

SARS-CoV-2基因组的不寻常特征表明，该基因组是经过复杂的实验室改造而非自然进化的，并描述了其可能的合成途径

闫丽梦（医学博士、博士）¹、康舒（博士）¹、冠杰（博士）¹、胡善昌（博士）¹

¹美国纽约，法治基金和法治社会

联系方式：team.lmyan@gmail.com

喜马拉雅国际工作站翻译

摘要

由新型冠状病毒SARS-CoV-2引起的COVID-19大流行，已导致全球91万多人死亡，全球经济受到前所未有的破坏。尽管影响巨大，但SARS-CoV-2的起源仍然是神秘且有争议的。自然起源论虽然被广泛接受，但缺乏实质性的支持。然而，另一种理论认为病毒可能来自研究实验室，但在同行评议的科学期刊上却受到了严格审查。尽管如此，SARS-CoV-2表现出的生物学特征与自然发生的人兽共患病毒不一致。在这份报告中，我们描述了基因组、结构、医学和文献证据，综合这些证据看起来，其强烈地与自然起源理论相矛盾。证据表明，SARS-CoV-2应该是以蝙蝠冠状病毒ZC45和/或ZXC21为模板和/或骨架研制的实验室产物。在这些证据的基础上，我们进一步假设了SARS-CoV-2的合成路径，证明这种冠状病毒在实验室研制的方便性，并且可以在大约六个月内完成。我们的工作强调了对相关研究实验室进行独立调查的必要性。该报告还主张对最近公布的某些数据进行批判性研究，尽管这些数据存在问题，但却被用来支持和宣称SARS-CoV-2的自然起源理论。从公共卫生的角度来看，这些行动是必要的，因为了解SARS-CoV-2的来源和病毒如何进入人类世界的途径，对于从根本上控制COVID-19大流行以及防止今后类似的大流行至关重要。

介绍

COVID-19造成了世界性的大流行，其规模和严重性是前所未有的。尽管国际社会做出了巨大的努力，但对这一流行病的管理和控制仍然困难重重，充满挑战。

作为一种冠状病毒，SARS-CoV-2与其他呼吸道和/或人兽共患的病毒有很大的不同：它能攻击多个器官；它能够进行长时间的无症状感染；它具有高度的传染性，在高危人群中具有明显的致死性；它自出现之初就很好地适应了人类¹；它能高效地结合人类ACE2受体（hACE2），其亲和力大于与任何其他潜在宿主的ACE2相关的结合力^{2, 3}。

SARS-CoV-2的起源仍有很多争议。一篇被广泛引用的《自然医学》（Nature Medicine）论文声称，SARS-CoV-2很可能来自自然⁴。然而，这篇文章及其中心结论现在受到来自世界各地科学家的质疑⁵⁻¹⁵。此外，《自然医学》这篇论文的作者有利益冲突的迹象^{16, 17}，这进一步引起了人们对这篇论文可信度的关注。

支持自然起源论的现有科学论文主要依靠一个单一的证据——之前发现的一种名为RaTG13的蝙蝠冠状病毒，它与SARS-CoV-2的核苷酸序列一致性高达96%¹⁸。然而，RaTG13在自然界中的存在及其所报道的序列的真实性正受到广泛质疑^{6-9, 19-21}。值得注意的是，科学杂志明确地审查了任何暗示SARS-CoV-2的非自然起源的不同意见^{8, 22}。由于这种审查制度，质疑SARS-CoV-2的自然起源或RaTG13的实际存在的文章，尽管在科学上具有很高的质量，但只能作为预印本^{5-9, 19-21}或其他非同行评议的文章存在于各种网络平台上^{10-13, 23}。尽管如此，对这些报道的分析却一再指出，RaTG13的报道存在严重问题，很可能存在造假行为^{6, 8, 9, 19-21}。因此，发表伪造的科学数据以误导全世界

追查SARS-CoV-2的来源的理论已经具有实质性的说服力，并与SARS-CoV-2是非自然来源的概念相互关联。

与这一概念相一致的是，基因组、结构和文献证据也表明SARS-CoV-2的非自然起源。此外，丰富的文献表明，功能增强研究早已发展到病毒基因组可以被精确工程化和操纵的阶段，从而能够研制出具有独特特性的新型冠状病毒。在本报告中，我们介绍了这样的证据和相关分析。报告的第一部分描述了SARS-CoV-2的基因组和结构特征，这些特征的存在可能与该病毒是实验室改造的产物这一理论相一致，而不是简单的连续病毒传代所造成的。报告的第二部分描述了SARS-CoV-2在实验室产生的极有可能的途径，其中的关键步骤得到了病毒基因组中的证据支持。重要的是，第二部分应该被看作是一个演示，展示如何利用现有的材料和有据可查的技术，在短时间内方便地在实验室里研制出SARS-CoV-2。本报告是由经验丰富的科学家团队利用我们在病毒学、分子生物学、结构生物学、计算生物学、疫苗研发和医学方面的综合专业知识撰写的。

1. SARS-CoV-2是否经过体外培养操纵？

我们提出了三条证据来支持我们的论点，即实验室操纵是产生SARS-CoV-2的一部分。

i、SARS-CoV-2的基因组序列与中国人民解放军第三军医大学（中国重庆）和南京军区军事医学研究所（中国南京）发现的一种蝙蝠冠状病毒的基因组序列可疑地相似。

ii、SARS-CoV-2的刺突蛋白内的受体结合基序（RBM）决定了该病毒的宿主特异性，它与2003年流行的SARS-CoV的受体结合基序相似，令人怀疑。基因组证据表明，RBM已被基因改造。

iii、SARS-CoV-2在其刺突蛋白中含有一个独特的弗林酶切位点，众所周知，该位点能大大增强病毒的感染力和细胞向性。然而，在自然界中发现的这一类特殊的冠状病毒中完全没有这个切位点。此外，与这一额外序列相关的罕见密码子表明，这一弗林酶切位点极有可能不是自然进化的产物，而是通过简单的连续传代或多株重组事件以外的技术，在共同感染的组织培养物或动物体内人工插入SARS-CoV-2基因组的。

1.1 基因组序列分析显示，ZC45或与之密切相关的蝙蝠冠状病毒应是研制SARS-CoV-2的骨架

长约3万个核苷酸的SARS-CoV-2基因组结构如图1所示。搜索NCBI序列数据库发现，在所有已知的冠状病毒中，有两个相关的蝙蝠冠状病毒ZC45和ZXC21与SARS-CoV-2具有最高的序列一致性（每个蝙蝠冠状病毒与SARS-CoV-2在核苷酸水平上有约89%的一致性）。图1描述了SARS-CoV-2与代表性β冠状病毒基因组的相似性。ZXC21，与ZC45有97%的一致性和非常相似特征，没有显示。请注意，鉴于有强有力的证据表明RaTG13病毒的序列可能是伪造的，而且该病毒在自然界中并不存在，因此RaTG13病毒被排除在本分析之外^{2, 6-9}。（不久将提交一份后续报告，总结证明RaTG13虚假性质的最新证据）

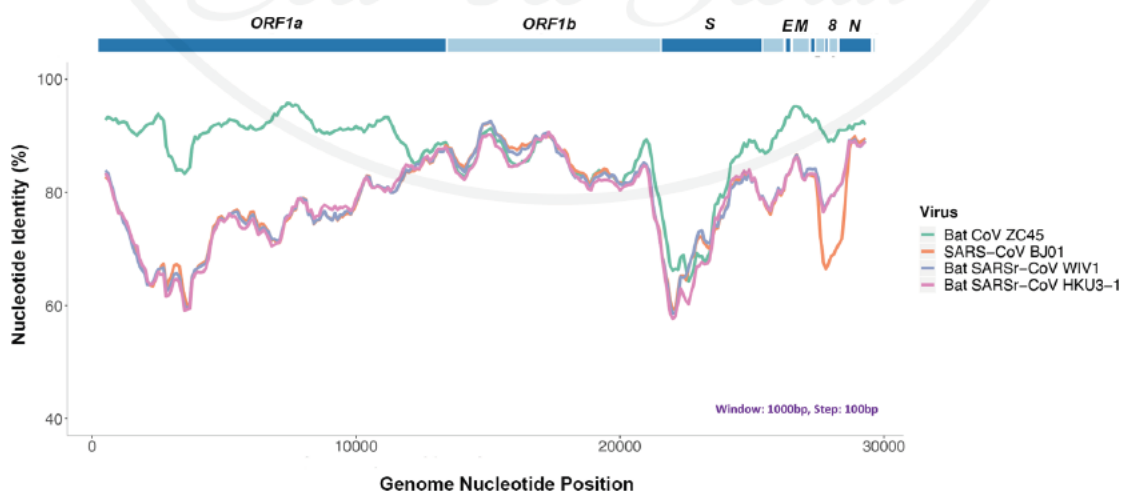


图1、基因组序列分析显示，蝙蝠冠状病毒ZC45与SARS-CoV-2的匹配度最接近 顶部：SARS-CoV-2 (2019-nCoV WIV04) 的基因组组织。底部：基于2019-nCoV WIV04全长基因组的相似程度图。以SARS-CoV BJ01、bat SARSr-CoV WIV1、bat SARSr-CoV HKU3-1、蝙蝠冠状病毒ZC45的全长基因组作为参考序列。

当SARS-CoV-2和ZC45/ZXC21在氨基酸水平上进行比较时，发现大多数蛋白质的序列高度一致。核衣壳蛋白的一致性为94%，膜蛋白的一致性为98.6%。刺突蛋白的S2部分（第2半部分）一致性为95%。重要的是，Orf8蛋白的一致性为94.2%，E蛋白的一致性为100%。

Orf8是一种辅助蛋白，其功能在大多数冠状病毒中基本上未知，尽管最近的数据表明SARS-CoV-2的Orf8通过下调MHC-I²⁴来介导宿主适应性免疫逃避。通常情况下，Orf8在冠状病毒中保守性较差²⁵。序列爆破分析表明，ZC45/ZXC21的Orf8蛋白与SARS-CoV-2的Orf8有94.2%的一致性，而其它冠状病毒没有与SARS-CoV-2在这一特定蛋白有超过58%的一致性。这里，在通常保守性较差的Orf8蛋白上存在高度同源性是非常不寻常的。

