



DOI: 10.13881/j.cnki.hljxmsy.2023.09.0205

表达 SFTSV Gn 基因的重组 5 型腺病毒的构建与鉴定

张璇, 王新宇, 刘宇婷, 涂影叶, 梁耀文, 易昌华, 殷国平*

(南京中医药大学 附属南京医院, 南京 210003)



中图分类号: S829.9

文献标识码: A

文章编号: 1004-7034(2024)09-0008-06

摘要: 为了构建出表达新布尼亚病毒(SFTSV) Gn 基因的重组 5 型腺病毒, 试验根据 GenBank 上发表的 SFTSV Gn 基因序列(登录号为 ADZ04482.1)设计合成引物, 采用特异性 PCR 方法在 Gn 基因前添加了 KOZAK 序列和 tPA 信号肽序列; 然后通过酶切、连接等方法构建重组穿梭质粒 PGA-KOZAK-tPA-Gn, 与腺病毒骨架质粒 pAd5- Δ E1 Δ E3-5E4 在 BJ5183 感受态细胞中进行同源重组, 得到重组腺病毒质粒 rAd5-KOZAK-tPA-Gn, 用 Pac I 酶酶切重组腺病毒质粒, 并将线性化的质粒转染至 HEK 293 细胞中进行病毒包装、扩繁和纯化; 采用 PCR 扩增、Western-blot 等技术检测病毒基因的表达情况, 并测定重组腺病毒效价。结果表明: 通过 PCR 扩增获得了 1 546 bp 的 KOZAK-tPA-Gn 基因, 并成功构建了重组穿梭质粒; SFTSV Gn 基因在重组腺病毒传代过程中稳定存在; 重组腺病毒在 HEK 293 细胞中表达出分子量约为 61 ku 的 SFTSV Gn 蛋白; 测得重组腺病毒效价为 $1 \times 10^{-7.63}$ / 0.1 mL TCID₅₀。说明试验成功构建出表达 SFTSV Gn 基因的重组 5 型腺病毒。

关键词: 新布尼亚病毒; Gn 基因; 重组 5 型腺病毒; 质粒构建; HEK 293 细胞

Construction and identification of recombinant adenovirus type 5 expressing SFTSV Gn gene

ZHANG Xuan, WANG Xinyu, LIU Yuting, TU Yingye, LIANG Yaowen, YI Changhua, YIN Guoping*

(Nanjing Hospital Affiliated to Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210003, China)

Abstract: In order to construct a recombinant adenovirus type 5 expressing the novel Bunya virus (SFTSV) Gn gene, primers were designed and synthesized based on the SFTSV Gn gene sequence published in GenBank (ADZ04482.1), and the KOZAK sequence and tPA signal peptide sequence were added to the Gn gene by specific PCR method. Then, a recombinant shuttle plasmid PGA-KOZAK-tPA-Gn was constructed by enzyme digestion and ligation, and homologous recombination with the adenovirus skeleton plasmid pAd5- Δ E1 Δ E3-5E4 was performed in BJ5183 receptor cells to obtain the recombinant adenovirus plasmid rAd5-KOZAK-tPA-Gn. The recombinant adenovirus plasmid was cleaved using Pac I enzyme, and the linearized plasmid was transfected into HEK 293 cells for virus packaging, propagation, and purification. PCR, Western-blot and other techniques were used to detect the expression of viral genes, and the titer of the recombinant adenovirus was determined. The results showed that 1 546 bp KOZAK-tPA-Gn gene was obtained by PCR amplification, and the recombinant shuttle plasmid was successfully constructed. SFTSV Gn gene was stable during the passage of recombinant adenovirus. Recombinant adenovirus expressed SFTSV Gn protein with molecular weight of 61 ku in HEK 293 cells. The titer of the recombinant adenovirus was measured to be $1 \times 10^{-7.63}$ / 0.1 mL TCID₅₀. These results indicated that recombinant adenovirus type 5 expressing SFTSV Gn gene was successfully constructed.

