑制 ELISA

用真核表达 SARS 冠状 S 蛋白包被 ELISA 板约 $1\mu\text{g}/\text{孔}$, 4°C 包被过夜。用 TBS 将纯化的噬菌体 2C5P14 10 倍梯度稀释,同时用野生型 $\text{V}_{\text{cs}}\text{M13}$ 噬菌体作为对照,使其浓度依次为 2×10^{12} , 2×10^{11} , 至 2×10^4 。各取 $50\mu\text{L}$ 与等体积适当稀释的单抗 2C5 混合 37°C 作用 1h。感作后加入 ELISA 孔中,每孔重复 3 次。 37°C 作用 1h,洗涤后加入 5000 倍稀释的 HRP 标记羊抗鼠 IgG 37°C 作用 1h,洗涤后用 OPD 显色,测定 492nm OD 值。

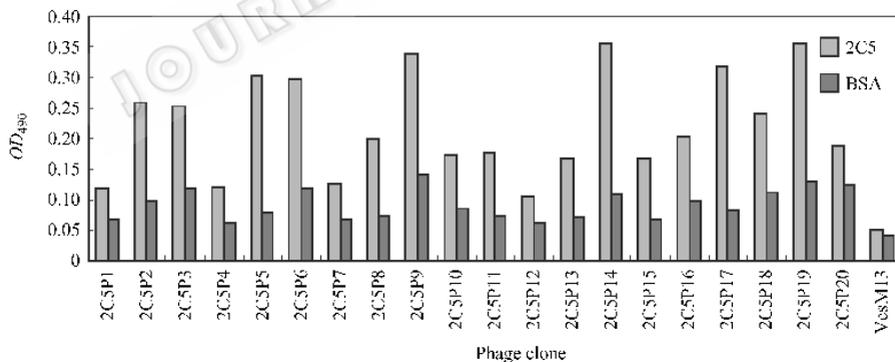


图1 噬菌体与单克隆抗体 2C5 的 ELISA 结合分析

Fig.1 ELISA analysis the binding ability of diluted phages clone to MAb 2C5

2.3 噬菌体展示序列的测定与分析

经序列测定表明,在第三轮洗脱物中随机挑选的 20 个克隆中,其展示的 7 肽序列有 8 个是一致的,为 TPEQQFT。而且这 8 个克隆与单抗 2C5 的结合能力最好,其 ELISA OD 值均大于 0.25(表 2),测序结果与 ELISA 结果有很高的一致性,表明序列 TPEQQFT 为单克隆抗体 2C5 的模拟抗原表位。为进一步分析 S 蛋白中 2C5 表位的结构,将 TPEQQFT 7 肽序列与 S 蛋白全长序列进行比对分析。结果发

2 结果

2.1 噬菌体肽库的筛选

为了证明噬菌体肽库筛选系统的有效性,在三次淘洗过程中,通过不断提高洗涤液中 Tween-20 的浓度而逐渐严格洗涤条件,经三轮“吸附-洗脱-扩增”富集筛选后,测定噬菌体的输入与收获率,结果如表 1 所示。结果表明经每一轮筛选后,噬菌体都得到了富集。

表 1 噬菌体肽库的筛选

Table 1 Bio-Panning with the peptide library

	1 st screening	2 nd screening	3 rd screening
Input	2×10^{10} pfu	5×10^8 pfu	5×10^8 pfu
Output	1.7×10^5 pfu	3.7×10^5 pfu	1.9×10^7 pfu
Out/In	$8.5 \times 10^{-4} \%$	0.074%	3.8%

2.2 噬菌体的克隆与结合分析

挑取第三轮筛选后洗脱物中的 20 个噬斑克隆,并扩增纯化得到了 20 个噬菌体克隆。用单克隆抗体 2C5 包被 ELISA 板后,检测 20 个噬菌体克隆与单抗的结合能力。结果表明,OD 值大于 0.2 的有 10 个,OD 值大于 0.25 的有 8 个噬菌体克隆(图 1),表明经三轮筛选后,噬菌体随机肽库得到了很好的富集,并且这种富集作用很特异。

