



# 携带 Fluc 与 mCherry 双报告基因的重组痘苗病毒 WR 株的构建及体外应用

孙洁伟<sup>1,2#</sup>, 黄保英<sup>2#</sup>, 王梦微<sup>1,2</sup>, 吴依依<sup>2</sup>, 楚巧鸿<sup>2</sup>, 霍恕婷<sup>2</sup>, 赵莉<sup>2</sup>, 翟德胜<sup>3</sup>, 邓瑶<sup>2</sup>, 赵莹<sup>1\*</sup>, 谭文杰<sup>2\*</sup>

- 1 新乡医学院 药学院, 河南 新乡 453003
- 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 102206
- 3 新乡医学院 公共卫生学院, 河南 新乡 453003

孙洁伟, 黄保英, 王梦微, 吴依依, 楚巧鸿, 霍恕婷, 赵莉, 翟德胜, 邓瑶, 赵莹, 谭文杰. 携带 Fluc 与 mCherry 双报告基因的重组痘苗病毒 WR 株的构建及体外应用[J]. 微生物学报, 2024, 64(12): 4789-4803.

SUN Jiewei, HUANG Baoying, WANG Mengwei, WU Yiyi, CHU Qiaohong, HUO Shuting, ZHAO Li, ZHAI Desheng, DENG Yao, ZHAO Ying, TAN Wenjie. Construction and application *in vitro* of a recombinant vaccinia virus strain WR expressing dual reporters Fluc and mCherry[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(12): 4789-4803.

**摘要:**【目的】构建同时表达双报告基因(荧光素酶 Fluc 和红色荧光蛋白 mCherry)的重组痘苗病毒 WR 株。【方法】采用 CRISPR/Cas9 技术构建针对 WR 株 J2R 区的 gRNA CRISPR/Cas9 质粒及表达 Fluc 和 mCherry 的质粒 pJSE-Fluc/mCherry, 插入至 TK 区构建重组痘苗病毒 rWR-Fluc/mCherry。采用 PCR 与测序分析基因插入位置与序列的准确性; 通过 mCherry、Fluc 活性、空斑形态鉴定重组病毒; 重组病毒连续盲传 12 代, 检测双报告基因及 E3L 表达分析重组病毒的遗传稳定性; 检测重组病毒(rWR)与野生型病毒(WR)感染 Vero 和 HeLa 细胞后的细胞病变、TCID<sub>50</sub>、报告基因表达, 分析病毒的复制动力学。采用空斑法、qPCR 法、双报告基因活性检测, 评价 ST-246 作为阳性药物的体外抗病毒药效。【结果】体外鉴定结果显示, Fluc 和 mCherry 准确插入 WR 株的 TK 区域, 感染 Vero 细胞后可检测到 mCherry 荧光及 Fluc 酶活性, 空斑形态与野生型病毒一致, 连续盲传 12 代病毒滴度保持稳定, 并且双报告基因活性及 E3L 表达均可稳定检出, 表明重组病毒 rWR-Fluc/mCherry 构建成功且遗传稳定; 重组病毒感染 Vero 和 HeLa 细胞后

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFD1800405, 2021YFA1201003, 2022YFC2304100)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFD1800405, 2021YFA1201003, 2022YFC2304100).

#These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding authors. E-mail: ZHAO Ying, zhaoyingxxmc@163.com; TAN Wenjie, tanwj@ivdc.chinacdc.cn

Received: 2024-05-30; Accepted: 2024-09-19; Published online: 2024-09-26

的细胞病变、TCID<sub>50</sub> 滴定、双报告基因活性检测均表明, 感染后 48–72 h 达到复制高峰, 与 WR 的复制动力学一致。采用重组病毒 rWR-Fluc/mCherry 测得 ST-246 的 EC<sub>50</sub> 与 WR 野生型病毒一致, 多个检测方法(病毒蚀斑、DNA 拷贝数、双报告基因活性) EC<sub>50</sub> 结果(2–7 nmol/L 之间)间均具有良好的 consistency(相关系数  $r$  均大于 0.500 0,  $P < 0.05$ )。【结论】成功构建了可同时表达 Fluc 与 mCherry 双报告基因且遗传稳定的重组痘苗病毒 rWR-Fluc/mCherry, 可应用于抗病毒药物体外快捷筛选及药效分析。

关键词: 痘苗病毒; 重组; 双报告基因; 抗正痘病毒药物; 半数有效浓度

## Construction and application *in vitro* of a recombinant vaccinia virus strain WR expressing dual reporters Fluc and mCherry

SUN Jiewei<sup>1,2#</sup>, HUANG Baoying<sup>2#</sup>, WANG Mengwei<sup>1,2</sup>, WU Yiyi<sup>2</sup>, CHU Qiaohong<sup>2</sup>, HUO Shuting<sup>2</sup>, ZHAO Li<sup>2</sup>, ZHAI Desheng<sup>3</sup>, DENG Yao<sup>2</sup>, ZHAO Ying<sup>1\*</sup>, TAN Wenjie<sup>2\*</sup>

1 College of Pharmacy, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan, 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 102206, China

3 School of Public Health, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan, China

**Abstract: [Objective]** To construct a recombinant vaccinia virus strain WR that expresses dual reporters (luciferase Fluc and red fluorescent protein mCherry). **[Methods]** Firstly, the gRNA CRISPR/Cas9 plasmid targeting the J2R region of WR and the plasmid pJSE-Fluc/mCherry carrying the dual reporter genes were constructed. Then, the CRISPR/Cas9 gene editing tool was used to insert the dual reporter genes into the TK region, and thus the recombinant vaccinia virus strain rWR-Fluc/mCherry (rWR) was constructed. The location and sequence of insertion in rWR were analyzed by PCR and sequencing. The recombinant strain rWR was characterized by mCherry/Fluc activity and plaque assays. The recombinant strain rWR was subcultured for 12 passages, and the expression levels of the dual reporter genes and E3L were determined to reveal the genetic stability of the strain. To analyze the replication dynamics of the virus in Vero and HeLa cells, we determined the cytopathic effect (CPE), TCID<sub>50</sub>, and dual reporter expression of rWR and the wild type (WR) in the infected cells. Furthermore, we evaluated the inhibitory effects of ST-246 as a positive drug on both rWR and WR *in vitro* by the plaque assay, qPCR, and dual reporter activity measurement. **[Results]** Fluc and mCherry were accurately inserted into the TK region of WR. The Vero cells infected with rWR showed the activities of dual reporters and the plaque morphology consistent with that of WR. After 12 passages, the dual reporter activities and E3L expression were stably detected in rWR, which indicated that rWR was successfully constructed and genetically stable. The CPE, TCID<sub>50</sub>, and

dual reporter activity in Vero and HeLa cells indicated that replication peaked 48–72 h post-infection with rWR, which was consistent with the replication dynamics of WR. The median effective concentration ( $EC_{50}$ ) of ST-246 against rWR was in agreement with that against WR, and the  $EC_{50}$  (2–7 nmol/L) obtained by the plaque assay, qPCR, and dual reporter activity measurement showed good consistency ( $r > 0.500$  and  $P < 0.05$ ). **[Conclusion]** A recombinant vaccinia virus strain rWR simultaneously expressing Fluc and mCherry was successfully constructed, and it was genetically stable. This strain might be used as an *in vitro* system for rapid screening and characterization of anti-orthopoxvirus drugs with simple operation.

**Keywords:** vaccinia virus; recombinant; dual-reporter gene; anti-orthopoxvirus drugs; median effective concentration ( $EC_{50}$ )

痘病毒(poxvirus)是目前已知的基因组最大的线性 DNA 病毒,其成员正痘病毒属因宿主范围广且大部分都能引起动物源性人兽共患病,是痘病毒中最受关注的成员;正痘病毒属的成员包括天花病毒(variola virus, VARV)、痘苗病毒(vaccinia virus, VACV)、猴痘病毒(monkeypox virus, MPXV)、牛痘病毒(cowpox virus, CPXV)、骆驼痘病毒(camelpox virus, CMLV)和鼠痘病毒(ectromelia virus, ECTV)等<sup>[1-4]</sup>。自全球停止天花疫苗接种以来,人类对正痘病毒的感染风险显著增加<sup>[5]</sup>。2022年,全球暴发的猴痘疫情被世界卫生组织宣布为“国际关注的公共卫生紧急事件”,再次引发了对人感染正痘病毒病的担忧<sup>[6]</sup>。