Keywords: new Bunya virus; Gn gene; recombinant adenovirus type 5; plasmid construction; HEK 293 cells

发热伴血小板减少综合征(SFTS)是新布尼亚病毒(Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus, SFTSV)感染引起的一种新的人兽共患传染病^[1]。SFTS 主要表现为高热、血小板减少、出血、神经系统异常等症状,严重时导致多器官衰竭^[2-3]。目前, SFTSV 主要通过长角血蜱进行传播^[4],但其终宿主尚不清楚。近年来,从许多种动物如狗、羊、牛、老鼠、猎豹等体内检出了 SFTSV 基因和抗体^[5-6],说明 SFTSV 在动物中具有广泛的传染性。此外,流行病学调查结果显示,家畜可能是 SFTSV 的中间宿主,通过

蜱虫叮咬及接触家畜血液或分泌物等途径传播给人类^[7-8]。SFTS 是一种新兴的蜱传疾病,严重威胁着人类和动物的生命安全。因此,研发针对 SFTSV 的人畜共用疫苗迫在眉睫。

SFTSV 是一种直径为 80~100 nm 的包膜 RNA 病毒,由 3 个片段(L 段、M 段、S 段)组成。L 段编码 RNA 依赖性 RNA 聚合酶; M 段编码一种糖蛋白前体,其通过水解产生 Gn 和 Gc 糖蛋白; S 段分别编码结构蛋白和非结构蛋白^[9-10]。Gn 和 Gc 糖蛋白能够通过与宿主细胞表面受体结合增强病毒的黏附和侵

收稿日期: 2023-09-28; 修回日期: 2024-04-09

基金项目: 国家自然科学基金委员会重大研究计划项目(92169106)

作者简介: 张璇(1998—)女,硕士研究生,研究方向为病毒学,20211783@njucm.edu.cn.

通信作者: 殷国平(1969—)男,教授,硕士,硕士生导师,研究方向为麻醉学,yinguoping0304@163.com.

入能力^[11]。Wu Y.等^[12]研究发现,SFTSV Gn蛋白含有中和抗体识别位点,可以诱导机体产生中和抗体。此外,SFTS患者血液中存在SFTSV Gn特异性抗体IgG,并且SFTSV Gn蛋白中和抗体与病情预后密切相关^[13]。J. E. Kwak等^[14]研究发现,SFTSV的Gn、Gc、N、NS和RdRp等多个基因的DNA疫苗能够诱导机体产生免疫应答,产生中和抗体,从而预防SFTSV感染引起的死亡。单剂量共表达狂犬病病毒(RABV)糖蛋白和SFTSV Gn蛋白的重组复制缺陷型5型人腺病毒疫苗诱导了针对SFTSV和RABV的中和抗体,并降低了脾脏病毒载量^[15]。因此,SFTSV Gn蛋白可能具有作为新型SFTSV疫苗的潜在候选分子。

目前,针对SFTSV的特效药物和成熟疫苗尚未问世,因此迫切需要开发一种安全、稳定、高效的新型SFTSV疫苗。由于腺病毒具有稳定性好、外源DNA容量大、宿主范围广等优势,本试验通过在SFTSV Gn基因编码区引入KOZAK序列和tPA信号肽序列,成功构建编码SFTSV Gn蛋白的重组腺病毒质粒,并将其转染至HEK 293细胞中,以期获得表达SFTSV Gn基因的重组5型腺病毒,为研制新型SFTSV疫苗奠定基础。

1 材料

1.1 质粒、菌株和细胞

Top10感受态细胞、JM110感受态细胞、XL1-Blue感受态细胞,均购自上海唯地生物技术有限公司;腺病毒骨架质粒pAd5- Δ E1 Δ E3-5E4、穿梭质粒PGA-CAR、HEK 293细胞及BJ5183感受态细胞,均由南京第二医院实验室提供。

