基于慢病毒的猴痘假病毒系统设计与构建及其评价抗猴痘抗体中和活性的应用

崔彩霞，李世聪，包汶鑫，金浙东，袁运生*
（上海交通大学药学院，细胞工程及抗体药物教育部工程研究中心，上海 200240）

摘要：猴痘病毒表面的 A35R 和 M1R 抗原在介导病毒入侵过程中发挥重要生物学功能，也是潜在的疫苗设计与中和抗体治疗的重要靶点。该研究通过分子克隆技术分别构建 A35R 或 M1R 与严重急性呼吸系统综合征（SARS）冠状病毒表面棘突蛋白（S）的介导膜融合的 S2 结构域融合蛋白表达载体（A35R-S2 或 M1R-S2），并用融合蛋白替代慢病毒包装系统的包膜蛋白成分，在人胚肾细胞（HEK-293T 细胞）里将插入萤光素酶报告基因的慢病毒载体质粒包装到慢病毒中，形成同时包膜展示 A35R-S2 或 M1R-S2 和基因组上载有萤光素酶的工程化慢病毒。体外感染试验证实，该工程化慢病毒可有效侵染 HEK-293T 细胞及非洲绿猴肾细胞（Vero-E6 细胞），A35R 和 M1R 特异性抗体可显著抑制工程化慢病毒的感染活性。综上所述，基于猴痘表面抗原 -S2 融合包膜蛋白的技术平台可包装出模拟猴痘感染的猴痘假病毒，并可作为猴痘病毒治疗性抗体候选药物的高通量筛选及疫苗免疫效果初步评估的新型工具。

关键词：猴痘病毒；慢病毒；假病毒；中和抗体；分子克隆；基因工程
中图分类号：R392；TQ464　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2026)02-0184-07
引用：崔彩霞, 李世聪, 包汶鑫, 等．基于慢病毒的猴痘假病毒系统设计与构建及其评价抗猴痘抗体中和活性的应用[J]．中国医药工业杂志, 2026, **57**(2): 184-190．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2026.02.007

Design and Construction of a Lentivirus-based Monkeypox Pseudovirus System and Its Application to Evaluation of Neutralizing Activity of Anti-MPXV Antibodies

CUI Caixia, LI Shicong, BAO Wenxing, JIN Zhedong, YUAN Yunsheng*
(*Engineering Research Center of Cell & Therapeutic Antibody, MOE, School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240*)

ABSTRACT: The A35R and M1R antigens on the surface of the monkeypox virus (MPXV) play critical roles in mediating viral entry. These two antigens are also important targets for potential vaccine design and therapeutic antibody development. In this study, molecular cloning techniques were employed to construct expression vectors for fusion proteins (A35R-S2 or M1R-S2), which consisted of either A35R or M1R fused with the S2 domain of the Spike (S) protein from severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus, a domain that mediates membrane fusion between the virus and host cell. These fusion proteins were used to replace the envelope protein component of a lentiviral packaging system. In human embryonic kidney 293T (HEK-293T) cells, a lentiviral vector plasmid inserted a firefly luciferase as reporter gene was packaged into lentiviruses, resulting in engineered lentiviral particles that both display A35R-S2 or M1R-S2 on their envelope and carry the luciferase gene within their genome. *In vitro* infection assays confirmed that these engineered lentiviruses could effectively infect HEK293T and African green monkey kidney cells (VERO-E6 cells), and that A35R- and M1R-specific antibodies significantly inhibited their infectivities. The results demonstrate that this technical platform, which utilizes monkeypox surface antigen-S2 fusion envelope proteins, can generate monkeypox pseudoviruses that mimic MPXV infection. This system serves as a novel tool for high-throughput screening of therapeutic antibody candidates and preliminary evaluation of vaccine efficacy against monkeypox virus.

