

DOI:10.13350/j.cjpb.230501

• 论著 •

# H1N1 嵌合冷适应疫苗株的构建及其生物学特性分析与鉴定\*

李东旭<sup>1,2</sup>, 孙伟洋<sup>2</sup>, 赵梦琳<sup>2</sup>, 孙悦<sup>2,3</sup>, 朱梦涵<sup>2,4</sup>, 刘夏薇<sup>2,4</sup>, 苏日娜<sup>2,5</sup>, 武毓姝<sup>1,2</sup>,  
任娟<sup>2,6</sup>, 罗敏<sup>2,6</sup>, 王铁成<sup>2</sup>, 冯娜<sup>2</sup>, 夏咸柱<sup>2</sup>, 高玉伟<sup>2\*\*</sup>, 闫芳<sup>1\*\*</sup>

(1. 山西农业大学, 山西晋中 030801; 2. 中国农业科学院长春兽医研究所; 3. 东北师范大学;  
4. 河南大学; 5. 吉林农业大学; 6. 山东师范大学)

**【摘要】** 目的 应用反向遗传技术构建以B型流感病毒冷适应株为骨架表达季节性流感病毒H1N1 HA蛋白的嵌合疫苗株。方法 将B型流感病毒冷适应株B/Vienna/1/99的HA片段胞外区替换为H1N1(A/Victoria/2570/2019)的HA蛋白,将重组质粒与骨架株的其余7个质粒共转染293T细胞,拯救H1N1嵌合疫苗株。对重组病毒株进行血凝鉴定、RT-PCR鉴定、电镜鉴定、一步生长曲线绘制以及小鼠安全性评价。结果 成功拯救出H1N1嵌合流感病毒株,命名为rA/B-H1-Vic。经测序鉴定其序列与预期一致,并且在电镜下观察到流感病毒粒子的典型特征。H1N1嵌合流感病毒株血凝效价最高达 $2^5$ ,在MDCK细胞上的病毒滴度为 $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub>/mL,在鸡胚中的病毒滴度为 $10^{8.36}$  EID<sub>50</sub>/mL。分别以 $10^6$  EID<sub>50</sub>和 $10^5$  EID<sub>50</sub>剂量鼻腔接种小鼠,其体重与对照组相比无明显下降,小鼠存活率100%,攻毒后第3d仅在小鼠鼻甲骨和肺脏组织检测到低水平的病毒复制。结论 成功拯救出无毒力的H1N1嵌合疫苗株,为流感病毒新型疫苗的研制提供了新的思路。

**【关键词】** H1N1嵌合疫苗株;HA;嵌合疫苗;反向遗传技术

**【中图分类号】** R373.1

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2023)05-0497-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 May;18(5):497-501,507.]

## The construction and identification of H1N1 chimeric attenuated cold adapted influenza vaccine

LI Dongxu<sup>1</sup>, SUN Weiyang<sup>2</sup>, ZHAO Menglin<sup>2</sup>, SUN Yue<sup>2,3</sup>, ZHU Menghan<sup>2,4</sup>, LIU Xiawei<sup>2,4</sup>, SU Rina<sup>2,5</sup>, WU Yushu<sup>1,2</sup>, REN Juan<sup>2,6</sup>, LUO Min<sup>2,6</sup>, WANG Tiecheng<sup>2</sup>, FENG Na<sup>2</sup>, XIA Xianzhu<sup>2</sup>, GAO Yuwei<sup>2</sup>, YAN Fang<sup>1</sup> (1. Shanxi Agricultural University, Jinzhong, Shanxi 030801, China; 2. Key Laboratory of Jilin Province for Zoonosis Prevention and Control, Changchun Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences; 3. Northeast Normal University; 4. Henan University; 5. Jilin Agricultural University; 6. Shandong Normal University)\*\*\*

**【Abstract】** **Objective** In this study, we applied reverse genetic techniques to construct a chimeric influenza vaccine expressing the HA protein of seasonal influenza virus H1N1 using the cold-adapted attenuated influenza B virus strain as a backbone. **Methods** The HA fragment ectodomain region of B/Vienna/1/99 of influenza B virus was replaced with the HA protein of H1N1 influenza virus (A/Victoria/2570/2019), and the recombinant plasmid was cotransfected with the other seven plasmids of the backbone strain in 293T cells at 33 °C under 5% CO<sub>2</sub> for 72 hours to rescue the H1N1 chimeric vaccine strain. The recombinant viral strain was subjected to hemagglutination assay identification, RT-PCR identification, electron microscopy identification, one-step growth curve. We evaluated the safety of this H1N1 chimeric influenza vaccine in mice model. **Results** The H1N1 chimeric influenza virus strain was successfully rescued and named rA/B-H1-Vic. The sequence was sequenced correctly and identified as expected, and typical particles of influenza virus were observed by electron microscopy. The H1N1 chimeric influenza virus strain had a hemagglutination titers of about  $2^5$ . Also, we detected the viral titer of  $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub>/mL on MDCK cells and  $10^{8.36}$  EID<sub>50</sub>/mL in chicken embryo eggs. Mice were inoculated intranasally with  $10^6$  EID<sub>50</sub> and  $10^5$  EID<sub>50</sub> in a volume of 50  $\mu$ L, respectively, and the infective mice showed no significant weight loss compared to control mice, the survival rate of infective mice was 100%. We detected a low level of viral replication only in nasal turbinate and lungs- on day 3 post-infection. The other tissues, including hearts, livers,

