

携带增强绿色荧光蛋白的重组甲型流感病毒构建及体外应用

李佳^{1,2#}, 王东红^{2#}, 蒋宇婕^{1,2}, 韩瑞雯^{1,2}, 楚巧鸿², 王塘琪^{1,2}, 刘冠雅^{2,3}, 张雪洁^{2,4}, 黄保英², 邓瑶², 谭文杰^{1,2*}

1 温州医科大学 检验医学院 生命科学学院, 浙江省医学遗传学重点实验室, 浙江 温州

2 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 国家卫生健康委员会生物安全重点实验室, 传染病溯源预警与智能决策全国重点实验室, 北京

3 包头医学院 公共卫生学院, 内蒙古 包头

4 新乡医学院 公共卫生学院, 河南 新乡

李佳, 王东红, 蒋宇婕, 韩瑞雯, 楚巧鸿, 王塘琪, 刘冠雅, 张雪洁, 黄保英, 邓瑶, 谭文杰. 携带增强绿色荧光蛋白的重组甲型流感病毒构建及体外应用[J]. 微生物学报, 2025, 65(10): 4607-4620.

LI Jia, WANG Donghong, JIANG Yujie, HAN Ruiwen, CHU Qiaohong, WANG Tangqi, LIU Guanya, ZHANG Xuejie, HUANG Baoying, DENG Yao, TAN Wenjie. Development and *in vitro* application of a recombinant influenza A virus expressing enhanced green fluorescent protein[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(10): 4607-4620.

摘要: 【目的】构建表达增强绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)报告基因的重组甲型流感病毒, 并研究其体外生物学特性、抗病毒药物筛选及中和抗体检测的应用。【方法】运用流感病毒反向遗传学技术在 H1N1-PR8 病毒神经氨酸酶(NA)基因的 C 端插入 EGFP 基因, 成功构建并拯救出重组甲型流感病毒, 命名为 PR8NAEGFP/WSN。采用逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)与测序分析验证 EGFP 插入位置的准确性及遗传稳定性; 通过 EGFP 报告基因表达、复制动力学分析和空斑形态观察, 对重组病毒(PR8NAEGFP/WSN)和对照病毒(PR8NA/WSN, 无 EGFP 插入)进行鉴定; 采用病灶形成试验(focus-forming assay, FFA)、定量聚合酶链式反应(quantitative polymerase chain reaction, qPCR)和 EGFP 荧光检测, 评估流感病毒阳性药物法匹拉韦的体外抗病毒药效; 同时采用病灶减少中和试验(focus reduction neutralization test, FRNT)和报告基因活性检测, 开展甲型流感病毒(influenza A virus, IAV)中和抗体检测。【结果】重组病毒(PR8NAEGFP/WSN)在鸡胚中经过 5 代盲传后仍能保持遗传稳定。与 PR8NA/WSN 相比, 该重组病毒在 48 h 测得的病毒滴度略低, 结晶紫噬斑形态

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFA1201003, 2022YFC2304100)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFA1201003, 2022YFC2304100).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: tanwj@ivdc.chinacdc.cn

Received: 2025-03-24; Accepted: 2025-05-02; Published online: 2025-07-02

与对照病毒相似。采用重组病毒测得的法匹拉韦半数有效浓度(half maximal effective concentration, EC_{50})与对照病毒一致,且通过 FFA、qPCR 和 EGFP 荧光等多种检测方法所得的 EC_{50} 值之间具有良好的相关性。FRNT 和 EGFP 荧光测定的中和抗体滴度相关系数 r 为 0.930 4, 结果具有良好的 consistency。【结论】携带报告基因的重组流感病毒为 IAV 的基础研究、抗病毒药物和疫苗评价提供了实时可视化的工具。

关键词: 甲型流感病毒; 反向遗传学; 报告基因; 体外应用; 抗病毒药物; 中和抗体

Development and *in vitro* application of a recombinant influenza A virus expressing enhanced green fluorescent protein

LI Jia^{1,2#}, WANG Donghong^{2#}, JIANG Yujie^{1,2}, HAN Ruiwen^{1,2}, CHU Qiaohong², WANG Tangqi^{1,2}, LIU Guanya^{2,3}, ZHANG Xuejie^{2,4}, HUANG Baoying², DENG Yao², TAN Wenjie^{1,2*}

1 Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, School of Laboratory Medicine and Life Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang, China

2 National Key Laboratory of Intelligent Tracking and Forecasting for Infectious Diseases (NITFID), NHC Key Laboratory of Biosafety, National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing, China

3 School of Public Health, Baotou Medical College, Baotou, Inner Mongolia, China

4 School of Public Health, Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan, China

Abstract: [Objective] To develop a recombinant influenza A virus (IAV) expressing a reporter (enhanced green fluorescent protein, EGFP), study its biological characteristics *in vitro*, and explore its application in antiviral drug screening and neutralizing antibody (nAb) detection. [Methods] The EGFP gene was inserted into the C-terminus of NA (derived from H1N1-PR8) by reverse genetics of influenza virus, and the recombinant IAV was successfully constructed, rescued, and named PR8NAEGFP/WSN. The EGFP insertion position and genetic stability were analyzed by RT-PCR and sequencing. PR8NAEGFP/WSN and the control virus (PR8NA/WSN, without EGFP insertion) were identified based on EGFP reporter gene expression, replication kinetics, and plaque morphology. The *in vitro* antiviral efficacy of favipiravir, a positive drug for influenza virus, was evaluated by focus-forming assay (FFA), qPCR, and EGFP fluorescence detection. The focus reduction neutralization test (FRNT) and reporter gene activity detection were conducted for IAV nAb detection. [Results] PR8NAEGFP/WSN remained genetically stable after five passages in chicken embryos. Compared with PR8NA/WSN, PR8NAEGFP/WSN showed a slightly declined titer at the time point of 48 h and similar crystal violet plaque morphology. The EC_{50} of favipiravir measured with the recombinant virus is consistent with that with the control virus, and the EC_{50} values obtained through various detection methods, including FFA, qPCR, and EGFP fluorescence, show good correlations. The correlation coefficient r of the nAb titer determined by FRNT and EGFP fluorescence was 0.930 4, which indicated good consistency. [Conclusion] PR8NAEGFP/

WSN, a recombinant IAV carrying the reporter gene, might be used as a real-time visualization tool for the basic research on IAV and the evaluation of antivirals and vaccines for IAV.

Keywords: influenza A virus; reverse genetics; reporter gene; *in vitro* application; antiviral drugs; neutralizing antibodies

甲型流感病毒(influenza A virus, IAV)是威胁人类健康的呼吸道病原体, 每年在全球范围内引发 300 万至 500 万例重症病例, 并导致约 29 万至 65 万人死亡^[1-2]。IAV 基因组由 8 个单链 RNA 片段构成, 不同病毒株在同一宿主细胞内感染时能够进行基因重配, 进而生成新的变异株。通过突变和基因重配, 流感病毒不断进化, 致病性和传播性也随之增强。因此, 迫切需要开发新型疫苗, 并筛选有效的抗病毒药物以应对 IAV 感染。使用表达报告基因的重组 IAV 将有助于加速这一进程^[3-6]。

反向遗传学方法的发展为研究 IAV 感染生物学的多个方面提供了强有力的工具, 涵盖氨基酸残基在蛋白质功能中的作用、病毒与宿主的相互作用, 以及病毒的复制与发病机制等^[7-8]。此外, 该技术还广泛应用于开发灭活或减毒活流感疫苗^[9-10]。由于 A/PR/8/34 (H1N1) 和 A/WSN/1933 (H1N1) 病毒的聚合酶和核蛋白能有效促进病毒的复制和转录, 因此实验室通常采用适应的 PR8 或 WSN 病毒开展反向遗传学研究。为进行抗病毒药物和中和抗体的高通量筛选, 研究者借助反向遗传学技术, 利用 PR8 或 WSN 骨架尝试在不同的流感病毒蛋白中构建表达外源基因(如荧光蛋白和荧光素酶蛋白)的重组流感病毒^[11]。表达报告基因的重组 IAV 为病毒感染的检测、定量和追踪提供了简便且可靠的方法^[3]。