痘苗病毒(vaccinia virus, VACV)是目前研究最为深入的正痘病毒。痘苗病毒 WR 株(vaccinia virus western reserve strain)通过在小鼠脑内传代培养而获得,具有显著神经毒性<sup>[7]</sup>,是正痘病毒应用最为广泛的模式病毒;由于其在动物模型中显示出较其他毒株更强的毒性,特别是通过鼻内途径感染时,对小鼠具有较强致病性,能够引发小鼠急性肺感染并能扩散至多个器官,因此该病毒在疫苗及抗病毒药效学体内评价方面也具有重要的应用价值<sup>[8-10]</sup>。

ST-246 是一种口服抗病毒药物,已被证实对包括天花病毒猴痘病毒在内的其他正痘病毒具有显著的抗病毒活性<sup>[11]</sup>。该药物的作用机制在于其抑制正痘病毒的 VP37 包膜蛋白,阻断病毒粒子的包膜形成<sup>[12]</sup>。在体外细胞模型中,Warner 等证实了 ST-246 对不同分支的猴痘病毒均展现出一定的抑制效果<sup>[13]</sup>。在体内动物模型中,ST-246 在食蟹猴感染猴痘病毒后的第 5、6、7 或 8 天进行治疗,存活率分别为 100%、67%、100%和 50%<sup>[14]</sup>。2021 年 11 月,加拿大卫生部批准了 ST-246 用于治疗痘苗、猴痘以及天花病毒感染<sup>[11]</sup>。

报告基因的使用可以实现病毒感染复制的实时监测、快速与多指标检测,大大促进了病毒学研究<sup>[15-16]</sup>。萤火虫荧光素酶(firefly luciferase, Fluc)具有灵敏度高、荧光强度高、穿透力强、容易定量等优势,已成为高通量药物筛选研究的常用工具。红色荧光蛋白(mCherry)具有易于观察、不需要加底物、毒性低等优势,近年来已广泛用于生物示踪剂。构建携带双报告基因的重组痘苗病毒,既能实现体外病毒感染和复制的实时监测,也能用于动物体内的病毒组织分布与感染强度的研究,为实现疫苗及药物的快速可视化评价提供了重要技术支撑<sup>[17]</sup>。

常见的重组病毒构建方法包括同源重组、体外连接、细菌人工染色体和 CRISPR/Cas9 技术等<sup>[18]</sup>。使用 CRISPR/Cas9 技术构建重组病毒的效率比传统同源重组法高出至少 90%<sup>[19]</sup>，是一种强大 DNA 编辑工具<sup>[20]</sup>。

基于上述分析，本研究拟采用 CRISPR/Cas9 技术构建可同时表达 Fluc 与 mCherry 双报告基因且遗传稳定的重组痘苗病毒 rWR-Fluc/ mCherry (rWR)，并采用抗正痘病毒阳性药物 ST-246，初步探讨了 rWR 在抗病毒药物体外药效评价中的应用，为正痘病毒感染机制研究及高通量药物筛选评价提供了新的技术手段。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞和病毒

非洲绿猴肾细胞(Vero)购自 ATCC；人胚肾细胞 293T (HEK-293T, CRL-3519)购自国家生物医学实验细胞资源库；上述细胞均使用含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基(Gibco 公司)培养。痘苗病毒 WR 株(WR)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保存，保藏编号为 CHPC2.3.9-C-Tan-WR。

### 1.2 gRNA CRISPR/Cas9 质粒及供体质粒构建

pX458del 质粒和 pJSE 质粒，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保存<sup>[19]</sup>，其中，pX458del 携带 Cas9 与 GFP 标签，用于提供 Cas9 蛋白、gRNA 复合物，并实现转染细胞的可视化。pJSE 用于痘苗病毒重组，可提供同源臂和 p7.5 与 pE/L 启动子。在 <http://crispor.tefor.net/> 网站中输入 WR-J2R 区基因序列<sup>[21]</sup>，按“Doench '16-Score”参数将网站列出的所有 gRNA 序列从大到小进行排序，选出评分最高的 gRNA 序列：300gRNA (5'-CACCT

GTGAGCGTATGGCAAACGA-3')，每个 gRNA 序列及反向互补序列的 5'端加上 *Bbs* I 酶切位点，合成后插入质粒 pX458del 中，命名为 pX458del-300gRNA。

在质粒 pJSE 基础上采用无缝克隆技术构建供体质粒 pJSE-Fluc/mCherry，其中，Fluc 表达盒通过 *Bam*H I 位点构建至 p7.5 启动子后，用于荧光素酶定量；mCherry 表达盒通过 *Bgl* II 位点构建至 pE/L 启动子后，用于重组病毒筛选纯化及荧光灶定量。所有质粒序列均经 Sanger 测序确认无误。

### 1.3 病毒的重组

将 293T 细胞按照  $3.5 \times 10^6$  细胞/孔密度培养于 6 孔板中，37 °C 培养过夜，待细胞 60%–70% 融合时，更换为 5% FBS 的 DMEM 培养基。按 X-tremeGENE HP DNA 转染试剂说明书制备 pX458del-300gRNA 质粒-HP 转染试剂复合物，随后逐滴滴加到 293T 细胞中，直至复合物全部加入到细胞中；第 2 天待细胞融合度为 90%时，更换 2% FBS 的 DMEM 培养基，将 WR 按 MOI 为 0.01 剂量感染细胞后 2 h 换液；之后转染供体质粒 pJSE-Fluc/mCherry，转染后 24 h 通过观察红色荧光噬斑筛选和收获重组病毒，采用有限稀释法筛选重组病毒单克隆，获得的重组病毒命名为 rWR (C-Tan)-Fluc/mCherry，简称为 rWR，收获细胞及上清，冻存于 -80 °C。

### 1.4 PCR 鉴定

分别将 rWR 和 WR 感染 Vero 细胞后 48 h 收获细胞，按照病毒 DNA/RNA 核酸提取试剂盒(西安天隆科技有限公司)提取病毒 DNA，用作 PCR 模板进行 PCR 鉴定与 qPCR 分析。采用 2 种特异性引物，即 TK-F (5'-CAACTGAATATGTCCGCCGTTTCAT-3')和 TK-R (5'-TTATGAGTCGATGTAACACTTTCTACGAGC-3')，分别针对病毒的同源左臂和右臂进行 PCR 扩增，以鉴

定病毒的插入区。在野生型病毒中预期产物为 534 bp, 携带双报告基因重组病毒的预期产物为 2 994 bp。

### 1.5 Western blotting 检测

将 Vero 细胞以  $4 \times 10^6$ /孔密度, 2 mL/孔培养于 6 孔板中, 待细胞形成单层融合状, 采用 MOI 为 0.05 剂量的病毒感染。感染后 24 h, 使用 Western blotting 及 IP 细胞裂解液(上海碧云天生物技术股份有限公司)制备样本。样本经 SDS-PAGE 后转移至 NC 膜上。然后使用 5% 脱脂乳粉在室温下封闭膜 2 h, 并使用含 5% 脱脂乳粉稀释的一抗抗体孵育过夜。一抗包括抗-Fluc 鼠单克隆抗体(1:1 000)、抗-mCherry 鼠单克隆抗体(1:1 000)、抗-E3L 鼠多克隆抗体(1:250)和抗- $\beta$ -actin 单克隆抗体(1:10 000)(Abcam 公司)。膜使用稀释至 1:10 000 的红外鼠源二抗, 在避光下孵育 1 h。然后使用含有 0.05% Tween-20 的 TBS 洗涤膜, 去除未结合的抗体。待膜晾干后, 使用红外 Odyssey 红外激光扫描仪(LI-COR 公司)扫描膜成像。

### 1.6 荧光素酶试验

采用 Bright-Lite™ Luciferase Assay System (南京诺唯赞生物科技股份有限公司)测量萤火虫荧光素酶活性。将细胞培养物与底物按照 1:1 的体积加入, 即加入 100  $\mu$ L Bright-Lite™ 至待测细胞孔中, 室温孵育 2 min 后使用 Synergy H1 多功能酶标仪(BioTek 公司), 选择发光检测模块进行检测。

### 1.7 重组病毒遗传稳定性评估

将 Vero 细胞以  $4 \times 10^5$  细胞/孔接种于 6 孔板中, 待细胞生长至 90% 时, 将 rWR 按照 MOI 为 0.01 进行感染, 48 h 后收获病毒。后续使用前一代病毒粗制品再次按照 MOI 为 0.01 进行感染, 连续盲传 12 代后, 通过 Western blotting 检测 Fluc、mCherry 以及 E3L 基因的表达, 用