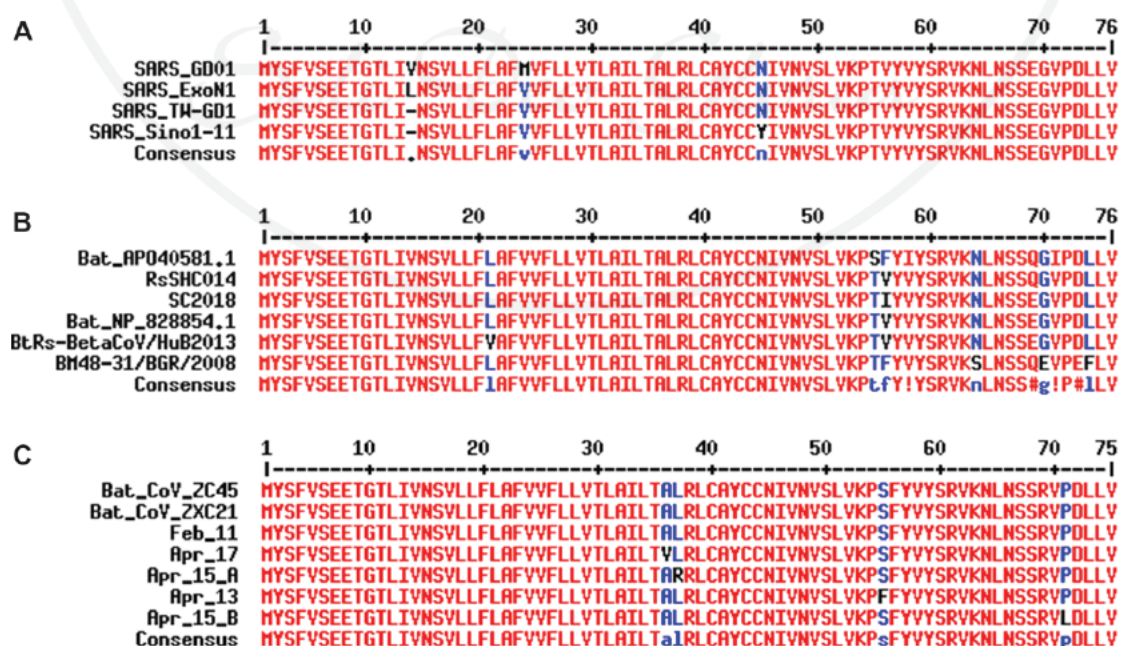


图2、来自不同 β 冠状病毒的E蛋白的序列对齐，表明了E蛋白对氨基酸突变的许可和倾向 A、在SARS-CoV的不同菌株中观察到了突变。GenBank登记号：SARS_GD01: AY278489.2, SARS_ExoN1: ACB69908.1, SARS_TW_GD1: AY451881.1, SARS_ino1_11: AY485277.1。B、来自相关蝙蝠冠状病毒的E蛋白的对齐表明其对多个位置突变的耐受性。GenBank登记号：Bat_AP040581.1: APO40581.1, RsSHC014: KC881005.1, SC2018: MK211374.1, Bat_NP_828854.1: NP_828854.1, BtRs BetaCoV/HuB2013: AIA62312.1, BM48-31/BGR/2008: YP_003858586.1。C、SARS-CoV-2的早期样本与ZC45和ZXC21在E蛋白上有100%的一致性，但从2020年4月开始的SARS-CoV-2的测序数据表明，在多个位置发生了突变。病毒的登记号。Feb_11: MN997409, ZC45: MG772933.1, ZXC21: MG772934, Apr_13: MT326139, Apr_15_A: MT263389, Apr_15_B: MT293206, Apr_17: MT350246。利用MultAlin网络服务器 (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) 进行了对齐。

冠状病毒E蛋白是一种结构性蛋白，它嵌入并内衬在病毒粒子包膜的内部²⁶。E蛋白对突变具有耐受性，这在SARS（图2A）和相关蝙蝠冠状病毒（图2B）中都得到了证明。这种对E蛋白氨基酸突变的耐受性在目前的SARS-CoV-2大流行中得到进一步证明。自SARS-CoV-2在人类中爆发以来，经过短短两个月的病毒传播，SARS-CoV-2中的E蛋白已经发生了突变。4月份获得的序列数据显示，不同毒株的四个不同位置已经发生了突变（图2C）。与这一发现相一致的是，序列爆破分析表明，除了SARS-CoV-2之外，没有已知的冠状病毒与ZC45/ZXC21在E蛋白上具有100%的氨基酸序列一致性（排除了当前大流行开始后发表的可疑冠状病毒^{18, 27-31}）。虽然在SARS-CoV和某些与SARS相关的蝙蝠冠状病毒之间观察到了E蛋白的100%一致性，但没有任何一对病毒同时在Orf8蛋白上有超过83%的一致性³²。因此，SARS-CoV-2和ZC45/ZXC21之间在Orf8蛋白上94.2%的一致性，E蛋白上100%的一致性，以及整体基因组/氨基酸水平的相似性是非常不寻常的。综合考虑这些证据，它符合SARS-CoV-2基因组的起源是以ZC45/ZXC21为骨架和/或模板进行基因功能增强改造的假说。

重要的是，ZC45和ZXC21是由中国人民解放军第三军医大学（中国重庆）和南京军区军事医学研究所（中国南京）发现

(2015年7月至2017年2月之间)、分离并定性的蝙蝠冠状病毒。数据和相关工作已于2018年发表^{33, 34}。显然，这种骨架/模板，对于SARS-CoV-2的研制至关重要，并存在于这些实验室和其他相关研究实验室中。

进一步加强我们论点的是已公布的RaTG13病毒¹⁸，据报道其基因组序列与SARS-CoV-2病毒有96%的一致性。RaTG13病毒虽然表明了SARS-CoV-2的自然起源理论，但也转移了科学界和公众对ZC45/ZXC21的注意力^{4, 18}。事实上，中国BSL-3实验室（上海公共卫生临床中心）发表了一篇《自然》杂志的文章，报道了SARS-CoV-2与ZC45/ZXC21而不是与RaTG13之间存在密切系统发育关系³⁵，但该实验室很快就被关闭“整改”³⁶。据信，该实验室的研究人员因披露SARS-CoV-2和ZC45/ZXC21之间的联系而受到惩罚。另一方面，我们已经积累了大量的证据，指出与报告的RaTG13序列有关的严重问题，以及质疑这种蝙蝠病毒在自然界的实际存在^{6, 7, 19-21}。最近发表的一篇论文也表明，RaTG13的刺突蛋白的受体结合域（RBD）不能与两种不同类型的马蹄蝠的ACE2结合（它们与RaTG13所谓的天然宿主马蹄蝠：中菊头蝠密切相关）²，这意味着RaTG13不能感染马蹄蝠。这一发现进一步证实了所报道的RaTG13序列可能是伪造的，因为由该序列编码的刺突蛋白似乎并不具备所声称的功能。伪造病毒以转移人们对ZC45/ZXC21的关注，这一事实说明了ZC45/ZXC21在SARS-CoV-2研制中的实际作用。

1.2 SARS-CoV-2刺突蛋白的受体结合基序不能从自然界中诞生，而是应通过基因工程制造出来

刺突蛋白装饰着冠状病毒粒子的外部。它们在感染人体中起着重要的作用，因为它们介导与宿主细胞受体的相互作用，从而帮助确定病毒的宿主范围和组织向性。刺突蛋白分为两半部分（图3）。前面或N-末端的一半被命名为S1，它完全负责与宿主受体结合。在SARS-CoV和SARS-CoV-2感染中，宿主细胞

受体都是hACE2。在S1内，有一段约70个氨基酸的片段与hACE2直接接触，相应地被命名为受体结合基序（RBM）（图3C）。在SARS-CoV和SARS-CoV-2中，RBM完全决定了与hACE2的相互作用。刺突蛋白的C端半部被命名为S2。S2的主要功能包括维持三聚体的形成，并在S1/S2交界处和下游S2'位置的连续蛋白酶切割后，介导膜融合，使病毒进入细胞。

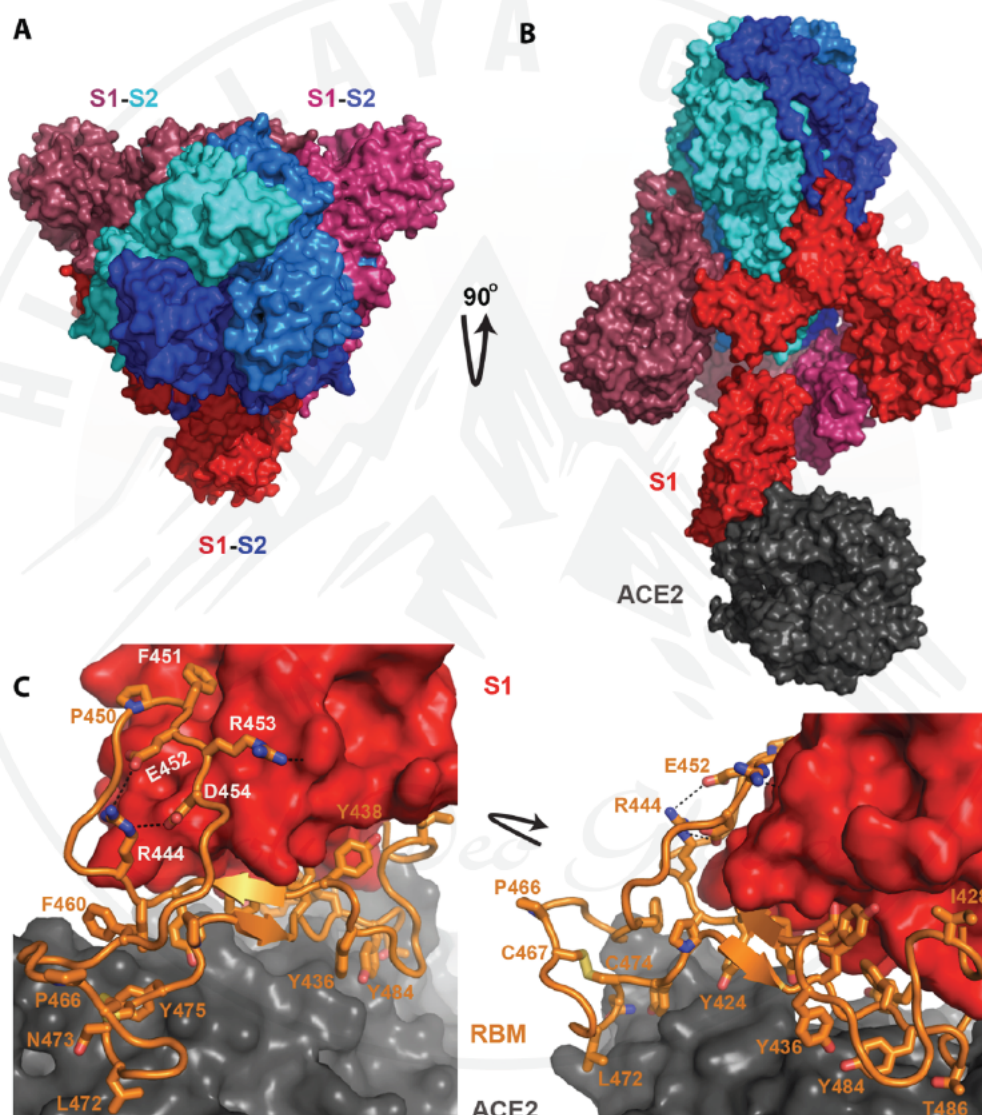


图3、SARS刺突蛋白的结构以及它如何与hACE2受体结合 图片是根据PDB ID: 6acj生成的³⁷。A) 三个刺突蛋白，每个由一个S1半和一个S2半组成，形成一个三聚体。B) S2半（蓝色的阴影）负责三聚体的形成，而S1部分（红色的阴影）负责结合hACE2（深灰色）。C) S1和hACE2之间的结合细节。S1的RBM，是进行充分结合的关键，标为橙色。RBM内对hACE2相互作用或蛋白质折叠都很重要的残基显示为棍状（残基数遵循SARS刺突序列）。