本研究利用反向遗传学技术构建了携带增强绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)报告基因且遗传稳定的 PR8 NAEGFP/WSN 重组病毒。进一步采用抗流感病毒阳性药物法匹拉韦和小鼠免疫血清, 验证了该重组病毒在抗病毒药物药效评价和中和抗体

检测中的应用潜力。这一成果将为流感病毒研究及抗病毒药物开发提供新的实验方法和理论工具。

1 材料与方法

1.1 细胞、质粒与血清

人胚肾细胞(HEK-293T)和 Madin-Darby 犬肾细胞(MDCK)购自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC), 培养基为杜氏改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), 其中含 10% 胎牛血清和 1% 抗生素, 培养条件为 37 °C、5% CO₂。A/WSN/1933 (H1N1) 的 7 个质粒, GenBank 登录号分别为 LC333185.1 (血凝素, HA)、LC333183.1 (聚合酶蛋白 1, PB1)、LC333182.1 (聚合酶蛋白 2, PB2)、LC333184.1 (聚合酶酸性蛋白, PA)、LC333186.1 (核蛋白, NP)、MF039638.1 (基质蛋白, M)、LC333189.1 (非结构蛋白, NS); A/PR/8/34 (H1N1) 的 PR8-NA 质粒和 PHW2000 载体均由中国国家流感中心惠赠。PR8NA/WSN 免疫小鼠血清由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所应急技术中心收集并保存。

1.2 PR8NAEGFP/WSN 病毒构建与拯救

在甲型流感病毒 A/PR/8/34 (H1N1) 神经氨酸酶(neuraminidase, NA)的 C 端插入猪捷申病毒 2A 肽(GSGATNFSLKQAGDVEENPGP, P2A 自剪切位点)及 EGFP 荧光报告基因, 同时保留 NA 基因两端的 3' (18 个核苷酸)和 5' (157 个核苷酸)包装信号, 以助于包装成完整的病毒颗粒, 构建的质粒命名为 PR8NAEGFP。

将 293T 和 MDCK 细胞按 2:1 的比例混合, 铺至 6 孔板, 于 37 °C 培养至细胞密度达到 80% 后进行转染。转染时, 将 PR8NAEGFP 质粒和 WSN 的 7 个质粒稀释至 100 ng/μL, 使用 jetPRIME 转染试剂(Polyplus 公司)与 Opti-MEM (Gibco 公司)培养基平衡至室温。在每个 EP 管中加入 0.5 μg 质粒和 300 μL jetPRIME 缓冲液, 按 1:2 的比例加入 jetPRIME® Reagent, 轻轻混匀后静置 10 min, 再加入 1 mL Opti-MEM。将质粒-转染试剂混合液加入细胞后, 置于 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养 8 h, 之后每孔补充 1.3 mL 含 L-1-甲苯磺酰丙基-2-吡咯烷甲酰胰蛋白酶(L-1-tosylamido-2-phenylethyl chloromethyl ketone, TPCK)-Trypsin (Sigma-Aldrich 公司)的 Opti-MEM, 继续在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 72 h。观察到细胞病变并进行血凝检测后, 收集病毒感染液作为 P0 代病毒。将 P0 代病毒稀释后接种至 9-12 日龄的无特定病原体 (specific pathogen-free, SPF) 鸡胚, 37 °C 培养 48 h 后, 收集鸡胚尿囊液, 分装保存于 -80 °C 冰箱。

1.3 RT-PCR 鉴定

参照试剂厂商说明书, 使用 QIAamp Viral RNA Mini Kit [凯杰生物工程(深圳)有限公司]提取 PR8NAEGFP/WSN 重组病毒 P1-P5 代病毒和对照病毒 PR8NA/WSN 的 RNA, 使用 SuperScript™ IV VILO™ Master Mix (ThermoFisher Scientific 公司)将 RNA 一步反转录为 cDNA。引物为 NA-F (5'-TCAAATGGGACTGTAAAGGA-3') 和 NA-R (5'-CTTGTCATGCTGAATGGC-3')。PCR 反应体系(20 μL): 2×PrimeSTAR Mix 10 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, cDNA 模板 1 μL, ddH₂O 7 μL。PCR 反应条件: 98 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 10 s, 共 30 个循环。用 1% 琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行鉴定。

1.4 法匹拉韦体外抗病毒药效试验

将 MDCK 细胞以 2×10⁴ 细胞/孔接种于 96 孔透明板 [用于病灶形成试验 (focus-forming

assay, FFA) 法和实时荧光定量 PCR (real-time fluorescent quantitative PCR, qPCR) 法] 及 96 孔黑色框平底板 (GFP 法)。待细胞生长至约 90% 融合时, 每孔接种含 100 半数组织培养感染剂量 (tissue culture infectious dose 50, TCID₅₀) (GFP 法和 qPCR 法) 和 50-80 病灶形成单位 (focus forming unit, FFU) (FFA 法) 的病毒, 并在 37 °C 条件下吸附 1 h。随后, 将法匹拉韦 (favipiravir, 购自 MCE 公司) 以 100 μg/mL 的初始浓度起始, 进行 4 倍比稀释, 共设置 8 个浓度梯度, 每孔加入 100 μL 药物溶液, 继续在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 48 h (GFP 法和 qPCR 法), 或 18 h (用于 FFA 法)。

1.5 GFP 荧光强度检测

在 PR8NAEGFP/WSN 病毒培养 48 h 后, 每孔加入 200 μL 4% 细胞组织固定液, 固定 40 min 后弃去上清液。使用 Gen5 多功能荧光酶标仪, 在激发光波长 479 nm 和发射光波长 520 nm 下, 采用底读模式测定 GFP 荧光强度。根据公式(1) 计算药物抑制率。

$$\text{药物抑制率} = (\text{病毒对照荧光读值} - \text{实验孔荧光读值}) / \text{病毒对照荧光读值} \times 100\% \quad (1)$$

1.6 病灶形成试验

参照文献[12-16]进行病灶形成试验。固定: 每孔加入 200 μL 4% 多聚甲醛固定 40 min。透膜: 每孔加入 100 μL 0.1% TritonX-100, 室温通透 30 min。抗体孵育: 每孔加入 30 μL 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 偶联的抗甲型流感病毒 NP 单克隆抗体 (Zoonogen 公司), 室温孵育 1 h 后, PBST 洗 3 次。显色: 每孔加入 30 μL Trueblue (KPL) 过氧化物酶底物, 避光孵育 10 min。计数: 使用 CTL ImmunoSpot S6 通用分析仪进行扫描并定量病灶数。

1.7 病灶减少中和试验 (focus reduction neutralization test, FRNT)

采用受体破坏酶 (receptor destroying enzyme, RDE) 对待测小鼠血清样本进行预处理。具体操

作如下: 将 RDE 与血清按 3:1 的比例混合, 置于 37 °C 恒温水浴箱中孵育过夜。随后, 将混合液转移至 56 °C 进行 30 min 热灭活处理, 待其自然冷却至室温后, 加入病毒维持液进行 1:10 的初始稀释, 并在 96 孔板中进行连续 2 倍梯度稀释。将上述处理后的血清样本与 50 FFU 的病毒稀释液等体积混合(最终稀释度为 1:20), 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 1 h。孵育完成后, 将 30 μL 混合液加入细胞培养板中, 吸附 1 h, 每个样本设置双复孔, 同时设立病毒对照孔和细胞对照孔。吸附结束后, 吸弃混合液, 加入 100 μL 微晶纤维素(avicel)覆盖层, 置于 37 °C 培养箱中培养 18 h 后, 采用 1.6 节所述的 FFA 法检测血清样本的中和抗体水平。中和效价以半数中和效价(neutralizing titer 50, NT₅₀)值表示, 即能够抑制 50% 病毒感染病灶形成的最高小鼠血清稀释倍数。

