

DOI:10.13350/j.cjpb.220201

• 论著 •

新型冠状病毒 RBD 区重组流感病毒的拯救及初步鉴定*

王振飞^{1,2}, 孙伟洋², 王宇田², 赵梦琳², 王文琪², 朱梦涵², 孙悦², 李东旭², 徐嘉奇²,

王铁成², 冯娜², 杨松涛², 赵永坤², 夏咸柱^{1,2}, 高玉伟^{1,2,*}

(1. 吉林农业大学, 吉林长春 130118; 2. 中国农业科学院 长春兽医研究所)

【摘要】 **目的** 利用流感反向遗传技术,以 B 型流感病毒 B/Yamagata/16/88 株作为骨架,表达新型冠状病毒(SARS-CoV-2)S 蛋白的受体结合域(RBD),构建以 B 型流感病毒为载体的新型冠状病毒疫苗候选株。**方法** 基因合成新冠病毒参考株 S 蛋白上的 RBD 基因片段(318-541aa),对 B 型流感病毒 B/Yamagata/16/88/的 NS1 片段进行设计改造并插入 RBD 序列,构建重组质粒 NS110-RBD。将 NS110-RBD 与其余 7 个骨架株重组质粒共转染 293T 细胞和 MDCK 细胞,拯救表达新型冠状病毒 RBD 区重组流感病毒,对拯救出的毒株进行形态学、分子生物学鉴定及病毒滴度和 Western blot 检测。**结果** 成功拯救出重组流感病毒株并命名为 rIBV-NS110-RBD。PCR 鉴定 RBD 目的基因大小正确,测序表明拯救病毒株的序列正确,在透射电镜下观察到拯救病毒株的病毒粒子具有流感病毒粒子的典型特征。经测定,拯救株 rIBV-NS110-RBD 在 MDCK 细胞上的病毒滴度为 $10^{5.5}$ TCID₅₀/ml,在鸡胚上的病毒滴度为 $10^{6.5}$ EID₅₀/ml,血凝效价最高达 2^5 ;Western Blot 检测到 RBD 的表达,其分子质量为 35 ku。**结论** 成功拯救出高表达新型冠状病毒 RBD 蛋白的高血凝效价的重组流感病毒株,该病毒具有流感病毒粒子的典型特征,为以 B 型流感病毒为载体作为新型冠状病毒疫苗的研发提供了新思路。

【关键词】 新型冠状病毒;B 型流感病毒;反向遗传学;RBD

【中图分类号】 R373.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)02-0125-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Feb;17(2):125-129, 135.]

Rescue and preliminary identification of recombinant influenza virus in RBD region of SARS-CoV-2

WANG Zhen-fei¹, SUN Wei-yang², WANG Yu-tian², ZHAO Meng-lin², WANG Wen-qi², ZHU Meng-han², SUN Yue², LI Dong-xu², XU Jia-qi², WANG Tie-cheng², FENG Na², YANG Song-tao², ZHAO Yong-kun², XIA Xian-zhu^{1,2}, GAO Yu-wei^{1,2} (1. *Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China*; 2. *Key Laboratory of Jilin Province for Zoonosis Prevention and Control, Changchun Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences*)***

【Abstract】 **Objective** Using influenza reverse genetics, the receptor binding domain (RBD) of S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) was expressed by B/Yamagata/16/88 strain as the vaccine backbone. Influenza B virus used as a vaccine vector when constructed a novel SARS-CoV-2 vaccine candidate. **Methods** Firstly, the RBD gene fragment (318-541aa) on the S protein of the reference strain of SARS-CoV-2 was synthesized. NS1 fragment of B/Yamagata/16/88/ was designed and inserted into the RBD sequence to construct the recombinant plasmid NS110-RBD. The recombinant plasmid NS110-RBD and other 7 gene plasmids were co-transfected into 293T cells and MDCK cells to rescue the recombinant influenza virus expressing the RBD region of SARS-CoV-2. The rescued virus was identified in the morphology, molecular biology, virus titer and Western Blot. **Results** We have successfully rescued the recombinant influenza virus strain and named rIBV-NS110-RBD. The result of PCR identification showed that the RBD gene was correct, and the sequence of the rescued virus was correct. The virus particles of the rescued virus had typical characteristics of influenza virus particles. The virus titer of rIBV-NS110-RBD was $10^{5.5}$ TCID₅₀/ml in MDCK cells and $10^{6.5}$ EID₅₀/ml in chicken embryo eggs. The hemagglutination titer of this rescued virus could reach 2^5 . The expression of RBD protein was detected by Western Blot. **Conclusion** The recombinant influenza B virus vector that expressed the SARS-CoV-2 Spike RBD protein was rescued successfully and provides a novel strategy for the development of a novel SARS-CoV-2 vaccine.

