

DOI:10.13350/j.cjpb.230305

• 论著 •

SARS-CoV-2 重组痘苗病毒载体疫苗的构建、筛选、安全性和免疫原性研究*

毛泓月¹, 李一权², 丛佳南³, 杨霞⁴, 李玥², 刘子睿³, 李善智², 修志儒², 李亚茹⁴,
李霄³, 尚超^{3**}, 朱羿龙^{2**}, 金宁一^{1,2,3**}

(1. 西北农林科技大学动物医学院, 陕西杨凌 712100; 2. 长春中医药大学; 3. 中国农业科学院长春兽医研究所; 4. 延边大学)

【摘要】 目的 利用穿梭质粒通过同源重组构建表达 SARS-CoV-2 RBDEPI 蛋白重组痘苗病毒, 并对其筛选、鉴定和免疫原性检测。方法 参照 SARS-CoV-2 全基因组序列设计合成目的基因 RBDEPI, 通过 PCR、测序、酶切连接将目的基因插入到痘苗病毒穿梭载体 pSTKE 中, 构建 pSTKE-RBDEPI。将 pSTKE-RBDEPI 与天坛株痘苗病毒 VTT 共转染鼠肾细胞 BHK-21 中, 通过同源重组, 并以增强型绿色荧光蛋白 EGFP 为筛选标记, 通过多次绿色荧光噬斑筛选获得重组病毒 rVTT Δ TK-RBDEPI。利用 RT-PCR 和 Western blot 检测 rVTT Δ TK-RBDEPI 目的基因的转录和目的蛋白的表达情况; 通过 ELISA 和 ELISPOT 检测 rVTT Δ TK-RBDEPI 免疫小鼠 SARS-CoV-2 与痘苗病毒载体特异性抗体水平 and 特异性淋巴细胞 IL-4 与 IFN- γ 的表达情况, 确定 rVTT Δ TK-RBDEPI 的免疫原性。结果 经过 10 次绿色荧光噬斑筛选、RT-PCR 与 Western blot 鉴定获得 1 株能够表达 SARS-CoV-2 RBDEPI 的重组痘苗病毒 rVTT Δ TK-RBDEPI, 且 rVTT Δ TK-RBDEPI 具备良好的免疫原性。结论 获得能够表达 SARS-CoV-2 RBDEPI 的重组痘苗病毒, 该疫苗具有免疫原性, 为以痘苗病毒为载体的 SARS-CoV-2 疫苗的进一步研究和临床治疗奠定了基础。

【关键词】 SARS-CoV-2 RBDEPI; 重组痘苗病毒; 同源重组; 免疫原性

【中图分类号】 R373.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)03-0271-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Mar;18(3):271-275.]

Construction, screening, safety and immunogenicity of recombinant vaccinia virus vector vaccine against SARS-CoV-2

MAO Hong-yue¹, LI Yi-quan², CONG Jia-nan³, YANG Xia⁴, LI Yue², LIU Zi-rui³, LI Shan-zhi², XIU Zhi-ru², LI Ya-ru⁴, LI Xiao³, SHANG Chao², ZHU Yi-long², JIN Ning-yi^{1,2,3} (1. College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shanxi, China; 2. Changchun University of Chinese Medicine; 3. Changchun Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences; 4. Yanbian University) **

【Abstract】 **Objective** To construct recombinant vaccinia virus expressing sars-cov-2 rbdepi protein, and to screen, identify, and detect its safety and immunogenicity. **Methods** The target gene RBDEPI was designed and synthesized according to SARS-CoV-2, the target gene was inserted into the vaccinia virus shuttle vector pSTKE by PCR, sequencing and enzyme digestion, to construct the recombinant shuttle vector pSTKE RBDEPI. Then, the vector pSTKE RBDEPI was transfected with Tiantan vaccinia virus VTT into BHK-21 cells for homologous recombination, EGFP was used as a screening marker, the recombinant virus was obtained by plaque screening. The recombinant virus was identified by RT-PCR and Western blot, the SARS-CoV-2 and VTT specific antibody, IL-4, and IFN- γ levels were detected by ELISA and ELISPOT, to determine the immunogenicity of rVTT Δ TK-RBDEPI. **Results** The recombinant vaccinia virus rVTT Δ TK-RBDEPI which could express RBDEPI was obtained after 10 times of plaque screening, and rVTT Δ TK-RBDEPI has good immunogenicity. **Conclusion** The recombinant vaccinia virus expressing SARS-CoV-2 RBDEPI was successfully obtained and also has good immunogenicity, this study laid a foundation for further research and clinical treatment of SARS-CoV-2 vaccine with vaccinia virus as vector.

