



携带 TAP 标签的重组甲型流感病毒的构建与鉴定

谭琳¹, 张文钰¹, 潘明磊¹, 张磊², 曹萌萌^{1*}, 邓涛^{1,2*}

1 北京协和医学院病原生物学研究所, 北京 102600

2 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

谭琳, 张文钰, 潘明磊, 张磊, 曹萌萌, 邓涛. 携带 TAP 标签的重组甲型流感病毒的构建与鉴定[J]. 微生物学报, 2023, 63(2): 601-609.

TAN Lin, ZHANG Wenyu, PAN Minglei, ZHANG Lei, CAO Mengmeng, DENG Tao. Construction and identification of recombinant influenza A virus carrying TAP-tag[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(2): 601-609.

摘要:【目的】将 TAP 标签构建到 WSN 病毒基因组上, 得到含有 TAP 标签的重组流感病毒, 以便进行后续的病毒追踪。【方法】利用反向遗传学技术, 对甲型流感病毒 A/WSN/33 (H1N1) 的 PA 片段进行改造来插入 TAP (tandem affinity purification) 标签序列。通过病毒拯救得到表达外源标签 TAP 的重组流感病毒 WSN PA-TAP, 并对拯救出的重组病毒进行生物学鉴定。【结果】成功拯救出重组流感病毒并命名为 WSN PA-TAP。重组病毒基因组测序表明重组病毒的序列正确, 利用 RNA 银染技术观察到重组病毒的全基因组片段。重组流感病毒 WSN PA-TAP 在 MDCK 细胞上测定生长曲线, 发现该重组病毒的复制能力比野生型 WSN 弱; Western blotting 检测到 PA-TAP 融合蛋白的表达, 其分子质量为 96 kDa。【结论】成功拯救出能够表达外源标签 TAP 的重组流感病毒 WSN PA-TAP, 为筛选与甲型流感病毒聚合酶有关的宿主蛋白的研究提供了新思路, 同时也为以甲型流感病毒为载体携带外源基因的探索提供了重要依据。

关键词: 甲型流感病毒; 串联亲和纯化; 反向遗传学

资助项目: 国家自然科学基金(81871669)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81871669).

*Corresponding authors. E-mail: CAO Mengmeng, caomengm@163.com; DENG Tao, dengt@im.ac.cn

Received: 2022-05-18; Accepted: 2022-07-28; Published online: 2022-08-31

Construction and identification of recombinant influenza A virus carrying TAP-tag

TAN Lin¹, ZHANG Wenyu¹, PAN Minglei¹, ZHANG Lei², CAO Mengmeng^{1*}, DENG Tao^{1,2*}

1 Institute of Pathogen Biology, Peking Union Medical College, Beijing 102600, China

2 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: **[Objective]** To rescue the recombinant influenza A/WSN/33 (H1N1) virus expressing the tandem affinity purification TAP-tag. **[Methods]** The PA sequence of influenza A/WSN/33 (H1N1) virus was modified and then inserted into the TAP sequence to construct a recombinant plasmid pHW-PA-TAP-WSN. The recombinant influenza virus WSN PA-TAP expressing exogenous TAP-tag was rescued by reverse genetics and then identified by plaque assay, RNA silver staining, etc. **[Results]** The recombinant influenza viruses WSN PA-TAP were successfully rescued. The sequencing results showed that the sequence of the recombinant virus genome was correct, and the eight fragments of the rescued virus were observed by RNA silver staining. The growth curve of WSN PA-TAP was established with MDCK cells. The recombinant WSN PA-TAP had weaker replication ability than the wild-type WSN. Western blotting showed that the PA-TAP fusion protein had a molecular weight of 96 kDa. **[Conclusion]** The recombinant influenza virus WSN PA-TAP capable of expressing the exogenous TAP-tag was successfully rescued, which provided a new method for the screening of host proteins related to influenza A virus polymerase. Furthermore, the recombinant influenza virus provides a basis for the exploration of influenza A virus carrying foreign genes. **Keywords:** influenza A virus; tandem affinity purification; reverse genetics