【Key words】 severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2); Influenza B virus; reverse genetics; RBD

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 31970502); 国家科技重大专项(No. 2020ZX10001-016-003)。

** **【通讯作者】** 高玉伟, E-mail: yuwei0901@outlook.com

【作者简介】 王振飞(1996-), 男, 内蒙古赤峰人, 硕士, 主要从事病毒学与人兽共患病研究。E-mail: zhenfei0420@163.com

新型冠状病毒(SARS-CoV-2)是引起新型冠状病毒肺炎的主要病原体,与另外两种感染人的冠状病毒 SARS-CoV、MERS-CoV 同属冠状病毒科,β 冠状病毒属。新型冠状病毒是一种包膜的、正向、单链 RNA 病毒,基因组为 29903nts,由核衣壳蛋白(N)、膜蛋白(M)、包膜蛋白(E)、以及刺突蛋白(S)组成的外膜包覆着^[1]。与 SARS-CoV 一样,新型冠状病毒的 S 蛋白通过受体结合结构域(RBD)与它们共同的受体血管紧张素转换酶 2(ACE2)结合,介导病毒进入宿主细胞。在感染过程中,S 蛋白被宿主蛋白酶(如 TMPRSS2)切割成 N 端的 S1 亚基和 C 端的 S2 亚基,并从融合前状态转变为融合后状态。S 蛋白是一种 I 型融合蛋白,在病毒粒子表面形成三聚体,S 蛋白包含两个功能性亚基 S1 和 S2,两亚基由胞外结构域(ECD)和单个跨膜螺旋组成,分别介导受体结合和膜融合。其中 S1 负责与宿主细胞受体结合,S2 亚基负责病毒膜和细胞膜融合。S1 由 N 端结构域(NTD)和受体结合结构域(RBD)组成,对决定组织嗜性和宿主范围至关重要。S 蛋白不但决定病毒的传染性及其在宿主中的传播性,也是诱导保护性免疫反应的主要抗原^[2-3]。因此目前所有正在开发的疫苗主要都以 RBD 作为靶点^[3-5]。

A 型流感病毒(influenza A virus, IAV)宿主广泛,而 B 型流感病毒(IBV)主要在人群中流行,也有海豹感染的报道。与 A 型流感病毒一样,B 型流感病毒也不断地经历抗原漂移,但进化速度低于 A 型流感病毒,并且不同 B 型流感病毒株之间有规律的重新组合^[6]。到目前为止,B 型流感病毒主要分为 Victoria 和 Yamagata 两个谱系^[7]。两谱系流感病毒与早期的 B/Lee/1940 流感病毒不同,自 20 世纪 80 年代以来一直在人类群体中共同传播流行,是每 3 年一次的主要流行毒株。此外,在过去十年中,B 型流感病毒引起了学校和社会的几次急性呼吸道疾病暴发,以及继发性细菌性肺炎感染。B 型流感病毒的传播和缺乏抗病毒效果加剧了人们对其健康的担忧。

流感病毒非结构蛋白 1(NS1)是一型干扰素(IFN)的拮抗剂,研究表明通过对 B 型流感病毒 NS1 基因进行截短和缺失修饰,与野生型(WT)病毒相比减毒株的复制减弱,诱生干扰素作用增强^[8-9]。因此,与传统的减毒活疫苗或灭活病毒疫苗相比,NS1 减毒株免疫将产生更强的免疫应答。本研究对 B 型流感病毒的 NS 片段的 NS1 进行修饰,使 NS1 截短保留 100 个氨基酸,然后插入新型冠状病毒的 RBD 片段^[10],再利用反向遗传学技术拯救出以 B 型流感病毒减毒株为骨架、表达新型冠状病毒 RBD 区的重组流感病毒,为流感病毒包装机制的研究和新型冠状病毒和新型流感病毒双价疫苗的研发奠定基础。