【Key words】 SARS-CoV-2 RBDEPI; recombinant vaccinia virus; homologous recombination; immunogenicity

* **【基金项目】** 2021 年长春市科技发展计划项目创新平台与人才计划青年科技人才创新创业专项 (No. 21QC01); 吉林省教育厅科学技术研究项目 (No. JJKH20220887KJ); 2022 年度吉林省中医药科技项目 (No. 2022133); 2022 年度省科技发展计划项目 (No. 20220508075RC)。

** **【通讯作者】** 金宁一, E-mail: ningyik@126.com; 朱羿龙, E-mail: zhuyilong@ccu.edu.cn; 尚超, E-mail: shangchao1290@126.com

【作者简介】 毛泓月 (1998-), 女, 陕西西安人, 硕士研究生。研究方向: 预防兽医。E-mail: 2448932315@qq.com

2019年爆发的新型冠状病毒肺炎(corona virus disease 2019, COVID-19)是由病原体 SARS-CoV-2 引起的严重急性呼吸综合征^[1], SARS-CoV-2 属于冠状病毒科冠状病毒属中的 β 类型冠状病毒,是一种有包膜的单股正链 RNA 病毒^[2-3],表面有突出的棍棒状突起^[4]。SARS-CoV-2 是第9种记录在案的感染人类的冠状病毒,是过去20年中发现的第7种冠状病毒^[5],也是已知的第3种导致人类严重急性呼吸道综合征的病毒。该病毒已经变异为 Alpha(B. 1. 1. 7), Beta(B. 1. 351), Gamma(P. 1), Epsilon(B. 1. 427), Delta(B. 1. 617. 2)^[6]和 Omicron(B. 1. 1. 529)^[7],这7种变异毒株为新冠疫情的防控带来了全新的挑战。

冠状病毒主要含有4个结构蛋白(棘突糖蛋白S、囊膜蛋白E、膜蛋白M、衣壳蛋白N)和16个非结构蛋白(nsp1-16)。其中以结构蛋白S最为重要,其中包含S1和S2两个亚基,S1亚基内部包含受体结构域RBD(receptor binding domain),可以使血管紧张素转化酶2(ACE2)作为受体细胞与病毒结合^[8]。主要通过呼吸道飞沫、接触、气溶胶和消化道等途径传播。

本实验以 SARS-CoV-2 RBDEPI 为目的基因,将前期构建的痘苗病毒穿梭载体和天坛株痘苗病毒进行同源重组,利用 EGFP 为筛选标记基因进行噬斑筛选,RT-PCR 和 Western blot 检测外源基因的表达,并通过 BABL/C 小鼠验证重组痘苗病毒 rVTT Δ TK-RBDEPI 的免疫原性,为以痘苗病毒为载体的 SARS-CoV-2 疫苗的进一步研究和临床治疗奠定基础。

材料与方 法

1 材 料

1.1 主要试剂 含有 SARS-CoV-2 RBDEPI 基因的质粒由上海生工合成;天坛株痘苗病毒,痘苗病毒穿梭载体 pSTKE 和鼠肾细胞 BHK-21 由本实验室保存。ExTaq 购自日本 TAKARA 公司;FastDigest Sal I 和 FastDigest Kpn I 购自美国 Thermo Scientific 公司;转染试剂 Effectene Transfection Reagent 购自德国 QIAGEN 公司;Mouse IL-4 pre-coated ELOSPOT kit 和 Mouse IFN- γ pre-coated ELOSPOT kit 购自达科为生物技术有限公司;新型冠状病毒 COVID-19 鼠源 IgG 抗体检测试剂盒(酶联免疫法)购自达瑞生物技术股份有限公司;多肽 peptide-1(436-455), peptide-2(446-465), peptide-3(456-475), peptide-4(466-485), peptide-5(476-495), peptide-6(486-508), peptide-7(405-431)和 peptide-8(333-360)由金斯瑞生物技术有限公司合成。