1.8 荧光定量 PCR

采用核酸提取仪(西安天隆科技有限公司)提取 RNA。采用 One Step PrimeScript RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司)检测 IAV 基质蛋白 M 基因。引物和探针为 IAV-F (5'-CAAGACCAATCCTGT CACCTYTR-3')、IAV-R (5'-TCTACGCTGCAG TCCTCGCTC-3') 和 IAV-P (5'-FAM-ACGCTCA CCGTGCCAGTGAGC-BHQ1-3')。反应体系(20 μL): One Step PrimeScript III RT-qPCR (2×) 10 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 0.4 μL, 探针(10 μmol/L) 0.4 μL, RNA 2 μL, RNase free H₂O 6.8 μL。PCR 反应条件: 52 °C 5 min, 95 °C 10 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 共 40 个循环。通过标准曲线计算病毒拷贝数。

1.9 结晶紫噬斑试验

将 MDCK 细胞以 2×10⁵ 个细胞/孔接种于 12 孔培养板中。待细胞生长至单层时, 按照 50 空斑形成单位(plaque forming unit, PFU)/孔的剂量感染病毒, 吸附 1 h 后, 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 再更换 Avicel 覆盖层。然后在 37 °C、5% CO₂

条件下培养 48 h。使用 4% 细胞组织固定液固定细胞 40 min, 进行结晶紫染色, 晾干后拍照。噬斑面积由 ImageJ 软件进行定量。

1.10 统计分析

所有数据分析均使用 GraphPad Prism 9.5.1 软件进行。统计学检验采用双尾 *t* 检验和皮尔逊相关系数(Pearson correlation coefficient, *r*), 其中 *r* 值越接近 1 表示正相关性越强。*P* 值小于 0.05 被认为具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 PR8NAEGFP/WSN 病毒构建与验证

本研究将 A/WSN/1933 (H1N1) 流感病毒的 7 个质粒(HA、PB1、PB2、PA、NP、NS 和 M)与 A/PR/8/34 (H1N1) 流感病毒的重组质粒 PR8NAEGFP 共同转染至 293T 和 MDCK 细胞(1:2 共培养), 在 37 °C、5% CO₂ 条件下孵育 48 h 后, 观察到细胞病变并检测到血凝反应, 证明 PR8NAEGFP/WSN 病毒成功拯救, 记为 P0 代(图 1A)。随后, 将 P1 代病毒接种于 9 日龄 SPF 鸡胚进行扩毒, 并以感染复数(multiplicity of infection, MOI)=0.001 感染 MDCK 细胞, 在荧光显微镜下成功验证了 EGFP 荧光的表达。

2.2 PR8NAEGFP/WSN 病毒具有遗传稳定性

为了验证 PR8NAEGFP/WSN 病毒的遗传稳定性, 以 PR8NA/WSN 为对照, 使用 NA-F 和 NA-R 引物对 P1 代至 P11 代病毒进行 RT-PCR 扩增, 检测 NA 基因 C 端是否插入 EGFP 报告基因。RT-PCR (图 1B) 和荧光结果(图 1C)表明, 病毒各代次均成功插入 720 bp 的 EGFP 报告基因, 并在感染细胞时表达绿色荧光, 显示出良好的遗传稳定性。此外, 委托北京擎科生物科技股份有限公司对 PR8NAEGFP/WSN 片段进行测序验证, 结果显示其测序结果与预期一致, 进一步确认了 EGFP 报告基因插入位置的正确性。

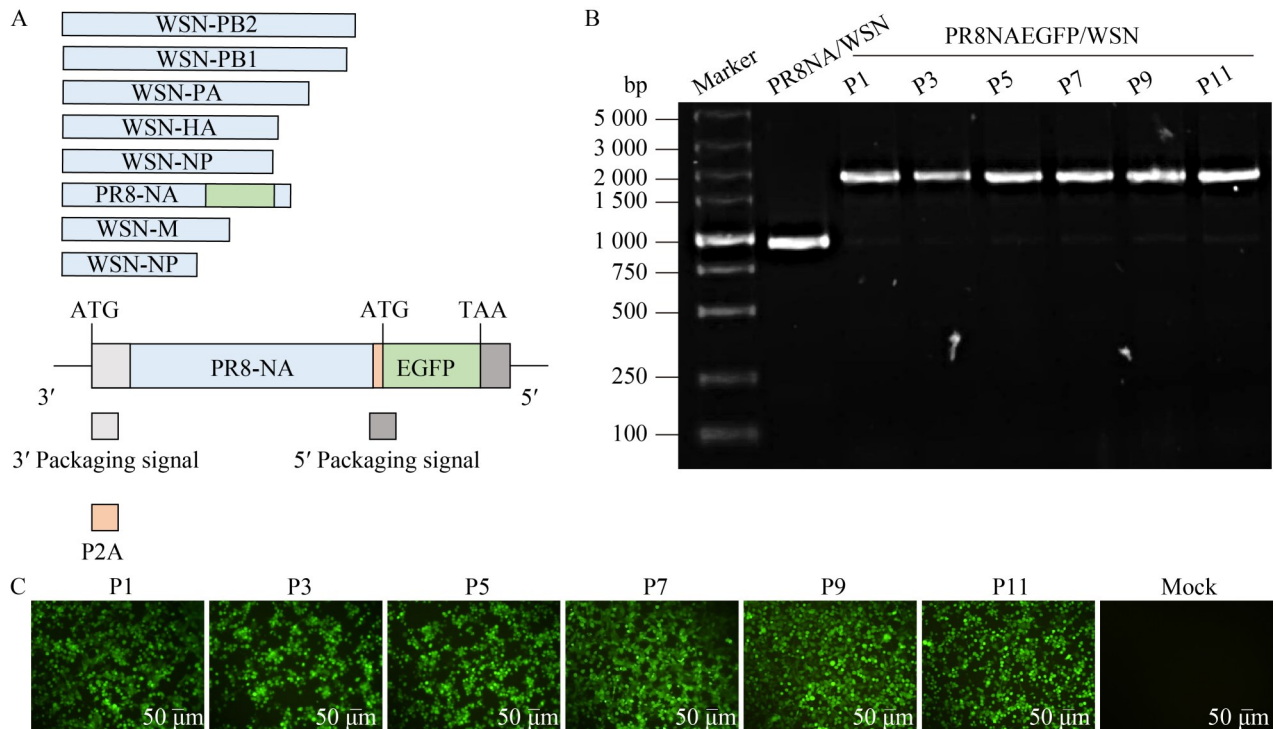


图1 PR8NAEGFP/WSN病毒构建与验证。A: 重组病毒PR8NAEGFP/WSN中NA-EGFP的示意图; B: RT-PCR检测验证重组病毒的遗传稳定性; C: 荧光显微镜观察EGFP报告基因的表达。

Figure 1 Construction and validation of PR8NAEGFP/WSN. A: Schematic diagram of NA-EGFP in the recombinant virus PR8NAEGFP/WSN; B: RT-PCR verification of the genetic stability of the recombinant virus; C: Observation of EGFP reporter gene expression under a fluorescence microscope.

2.3 PR8NAEGFP/WSN 和 PR8NA/WSN 病毒的体外生物学特性

为了评估 PR8NAEGFP/WSN 和 PR8NA/WSN 的体外生物学特性是否有显著差异, 本研究以 MOI 为 0.001 感染 MDCK 细胞, 观察了 2 株病毒在 0、12、24、48 和 72 h 的复制动力学、EGFP 荧光表达及 48 h 病毒噬斑形态(图 2)。复制动力学结果表明, 2 株病毒均在感染后 48 h 达到病毒复制的高峰, 但 PR8NAEGFP/WSN 的病毒滴度是 PR8NA/WSN 的约 5.96 倍。此外, PR8NAEGFP/WSN 病毒在感染后 12 h 即可观察到微弱的 EGFP 荧光表达, 且随着时间的推移, 表达强度逐渐增强, 至 48 h 达到峰值, 而在 72 h 因细胞病变脱落, 荧光强度有所减弱(图 2A), 这一现象与复制动力学结果一致(图 2B)。