现 7 肽序列 TPEQQFT 分散于 S 蛋白第 539 至 559 氨基酸残基序列间(图 2)。可能 539-559 片段即为单抗 2C5 的连续表位序列。

2.4 噬菌体的竞争 ELISA

序列测定分析以及与单抗 2C5 的 ELISA 分析表明,经三轮筛选后得到了一致的展示 7 肽序列。为了进一步验证该序列为 S 蛋白表位的可能性,分析了展示有该 7 肽序列的噬菌体克隆 2C5P14 对单抗 2C5 与 S 蛋白抗原结合的抑制效果。结果表明,噬

表 2 噬菌体序列测定结果
Table 2 Sequence analysis of selected

Phage clone No.	OD ₄₉₀	DNA sequence	AA sequence
2c5p1	0.119	ACGAAGTCTCCTCTCTGCAG	TKSPPLQ
2c5p2	0.258	ACGCGTGAGCAGCAGTTACT	TPEQQFT
2c5p3	0.253	ACGCGTGAGCAGCAGTTACT	TPEQQFT
2c5p4	0.121	ACGAAGTCTCCTCTCTGCAG	TKSPPLQ
2c5p5	0.302	ACGCGTGAGCAGCAGTTACT	TPEQQFT
2c5p6	0.298	ACGCGTGAGCAGCAGTTACT	TPEQQFT
2c5p7	0.127	ACGAAGTCTCCTCTCTGCAG	TKSPPLQ
2c5p8	0.200	ACGAAGTCTCCTCTCTGCAG	TKSPPLQ
2c5p9	0.338	ACGCGTGAGCAGCAGTTACT	TPEQQFT
2c5p10	0.173	ACTCCTTCGGCGCTTGGAGT	TPSALAS
2c5p11	0.176	TCTTGGCCTAATACGAGTAAT	SWPNTSN
2c5p12	0.107	ACGTCGCTGCTGAGGGGCGAG	TSLLRGQ
2c5p13	0.168	CCTCCGATGCCGAATACGACG	PPMPNTT
2c5p14	0.357	ACGCGTGAGCAGCAGTTACT	TPEQQFT
2c5p15	0.167	ACTCCTTCGGCGCTTGGAGT	TPSALAS
2c5p16	0.203	TCTTGGCCTAATACGAGTAAT	SWPNTSN
2c5p17	0.318	ACGCGTGAGCAGCAGTTACT	TPEQQFT
2c5p18	0.242	CATGCTACGCATACGAATTAT	HATHNTY
2c5p19	0.355	ACGCGTGAGCAGCAGTTACT	TPEQQFT
2c5p20	0.187	ACTCCTTCGGCGCTTGGAGT	TPSALAS

* OD₄₉₀在 0.25 以上有 8(2,3,5,6,9,14,17,19)个,全为:TPEQQFT;OD₄₉₀在 0.2 以上的有 10 个,8 个:TPEQQFT(16);SWPNTSN(18);HATHNTY



图 2 噬菌体展示肽序列与 S 蛋白序列的比对分析

Fig.2 Sequence alignment between the peptide displayed on the phage and S protein of SARS-CoV of BJ01 strain

菌体 2C5p14 对 S 蛋白抗原具有竞争抑制作用,当噬菌体数量为 10^{11} pfu/孔时几乎能完全抑制 2C5 与 S 蛋白的结合(图 3)。

3 讨论

Smith 于 1985 年^[18]首次报道运用基因工程方法可将外源性多肽序列与丝状噬菌体 fd 的外壳蛋白融合表达并展示在噬菌体表面,随后又证明展示于噬菌体表面的多肽能够被特异性抗体所识别^[19]。噬菌体展示使表达的多肽以融合蛋白形式展现在噬菌体表面,保持相对独立的空间结构和生物活性,并且可用免疫学亲和纯化方法筛选,因此噬菌体展示是一种筛选靶蛋白和多肽的强有力方法。该技术可用于研究多肽或蛋白质的性质、相互识别和作用,能

从巨大展示肽库中选择特定功能的多肽结构。噬菌体表面展示技术广泛用于蛋白质相互作用的研究、新型疫苗的研制、药物的开发及诊断试剂制备、抗原表位的鉴定、特异性调节分子的分离、细胞表面工程的研究等方面^[20,22]。