于了解重组病毒遗传稳定性。

### 1.8 病毒复制动力学

将 Vero 与 HeLa 细胞分别以  $4 \times 10^5$  细胞/孔接种于 6 孔板中, 37 °C 培养过夜, 待细胞生长至 90% 时, 按 MOI 为 0.01 的剂量感染病毒; 37 °C 吸附 2 h 后弃去感染液, 用 PBS 清洗 2 遍, 更换新鲜 2% FBS MEM, 置于 37 °C 恒温培养箱中继续培养。病毒吸附 2 h 后定义为 0 h, 之后分别收获 12、24、48、72 和 96 h 的上清和细胞混悬液, 于 -80 °C 至室温, 反复冻融 3 次之后进行病毒滴度的测定, 参照 Thevenin 等<sup>[22]</sup>采用 Karber 法计算 50% 细胞发生病变的剂量 (tissue culture infectious dose 50, TCID<sub>50</sub>), 通过 TCID<sub>50</sub> 和荧光素酶活性检测绘制复制动力学和荧光表达动力学曲线, 每组实验重复 3 次。

### 1.9 空斑试验

将 Vero 细胞以  $2 \times 10^5$  细胞/孔接种于 12 孔培养板中。待细胞生长至 90% 时, 按照 30 PFU/孔的剂量感染病毒, 吸附 2 h 后使用 PBS 洗涤细胞 3 次后更换 2% FBS MEM 培养基, 然后在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 下孵育 48 h 和 72 h。之后每孔加 0.1% 结晶紫-4% 多聚甲醛固定液 1 mL, 固定染色 30 min, 吸弃染色-固定液, 每孔加入 1 mL ddH<sub>2</sub>O 洗涤 2 遍, 晾干后拍照。

### 1.10 qPCR 试验

采用全自动核酸提取仪(西安天隆科技有限公司)提取总 DNA。使用 2×Taq Pro U<sup>+</sup> Multiple Probe qPCR Mix (南京诺唯赞生物科技股份有限公司)检测痘苗病毒 E3L 靶基因<sup>[23]</sup>, 其中正向引物序列为 5'-ATCCTCTCTCATTGATTTTTTCGCGGGA-3'; 反向引物序列为 5'-TGGAGAAGCGAGAAGTTAATAAAGC-3'; 探针引物序列为 5'-HEX-TCGTCGGAGCTGTACACCATAGCAC-BHQ1-3'。反应体系(20  $\mu$ L): 2×Taq Pro U<sup>+</sup> Multiple Probe qPCR Mix 10  $\mu$ L, 正、反向

引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 0.4  $\mu\text{L}$ , 探针(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.4  $\mu\text{L}$ , 模板 2  $\mu\text{L}$ , 去离子水 6.8  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 37  $^{\circ}\text{C}$  消化 120 s, 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s; 95  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 共 45 个循环。通过标准曲线计算病毒拷贝数。

### 1.11 ST-246 体外抗病毒药效试验

本研究药效学评价方法参照文献[24]进行。分别将 Vero 细胞按照  $2\times 10^4$  细胞/孔和  $2\times 10^5$  细胞/孔接种于 96 孔板和 12 孔板, 待细胞生长至 90% 时, 将 ST-246 (T17026, 上海陶术生物科技有限公司) 初始浓度 2  $\mu\text{mol/L}$  开始倍比稀释至 0.000 64  $\mu\text{mol/L}$ , 6 个稀释度预处理 1.5 h 后, 用 2% 胎牛血清 MEM 将 rWR 稀释至 100 PFU/100  $\mu\text{L}$  (96 孔板) 和 50 PFU/500  $\mu\text{L}$  (12 孔板), 每个孔加 100  $\mu\text{L}$  (96 孔板) 和 500  $\mu\text{L}$  (12 孔板), 即每孔含 100 PFU (96 孔板) 和 50 PFU (12 孔板) 病毒, 致使药物浓度稀释至 1 $\times$  浓度, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱继续培养 72 h。收获上清和细胞混悬液于 -80  $^{\circ}\text{C}$  保存, 反复冻融 3 次后, 采用空斑法、qPCR 法、荧光法及荧光素酶法检测并计算抑制病毒抑制率, 以 50% 病毒被抑制的最大药效浓度为半数有效浓度 (50% effective concentration,  $\text{EC}_{50}$ )。其中, 荧光素酶法利用 Synergy H1 酶标仪的 Gen 5 软件进行信号采集与荧光读数, 按公式 (1) 计算抑制率。

药物抑制率 = (病毒对照荧光读数 - 实验孔荧光读数) / 病毒阳性荧光读数  $\times 100\%$  (1)

### 1.12 统计分析

采用 GraphPad Prism 9 软件进行制图和统计分析。利用 ImageJ 分析灰度值, 将目标蛋白的灰度信号除以内参蛋白的信号, 计算相对表达量; 药物抑制率计算采用四参数 Logistic 模型 Variable slope (four parameters) 法计算, 采用双尾  $t$  检验进行统计分析, 抑制率曲线参照文献[25]绘制; 采用 Spearman 相关系数 ( $r$ ) 确定两

组间相关性,  $r$  值越接近 1 表示正相关性越强;  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 基于 CRISPR/Cas9 技术的重组病毒 rWR 构建

胸腺激酶 (thymidine kinase, TK) 区域常被选作重组痘苗病毒外源基因的插入位点<sup>[26]</sup>。本研究在该区域插入 Fluc 和 mCherry 报告基因, 以实现病毒可视化追踪。首先, 设计并构建了一个含有导向 RNA (gRNA) 的 CRISPR/Cas9 质粒 (图 1A) 以提升重组痘苗病毒基因组编辑的效率。其次, 构建了一个携带 Fluc 和 mCherry 报告基因的供体质粒, 其以 TK 区的同源臂为侧翼序列, mCherry 表达盒由早期/晚期 (pE/L) 启动子驱动, Fluc 表达盒由 p7.5 启动子控制 (图 1B)。随后, 采用脂质体介导的方法将 gRNA CRISPR/Cas9 质粒转染至 HEK-293T 细胞。转染后 24 h, 通过 EGFP 荧光蛋白的表达来评估 CRISPR/Cas9 系统的活性。最后, 感染 MOI 为 0.01 剂量 WR 病毒株, 并于感染后 2 h 更换培养液, 采用相同方法转染含有 Fluc/mCherry 报告基因的供体质粒 pJSE-Fluc/mCherry, 24 h 后通过观察红色荧光噬斑筛选和收获重组病毒 (图 1C), 采用有限稀释法筛选重组病毒单克隆<sup>[26]</sup>, 获得的重组病毒命名为 rWR (C-Tan)-Fluc/mCherry, 简称为 rWR。

### 2.2 rWR 的生物学鉴定

本研究以野生型 WR 株为对照, 采用 TK-F 和 TK-R 引物对重组病毒 rWR 进行 PCR 扩增, 鉴定是否在 TK 区插入双报告基因 (图 1B), 琼脂糖凝胶电泳可观察到约 3 000 bp 和约 500 bp 的条带, 分别对应插入 Fluc-mCherry 和未插入报告基因区片段大小 (图 2A)。重组病毒的 Fluc-mCherry 片段区域测序结果显示与预期序列一致, 确认了 Fluc 和 mCherry 双报告基因序

列及插入位置的正确性。荧光显微镜下可观察 rWR 感染的 Vero 细胞中出现了红色荧光(图 2B), 说明 mCherry 可有效表达。此外, 荧光素酶活性测定 rWR 感染的 Vero 细胞读值可达  $10^5$  以上相对发光单位(relative light units, RLU), 证实了 Fluc 的高效表达(图 2C)。感染 Vero 细胞 48 h 和 72 h 后的空斑观察结果显示重组病毒在噬斑形态和大小上与野生型病毒无显著差异(图 2D)。将 rWR 重组病毒传至第 12 代, 用空斑法测定 P1-P12 代的病毒滴度(图 2E), 各代次病毒滴度均大于  $10^6$  PFU/mL, 从 P1 代的  $(2.63 \pm 0.61) \times 10^6$  PFU/mL 持续维持至 P12 代的  $(3.77 \pm 0.78) \times 10^6$  PFU/mL。取第 1、3、5、7 和 9 代病毒感染细胞进行 Western blotting 检测, 在 65、30 及 22 kDa 处均能观察到明显的条带, 分

别与 Fluc、mCherry 及 E3L 的表达的大小一致(图 2F); 对 Western blotting 结果中的 Fluc 进行灰度扫描分析(图 2G), 各代次病毒的蛋白表达的灰度值保持稳定, 说明 rWR 重组病毒具有良好的稳定性。

### 2.3 rWR 的体外复制动力学

本研究测定了 rWR 和 WR 以 MOI 为 0.01 感染 Vero 和 HeLa 细胞后 0、12、24、48、72 和 96 h 的细胞病变、TCID<sub>50</sub>、mCherry 表达及 Fluc 活性, 用于研究病毒的复制动力学。在 Vero 细胞中的复制动力学结果显示, rWR 和 WR 两株病毒均在感染后 24 h 开始出现病变、48-72 h 病变加剧、96 h 后细胞基本脱落(图 3A); TCID<sub>50</sub> 滴定结果显示, rWR 和 WR 均在感染后 24 h 迅速复制, 并在 48 h 至 72 h 达到平台期, 96 h 后