\* **【基金项目】** 国家科技重大专项(No. 2020ZX10001-016)。

\*\* **【通讯作者】** 闫芳, E-mail: yanfang6615@163.com; 高玉伟, E-mail: yuwei0901@outlook.com

**【作者简介】** 李东旭(1997-),女,河北省保定人,硕士,主要从事病毒学与人兽共患病学研究。E-mail: lidongxu1014@163.com

spleens, kidney, intestines, and brains, were found no virus replication. **Conclusion** We rescued the non-virulent H1N1 chimeric vaccine strain successfully and it may provide a new strategy for the development of novel influenza vaccines.

**【Key words】** H1N1 chimeric vaccine strain; HA; chimeric vaccine; reverse genetic technology

季节性流感是一种由流感病毒引起的急性呼吸道传染病。据世界卫生组织报道,季节性流感每年在全球造成 29 万至 65 万人死亡<sup>[1]</sup>。此外,流感大流行不定期发生,造成严重的公共卫生问题<sup>[2]</sup>。季节性流感病毒主要包括 H1N1、H3N2 和 B 型流感病毒。其中, H1N1 是常见的季节性流感病毒亚型,历史上引起多次大流行。2009 年 H1N1 亚型流感病毒引起全球大流行,造成严重影响<sup>[3]</sup>。从 2019 年 9 月到 2020 年 2 月, H1N1 亚型流感病毒至少造成 3 400 万例流感疾病,死亡 2 万例<sup>[4]</sup>。H1N1 流感病毒具有高传染性、强致病力、高突变率等特点,给流感的防治带来较大困难。

流感病毒基因组由 8 段线性单股负链 RNA 组成,其中血凝素(HA)蛋白是流感病毒的主要表面蛋白,能够结合宿主细胞表面唾液酸受体,并在病毒进入细胞时引起膜融合<sup>[5]</sup>。同时,流感病毒 HA 蛋白是研究流感病毒疫苗的主要靶蛋白,目前多种类型的流感疫苗研究中均以 HA 蛋白作为研究对象,包括裂解疫苗、亚单位疫苗、病毒载体疫苗等。

在人类中传播的乙型流感病毒分为两个谱系, B/Victoria/2/87 谱系和 B/Yamagata/16/88 谱系。这两个谱系交替流行,有报道新冠疫情发生后的 2020 年 3 月以来很少检测到 Yamagata 谱系<sup>[6]</sup>。乙型流感病毒相较于甲型流感病毒发生抗原变异的速度相对较慢<sup>[7]</sup>。目前我国已经上市的流感疫苗包含减毒活疫苗和灭活疫苗等。冷适应减毒活疫苗具有温度敏感性和冷适应特性,能够在人鼻腔低温(30 ℃)条件下增殖<sup>[8]</sup>,可在上呼吸道复制,诱导机体产生黏膜免疫、体液免疫和细胞免疫多重免疫反应应答,同时具有不与甲型流感病毒发生基因重配的优势。目前,除了商品化流感冷适应疫苗的骨架株外,也已开发出多种 A 型和 B 型流感病毒冷适应骨架株。

本研究拟对 B 型流感病毒冷适应株 B/Vienna/1/99 进行改造,将 HA 基因片段胞外区替换为 A/Victoria/2570/2019 的 HA 基因片段,剩下的 HA 蛋白包装信号部分保持不变<sup>[9]</sup>,构建能表达甲型 H1N1 流感 HA 蛋白的安全性好的 A/B 嵌合流感减毒株,为新型流感减毒疫苗的研发提供一种新的思路。

## 材料与amp;方法

### 1 材料

**1.1 载体和质粒** B 型冷适应流感病毒 B/Vienna/

1/99 基因 8 质粒拯救系统和 A/Victoria/2570/2019 HA 基因重组质粒由中国农业科学院长春兽医研究所病毒学实验室保存。

**1.2 细胞和鸡胚** 293T 和 MDCK 细胞由中国农业科学院长春兽医研究所病毒学实验室保存。8 日龄 SPF 鸡胚以及 4~6 周龄、雌性、SPF BALB/c 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