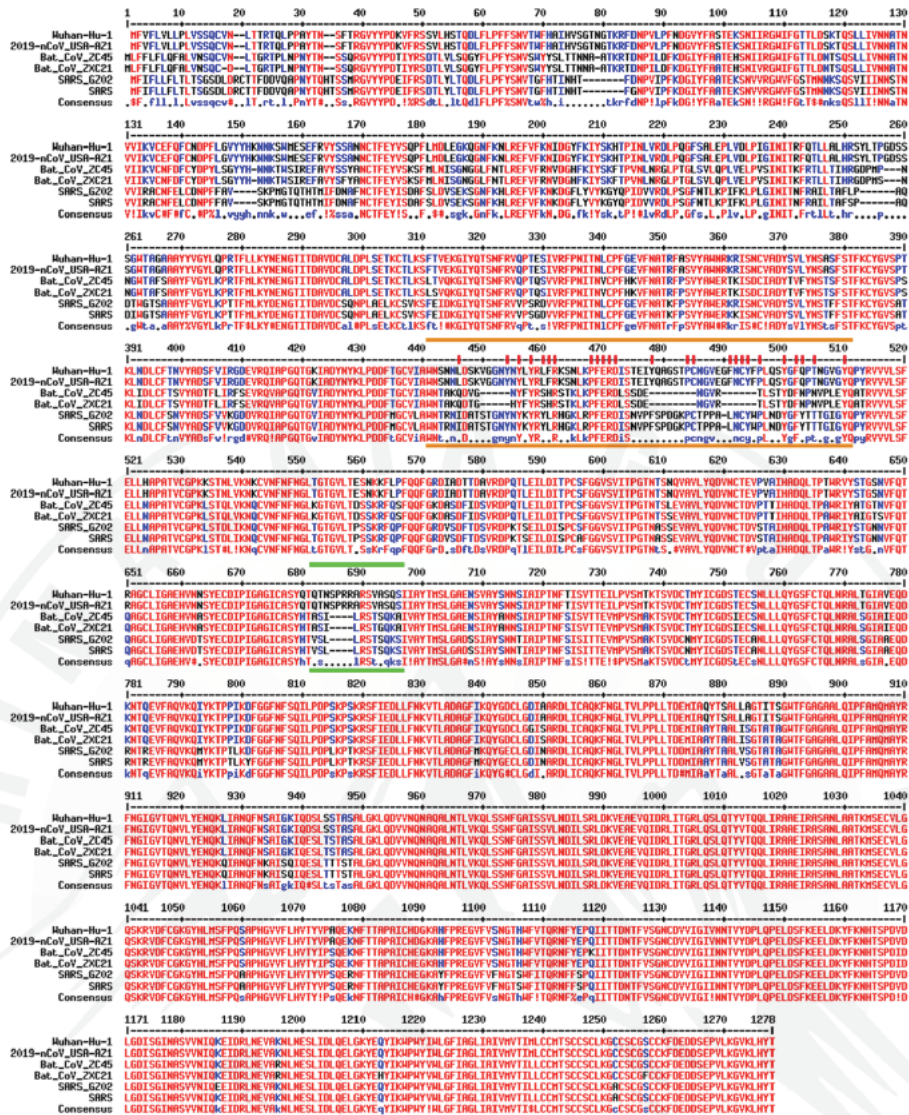


图4、相关冠状病毒的刺突蛋白序列对齐 被比较的病毒包括SARS-CoV-2 (Wuhan-Hu-1: NC 045512, 2019-nCoV USA-AZI: MN997409)、蝙蝠冠状病毒 (Bat_CoV_ZC45: MG772933, Bat_CoV_ZXC21: MG772934) 和SARS冠状病毒 (SARS_GZ02: AY390556, SARS: NC_004718.3)。由两条橙色线标记的区域是受体结合基序 (RBM)，这对与hACE2受体的相互作用很重要。关键的残基在顶部另外用红色小棍突出显示。由两条绿线标记的区域是一个弗林酶切位点，该位点只存在于SARS-CoV-2中，而不存在于任何其他β冠状病毒B群中。

与其他观察到的病毒蛋白的情况相似，SARS-CoV-2的S2与ZC45/ZXC21的S2具有很高的序列一致性 (95%)。与此形成鲜明对比的是，SARS-CoV-2和ZC45/ZXC21之间，决定病毒可以感染哪种宿主 (人类或蝙蝠) 的S1蛋白的保守性要低得多，其氨基酸序列一致性只有69%。

图4显示了6种β冠状病毒的刺突蛋白的序列对齐。两种是本次大流行中分离出来的病毒（Wuhan-Hu-1, 2019-nCoV_USA-AZ1）；两种是疑似模板病毒（Bat_CoV_ZC45, Bat_CoV_ZXC21）；两种是SARS冠状病毒（SARS_GZ02, SARS）。RBM在两条橙色线条之间突出显示。显然，尽管整体基因组的序列一致性很高，但SARS-CoV-2的RBM与ZC45和ZXC21的RBM有显著差异。耐人寻味的是，SARS-CoV-2的RBM与SARS 刺突蛋白的RBM非常相似。虽然这不是一个完全的“复制和粘贴”，但仔细检查刺突蛋白-hACE2结构^{37, 38}显示，所有对hACE2结合或蛋白质折叠（图3C中的橙色小棍和图4中的红色短线所强调的内容）至关重要的残基都被“保留”下来了。这些必要的残基大部分被精确地保留下来，包括那些参与二硫键形成（C467, C474）和静电相互作用（R444, E452, R453, D454）的残基，这是RBM结构完整性的关键（图3C和4）。关键残基组内的少数变化几乎都是疏水性的“置换”（I428→L、L443 →F、F460 →Y、L472→F、Y484→Q），这不应影响蛋白质折叠或与hACE2的相互作用。同时，大部分非关键的氨基酸残基都发生了“突变”（图4，RBM残基未用短红线标注）。仅从这个序列分析来看，我们很早就确信SARS-CoV-2刺突蛋白不仅会与hACE2结合，而且其结合方式也恰恰类似于原来SARS 刺突蛋白与hACE2之间的结合方式。最近的结构性分析工作证实了我们的预测³⁹。

如下文所述，SARS-CoV-2的RBM与SARS-CoV的RBM相似的方式以及SARS-CoV-2与ZC45/ZXC21之间的整体序列保留模式是非常不寻常的。综上所述，这表明SARS-CoV-2基因组的部分内容并非来自自然的准种病毒颗粒进化。

如果SARS-CoV-2确实来自自然进化，那么它的RBM只能通过两种可能的途径之一获得。1) 祖先重组事件，然后是趋同进化；2) 最近发生的自然重组事件。

在第一种情况下，SARS-CoV-2的祖先，一种类ZC45/ZXC21的蝙蝠冠状病毒会与一种携带相对“完整”RBM的冠状病毒（参照SARS）重组和“替换”它的RBM。这种重组将导致一种新型的类ZC45/ZXC21的冠状病毒，其RBM中的所有缺口都被“填补”了（图4）。随后，该病毒将在其新的宿主中进行广泛的适应，其中ACE2蛋白与hACE2高度同源。整个基因组的随机突变将不得不发生，最终将RBM塑造为其当前的形式—以一种高度智能的方式类似于SARS-CoV的RBM。然而，这种趋同进化过程也会导致基因组其他部分大量突变的积累，使得整体序列一致性相对较低。SARS-CoV-2与ZC45/ZXC21在各种蛋白质上的高序列一致性（94-100%一致性）并不支持这种情况，因此，能清楚地表明携带这种RBM的SARS-CoV-2不可能通过这种趋同进化途径，来源于类ZC45/ZXC21的蝙蝠冠状病毒。

在第二种情况下，类ZC45/ZXC21冠状病毒必须在最近与另一种冠状病毒进行重组和替换RBM，这种冠状病毒已经成功地适应了与hACE2高度同源的动物ACE2的结合。这种事件的可能性部分取决于自然重组的一般要求：1）两种不同的病毒具有显著的序列相似性；2）它们必须共同感染并存在于同一动物的同一细胞中；3）重组的病毒不会被宿主清除或使宿主灭绝；4）重组的病毒最终必须变得稳定并可在宿主物种内传播。

关于这种最近重组情况，动物源不可能是蝙蝠，因为蝙蝠的ACE2蛋白与hACE2的同源性不够，因此适应性不能产生SARS-CoV-2中所看到的RBM序列。这个动物源也不可能是人类，因为类ZC45/ZXC21的冠状病毒无法感染人类。此外，在2019年底之前，还没有证据表明任何SARS-CoV-2或类SARS-CoV-2的病毒在人群中传播。耐人寻味的是，根据最近的一项生物信息学研究，SARS-CoV-2自疫情开始以来就对人类有良好的适应性¹。

自然进化只剩下另外一种可能，即类ZC45/ZXC21病毒和含有类SARS的RBM的冠状病毒可能在一个中间宿主中重组，其中ACE2蛋白与hACE2同源。多个实验室已有报道，部分从马来西亚走私到中国的巽他穿山甲携带了冠状病毒，其受体结合域（RBD）与SARS-CoV-2几乎完全相同^{27-29, 31}。然后，他们继续提出，穿山甲很可能是SARS-CoV-2的中间宿主^{27-29, 31}。然而，最近的独立报告发现这一数据存在重大缺陷⁴⁰⁻⁴²。此外，与这些报告^{27-29, 31}相反，2009年至2019年间，在马来西亚和沙巴州收集了十多年的巽他穿山甲样本中没有检测到冠状病毒⁴³。最近的一项研究还表明，SARS-CoV-2和报道的穿山甲冠状病毒之间共享的RBD与hACE2的结合力是穿山甲ACE2的十倍²，这进一步否定了穿山甲作为可能的中间宿主。最后，一项电脑模拟研究虽然回应了穿山甲不可能是中间宿主的观点，但也表明，在他们的研究中，没有一种动物ACE2蛋白比hACE2与SARS-CoV-2刺突蛋白表现出更有利的结合潜力³。最后一项研究几乎排除了所有动物作为中间宿主的嫌疑³，这与SARS-CoV-2从爆发之初就对人类有良好适应性的观察结果一致¹。这一点很重要，因为这些研究结果共同表明，SARS-CoV-2似乎不存在中间宿主，这至少降低了中间宿主发生重组事件的可能性。

即使我们忽略上述证据，即不存在合适的宿主来进行重组，而假设确实存在这样的宿主，那么自然界中发生这种重组事件的可能性也几乎没有。

如上所述，如果自然重组事件是SARS-CoV-2出现的原因，那么类ZC45/ZXC21病毒和含有类SARS的RBM的冠状病毒必须在同一细胞中通过替换S1/RBM进行重组，这是一种罕见的重组形式。此外，由于SARS在人类历史上只发生过一次，因此，自然界以如此智能的方式产生一种类SARS的病毒—只在几个关键的位点上拥有与SARS的RBM不同的RBM，至少也是同样罕见的（图4）。这种独特的类SARS冠状病毒与类ZC45/ZXC21的祖先病毒驻留在同一细胞中，两种病毒以“RBM替换”的方式进

行重组的可能性极低。重要的是，这一点，以及下面1.3节中描述的其他重组事件（在自然界中更不可能发生），都必须偶然产生在SARS-CoV-2中所看到的刺突蛋白。

上述证据和分析综合起来似乎不赞成SARS-CoV-2的RBM有自然来源，且有大量文献表明，功能增强研究，即对冠状病毒的刺突蛋白进行特异性工程改造，已经多次成功地从非人类来源的冠状病毒中产生了感染人类的冠状病毒⁴⁴⁻⁴⁷。

记录还显示，武汉病毒研究所等研究实验室与美国研究人员⁴⁵合作（也有单独的研究工作⁴⁷），已经成功开展了此类研究。此外，武汉病毒研究所还从事了几十年的冠状病毒监测研究，因此拥有世界上最大的冠状病毒收藏库。显然，对于武汉病毒研究所和其他相关实验室来说，开展并成功进行这种刺突蛋白/RBM工程和功能增强实验，技术上的障碍是不存在的。

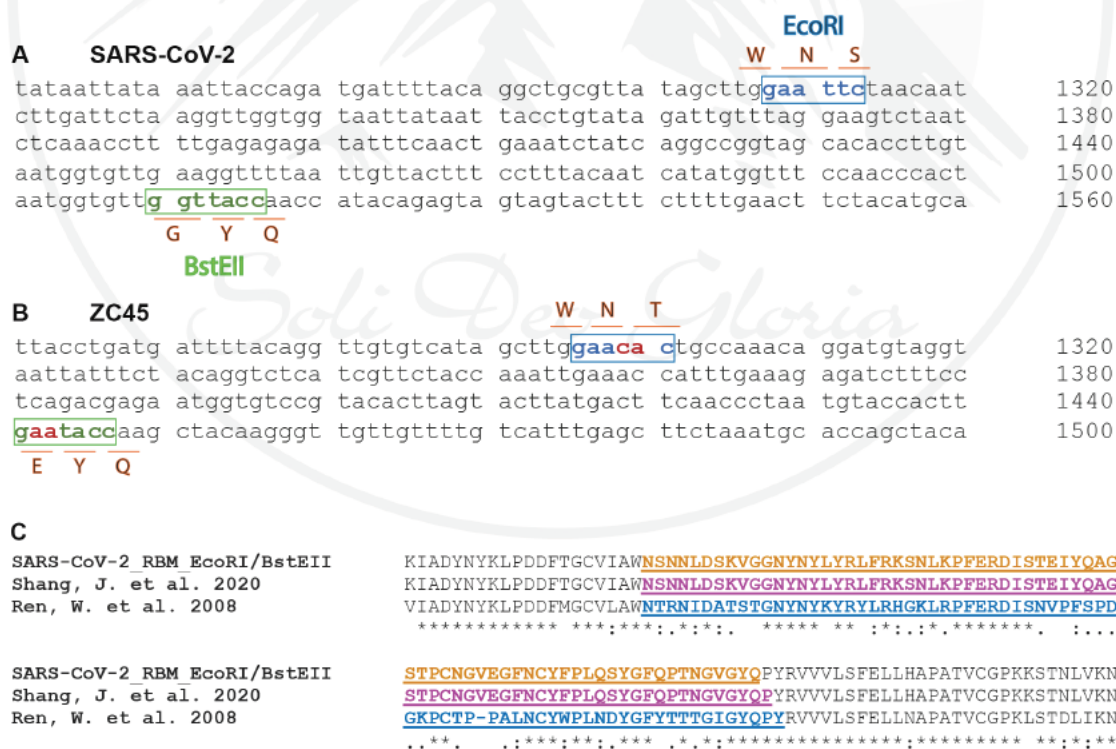


图5、SARS-CoV-2的RBM任一端都有两个限制性位点，这为替换刺突蛋白基因内的RBM提供了方便 A. SARS-CoV-2 (Wuhan-Hu-1) 的RBM的核苷酸序列。