1.2 实验动物 6周龄雌性 BALB/c 小鼠购自北京维通利华公司。

2 方 法

2.1 穿梭质粒的构建 参照合成基因的全序列设计可特异性扩增 RBDEPI 基因引物。上游引物: ggtaccATGCCTAATATTACAAACTTGTGCC (Kpn I);下游引物: gtcgacTTAATTGTCCTGCTACTGGAATGG(Sal I)。PCR 体系: ExTaq DNA Polymerase 1.0 μ L, 10 \times ExTaq Buffer 2.0 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 2.0 μ L, 上下游引物各 1.0 μ L, cDNA 4.0 μ L, ddH₂O 9.0 μ L, 总体积 20.0 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 15 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将 PCR 扩增后的目的基因与载体 pEASY-Blunt Simple 相连接后,通过测序和酶切鉴定,鉴定正确的目的基因插入到痘苗病毒穿梭载体 pSTKE 中,获得重组痘苗病毒穿梭质粒 pSTKE-RBDEPI。

2.2 重组痘苗病毒的构建和筛选 将 BHK-21 细胞以 3×10^5 个/孔接种于 6 孔细胞培养板中,并在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。将天坛株痘苗病毒 VTT 以 0.1 感染复数(multiplicity of infection, MOI)接种于 BHK-21 细胞,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的条件下继续培养 2 h 后,再利用转染试剂 Effectene Transfection Reagent 将 2 μ g 的重组质粒 pSTKE-RBDEPI 转染至 BHK-21 细胞中,继续培养 48 h,在荧光显微镜下观察绿色荧光并拍照记录,收取病变细胞经冻融 3 次,接种于 BHK-21 细胞,48 h 后在荧光显微镜下挑取绿色荧光噬斑;冻融 3 次后接种于 BHK-21 细胞。重复此操作直至所有细胞病变都为绿色荧光病变细胞时,收取绿色荧光病变细胞进行鉴定。

2.3 重组痘苗病毒的 RT-PCR 鉴定 将经过 10 次噬斑筛选后的重组痘苗病毒接种于 BHK-21 细胞中,继续培养 48 h 后收集细胞,使用 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 提取试剂盒提取 RNA,并将其反转录为 cDNA,扩增 RBDEPI 基因。

2.4 重组痘苗病毒的 Western blot 鉴定 将经过 10 次噬斑筛选后的重组痘苗病毒接种于 BHK-21 细胞中,继续培养 48 h 后收集细胞,利用 MinuteTM 总蛋白提取试剂盒提取总蛋白制备总蛋白,Western blot 检测 RBDEPI 的表达情况,其中一抗为本实验制备。

2.5 重组痘苗病毒的免疫原性验证 将 30 只 5 周龄雌性 BABL/c 小鼠随机分成 3 组,即 rVTT Δ TK-RBDEPI 组、VTT 对照组和 PBS 对照组,每组 10 只。将 10^6 PFU 重组痘苗病毒 rVTT Δ TK-RBDEPI 以 100 μ L 经肌肉免疫于 BABL/c 小鼠的两后肢股四头肌位置处,将 VTT 和 PBS 以相同的免疫方式和免疫剂量免疫 BABL/c 小鼠。每组免疫两次,并于初次免疫后 21 d 加强免疫,加强免疫的病毒滴度、剂量、免疫

方式与初次免疫相同。免疫后每周经尾静脉采血并分离血清,利用新型冠状病毒 COVID-19 鼠源 IgG 抗体检测试剂盒检测 SARS-CoV-2 特异性抗体水平;利用 2×10^5 PFU/mL VTT 包被 ELISA 板,检测痘苗病毒载体特异性抗体水平抗体。加强免疫后 2 周取小鼠脾脏分离脾淋巴细胞,利用 ELISPOT 检测试剂盒检测 IL-4 和 IFN- γ 的表达水平,其中刺激物为 8 种多肽的混合肽,混合肽的用量为 5 μ g。

结果

1 目的基因的扩增和重组穿梭质粒的构建

重组痘苗病毒穿梭质粒 pSTKE-RBDEPI 构建示意图如图 1A 所示,利用 PCR 扩增的目的基因条带大小为 1 260 bp,与预期条带大小相符(图 1B)。将目的片段与载体 pEASY-Blunt Simple 连接后进行测序和 Kpn I/Sal I 双酶切验证,特异性酶切结果如图 1C 所示,表明目的基因成功连接入载体。