Key Words: monkeypox virus; lentivirus; pseudovirus; neutralizing antibody; molecular cloning; gene engineering

猴痘是由猴痘病毒（monkeypox virus，MPXV）引起的一种人畜共患病。MPXV 主要通过直接接触皮肤、受污染的物品或动物传播，还可能会通过母婴传播。MPXV 是一种双链 DNA 病毒，基因组长度为 190 kb，与痘苗病毒（vaccinia virus，VACV）同属正痘病毒属，因此两者的基因组序列具有高度同源性。MPXV 的主要存在形式为细胞外囊膜病毒（enveloped virus，EV）和细胞内成熟病毒体（mature virion，MV）。MV 对病毒在宿主间的传播起重要作用，而 EV 有助于促进病毒在细胞之间的感染[1]。2022 年 5 月起，猴痘感染病例相继在美国、英国等国出现，传播到超过 112 个国家。猴痘感染的最初症状为喉咙痛、肌肉酸痛和发热，进而发展至不同阶段，包括皮疹、斑疹、丘疹、水疱和脓疱，严重者会发生各种炎症并死亡；人类感染后死亡率为 3%～6%。MPXV 的广泛传播已对全人类构成重大公共卫生威胁，因而开发有效的抗 MPXV 药物是一项紧迫的任务[2-3]。然而，由于 MPXV 致病性高、潜在的生物安全风险高，病毒在实验操作过程中传播的风险较高，因此需要在具备严格防护措施的生物安全三级实验室（biosafety level 3 laboratory，BLS-3）开展实验研究，防止实验人员感染和病毒的扩散。这很大程度延缓了 MPXV 疫苗及相关治疗药物的研发进度。

假病毒（pseudovirus）的核心基因组和衣壳蛋白或包膜蛋白来源于不同的病毒，是一类在体外组装的工程化重组病毒颗粒。假病毒具有与目标病毒类似的感染能力，可用于病毒表面蛋白与细胞膜表面受体介导的体外感染机制以及控制相关研究[4-5]。假病毒的基因组一般携带可检测的报告基因，如绿色荧光蛋白（green fluoresces protein，GFP）或萤火虫萤光素酶（luciferase），便于定性和定量分析假病毒的感染水平，目前已被广泛用于高生物安全等级病原微生物的研究。例如，抗严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 型（severe acute respiratory syndrome coronavirus 2，SARS-CoV-2）中和抗体的假病毒中和试验（pseudovirus-based neutralization assay，PBNA）[6-7]，均采用人乳头瘤病毒（human papilloma virus，HPV）16 型假病毒研究 L1 抗体的中和机制[8] 此外，对甲型流感病毒[9]、埃博拉病毒[10]、HIV[11] 等的感染控制研究均使用了假病毒。与高致病性的病毒相比，假病毒仅带有目标病毒的部分基因，无法自我复制，在 BLS-2 实验室即可进行相关病毒的研究，具有生物风险低、可操作性强、检测方便和灵敏度高等优点。目前较为常用的假病毒包装系统有慢病毒、鼠白血病病毒（murine leukemia virus，MLV）、水疱型口炎病毒（vesicular stomatitis virus，VSV）等包装系统。其中，慢病毒包装系统的转染效率高、基因导入容量大且稳定，被广泛用于制备包膜型假病毒[12-14]。

病毒表面棘突蛋白（Spike protein，S 蛋白）的作用是严重急性呼吸综合征（severe acute respiratory syndrome，SARS）识别宿主细胞受体，序列具有高度的保守性。S 蛋白可分为识别并结合宿主受体的 S1 结构域和促进病毒包膜和宿主细胞膜融合的 S2 结构域[15]。MPXV 的 A35R 和 M1R 分别是 MPXV EV 和 MV 的表面抗原，且分别是 VACV A33R 和 L1R 的同源基因。这 2 个表面蛋白具有良好的免疫原性，是猴痘疫苗候选抗原和中和抗体药物开发的潜在靶点[16-18]。本研究基于慢病毒包装系统，将 SARS 病毒 S 蛋白 S2 结构域的 DNA 序列分别与 MPXV A35R 和 M1R 蛋白的胞外段 DNA 序列融合，通过分子克隆技术构建了 2 种 pcDNA3.1-MPXV-Ag-SARS-S2 真核表达载体，分别表达融合 S2 结构域的 A35R 和 M1R 2 种假病毒包膜蛋白。然后，将结合慢病毒包装系统的蛋白质粒和携带萤光素酶报告基因的 pCDH-Luc 慢病毒质粒一起在体外包装为具有感染活性的 MPXV 假病毒，使用具有特异性识别 MPXV A35R 或 M1R 的中和抗体对所制备的猴痘假病毒活性进行初步验证。

1 仪器与试药

Celmate 型二氧化碳细胞培养箱（新加坡 ESCO 公司）；Infinite 200 PRO 型酶标仪（瑞士 Tecan 公司）；T100 型热循环仪（美国 Bio-Rad 公司）；EPS-300 型稳压稳流电泳