在RBM的5'-端发现一个*EcoRI*位点，在3'-端发现一个*BstEII*位点。B. 虽然这两个限制性位点不存在于ZC45的原始刺突蛋白基因中，但考虑到这两个位点的序列差异较小（2个核苷酸），它们可以被方便地引入。C. 氨基酸序列对齐与RBM区域的高亮显示（标色和下划线）。橙色（上）的RBM是由SARS-CoV-2（Wuhan-Hu-1）刺突蛋白中的*EcoRI*和*BstEII*位点定义的。品红色（中间）的RBM是李放博士及其同事替换成SARS刺突蛋白骨架的区域³⁹。蓝色（下）高亮的RBM来自SARS-BJ01（AY278488.2）的刺突蛋白（RBM: 424-494），该区域被石正丽实验室替换成不同蝙蝠冠状病毒的刺突蛋白，相应的片段被替换了⁴⁷。

值得注意的是，与RBM基因工程理论一致，我们在SARS-CoV-2基因组RBM的任一端分别发现了两个独特的限制性位点*EcoRI*和*BstEII*（图5A）。这两个位点，是日常分子克隆的热门选择，在这个刺突蛋白基因的其他部位并不存在。这种特殊的设置使得在刺突蛋白内替换RBM极为方便，为测试不同的RBM和相应的刺突蛋白提供了一种快速的方法。

这样的*EcoRI*和*BstEII*位点在其他β冠状病毒的刺突蛋白基因中并不存在，这强烈地表明它们不是自然的，是为了方便操纵关键的RBM而专门引入SARS-CoV-2的这个刺突蛋白基因中的。虽然ZC45刺突蛋白也没有这两个位点（图5B），但如本报告第2部分所述，它们可以非常容易地被引入。

值得注意的是，这里引入*EcoRI*位点会将相应的氨基酸从-WNT-变为-WNS-（图5AB）。据我们所知，所有SARS和类SARS的蝙蝠冠状病毒专门在这个位置携带一个T（苏氨酸）残基。除了疫情爆发后公布的可疑的RaTG13和穿山甲冠状病毒外⁴⁸，SARS-CoV-2是唯一的例外，因为这个T已经突变为S（丝氨酸）。

一旦限制位点被成功地引入，RBM片段可使用常规限制酶切割和连接反应方便地进行替换。虽然其它克隆技术可能不会留下任何遗传操纵的痕迹（吉布森组装作为一个例子），但仍

可选择这种老式的方法，因为它在替换这个关键的RBM中提供了极大的方便。

鉴于RBM完全决定hACE2的结合度，而且SARS RBM-hACE2的结合完全由高分辨率的结构来表征（图3）^{37, 38}，这种仅RBM的替换不会比完全的刺突蛋白替换更有风险。事实上，这种RBM替换策略的可行性已经得到了证明^{39, 47}。2008年，石正丽博士团队在把一个限制性位点引入密码子优化的刺突蛋白基因后，将SARS的RBM替换到几种类SARS的蝙蝠冠状病毒的刺突蛋白中（图5C）⁴⁷。然后，他们验证了所得到的嵌合刺突蛋白与hACE2的结合。此外，在最近的一份论文中，SARS-CoV-2的RBM被替换到SARS-CoV的受体结合域（RBD）中，导致嵌合RBD在结合hACE2方面完全发挥了作用（图5C）³⁹。令人注意的是，在这两种情况下，人为操纵的RBM片段几乎完全类似于由EcoRI和BstEII位点的位置定义的RBM（图5C）。虽然这两份论文都缺乏克隆细节的描述^{39, 47}，但可以想象，实际的限制性位点可能会有所不同，这取决于接受RBM插入的刺突蛋白基因，以及在感兴趣的区域引入独特的限制性位点的便利性。值得一提的是，最近发表的这篇论文³⁹的对应作者李放博士从2010年开始就一直是石正丽博士的积极合作者⁴⁹⁻⁵³。李博士是世界上第一个从结构上阐明SARS-CoV的RBD与hACE2结合的人³⁸，也是从结构上理解刺突蛋白-ACE2相互作用的顶级专家^{38, 39, 53-56}。在SARS-CoV-2的RBM任一端关于EcoRI和BstEII限制性位点的惊人发现，以及同一RBM区域分别被石博士和她的长期合作者用限制酶切方法进行了替换的事实，都不太可能是巧合。相反，它是证明SARS-CoV-2的RBM/刺突蛋白是基因操纵产物的实锤证据。

虽然复制SARS的RBM的确切序列可能很方便，但这太明显是人为设计和操纵的迹象。更具欺骗性的方法是改变一些非关键的残基，同时保留用于结合的关键残基。高分辨率结构可以很好地指导这种设计（图3）^{37, 38}。这样一来，当RBM整体序

列看起来与SARS的RBM序列明显不同时，hACE2的结合能力将得到很好的保留。我们认为，所有的关键残基（图4中用红色小棍标记的残基，与图3C中小棍所示的残基相同）都应该已被“保留”。如前所述，虽然有些应该是直接保留，但有些应该被替换成具有类似性质的残基，这就不会破坏hACE2的结合力，甚至可能进一步加强了结合功能。重要的是，可能在非关键的位点上有意做了改变，使之不像SARS的RBM的“复制粘贴”那样明显。

1.3 SARS-CoV-2的刺突蛋白中存在一个不寻常的弗林酶切位点，与病毒的毒性增强有关

SARS-CoV-2的刺突蛋白中另一个独特的基序是位于S1/S2交界处的多碱基弗林酶切位点（图4，两条绿线之间的片段）。这样的位点可以被弗林蛋白酶识别和切割。在β冠状病毒的B群内，除了SARS-CoV-2外，没有病毒在S1/S2交界处含有弗林酶切位点（图6）⁵⁷。与此相反，在其他组冠状病毒中也观察到这个位置的弗林酶切位点^{57, 58}。似乎存在一定的选择压力，使β冠状病毒的B群无法在自然界中获得或维持这样的位点。

```
Human SARS-CoV BJ01          655 - GICASYHTVSSL----RSTS - 670
Human SARS-CoV CUHK-W1       655 - GICASYHTVSSL----RSTS - 670
Human SARS-CoV Tor2          655 - GICASYHTVSSL----RSTS - 670
Human SARS-CoV Frankfurt-1   655 - GICASYHTVSSL----RSTS - 670
Human SARS-CoV Urbani         655 - GICASYHTVSSL----RSTS - 670
Civet SARS-CoV civet020      655 - GICASYHTVSSL----RSTS - 670
Civet SARS-CoV sz16          655 - GICASYHTVSSL----RSTS - 670
Raccoon dog SARS-CoV A030    655 - GICASYHTVSSL----RSTS - 670
SARS-CoV-2                   669 - GICASYQTQINSFRVRSVA - 688
Pangolin CoV MP789           n/a - GICASYQTQINS----RSVS - n/a
Bat SARSr-CoV RaTG13         669 - GICASYQTQINS----RSVA - 684
Bat SARSr-CoV LYRa11         659 - GICASYHTASLL----RNTD - 674
Bat SARSr-CoV LYRa3          659 - GICASYHTASLL----RNTG - 674
Bat SARSr-CoV RsSHC014       656 - GICASYHTVSSL----RSTS - 671
Bat SARSr-CoV Rs4084         656 - GICASYHTVSSL----RSTS - 671
Bat SARSr-CoV WIV1          656 - GICASYHTVSSL----RSTS - 671
Bat SARSr-CoV Rs3367         656 - GICASYHTVSSL----RSTS - 671
Bat SARSr-CoV Rs7327         656 - GICASYHTVSSL----RSTS - 671
Bat SARSr-CoV Rs9401         656 - GICASYHTVSSL----RSTS - 671
Bat SARSr-CoV Rs4231         655 - GICASYHTVSSL----RSTS - 670
Bat SARSr-CoV WIV16         655 - GICASYHTVSSL----RSTS - 670
Bat SARSr-CoV Rs4874         655 - GICASYHTVSSL----RSTS - 670
Bat SARSr-CoV ZC45           646 - GICASYHTASLL----RSTS - 661
Bat SARSr-CoV ZXC21         645 - GICASYHTASLL----RSTG - 660
Bat SARSr-CoV Rf4092        634 - GICASYHTASTL----RSVG - 649
Bat SARSr-CoV Rf/JL2012     636 - GICASYHTASLL----RSTG - 651
Bat SARSr-CoV JTMCI5        636 - GICASYHTASLL----RSTG - 651
Bat SARSr-CoV 16B0133       636 - GICASYHTASLL----RSTG - 651
Bat SARSr-CoV B15-21        636 - GICASYHTASLL----RSTG - 651
Bat SARSr-CoV YN2013        633 - GICASYHTASTL----RSIG - 648
Bat SARSr-CoV Anlong-103    633 - GICASYHTASTL----RSVG - 648
Bat SARSr-CoV Rp/Shaanxi2011 640 - GICASYHTASVL----RSTG - 655
Bat SARSr-CoV Rs/HuB2013    641 - GICASYHTASVL----RSTG - 656
Bat SARSr-CoV YNLF/34C      641 - GICASYHTASVL----RSTG - 656
Bat SARSr-CoV YNLF/31C      641 - GICASYHTASVL----RSTG - 656
Bat SARSr-CoV Rf1           641 - GICASYHTASHL----RSTG - 656
Bat SARSr-CoV 273           641 - GICASYHTASHL----RSTG - 656
Bat SARSr-CoV Rf/SX2013     639 - GICASYHTASLL----RSTG - 654
Bat SARSr-CoV Rf/HeB2013    641 - GICASYHTASLL----RSTG - 656
Bat SARSr-CoV Cp/Yunnan2011 641 - GICASYHTASLL----RNTG - 656
Bat SARSr-CoV Rs672         641 - GICASYHTASTL----RSVG - 656
Bat SARSr-CoV Rs4255        641 - GICASYHTASTL----RSVG - 656
Bat SARSr-CoV 4081          641 - GICASYHTASTL----RSVG - 656
Bat SARSr-CoV Rm1           641 - GICASYHTASVL----RSTG - 656
Bat SARSr-CoV 279           641 - GICASYHTASVL----RSTG - 656
Bat SARSr-CoV Rs/GX2013     642 - GICASYHTASVL----RSTG - 657
Bat SARSr-CoV Rs806         641 - GICASYHTASLL----RSTG - 656
Bat SARSr-CoV HKU3-1        642 - GICASYHTASVL----RSTG - 657
Bat SARSr-CoV Longquan-140  642 - GICASYHTASVL----RSTG - 657
Bat SARSr-CoV Rp3           641 - GICASYHTASTL----RSVG - 656
Bat SARSr-CoV Rs4247        642 - GICASYHTASTL----RSVG - 657
Bat SARSr-CoV Rs4237        641 - GICASYHTASTL----RSVG - 656
Bat SARSr-CoV As6526        641 - GICASYHTASTL----RSVG - 656
```