1.2 主要试剂

限制性内切酶Hind III、Kpn I、Xba I、BstZ17 I、SgRA I、Cla I和Pac I,均购自美国NEB公司;T4 DNA连接酶,购自南京诺维赞生物科技有限公司;LB肉汤、Taq DNA聚合酶、WB-抗二抗去除液、QuickShuttle-293,均购自南京普诺恩生物技术有限公司;SFTSV Gn多克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔IgG(H+L)抗体、GAPDH rabbit pAb,均由博奥龙生物科技有限公司提供;琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒,购自广州美基生物科技有限公司;LB营养琼脂平板(含amp),购自索莱宝生物科技有限公司;DMEM培养基,购自赛维尔生物科技有限公司。

1.3 主要仪器

梯度PCR仪(型号为BIO-RAD-T100),购自美国应用生物系统公司;蛋白电泳槽(型号为DYCZ-24EN),购自美国Bio-Rad公司;Touch Imager接触式化学发光成像系统(型号为AGP2341Y02),购自易亨特生命科学(上海)有限公司;CO₂培养箱(型号为

STERZ-CYCLEi160)、高速冷冻离心机(型号为LYWX6000),均购自美国Thermo Fisher Scientific公司;恒温培养振荡器(型号为ZWY-100D),购自上海智城分析仪器制造有限公司;倒置荧光显微镜(型号为TS2-PL),购自尼康公司;水浴锅(DX-8D),购自精宏实验设备有限公司;紫外分光光度计(型号为6136BM300848),购自艾本德(上海)国际贸易有限公司。

2 方法

2.1 基因的合成与引物的设计

根据GenBank中SFTSV Gn基因序列(登录号为ADZ04482.1),试验截取了SFTSV Gn基因的开放阅读框序列,委托金斯瑞生物科技股份有限公司合成SFTSV Gn基因。利用SnapGene软件设计引物,在Gn基因的上游引物5'端添加含有47个碱基的部分tPA信号肽序列;在tPA-Gn基因的上游引物5'端添加6个碱基的KOZAK序列和52个碱基的部分tPA信号肽序列,并进行PCR扩增获得KOZAK-tPA-Gn基因;在KOZAK-tPA-Gn基因的上游引物5'端添加限制性内切酶Hind III的酶切位点,在KOZAK-tPA-Gn基因的下游引物5'端添加限制性内切酶Xba I的酶切位点,并都在5'端添加保护碱基GC。所有引物均由北京擎科生物科技股份有限公司合成,引物信息见表1。

2.2 KOZAK-tPA-Gn基因的PCR扩增

用tPA-F1和tPA-R1引物特异性扩增SFTSV Gn基因,经琼脂糖凝胶电泳分析后,用琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒纯化目标片段;将带有部分tPA信号肽基因序列的tPA-Gn基因利用tPA-F2、tPA-R2引物进行特异性PCR扩增,再以回收的扩增产物为模板,以F-Hind III和R-Xba I为引物进行PCR扩增。PCR扩增体系(总体积为25 μ L):5 \times SF Buffer 5 μ L,模板DNA 0.5 μ L,上下游引物各1 μ L,Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase 0.5 μ L,DEPC水17 μ L。PCR扩增程序:95 $^{\circ}$ C预变性3 min;95 $^{\circ}$ C变性8 s,60 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸45 s,共30个循环;72 $^{\circ}$ C再延伸10 min;4 $^{\circ}$ C保存。对KOZAK-tPA-Gn基因进行纯化回收,检测浓度并置-20 $^{\circ}$ C冰箱中保存,备用。

2.3 重组穿梭质粒PGA-KOZAK-tPA-Gn的构建及酶切鉴定

为了构建重组穿梭质粒PGA-KOZAK-tPA-Gn,使用限制性内切酶Hind III和Xba I分别对PGA-CAR穿梭质粒和KOZAK-tPA-Gn基因进行双酶切,并通过琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒回收带有黏性末端的酶切质粒和目的片段,用紫外分光光度计测定酶切质粒和目的片段的浓度。然后,用T4 DNA连接酶