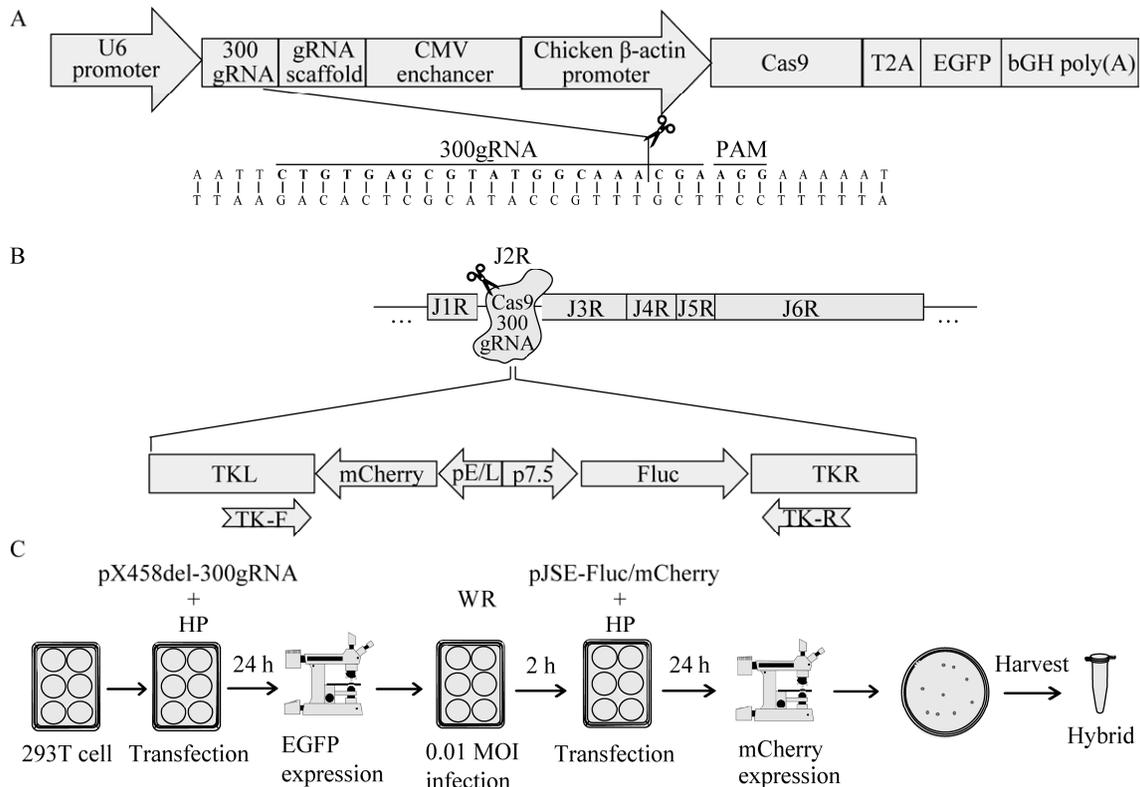
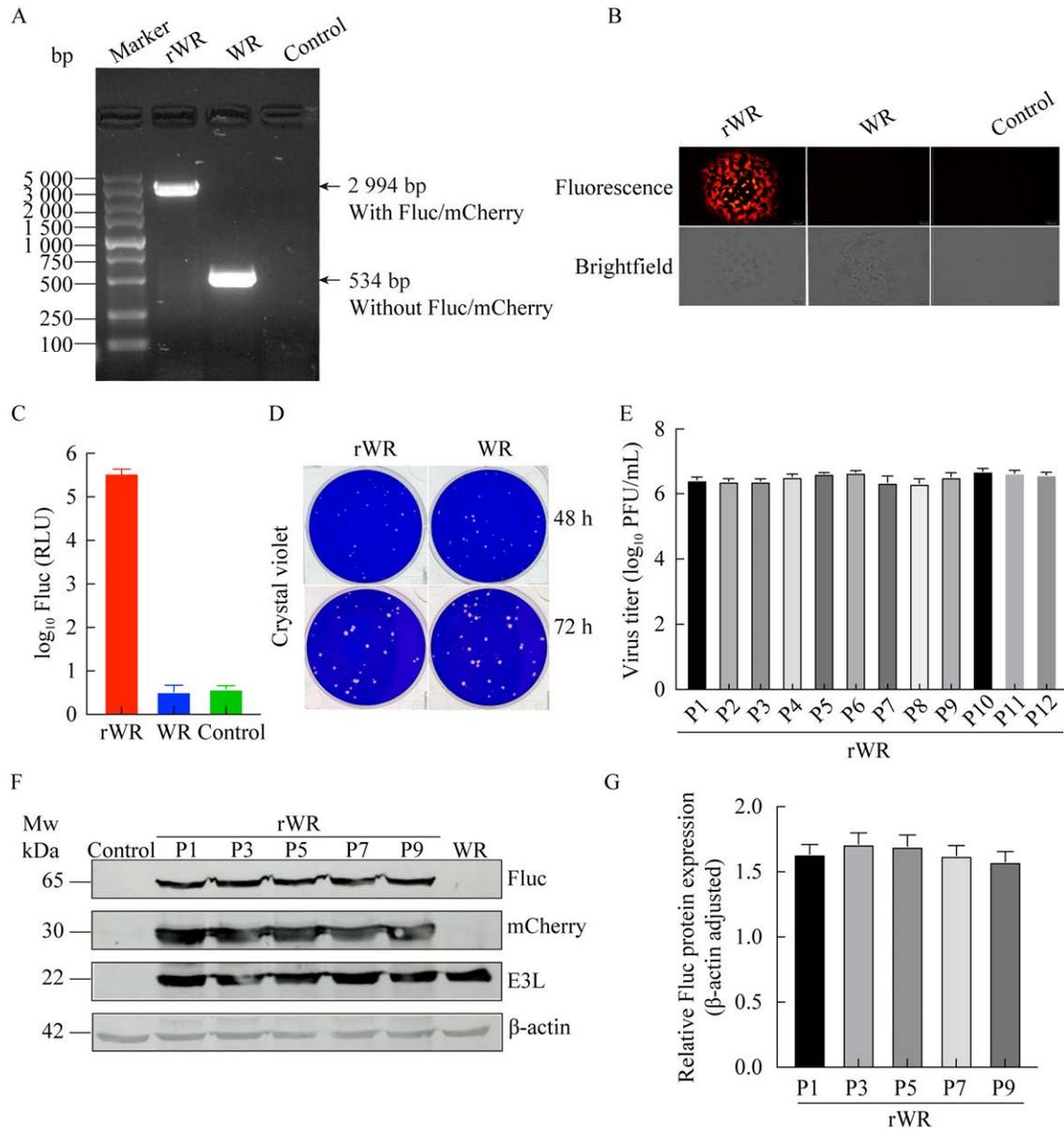


图 1 携带双报告基因重组痘苗病毒 rWR 的构建流程示意图

Figure 1 Construction schematic of recombinant vaccinia virus rWR with dual-reporter gene. A: gRNA CRISPR/Cas9 system schematic. B: Structure schematic of recombinant virus. C: Schematic diagram of recombinant virus construction and screening process.



**图 2 rWR 的鉴定与遗传稳定性**

Figure 2 Identification and genetic stability of rWR. A: PCR in recombinant region. B: mCherry fluorescence protein expression analysis. C: Fluc luciferase activity analysis. D: Morphological comparison of plaque. E: rWR specific generation titer. F, G: Western blotting verification of genetic stability and gray value analysis.