**1.3 主要试剂** 0.25% Trypsin-EDTA, 0.05% Trypsin-EDTA, Fetal Bovine Serum (FBS), DMEM 培养基, Opti-MEM, Antibiotic-Antimycotic 及 Lipofectamine™ 3000 Transfection Kit 购自美国 Thermo Fisher SCIENTIFIC 公司; Revere Transcriptase XL(AMV), Nucleo Spin Gel and PCR Clean-up 试剂盒和 Recombinant RNase inhibitor 购自中国宝生物工程大连有限公司; Phusion HF DNA Polymerase 购自美国 NEW ENGLAND Biolabs 公司; QIAamp Viral RNA Kits 及 QIAprep® Spin Miniprep Kit 质粒小提试剂盒购自德国 QIAGEN 公司; 1×PBS 缓冲液及氨苄青霉素溶液购自中国北京索莱宝科技有限公司; TPCK 胰蛋白酶购自美国 Sigma 公司。

**1.4 主要仪器设备** 基因扩增仪购自中国杭州朗基科学仪器有限公司;电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司;凝胶成像分析仪购自上海天能科技有限公司;生物安全柜购自中国北京东联哈尔仪器制造有限公司; -80 ℃ 超低温冰箱购自海尔生物医疗股份有限公司;恒温培养箱购自上海三腾仪器有限公司;光学显微镜购自日本 OLYMPUS 公司。

## 2 方法

**2.1 H1N1 嵌合流感病毒株的拯救** 取 293T 细胞用含 10% 胎牛血清和 1% Anti-Anti 的 DMEM 培养基培养,转染前用 0.05% 胰酶消化,测定细胞密度后以每孔  $1 \times 10^6$  个细胞的密度均匀铺至六孔板。分别将 B 型流感病毒冷适应株 B/Vienna/1/99 的 7 个质粒 pBD-BV-NA、pBD-BV-NP、pBD-BV-PA、pBD-BV-PB2、pBD-BV-PB1、pBD-BV-M、pBD-BV-NS 与重组质粒 pBD-H1-HA 各 600 ng 加入含 250  $\mu$ L Opti-MEM 的 1.5 mL 离心管中,与转染试剂混匀后室温静置 30 min,置于含 5% CO<sub>2</sub> 的 33 ℃ 细胞培养箱中孵育。转染 12 h 后,换含有 1% Anti-Anti 和终浓度为 0.2  $\mu$ g/mL TPCK 胰酶处理的 Opti-MEM 维持液继续培养 72 h,收集转染液保存备用。

取收集的转染液接种 8 日龄鸡胚尿囊腔,于 33 °C 恒温培养箱中孵育 72 h,测定鸡胚尿囊液血凝效价,收获效价高的鸡胚尿囊液,4 °C、3 500 r/min(离心半径 7 cm)离心 10 min,取上清,分装,作为毒种-80 °C 保存。

**2.2 H1N1 嵌合疫苗株的 RT-PCR 鉴定及测序鉴定** 设计 RT-PCR 引物(表 1)扩增 B 型流感病毒株全基因序列。根据 QIAamp Viral RNA Kits 说明书提取 H1N1 嵌合疫苗株的总 RNA,用鉴定引物进行 RT-PCR 和 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。纯化回收 PCR 产物并进行测序鉴定,以验证 H1N1-HA 基因是否正确。

表 1 RT-PCR 引物  
Table 1 RT-PCR primer

引物名称 Primer	引物序列(5'-3') Sequence
HA-F	CCAGCAGAAGCAGAGCATTTTC
HA-R	TTAGTAGTAACAAGAGCATTTTTCAATAACG
NA-F	CCAGCAGAAGCAGAGCATC
NA-R	TTAGTAGTAACAAGAGCATTTTTGAG
NP-F	CCAGCAGAAGCACAGCA
NP-R	TTAGTAGAAAACAACAGCATTTTT
PA-F	CCAGCAGAAGCGGTGCGTTT
PA-R	TTAGTAGAAAACACGTGCATTTTTGATTC
PB1-F	CCAGCAGAAGCGGAGCCTTT
PB1-R	TTAGTAGAAAACACGAGCCTTTTTTCA
PB2-F	CCAGCAGAAGCGGAGCCTTT
PB2-R	TTAGTAGAAAACACGAGCATTTTTCACTC
M-F	CCAGCAGAAGCACGCACT
M-R	TTAGTAGAAAACAACGCACTTTTTTC
NS-F	CCAGCAGAAGCAGAGGA
NS-R	TTAGTAGTAACAAGAGGATTTTTAT