于16 °C对目的片段与PGA-CAR酶切质粒进行连接过夜。连接成功后将重组穿梭质粒转化至Top10感受态细胞中,在LB营养琼脂平板(含amp)中培养。最后扩增连接成功的重组穿梭质粒,并从LB营养

琼脂平板(含amp)中筛选单克隆菌落,转移到含3~4 mL LB肉汤的15 mL离心管中,置37 °C恒温培养振荡器中以220 r/min过夜培养,提取质粒,并进行酶切和核酸凝胶电泳鉴定。

表1 引物信息

Table 1 Primer information

基因	引物名称	引物序列	预扩增片段大小/bp	退火温度/°C
tPA-Gn	tPA-F1	5'-TGCTGTGTGGGGCTGTGTTTCGTGTCCCCTAGCCAGGAGATCCACGGCACCAGT-ATGGACTCGGGCCCAATCA-3'	1 448	62
	tPA-R1	5'-TTTGTAAATCAATATCATGATCCTTGTAGTCTCCGTCGTGGTCCCTTATAGTCG-CTAGCATATCCAAGGAGGATGACAAT-3'		
KOZAK-tPA-Gn	tPA-F2	5' - - AATTCCTGCAGGCCTCGAG GCCACC ATGGACGCCATGAAACGGGGCCTGTGC-TGTGTCTCTTGCTGTGTGGGGCTG-3'	1 570	75
	tPA-R2	5' - CGGCGCGCCGGCCCTCGATTAATGATGATGATGATGGTGCCTGGGCTTAT-CGTCATCGTCTTTGTAATCAATATCATGATCCTTGTAG-3'		
KOZAK-tPA-Gn	F-Hind III	5'-GCAAGCTTGGCACCATGGACGCCATGAA-3'	1 546	60
	R-Xba I	5'-GCTCTAGAATGATGATGATGATGGTGCC-3'		

注:斜体部分为部分tPA信号肽序列,方框部分为KOZAK序列,下画线部分为酶切位点。

2.4 重组腺病毒 rAd5-KOZAK-tPA-Gn 的构建、包装、纯化及 PCR 鉴定

对重组穿梭质粒PGA-KOZAK-tPA-Gn进行BstzI7 I和SgRA I双酶切并回收,同时对腺病毒骨架质粒pAd5-ΔE1ΔE3-5E4进行Cla I酶切并回收;将这些片段转化至BJ5183感受态细胞内进行同源重组。在转化后涂于LB营养琼脂平板(含amp)上,置37 °C、CO₂培养箱中培养;提取重组腺病毒质粒rAd5-KOZAK-tPA-Gn,将质粒继续转化至XL1-Blue感受态细胞中进行质粒扩增,提取重组腺病毒质粒rAd5-KOZAK-tPA-Gn并送北京擎科生物科技股份有限公司测序验证。用限制性内切酶Pac I酶切重组腺病毒质粒rAd5-KOZAK-tPA-Gn,回收并纯化线性化质粒;采用脂质体法将rAd5-KOZAK-tPA-Gn质粒转染到HEK 293细胞中,每隔5 d观察细胞状态,若细胞出现明显病变,收集细胞和上清液,收获重组腺病毒rAd5-KOZAK-tPA-Gn;吸取上清液,用其感染6孔板中密度达到90%~100%的HEK 293细胞,以获得第1代病毒;用反复冻融后的上清液(第1代)继续感染10 cm培养皿中密度为90%的HEK 293细胞,得到第2代和第3代病毒;将第3代病毒上清液在液氮和37 °C水浴锅中反复冻融3次,采用氯化铯密度梯度离心法纯化腺病毒;以第3代病毒的DNA为模板,tPA-F2和tPA-R2为特异性引物,通过PCR方法验证KOZAK-tPA-Gn基因是否能在病毒传代增殖过程中稳定存在。PCR扩增体系和程序同2.2。