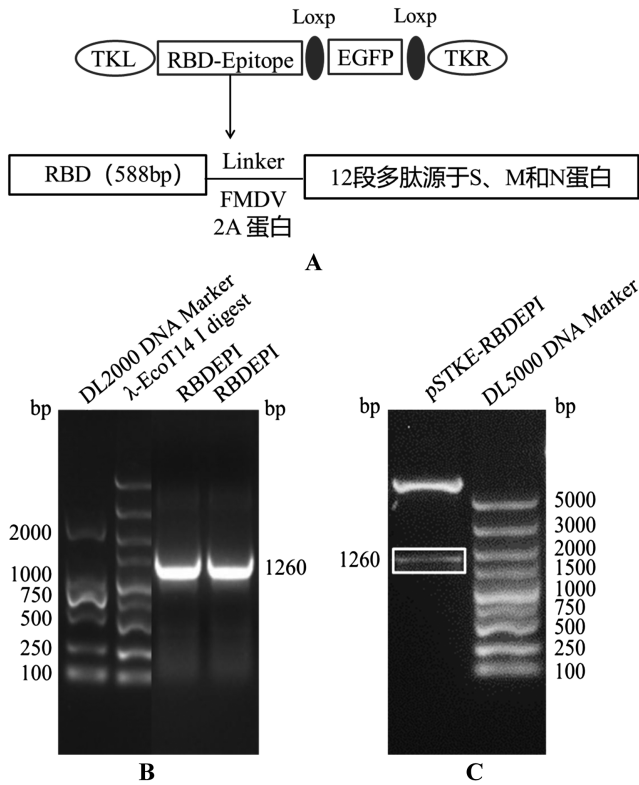


Fig. 1 Structural diagram of plasmid, amplification of target gene and construction of recombinant shuttle plasmid

2 重组痘苗病毒的筛选和纯化

将重组穿梭质粒 pSTKE-RBDEPI 与 VTT 共转染于 BHK-21 细胞中,以 VTT 的 TK 基因为重组臂,

以 EGFP 为筛选标记,通过 10 次噬斑筛选,获得表达 SARS-CoV-2 RBDEPI 蛋白的重组痘苗病毒。噬斑筛选扩增过程如图 2 所示。

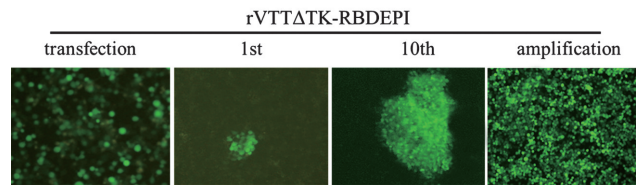


Fig. 2 Screening and purification of recombinant vaccinia virus

3 重组痘苗病毒的 RT-PCR 鉴定

提取重组痘苗病毒 rVTT Δ TK-RBDEPI 感染 BHK-21 细胞的 RNA 进行 RT-PCR 鉴定,结果如图 3,重组痘苗病毒 rVTT Δ TK-RBDEPI 能够成功转录。

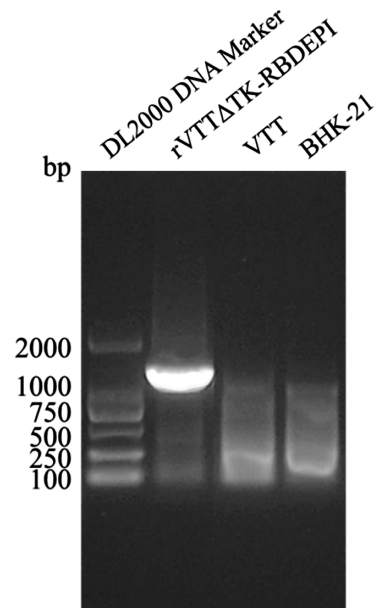


Fig. 3 Identification of recombinant vaccinia virus by RT-PCR

4 重组痘苗病毒的 Western blot 鉴定

提取重组痘苗病毒 rVTT Δ TK-RBDEPI 感染 BHK-21 细胞的总蛋白进行 Western blot 鉴定,结果如图 4,重组痘苗病毒 rVTT Δ TK-RBDEPI 转录表达的外源蛋白能被相应抗体识别,即具有反应原性。