收稿日期：2025-05-26
作者简介：崔彩霞，硕士研究生，专业方向：微生物与生化药。
通信作者：袁运生，副教授，博士研究生，专业方向：生物技术药物。

仪、VE-180 微型垂直电泳槽、HE-220 型高通量水平电泳槽、Tanon 5200 型全自动化学发光图像分析系统均购于上海天能科技有限公司。

抗 A35R 和抗 M1R 兔多克隆抗体，以及抗 M1R 重组抗体 7D11 均由本实验室制备和保存；快速 PCR 聚合酶（PrimeSTAR® Max DNA Polymerase）、限制性内切酶 *Bam*HⅠ、*Hin*d Ⅲ、*Xho* Ⅰ、T4 DNA 连接酶均购于日本 TaKaRa 公司；快速胶回收试剂盒（FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit，南京诺唯赞生物科技股份有限公司）；PCR 产物纯化试剂盒（苏州优逸兰迪生物科技有限公司）；无内毒素质粒小量提取试剂盒（Endo-free Plasmid Mini Kit Ⅱ，美国 Omega 公司）；5×SDS 上样缓冲液、转染试剂 Lipo8000、放射免疫沉淀法（radio immunoprecipitation assay，RIPA）细胞裂解液、一抗稀释液、含吐温 -20 的 Tris 缓冲盐水（Tris-buffered saline with Tween-20，TBST）、牛血清白蛋白（bovine serum albumin，BSA）均购于上海碧云天生物技术股份有限公司；脱脂奶粉（内蒙古伊利实业集团股份有限公司）；吐温 -20（国药集团化学试剂有限公司）；兔抗 SARS-CoV-2 S2 蛋白多克隆抗体（北京义翘神州科技股份有限公司）；羊抗兔 β 微管蛋白多克隆抗体（美国 Proteintech 公司）；HRP 标记的抗鼠 IgG 抗体（anti-mouse IgG HRP-linked antibody）、HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体（anti-rabbit IgG HRP-linked antibody）均购于美国 Cell Signaling Technology 公司；NcmECL Ultra 化学发光试剂盒、青霉素 / 链霉素（苏州新赛美生物科技有限公司）；慢病毒浓缩试剂盒［吉满生物科技（上海）有限公司］；冻干补体（郑州百基生物工程有限公司）；PBS、DMEM 培养基、FBS 均购于美国 Gibco 公司。

大肠埃希菌感受态细胞 DH5α 由本实验室制备保存；人胚肾细胞（HEK-293T 细胞）和非洲绿猴肾细胞（Vero-E6 细胞）由本实验室保存，均使用 DMEM 培养基（含 10% FBS 和 1% 青霉素 - 链霉素）培养于 37 ℃、5% CO_2 恒温培养箱中。

包装质粒（psPAX2）、携带萤光素酶报告基因的慢病毒载体质粒（pCDH-Luc）、真核表达载体（pcDNA3.1），以及含有 SARS 病毒 S 蛋白（SARS-S）DNA 序列的质粒均为本实验室所保存。MPXV 表面抗原（MPXV surfaceantigen，MPXV-Ag）A35R、M1R 的 DNA 序列由通用生物（安徽）股份有限公司合成。

2　方法与结果

2.1　重组真核表达质粒的构建

pcDNA3.1-MPXV-Ag-SARS-S2 采用两步亚克隆法进行构建。首先，将 S2 的 DNA 序列从含有 SARS-S DNA 序列的载体亚克隆到 pcDNA3.1 载体上，限制性内切酶位点为 *Bam*H Ⅰ与 *Hin*d Ⅲ，获得 pcDNA3.1-SARS-S2 质粒；然后，将编码 MPXV-Ag 胞外段的 DNA 序列克隆到 pcDNA3.1-SARS-S2 载体上，插入限制性内切酶位点为 *Xho* Ⅰ与 *Bam*H Ⅰ，获得表达 MPXV-Ag/S2 融合蛋白的真核表达质粒，通用名命名为 pcDNA3.1-MPXV-Ag-SARS-S2（图 1）。亚克隆的 PCR 引物设计带有相应的酶切位点，具体序列信息如表 1 所示。MPXV-Ag 的 DNA 序