将人工合成的随机排列的寡核苷酸插入丝状噬菌体 pIII 或 pVIII 基因的信号肽和成熟蛋白编码区之间,经转导后插入 DNA 片段以融合蛋白形式表达并装配在噬菌体表面,这些表达不同短肽(代表不同序列)的重组噬菌体构成噬菌体展示肽库。筛选则采用亲和纯化(affinity purification),称之为生物淘洗(biopanning),类似于淘金(panning)。其过程是,先将重组噬菌体与受体作用,除去非特异结合的噬菌体,然后将特异性结合的噬菌体洗脱下来经扩增、克

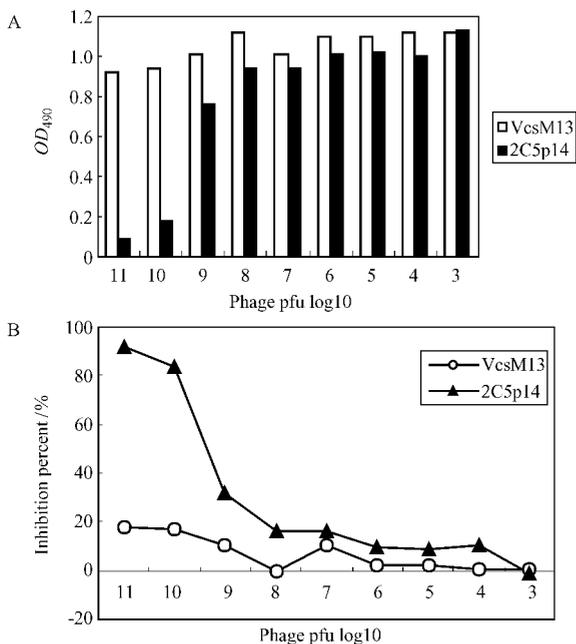


图3 噬菌体的竞争抑制 ELISA

Fig.3 Competitive inhibition ELISA of selected phage

降后进行序列测定和活性分析。在本实验中,以单克隆抗体 2C5 为靶,用噬菌体展示的随机七肽库进行淘洗,经三轮淘洗后得到了一致的序列 TPEQQFT。此序列与 S 蛋白进行序列对比后,发现可能是散在于 S539 - 559 间。进一步融合表达了 S539 - 559 多肽,结果发现此多肽确为 S 蛋白的一个线性表位^[14],但是与单抗 2C5 的回归免疫学反应表明它不是 2C5 的表位。但展示有此序列的噬菌体克隆对单抗 2C5 与 S 蛋白抗原间的 ELISA 反应确有竞争抑制作用,表明此序列为单抗 2C5 的一个模拟表位。进一步对单抗 2C5 进行特性分析,Western blot 分析发现它对细胞培养全病毒 S 蛋白 S1 区及其截短的片段的原核表达产物均不识别,这也表明它对应的表位不是一个线性表位,极可能是一个空间构象性表位。

对单克隆抗体 2C5 的特性分析的新报道也印证了本文的结果^[23,24],在他们的报告中报道了单抗 2C5 的中和活性,以及进一步明确了它对应的表位是一个构象性表位。它具有抑制 S 蛋白受体结合结构域(SRBD)与细胞受体 ACE2 结合的作用,表明此构象表位位于 SRBD 结构域上。一般而言,对构象表位进行精确的序列与位点鉴定是很困难的,而绝大多数抗原表位特别是中和性抗原表位都是构象性的。本实验中通过噬菌体展示肽库筛选得到了一个 2C5 的模拟表位,此模拟表位具有对 2C5 与 S 蛋白抗原的竞争抑制作用,此结果在进一步对 S 蛋白结

构与功能的研究和 SARS 疫苗的设计研究中可能会有一定的参考意义。

REFERENCES (参考文献)

[1] Babcock GJ, Eshshaki DJ, Thomas WD Jr *et al.* Amino acids 270 to 510 of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein are required for interaction with receptor. *J Virol*, 2004, **78** (9):4552 - 4560

[2] 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 Biol Chem*, 2004, **279** (5):3197 - 3201

[3] Gallagher TM, Buchmeier MJ. Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. *Virology*, 2001, **279** (2):371 - 374

[4] Hofmann H, Pohlmann S. Cellular entry of the SARS coronavirus. *Trends Microbiol*, 2004, **12** (10):466 - 472

[5] Bisht H, Roberts A, Vogel L *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein expressed by attenuated vaccinia virus protectively immunizes mice. *PNAS*, 2004, **101** (17):6641 - 6646