5 重组痘苗病毒免疫原性检测

SARS-CoV-2 特异性抗体检测结果如图 5A 所示,rVTT Δ TK-RBDEPI 组小鼠的 SARS-CoV-2 特异性抗体水平在免疫后逐渐升高,并在免疫后 2 周达到峰值,然后开始下降,初次免疫中 rVTT Δ TK-RBDEPI 组的 SARS-CoV-2 特异性抗体水平与 VTT 组和 PBS 组相比均无显著差别,加强免疫后 2 周的 SARS-CoV-2 特异性抗体水平显著高于 VTT 组和

PBS组($P < 0.05$)。痘苗病毒载体特异性抗体检测如图5B所示,rVTT Δ TK-RBDEPI组与VTT组的痘苗病毒载体特异性抗体水平在初次免疫后显著性高于PBS组($P < 0.01$),加强免疫后2周的rVTT Δ TK-RBDEPI组与VTT组的痘苗病毒载体特异性抗体水平再次升高。IL-4和IFN- γ 的ELISPOT检测结果如图5C,rVTT Δ TK-RBDEPI组IL-4和IFN- γ 的斑点数显著性多于VTT组和PBS组,即rVTT Δ TK-RBDEPI组IL-4和IFN- γ 的表达水平均显著性高于VTT组和PBS组($P < 0.01$)。表明rVTT Δ TK-RBDEPI具备良好的免疫原性。

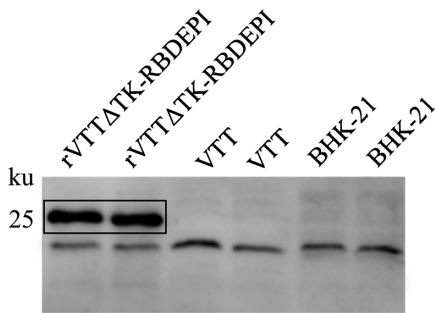
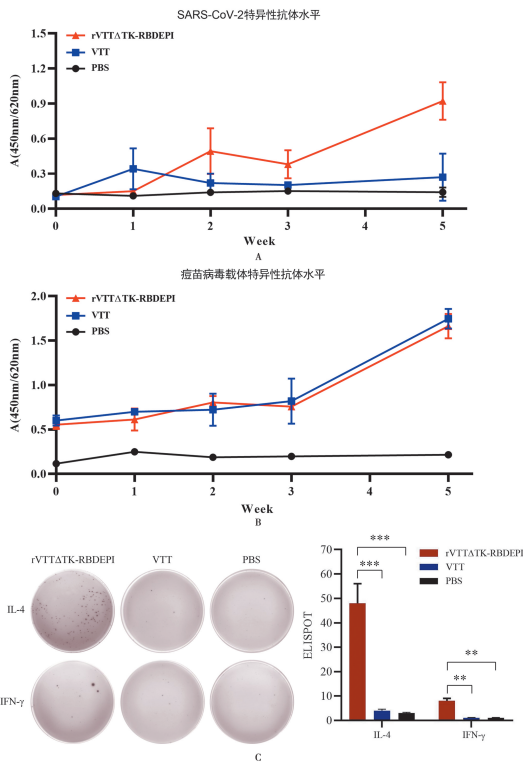


图4 重组痘苗病毒的 Western blot 鉴定

Fig.4 Identification of recombinant vaccinia virus by Western blot



A SARS-CoV-2 特异性抗体水平 B 痘苗病毒载体特异性抗体水平 C ELISPOT 检测

图5 重组痘苗病毒免疫原性检测

A Specific antibody level of SARS-CoV-2 B Specific antibody level of vaccinia virus vector C Detection Result of ELISPOT

Fig.5 Immunogenicity test of recombinant vaccinia virus

讨论

SARS-CoV-2 是一种新型冠状病毒,传播迅速、临床症状严重。近期,多种变异株和无症状感染者的出现为疫情的防控和疾病的防治带来了更大的挑战^[9-10]。新冠肺炎爆发不久后,SARS-CoV-2 的全基因组即被准确测序,针对治疗此病的药物和疫苗都在大量投入研究和生产。目前临床上还没有真正意义上药物和疫苗能够完全预防 SARS-CoV-2 感染。SARS-CoV-2 依赖于 S 蛋白,尤其是受体结合结构域(RBD)结合人细胞受体血管紧张素-转化酶 2(ACE2)来介导病毒入侵,因此靶向 RBD 有望实现预防 SARS-CoV-2 的感染^[11-12]。因此,大部分的 SARS-CoV 疫苗主要是针对 S 蛋白或 RBD 蛋白进行设计,并多用以应对该病毒的新型突变株^[13-15]。