材料与方法

1 材料

1.1 载体和质粒 B 型流感病毒 B/Yamagata/16/88/8 质粒反向遗传骨架及 PBD-NS110 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构建并保存。

1.2 细胞和鸡胚 MDCK 和 293T 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;7~9 日龄 SPF 鸡胚购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.3 主要试剂 Phusion HF DNA Polymerase 购自美国 NEW ENGLAND Biolabs 公司;Reverse Transcriptase XL (AMV), Nucleo Spin Gel and PCR Clean-up, 5× In-Fusion HD Enzyme Premix 和 *E. coli* JM109 Competent Cells 购自中国宝生物工程大连有限公司;QI Aamp Viral RNA Mini Kit 及 QIAprep Spin Miniprep Kit 购自德国 QIAGEN 公司;Lipofectamine 3000 Transfection Kit 购自美国 Thermo Fisher SCIENTIFIC 公司;0.25% Trypsin-EDTA, 0.05% Trypsin-EDTA, Fetal Bovine Serum (FBS), DMEM 培养基, Opti-MEM 和 Antibiotic-Antimycotic 购自美国 Thermo Fisher SCIENTIFIC 公司;1× PBS 缓冲液及氨苄青霉素购自中国北京索莱宝科技有限公司;TPCK 胰蛋白酶购自德国默克生物科技有限公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自中国上海碧云天生物技术有限公司;PVDF 膜购自美国 Bio-Rad 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;琼脂糖凝胶电泳槽购自中国北京君意东方电泳设备有限公司;凝胶成像仪购自中国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 °C 超低温冰箱购自 SANYO 公司。

2 方法

2.1 基因及引物设计与合成 查找 GenBank 上公布的新新型冠状病毒 Spike RBD 原始参考基因组序列,分别通过 Primer Premier 5 软件设计上、下游引物,通过 TAKARA 官网设计无缝克隆引物。参考序列和设计引物交由上海生工生物工程有限公司进行基因合成,引物序列见表 1。

表 1 In-Fusion 克隆引物设计合成序列(5'-3')
Table 1 Primer designed for In-Fusion cloning

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence
In Fusion-RBD-F	TTTAGAGTCCAACCAACAGAAT
In Fusion-RBD-R	GAAATTGACACATTTGTTTTTAAC
In Fusion-Vector -F	AGCAGAAGCAGAGGATTTGTTT
In Fusion-Vector-R	AGTAGTAACAAGAGGATTTTTATTTT AAATTCACAA

2.2 重组质粒的构建

2.2.1 目的基因片段的扩增 将合成的RBD目的基因片段用去离子水稀释至10 mmol/L,以此为模板,用引物 In Fusion-RBD-F/In Fusion-RBD-R PCR扩增目的基因片段,经1%琼脂糖凝胶电泳鉴定正确后进行胶回收纯化。

2.2.2 线性化载体的扩增 取实验室保存的B型流感病毒B/Yamagata/16/88/8质粒反向遗传操作系统中的PBD-NS110重组质粒,用去离子水稀释至10 mmol/L,以此为模板,用引物 In Fusion-Vector -F/In Fusion-Vector-R PCR扩增载体片段,经1%琼脂糖凝胶电泳鉴定正确后进行胶回收纯化。

扩增纯化的目的基因片段和线性化的载体各取100 ng,与5×In-Fusion HD Enzyme Premix和去离子水混合成10 μl体系,在50℃水浴锅中共同孵育15 min。取2.5 μl重组产物转化JM109感受态细胞,通过菌落PCR筛选,对含有目的基因片段的单克隆菌落进行扩增、纯化,委托上海生工生物工程有限公司进行测序鉴定。

2.3 重组流感病毒的拯救 293T细胞用含10%胎牛血清、1% Anti-Anti的DMEM培养基培养,于转染前用含0.05% EDTA的胰酶消化,测定细胞密度后平铺至6孔细胞培养板中,每孔 1×10^6 个细胞。待形成单层细胞后,按照Lipofectamine 3000脂质体转染试剂说明书进行转染。