下降(图 3C)。此外, rWR 重组病毒在感染后 24 h 即可观察到 mCherry 的表达, 并持续增强至 72 h 达到峰值, 96 h 后荧光强度减弱(图 3A), 与细胞病变结果一致; 并且, rWR 在感染后可检测到荧光素酶活性( $10^4$ – $10^5$  RLU), 在 48–72 h 达到高峰, 随后呈现下降趋势(图 3D), rWR 感

染 Vero 细胞后 Fluc 活性分别为( $17.11 \pm 5.51$ ) RLU、( $5.72 \pm 2.77$ ) $\times 10^3$  RLU、( $1.29 \pm 0.69$ ) $\times 10^4$  RLU、( $4.52 \pm 1.11$ ) $\times 10^5$  RLU、( $1.03 \pm 0.60$ ) $\times 10^5$  RLU 和( $2.57 \pm 2.13$ ) $\times 10^3$  RLU, 上述结果与细胞病变及 TCID<sub>50</sub> 测定结果趋势一致。在 HeLa 细胞中测得的病毒复制动力学与 Vero 细胞一致

(图 3B–3D), rWR 感染 HeLa 细胞后 Fluc 活性 分别为 $(19.22\pm 6.55)$  RLU、 $(1.33\pm 0.56)\times 10^4$  RLU、 $(2.53\pm 0.11)\times 10^5$  RLU、 $(1.51\pm 0.47)\times 10^6$  RLU、 $(1.25\pm 0.13)\times 10^6$  RLU 和 $(5.00\pm 0.24)\times 10^4$  RLU。

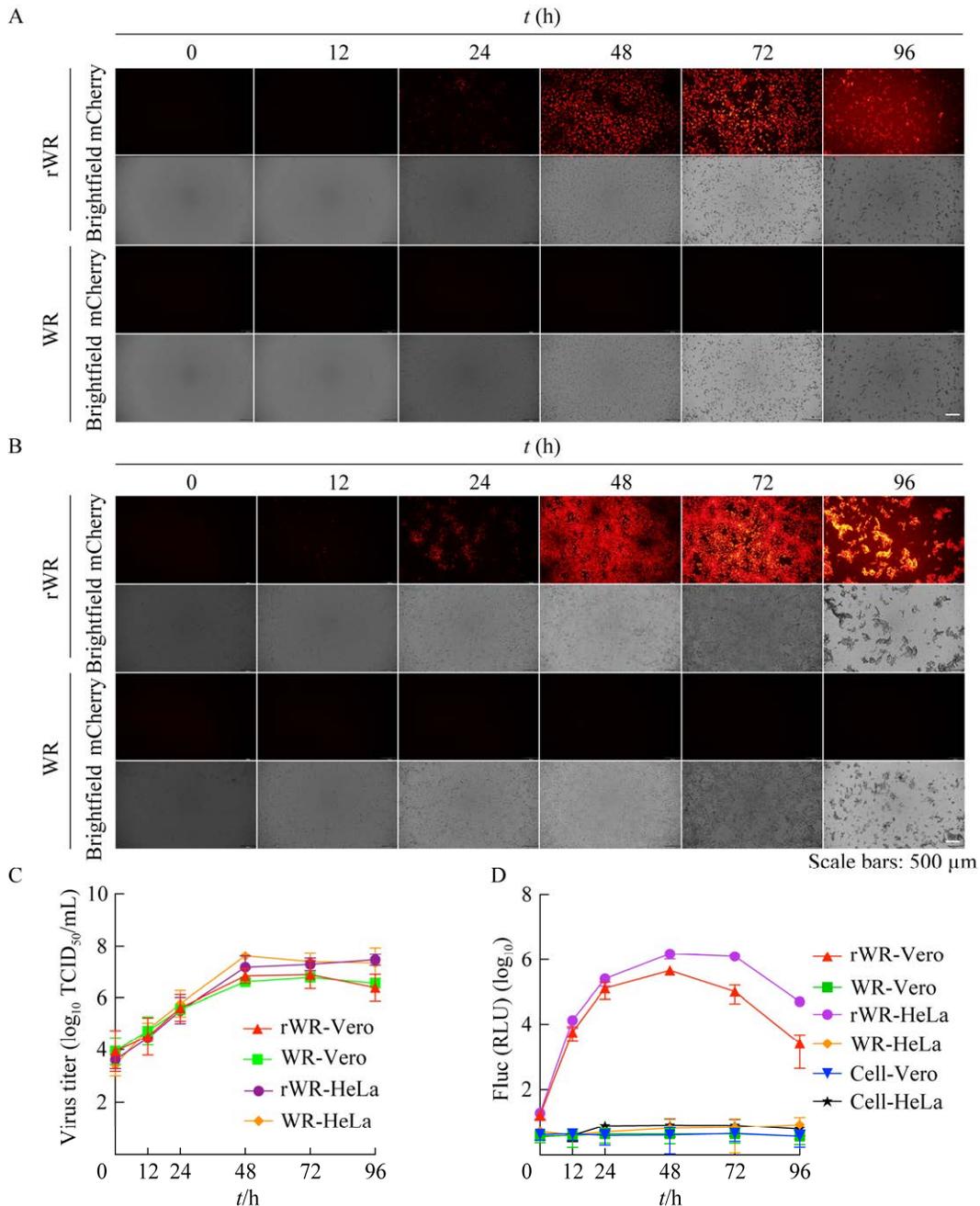


图 3 重组痘苗病毒在 Vero 和 HeLa 细胞中的复制动力学

Figure 3 Kinetics of replication of rWR in Vero and HeLa cells. A: Replication dynamics of infected Vero cells (mCherry fluorescence and cytopathic effects, upper: rWR, lower: WR). B: Replication dynamics of infected HeLa cells (mCherry fluorescence and cytopathic effects, upper: rWR, lower: WR). C: TCID<sub>50</sub> titer curves of Vero and HeLa cells after infection. D: Fluc activity curves of Vero and HeLa cells after infection with WR or rWR.

## 2.4 rWR 在体外抗正痘病毒药效学评价中的应用

为了解重组病毒 rWR 在抗正痘病毒药物筛选中的应用性能,本研究以 ST-246 为阳性药物,并以野生型病毒为对照病毒,在 Vero 细胞中,

通过空斑法、qPCR 法、mCherry 及 Fluc 活性等指标,对二者的药物半数有效浓度( $EC_{50}$ )进行了比较分析,并探讨了这些指标之间的相关性。空斑法结果显示,病毒的空斑数均随着药物浓度的降低而增多(图 4A),ST-246 对 rWR

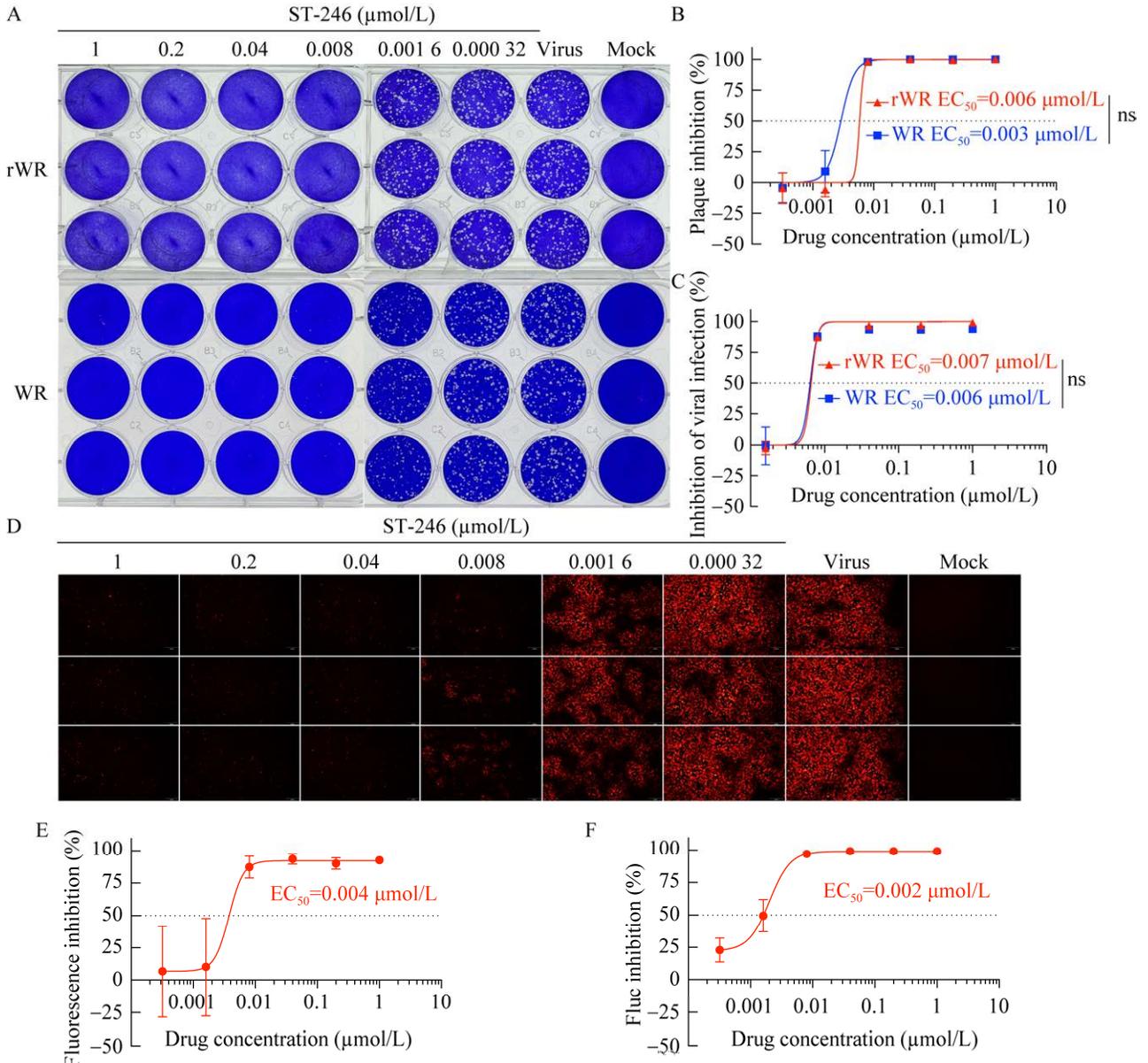


图 4 rWR 在体外抗正痘病毒药效学评价中的应用

Figure 4 Application of rWR for *in vitro* antiviral activity test (ST-246). A, B: The pharmacodynamics of ST-246 against orthopoxvirus *in vitro* was detected by plaque assay. C: The pharmacodynamics of ST-246 against orthopoxvirus *in vitro* was detected by qPCR assay. D, E: The pharmacodynamics of ST-246 against orthopoxvirus *in vitro* was detected by mCherry fluorescence foci assay. F: The pharmacodynamics of ST-246 against orthopoxvirus *in vitro* was detected by Fluc activity assay. ns: No significant difference.