[6] Buchholz UJ, Bukreyev A, Yang L *et al.* Contributions of the structural proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus to protective immunity. *PNAS*, 2004, **101** (26):9804 - 9809

[7] Bukreyev A, Lamirande EW, Buchholz UJ *et al.* Mucosal immunisation of African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*) with an attenuated parainfluenza virus expressing the SARS coronavirus spike protein for the prevention of SARS. *Lancet*, 2004, **363** (9427):2122 - 2127

[8] He Y, Zhou Y, Liu S *et al.* Receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein induces highly potent neutralizing antibodies: implication for developing subunit vaccine. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **324** (2):773 - 781

[9] Berry JD, Jones S, Drebot MA *et al.* Development and characterisation of neutralising monoclonal antibody to the SARS-coronavirus. *J Virol Methods*, 2004, **120** (1):87 - 96

[10] Greenough TC, Babcock GJ, Roberts A *et al.* Development and characterization of a severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus-neutralizing human monoclonal antibody that provides effective immunoprophylaxis in mice. *J Infect Dis*, 2005, **191** (4):507 - 514

[11] Zhou YJ (周艳君), Hua RH (华荣虹), Wang YK (王云峰) *et al.* Development of monoclonal antibodies against SARS-CoV and identification of antigenic epitopes. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报) 2005 **21** (2):211 - 215

[12] Gubbins MJ, Plummer FA, Yuan XY *et al.* Molecular characterization of a panel of murine monoclonal antibodies specific for the SARS-coronavirus. *Mol Immunol*, 2005, **42** (1):125 - 136

[13] Hua RH (华荣虹), Tong GZ (童光志), Wang YK (王云峰) *et al.* Expression and antigenic epitopes mapping of receptor binding domain on the spike protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理进展) 2005 **32** (10):1030 - 1037

- [14] Rong-Hong Hua , Yun-Feng Wang , Zhi-Gao Bu *et al.* Identification and epitope mapping of an immunodominant region on S1 domain of SARS-CoV spike protein. *DNA and Cell Biology* , 2005 , **24**(8) : 503 – 509
- [15] Hua RH , Zhou YJ , Wang YF *et al.* Identification of two antigenic epitopes on SARS-CoV spike protein. *Biochem Biophys Res Commun* , 2004 , **319**(3) : 929 – 935
- [16] Zhang H , Wang G , Li J *et al.* Identification of an antigenic determinant on the S2 domain of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike glycoprotein capable of inducing neutralizing antibodies. *J Virol* , 2004 , **78**(13) : 6938 – 6945
- [17] He Y , Lu H , Siddiqui P *et al.* Receptor-binding domain of severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein contains multiple conformation-dependent epitopes that induce highly potent neutralizing antibodies. *J Immunol* , 2005 , **174**(8) : 4908 – 4915
- [18] Smith GP. Filamentous fusion phage : novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* , 1985 , **228**(4705) : 1315 – 1317
- [19] Parnley SF , Smith GP Antibody-selectable filamentous fd phage vectors : affinity purification of target genes. *Gene* , 1988 , **73**(2) : 305 – 318
- [20] Hou L , Du G , Tong Y *et al.* Identification of B cell epitopes of hepatitis C virus RNA dependent RNA polymerase. *J Virol Methods* , 2002 , **104**(1) : 1 – 8
- [21] Dell 'Orco M , Saldarelli P , Minafra A *et al.* Epitope mapping of Grapevine virus A capsid protein. *Arch Virol* , 2002 , **147**(3) : 627 – 634
- [22] Cerino A , Meola A , Segagni L *et al.* Monoclonal antibodies with broad specificity for hepatitis C virus hypervariable region 1 variants can recognize viral particles. *J Immunol* , 2001 , **167**(7) : 3878 – 3886
- [23] He Y , Zhu Q , Liu S *et al.* Identification of a critical neutralization determinant of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus : importance for designing SARS vaccines. *Virology* , 2005 , **334**(1) : 74 – 82
- [24] Chou TH , Wang S , Sakhatsky PV *et al.* Epitope mapping and biological function analysis of antibodies produced by immunization of mice with an inactivated Chinese isolate of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV). *Virology* , 2005 , **334**(1) : 134 – 143