2.3.1 表达新型冠状病毒RBD蛋白重组流感病毒株的拯救 取B型流感病毒B/Yamagata/16/88/8质粒反向遗传操作系统中的7个阳性质粒PBD-PB2、PBD-PB1、PBD-PA、PBD-HA、PBD-NA、PBD-NP、PBD-M和构建的重组质粒NS110-RBD各600 ng,在含有250 μl Opti-MEM的1.5 ml离心管中同Lipofectamine 3000脂质体转染试剂一起混匀,室温下静置20 min。将质粒与转染试剂混合液滴加入含200 ml 250 μl Opti-MEM的6孔板中,33℃、5% CO₂条件下培养12 h,然后换含有1% Anti-Anti和0.2 μg/ml TPCK胰酶的Opti-MEM培养液继续培养72 h。收集细胞上清液备用。

2.3.2 转染细胞上清液接种鸡胚 将收集的转染细胞上清液采用鸡胚尿囊腔接种法接种于7日龄的SPF鸡胚,33℃恒温培养箱中孵育72 h,采用血凝(HA)试验测定血凝效价。拯救的重组流感病毒株命名为rIBV-NS110-RBD。

2.3.3 rIBV-NS110-RBD毒种的制备 方法同2.3.2。将rIBV-NS110-RBD采用鸡胚尿囊腔接种法接种于7日龄SPF鸡胚,33℃恒温培养箱中孵育72 h,采用HA试验测定血凝效价。4℃条件下收取血凝效价

高且清亮不含血的鸡胚尿囊液于50 ml离心管中作为毒种,4℃、5500 r/min离心10 min,取上清液分装,-80℃超低温冰箱保存。

2.4 rIBV-NS110-RBD的鉴定

2.4.1 rIBV-NS110-RBD的PCR扩增和测序鉴定 取rIBV-NS110-RBD按照QI Aamp Viral RNA Mini Kit总RNA提取试剂盒说明书方法提取RNA,利用Reverse Transcriptase XL(AMV)反转录成cDNA后分别用合成的B型流感病毒8个基因片段特异性引物进行PCR扩增。取PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳鉴定和测序鉴定。

2.4.2 rIBV-NS110-RBD半数组织感染量(TCID₅₀)测定 MDCK细胞用含10%胎牛血清、1% Anti-Anti的DMEM培养基培养,用含0.25% EDTA的胰酶消化后测定细胞密度后平铺至96孔细胞培养板中,置37℃、5% CO₂细胞培养箱中培养9 h至单层细胞密度约80%备用。取rIBV-NS110-RBD作10倍倍比稀释8个稀释度。取稀释的病毒液加入到96孔板中,每孔100 μl,每个稀释度做3个重复,并设立空白细胞对照组。96孔板置于33℃、5% CO₂细胞培养箱中孵育1.5 h,弃去病毒液;每孔加入200 μl含终浓度2 μg/μl TPCK胰酶和1% Anti-Anti的Opti-MEM,继续培养72 h,取细胞上清液测定血凝效价,按Reed-Muench法计算病毒的TCID₅₀。

2.4.3 rIBV-NS110-RBD鸡胚半数感染量(EID₅₀)的测定 取rIBV-NS110-RBD作10倍倍比稀释8个稀释度。取稀释的病毒液,每个稀释度取100 μl接种3枚7日龄SPF鸡胚。将接种后的SPF鸡胚放置于33℃恒温培养箱中孵育72 h,收集鸡胚尿囊液测定血凝效价,按Reed-Muench法计算病毒的EID₅₀。

2.4.4 rIBV-NS110-RBD电镜观察 收集的鸡胚尿囊液毒种经β-丙内酯灭活后用磷钨酸负染,透射电子显微镜下观察病毒的基本形态。

2.4.5 Western blot检测rIBV-NS110-RBD RBD的表达 将rIBV-NS110-RBD和未改造野生型毒株(WT)分别接种7日龄SPF鸡胚,每胚100 μl,置33℃孵育72 h后分别收取尿囊液,以尿囊液与细胞裂解液1:9的比例裂解尿囊液,采用Western blot验证RBD的表达。

结果

1 重组质粒NS110-RBD的构建

载体和目的基因片段PCR扩增后经1%琼脂糖凝胶电泳分析(图1)和测序鉴定均正确,符合设计思路。

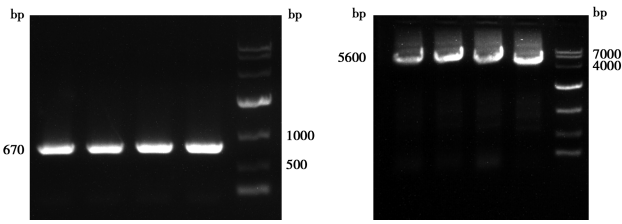


图 1 目的基因片段 RBD(左图)和载体片段 PBD-NS110(右图) PCR 产物 1%琼脂糖凝胶电泳分析

Fig. 1 Target gene fragment RBD (left) and Carrier segment PBD-NS110 (right)