与WR株的 $EC_{50}$ 分别为 $0.006 \mu\text{mol/L}$ 和 $0.003 \mu\text{mol/L}$ ,二者差异无统计学意义(图 4B)。qPCR 法结果显示,病毒复制的抑制率均随着药浓度的降低而降低(图 4C),ST-246 对 rWR 与 WR 的  $EC_{50}$  分别为  $0.007 \mu\text{mol/L}$  和  $0.006 \mu\text{mol/L}$  (图 4C)。rWR 特有的双报告基因系统检测结果表明:mCherry 荧光强度随着药物浓度的减少而量增多(图 4D),mCherry 定量分析的  $EC_{50}$  值为  $0.004 \mu\text{mol/L}$  (图 4E);同时,Fluc 荧光素酶活性随着 ST-246 浓度的减少而增加,呈现出剂量依赖性, $EC_{50}$  值为  $0.002 \mu\text{mol/L}$  (图 4F)。重组病毒与野生型病毒的相关性分析结果表明,2

株病毒采用空斑法和 qPCR 法测得的抑制率的相关性  $r$  值均大于  $0.8000$ ,  $P < 0.001$ , 具有良好的 consistency(图 5A、5B);重组病毒的 4 种不同指标的相关性分析结果也表明,各指标间之间存在良好的一致性,其中,Fluc 与 mCherry 与空斑法的  $r$  值均大于  $0.7000$ ,  $P < 0.001$  (图 5C、5D);空斑法与 qPCR 法的  $r$  值大于  $0.6000$ ,  $P < 0.01$  (图 5E);Fluc 与 mCherry 与 qPCR 法的  $r$  值均大于  $0.5000$ ,  $P < 0.05$  (图 5F、5G);Fluc 与 mCherry 的  $r$  值大于  $0.7000$ ,  $P < 0.001$  (图 5H)。

上述结果表明,rWR 株可以作为一个良好的模式病毒用于抗正痘病毒药物的体外筛选和评估。

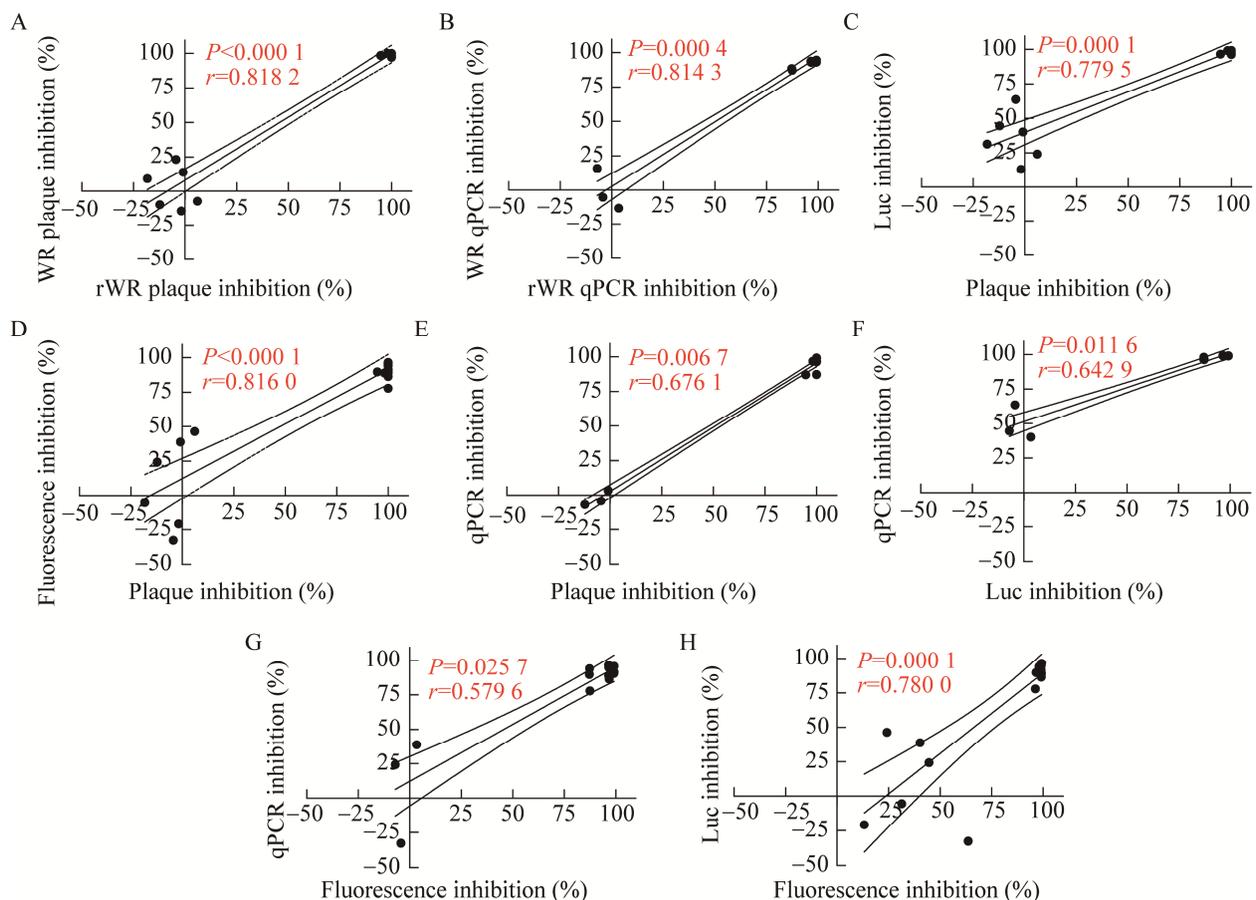


图 5 不同方法对重组病毒 rWR 与野生型病毒 WR 检测结果间相关性进行分析

Figure 5 Correlation analysis between rWR and WR base on different assays. A, B: The correlation between recombinant virus and wild type virus was analyzed by plaque assay and qPCR assay. C–H: Correlation analysis of various indexes of recombinant virus.

### 3 讨论与结论

尽管 2023 年 5 月世界卫生组织宣布猴痘疫情不再构成“国际关注的突发公共卫生事件”，但是猴痘病毒在全球范围内传播，严重威胁人类健康，加强对其基础研究并开发有效的抗病毒疫苗药物仍是正痘病毒研究的重要方向。构建携带多个报告基因的重组痘苗病毒，将大大促进疫苗药物研究的实时化、可视化与高通量化。本研究构建了携带 Fluc 与 mCherry 双报告基因的重组痘苗病毒 rWR，并初步探讨了其在抗病毒药物体外研究中的应用，为抗正痘病毒药物评价等研究提供了新的技术手段。

重组病毒构建策略方面，本研究采用了 CRISPR-Cas9 技术系统，该系统因其简便、高效、稳定的特性，在病毒基因工程操作中展现出显著优势<sup>[27]</sup>，尤其是其可以增加痘苗病毒基因组的修复概率<sup>[28]</sup>。袁航等<sup>[29]</sup>研究表明，在 BHK-21 细胞中预先转染含有 gRNA 及 Cas9 蛋白共表达质粒后，感染重组病毒液的噬斑计数中，白斑数量比未转染 gRNA 及 Cas9 共表达质粒的对照组显著减少，大约减少至对照组的 5%–10%，而蓝斑数量在两组间并未观察到显著差异，提示 CRISPR-Cas9 技术可有效促进重组蓝斑病毒的富集，有助于重组病毒的快速筛选。在重组区域选择方面，痘苗病毒的 TK 基因区域常被选作外源基因的插入位点，外源基因插入痘苗病毒的 TK 区后不影响病毒的复制周期，并且该基因在感染的早期阶段便开始表达，大大方便了重组病毒的筛选及早期鉴定<sup>[30]</sup>。本研究获得的 rWR 双报告基因重组病毒在噬斑形态和大小上与野生型病毒未显示出显著差异，且连续传代至 P12 代后病毒滴度可达  $10^6$  PFU/mL 以上，报告基因的表达稳定，具有良好的应用前景。