结晶紫噬斑实验结果显示, PR8NAEGFP/WSN 和 PR8NA/WSN 病毒在噬斑形态和面积大小上未表现出显著差异(图 2C-2D)。

2.4 PR8NAEGFP/WSN 病毒在体外抗流感病毒药效学评价中的应用

为了评估 PR8NAEGFP/WSN 重组病毒在抗流感病毒药物筛选中的应用效果, 本研究以法匹拉韦作为阳性对照药物, PR8NA/WSN 病毒作为对照病毒, 采用 FFA 法、qPCR 法及 EGFP 荧光灶定量法对其药物半数有效浓度(EC_{50})及相关性进行比较分析(图 3)。FFA 法结果表明, 随着药物浓度降低, 病毒的病灶数逐渐增加(图 3A)。法匹拉韦对 PR8NAEGFP/WSN 和 PR8NA/WSN 病毒的 EC_{50} 分别为 0.608 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.535 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 二者之间无显著差异(图 3D)。通过 qPCR 法测

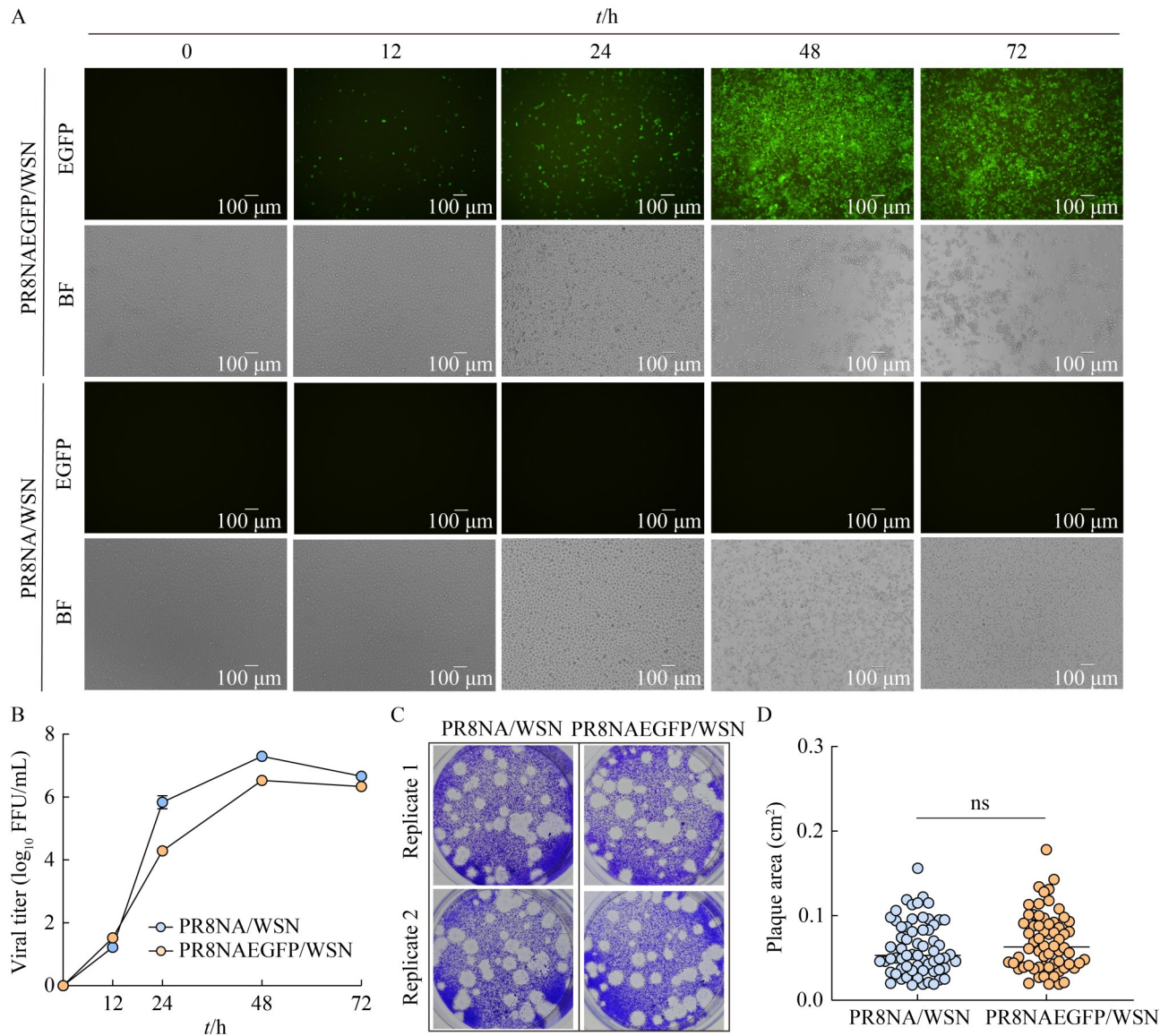
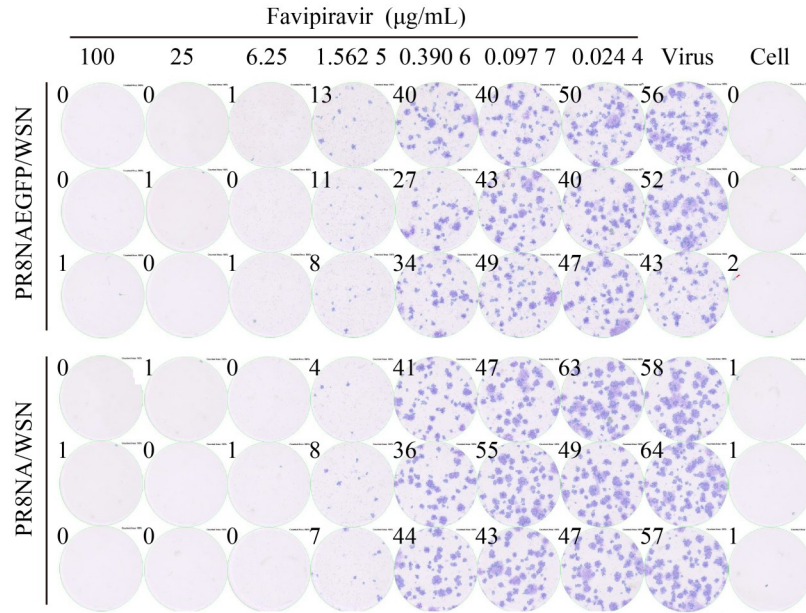


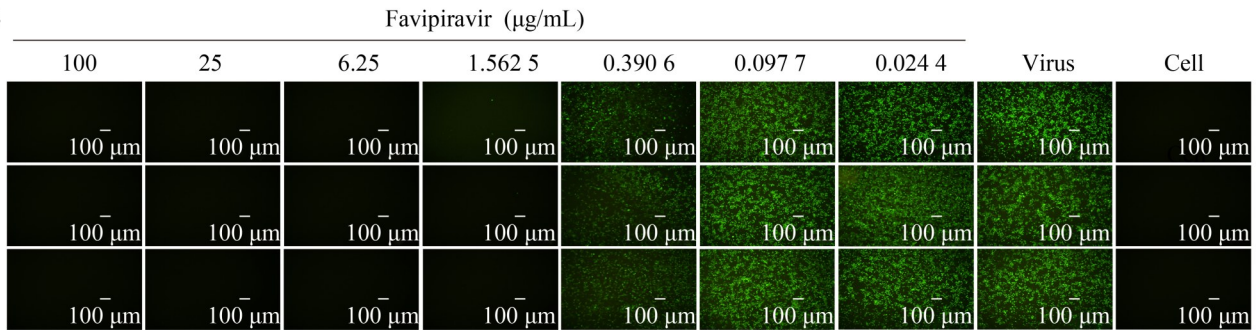
图2 PR8NAEGFP/WSN体外生物学特性。 A: PR8NAEGFP/WSN与PR8NA/WSN病毒的EGFP荧光与细胞病变示意图(EGFP荧光与细胞病变, 上图为PR8NAEGFP/WSN, 下图为PR8NA/WSN); B: PR8NAEGFP/WSN与PR8NA/WSN病毒的复制动力学曲线对比; C: PR8NAEGFP/WSN与PR8NA/WSN病毒的结晶紫噬斑形态示意图; D: PR8NAEGFP/WSN与PR8NA/WSN病毒的结晶紫染色噬斑面积的统计学分析(ns: $P>0.05$, 差异无统计学意义)。

Figure 2 *In vitro* biological characteristics of PR8NAEGFP/WSN. A: Schematic diagram of EGFP fluorescence and cytopathic effect of PR8NAEGFP/WSN and PR8NA/WSN viruses (Top: PR8NAEGFP/WSN; Bottom: PR8NA/WSN); B: Comparison of replicative kinetics curves of PR8NAEGFP/WSN and PR8NA/WSN viruses; C: Schematic diagram of crystal violet plaque morphology of PR8NAEGFP/WSN and PR8NA/WSN viruses; D: Statistical analysis of crystal violet staining plaque area of PR8NAEGFP/WSN and PR8NA/WSN viruses (ns: $P>0.05$, no statistically significant difference).