图6、在刺突蛋白的S1/S2交界处发现的弗林酶切位点是SARS-CoV-2所独有的，在其他β冠状病毒B群中不存在 图片重制自Hoffmann等⁵⁷。

如前所述，在进入细胞过程中，刺突蛋白首先在S1/S2交界处被切割。这一步骤以及随后在下游暴露融合肽的切割都是由宿主蛋白酶介导的。这些蛋白酶在不同细胞类型中的存在与否，极大地影响了细胞向性，并假定也影响了病毒感染的致病性。与其他蛋白酶不同，弗林蛋白酶在许多类型的细胞中广泛表达，并存在于多个细胞和细胞外位置。重要的是，在S1/S2交界处引入一个弗林蛋白酶切位点，可以显著增强病毒的感染力，以及大大扩展其细胞向性—这一现象在流感病毒和其他冠状病毒中都有很好的记录⁵⁹⁻⁶⁵。

如果我们撇开自然界中任何β冠状病毒B群中都没有发现弗林酶切位点的事实，而假设SARS-CoV-2中的这个位点是自然进化的结果，那么只有一种进化途径是可能的，即弗林酶切位点必须来自于同源重组事件。具体来说，一个不含弗林酶切位点的祖先β冠状病毒必须与一个含有弗林酶切位点的近亲冠状病毒重组。

然而，有两个事实不利于这种可能性。首先，尽管一些来自其他组或群的冠状病毒确实含有多碱基弗林酶切位点，但没有一种冠状病毒含有SARS-CoV-2确切的多碱基序列（-PRRAR/SVA-）。其次，在SARS-CoV-2和任何含有合理弗林酶切位点的冠状病毒之间，刺突蛋白上的序列一致性不超过40%⁶⁶。如此低的序列一致性排除了这些病毒祖先之间发生成功的同源重组的可能性。因此，SARS-CoV-2刺突蛋白中的弗林酶切位点不可能源自自然，而应该是实验室改造的结果。

与这一说法相一致的是，对SARS-CoV-2刺突蛋白中弗林酶切位点的核苷酸序列进行仔细检查后发现，插入序列内的两个连续的Arg残基（-PRRA-）均由罕见的密码子CGG（SARS-

CoV-2中Arg最少使用的密码子) 编码 (图7) ⁸。事实上, 这种CGGCGG排列是在SARS-CoV-2基因组中发现的唯一实例, 这种罕见的密码子被串联使用。这一观察结果强烈地表明, 这个弗林酶切位点应该是基因工程的结果。更加让人怀疑的是, 这里的密码子选择制定了一个FauI限制位点, 这说明限制性片段长度多态性 (武汉病毒研究所实验室精通的技术⁶⁷) 有可能涉及其中。在那里, FauI切位所产生的片段模式可以用来监测刺突蛋白中弗林酶切位点的保留情况, 因为这个弗林酶切位点在体外容易发生缺失^{68, 69}。具体来说, 可以对从细胞培养物或实验室动物中回收的病毒的刺突蛋白基因进行RT-PCR检测, 其产物要经过FauI切位。保留或失去弗林酶切位点的病毒将产生不同的模式, 从而可以方便地跟踪要研究的病毒。

FauI

```
tat cag act cag act aat tct cct cgg cgg gca cgt agt gta gct agt caa tcc atc att
Y Q T Q T N S P R R A R S V A S Q S I I
```

图7、在SARS-CoV-2刺突蛋白的S1/S2交界处的-PRRA-插入的两个连续的Arg残基都由一个罕见的密码子CGG编码 一个FauI限制位点, 5'-(N)₆GCGGG-3', 嵌入在“插入的”PRRA段的编码序列中, 它可作为监测引入的弗林酶切位点保存情况的标记。

此外, 虽然目前还没有已知的冠状病毒含有SARS-CoV-2刺突蛋白中确切的-PRRAR/SVA-序列, 但在2017年石正丽博士发表的啮齿类动物冠状病毒AcCoV-JC34的刺突蛋白的S1/S2交界处观察到了类似的-RRAR/AR-序列⁷⁰。可见, -RRAR-作为功能性弗林酶切位点的合理性自2017年起就已被武汉病毒研究所专家所认知。

相关证据共同表明, SARS-CoV-2刺突蛋白中的弗林酶切位点可能不是来自自然界, 且可能是基因操纵的结果。这种操纵的目的可能是评估实验室研制的冠状病毒的传染性和致病性的任何潜在增强作用⁵⁹⁻⁶⁴。事实上, 最近的研究已经证实, 弗林酶切位点确实赋予了SARS-CoV-2显著的致病性优势^{57, 68}。

1.4 小结

这一部分提出的证据显示，SARS-CoV-2基因组的某些方面极难被解释为自然进化的结果。我们提出的另一种理论是，该病毒可能是以ZC45/ZXC21蝙蝠冠状病毒为骨架和/或模板产生的。刺突蛋白，特别是其中的RBM，应该是经过人工操纵的，在此基础上，病毒获得了与hACE2结合并感染人类的能力。在RBM任一端发现了一个独特的限制性酶切位点也支持了这一点。一个不寻常的弗林酶切位点可能已经被引入并插入到刺突蛋白的S1/S2交界处，这有助于增加病毒的毒性和致病性。这些转化就使SARS-CoV-2病毒最终成为一种高传染性、发病隐匿性、致死性、后遗症不明确、破坏性大的病原体。

显然，SARS-CoV-2可能是通过武汉病毒研究所的功能增强操纵产生的，这种可能性很大，应该进行彻底和独立的调查。

2. 描述SARS-CoV-2的合成途径

在本报告的第二部分，我们描述了在实验室环境下研制SARS-CoV-2的合成路径。这是基于大量文献支持以及SARS-CoV-2基因组中存在的基因证据而假定的。虽然这里提出的步骤和实际采取的可能非完全一样，但我们相信，关键程序应没有太大的不同。重要的是，我们在这里的工作应该作为一个示范，证明如何遵循已验证的概念并使用成熟的技术，可在研究实验室中方便地设计和研制SARS-CoV-2。

重要的是，香港和中国大陆的实验室在冠状病毒研究方面，无论是在资源还是研究产出，都处于世界领先地位。后者不仅体现在过去20年中他们发表的大量论文上，还体现在他们在这一领域取得的里程碑式的成就上：他们是第一个发现麝猫是SARS-CoV的中间宿主，并分离出了第一株病毒⁷¹；他们是第一个发现SARS-CoV来源于蝙蝠^{72, 73}；他们首次揭示了SARS-CoV

感染的抗体依赖增强 (ADE) ⁷⁴; 他们在了解MERS (中东呼吸综合征) 的各个领域 (人兽共患病、病毒学和临床研究) 方面做出了重大贡献⁷⁵⁻⁷⁹; 他们在SARS-CoV-2研究方面取得了多项突破^{18, 35, 80}。最后但并非最不重要的是, 他们拥有世界上最大的冠状病毒收藏库 (基因组序列和活体病毒)。香港和大陆的研究实验室都有现成的知识、专业技术和资源 (他们广泛合作) 来开展和完成下面所描述的工作。

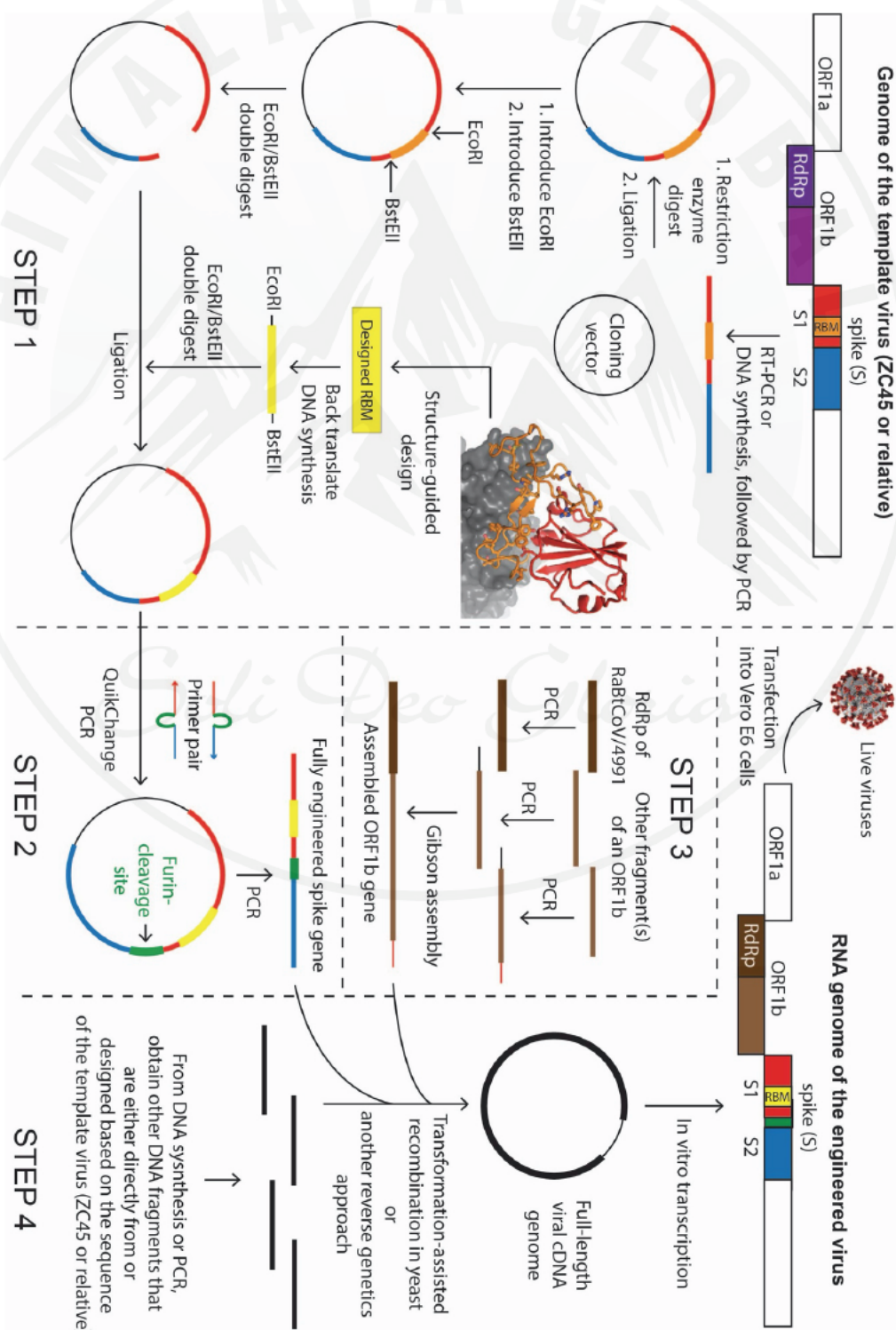


图8、SARS-CoV-2实验室制造可能的合成路径示意图

2.1 新型冠状病毒实验室研制设计的可能方案

在本小节中，我们概述了项目设计阶段可能制定的整体策略和主要考虑因素。

要想设计和研制一个针对人类的冠状病毒，他们就必须选择一种蝙蝠冠状病毒作为模板/骨架。这可以很方便地完成，因为在过去的20年里，许多研究实验室一直在积极收集蝙蝠冠状病毒^{32, 33, 70, 72, 81-85}。然而，考虑到石正丽博士一直从事冠状病毒的功能增强研究，这个模板病毒最好不是石正丽博士收藏的病毒。因此，ZC45和/或ZXC21这些由军事实验室³³发现并拥有的新型蝙蝠冠状病毒将适合作为模板/骨架病毒。也有可能是这些军事实验室从同一地点发现了其他密切相关的病毒，并保留了一些未公布的病毒，因此，实际的模板可能是ZC45和/或ZXC21、或它们的近亲病毒。无论三者中哪一个是实际的模板，下面描述的假定途径都是一样的。

一旦他们选择了模板病毒，他们首先需要通过分子克隆，对刺突蛋白进行工程设计，使其能够与hACE2结合。这种操纵所涉及的概念和克隆技术已经在文献^{44-46, 84, 86}中得到了充分的记载。在几乎没有失败风险的情况下，模板蝙蝠病毒就可以转化为可以结合hACE2并感染人类的冠状病毒⁴⁴⁻⁴⁶。