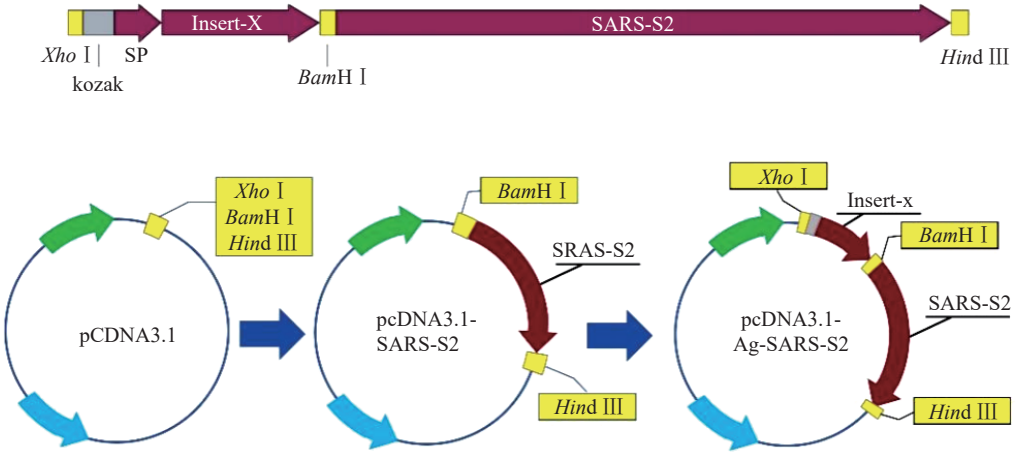


图 1　重组真核表达质粒构建示意图

Fig.1　Schematic Diagram of the Construction of Recombinant Eukaryotic Expression Plasmid

列在合成时，编码成熟抗原蛋白的 DNA 序列前均添加了小鼠 IgG 重链信号肽序列（编码氨基酸序列：MGWSCIILFLVATATGVHS），并在 DNA 的开放阅读框前增加 kozak 序列。通过亚克隆分别获得表达 A35R/S2 和 M1R/S2 融合蛋白的载体，简称为 pA35-S2、pM1-S2。将构建的 2 种质粒分别转化至 DH5α 中，然后挑选单克隆送由铂尚生物技术（上海）有限公司测序，保存测序正确的菌种并制备无内毒素质粒。

表 1　PCR 亚克隆引物

Tab.1　PCR Subcloning Primers

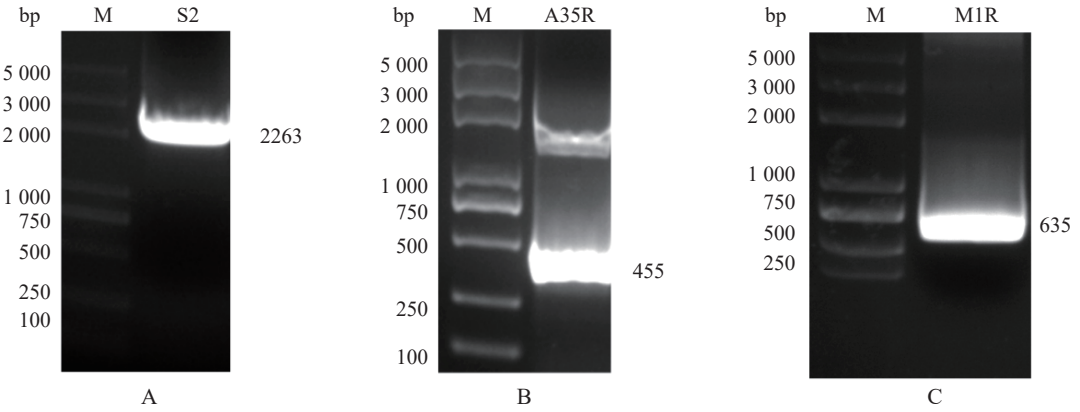
引物名称	引物序列 [1)]
SARS S-F	5'-TGCG*GGATCC*ATGTGCGGACCAAAGC-3'
SARS S-R	5'-TCCC*AAGCTT*TTAGGTGTAGTG-CAGCTTCA-3'
AAME-F	5'-TCCG*CTCGAG*GCCACCATGGG-3'
A35-R	5'-TCGC*GGATCC*GGTGCAGAAGTACTTG-3'
M1-R	5'-TCGC*GGATCC*CTGAACACCTGTACCA-3'