**2.3 H1N1 嵌合疫苗株的电镜鉴定** 于收集的鸡胚尿囊液毒种中加入 1%β-丙内酯,4 °C 过夜灭活。经磷酸钨溶液负染后于透射电镜下观察病毒形态。

**2.4 H1N1 嵌合疫苗株 TCID<sub>50</sub> 的测定** MDCK 细胞用含 5%胎牛血清和 1%Anti-Anti 的 DMEM 培养基培养,转染前用 0.25%胰酶消化,根据细胞密度均匀铺至 96 孔板,置于含 5%CO<sub>2</sub> 的 37 °C 细胞培养箱中培养 9 h,显微镜下观察细胞汇合率达到 80%后测定 TCID<sub>50</sub>。96 孔板提前用 DMEM 培养基清洗两次。将 H1N1 嵌合疫苗株 10 倍倍比稀释至 10<sup>-8</sup>,每个稀释梯度做 3 个重复,加入 96 孔板,每孔 100 μL,于 5% CO<sub>2</sub>、33 °C 细胞培养箱中孵育 1.5 h,每隔 15~20 min 轻轻晃匀细胞板。孵育 1.5 h 后弃去病毒液,换含 1% Anti-Anti 和终浓度为 2 μg/mL TPCK 胰酶处理的 Opti-MEM 维持液,继续培养 72 h,收集细胞培养上清液测定血凝效价,按照 Reed-Muench 法计算 H1N1 嵌合疫苗株的 TCID<sub>50</sub>。

**2.5 H1N1 嵌合疫苗株 EID<sub>50</sub> 的测定** 将 H1N1 嵌合疫苗株 10 倍倍比稀释至 10<sup>-8</sup>,每个稀释梯度做 3 个重复,接种 8 日龄鸡胚尿囊腔,100 μL/枚,于 33 °C 恒温培养箱中孵育 72 h,收集鸡胚尿囊液测定血凝效价,按照 Reed-Muench 法计算 H1N1 嵌合疫苗株的 EID<sub>50</sub>。

**2.6 H1N1 嵌合疫苗株一步生长曲线的测定** 将 H1N1 嵌合疫苗株以 MOI=0.1 感染在 6 孔板中生长至 80%的单层 MDCK 细胞,在 5% CO<sub>2</sub>、33 °C 细胞培养箱中孵育 1.5 h,弃去病毒液;加入含 1% Anti-Anti 和终浓度为 2 μg/mL TPCK 胰酶的维持液,继续培养 72 h,并分别于 12、24、36、48、60、72 h 收取病毒液进行 TCID<sub>50</sub> 的测定,绘制一步生长曲线。

**2.7 H1N1 嵌合疫苗株接种小鼠的安全性评价** 将 4~6 周龄雌性 BALB/c 小鼠随机分为 3 组,实验组均为 11 只,对照 Mock 组为 5 只。用无菌 PBS 稀释 H1N1 嵌合疫苗株毒种至攻毒剂量,高剂量组攻毒剂量为 10<sup>6</sup>EID<sub>50</sub>/50 μL,低剂量组攻毒剂量为 10<sup>5</sup>EID<sub>50</sub>/50 μL。小鼠麻醉后按照设定的分组进行滴鼻攻毒,对照组用等体积的无菌 PBS。攻毒开始记为第 0 d,连续对实验组和对照组小鼠进行 14 d 体重和存活率监测,并于攻毒后第 3 d 和第 6 d 从各组随机取 3 只小鼠的心、肝、脾、肺、肾、肠、鼻甲骨、脑等组织进行病毒滴度测定,评价疫苗株的安全性。

## 结果

### 1 H1N1 嵌合疫苗株的拯救及其血凝效价

应用反向遗传技术构建 H1N1 嵌合疫苗株,拯救成功的 H1N1 嵌合疫苗株命名为 rA/B-H1-Vic,接种 MDCK 细胞后收获病毒上清液,测定其血凝效价为 2<sup>5</sup>(图 1)。

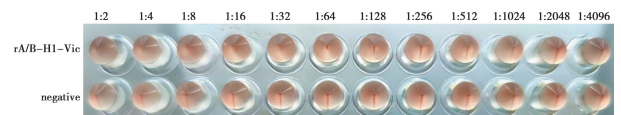


图 1 嵌合流感病毒株 rA/B-H1-Vic 的血凝试验结果  
Fig. 1 Hemagglutination test of chimeric influenza virus strain rA/B-H1-Vic

### 2 H1N1 嵌合疫苗株的 RT-PCR 及测序鉴定

将 H1N1 嵌合疫苗株 rA/B-H1-Vic 根据 QIAamp Viral RNA Kits 说明书提取 RNA,经 Revere Transcriptase XL (AMV) 反转录后,获得 cDNA。以 cDNA 为模板,分别用 8 片段鉴定引物进行 PCR 扩增,PCR 产物 1%琼脂糖凝胶电泳结果如图 2,H1N1 嵌合疫苗株 8 个基因片段分别为 2 396、2 369、2 305、1 882、1 844、1 557、1 190、1 097 bp。