2.5 效价的测定

用DMEM培养基稀释纯化及脱盐后的病毒液,

稀释倍数为 $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^{10}$ 倍,取96孔细胞培养板,将100 μL相同稀释倍数的病毒液依次添加到每列8个孔中,最后两列加入DMEM培养基作为阴性对照;以DMEM培养基为稀释液稀释HEK293细胞,使每100 μL悬浮液中含 2×10^4 个细胞,在96孔细胞培养板的第1~10列中加入100 μL细胞悬浮液,置37 °C、CO₂培养箱中培养3~7 d,每天记录细胞的病变情况,然后采用Karber法计算病毒效价。

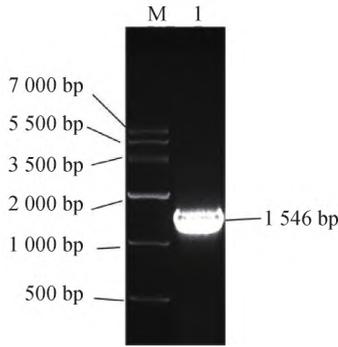
2.6 Western-blot 检测

用重组腺病毒rAd5-KOZAK-tPA-Gn感染HEK 293细胞(重组腺病毒感染组),48 h后提取细胞蛋白,以SFTSV Gn多克隆抗体作为一抗、HRP标记的羊抗兔IgG(H+L)抗体作为二抗进行Western-blot检测;以pAd5-ΔE1ΔE3-5E4感染的HEK 293细胞和正常HEK 293细胞作为阴性对照组1和2。

3 结果与分析

3.1 KOZAK-tPA-Gn 基因的 PCR 扩增

以SFTSV Gn基因作为模板,使用表1中的引物进行PCR扩增,再以纯化的扩增产物为模板,通过特异性PCR方法扩增出含有完整KOZAK序列和tPA信号肽序列的KOZAK-tPA-Gn基因。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析后,通过对KOZAK-tPA-Gn基因进行特异性PCR扩增得到一条长度约为1 546 bp的条带(见图1),与预测结果一致。说明试验成功扩增出带有Hind III、Xba I酶切位点的KOZAK-tPA-Gn基因。



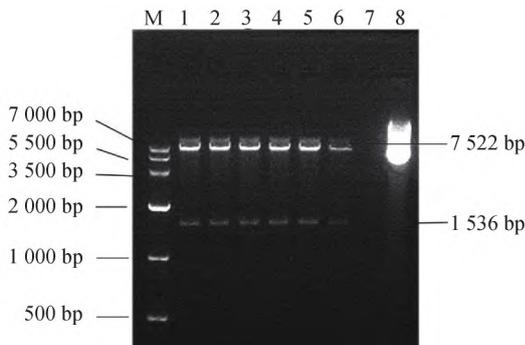
M.DL-7 000 Marker; 1.KOZAK-tPA-Gn 基因。

图1 KOZAK-tPA-Gn 基因的 PCR 扩增结果

Fig.1 PCR amplification results of KOZAK-tPA-Gn gene

3.2 重组穿梭质粒 PGA-KOZAK-tPA-Gn 的酶切鉴定

使用限制性内切酶 Hind III 和 Xba I 对含有酶切位点的目的序列(KOZAK-tPA-Gn ,1 546 bp) 进行双酶切,得到了带有黏性末端的 KOZAK-tPA-Gn 基因片段,大小为 1 536 bp。对穿梭质粒 PGA-CAR 进行 Hind III 和 Xba I 双酶切,并通过琼脂糖凝胶电泳回收带有黏性末端的酶切质粒。将带有黏性末端的 KOZAK-tPA-Gn 基因片段与酶切质粒连接过夜,然后进行转化与扩增。对获得的重组穿梭质粒 PGA-KOZAK-tPA-Gn 进行 Hind III 和 Xba I 双酶切,经酶切后得到 2 个大小分别为 1 536 bp 和 7 522 bp 的条带(见图 2) ,与预期结果相符。