注：[1)] *Bam*H Ⅰ识别序列为 GGATCC；*Hin*d Ⅲ识别序列为 AAGCTT；*Xho* Ⅰ识别序列为 CTCGAG。

SARS-S2 片段编码 S 蛋白的 510 ～ 1 255 位氨基酸序列，加上终止密码子的阅读框长度为 2 241 bp。SARS-S2 PCR 产物的 1％琼脂糖凝胶电泳结果（图 2A）显示，在 2 000 bp 条带附近有特异性 DNA 片段，说明 PCR 产物属于目标产物。A35R 和 M1R 的 DNA 片段理论长度分别为 455 bp 和 635 bp。其 PCR 产物的电泳结果（图 2B、2C）显示，分别在 500 bp 和 700 bp 下方处观察到特异性条带，表明成功获得 A35R 和 M1R 的 DNA 片段。构建完成的 pA35-S2 和 pM1-S2 质粒的 sanger 测序分析显示。序列测定结果与设计相符，未出现任何突变。

2.2　重组抗原融合蛋白的表达与鉴定

取对数生长期的 HEK-293T 细胞，按每孔 4×10^5 个细胞的密度接种到 6 孔细胞培养板内，培养过夜（16 h）。待细胞融合度达到 70％～ 80％时更换新鲜培养基，并按 Lipo8000 试剂说明书配制质粒转染混合液，转染 DNA 总量为每孔 2.5 μg。将混合液均匀滴至 6 孔细胞培养板中，于 37 ℃、5％ CO_2 条件下培养 48 h，去除培养基并用 PBS 洗涤细胞后，每孔加入 RIPA 细胞裂解液 150 μL，于冰上裂解 10 min。细胞裂解液于 4 ℃离心（14 000×*g*）10 min，取上清液，加入 5×SDS 上样缓冲液，混匀后于 95 ℃变性 10 min，取 20 μL 进行免疫印迹分析。样品通过 12％的 SDS-PAGE 电泳分离后，于恒流 400 mA 条件下，转印 30 min，将蛋白转印至聚偏二氟乙烯（polyvinylidenefluoride，PVDF）膜上，用封闭液（5％脱脂奶粉溶于 TBST）室温（20 ℃）封闭



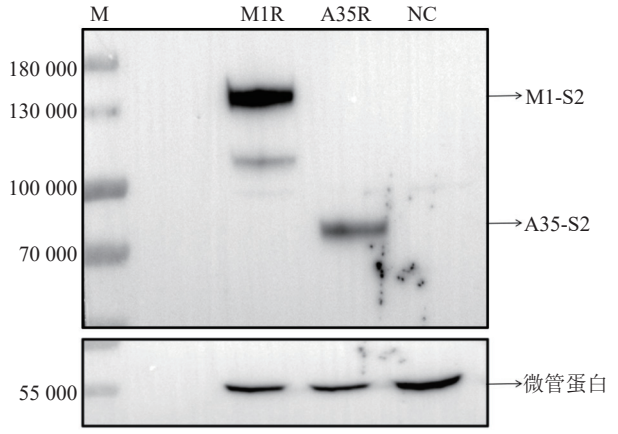
A—SARS-S2 的 PCR 亚克隆结果（M—DL5000 型 DNA Marker；S2—SARS-S2 片段 PCR 亚克隆产物）；B—A35R 的 PCR 扩增结果（M—DL5000 型 DNA Marker；A35R—A35R 片段 PCR 亚克隆物）；C—M1R 的 PCR 扩增结果（M—DL5000 型 DNA Marker；M1R—M1R 片段 PCR 亚克隆产物）。

图 2　重组真核表达质粒构建

Fig.2　Construction of Recombinant Eukaryotic Expression Plasmid

1 h，用 TBST 清洗 3 次，每次 5 min。将膜置于含兔抗 SARS-CoV-2 S2 蛋白多克隆抗体（1 ∶ 3 000 稀释）的一抗杂交液（含 3% BSA 的 TBST）中室温孵育 1 h，TBST 清洗 3 次；或将膜置于含 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体（1 ∶ 10 000 稀释）的封闭液中，室温孵育 40 min，用 TBST 清洗 3 次；随后，按说明书用化学发光试剂进行显影处理，采用化学发光图像分析系统对膜进行发光检测和图像采集。内参采用羊抗兔β微管蛋白多克隆抗体（1 ∶ 2 000稀释），操作与 S2 蛋白一致。