PCR 产物测序后进行序列比对分析,与基因序列结果一致。

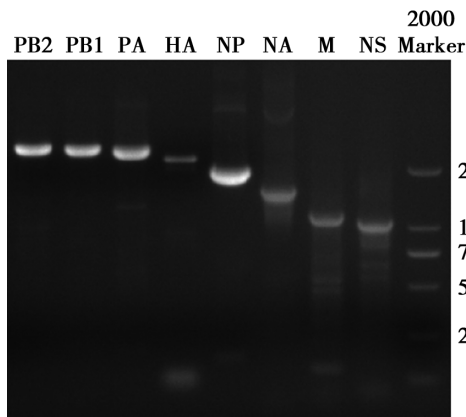


图 2 嵌合流感病毒株 rA/B-H1-Vic 的 8 个基因片段的 PCR 扩增  
Fig. 2 PCR results of 8 gene segments of chimeric influenza virus strain rA/B-H1-Vic

### 3 H1N1 嵌合疫苗株的 TCID<sub>50</sub>

将 H1N1 嵌合疫苗株以不同稀释度接种 MDCK 细胞,33 °C 培养箱中培养 72 h 后,收集细胞上清液测定血凝效价,按照 Reed-Muench 法计算 H1N1 嵌合疫苗株的 TCID<sub>50</sub>,结果显示 H1N1 嵌合疫苗株在 MDCK 细胞上的病毒滴度为 10<sup>4.5</sup> TCID<sub>50</sub>/mL。

### 4 H1N1 嵌合疫苗株的 EID<sub>50</sub>

将 H1N1 嵌合疫苗株 10 倍倍比稀释至 10<sup>-8</sup>,每个稀释度 3 个重复,接种 8 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔,33 °C 培养箱中培养 72 h 后,收集鸡胚尿囊液测定血凝效价,按照 Reed-Muench 法计算 H1N1 嵌合疫苗株的 EID<sub>50</sub>,结果显示 H1N1 嵌合疫苗株在鸡胚上的病毒滴度为 10<sup>8.36</sup> EID<sub>50</sub>/mL。

### 5 H1N1 嵌合疫苗株电镜下的形态

H1N1 嵌合疫苗株染色后电镜观察其形态,结果如图 3。病毒颗粒呈球形,直径在 80~120 nm,病毒粒子表面有纤突,与流感病毒典型特征一致。

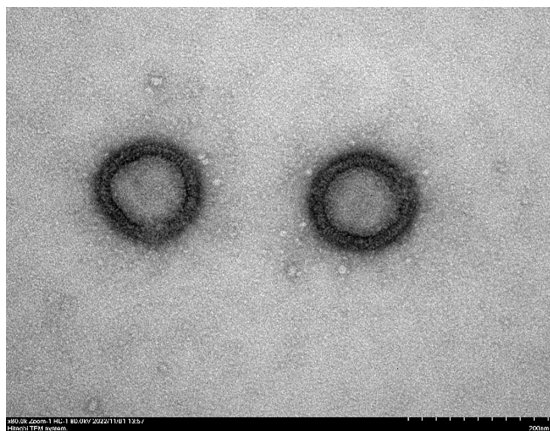


图 3 嵌合流感病毒株 rA/B-H1-Vic 电镜图(80000×)  
Fig. 3 Electron micrograph of chimeric influenza virus strain rA/B-H1-Vic

### 6 H1N1 嵌合疫苗株的一步生长曲线

H1N1 嵌合疫苗株一步生长曲线如图 4 所示,可观察到拯救出的 H1N1 嵌合疫苗株在 MDCK 细胞上生长良好,并在感染后 60 h 病毒复制达到峰值。

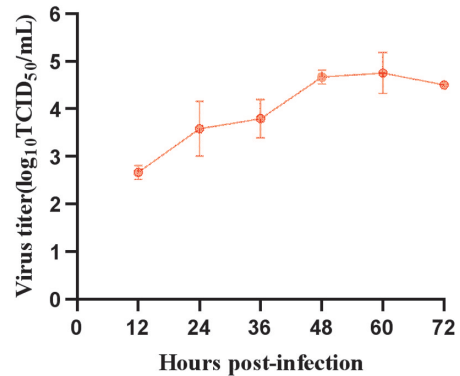


图 4 嵌合流感病毒株 rA/B-H1-Vic 的一步生长曲线  
Fig. 4 One-step growth curve of the chimeric influenza virus strain rA/B-H1-Vic

### 7 H1N1 嵌合疫苗株小鼠安全性

7.1 小鼠体重变化率 BALB/c 小鼠用 H1N1 嵌合疫苗攻毒后观察 14 d,与对照组相比体重未明显下降(图 5),实验组小鼠在感染后第 2 d 体重出现轻度下降,第 4 d 开始呈上升趋势,表明 H1N1 嵌合疫苗株安全性良好。