流感病毒属于正粘病毒科，主要分为 4 型 (A、B、C 和 D)^[1]。其中，甲型流感病毒(influenza A virus, IAV)和乙型流感病毒(influenza B virus, IBV)是引起季节性流感的主要原因。作为一种能引起全球性健康问题的病原体，流感病毒对全世界人类的生命财产安全造成了严重威胁。在过去的 100 年中，全球总共暴发了 4 次世界性流感大流行，其中只 1918 年流感就造成了超过 5 000 万人的死亡^[2]。目前，疫苗接种是预防和控制流感病毒传染最有效的方法^[3]。但由于流感病毒的抗原变异迅速，通常每年的流行季节都需要重新制备抗流感病毒疫苗。

甲型流感病毒的基因组由八条单股负链 RNA 组成，其基因组至少编码 17 种病毒蛋白^[4]。每条病毒 RNA (vRNA)片段都与多个寡聚核蛋白(NP)及病毒编码的 RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)共同形成病毒核糖核蛋白复合物(vRNP)。甲型流感病毒入侵细胞后，vRNP 会从病毒颗粒中释放并转运至细胞核，在细胞核中完成 vRNA 的转录和复制^[5]。甲型流感病毒基因组的转录和复制主要依赖于病毒编码的 RdRp 活性，RdRp 是一个异源三聚复合体，由聚合酶碱性蛋白 1 (PB1)、聚合酶碱性蛋白 2 (PB2)

和聚合酶酸性蛋白(PA)组成, 3个亚基的正确组装对于 RdRp 的活性至关重要^[6]。作为 RdRp 中最小的亚基, PA 亚基的 N 端结构域与 II 型限制性内切核酸酶的结构域相似^[7], 在病毒 mRNA 转录时的夺帽过程中发挥着重要作用。PA 亚基的 C 端结构域主要与 PB1 发生相互作用以形成 RdRp 的核心结构^[8], 且 PA 亚基先前已被证明其 C 末端可以耐受其他序列的融入而不破坏聚合酶功能^[9]。

串联亲和纯化(tandem affinity purification, TAP)是一种将 2 种亲和标签顺式串联以纯化蛋白质的方法。TAP 标签是由 2 个不同序列的标签构成, 并由烟草蚀纹病毒(tobacco etch virus, TEV)切割位点隔开, 其靠近 N 端的标签为钙调蛋白结合肽(CBP), 远端标签则是由金黄色葡萄球菌蛋白 A 的 IgG 结合部分组成(protein A)^[10]。TAP 纯化可以得到大量含有靶蛋白的复合物, 且蛋白表达及与复合物的结合都接近生理水平, 是一种检测体内蛋白相互作用的方法。研究中 TAP 纯化通常与质谱法(mass spectrometry, MS)结合使用, 可以高效、准确地纯化蛋白质复合物以供质谱分析鉴定。TAP-MS 联用分析方法在研究甲型流感病毒与宿主因子之间的互作机制发挥了重要的作用, 先前已有报道利用单个病毒蛋白筛选发现参与甲型流感病毒生命周期的细胞蛋白, 我们希望能够建立一种新的方法, 在接近于自然状态下病毒感染细胞的背景以 TAP-MS 技术来鉴别甲型流感病毒转录/复制机制的相互作用组。

流感病毒的反向遗传学是分析病毒在体内和体外生物学特征的重要工具^[11]。在本研究中, 我们首次尝试在甲型流感病毒的 PA 基因片段 C 末端插入长标签 TAP, 并使用反向遗传学技术成功拯救重组流感病毒 WSN PA-TAP, 确定

了该重组病毒的生长曲线等生物学特征。利用该重组病毒可以在细胞感染的背景下有效地研究病毒与宿主之间的相互作用, 且该构建策略可为甲型流感病毒作为承载外源基因片段的病毒载体提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 细胞和病毒

人肾上皮细胞系 HEK293T 和犬肾细胞系 MDCK 均购自美国模式培养物保藏中心(ATCC), 并在恒温 37 °C 并含有 5% CO₂ 的培养箱中培养, 细胞使用的培养基均为含有 10% 胎牛血清(Hyclone)和 1% 双抗(100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素, P/S, Gibco)的 DMEM (Gibco) 基本培养基。甲型流感病毒株为 Influenza A/WSN/33 (H1N1)。