免疫印迹结果（图 3）显示，转染 pA35-S2 质粒的 HEK-293T 细胞总蛋白在 70 000 处有明显的特异性条带，与目的条带理论大小（72 000）相符；转染 pM1-S2 质粒的 HEK-293T 细胞总蛋白在 130 000 处有明显条带，推测是融合蛋白的二聚体形态。上述结果表明，构建的 2 个猴痘抗原融合蛋白表达质粒均能在 HEK-293T 细胞内进行正常表达，可用于假病毒包装研究。



M—蛋白标准品；M1R—转染 pM1-S2 质粒的 HEK-293T 细胞总蛋白；A35R—转染 pA35-S2 质粒的 HEK-293T 细胞总蛋白；NC—转染 pcDNA3.1 空载体的 HEK-293T 细胞总蛋白。

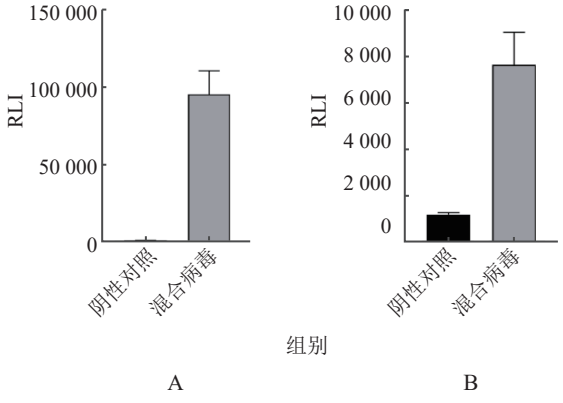
图 3　重组真核表达质粒的鉴定

Fig.3　Identification of the Recombinant Eukaryotic Expression Plasmid

2.3　猴痘假病毒的制备及体外活性检测

将 HEK-293T 细胞以每孔约 4×10^5 个细胞的密度接种到 6 孔细胞培养板内，培养过夜，待细胞融合度达到 70%～80%时，更换新鲜培养基并按 Lipo8000 试剂说明书配制质粒转染混合液，转染 DNA（pA35-S2、pM1-S2、pSPAX2、pCDH-Luc 按质量比 0.5 ∶ 0.5 ∶ 1 ∶ 1 混合所得）总量为每孔 2.4 μg；同时设置阴性对照，转染 DNA（pCDNA3.1 空载体、pSPAX2、pCDH-Luc 按质量比 1 ∶ 1 ∶ 1 混合所得）总量为每孔 2.4 μg。将质粒转染混合液均匀滴加至 HEK-293T 细胞的培养液中，于 37 ℃、5% CO_2 条件培养 48 h，收集细胞上清液，使用慢病毒浓缩试剂盒对慢病毒进行 5 倍浓缩。取 HEK-293T 细胞和 Vero-E6 细胞，按每孔约 1×10^5 个细胞的密度分别接种到 24 孔板中，培养过夜（16 h）后，每孔加入浓缩后的假病毒浓缩液 50 μL，继续培养 48 h 后，使用萤光素酶底物化学发光检测试剂盒检测化学发光强度（relative luminescence intensity，RLI）。

结果（图 4）表明，相较于阴性对照，加入混合病毒的 HEK-293T 和 Vero-E6 细胞均表达了高活性的萤光素酶，表明本法所制备的假病毒对 HEK-293T 和 Vero-E6 细胞均有感染活性。



A—HEK-293T 细胞；B—Vero-E6 细胞。

图 4　假病毒感染宿主细胞后表达的萤光素酶活性（*n*=3）

Fig.4　The Expressed Luciferin Activities of the Host Cells after Infected by Pseudoviruses（*n*=3）