其次，他们利用分子克隆在刺突蛋白的S1/S2交界处引入一个弗林酶切位点。根据已知的知识^{60, 61, 65}，这种操纵很可能产生一株传染性和致病性更强的冠状病毒。

第三，他们制造出一个ORF1b基因构建。ORF1b基因编码多聚蛋白Orf1b，它经过后转译加工产生单个病毒蛋白：RNA依赖性RNA聚合酶（RdRp）、螺旋酶、胍-N7甲基转移酶、尿苷酸特异的核糖核酸内切酶和2'-O-甲基转移酶。这些蛋白都是病毒复制机制的一部分。其中，RdRp蛋白是最关键的一个，在冠状病毒中高度保守。重要的是，石正丽博士的实验室采用PCR方案，将RdRp基因的特定片段进行扩增，作为他们检测原始样本（蝙蝠粪便拭子、粪便等）中是否存在冠状病毒的主要方法。由于这种做法，石正丽团队已经记录了他们成功检测和/或收集到的所有冠状病毒的RdRp这个短段的序列信息。

在这里，由于Orf1b是保守性的，而且很可能来自任何 β 冠状病毒的Orf1b都足以胜任这项工作，所以基因操纵的要求不高，也不复杂。然而，我们相信，他们希望将特定的Orf1b引入病毒中，可能原因是以下两种之一：

1. 由于许多系统发育分析仅根据RdRp基因的序列相似性对冠状病毒进行分类^{18, 31, 35, 83, 87}，因此，在基因组中使用不同的RdRp可以确保在系统发育研究中把SARS-CoV-2和ZC45/ZXC21分成不同的组/亚群。然而，选择RdRp基因是很方便的，因为RdRp短段序列已经被记录在所有收集/检测到的冠状病毒中。他们最终选择的是2013年发现的蝙蝠冠状病毒RaBtCoV/4991的RdRp序列。对于RaBtCoV/4991，唯一公开的信息是其RdRp短段的序列⁸³，而从未报道过其完整的基因组序列或病毒分离史。在扩增了RaBatCoV/4991的RdRp片段（或整个ORF1b基因）后，他们就会将其用于SARS-CoV-2基因组的后续组装和研制。RdRp序列的微小变化可以在一开始就引入（通过DNA合成），也可以在以后通过传代产生。在另一条研究主线上，当他们从事RaTG13序列的伪造时，他们可以从RaBtCoV/4991的RdRp短段入手，而不对其序列引入任何改变，从而使这两种病毒在这个RdRp短段上的核苷酸序列

100%一致⁸³。这样这个RaTG13病毒就可以宣称早在2013年就被发现了。

2. 来自RaBatCoV/4991的RdRp蛋白的独特之处在于，它比任何其他β冠状病毒的RdRp在开发抗病毒药物方面更有优势。RdRp在人体细胞中没有同系物，这使得这种重要的病毒酶成为抗病毒开发的非常理想的靶点。以目前正在进行临床试验的瑞德西韦（Remdesivir）为例，其靶点就是RdRp。在研制一种新型的、针对人类的病毒时，他们也会对开发解药感兴趣。即使发现这样的药物可能不容易实现，但他们有意加入更适合抗病毒药物开发的RdRp也是合理的。

第四，他们利用反向遗传学将刺突蛋白的基因片段、ORF1b和模板ZC45的其余部分组装成病毒基因组的互补DNA。然后他们会进行体外转录，得到病毒RNA基因组。将RNA基因组转染到细胞中，就可以回收具有所需人工基因组的活病毒和传染性病毒。

第五，采用体内连续传代，他们对病毒株进行表征和优化，以提高病毒株的适配性、感染力和整体适应性。然后获得一个或几个符合一定标准的病毒株作为最终产品。

2.2 研制SARS-CoV-2的假定合成途径

在本小节中，我们更详细地描述了如何在实验室环境中利用现有材料和常规的分子、细胞和病毒学技术进行每一个步骤。这个过程的示意图如图8所示。我们估计，整个过程可以在大约6个月内完成。

步骤1：为hACE2结合的刺突蛋白设计RBM（1.5个月）。

蝙蝠冠状病毒的刺突蛋白由于其RBM内重要残基的缺失而不能或无法有效结合hACE2。这可以由模板病毒ZC45的RBM（图4）为例。在SARS-CoV-2的研制中，第一个也是最关键的步骤是对刺突蛋白进行工程设计，使其获得结合hACE2的能力。有文献证明，自2008年以来，研究实验室已经反复进行了这样的操纵⁴⁴，成功地产生了具有感染人类细胞能力的工程化冠状病毒^{44-46, 88, 89}。虽然有许多可能的方法可以对刺突蛋白进行工程设计，但我们相信，实际上他们所做的是以SARS的RBM为指导，用设计好的、可能经过优化的RBM替换了原来的RBM。如第一部分所述，我们观察到SARS-CoV-2基因组中RBM的任一端存在两个独特的限制性位点EcoRI和BstEII（图5A），而且这种RBM替换已经由石正丽博士和她的长期合作者、结构生物学专家李放博士成功地进行了^{39, 47}。

虽然ZC45刺突蛋白不包含这两个限制性位点（图5B），但它们可以非常容易地被引入。原始的刺突蛋白基因可用RT-PCR扩增或通过DNA合成获得（一些变化可以安全地引入序列的某些可变区域），然后进行PCR。之后使用EcoRI和BstEII以外的限制性位点将该基因克隆到质粒中。一旦进入质粒，刺突基因可以很容易被修改。首先，可以通过将高亮的“gaacac”序列（图5B）转换为所需的“gaattc”来引入EcoRI位点（图5A）。它们之间的区别是两个连续的核苷酸。使用市售的QuikChange定点突变试剂盒，这样的二核苷酸突变可以在不超过一周的时间内产生。随后，BstEII位点可类似地引入在RBM的另一端。具体来说，“gaatacc”序列（图5B）将被转换为所需的“ggttacc”（图5A），这同样需要一周的时间。

一旦这些限制性位点（这是在SARS-CoV-2的刺突蛋白基因内独有的）被成功地引入，不同的RBM段可以方便地进行替换，由此产生的刺突蛋白随后使用既定的化验方法进行评估。

如第一部分所述，RBM段的设计可以通过高分辨率的结构（图3）得到很好的指导^{37, 38}，以智能的方式产生一个类似于SARS的RBM的序列。当进行结构指导下的RBM设计时，他们会按照常规生成几个（例如12个）这样的RBM，并希望一些特定的变体在结合hACE2方面可能优于其他变体。一旦设计完成，他们可以让每个设计好的RBM基因进行商业化合成（快速且非常经济实惠），在5'-端有一个EcoRI位点，在3'-端有一个BstEII位点。然后，这些新型RBM基因可以分别克隆到刺突蛋白基因中。基因合成和随后的克隆，可以批量模式完成设计的RBM的小型库，这大约需要一个月的时间。

然后，这些工程化的刺突蛋白可能会使用既定的假型病毒感染化验来测试hACE2的结合力^{45, 49, 50}。具有良好至异常优越结合力的工程化的刺突蛋白将被选择。（虽然不是必要的，但在这里可能涉及定向进化(在RBM基因上进行容易出错的PCR)，再加上体外结合化验^{39, 90}或假型病毒感染化验^{45, 49, 50}，以获得与hACE2结合的具有特殊亲和力的RBM。）

鉴于刺突蛋白工程的丰富文献^{44-46, 84, 86}和现有的刺突蛋白-hACE2复合物的高分辨率结构^{37, 38}，这一步的成功将得到很大的保证。在这一步骤结束时，可如愿获得一个新的刺突蛋白基因，它编码了一个新的刺突蛋白能够以高亲和力结合hACE2。

步骤2：在S1/S2交界处设计一个弗林酶切位点（0.5个月）。

步骤1的产物，含有工程化的刺突蛋白的质粒，将被进一步修改，以包含在S1/S2交界处的弗林酶切位点（在图4中由绿线表示的段）。这段短的基因序列可以使用几个常规克隆技术方便地插入，包括QuikChange定向位点PCR⁶⁰，重叠PCR，然后使用限制性酶切和连接反应⁹¹，或吉布森组装。这些技术都不会在序列中留下任何痕迹。无论选择哪种克隆方法，插入的基因片都将包含在引物中，引物被设计、合成并用于克隆。这一步，

导致在S1/S2交界处添加的弗林酶切位点的刺突蛋白得到进一步修改，可以在不超过两周的时间内完成。

步骤3：获得一个包含源自RaBtCoV/4991的RdRp短段序列的ORF1b基因（1个月，但可与步骤1和2同时进行）。

与刺突蛋白的工程不同，这里不需要复杂的设计，除了需要包含RaBtCoV/4991的RdRp基因段。这里可以使用吉布森组装。在这种技术中，几个片段，每个相邻的对共享20-40 bp重叠，在一个简单的反应中组合在一起，以组装成一个长的DNA产物。两个或三个片段，每个覆盖ORF1b基因的重要部分，根据已知的蝙蝠冠状病毒序列进行选择。其中一个片段是RaBtCoV/4991的RdRp片段⁸³。每个片段将与引物中引入的适当的重叠区域进行PCR扩增。最后，所有纯化的片段将以等摩尔浓度汇集，并加入到吉布森反应混合物中，经过短暂的孵育，将整体产生所需的ORF1b基因。

步骤4：利用反向遗传学制作设计的病毒基因组，并回收活病毒（0.5个月）。

反向遗传学经常被用于组装整个病毒基因组，包括冠状病毒基因组^{67, 92-96}。最近的例子是利用酵母中的转化辅助重组法重建SARS-CoV-2基因组⁹⁷。利用这种方法，瑞士科研小组组装了整个病毒基因组，并在短短一周内产生了活病毒⁹⁷。这种高效的技术，不会在研制的病毒基因组中留下任何人工操纵的痕迹，自2017年起就可以使用^{98, 99}。除了工程化的刺突基因（来自步骤1和2）和ORF1b基因（来自步骤3），覆盖基因组其余部分的其他片段将通过从模板病毒的RT-PCR扩增或通过遵循从模板病毒的序列略微改变的DNA合成获得。我们认为，后一种方法更有可能，因为它可以将序列变化引入到保守性较差的蛋白质的可变区域，其过程可以很容易地根据多序列对齐指导。更具保守功能的氨基酸序列，如E蛋白的氨基酸序列，可能会保持

不变。然后，所有的DNA片段将被汇集在一起，并转化到酵母中，在那里，SARS-CoV-2基因组的互补DNA将通过转化辅助重组进行组装。当然，也可以采用另一种反向遗传学的方法^{67, 92-96, 100}，武汉病毒研究所过去已经成功地使用了这种方法⁶⁷。虽然一些早期的反向遗传学方法可能会在不同片段连接的地方留下限制性位点，但这些痕迹将很难被检测到，因为连接的确切位置可以在约30kb基因组的任何地方。无论使用哪种方式，病毒基因组的互补DNA将从反向遗传学实验中获得。随后，以该cDNA为模板进行体外转录，将产生病毒RNA基因组，转染到Vero E6细胞中后，可以生产具有所有设计特性的活病毒。

步骤5：优化病毒的适应性，提高病毒在体内的hACE2结合亲和力（2.5-3个月）

从步骤4中回收的病毒需要经过经典的实验—实验室动物的连续传代—进行进一步调整¹⁰¹。这最后一步将验证病毒的适应性，并确保其面向受体的适应性，以适应其预定的宿主，根据上述分析，宿主应该是人类。重要的是，RBM和弗林酶切位点，被分别引入到刺突蛋白中，现在将作为一个功能单元一起优化。在各种可用的冠状病毒动物模型（如小鼠、仓鼠、雪貂和猴子）中，hACE2转基因小鼠（hACE2-mice）应该是这里最合适、最方便的选择。这种动物模型在SARS-CoV的研究过程中已经建立起来了，并且在杰克逊实验室已经有多年的使用经验¹⁰²⁻¹⁰⁴。