M.DL-7 000 Marker; 1~6.重组穿梭质粒酶切产物; 7.水对照; 8.重组穿梭质粒。

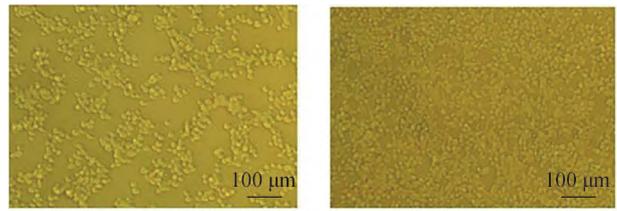
图2 重组穿梭质粒 PGA-KOZAK-tPA-Gn 的酶切鉴定结果

Fig.2 Identification result of recombinant shuttle plasmid PGA-KOZAK-tPA-Gn by enzyme digestion

3.3 重组腺病毒 rAd5-KOZAK-tPA-Gn 的包装、纯化及目的基因的检测

HEK 293 细胞在转染线性化的腺病毒质粒 10 d 后出现明显的病变。在 90% 细胞出现不同程度的病变时收集病毒,并将其接种于 HEK 293 细胞中进行传代培养。在细胞传至第 3 代时,经病毒感染 48 h 后均可见不同程度的细胞病变,而未接种重组腺病毒

的细胞结构完好,见图 3。



A 接种重组腺病毒 48 h 后的细胞病变

B 未接种重组腺病毒的细胞

图3 重组腺病毒 rAd5-KOZAK-tPA-Gn 的包装结果

Fig.3 Packaging results of recombinant adenovirus rAd5-KOZAK-tPA-Gn

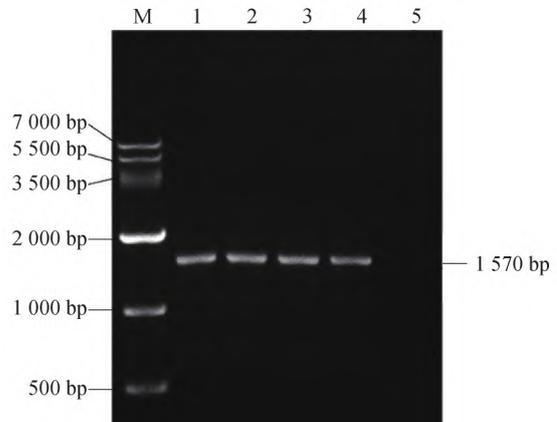
采用氯化铯密度梯度离心法对第 3 代重组腺病毒进行纯化,分离出纯化的重组腺病毒 rAd5-KOZAK-tPA-Gn,结果见图 4。



图4 重组腺病毒 rAd5-KOZAK-tPA-Gn 的纯化结果

Fig.4 Purification result of recombinant adenovirus rAd5-KOZAK-tPA-Gn

用特异性引物 tPA-F2、tPA-R2 对第 3 代重组腺病毒 rAd5-KOZAK-tPA-Gn 进行 PCR 鉴定,结果(见图 5) 扩增出大小为 1 570 bp 的目的条带,说明目的基因稳定地存在于腺病毒基因组中。



M.DL-7 000 Marker; 1~4.第 3 代重组腺病毒 PCR 产物; 5.水对照。

图5 重组腺病毒 rAd5-KOZAK-tPA-Gn 的 PCR 鉴定结果

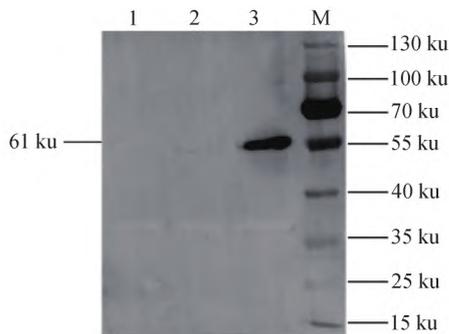
Fig.5 PCR identification results of the target gene of recombinant adenovirus rAd5-KOZAK-tPA-Gn