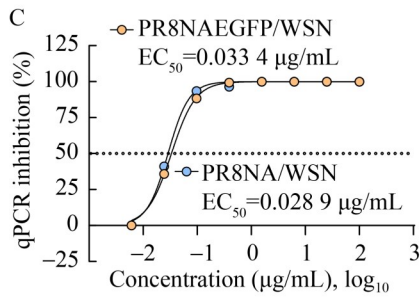
A



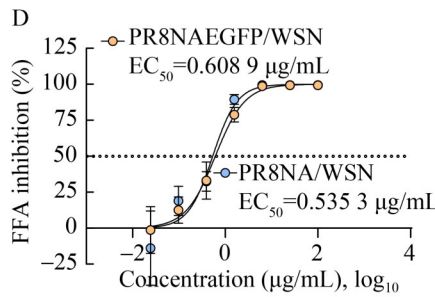
B



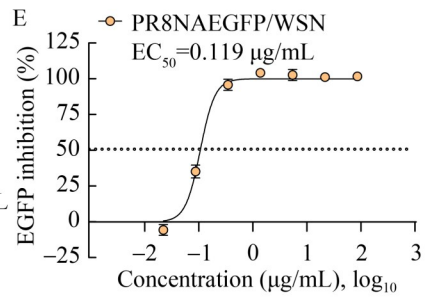
C



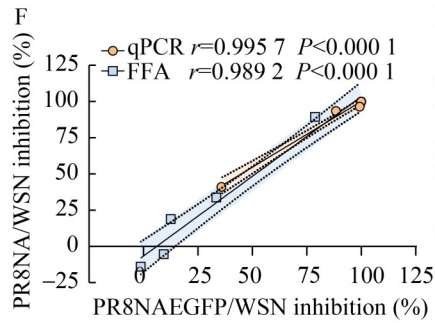
D



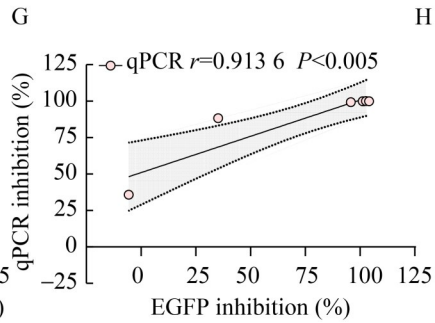
E



F



G



H

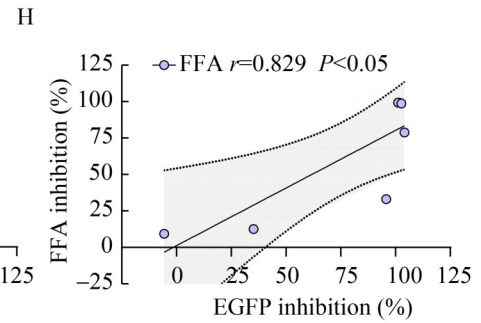


图3 PR8NAEGFP/WSN病毒在体外抗流感病毒药效学评价中的应用。A: 采用FFA法检测法匹拉韦抗PR8NAEGFP/WSN与PR8NA/WSN病毒的病灶示意图(上图为PR8NAEGFP/WSN, 下图为PR8NA/WSN); B: 采用EGFP荧光灶定量法检测法匹拉韦抗PR8NAEGFP/WSN病毒的荧光示意图; C、D: 分别采用qPCR法和FFA法检测法匹拉韦抗PR8NAEGFP/WSN与PR8NA/WSN病毒, 计算EC₅₀的曲线拟合图; E: 采用EGFP荧光灶定量法检测法匹拉韦抗PR8NAEGFP/WSN病毒, 计算EC₅₀的曲线拟合图; F: 采用qPCR法与FFA法分析PR8NAEGFP/WSN与PR8NA/WSN病毒之间的相关性; G、H: 采用EGFP荧光灶定量法与qPCR法(G)、FFA法(H)分析PR8NAEGFP/WSN病毒之间的相关性。

Figure 3 Application of PR8NAEGFP/WSN in the pharmacodynamic evaluation of anti-influenza virus agents *in vitro*. A: Schematic diagram of foci detected by FFA method for favipiravir against PR8NAEGFP/WSN and PR8NA/WSN viruses (Top: PR8NAEGFP/WSN; Bottom: PR8NA/WSN); B: Fluorescence diagram of EGFP foci quantification method for favipiravir against PR8NAEGFP/WSN virus; C, D: Detection of favipiravir against PR8NAEGFP/WSN and PR8NA/WSN viruses using qPCR and FFA methods, with EC₅₀ curve fitting; E: Curve fitting graph for calculating EC₅₀ using EGFP foci quantification method for favipiravir against PR8NAEGFP/WSN virus; F: Correlation analysis between PR8NAEGFP/WSN and PR8NA/WSN viruses using qPCR and FFA methods; G, H: Correlation analysis of PR8NAEGFP/WSN virus using EGFP foci quantification method with qPCR (G) and FFA (H) methods.

得, 随着药物浓度减少, 病毒复制的抑制率呈下降趋势(图 3C), 法匹拉韦对 PR8NAEGFP/WSN 和 PR8NA/WSN 病毒的 EC₅₀ 分别为 0.033 4 μg/mL 和 0.028 9 μg/mL (图 3C)。EGFP 荧光灶的数量随着药物浓度降低而增加(图 3B), 对 EGFP 荧光灶强度进行定量分析得出的 EC₅₀ 值为 0.119 0 μg/mL (图 3E)。

对 PR8NAEGFP/WSN 和 PR8NA/WSN 病毒进行相关性分析发现, 采用 FFA 法和 qPCR 法测得的病毒抑制率的相关性(*r* 值)均大于 0.950 0, 且 $P < 0.000 1$, 显示出较高的一致性(图 3F)。此外, EGFP 荧光灶定量法与 qPCR 法及 FFA 法的相关性分析结果显示, EGFP 与 qPCR 法的 *r* 值为 0.913 6, $P < 0.005$ (图 3G); EGFP 与 FFA 法的 *r* 值为 0.829 0, $P < 0.05$ (图 3H)。上述结果表明, PR8NAEGFP/WSN 重组病毒可作为一个良好的工具用于抗流感病毒药物的体外筛选和评估。

2.5 PR8NAEGFP/WSN 病毒在体外应用于中和抗体检测

使用带有绿色荧光蛋白标记的 PR8NAEGFP/WSN 病毒可实时监测细胞培养中的病

毒感染情况。当病毒与免疫小鼠血清反应时, 中和抗体能够抑制病毒感染, 从而导致荧光信号减少, 间接反映抗体的中和效力。此外, 借助荧光酶标仪对 EGFP 荧光强度进行定量, 可减少人工误差, 提高实验精度。本研究以 PR8NA/WSN 病毒作为对照病毒, 采用 FRNT 法检测了 10 份免疫小鼠血清的中和抗体滴度(表 1)。结果显示, 2 种方法检测的中和抗体滴度的 *r* 值为 0.930 4, 且 $P < 0.000 1$, 表明两者之间具有较高的一致性(图 4)。这一发现表明, PR8NAEGFP/WSN 重组病毒可作为一种有效的检测工具, 用于评估抗体对病毒的中和能力, 并为疫苗开发或免疫反应研究提供重要数据。