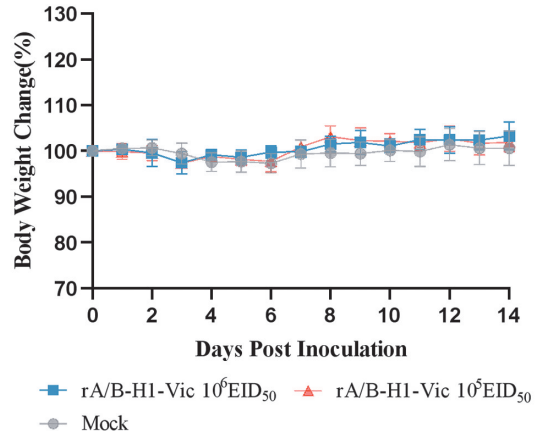


图 5 感染嵌合流感病毒株 rA/B-H1-Vic 的小鼠体重变化率(%)  
Fig. 5 Rate of body weight change in mice infected with chimeric influenza virus strain rA/B-H1-Vic

7.2 小鼠存活率 BALB/c 小鼠经滴鼻攻毒后连续观察 14 d,实验组和对照组小鼠存活率均为 100%(图 6)。

7.3 小鼠肺脏病毒滴度 攻毒后第 3 d 和第 6 d 的小鼠肺脏组织研磨后作倍比稀释,进行鸡胚病毒滴定。结果显示,攻毒后第 3 d,高、低剂量组小鼠肺脏组织均检测到较低水平的病毒复制,攻毒后第 6 d 未检测到病毒复制(图 7)。

7.4 小鼠组织嗜性 攻毒后第 3 d,仅在实验组小鼠

鼻甲骨中检测到低水平的病毒复制,其他组织如心脏、肝脏、脾脏、肾脏、肠、脑中均未检测到病毒复制(图8)。

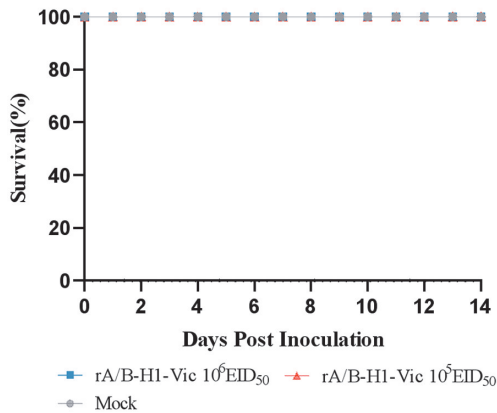


图6 感染嵌合流感病毒株 rA/B-H1-Vic 的小鼠存活率(%)  
Fig. 6 Survival rate of mice infected with chimeric influenza virus strain rA/B-H1-Vic

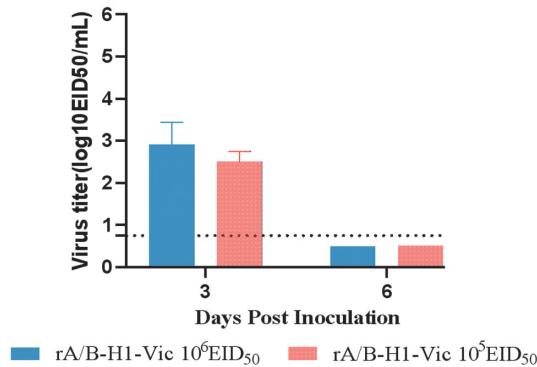


图7 感染嵌合流感病毒株 rA/B-H1-Vic 小鼠肺脏中的病毒滴度  
Fig. 7 Viral titers in the lungs of mice infected with the chimeric influenza virus strain rA/B-H1-Vic

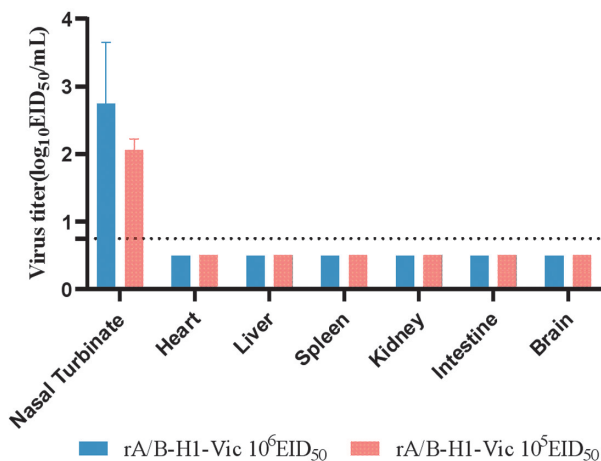


图8 感染嵌合流感病毒株 rA/B-H1-Vic 的小鼠组织嗜性  
Fig. 8 Histophilicity of mice infected with chimeric influenza virus strain rA/B-H1-Vic