2 rIBV-NS110-RBD 的血凝效价

取 rIBV-NS110-RBD 接种 7 日龄 SPF 鸡胚, 培养 72 h 后进行血凝试验, 测得其血凝效价为 2^5 (图 2)。

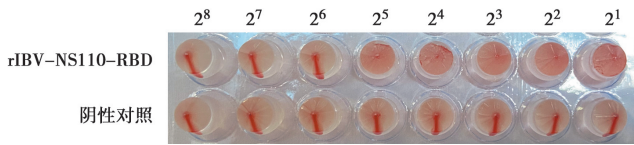


图 2 拯救病毒株 rIBV-NS110-RBD 的血凝试验

Fig. 2 Hemagglutination test of rescue virus strain rIBV-NS110-RBD

3 rIBV-NS110-RBD 的 PCR 和测序鉴定

取 rIBV-NS110-RBD 按照 QI Aamp Viral RNA Mini Kit 说明书提取 RNA, 利用 Reverse Transcriptase XL(AMV) 反转录成 cDNA, 分别用合成的 B 型流感病毒 8 个基因片段特异性引物进行 PCR 扩增。取 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定和测序鉴定。1% 琼脂糖凝胶电泳显示拯救病毒株 rIBV-NS110-RBD 的 7 个基因片段大小与 B 型流感病毒 B/Yamagata/16/88/ 相符, NS 片段与实验设计相符 (图 3)。

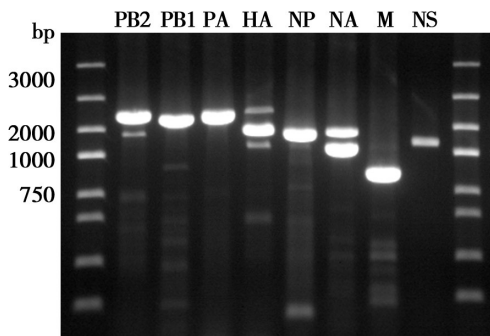


图 3 拯救病毒株 rIBV-NS110-RBD 的 8 个基因片段 PCR 扩增

Fig. 3 PCR results of 8 gene fragments of rIBV-NS110-RBD strain

PCR 产物测序后用 DNA STAR 作比对分析, rIBV-NS110-RBD 的 7 个基因片段序列与 B 型流感病毒 B/Yamagata/16/88/ 相符, NS 片段与实验设计相符 (图 4)。

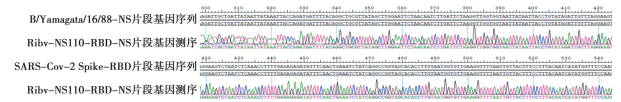


图 4 rIBV-NS110-RBD 的 NS 基因序列

Fig. 4 Sequencing results of NS gene of rIBV-NS110-RBD

4 rIBV-NS110-RBD 的 TCID₅₀

将 rIBV-NS110-RBD 以不同稀释度接种 MDCK 细胞, 孵育 72 h 后取细胞上清液进行血凝试验, 每个稀释度做 3 个重复。结果 10^{-4} 稀释度以下均出现血凝, 10^{-5} 稀释度出现 2 个血凝, 10^{-6} 稀释度出现 1 个血凝。以上结果按 Reed-Muench 法计算 rIBV-NS110-RBD 的 EID₅₀ 为 $10^{5.5}$ /ml。

5 rIBV-NS110-RBD 的 EID₅₀

将 rIBV-NS110-RBD 以不同稀释度接种 7 日龄 SPF 鸡胚, 孵育 72 h 后取鸡胚尿囊液进行血凝试验, 每个稀释度做 3 个重复。结果 10^{-5} 稀释度以下均出现血凝, 10^{-6} 稀释度出现 2 个血凝, 10^{-7} 稀释度出现 1 个血凝。按 Reed-Muench 法计算拯救病毒株 rIBV-NS110-RBD 的 EID₅₀ 为 $10^{6.5}$ /ml。