随着生物学技术的发展,以痘病毒为载体表达外源基因的技术不断被完善,痘苗病毒不仅克服了传统的插入外源 DNA 片段较短的限制,并且病毒的增殖和复制也不会受到显著影响^[16]。由于痘苗病毒的核酸序列较长,设计合成重组臂,利用穿梭质粒通过同源重组,构建重组病毒是较为常用的方法之一。常用作载体表达的痘苗病毒毒株有 WR 株^[17]、天坛株^[18]、Wyeth 株^[19]、Copenhagen 株^[20]和 NYCBH 株^[21]等。其中天坛株痘苗病毒作为我国天花病毒疫苗株具有相对毒力较弱,安全性较高等特点,常用作载体来表达外源蛋白。痘苗病毒是一种双链 DNA 病毒,属于痘病毒科正痘病毒属,正痘病毒属还包括天花病毒、牛痘病毒以及近期引起欧美猴痘疫情的猴痘病毒^[22]。本研究 rVTT Δ TK-RBDEPI 不仅能够诱导 BALB/c 小鼠产生高水平 SARS-CoV-2 特异性抗体,而且能够诱导产生高水平痘苗病毒载体特异性抗体。研究表明天花疫苗对猴痘病毒的保护率约为 85%^[23-24],因此 rVTT Δ TK-RBDEPI 具备成为同时预防 SARS-CoV-2 和猴痘病毒感染的二联苗潜力。

本研究选取 SARS-CoV-2 的 S 蛋白中受体结合结构域 RBD 蛋白以及 S 蛋白、N 蛋白和 M 蛋白中的 12 段多肽构成的混合肽 EPI 作为抗原,并以口蹄疫病毒 2A 蛋白作为 Linker 将 RBD 蛋白与 EPI 混合肽连接构成 RBDEPI。口蹄疫病毒 2A 蛋白约 18 个氨基酸残基,具有自我剪切活性^[25-26]。因此可以使得 RBD 与 EPI 分别刺激机体产生特异性免疫反应。在 ELISPOT 检测结果中,IL-4 的表达水平显著性高于 IFN- γ ,推测重组痘苗病毒 rVTT Δ TK-RBDEPI 以刺激体液免疫为主。在后续研究中,将通过 Cre/Loxp 系统敲除 rVTT Δ TK-RBDEPI 中 EGFP 标记基因,分析 rVTT Δ TK-RBDEPI 的体内分布和体内残留等一系列实验来评价其安全性。制定最适免疫策略,通过测定抗体效价以及中和抗体滴度来进一步评价其免