连续传代的程序是简单直接的。简而言之，从步骤4中选择的病毒株，即SARS-CoV-2的前体，将被鼻内接种到一组麻醉的hACE2-小鼠中。感染后2-3天左右，肺部的病毒通常会放大到一个峰值滴度。然后，小鼠将死去，其肺部最后均质化。通常，携带病毒量最高的鼠肺上清液将被用于提取候选病毒，以备下一轮传代。经过大约10~15轮的传代，病毒株的hACE2结合亲和力、感染效率和致死率都会得到充分的提高，病毒基因组也会

趋于稳定¹⁰¹。最后，经过一系列的表征实验（如病毒动力学化验、抗体反应化验、症状观察和病理检查等），得到最终产品 SARS-CoV-2，从而结束了整个研制过程。从此，这种病毒病原体可以被扩增（很可能使用Vero E6细胞），并进行常规生产。

值得注意的是，根据对SARS-CoV的研究，hACE2小鼠虽然适合SARS-CoV-2的适应性，但并不是反映病毒在人类中的传播性和相关临床症状的良好模型。我们认为，在COVID-19爆发前，那些科学家可能没有使用合适的动物模型（如叙利亚仓鼠）来测试SARS-CoV-2的传播性。如果他们使用适当的动物模型进行实验，SARS-CoV-2的高传染性就会非常明显，因此SARS-CoV-2不会在疫情爆发之初被描述为“不会造成人传人”。

我们还假定，针对提高传播能力和致死率的广泛实验室适应措施可能会让病毒变得更加强大。因此，SARS-CoV-2在目前对人类的适应过程中，可能已经失去了在传播性和致死性上弱化的能力。这一假设与SARS-CoV-2尽管在大流行，但到目前为止还没有明显的减弱迹象，也与最近出现的主要变异体只表现出更强的传播性的观察相一致¹⁰⁵⁻¹⁰⁸。

连续传代是一个快速而密集的过程，在这个过程中，病毒的适应性被加速。虽然意在模仿自然进化，但连续传代在时间和规模上都受到更多限制。因此，与自然进化相比，预计连续传代过程中随机突变的情况会更少。这对于保守的病毒蛋白来说尤其如此，例如E蛋白。E蛋白在病毒复制中至关重要，是毒性的决定因素，对它进行工程化处理可能会使SARS-CoV-2减毒¹⁰⁹⁻¹¹¹。因此，在最初的组装阶段，这些科学家可能决定保持E蛋白的氨基酸序列与ZC45/ZXC21的序列不变。由于E蛋白的保守性和连续传代的限制，实际上没有发生氨基酸突变，导致SARS-CoV-2和ZC45/ZXC21之间E蛋白的序列一致性100%相同。同样的情况也可能发生在分子克隆的标记（RBM两侧的限制

制性位点)上。连续传代,应该使SARS-CoV-2基因组部分自然化,但可能没有消除所有人工操纵的痕迹。

3. 结语

关于SARS-CoV-2的起源,许多问题仍然没有答案。著名病毒学家在给《自然医学》的一封信中暗示,实验室逃逸虽然没有完全排除,但不太可能,且SARS-CoV-2基因组中没有基因操纵的迹象⁴。然而,我们在这里表明,SARS-CoV-2基因组的刺突蛋白基因内的基因证据(RBM两端的限制性位点;在插入的弗林酶切位点使用的串联稀有密码子)确实存在,并表明SARS-CoV-2基因组应该是基因操纵的产物。此外,已验证的概念、成熟的技术、知识和专业技术都已具备,可以在短时间内方便地研制出这种新型冠状病毒。

抛开动机不谈,以下关于SARS-CoV-2的事实是有充分依据的:

- 1、如果它是实验室产品,那么它产生的最关键因素—骨架/模板病毒(ZC45/ZXC21),是属于军事研究实验室的。
- 2、SARS-CoV-2的基因组序列很可能经过了基因工程改造,通过这个,病毒获得了以人类为目标的能力,并增强了毒性和感染力。
- 3、SARS-CoV-2的特点和致病作用是前所未有的。该病毒具有高度传播、发病隐匿、攻击多器官、后遗症不明确、致死性强、并伴有各种症状和并发症等特点。
- 4、SARS-CoV-2引起了世界性的大流行,夺去了数十万人的生命,使全球经济瘫痪。它具有前所未有的破坏力。

根据我们和其他人收集到的证据，我们认为，要找到 SARS-CoV-2 的来源，就应该对武汉病毒研究所的 P4 实验室及其密切合作者的实验室进行独立审查。这样的调查早就应该进行，且不应该再拖延下去。

我们还注意到，在 2015 年发表的嵌合病毒 SHC015-MA15 中，最初遗漏了美国国家过敏症与传染病研究所（NIAID）对石正丽的经费资助声明。或许是在 2016 年 1 月的会议上恢复了美国国立卫生研究院（NIH）对病毒的增强功能研究的经费资助，因此在 2016 年发表的论文勘误中恢复了此声明。这是一种不寻常的科研行为，需要一个解释。

本报告中没有彻底描述的是，各种证据表明，最近公布的几种冠状病毒（RaTG13¹⁸、RmYN02³⁰和几种穿山甲冠状病毒^{27-29, 31}）非常可疑，很可能是伪造的。这些造假除了欺骗科学界和公众，使 SARS-CoV-2 的真实身份被隐藏外，没有其他目的。虽然排除这些证据的细节并没有改变本报告的结论，但我们认为这些细节将为我们的论点提供更多支持，即 SARS-CoV-2 是一种实验室强化的病毒，是功能增强研究的产物。目前，我们正在编写一份后续报告，重点阐述这些补充证据，不久后将提交。

鸣谢

我们要感谢张道玉与我们分享了 β 冠状病毒不同亚群中 E 蛋白突变的发现。我们也感谢所有匿名的科学家和其他个人，他们为揭示 SARS-CoV-2 起源相关的各种事实做出了贡献。

参考文献

1. Zhan, S.H., Deverman, B.E. & Chan, Y.A. SARS-CoV-2 is well adapted for humans. What does this mean for re-emergence? *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.05.01.073262> (2020).

2. Mou, H. et al. Mutations from bat ACE2 orthologs markedly enhance ACE2-Fc neutralization of SARSCoV-2. *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.06.29.178459> (2020).
3. Piplani, S., Singh, P.K., Winkler, D.A. & Petrovsky, N. In silico comparison of spike protein-ACE2 binding affinities across species; significance for the possible origin of the SARS-CoV-2 virus. *arXiv*, arXiv:2005.06199 (2020).
4. Andersen, K.G., Rambaut, A., Lipkin, W.I., Holmes, E.C. & Garry, R.F. The proximal origin of SARSCoV-2. *Nat Med* 26, 450-452 (2020).
5. Maiti, A.K. On The Origin of SARS-CoV-2 Virus. Preprint (authorea.com), DOI: 10.22541/au.159355977.76503625 (2020).
6. Lin, X. & Chen, S. Major Concerns on the Identification of Bat Coronavirus Strain RaTG13 and Quality of Related Nature Paper. Preprints, 2020060044 (2020).
7. Bengston, D. All journal articles evaluating the origin or epidemiology of SARS-CoV-2 that utilize the RaTG13 bat strain genomics are potentially flawed and should be retracted. OSFPreprints, DOI: 10.31219/osf.io/wy89d (2020).
8. Segreto, R. & Deigin, Y. Is considering a genetic-manipulation origin for SARS-CoV-2 a conspiracy theory that must be censored? Preprint (Researchgate) DOI: 10.13140/RG.2.2.31358.13129/1 (2020).
9. Rahalkar, M.C. & Bahulikar, R.A. Understanding the Origin of 'BatCoV RaTG13', a Virus Closest to SARS-CoV-2. Preprints, 2020050322 (2020).
10. Robinson, C. Was the COVID-19 virus genetically engineered? (<https://gmwatch.org/en/news/latestnews/19383>, 2020).
11. Robinson, C. Another expert challenges assertions that SARS-CoV-2 was not genetically engineered. (<https://gmwatch.org/en/news/latest-news/19383>, 2020).
12. Sørensen, B., Dalgleish, A. & Susrud, A. The Evidence which Suggests that This Is No Naturally Evolved Virus. Preprint, <https://www.minervanett.no/files/2020/07/13/TheEvidenceNoNaturalEvol.pdf> (2020).
13. Zhang, B. SARS-CoV-2 Could Come from a Lab - A Critique of "The Proximal Origin of SARS-CoV-2" Published in Nature Medicine. (<https://www.linkedin.com/pulse/sars-cov-2-could-come-from-labcritique-proximal-origin-billy-zhang> articleId=6651628681431175168#comments-6651628681431175168&trk=public_profile_article_view, 2020).
14. Sirotkin, K. & Sirotkin, D. Might SARS-CoV-2 Have Arisen via Serial Passage through an Animal Host or Cell Culture? *BioEssays*, <https://doi.org/10.1002/bies.202000091> (2020).
15. Seyran, M. et al. Questions concerning the proximal origin of SARS-CoV-2. *J Med Virol* (2020).
16. China Honors Ian Lipkin. (<https://www.publichealth.columbia.edu/public-health-now/news/china-honorsian-lipkin>, 2020).
17. Holmes, E. Academic CV. (<https://www.sydney.edu.au/AcademicProfiles/profile/resource?urlid=edward.holmes&type=cv>, 2020).
18. Zhou, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*(2020).
19. Rahalkar, M. & Bahulikar, R. The Abnormal Nature of the Fecal Swab Sample used for NGS Analysis of RaTG13 Genome Sequence Imposes a Question on the Correctness of the RaTG13 Sequence. Preprints.org, 2020080205 (2020).
20. Singla, M., Ahmad, S., Gupta, C. & Sethi, T. De-novo Assembly of RaTG13 Genome Reveals Inconsistencies Further Obscuring SARS-CoV-2 Origins. Preprints, 2020080595 (doi: 10.20944/preprints202008.0595.v1) (2020).
21. Zhang, D. Anomalies in BatCoV/RaTG13 sequencing and provenance. Preprint (zenodo.org), <https://zenodo.org/record/3987503#.Xz9GzC-z3GI> (2020).
22. Robinson, C. Journals censor lab origin theory for SARS-CoV-2. (<https://www.gmwatch.org/en/news/latest-news/19475-journals-censor-lab-origin-theory-for-sars-cov-2>, 2020).
23. Scientific evidence and logic behind the claim that the Wuhan coronavirus is man-made. <https://nerdhaspower.weebly.com> (2020).
24. Zhang, Y. et al. The ORF8 Protein of SARS-CoV-2 Mediates Immune Evasion through Potently Downregulating MHC-I. *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.05.24.111823> (2020).