6 rIBV-NS110-RBD 形态

电镜观察病毒粒子呈球状, 直径约 120 nm, 表面有纤突 (图 5)。病毒粒子大小和形态分布符合流感病毒的典型特征。

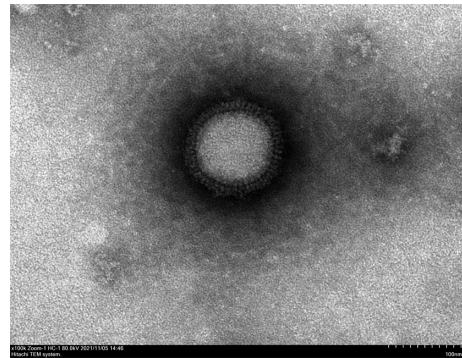


图 5 电镜下的 rIBV-NS110-RBD 形态 (100k×)

Fig. 5 Electron micrograph of rescue virus strain rIBV-NS110-RBD

7 RBD Western blot 检测

裂解后的 rIBV-NS110-RBD 经 Western blot 检测到分子质量为 35 ku 的目的蛋白 RBD 与相应抗体反应条带 (SARS-CoV-2 Spike RBD), 接种野生型毒株 (WT) 以及不接种任何病毒株的阴性对照鸡胚尿囊液 (NC) 无此反应条带 (图 6)。

讨论

新型冠状病毒在全球引发了严重的新型冠状病毒肺炎疫情, 并于 2020 年 3 月被宣布为大流行。世界卫生组织 (WHO) 公布的数据显示, 截止到 2022 年 3 月,

全球超过 200 多个国家已经报道了 250 715 502 例确诊病例,其中包括 5 062 106 例死亡病例。

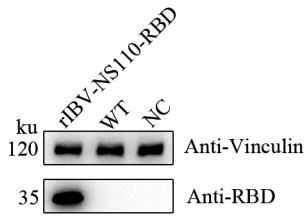


图 6 Western blot 检测 rIBV-NS110-RBD 的 RBD 表达情况
Fig. 6 Western blot of rescue virus strain rIBV-NS110-RBD

当新型冠状病毒的基因序列在 2020 年 1 月初被公布以后就开始了针对其疫苗的研发,并以前所未有的速度发展。目前已有 200 多种疫苗处于不同的研发阶段,疫苗种类主要分为灭活疫苗、减毒活疫苗、重组蛋白疫苗、mRNA 疫苗和病毒载体疫苗。鉴于疫情的严重性,WHO 相继将辉瑞-Biontech、阿斯利康、强生疫苗、Moderna 疫苗和国药灭活疫苗列入紧急使用清单。在中和抗体方面,灭活疫苗处于低端,ChAdOx1 和 mRNA 候选疫苗处于中等范围,重组蛋白疫苗候选疫苗处于高端,产生的中和抗体滴度较高。在耐受性方面,灭活疫苗和重组蛋白疫苗表现相对较好,其次是 mRNA 疫苗和腺病毒载体疫苗,在第二次免疫接种后显示出更强的免疫原性。在实用性方面,mRNA 疫苗存在成本造价高、运输及储存困难等问题^[11-15]。

迄今为止,针对新型冠状病毒尚有效的治疗方法,新型冠状病毒疫苗仍然是防控病毒的主要手段。现阶段新型冠状病毒疫苗临床数据表明具有安全性和有效性,但仍然不能满足应对新型冠状病毒肺炎疫情的要求^[12]。因此,迫切需要研制一种更加安全有效的新型冠状病毒疫苗。

随着反向遗传学技术的出现^[16],已经构建了基于流感病毒载体的重组疫苗^[17-20],可诱导对多种不同病原体的保护性免疫,包括西尼罗河病毒、恶性疟原虫和呼吸道合胞病毒等^[21]。本研究拯救出的表达新型冠状病毒 RBD 区的重组流感病毒株,在原有的流感病毒减毒株基础上,能稳定编码表达外源蛋白 RBD。其作为疫苗候选株与现有的复制缺陷型腺病毒载体疫苗相比,可在鸡胚或者 MDCK 细胞上传代生产,具有造价便宜,易于生产等优点。与腺病毒相比,B 型流感病毒在人群中流行不广泛,更不易引起抗载体免疫反应。在接种方式上,可采用喷鼻法。人类下呼吸道被认为主要受到 IgG 的保护,IgG 是血清中的主要抗体类型,该抗体被输送到肺部。上呼吸道被认为主要受分泌型 IgA(sIgA)的保护。呼吸道病毒自然感染既能诱导以 IgG 为主的全身性免疫应答,又能诱导以 sIgA 为主的上呼吸道粘膜免疫应答。肌肉或皮内接种在许多情况