3 讨论与结论

表达报告基因的重组流感病毒是研究流感病毒生物学及其发病机制的重要工具。这些重组病毒能够在体外和体内便捷地追踪病毒感染, 无需依赖二次检测方法来识别感染细胞, 也无需通过验证的动物模型来确认病毒的存在^[17-20]。本研究通过构建携带 EGFP 报告基因的 PR8NAEGFP/WSN 重组流感病毒, 初步探讨了

表1 两种不同方法检测免疫小鼠血清中和抗体滴度

Table 1 Virus-neutralizing antibody titers in the serum of vaccinated mice detected by two different methods

血清样本编号 Serum number	免疫小鼠血清中和滴度 ^a Virus-neutralizing titers in immunized mouse serum ^a	
	FRNT	EGFP
1	307.2	272.1
2	744.4	636.8
3	572.7	216.3
4	438.5	208.5
5	1 603.0	2 516.0
6	196.6	272.3
7	208.3	254.6
8	880.9	1 692.0
9	526.2	1 046.0
10	1 285.0	2 336.0
NC ^b	<10	<10

^a: 中和50% FFU; ^b: 阴性对照血清。待测血清的初始稀释度为1:20。为了方便绘图和统计, 将阴性的待测血清样本赋值为10。

^a: 50% FFU neutralization; ^b: Negative control serum. The initial dilution of the serum samples to be tested in this study was 1:20. For the purpose of graphing and statistical analysis, negative serum samples were assigned a value of 10.

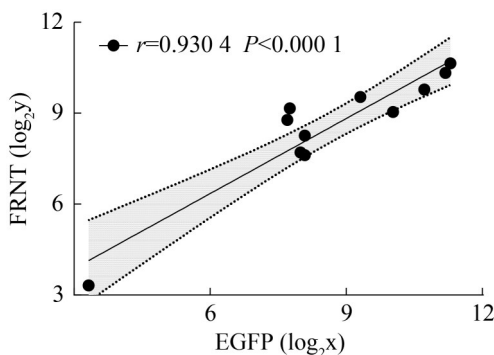


图4 两种不同方法检测免疫小鼠血清中和抗体滴度的相关性

Figure 4 Correlation of neutralizing antibody titers in immune mouse serum detected by two different methods.

其在抗病毒药物和中和抗体检测中的应用。该研究为高通量药物筛选平台的建立以及流感病毒疫苗的研发提供了一种实时可视化的检测工具。

结晶紫噬斑试验^[21]和半数组织培养感染剂量^[22]是滴定流感病毒的经典方法, 但这2种方法依赖于细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)的产生, 且培养时间较长。对于某些临床分离株, 无法形成明显的CPE, 上述2种方法在某些情况下会限制IAV的研究^[23-24]。为了解决这一问题, 研究者已采用基于免疫染色的病灶形成试验等二级实验方法来研究野生型甲型流感病毒^[12]。虽然这些方法在解决噬斑形成困难和缩短实验时间方面有所改进, 但它们依赖抗体与病毒蛋白的结合, 而抗体的成本通常较高, 从而增加了实验的经济负担。此外, FFA法通常需要覆盖层来防止流感病毒的扩散, 无法实时追踪细胞或动物体内的病毒感染过程。相比之下, 使用表达荧光蛋白的重组病毒结合体外成像技术(如荧光显微镜和活体成像)能够在体外和体内有效地追踪病毒感染, 从而获得可靠的定量读数^[20,25]。

目前, 对抗IAV的可用选择包括抗病毒药物和疫苗。已批准用于IAV的抗病毒药物主要包括神经氨酸酶抑制剂、M2离子通道抑制剂和聚合酶抑制剂。然而, 这些抗病毒化合物在安全性和病毒耐药性方面存在一定问题^[26-28]。因此, 迫切需要开发新的抗病毒药物来对抗IAV感染。接种疫苗是预防IAV感染的主要手段。然而, 目前已批准的流感疫苗疗效适中, 并且会随着季节变化而变化。针对HA茎部开发的广谱通用流感疫苗被寄望能克服传统流感疫苗在抗原漂移和抗原转变中的挑战, 从而提供对多种流感病毒亚型的保护。对产生中和抗体的广度和效力进行全面检测, 将有助于加速开发有效的通用流感疫苗。流感特异性抗体滴度的测定通常使用血凝抑制试验(hemagglutination inhibition test, HAI)和微量中和试验进行^[29]。靶

向 HA 茎部保守表位的流感疫苗通过抑制病毒融合机制中和病毒。传统的 HAI 测定通过测量抗体对病毒与受体相互作用的抑制作用, 无法检测到这种中和活性^[30]。噬斑减少中和试验也常用于流感及其他病毒的研究。这些方法通过用酶联免疫吸附测定检测病毒核蛋白、滴定血凝或评分细胞病变效应来衡量病毒复制, 但由于操作繁琐且劳动强度大, 难以大规模推广, 且处理来自动物的活病毒需要高安全级别的实验室。尽管已有 HA/NA 报告基因假病毒用于流感研究, 并且有效应用于测量中和活性, 但它们常因未能涵盖流感病毒的一些关键方面而受到批评^[31-33]。因此, 构建具有报告基因的重组流感病毒有助于高通量筛选抗病毒药物并开发标准化的高通量中和测定方法, 能够显著提高感染监测和表征疫苗接种诱导的中和抗体反应能力。

许多研究已报道使用 IAV 不同节段编码荧光素酶^[34-36]或荧光蛋白^[37-40]。其中, NA 节段已被证明可以耐受外源 EGFP 报告基因的插入^[41-43]。然而, 采用不同策略将报告基因整合到流感病毒基因组时, 通常面临一定的技术限制与表型变化, 主要表现为重组流感病毒的生物学特性发生改变, 导致病毒的复制能力显著减弱^[34]。此外, 表达报告基因的重组流感病毒在细胞培养或小鼠中的连续传代过程中, 报告基因的活性可能会丧失^[20,44], 这限制了其在多周期生长实验、模型生物的长期感染或传播研究中的应用。研究表明野生型 A/WSN/1933 (H1N1)骨架的 NA 表达量明显高于 A/PR/8/34 (H1N1)^[45]。在本实验室的前期研究中也证明了这一观点^[46]。因此, 基于上述研究背景, 本研究采用 A/WSN/1933 (H1N1)骨架构建了携带 EGFP 报告基因的 PR8NAEGFP/WSN 嵌合重组病毒。通过实验验证, 发现该重组病毒在细胞培养中的连续传代过程中报告基因具有较好的遗传稳定性与高水平报告基因表达。此外, 重组病毒的生物学特性与对照病毒相比未发生显

著改变。本研究解决了报告基因稳定性和病毒复制能力的矛盾, 为后续的流感病毒研究提供了更为可靠的工具。

流感病毒载体疫苗因其广谱免疫反应、快速生产、增强的免疫效果以及较高的适应性等特点, 已成为防控流感及其他呼吸道传染病的重要候选平台^[47]。研究表明已将该载体应用于表达严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)受体结合区(RBD)和呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)的保护性抗原 G 胞外结构域(Gecto), 通过单剂鼻内免疫小鼠, 成功诱导了强大的黏膜免疫和全身免疫反应, 并实现了对 IAV 和 SARS-CoV-2 或 RSV 的交叉保护^[48-49]。

表达生物发光或荧光蛋白的报告病毒能够方便地在体内观察病毒复制, 无需通过安乐死来检测啮齿动物的病毒滴度, 同时还能利用非侵入性技术进行全身成像^[25,50]。因此, 本研究仍存在一定的局限性, 未来需进一步探索 PR8NAEGFP/WSN 在动物体内的感染特性。综上所述, 本研究成功构建了携带 EGFP 报告基因且具有遗传稳定性的 PR8NAEGFP/WSN 重组流感病毒, 并采用阳性药物法匹拉韦和小鼠免疫血清, 初步探讨了该病毒在高通量抗病毒药物筛选、减毒活疫苗开发和疫苗评价中的应用前景, 为深入开展抗 IAV 感染研究奠定了技术基础。