报告基因选择方面，荧光蛋白和荧光素酶蛋白各具优劣。荧光蛋白因其直观的细胞内表达特性，是检测重组病毒感染的首选；而荧光素酶在定量分析中展现出更高的灵敏度，在体内实验中更受关注<sup>[31]</sup>。考虑到表达单一报告基因的重组病毒难以同时发挥二者的优势，本研究选择了 mCherry 与 Fluc 双报告基因用于重组病毒的构建。本研究构建的重组病毒 rWR, Fluc 和 mCherry 报告基因均能获得有效表达，不仅可以通过荧光显微镜进行直观的观察、还能通过多功能酶标仪进行高通量的定量检测，双报告基因的设计既弥补了传统空斑法通量不足、耗时与步骤繁杂的缺陷，也弥补了传统 qPCR 法需要进行核酸提取、引物探针设计以及耗时较长的 PCR 反应过程，在实现检测手段的快速、便捷与高通量方面具有明显的优势。此外，本研究中 mCherry 报告基因不仅具有稳定性高、自发光背景低、毒性弱的特点<sup>[32]</sup>，并且还能与本研究中携带 EGFP 的 Cas9-gRNA 共表达质粒区分，有助于评估质粒转染效果；Fluc 高荧光信号强度和极低的背景信号，不仅有助于提高检测的灵敏性，更为将来的体内动物感染模型构建奠定了基础。值得注意的是，在病毒复制动力学的研究中，本研究分别采用了 TCID<sub>50</sub> 法与基于荧光素酶(Fluc)活性法进行的定量分析中仍存在一定差异，其中，基于 TCID<sub>50</sub> 滴定测得的病毒复制高峰点与平台期为感染后 72 h 与 96 h，而荧光素酶活性测得的病毒复制高峰点为感染后 48 h，二者存在一定差异，究其原因，可能与 2 种方法的原理及检测灵敏度的差异有关，TCID<sub>50</sub> 法主要依靠细胞病变的观察进行结果判断，当细胞病变达到观测终点后，结果相对稳定；而 Fluc 法主要依赖于荧光素酶与底物的活性结果判读，受底物的表达量、稳定性及酶活性的影响较大，在病毒感染 72 h 后细胞病

变程度较为严重, Fluc 的表达与活性也可能受到一定影响而降低, 因此在采用 Fluc 进行病毒感染复制特性研究时, 也应该与经典的病毒学研究方法相结合使用。

在病毒监测和感染研究领域, 双报告基因系统的应用提供了一种强有力的工具。该系统能够实时追踪和监测病毒感染的动态过程, 可以用于观察和分析病毒复制的各个阶段, 包括病毒基因组的转录与复制、病毒粒子的组装过程, 以及病毒粒子从宿主细胞中的释放等关键环节<sup>[33-34]</sup>。该系统的高度灵敏度和实时性, 使其成为研究病毒传播机制和制定有效防控措施的重要技术手段。本研究采用 ST-246 作为阳性药物, 系统比较了重组病毒 rWR 与野生型病毒 WR 株的应用性能与特点。ST-246 是首个获批用于治疗天花和猴痘的抗病毒药物<sup>[35-36]</sup>。Pires 等<sup>[37]</sup>采用空斑法在 BSC-40 细胞系中对野生型 WR 株进行了药效学评估, 测定其  $EC_{50}$  为  $0.0425 \mu\text{mol/L}$ ; Chiem 等<sup>[15]</sup>则利用报告基因系统在 A549 细胞系中对携带 Nluc 和 GFP 双报告基因的重组 WR 株进行了  $EC_{50}$  的测定, 分别为  $0.19 \mu\text{mol/L}$  和  $0.23 \mu\text{mol/L}$ 。本研究中采用空斑法、qPCR 法、Fluc 法及 mCherry 法测得的 ST-246  $EC_{50}$  分别为 0.006、0.007、0.002 及  $0.004 \mu\text{mol/L}$ , 与已有报道<sup>[38]</sup>相比均显示出纳摩尔级别的抗病毒效果,  $EC_{50}$  数值的差异, 可能与不同研究体系采用的药物来源、实验流程、细胞系、检测指标、检测指标灵敏度和检测终点的选择不同有关。在实验流程方面, 包括治疗性用药与预防性 2 种方式, 本研究的实验流程为预防和治疗性的全程给药, 该流程可同时用于进入抑制剂与复制抑制剂的药效学评价, 更适用于机制不清的药物的筛选与评价; 在检测材料选择方面, 考虑到痘苗病毒主要包含细胞内成熟病毒和细胞外包膜病毒 2 种感染性病

毒粒子, 本研究选取了细胞和上清作为检测材料, 有助于了解药物对病毒的整体抑制效果。此外, 本研究分析了传统空斑法和 qPCR 法测定的药物抑制率曲线与  $EC_{50}$ , ST-246 对 rWR ( $0.006 \mu\text{mol/L}$ ) 的抑制能力虽然在数值略低于 WR ( $0.003 \mu\text{mol/L}$ ), 但二者的差异无统计学意义; 本研究同时还分析了空斑法、qPCR 法、mCherry、Fluc 等多个指标的药物抑制率曲线与  $EC_{50}$  之间的相关性, 结果均表明, 携带双报告基因的重组病毒 rWR 在进行体外抗病毒药效学评价时与野生型病毒具有良好的一致性, 为该病毒进一步用于抗病毒药物筛选与药效学评价研究提供了科学依据。

本研究仍存在一定局限性。虽然在 Vero 细胞中研究了病毒连续 12 代的遗传稳定性, 并在 Vero 与 HeLa 细胞中探讨了其复制动力学, 但考虑到痘苗病毒细胞嗜性广, 应采用更多不同物种与遗传背景的细胞开展系统研究; 其次, 因痘苗病毒基因组庞大, 仅检测了报告基因 mCherry、Fluc 与 E3L 的表达, 而未开展病毒全基因组测序分析, 仍需更多代次的传代与全基因组水平的精细研究。此外, 后续还应进一步开展 rWR 动物体内的感染特性研究及其在体内抗病毒药效学评价研究中的应用。

综上所述, 本研究构建了可同时表达 Fluc 与 mCherry 的双报告基因且遗传稳定的重组痘苗病毒 rWR, 并采用 ST-246 作为阳性药物, 初步探讨了该病毒在抗病毒药物体外研究中的应用, 为深入开展抗正痘病毒疫苗药物及致病机制研究奠定了基础。

## 作者贡献声明

孙洁伟: 方案设计、数据管理、形式分析、实验操作、方法设计、有效性验证、可视化、初稿写作; 黄保英: 数据管理、方案设计、经

费支持、审查和编辑写作；王梦微、吴依依、楚巧鸿、霍恕婷、赵莉：数据管理、实验操作、提供材料；翟德胜：监督指导、审查和编辑写作；邓瑶：监督指导、经费支持、提供材料；赵营：监督指导、审查和编辑写作；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