下会诱导高水平的血清 IgG,但不会诱导粘膜 sIgA 的产生。虽然也可以在上呼吸道粘膜表面发现一些 IgG,但缺乏 sIgA 往往使人容易受到上呼吸道感染。鼻腔接种可以有效地诱导粘膜抗体反应,从而潜在地在上呼吸道提供免疫^[22]。与传统的肌注接种方式比较更方便、安全,不但可以引起机体的体液免疫和细胞免疫,还可以引起机体的黏膜免疫,使该疫苗候选株与灭活疫苗在相同使用剂量下免疫效果更佳。

本研究拯救出的新冠疫苗候选株以 B 型流感病毒减毒株为骨架,与 Koonpaew 等^[23]研发的疫苗株相比,还具有不与自然界中流行的 A 型流感病毒重配的优点,可应用现有成熟的流感疫苗技术快速生产。此外,该疫苗候选株还具备成为新型冠状病毒和 B 型流感病毒双价疫苗的可能性,为 B 型流感病毒包装机制的研究和新型冠状病毒和新型流感病毒双价疫苗的研发奠定了基础。

【参考文献】

- [1] Kim D, Lee JY, Yang JS, et al. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome[J]. Cell, 2020, 181(4): 914-921.
- [2] Xia X. Domains and functions of spike protein in Sars-Cov-2 in the context of vaccine design[J]. Viruses, 2021, 13(1): 109.
- [3] Yang J, Wang W, Chen Z, et al. A vaccine targeting the RBD of the S protein of SARS-CoV-2 induces protective immunity[J]. Nature, 2020, 586(7830): 572-577.
- [4] Piccoli L, Park YJ, Tortorici MA, et al. Mapping neutralizing and immunodominant sites on the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain by structure-guided high-resolution serology[J]. Cell, 2020, 183(4): 1024-1042.
- [5] Yu F, Xiang R, Deng X, et al. Receptor-binding domain-specific human neutralizing monoclonal antibodies against SARS-CoV and SARS-CoV-2[J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 212.
- [6] Jiao P, Fan W, Sun Y, et al. [Research advance of influenza B viruses][J]. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao, 2018, 34(6): 821-831.
- [7] Xu C, Chan KH, Tsang TK, et al. Comparative epidemiology of influenza B Yamagata- and Victoria-lineage viruses in households[J]. Am J Epidemiol, 2015, 182(8): 705-713.
- [8] Hai R, Martinez-Sobrido L, Fraser KA, et al. Influenza B virus NS1-truncated mutants: live-attenuated vaccine approach[J]. J Virol, 2008, 82(21): 10580-10590.
- [9] Nogales A, Huang K, Chauche C, et al. Canine influenza viruses with modified NS1 proteins for the development of live-attenuated vaccines[J]. Virology, 2017, 500: 1-10.
- [10] 李雪, 于志君, 孙伟洋, 等. B 型流感病毒 NS1 蛋白羧基端缺失对病毒致病性的影响分析[J]. 病毒学报, 2015, 31(4): 404-409.
- [11] Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine[J]. N Engl J Med, 2020, 383(27): 2603-2615.
- [12] Falsey AR, Sobieszczyk ME, Hirsch I, et al. Phase 3 safety and efficacy of AZD1222 (ChAdOx1 nCoV-19) Covid-19 vaccine[J]. N Engl J Med, 2021, 385(25): 2348-2360. (下转 135 页)