## 讨论

季节性流感可引起严重的公共卫生问题,如

H1N1 亚型流感病毒引起的 1918 年和 2009 年流感大流行造成了严重的社会经济和医疗负担<sup>[10]</sup>,接种疫苗是预防季节性流感病毒的一种有效方法。目前在人群中应用的是针对甲型 H1N1、H3N2 型流感病毒和 B 型流感病毒的季节性流感疫苗<sup>[11]</sup>,主要包括灭活疫苗、减毒疫苗等。

实验室中常用反向遗传技术拯救重组流感病毒,并以流感病毒作为载体生产疫苗,构建成功的流感病毒载体疫苗可通过滴鼻免疫方式同时诱导体液和细胞免疫反应,在相对较短的时间内产生抗体,且能保持较长的免疫持续时间,从而提高对机体的免疫保护效力<sup>[12]</sup>。活病毒载体疫苗还可用于进一步构建多价疫苗或多成分疫苗,可减少疫苗产品的开发时间,以及简化疫苗接种,提高不同基因型的病毒株之间的交叉保护效果<sup>[13]</sup>。本研究应用流感病毒作为载体生产 H1N1 嵌合疫苗,初步观察其对 BALB/c 小鼠几乎无毒性。

目前,流感减毒疫苗主要是冷适应获得流感病毒减毒株。冷适应减毒株是通过在低温条件下鸡胚中的连续传代致弱流感病毒,培养出的病毒株具有温度敏感性和冷适应特性,在较低温度下复制效果最好<sup>[14]</sup>,并且在机体免疫中安全性更好。Hai 等<sup>[8]</sup>构建了嵌合 B/PR8 HA (H1)、HK68 (H3)和 VN (H5)的 A/B 流感嵌合疫苗株,能在小鼠中引发针对潜在大流行性流感病毒亚型的保护性免疫反应。此外,采用新策略的流感减毒方法也不断被研究。包括对流感病毒 M 基因进行突变或缺失、NS 基因截短或缺失、基因重排、合成生物学技术等<sup>[15-17]</sup>。

有研究报道通过保留包装信号方式可将 A 型流感病毒和 B 型流感病毒的蛋白进行重组<sup>[18-21]</sup>。但是,这种重组后病毒株滴度减弱,在疫苗生产中可能会遇到产量和成本等问题。本研究尝试将 A 型流感病毒的表面蛋白插入到一株 B 型流感冷适应株中,从而获得滴度较高的嵌合减毒疫苗株。以 B 型冷适应流感病毒为骨架,成功拯救出 1 株表达 H1N1 HA 蛋白的 A/B 嵌合流感疫苗株, H1N1 嵌合疫苗株在鸡胚上保持高滴度生长,接种该疫苗株的小鼠体重未明显下降,存活率为 100%,表明 H1N1 嵌合疫苗株在小鼠模型中安全性良好。

本研究成功拯救出 H1N1 嵌合疫苗株,该疫苗株保留了 B 型流感病毒骨架株的减毒性等优势,同时由于病毒包装信号的差异,不会与自然界流行的 A 型流感病毒发生基因重组,在实际应用中可以克服现有流感减毒疫苗的不足。H1N1 嵌合疫苗株的构建为流感新型疫苗的研发提供了新的思路。

(下转 507 页)

- [13] Bina JE, Mekalanos JJ. *Vibrio cholerae* TolC is required for bile resistance and colonization[J]. Infect Immun, 2001, 69(7): 4681-4685.
- [14] Ferhat M, Atlan D, Vianney A, et al. The TolC protein of *Legionella pneumophila* plays a major role in multi-drug resistance and the early steps of host invasion[J]. PLoS One, 2009, 4(11): e7732.
- [15] Virlogeux-Payant I, Baucheron S, Pelet J, et al. TolC, but not AcrB, is involved in the invasiveness of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* by increasing type III secretion system-1 expression[J]. Int J Med Microbiol, 2008, 298(7-8): 561-569.
- [16] Alav I, Sutton JM, Rahman KM. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation[J]. J Antimicrob Chemother, 2018, 73(8): 2003-2020.
- [17] Deininger KN, Horikawa A, Kitko RD, et al. A requirement of TolC and MDR efflux pumps for acid adaptation and GadAB induction in *Escherichia coli* [J]. PLoS One, 2011, 6(4): e18960.
- [18] Gil H, Platz GJ, Forestal CA, et al. Deletion of TolC orthologs in *Francisella tularensis* identifies roles in multidrug resistance and virulence[J]. PNAS, 2006, 103(34): 12897-12902.
- [19] Lamut A, Peterlin Masic L, Kikelj D, et al. Efflux pump inhibitors of clinically relevant multidrug resistant bacteria[J]. Med Res Rev, 2019, 39(6): 2460-2504.
- [20] 荣娜, 简思杰, 孙薇, 等. 鱼类致病嗜水气单胞菌外膜蛋白 TolC 的原核表达及抗原性分析[J]. 河南农业科学, 2021, 50(3): 157-164.
- [21] Hinchliffe P, Symmons MF, Hughes C, et al. Structure and operation of bacterial tripartite pumps [J]. Annu Rev Microbiol. 2013(67): 221-242.