2.4　猴痘假病毒抗原中和抗体的中和能力检测

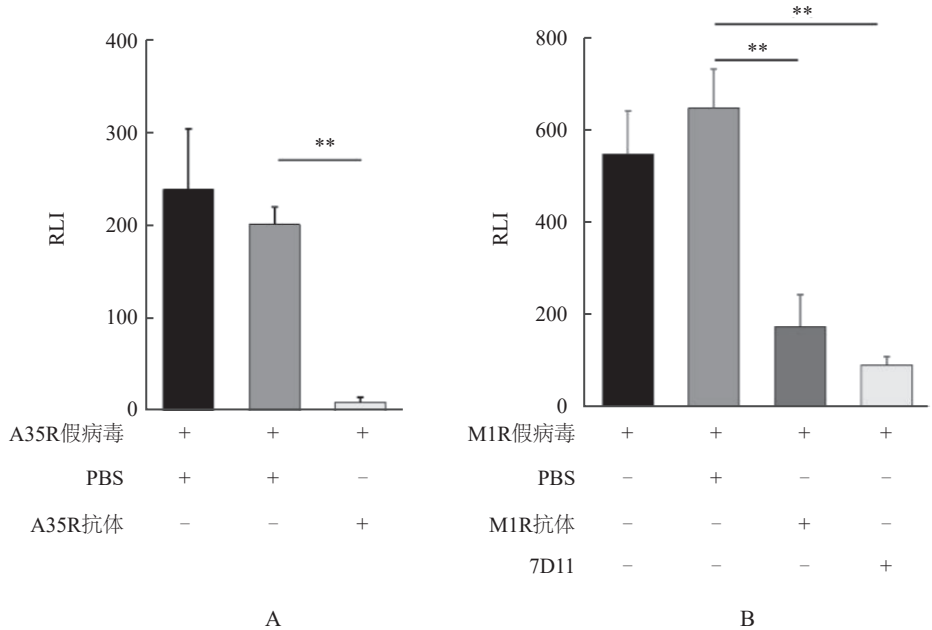
为验证 A35R 和 M1R 假病毒是否可以用于分析相应中和抗体的活性，抗 A35R 兔多克隆抗体、抗 M1R 兔多克隆抗体、抗 M1R 重组抗体 7D11 等

3 种中和抗体被用来作为中和假病毒的待测抗体。按“**2.3**”项下方法制备假病毒浓缩液。先将假病毒和 DMEM 完全培养基（含 10％灭活补体 FBS）按体积比 1 ∶ 2 稀释；各中和抗体用含有 10％补体的 DMEM 稀释至 100 μg/mL，加入等体积的慢病毒混合，在 37 ℃孵育 2 h。取对数生长期的 HEK-293T 细胞，以每 1 mL 含 2×10^5 个细胞的密度接种 100 μL 到 96 孔培养板中，培养过夜（16 h）；去除 96 孔培养板里的细胞培养基，将上述假病毒抗体混合液加入培养板中，并以 PBS 为对照，用量均为每孔 100 μL，37 ℃孵育 1 h；去除病毒抗体混合液，更换为 DMEM 完全培养基，于 37 ℃、5％ CO_2 恒温培养箱继续培养 24 h，按说明书加入萤光素酶底物，采用酶标仪检测萤光素酶活性。

结果（图 5）显示，在加入兔多克隆抗体后，2 种细胞表达萤光素酶的活性均显著降低，表明 A35R 和 M1R 假病毒的感染能力可分别被抗 A35R 兔多克隆抗体或抗 M1R 兔多克隆抗体有效抑制。此外，7D11 也具有较强的假病毒中和能力，与文献[19]报道的 7D11 对 MPXV 和 VACV 都有良好的体外中和活性相一致。由此可见，猴痘假病毒系统可进行 MPXV 中和抗体的中和试验，初步评价中和抗体活性。

3 讨论

本研究基于慢病毒包装技术制备了带有萤光素酶报告基因与包膜上展示 A35R-SARS-S2 或 M1R-SARS-S2 融合蛋白的工程化慢病毒（即假病毒）。众所周知，慢病毒感染的宿主范围严格依赖于包膜蛋白与宿主细胞膜表面受体的相互识别机制。SARS S 蛋白的 S2 结构域含有 2 个七肽重复序列结构，桥连病毒膜与宿主细胞膜，并通过变构促进膜融合，然后将病毒基因组释放入宿主细胞。将 MPXV Ag 与 S2 结构域融合，充分发挥了参与调控 MPXV 表面抗原蛋白与结合宿主的作用以及 S2 结构域调控慢病毒感染宿主细胞的功能。HEK-293T 和 VERO-E6 细胞是 VACV 和 MPXV 体外试验中常用的细胞株。展示 A35R 和 M1R 的猴痘假病毒可有效感染以上两个细胞株，实现了模拟 A35R 或 M1R 介导的 MPXV 感染过程。该猴痘假病毒构建平台可以应用到其他 MPXV 表面抗原特异性假病毒的制备中，也可为其他正痘病毒假病毒的构建提供借鉴。然而，由于 MPXV 表面抗原蛋白数量较多，部分抗原蛋白的功能尚不清楚，仅仅设计、构建、制备 A35R 和 M1R