1.2 质粒和抗体

甲型流感病毒 A/WSN/33 (H1N1) 反向遗传学系统(pHW2000-WSN-PB2、-PB1、-PA、-HA、-NP、-NA、-M 和-NS)的 8 种质粒在之前已有描述^[12]。编码 PB1、PB2、NP 蛋白以及 PA-TAP 标签蛋白的 pcDNA 质粒源自甲型流感病毒 Influenza A/WSN/33 (H1N1)。

小鼠抗流感 NP 抗体(MAB8251)买自 Millipore (Temecula 公司), 鼠抗 actin 抗体买自 Sigma-Aldrich (A1978), 兔抗 TAP (sc-25768) 抗体来自 Santa Cruz Biotechnology (SantaCruz 公司), 兔抗 PB1 抗体、兔抗 PB2 和兔抗 PA 抗体买自 Abmart 公司(中国上海)。

1.3 重组质粒的构建

1.3.1 目的基因片段的扩增

以本实验保存的 pcDNA3.1-PA-TAP 质粒为模板, 用引物 PA-TAP-F/PA-TAP-R (表 1) PCR 扩增目的基因片段, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后胶回收纯化。

表 1 本研究中使用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
PA-TAP-F	gtagaactaaggaggg
PA-TAP-R	cttcatatagcccccaatcaggtgacttccccgc
PA-Vector-F	ttgggggctatatgaag
PA-Vector-R	ccctcctagtctac

其中, 聚合酶链反应试剂(PCR) Q5 High-Fidelity PCR Master Mix 购自 NEB。胶回收试剂盒: AxyPrep DNA Gel Extraction Kit 购自 Axygen。

1.3.2 线性化载体的扩增

以甲型流感病毒 Influenza A/WSN/33 (H1N1) 8 质粒反向遗传学拯救系统中的 pHW-WSN-PA 质粒为模板, 用引物 PA-Vector-F/PA-Vector-R (表 1) PCR 扩增载体片段, 经 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定后胶回收纯化。扩增纯化的目的基因片段和线性化的载体按照无缝连接试剂盒说明书(Trelief™ SoSoo Cloning Kit Ver.2)进行连接。连接结束按照说明书取重组产物转化 DH5 α 感受态细胞, 利用载体携带的氨苄青霉素抗性进行筛选, 对连接成功的单克隆菌落进行扩增、纯化, 委托北京擎科生物科技有限公司进行测序鉴定。

1.4 重组质粒的蛋白表达鉴定

HKE293T 细胞铺于 6 孔板, 每孔 1.2×10^6 个细胞, 2 mL 培养基。次日转染前, 将普通细胞培养液换成 Opti-MEM, 各取 1 μ g 的 pHW-WSN-PA、构建的 pHW-WSN-PA-TAP 以及空载 pHW2000 质粒分别配比 1.5 μ L Invitrogen Lipofectamine 2000 (Thermo, 11668019), 按照 Lipofectamine 2000 说明书进行转染, 4–6 h 后, 将 6 孔板的 Opti-MEM 换成加 10% FBS、1% 双抗(P/S)的普通细胞培养基 DMEM, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱中, 24 h 后, 收集细胞, 吸弃培养基, 每孔加入 1 mL PBS 洗 2 遍, 将细胞沉淀在 100 μ L 裂解缓冲液 CytoBuster (Merck

Biosciences 公司)中, 冰上裂解 30 min。加入含有 β -巯基乙醇的 Loading buffer 并将样品煮沸 10 min, 使用 8% SDS-PAGE 胶分离蛋白质, 使用抗 PA 抗体、单克隆抗 PB2 抗体和单克隆抗 actin 抗体来观察 PA-TAP 融合蛋白表达情况。

1.5 免疫印记实验

收集的细胞样品进行 Western blotting 验证。使用 CytoBuster (Merck Biosciences)裂解细胞 30 min, 并于 12 000 r/min 条件下离心 30 min 以去除细胞碎片。通过 8% SDS-PAGE 分离获得的蛋白质样品, 并转印至硝酸纤维素膜(NC)。使用指示抗体和 IRDye 二级抗体进行免疫印迹 (LI-COR Biosciences)。其中电泳条件 80 V、120 min, 转印条件为 80 V、90 min, 用 5%脱脂牛奶封闭 1–2 h。使用奥德赛红外成像系统 (LI-COR Biosciences)测定蛋白质表达水平。使用 Odyssey 系统软件分析相对蛋白表达水平。