作者声明没有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] de CLERCQ E, JIANG YK, LI GD. Therapeutic strategies for human poxvirus infections: monkeypox (mpox), smallpox, molluscipox, and orf[J]. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 2023, 52: 102528.
- [2] DIVEN DG. An overview of poxviruses[J]. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2001, 44(1): 1-16.
- [3] KOŁODZIEJ M, JONIEC J, BARTOSZCZE M, GRYKO R, KOCIK J, KNAP J. Research on substances with activity against orthopoxviruses[J]. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2013, 20(1): 1-7.
- [4] ESSBAUER S, PFEFFER M, WILHELM S, MEYER H. Zoonotic poxviruses[J]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*, 2004, 47(7): 671-679.
- [5] HENDERSON DA. Smallpox virus destruction and the implications of a new vaccine[J]. *Biosecurity and Bioterrorism*, 2011, 9(2): 163-168.
- [6] WHO. 2022-24 Mpox (Monkeypox) Outbreak: Global Trends[EB/OL]. [2024-4-10]. [https://worldhealthorg.shinyapps.io/mpx\\_global](https://worldhealthorg.shinyapps.io/mpx_global).
- [7] PARKER RF, BRONSON LH, GREEN RH. Further studies of the infectious unit of vaccinia[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 1941, 74(3): 263-281.
- [8] SMEE DF, BAILEY KW, SIDWELL RW. Treatment of lethal vaccinia virus respiratory infections in mice with cidofovir[J]. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 2001, 12(1): 71-76.
- [9] SMEE DF, BAILEY KW, WONG MH, SIDWELL RW. Effects of cidofovir on the pathogenesis of a lethal vaccinia virus respiratory infection in mice[J]. *Antiviral Research*, 2001, 52(1): 55-62.
- [10] ZEH HJ, DOWNS-CANNER S, MCCART JA, GUO ZS, RAO UNM, RAMALINGAM L, THORNE SH, JONES HL, KALINSKI P, WIECKOWSKI E, O'MALLEY ME, DANESHMAND M, HU K, BELL JC, HWANG TH, MOON A, BREITBACH CJ, KIRN DH, BARTLETT DL. First-in-man study of western reserve strain oncolytic vaccinia virus: safety, systemic spread, and antitumor activity[J]. *Molecular Therapy*, 2015, 23(1): 202-214.
- [11] HALANI S, LEONG D, WU PE. Tecovirimat for monkeypox[J]. *CMAJ*, 2022, 194(46): E1573.
- [12] HOY SM. Tecovirimat: first global approval[J]. *Drugs*, 2018, 78(13): 1377-1382.
- [13] WARNER BM, KLASSEN L, SLOAN A, DESCHAMBAULT Y, SOULE G, BANADYGA L, CAO JX, STRONG JE, KOBASA D, SAFRONETZ D. *In vitro* and *in vivo* efficacy of tecovirimat against a recently emerged 2022 monkeypox virus isolate[J]. *Science Translational Medicine*, 2022, 14(673): eade7646.
- [14] RUSSO AT, GROSENBACH DW, BRASEL TL, BAKER RO, CAWTHON AG, REYNOLDS E, BAILEY T, KUEHL PJ, SUGITA V, AGANS K, HRUBY DE. Effects of treatment delay on efficacy of tecovirimat following lethal aerosol monkeypox virus challenge in *Cynomolgus* macaques[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2018, 218(9): 1490-1499.
- [15] CHIEM K, NOGALES A, LORENZO M, MORALES VASQUEZ D, XIANG Y, GUPTA YK, BLASCO R, deLa TORRE JC, MARTÍNEZ-SOBRIDO L. Identification of *in vitro* inhibitors of monkeypox replication[J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(4): e0474522.
- [16] ZHANG ZR, ZHANG HQ, LI XD, DENG CL, WANG Z, LI JQ, LI N, ZHANG QY, ZHANG HL, ZHANG B, YE HQ. Generation and characterization of Japanese encephalitis virus expressing GFP reporter gene for high throughput drug screening[J]. *Antiviral Research*, 2020, 182: 104884.
- [17] CHOE J, GUO HH, van den ENGH G. A dual-fluorescence reporter system for high-throughput clone characterization and selection by cell sorting[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(5): e49.
- [18] OKOLI A, OKEKE MI, TRYLAND M, MOENS U. CRISPR/Cas9-advancing orthopoxvirus genome editing for vaccine and vector development[J]. *Viruses*, 2018, 10(1): 50.
- [19] 吴雅彬, 赵莉, 任皎, 袁航, 张鹏, 叶飞, 田厚文, 王文玲, 谭文杰. 基于 CRISPR-Cas9 的痘苗病毒高

- 效重组体系的建立[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2021, 35(2): 199-204.
- WU YB, ZHAO L, REN J, YUAN H, ZHANG P, YE F, TIAN HW, WANG WL, TAN WJ. CRISPR-Cas9 system for construction of highly efficient recombinant vaccinia virus[J]. Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology, 2021, 35(2): 199-204 (in Chinese).
- [20] WANG D, WANG XW, PENG XC, XIANG Y, SONG SB, WANG YY, CHEN L, XIN VW, LYU YN, JI JF, MA ZW, LI CB, XIN HW. CRISPR/Cas9 genome editing technology significantly accelerated herpes simplex virus research[J]. Cancer Gene Therapy, 2018, 25(5/6): 93-105.
- [21] CONCORDET JP, HAEUSSLER M. CRISPR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(W1): W242-W245.
- [22] THEVENIN T, LOBERT PE, HOBER D. Inactivation of an enterovirus by airborne disinfectants[J]. BMC Infectious Diseases, 2013, 13: 177.
- [23] HUO ST, CHEN YD, LU RJ, ZHANG ZX, ZHANG GQ, ZHAO L, DENG Y, WU CC, TAN WJ. Development of two multiplex real-time PCR assays for simultaneous detection and differentiation of monkeypox virus I<sub>2a</sub>, I<sub>2b</sub>, and I clades and the B.1 lineage[J]. Biosafety and Health, 2022, 4(6): 392-398.
- [24] GROSENBACH DW, HRUBY DE. Preliminary screening and *in vitro* confirmation of orthopoxvirus antivirals[J]. Methods in Molecular Biology, 2019, 2023: 143-155.
- [25] WANG ML, CAO RY, ZHANG LK, YANG XL, LIU J, XU MY, SHI ZL, HU ZH, ZHONG W, XIAO GF. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) *in vitro*[J]. Cell Research, 2020, 30(3): 269-271.
- [26] di GIOIA C, YUAN M, WANG YH. Vaccinia virus genome editing using CRISPR[J]. Methods in Molecular Biology, 2019, 2023: 109-117.
- [27] YUAN M, WEBB E, LEMOINE NR, WANG YH. CRISPR-Cas9 as a powerful tool for efficient creation of oncolytic viruses[J]. Viruses, 2016, 8(3): 72.
- [28] GOWRIPALAN A, SMITH S, STEFANOVIC T, TSCHARKE DC. Rapid poxvirus engineering using CRISPR/Cas9 as a selection tool[J]. Communications Biology, 2020, 3(1): 643.
- [29] 袁航, 任皎, 赵莉, 豆亚美, 田厚文, 王文玲, 谭文杰. 痘苗病毒天坛株 F1L 区高效重组方法的建立[J]. 病毒学报, 2022, 38(4): 791-798.
- YUAN H, REN J, ZHAO L, DOU YM, TIAN HW, WANG WL, TAN WJ. Establishment of an efficient recombinant method in the F1L region of Tiantan vaccinia virus[J]. Chinese Journal of Virology, 2022, 38(4): 791-798 (in Chinese).
- [30] MACKETT M, SMITH GL, MOSS B. General method for production and selection of infectious vaccinia virus recombinants expressing foreign genes[J]. Journal of Virology, 1984, 49(3): 857-864.
- [31] THORNE N, INGLESE J, AULD DS. Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology[J]. Chemistry & Biology, 2010, 17(6): 646-657.
- [32] SHANER NC, CAMPBELL RE, STEINBACH PA, GIEPMANS BNG, PALMER AE, TSIEN RY. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein[J]. Nature Biotechnology, 2004, 22(12): 1567-1572.
- [33] DRAYMAN N, KARIN O, MAYO A, DANON T, SHAPIRA L, RAFAEL D, ZIMMER A, BREN A, KOBILER O, ALON U. Dynamic proteomics of herpes simplex virus infection[J]. mBio, 2017, 8(6): e01612-17.
- [34] LIU SL, WANG ZG, XIE HY, LIU AN, LAMB DC, PANG DW. Single-virus tracking: from imaging methodologies to virological applications[J]. Chemical Reviews, 2020, 120(3): 1936-1979.
- [35] HUNG YP, LEE CC, LEE JC, CHIU CW, HSUEH PR, KO WC. A brief on new waves of monkeypox and vaccines and antiviral drugs for monkeypox[J]. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 2022, 55(5): 795-802.
- [36] JORDAN R, LEEDS JM, TYAVANAGIMATT S, HRUBY DE. Development of ST-246<sup>®</sup> for treatment of poxvirus infections[J]. Viruses, 2010, 2(11): 2409-2435.
- [37] PIRES MA, RODRIGUES NFS, de OLIVEIRA DB, de ASSIS FL, COSTA GB, KROON EG, MOTA BEF. *In vitro* susceptibility to ST-246 and Cidofovir corroborates the phylogenetic separation of Brazilian Vaccinia virus into two clades[J]. Antiviral Research, 2018, 152: 36-44.
- [38] FRENOIS-VEYRAT G, GALLARDO F, GORGÉ O, MARCHETEAU E, FERRARIS O, BAI DALIUK A, FAVIER AL, ENFROY C, HOLY X, LOURENCO J, KHOURY R, NOLENT F, GROSENBACH DW, HRUBY DE, FERRIER A, ISENI F, SIMON-LORIERE E, TOURNIER JN. Tecovirimat is effective against human monkeypox virus *in vitro* at nanomolar concentrations[J]. Nature Microbiology, 2022, 7(12): 1951-1955.