致谢

感谢国家流感中心王大燕研究员与秦堃博士在流感反向遗传学上给予的支持与技术指导。

作者贡献声明

李佳: 初稿写作、方案设计、实验操作、撰写文章; 王东红: 提出概念、提供材料; 蒋宇婕: 实验操作; 韩瑞雯: 提供材料; 楚巧鸿: 数据分析; 王瑋琪: 数据收集与监管; 刘冠雅:

数据管理；张雪洁：数据验证；黄保英：稿件润色修改、审查和编辑写作；邓瑶：审阅、监督指导；谭文杰：方案设计、项目管理、提供资源、监督指导、经费支持、审查和编辑写作。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] BARR IG, McCAULEY J, COX N, DANIELS R, ENGELHARDT OG, FUKUDA K, GROHMANN G, HAY A, KELSO A, KLIMOV A, ODAGIRI T, SMITH D, RUSSELL C, TASHIRO M, WEBBY R, WOOD J, YE ZP, ZHANG WQ. Epidemiological, antigenic and genetic characteristics of seasonal influenza a(H1N1), a (H3N2) and B influenza viruses: basis for the WHO recommendation on the composition of influenza vaccines for use in the 2009–2010 Northern Hemisphere season[J]. *Vaccine*, 2010, 28(5): 1156-1167.
- [2] LOUIE JK, JEAN C, ACOSTA M, SAMUEL MC, MATYAS BT, SCHECHTER R. A review of adult mortality due to 2009 pandemic (H1N1) influenza A in California[J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e18221.
- [3] CHIEM K, NOGALES A, MARTINEZ-SOBRIDO L. Generation, characterization, and applications of influenza a reporter viruses[M]//*Bioluminescence*. New York, NY: Springer US, 2022: 249-268.
- [4] PARK JG, AVILA-PÉREZ G, NOGALES A, BLANCO-LOBO P, deLa TORRE JC, MARTÍNEZ-SOBRIDO L. Identification and characterization of novel compounds with broad-spectrum antiviral activity against influenza a and B viruses[J]. *Journal of Virology*, 2020, 94(7): e02149-19.
- [5] NOGALES A, AVILA-PÉREZ G, RANGEL-MORENO J, CHIEM K, DeDIEGO ML, MARTÍNEZ-SOBRIDO L. A novel fluorescent and bioluminescent bireporter influenza a virus to evaluate viral infections[J]. *Journal of Virology*, 2019, 93(10): e00032-19.
- [6] MARTINEZ-SOBRIDO L, NOGALES A. Recombinant influenza a viruses expressing reporter genes from the viral NS segment[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(19): 10584.
- [7] BLAKE ME, KLEINPETER AB, JUREKA AS, PETIT CM. Structural investigations of interactions between the influenza a virus NS1 and host cellular proteins[J]. *Viruses*, 2023, 15(10): 2063.
- [8] ECKERT N, WRENSCH F, GÄRTNER S, PALANISAMY N, GOEDECKE U, JÄGER N, PÖHLMANN S, WINKLER M. Influenza A virus encoding secreted *Gaussia luciferase* as useful tool to analyze viral replication and its inhibition by antiviral compounds and cellular proteins[J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97695.
- [9] NOGALES A, DeDIEGO ML, MARTÍNEZ-SOBRIDO L. Live attenuated influenza A virus vaccines with modified NS1 proteins for veterinary use[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 12: 954811.
- [10] BLANCO-LOBO P, NOGALES A, RODRÍGUEZ L, MARTÍNEZ-SOBRIDO L. Novel approaches for the development of live attenuated influenza vaccines[J]. *Viruses*, 2019, 11(2): 190.
- [11] NEUMANN G. Influenza reverse genetics-historical perspective[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2021, 11(4): a038547.
- [12] WANG GS, HUANG PF, HONG JP, FU R, WU Q, CHEN RQ, LIN LN, HAN QY, CHEN HL, CHEN YX, XIA NS. Establishment of a rapid ELISPOT assay for influenza virus titration and neutralizing antibody detection[J]. *Journal of Medical Virology*, 2021, 93(6): 3455-3464.
- [13] LI SX, ZHAO H, YANG HW, HOU WH, CRUZ-COSME R, CAO RY, CHEN CY, WANG W, XU LF, ZHANG J, ZHONG W, XIA NS, TANG QY, CHENG T. Rapid neutralization testing system for zika virus based on an enzyme-linked immunospot assay[J]. *ACS Infectious Diseases*, 2020, 6(5): 811-819.
- [14] LIN YP, GU Y, McCAULEY JW. Optimization of a quantitative micro-neutralization assay[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2016(118): 54897.
- [15] VANDERHEIDEN A, EDARA VV, FLOYD K, KAUFFMAN RC, MANTUS G, ANDERSON E, ROUPHAEL N, EDUPUGANTI S, SHI PY, MENACHERY VD, WRAMMERT J, SUTHAR MS. Development of a rapid focus reduction neutralization test assay for measuring SARS-CoV-2 neutralizing antibodies[J]. *Current Protocols in Immunology*, 2020, 131(1): e116.
- [16] 李佳, 楚巧鸿, 张菱芳, 单徐畅, 王珊珊, 韩瑞雯, 蒋宇婕, 王东红, 黄保英, 邓瑶, 谭文杰. 甲型流感病毒病灶形成滴定方法的建立与应用[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2025, 45(1): 45-52.
- [17] LI J, CHU QH, ZHANG LF, SHAN XC, WANG TQ, HAN RW, JIANG YJ, WANG DH, HUANG BY, DENG Y, TAN WJ. Development and application of an optimized focus-forming assay for quantitation of influenza A virus titer[J]. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 2025, 45(1): 45-52 (in Chinese).
- [18] NOGALES A, BAKER SF, MARTÍNEZ-SOBRIDO L. Replication-competent influenza A viruses expressing a red fluorescent protein[J]. *Virology*, 2015, 476: 206-216.
- [19] FUKUYAMA S, KATSURA H, ZHAO DM, OZAWA M, ANDO T, SHOEMAKER JE, ISHIKAWA I, YAMADA S, NEUMANN G, WATANABE S, KITANO H, KAWAOKA Y. Multi-spectral fluorescent reporter influenza viruses (Color-flu) as powerful tools for *in vivo* studies[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 6600.
- [20] DiPIAZZA A, NOGALES A, POULTON N, WILSON PC, MARTÍNEZ-SOBRIDO L, SANT AJ. Pandemic 2009 H1N1 Influenza *Venus* reporter virus reveals broad diversity of MHC class II-positive antigen-bearing cells