A—A35R 的兔多克隆抗体中和 A35R 假病毒；B—M1R 的兔多克隆抗体及对照重组抗体 7D11 中和 M1R 假病毒。

图 5 猴痘假病毒体外评价不同中和抗体的活性（*n*=3）

Fig.5 The Neutralizing Activity of Antibodies Assessed *in vitro* Using Monkeypox Pseudovirus (*n*=3)

特异性假病毒的方法与策略仍具有一定的局限性。未来，可进一步探索、优化 MPXV 融合包膜蛋白结构设计、扩展抗原种类以及病毒包装系统优化等，也可以根据需要，改进假病毒的报告基因种类，拓展假病毒的应用范围。

参考文献：

[1] ROBERTS K L, SMITH G L. Vaccinia virus morphogenesis and dissemination [J]. *Trends Microbiol*, 2008, **16**(10): 472-479.

[2] ZHU Z Z, SUN Q, XU Y H, *et al*. Novel drug targets for monkeypox: from viral to host proteins [J]. *Infect Med* (Beijing), 2025, **4**(1): 100165.

[3] MCCOLLUM A M, SHELUS V, HILL A, *et al*. Epidemiology of human mpox-worldwide, 2018-2021 [J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2023, **72**(3): 68-72.

[4] 葛慧敏, 蒋雯玲, 方中岳, 等. 假病毒包装系统发展及新兴应用[J]. 病毒学报, 2024, **40**(3): 631-640.

[5] 朱婉露, 张　军, 肖　鹤. 流感病毒假病毒研究进展[J]. 军事医学, 2024, **48**(11): 869-873.

[6] TAN C J, WANG N, DENG S S, *et al*. The development and application of pseudoviruses: assessment of SARS-CoV-2 pseudoviruses [J]. *PeerJ*, 2023, **11**: e16234.

[7] NIE J H, LI Q Q, WU J J, *et al*. Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for SARS-CoV-2 [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, **9** (1): 680-686.

[8] LI M Y, HUANG J M, ZHU Y, *et al*. Anti-L1 antibody-bound HPV16 pseudovirus is degraded intracellularly via TRIM21/proteasomal pathway [J]. *Virol*, 2022, **19**(1): 90.

[9] QIU C, HUANG Y, ZHANG A L, *et al*. Safe pseudovirus-based assay for neutralization antibodies against influenza A(H7N9) virus [J]. *Emerg Infect Dis*, 2013, **19**(10): 1685-1687.

[10] WANG Y Z, CUI R, LI G M, *et al*. Teicoplanin inhibits Ebola pseudovirus infection in cell culture [J]. *Antiviral Res*, 2016, **125**: 1-7.

[11] NIE J H, HUANG W J, LIU Q, *et al*. HIV-1 pseudoviruses constructed in China regulatory laboratory [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2019, **9**(1): 32-41.

[12] 孟凡荣, 陈　琛, 万海粟, 等. 慢病毒载体及其研究进展[J]. 中国肺癌杂志, 2014, **17**(12): 870-876.

[13] 汤　晗, 聂建云, 李文斌, 等. 慢病毒载体系统的发展及在肿瘤基因治疗中的应用[J]. 现代肿瘤医学, 2017, **25**(10): 1659-1662.

[14] 张雨薇. 狂犬病病毒假病毒的构建及其在中和抗体检测中的应用 [D]. 长春: 长春理工大学硕士学位论文, 2022.

[15] DU L Y, HE Y X, ZHOU Y S, *et al*. The spike protein of SARS-CoV—a target for vaccine and therapeutic development [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2009, **7**(3): 226-236.

[16] XIANG Q, LI L H, WU J, *et al*. Application of pseudovirus system in the development of vaccine, antiviral-drugs, and neutralizing antibodies [J]. *Microbiol Res*, 2022, **258**: 126993.

[17] WARD B M, WEISBERG A S, MOSS B. Mapping and functional analysis of interaction sites within the cytoplasmic domains of the vaccinia virus A33R and A36R envelope proteins [J]. *J Virol*, 2003, **77**(7): 4113-4126.

[18] REN Z N, LI M J, CHEN J Y, *et al*. Identification of mpox M1R and B6R monoclonal and bispecific antibodies that efficiently neutralize authentic mpox virus [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2024, **13**(1): 2401931.

[19] QU Y Y, TAI W B, MA E H, *et al*. Generation and characterization of neutralizing antibodies against M1R and B6R proteins of monkeypox virus [J]. *Nat Commun*, 2025, **16**(1): 3100.