25. Muth, D. et al. Attenuation of replication by a 29 nucleotide deletion in SARS-coronavirus acquired during the early stages of human-to-human transmission. *Sci Rep* 8, 15177 (2018).
26. Schoeman, D. & Fielding, B.C. Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virology* 16, 69 (2019).
27. Lam, T.T. et al. Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature* (2020).
28. Liu, P. et al. Are pangolins the intermediate host of the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2)? *PLoS Pathog* 16, e1008421 (2020).
29. Xiao, K. et al. Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. *Nature* (2020).
30. Zhou, H. et al. A Novel Bat Coronavirus Closely Related to SARS-CoV-2 Contains Natural Insertions at the S1/S2 Cleavage Site of the Spike Protein. *Curr Biol* 30, 2196-2203 e3 (2020).
31. Zhang, T., Wu, Q. & Zhang, Z. Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated with the COVID-19 Outbreak. *Curr Biol* 30, 1578 (2020).
32. Yang, X.L. et al. Isolation and Characterization of a Novel Bat Coronavirus Closely Related to the Direct Progenitor of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *J Virol* 90, 3253-6 (2015).
33. Hu, D. et al. Genomic characterization and infectivity of a novel SARS-like coronavirus in Chinese bats. *Emerg Microbes Infect* 7, 154 (2018).
34. Wang, Y. Preliminary investigation of viruses carried by bats on the southeast coastal area (东南沿海地区蝙蝠携带病毒的初步调查研究). *Master Thesis* (2017).
35. Wu, F. et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 579, 265-269 (2020).
36. Lab That First Shared Novel Coronavirus Genome Still Shut Down by Chinese Government. *Global Biodefense*, <https://globalbiodefense.com/headlines/chinese-lab-that-first-shared-novel-coronavirus-genome-shut-down/> (2020).
37. Song, W., Gui, M., Wang, X. & Xiang, Y. Cryo-EM structure of the SARS coronavirus spike glycoprotein in complex with its host cell receptor ACE2. *PLoS Pathog* 14, e1007236 (2018).
38. Li, F., Li, W., Farzan, M. & Harrison, S.C. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. *Science* 309, 1864-8 (2005).
39. Shang, J. et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature* (2020).
40. Hassanin, A. The SARS-CoV-2-like virus found in captive pangolins from Guangdong should be better sequenced. *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.05.07.077016> (2020).
41. Zhang, D. The Pan-SL-CoV/GD sequences may be from contamination. *Preprint* (zenodo.org), DOI: 10.5281/zenodo.3885333 (2020).
42. Chan, Y.A. & Zhan, S.H. Single source of pangolin CoVs with a near identical Spike RBD to SARSCoV-2. *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.07.07.184374> (2020).
43. Lee, J. et al. No evidence of coronaviruses or other potentially zoonotic viruses in Sunda pangolins (*Manis javanica*) entering the wildlife trade via Malaysia. *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.06.19.158717> (2020).
44. Becker, M.M. et al. Synthetic recombinant bat SARS-like coronavirus is infectious in cultured cells and in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19944-9 (2008).
45. Menachery, V.D. et al. A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. *Nat Med* 21, 1508-13 (2015).
46. Menachery, V.D. et al. SARS-like WIV1-CoV poised for human emergence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 3048-53 (2016).
47. Ren, W. et al. Difference in receptor usage between severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus and SARS-like coronavirus of bat origin. *J Virol* 82, 1899-907 (2008).
48. Li, X. et al. Emergence of SARS-CoV-2 through Recombination and Strong Purifying Selection. *bioRxiv* (2020).
49. Hou, Y. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) proteins of different bat species confer variable susceptibility to SARS-CoV entry. *Arch Virol* 155, 1563-9 (2010).
50. Yang, Y. et al. Two Mutations Were Critical for Bat-to-Human Transmission of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *J Virol* 89, 9119-23 (2015).

51. Luo, C.M. et al. Discovery of Novel Bat Coronaviruses in South China That Use the Same Receptor as Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *J Virol* 92(2018).
52. Cui, J., Li, F. & Shi, Z.L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* 17, 181-192 (2019).
53. Wan, Y. et al. Molecular Mechanism for Antibody-Dependent Enhancement of Coronavirus Entry. *J Virol* 94(2020).
54. Li, F. Receptor recognition mechanisms of coronaviruses: a decade of structural studies. *J Virol* 89, 1954-64 (2015).
55. Li, F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annu Rev Virol* 3, 237-261 (2016).
56. Shang, J. et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117, 11727-11734 (2020).
57. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H. & Pohlmann, S. A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. *Mol Cell* 78, 779-784 e5 (2020).
58. Coutard, B. et al. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res* 176, 104742 (2020).
59. Claas, E.C. et al. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet* 351, 472-7 (1998).
60. Watanabe, R. et al. Entry from the cell surface of severe acute respiratory syndrome coronavirus with cleaved S protein as revealed by pseudotype virus bearing cleaved S protein. *J Virol* 82, 11985-91 (2008).
61. Belouzard, S., Chu, V.C. & Whittaker, G.R. Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 5871-6 (2009).
62. Kido, H. et al. Role of host cellular proteases in the pathogenesis of influenza and influenza-induced multiple organ failure. *Biochim Biophys Acta* 1824, 186-94 (2012).
63. Sun, X., Tse, L.V., Ferguson, A.D. & Whittaker, G.R. Modifications to the hemagglutinin cleavage site control the virulence of a neurotropic H1N1 influenza virus. *J Virol* 84, 8683-90 (2010).
64. Cheng, J. et al. The S2 Subunit of QX-type Infectious Bronchitis Coronavirus Spike Protein Is an Essential Determinant of Neurotropism. *Viruses* 11(2019).
65. Ito, T. et al. Generation of a highly pathogenic avian influenza A virus from an avirulent field isolate by passaging in chickens. *J Virol* 75, 4439-43 (2001).
66. Canrong Wu, Y.Y., Yang Liu, Peng Zhang, Yali Wang, Hua Li, Qiqi Wang, Yang Xu, Mingxue Li, Mengzhu Zheng, Lixia Chen. Furin, a potential therapeutic target for COVID-19. Preprint (chinaXiv), <http://www.chinaxiv.org/abs/202002.00062> (2020).
67. Zeng, L.P. et al. Bat Severe Acute Respiratory Syndrome-Like Coronavirus WIV1 Encodes an Extra Accessory Protein, ORFX, Involved in Modulation of the Host Immune Response. *J Virol* 90, 6573-6582 (2016).
68. Lau, S.Y. et al. Attenuated SARS-CoV-2 variants with deletions at the S1/S2 junction. *Emerg Microbes Infect* 9, 837-842 (2020).
69. Liu, Z. et al. Identification of common deletions in the spike protein of SARS-CoV-2. *J Virol* (2020).
70. Ge, X.Y. et al. Detection of alpha- and betacoronaviruses in rodents from Yunnan, China. *Virol J* 14, 98 (2017).
71. Guan, Y. et al. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science* 302, 276-8 (2003).
72. Ge, X.Y. et al. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature* 503, 535-8 (2013).
73. Lau, S.K. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14040-5 (2005).
74. Kam, Y.W. et al. Antibodies against trimeric S glycoprotein protect hamsters against SARS-CoV challenge despite their capacity to mediate FcγRII-dependent entry into B cells in vitro. *Vaccine* 25, 729-40 (2007).
75. Chan, J.F. et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus: another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease. *Clin Microbiol Rev* 28, 465-522 (2015).

76. Zhou, J., Chu, H., Chan, J.F. & Yuen, K.Y. Middle East respiratory syndrome coronavirus infection: virus-host cell interactions and implications on pathogenesis. *Virology* 12, 218 (2015).
77. Yeung, M.L. et al. MERS coronavirus induces apoptosis in kidney and lung by upregulating Smad7 and FGF2. *Nat Microbiol* 1, 16004 (2016).
78. Chu, D.K.W. et al. MERS coronaviruses from camels in Africa exhibit region-dependent genetic diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, 3144-3149 (2018).
79. Ommeh, S. et al. Genetic Evidence of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-Cov) and Widespread Seroprevalence among Camels in Kenya. *Virology* 33, 484-492 (2018).
80. Sia, S.F. et al. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature* (2020).
81. Ren, W. et al. Full-length genome sequences of two SARS-like coronaviruses in horseshoe bats and genetic variation analysis. *J Gen Virol* 87, 3355-9 (2006).
82. Yuan, J. et al. Intraspecies diversity of SARS-like coronaviruses in *Rhinolophus sinicus* and its implications for the origin of SARS coronaviruses in humans. *J Gen Virol* 91, 1058-62 (2010).
83. Ge, X.Y. et al. Coexistence of multiple coronaviruses in several bat colonies in an abandoned mineshaft. *Virology* 31, 31-40 (2016).
84. Hu, B. et al. Discovery of a rich gene pool of bat SARS-related coronaviruses provides new insights into the origin of SARS coronavirus. *PLoS Pathog* 13, e1006698 (2017).
85. Luo, Y. et al. Longitudinal Surveillance of Betacoronaviruses in Fruit Bats in Yunnan Province, China During 2009-2016. *Virology* 33, 87-95 (2018).
86. Kuo, L., Godeke, G.J., Raamsman, M.J., Masters, P.S. & Rottier, P.J. Retargeting of coronavirus by substitution of the spike glycoprotein ectodomain: crossing the host cell species barrier. *J Virol* 74, 1393-406 (2000).
87. Drexler, J.F. et al. Genomic characterization of severe acute respiratory syndrome-related coronavirus in European bats and classification of coronaviruses based on partial RNA-dependent RNA polymerase gene sequences. *J Virol* 84, 11336-49 (2010).
88. Agnihothram, S. et al. A mouse model for Betacoronavirus subgroup 2c using a bat coronavirus strain HKU5 variant. *mBio* 5, e00047-14 (2014).
89. Johnson, B.A., Graham, R.L. & Menachery, V.D. Viral metagenomics, protein structure, and reverse genetics: Key strategies for investigating coronaviruses. *Virology* 517, 30-37 (2018).
90. Wu, K., Peng, G., Wilken, M., Geraghty, R.J. & Li, F. Mechanisms of host receptor adaptation by severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Biol Chem* 287, 8904-11 (2012).
91. Follis, K.E., York, J. & Nunberg, J.H. Furin cleavage of the SARS coronavirus spike glycoprotein enhances cell-cell fusion but does not affect virion entry. *Virology* 350, 358-69 (2006).
92. Yount, B., Denison, M.R., Weiss, S.R. & Baric, R.S. Systematic assembly of a full-length infectious cDNA of mouse hepatitis virus strain A59. *J Virol* 76, 11065-78 (2002).
93. Yount, B. et al. Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12995-3000 (2003).
94. Almazan, F. et al. Construction of a severe acute respiratory syndrome coronavirus infectious cDNA clone and a replicon to study coronavirus RNA synthesis. *J Virol* 80, 10900-6 (2006).
95. Scobey, T. et al. Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 16157-62 (2013).
96. Almazan, F., Marquez-Jurado, S., Nogales, A. & Enjuanes, L. Engineering infectious cDNAs of coronavirus as bacterial artificial chromosomes. *Methods Mol Biol* 1282, 135-52 (2015).
97. Thao, T.T.N. et al. Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform. *Nature* (2020).
98. Oldfield, L.M. et al. Genome-wide engineering of an infectious clone of herpes simplex virus type 1 using synthetic genomics assembly methods. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E8885-E8894 (2017).

99. Vashee, S. et al. Cloning, Assembly, and Modification of the Primary Human Cytomegalovirus Isolate Toledo by Yeast-Based Transformation-Associated Recombination. *mSphere* 2(2017).
100. Xie, X. et al. An Infectious cDNA Clone of SARS-CoV-2. *Cell Host Microbe* 27, 841-848 e3 (2020).
101. Roberts, A. et al. A mouse-adapted SARS-coronavirus causes disease and mortality in BALB/c mice. *PLoS Pathog* 3, e5 (2007).
102. Roberts, A. et al. Animal models and vaccines for SARS-CoV infection. *Virus Res* 133, 20-32 (2008).
103. Takayama, K. In Vitro and Animal Models for SARS-CoV-2 research. *Trends Pharmacol Sci* 41, 513-517 (2020).
104. Wang, Q. hACE2 Transgenic Mouse Model For Coronavirus (COVID-19) Research. The Jackson Laboratory Research Highlight, <https://www.jax.org/news-and-insights/2020/february/introducingmouse-model-for-corona-virus#> (2020).
105. Zhang, L. et al. The D614G mutation in the SARS-CoV-2 spike protein reduces S1 shedding and increases infectivity. *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.06.12.148726> (2020).
106. Yurkovetskiy, L. et al. Structural and Functional Analysis of the D614G SARS-CoV-2 Spike Protein Variant. *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.07.04.187757> (2020).
107. Korber, B. et al. Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell* 182, 812-827 e19 (2020).
108. Plante, J.A. et al. Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness and neutralization susceptibility. *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.09.01.278689> (2020).
109. Poon, L.L. et al. Recurrent mutations associated with isolation and passage of SARS coronavirus in cells from non-human primates. *J Med Virol* 76, 435-40 (2005).
110. Pervushin, K. et al. Structure and inhibition of the SARS coronavirus envelope protein ion channel. *PLoS Pathog* 5, e1000511 (2009).
111. Nieto-Torres, J.L. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogenesis. *PLoS Pathog* 10, e1004077 (2014).

Soli Deo Gloria