1.6 重组流感病毒的拯救

于 6 孔板中铺 293T 和 MDCK 混合细胞, 次日进行转染, 使用 PB2、PB1、PA (或构建的 PA-TAP 病毒质粒)、HA、NP、NA、M、NS 拯救质粒各 0.5 μ g 混合并按照 Lipofectamine 2000 脂质体转染说明书进行转染, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养箱内培养 6 h 后, 吸弃含脂质体的培养基并更换为含有 1%双抗(P/S)和 0.2 μ g/mL TPCK-E 的 Opti-MEM 培养液继续培养 48 h, 培养结束后观察 MDCK 细胞病变并收细胞上清, 保存于 -80 $^{\circ}$ C, 得到的 P₀ 病毒以 MOI=0.001 感染 MDCK 进行扩毒直至 P₁ 代, 并通过流感病毒的噬斑测定确定病毒滴度。

1.6.1 流感病毒的噬斑测定

MDCK 细胞以每孔 2×10^5 个细胞接种于 12 孔板中。次日, 细胞在无血清培养基中用 10 倍稀释系列的病毒感染, 每个稀释倍数的体积为 300 μ L, 在室温孵育 1 h 后除去接种稀释的病毒

液, PBS 清洗 2 遍细胞, 每孔加入 1.5 mL 含有 1% 双抗(P/S)和 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TPCK-E 且浓度为 1% 的低熔点琼脂培养基(Amresco), 室温放置 1 h, 待琼脂完全凝固后, 倒置放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养, 48–72 h 后观察结果。每孔加入 1 mL 固定液(4% 甲醛), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育, 之后每孔加入 0.5 mL 染色液(25% 甲醇+0.5% 结晶紫)进行染色。

1.6.2 重组流感病毒 WSN PA-TAP 的生长曲线测定

MDCK 细胞(3.5 cm 培养皿中每皿接种 6×10^5 个细胞)用 MOI 为 0.001 的野生型 WSN 病毒或 WSN PA-TAP 病毒进行感染, 每皿接种总体积为 600 μL 的病毒稀释液, 室温孵育 1 h 后, 吸弃上清并更换为 2 mL 含有 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TPCK-E (Sigma-Aldrich)的无血清培养基, 分别在感染后 0、12、24、36 及 48 h 收集上清并进行噬斑测定。

1.6.3 重组流感病毒 WSN PA-TAP RNA 提取及 vRNA 银染实验

取一支 WSN PA-TAP P₁ 代病毒冻存原液, 室温溶解后, 取 250 μL , 按照 Trizol LS (Sigma-Aldrich)说明书提取病毒基因组 RNA, 定量后进行 RNA 的聚丙烯酰胺凝胶电泳验证。取 WSN 和 WSN PA-TAP RNA 各 500 ng, 用聚丙烯酰胺凝胶(2.8%)进行分离, 分离结束后对其进行银染显色, 银染试剂盒(SilverQuest™ Silver Staining Kit)购自 Thermo Fisher。

1.6.4 利用 Western blotting 检测重组流感病毒 WSN-PA-TAP 的标签蛋白

HEK293T 细胞以每孔 1.2×10^6 个细胞接种于 6 孔板, 次日用 WSN PA-TAP 病毒或野生型 WSN 病毒以 MOI=1 感染 24 h, 并将未染色的 293T 细胞作为阴性对照。24 h 后, 吸弃细胞上清, 每孔加入 1 mL PBS 洗 2 遍, 收集细胞并用于 Western blotting 检测 PA-TAP 融合蛋白的表达, 使用相关抗体见材料及方法 1.2 和 1.5。

1.7 统计

图表用 GraphPad Prism8 (GraphPad Software) 软件制作, 统计学分析 GraphPad Prism8 软件进行。

2 结果与分析

2.1 重组克隆 pHW-WSN-PA-TAP 质粒的构建及蛋白表达

以 pHW2000 为载体, 利用 pHW2000-WSN-PA 和 pcDNA3.1-PA-TAP 质粒构建了 pHW-WSN-PA-TAP 重组质粒。通过 PCR、无缝克隆连接等技术, 在 PA-TAP 的终止密码子和 5' NCR 序列之间插入 PA 基因编码区 3' 末端 104 nt 的重复序列, 使得 PA-TAP vRNA 的 5' 末端的 162 nt 与野生型(WT) PA vRNA 5' 末端相同以保证 PA 片段 5' 末端的包装信号不被破坏, 最终获得了重组克隆质粒 pHW-WSN-PA-TAP (图 1), 经测序证明重组质粒序列正确。