- following infection *in vivo*[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 10857.
- [20] MANICASSAMY B, MANICASSAMY S, BELICHAVILLANUEVA A, PISANELLI G, PULENDRAN B, GARCÍA-SASTRE A. Analysis of *in vivo* dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(25): 11531-11536.
- [21] GAUSH CR, SMITH TF. Replication and plaque assay of influenza virus in an established line of canine kidney cells[J]. *Applied Microbiology*, 1968, 16(4): 588-594.
- [22] KLIMOV A, BALISH A, VEGUILLA V, SUN H, SCHIFFER J, LU XH, KATZ JM, HANCOCK K. Influenza virus titration, antigenic characterization, and serological methods for antibody detection[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2012, 865: 25-51.
- [23] TISDALE M. Monitoring of viral susceptibility: new challenges with the development of influenza NA inhibitors[J]. *Reviews in Medical Virology*, 2000, 10(1): 45-55.
- [24] HATAKEYAMA S, SAKAI-TAGAWA Y, KISO M, GOTO H, KAWAKAMI C, MITAMURA K, SUGAYA N, SUZUKI Y, KAWAOKA Y. Enhanced expression of an alpha 2,6-linked sialic acid on MDCK cells improves isolation of human influenza viruses and evaluation of their sensitivity to a neuraminidase inhibitor[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(8): 4139-4146.
- [25] TRAN V, MOSER LA, POOLE DS, MEHLE A. Highly sensitive real-time *in vivo* imaging of an influenza reporter virus reveals dynamics of replication and spread[J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(24): 13321-13329.
- [26] JACKSON RJ, COOPER KL, TAPPENDEN P, REES A, SIMPSON EL, READ RC, NICHOLSON KG. Oseltamivir, zanamivir and amantadine in the prevention of influenza: a systematic review[J]. *Journal of Infection*, 2011, 62(1): 14-25.
- [27] KUMAR G, SAKHARAM KA. Tackling influenza A virus by M2 ion channel blockers: latest progress and limitations[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2024, 267: 116172.
- [28] MCKIMM-BRESCHKIN JL. Influenza neuraminidase inhibitors: antiviral action and mechanisms of resistance[J]. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 2013, 7(s1): 25-36.
- [29] JONES JC, PASCUA PNQ, FABRIZIO TP, MARATHE BM, SEILER P, BARMAN S, WEBBY RJ, WEBSTER RG, GOVORKOVA EA. Influenza A and B viruses with reduced baloxavir susceptibility display attenuated *in vitro* fitness but retain ferret transmissibility[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(15): 8593-8601.
- [30] LAURIE KL, ENGELHARDT OG, WOOD J, HEATH A, KATZ JM, PEIRIS M, HOSCHLER K, HUNGNES O, ZHANG WQ, van KERKHOVE MD, CONSISE Laboratory Working Group participants. International laboratory comparison of influenza microneutralization assays for a(H1N1)pdm09, a(H3N2), and a(H5N1) influenza viruses by CONSISE[J]. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2015, 22(8): 957-964.
- [31] OH HJ, AKERSTRÖM S, SHEN S, BEREZKY S, KARLBERG H, KLINGSTRÖM J, LAL SK, MIRAZIMI A, TAN YJ. An antibody against a novel and conserved epitope in the hemagglutinin 1 subunit neutralizes numerous H5N1 influenza viruses[J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(16): 8275-8286.
- [32] CARNELL GW, FERRARA F, GREHAN K, THOMPSON CP, TEMPERTON NJ. Pseudotype-based neutralization assays for influenza: a systematic analysis[J]. *Frontiers in Immunology*, 2015, 6: 161.
- [33] YANG ZY, WEI CJ, KONG WP, WU L, XU L, SMITH DF, NABEL GJ. Immunization by avian H5 influenza hemagglutinin mutants with altered receptor binding specificity[J]. *Science*, 2007, 317(5839): 825-828.
- [34] PAN WQ, DONG ZY, LI F, MENG WX, FENG LQ, NIU XF, LI CF, LUO QF, LI ZF, SUN CJ, CHEN L. Visualizing influenza virus infection in living mice[J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 2369.
- [35] HEATON NS, LEYVA-GRADO VH, TAN GS, EGGINK D, HAI R, PALESE P. *In vivo* bioluminescent imaging of influenza a virus infection and characterization of novel cross-protective monoclonal antibodies[J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(15): 8272-8281.
- [36] YAN D, WEISSHAAR M, LAMB K, CHUNG HK, LIN MZ, PLEMPER RK. Replication-competent influenza virus and respiratory syncytial virus luciferase reporter strains engineered for co-infections identify antiviral compounds in combination screens[J]. *Biochemistry*, 2015, 54(36): 5589-5604.
- [37] AVILOV SV, MOISY D, MUNIER S, SCHRAIDT O, NAFFAKH N, CUSACK S. Replication-competent influenza A virus that encodes a split-green fluorescent protein-tagged PB2 polymerase subunit allows live-cell imaging of the virus life cycle[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(3): 1433-1448.
- [38] LAKDAWALA SS, WU YC, WAWRZUSIN P, KABAT J, BROADBENT AJ, LAMIRANDE EW, FODOR E, ALTAN-BONNET N, SHROFF H, SUBBARAO K. Influenza a virus assembly intermediates fuse in the cytoplasm[J]. *PLoS Pathogens*, 2014, 10(3): e1003971.
- [39] KITTEL C, SEREINIG S, FERKO B, STASAKOVA J, ROMANOVA J, WOLKERSTORFER A, KATINGER H, EGOROV A. Rescue of influenza virus expressing GFP from the NS1 reading frame[J]. *Virology*, 2004, 324(1): 67-73.
- [40] PEREZ JT, GARCÍA-SASTRE A, MANICASSAMY B. Insertion of a *GFP* reporter gene in influenza virus[J]. *Current Protocols in Microbiology*, 2013, 29(1): 15G.4.1-15G.4.16.
- [41] LI F, FENG LQ, PAN WQ, DONG ZY, LI CF, SUN CJ, CHEN L. Generation of replication-competent recombinant influenza A viruses carrying a reporter gene harbored in the neuraminidase segment[J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(22): 12075-12081.
- [42] MACHADO AV, NAFFAKH N, van der WERF S, ESCRIOU N. Expression of a foreign gene by stable recombinant influenza viruses harboring a dicistronic genomic segment with an internal promoter[J]. *Virology*,

- 2003, 313(1): 235-249.
- [43] VIEIRA MACHADO A, NAFFAKH N, GERBAUD S, van der WERF S, ESCRIOU N. Recombinant influenza A viruses harboring optimized dicistronic NA segment with an extended native 5' terminal sequence: induction of heterospecific B and T cell responses in mice[J]. *Virology*, 2006, 345(1): 73-87.
- [44] KUZNETSOVA I, SHURYGINA AP, WOLF B, WOLSCHEK M, ENZMANN F, SANSYZBAY A, KHAIRULLIN B, SANDYBAYEV N, STUKOVA M, KISELEV O, EGOROV A, BERGMANN M. Adaptive mutation in nuclear export protein allows stable transgene expression in a chimeric influenza A virus vector[J]. *Journal of General Virology*, 2014, 95(Pt 2): 337-349.
- [45] GAO J, WAN HQ, LI X, RAKIC MARTINEZ M, KLENOW L, GAO YM, YE ZP, DANIELS R. Balancing the influenza neuraminidase and hemagglutinin responses by exchanging the vaccine virus backbone[J]. *PLoS Pathogens*, 2021, 17(4): e1009171.
- [46] 王东红, 邓瑶, 叶飞, 周剑芳, 王文, 黄保英, 王梦微, 孟昕, 谭文杰. 表达分泌荧光素酶的重组流感病毒构建及体外生物学特性研究[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2023, 43(11): 823-828.
- WANG DH, DENG Y, YE F, ZHOU JF, WANG W, HUANG BY, WANG MW, MENG X, TAN WJ. Construction of recombinant influenza virus expressing *Gaussia* luciferase and analysis of its *in vitro* biological characteristics[J]. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 2023, 43(11): 823-828 (in Chinese).
- [47] GERLACH T, ELBAHESH H, SALETTI G, RIMMELZWAAN GF. Recombinant influenza A viruses as vaccine vectors[J]. *Expert Review of Vaccines*, 2019, 18(4): 379-392.
- [48] WANG DH, DENG Y, ZHOU JF, WANG W, HUANG BY, WANG WL, WEI L, REN J, HAN RW, BING JL, ZHAI CC, GUO XY, TAN WJ. Single-dose intranasal immunisation with novel chimeric H1N1 expressing the receptor-binding domain of SARS-CoV-2 induces robust mucosal immunity, tissue-resident memory T cells, and heterologous protection in mice[J]. *Vaccines*, 2023, 11(9): 1453.
- [49] 韩瑞雯, 王东红, 王瑋琪, 程雪婷, 邴佳洛, 翟程程, 孙树才, 邓瑶, 黄保英, 谭文杰. 表达呼吸道合胞病毒G蛋白胞外区的重组H1N1流感病毒单剂滴鼻免疫可在小鼠诱导强免疫应答与保护[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2024, 44(2): 93-100.
- HAN RW, WANG DH, WANG TQ, CHENG XT, BING JL, ZHAI CC, SUN SC, DENG Y, HUANG BY, TAN WJ. Intranasal immunization with single-dose vaccine based on recombinant influenza virus H1N1 expressing the extracellular domain of respiratory syncytial virus G protein induces robust immunity and protection in mice[J]. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 2024, 44(2): 93-100 (in Chinese).
- [50] BU L, CHEN BQ, XING L, CAI XJ, LIANG SH, ZHANG LY, WANG XH, SONG WJ. Generation of a pdmH1N1 2018 influenza a reporter virus carrying a mCherry fluorescent protein in the PA segment[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 11: 827790.