疫原性,为以痘苗病毒为载体的 SARS-CoV-2 疫苗的进一步研究和临床治疗奠定基础。

【参考文献】

- [1] Xiang R, Yu Z, Wang Y, et al. Recent advances in developing small-molecule inhibitors against SARS-CoV-2 [J]. *Acta pharmaceutica Sinica B*, 2022, 12(4): 1591-1623.
- [2] Kim JM, Chung YS, Jo HJ, et al. Identification of coronavirus isolated from a patient in Korea with COVID-19 [J]. *Osong Public Health Res Perspect*, 2020, 11(1): 3-7.
- [3] Morse JS, Lalonde T, Xu S, et al. Learning from the past: possible urgent prevention and treatment options for severe acute respiratory infections caused by 2019-nCoV [J]. *ChemBiochem*, 2020, 21(5): 730-738.
- [4] 杨田田, 薛松, 秦蒙. 基于新型冠状病毒结构蛋白的诊疗技术的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2020, 35(5): 1015-1023.
- [5] Lednicky JA, Tagliamonte MS, White SK, et al. Emergence of porcine delta-coronavirus pathogenic infections among children in Haiti through independent zoonoses and convergent evolution [J]. *medRxiv*, 2021. 03. 19. 21253391.
- [6] Collier DA, De Marco A, Ferreira I, et al. Sensitivity of SARS-CoV-2 B. 1. 1. 7 to mRNA vaccine-elicited antibodies [J]. *Nature*, 2021, 593(7857): 136-141.
- [7] Ma C, Chen X, Mei F, et al. Drastic decline in sera neutralization against SARS-CoV-2 Omicron variant in Wuhan COVID-19 convalescents [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2022, 11(1): 567-572.
- [8] Barbosa LC, Goncalves TL, de Araujo LP, et al. Endothelial cells and SARS-CoV-2: an intimate relationship [J]. *Vascul Pharmacol*, 2021(137): 106829.
- [9] Song Y, Ge Z, Cui S, et al. COVID-19 cases from the first local outbreak of the SARS-CoV-2 B. 1. 1. 7 variant in china may present more serious clinical features: a prospective, comparative cohort study [J]. *Microbiol Spectr*, 2021, 9(1): e0027321.
- [10] 赵天明, 玄坤, 刘海霞, 等. 新型冠状病毒肺炎概述 [J]. *安徽预防医学杂志*, 2020, 26(01): 38-41.
- [11] Cheng YL, Chao CH, Lai YC, et al. Antibodies against the SARS-CoV-2 S1-RBD cross-react with dengue virus and hinder dengue pathogenesis [J]. *Front Immunol*, 2022(13): 941923.
- [12] Blanco OR, Dorta D, Hernandez CA, et al. Murine monoclonal antibodies against RBD of the SARS-CoV-2 spike protein as useful analytical tools for subunit vaccine development and clinical trials [J]. *J Immunol Methods*, 2022(500): 113195.
- [13] Lin WS, Chen IC, Chen HC, et al. Glycan masking of epitopes in the NTD and RBD of the spike protein elicits broadly neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 variants [J]. *Front Immunol*, 2021(12): 795741.
- [14] Lippi G, Adeli K, Plebani M. Commercial immunoassays for detection of anti-SARS-CoV-2 spike and RBD antibodies: urgent call for validation against new and highly mutated variants [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2021, 10. 1515/cclm-2021-1287.
- [15] Deshpande A, Harris BD, Martinez-Sobrido L, et al. Epitope classification and RBD binding properties of neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 variants of concern [J]. *Front Immunol*, 2021(12): 691715.
- [16] Merchlynsky M, Moss B. Introduction of foreign DNA into the vaccinia virus genome by in vitro ligation: recombination-independent selectable cloning vectors [J]. *Virology*, 1992, 190(1): 522-526.
- [17] Basilico C, Joklik WK. Studies on a temperature-sensitive mutant of vaccinia virus strain WR [J]. *Virology*, 1968, 36(4): 668-677.
- [18] Zhang Q, Tian M, Feng Y, et al. Genomic sequence and virulence of clonal isolates of vaccinia virus Tiantan, the Chinese smallpox vaccine strain [J]. *PLoS one*, 2013, 8(4): e60557.
- [19] Kim CJ, Cormier J, Roden M, et al. Use of recombinant poxviruses to stimulate anti-melanoma T cell reactivity [J]. *Ann Surg Oncol*, 1998, 5(1): 64-76.
- [20] Delaunay T, Nader J, Grard M, et al. High oncolytic activity of a double-deleted vaccinia virus copenhagen strain against malignant pleural mesothelioma [J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2020, 18: 573-578.
- [21] Denzler KL, Babas T, Rippeon A, et al. Attenuated NYCBH vaccinia virus deleted for the E3L gene confers partial protection against lethal monkeypox virus disease in cynomolgus macaques [J]. *Vaccine*, 2011, 29(52): 9684-9690.
- [22] Ma Y, Chen M, Bao Y, et al. MPoxVR: A comprehensive genomic resource for monkeypox virus variant surveillance [J]. *Innovation*, 2022, 3(5): 100296.
- [23] Gilchuk I, Gilchuk P, Sapparapu G, et al. Cross-Neutralizing and Protective Human Antibody Specificities to Poxvirus Infections [J]. *Cell*, 2016, 167(3): 684-694.
- [24] Petersen E, Kantele A, Koopmans M, et al. Human monkeypox: epidemiologic and clinical characteristics, diagnosis, and prevention [J]. *Infect Dis Clin North Am*, 2019, 33(4): 1027-1043.
- [25] Donnelly MLL, Hughes LE, Luke G, et al. The 'cleavage' activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring '2A-like' sequences [J]. *J Gen Virol*, 2001, 82(Pt 5): 1027-1041.
- [26] Donnelly MLL, Luke G, Mehrotra A, et al. Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein 'cleavage' mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal 'skip' [J]. *J Gen Virol*, 2001, 82(Pt 5): 1013-1025.

【收稿日期】 2022-09-08 【修回日期】 2022-11-20