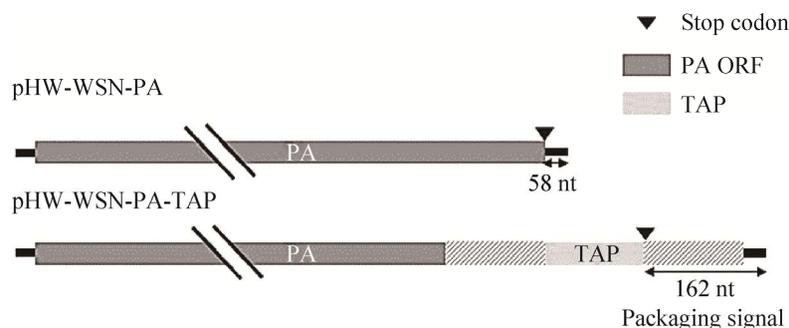


图 1 重组克隆质粒 pHW-WSN-PA-TAP 质粒示意图

Figure 1 Construction strategy of recombinant cloning of pHW-WSN-PA-TAP.

对构建的重组质粒 pHW-WSN-PA-TAP 进行蛋白表达验证, 结果显示 PA-TAP 成功表达, 蛋白大小约 96 kDa, 无标签的 PA 蛋白约 82 kDa, 实验结果(图 2)与预期一致。

2.2 WSN PA-TAP 重组病毒的拯救以及 PA-TAP 标签蛋白的验证

利用甲型流感病毒的八质粒拯救系统拯救

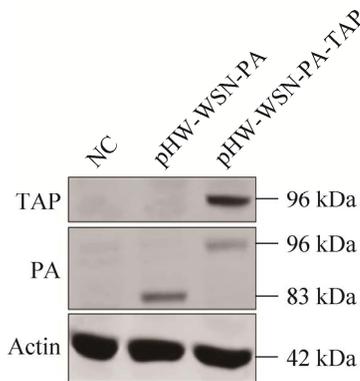


图 2 pHW-WSN-PA-TAP 蛋白表达情况
Figure 2 Schematic diagram of pHW-WSN-PA-TAP and its protein expression.

WSN 和 WSN PA-TAP 重组病毒^[12]。将拯救质粒混合后分别转染 293T 和 MDCK 混合细胞进行病毒拯救, 48 h 后, 发现两种病毒 WSN 及 WSN PA-TAP 的细胞中均发生细胞病变, 提示 WSN PA-TAP 重组病毒拯救成功。将两种分别进行盲传传至 P₁ 代, 对 P₁ 代病毒进行噬斑测定比较两种病毒在 MDCK 细胞上形成的噬斑大小, 结果显示 WSN PA-TAP 所形成的噬斑形态为圆斑, 这与野生型 WSN 所形成的噬斑形态大致相同(图 3)。

WSN 及 WSN PA-TAP 的 P₁ 代病毒分别以 MOI=1 感染 293T 细胞, Western blotting 分析 PB2、PA 蛋白和 TAP 标签蛋白表达情况, 并以 actin 作为阴性对照, 结果显示 WSN 及 WSN PA-TAP 病毒中 PB2 蛋白分子量相同, WSN PA-TAP 中 PA-TAP 蛋白与预期蛋白分子量一致(图 4), 该结果与重组质粒蛋白表达结果相似, 提示 WSN PA-TAP 重组病毒成功表达标签蛋白。