【收稿日期】 2022-12-04 【修回日期】 2023-02-26

(上接 501 页)

#### 【参考文献】

- [1] Nachbagauer R, Feser J, Naficy A, et al. A chimeric hemagglutinin-based universal influenza virus vaccine approach induces broad and long-lasting immunity in a randomized, placebo-controlled phase I trial[J]. Nat Med, 2021, 27(1): 106-114.
- [2] Hutchinson EC. Influenza virus[J]. Trends Microbiol, 2018, 26(9): 809-810.
- [3] Smith G, Dhanasekaran V, Justin B, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic [J]. Nature, 2009, 459(7250): 1122-1125.
- [4] Abdelrahman Z, Li M, Wang X. Comparative review of SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV, and influenza A respiratory viruses[J]. Front Immunol, 2020, 11: 552909.
- [5] Russell CJ, Hu M, Okda FA. Influenza hemagglutinin protein stability, activation, and pandemic risk[J]. Trends Microbiol, 2018, 26(10): 841-853.
- [6] Uyeky TM, Hui DS, Zambon M, et al. Influenza[J]. Lancet, 2022, 400(10353): 693-706.
- [7] 焦鹏涛, 范文辉, 孙业平, 等 B 型流感病毒研究进展[J]. 生物工程学报, 2018, 34(6): 821-831.
- [8] Glezen WP. Cold-adapted, live attenuated influenza vaccine[J]. Expert Rev Vaccines, 2004, 3(2): 131-139.
- [9] Hai R, Garcia-Sastre A, Swayne DE, et al. A reassortment- incompetent live attenuated influenza virus vaccine for protection against pandemic virus strains[J]. J Virol, 2011, 85(14): 6832-6843.
- [10] Fraser C, Donnelly CA, Cauchemez S, et al. Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings[J]. Science, 2009, 324(5934): 1557-1561.
- [11] Stepanova E, Krutikova E, Wong PF, et al. Safety, immunogenicity, and protective efficacy of a chimeric a/b live attenuated influenza vaccine in a mouse model [J]. Microorganisms, 2021, 9(2): 259.
- [12] Sun W, Luo T, Liu W, et al. Progress in the development of universal influenza vaccines[J]. Viruses, 2020, 12(9): 1033.
- [13] Chen J, Wang J, Zhang J, et al. Advances in development and application of influenza vaccines[J]. Front Immunol, 2021, 12: 711997.
- [14] Isakova-Sivak I, Rudenko L. Safety, immunogenicity and infectivity of new live attenuated influenza vaccines[J]. Expert Rev Vaccines, 2015, 14(10): 1313-1329.
- [15] Wang P, Zheng M, Lau SY, et al. Generation of DelNS1 influenza viruses: a strategy for optimizing live attenuated influenza vaccines[J]. mBio, 2019, 10(5): e02180-19.
- [16] Sun W, Wang Z, Sun Y, et al. Safety, immunogenicity, and protective efficacy of an H5N1 chimeric cold-adapted attenuated virus vaccine in a mouse model[J]. Viruses, 2021, 13(12): 2420.
- [17] Smith A, Rodriguez L, El Ghouayel M, et al. A live attenuated influenza vaccine elicits enhanced heterologous protection when the internal genes of the vaccine are matched to those of the challenge virus[J]. J Virol, 2020, 94(4): e01065-19.
- [18] Flandorfer A, Garcia-Sastre A, Basler CF, et al. Chimeric influenza A viruses with a functional influenza B virus neuraminidase or hemagglutinin[J]. J Virol, 2003, 77(17): 9116-9123.
- [19] Horimoto T, Takada A, Iwatsuki-Horimoto K, et al. Generation of influenza A viruses with chimeric (type A/B) hemagglutinins [J]. J Virol, 2003, 77(14): 8031-8038.
- [20] Margine I, Krammer F, Hai R, et al. Hemagglutinin stalk-based universal vaccine constructs protect against group 2 influenza A viruses[J]. J Virol, 2013, 87(19): 10435-10446.
- [21] Ermler ME, Kirkpatrick E, Sun W, et al. Chimeric hemagglutinin constructs induce broad protection against influenza B virus challenge in the mouse model[J]. J Virol, 2017, 91(12): e00286-17.

【收稿日期】 2022-12-21 【修回日期】 2023-03-15