- an Australian pelagic bird[J]. *Virology*, 1973, 51(2):259-269.
- [12] Hu C, Li X, Zhu C, et al. Co-circulation of multiple reassortant H6 subtype avian influenza viruses in wild birds in eastern China, 2016-2017[J]. *Virol J*, 2020, 17(1):62.
- [13] Huang K, Zhu H, Fan X, et al. Establishment and lineage replacement of H6 influenza viruses in domestic ducks in southern China[J]. *J Virol*, 2012, 86(11):6075-6083.
- [14] Li J, Quan C, Xie Y, et al. Continued reassortment of avian H6 influenza viruses from Southern China, 2014-2016[J]. *Trans-bound Emerg Dis*, 2019, 66(1):592-598.
- [15] Li Y, Li M, Tian J, et al. Genetic characteristics and pathogenicity of novel reassortant H6 viruses isolated from wild birds in China[J]. *Vet Microbiol*, 2021, 254(108978).
- [16] Zu Dohna H, Li J, Cardona C J, et al. Invasions by Eurasian avian influenza virus H6 genes and replacement of the virus' North American clade[J]. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15(7):1040-1045.
- [17] Pearce JM, Reeves AB, Ramey AM, et al. Interspecific exchange of avian influenza virus genes in Alaska; the influence of trans-hemispheric migratory tendency and breeding ground sympatry [J]. *Mol Ecol*, 2011, 20(5):1015-1025.
- [18] Saito T, Tanikawa T, Uchida Y, et al. Intracontinental and intercontinental dissemination of Asian H5 highly pathogenic avian influenza virus (clade 2.3.4.4) in the winter of 2014-2015 [J]. *Rev Med Virol*, 2015, 25(6):388-405.
- [19] Ramey AM, Pearce JM, Flint PL, et al. Intercontinental reassortment and genomic variation of low pathogenic avian influenza viruses isolated from northern pintails (*Anas acuta*) in Alaska; examining the evidence through space and time[J]. *Virology*, 2010, 401(2):179-189.
- [20] Wasilenko JL, Sarmiento L, Pantin-Jackwood MJ. A single substitution in amino acid 184 of the NP protein alters the replication and pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in chickens[J]. *Arch Virol*, 2009, 154(6):969-979.
- 【收稿日期】 2021-11-29 【修回日期】 2022-02-10

(上接 129 页)

- [13] Baden LR, El Sahly HM, Essink B, et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine[J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(5):403-416.
- [14] Sadoff J, Le Gars M, Shukarev G, et al. Interim results of a phase 1-2a trial of Ad26.COV2.S Covid-19 vaccine[J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(19):1824-1835.
- [15] Xia S, Zhang Y, Wang Y, et al. Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBIBP-CorV: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 trial[J]. *Lancet Infect Dis*, 2021, 21(1):39-51.
- [16] Nogales A, Perez D R, Santos J, et al. Reverse genetics of influenza B viruses[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1602:205-238.
- [17] Garulli B, Kawaoka Y, Castrucci MR. Mucosal and systemic immune responses to a human immunodeficiency virus type 1 epitope induced upon vaginal infection with a recombinant influenza A virus[J]. *J Virol*, 2004, 78(2):1020-1025.
- [18] Kobayashi H, Iwatsuki-Horimoto K, Kiso M, et al. A replication-incompetent influenza virus bearing the HN glycoprotein of human parainfluenza virus as a bivalent vaccine[J]. *Vaccine*, 2013, 31(52):6239-6246.
- [19] Maeda Y, Hatta M, Takada A, et al. Live bivalent vaccine for parainfluenza and influenza virus infections[J]. *J Virol*, 2005, 79(11):6674-6679.
- [20] Cardenas-Garcia S, Caceres CJ, Rajao D, et al. Reverse genetics for influenza B viruses and recent advances in vaccine development[J]. *Curr Opin Virol*, 2020, 44:191-202.
- [21] Martina BE, van den Doel P, Koraka P, et al. A recombinant influenza A virus expressing domain III of West Nile virus induces protective immune responses against influenza and West Nile virus[J]. *PLoS One*, 2011, 6(4):e18995.
- [22] Hassan AO, Kafai NM, Dmitriev IP, et al. A single-dose intranasal ChAd vaccine protects upper and lower respiratory tracts against SARS-CoV-2[J]. *Cell*, 2020, 183(1):169-184.
- [23] Koonpaew S, Kaewborisuth C, Srisutthisamphan K, et al. A single-cycle influenza A virus-based SARS-CoV-2 vaccine elicits potent immune responses in a mouse model[J]. *Vaccines (Basel)*, 2021, 9(8):850.
- 【收稿日期】 2021-11-11 【修回日期】 2022-02-13