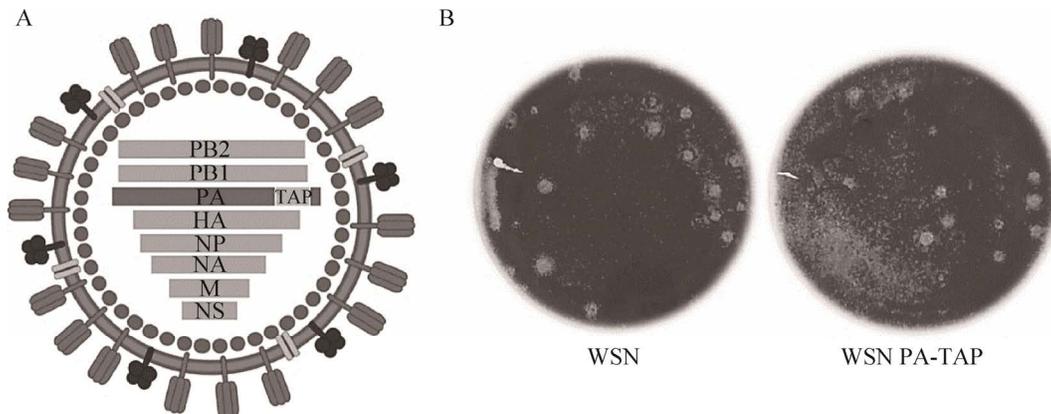


图 3 WSN PA-TAP 病毒示意图及 WSN 与 WSN PA-TAP 病毒噬斑对比

Figure 3 Schematic diagram of WSN PA-TAP and comparison of viral plaque between WSN and WSN PA-TAP. A: Schematic diagram of WSN PA-TAP virus particles. The modified PA fragment in the internal genome is represented by dark color, the inserted TAP-tag is represented by light color, and the rest of the fragments are consistent with WSN and are represented by gray. B: Schematic diagram of WSN and WSN PA-TAP plaque. The left picture shows the plaque of WSN, the right picture shows the plaque of WSN PA-TAP, and the picture shows the results of cell staining with crystal violet after the plaque assay of two P₁ generation viruses.

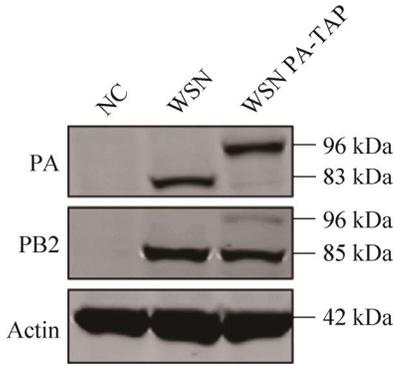


图 4 WSN 及 WSN PA-TAP 病毒中 PB2、PA 蛋白对比

Figure 4 Comparison of PB2 and PA proteins between WSN and WSN PA-TAP.

2.3 WSN PA-TAP 重组病毒的基因组分析

提取 WSN 和 WSN PA-TAP P₁代病毒颗粒中的 RNA, 利用 RNA 银染实验来观察病毒中各个基因片段长度的变化。与 WSN 相比, WSN PA-TAP 中出现大于 PB2 和 PB1 vRNA 片段长度(PB2 和 PB1 vRNA 长度均为 2 341 nt)的条带, 该条带为重组病毒中含有 TAP 标签序列的 PA-TAP 的 vRNA 片段, 其长度由原来的 2 233 nt 变为 2 721 nt (图 5), 该结果进一步证明 TAP

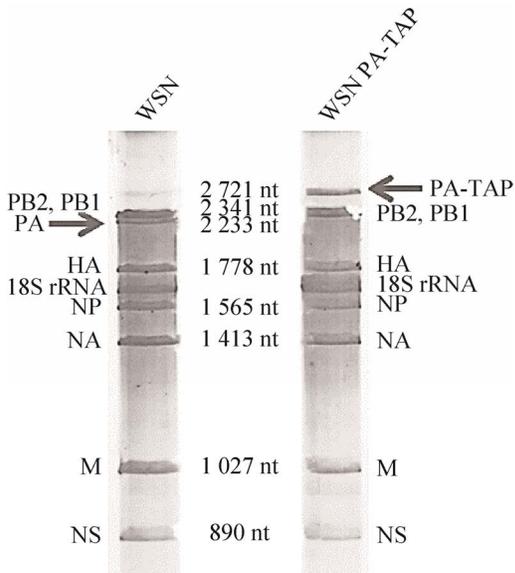


图 5 WSN 及 WSN PA-TAP 病毒的 vRNA 分析
Figure 5 vRNA analysis of WSN and WSN PA-TAP.

标签成功插入到重组病毒 WSN PA-TAP 基因组中。

将 WSN PA-TAP 全基因组送往测序公司进行测序鉴定, 结果符合预期。

2.4 WSN PA-TAP 重组病毒的生长动力学分析

为探究 PA 亚基的 C 端融入 TAP 标签蛋白后对甲型流感病毒生命周期的影响程度, 将 WSN 及 WSN PA-TAP 病毒分别感染 MDCK, 以比较 WSN 和 WSN PA-TAP 的生长动力学曲线。2 种病毒的生长曲线显示重组病毒 WSN PA-TAP 在不同时间的病毒滴度均低于野生型病毒 WSN (图 6), 提示在 PA 亚基的 C 端融合 TAP 标签蛋白会影响 WSN PA-TAP 在不同时间点的复制能力。

3 讨论与结论

在本项研究中, 我们首次在甲型流感病毒 A/WSN/33 (H1N1)的 PA 片段上插入了外源长标签 TAP, 成功拯救出含有 TAP 标签的重组流感病毒 WSN PA-TAP, 该重组病毒能正常表达

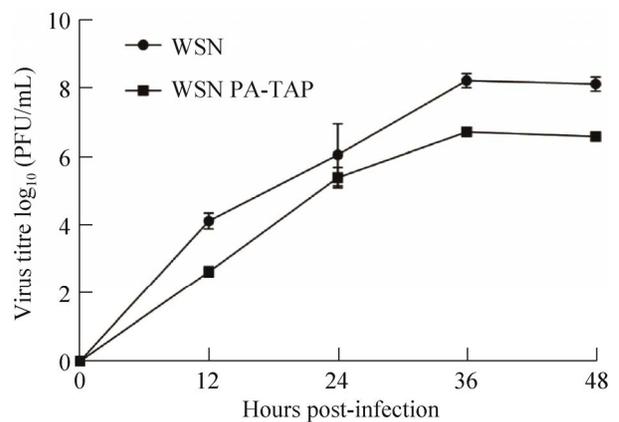


图 6 WSN 及 WSN PA-TAP 的生长动力学对比
Figure 6 Comparison of growth kinetics between WSN and WSN PA-TAP. Data were represented as means±SDs (n=3) and were representative of at least 3 independent experiments.

病毒蛋白和外源标签蛋白,并保持了原有的包装信号。此外,我们对 WSN PA-TAP 进行噬斑检测、基因组银染实验以及生长动力学等病毒学特征的确定,这些结果表明重组标签病毒的复制特征与野生型病毒 WSN 的复制特征比较相似,但是在复制能力上要弱于 WSN,提示 PA 与 TAP 标签构成的融合蛋白 PA-TAP 对重组病毒的复制产生了影响,在 PA 亚基的 C 端融合了一个 TAP 标签可能会影响 RdRp 参与的复制和转录过程,使得重组病毒最终表现为病毒滴度降低。

在插入外源基因片的选择上,我们优先考虑了 RdRp 的 2 个亚基 PB2 和 PA,我们分别构建了 PB2-TAP 和 PA-TAP 的流感病毒拯救质粒,在验证质粒表达无误后进行病毒拯救。2 种不同的设计方案都得到了验证,均成功拯救出了重组病毒,但是在随后对重组病毒的标签蛋白进行验证的过程中,我们发现 WSN PB2-TAP 病毒在 P₀ 代出现标签丢失的现象,而 WSN-PA-TAP 则未出现此种状况,我们得出结论,认为 PA 片段容忍外源基因的能力可能要优于 PB2 片段,这与其他人的观点一致^[13]。

甲型流感病毒的包装信号对于病毒形成完整病毒颗粒至关重要^[14]。我们在 WSN 的 PA 片段 5'端包装信号长度的选择上与之前不同,WSN-PA 片段的包装信号长度为 221 nt,我们在此基础上对 PA 片段的包装信号长度进行删减,将包装信号长度缩减到 162 nt 后并成功拯救出重组病毒,之前也有报道称在 PA 片段 5'端的包装信号缩短成 108 nt 也可以使外源的 GFP 标签整合到病毒基因组中,但该病毒在传代中容易发生标签丢失现象^[14],由此可推测出 PA 包装信号的长度并不固定,而 PA 片段在不同亚型的甲型流感病毒中序列高度保守,这其中很有可能是由于不同长度的外源序列导致

PA 形成与野生型 WSN 中 PA 片段不同的 RNA 结构,从而影响了病毒的包装^[14]。

在检测重组病毒 WSN PA-TAP 的生长动力学时,我们发现在各个时间点上 WSN PA-TAP 均显示出了明显低于 WSN 病毒滴度的趋势(图 6),可能原因之一是由于 TAP 标签影响了 PA 亚基本身的功能,使得 WSN PA-TAP 变现为复制能力弱于 WSN。我们利用空斑实验测定其浓度约为 6×10^6 PFU/mL,这要比野生型 WSN 低约 100 倍,这个滴度水平对于之后进行宿主因子筛选实验的影响较小,但是在感染小鼠方面,WSN PA-TAP 的毒力可能要明显弱于 WSN,这可能造成重组病毒在小鼠体内提前清除,或感染小鼠后小鼠出现病变症状不明显等状况;另外,该重组病毒的滴度过低也限制了其作为潜在的疫苗载体的应用,因此也需要对该重组病毒滴度降低进行机制研究,以期提高其病毒滴度来增加其作为病毒载体应用的可能。

本研究首次设计并拯救获得了一种在 PA 片段上含有长标签 TAP-tag 的重组流感病毒 WSN PA-TAP,并确定了不同于前人发现的 PA 片段 5'端的包装信号长度。该病毒能在感染背景下为研究宿主和病毒之间的复杂关系提供一种有效的手段,这将有利于我们发现对甲型流感病毒复制至关重要的细胞通路或关键的宿主因子,同时对于甲型流感病毒 PA 片段携带外源片段能力的评估提供了重要依据。

参考文献

- [1] ASHA K, KUMAR B. Emerging influenza D virus threat: what we know so far![J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2019, 8(2): 192.
- [2] PAULES C, SUBBARAO K. Influenza[J]. *Lancet* (London, England), 2017, 390(10095): 697-708.
- [3] HOUSER K. Influenza vaccines: challenges and solutions[J]. *Cell Host & Microbe*, 2015, 17(3): 295-300.

- [4] VASIN AV, TEMKINA OA, EGOROV VV, KLOTCHENKO SA, PLOTNIKOVA MA, KISELEV OI. Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: an overview of recently discovered proteins[J]. *Virus Research*, 2014, 185: 53-63.
- [5] CHAUHAN RP, GORDON ML. An overview of influenza A virus genes, protein functions, and replication cycle highlighting important updates[J]. *Virus Genes*, 2022, 58(4): 255-269.
- [6] MASSARI S, DESANTIS J, NIZI MG, CECCHETTI V, TABARRINI O. Inhibition of influenza virus polymerase by interfering with its protein-protein interactions[J]. *ACS Infectious Diseases*, 2021, 7(6): 1332-1350.
- [7] KOUBA T, DRNCOVÁ P, CUSACK S. Structural snapshots of actively transcribing influenza polymerase[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2019, 26(6): 460-470.
- [8] REICH S, GUILLIGAY D, PFLUG A, MALET H, BERGER I, CRÉPIN T, HART D, LUNARDI T, NANA O, RUIGROK RW, CUSACK S. Structural insight into cap-snatching and RNA synthesis by influenza polymerase[J]. *Nature*, 2014, 516(7531): 361-366.
- [9] BREEN M, NOGALES A, BAKER SF, MARTÍNEZ-SOBRIDO L. Replication-competent influenza A viruses expressing reporter genes[J]. *Viruses*, 2016, 8(7): 179.
- [10] VÖLKEL P, le FAOU P, ANGRAND PO. Interaction proteomics: characterization of protein complexes using tandem affinity purification-mass spectrometry[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2010, 38(4): 883-887.
- [11] PEKOSZ A, HE B, LAMB RA. Reverse genetics of negative-strand RNA viruses: closing the circle[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(16): 8804-8806.
- [12] NEUMANN G, WATANABE T, ITO H, WATANABE S, GOTO H, GAO P, HUGHES M, PEREZ DR, DONIS R, HOFFMANN E, HOBOM G, KAWAOKA Y. Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(16): 9345-9350.
- [13] 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.
- [14] MIYAMOTO S, MURAMOTO Y, SHINDO K, FUJITA-FUJIHARU Y, MORIKAWA T, TAMURA R, GILMORE JL, NAKANO M, NODA T. Contribution of RNA-RNA interactions mediated by the genome packaging signals for the selective genome packaging of influenza A virus[J]. *Journal of Virology*, 2022, 96(6): e0164121.