3.4 重组腺病毒 rAd5-KOZAK-tPA-Gn 效价测定结果

在 96 孔细胞培养板上计算病毒效价,在稀释 $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^6$ 倍时,所有孔细胞都出现了细胞病变;稀释 1×10^7 倍时有 5 个孔的细胞出现细胞病变,稀释 1×10^8 倍时有 3 个孔的细胞出现细胞病变,稀释 1×10^9 倍时有 1 个孔的细胞出现细胞病变,稀释 1×10^{10} 倍时没有细胞出现细胞病变,所以经 Karber 法计算病毒效价为 $1 \times 10^{-7.63} / 0.1 \text{ mL TCID}_{50}$ 。

3.5 重组腺病毒 rAd5-KOZAK-tPA-Gn 表达产物的 Western-blot 检测

结果见图 6。



1.pAd5- $\Delta E1\Delta E3-5E4$ 感染的 HEK 293 细胞; 2.正常的 HEK 293 细胞;
3.重组腺病毒感染的 HEK 293 细胞; M.预染的蛋白质 Marker。

图 6 重组腺病毒 rAd5-KOZAK-tPA-Gn 表达产物的 Western-blot 检测结果

Fig.6 Result of Western-blot detection of recombinant adenovirus rAd5-KOZAK-tPA-Gn expression products

由图 6 可知,与两个阴性对照组相比,重组腺病毒感染组观察到约 61 ku 的目的条带。

4 讨论与结论

SFTS 是近年来国内新发现的具有较高死亡率的人兽共患传染病,我国的病死率为 16.6%,韩国为 28.8%,日本为 31%^[16-17]。免疫是控制 SFTS 最经济、快捷的手段,因此迫切需要研发一种既能保护高风险人群,又能有效阻断家畜与宠物传播途径的新型疫苗。SFTSV Gn 是中和抗体的靶点,是致病机制和疫苗研究的重点^[18-19]。因此,本试验选择 SFTSV Gn 基因作为研究靶点。

SFTSV Gn 基因可在减毒重组痘苗病毒^[20]及重组水疱性口炎病毒^[21]中表达,疫苗可诱导小鼠产生中和抗体,但存在一定的安全隐患。因此,有必要选择安全的复制缺陷型载体。Ad5 在体内稳定、效价高且不与宿主基因组结合。Li J. X.等^[22]研究发现,用 Ad5 制备的新型冠状病毒疫苗具有较高的免疫原性。此外,Xu F.等^[23]用 Ad5 表达 SARS-nCoV-2 型刺突蛋白,发现吸入型 Ad5-nCoV 可有效诱导恒河猴产生抗 SARS-nCoV-2 的免疫反应。因此,本

试验选择复制缺陷型 Ad5 作为表达 SFTSV Gn 基因的载体。

本试验成功构建了表达 SFTSV Gn 基因的重组 5 型腺病毒,并在基因前引入了 KOZAK 序列和 tPA 信号肽序列,通过病毒扩繁和纯化后进行 PCR 扩增、Western-blot 验证,确认重组腺病毒包装成功并表达了目标蛋白,为其功能和作用机制的研究奠定了基础。

然而,尽管本试验在 HEK 293 细胞中成功包装出了重组腺病毒,但还需要进一步研究其免疫原性和保护性。未来,可以从动物试验和临床试验入手,以验证 SFTS 疫苗的安全性和有效性。同时,还需要深入探究 SFTSV 的感染机制和免疫学特性,以便更好地了解病毒与宿主之间的相互作用,为 SFTS 的防控提供科学依据。

参考文献:

- [1] 马婷,孙继民,施旭光,等.发热伴血小板减少综合征流行病学研究进展[J].中国媒介生物学及控制杂志,2015,26(3):327-329.
- [2] CHOI S J, PARK S W, BAE I G, et al. Severe fever with thrombocytopenia syndrome in South Korea, 2013-2015 [J]. PLoS Negl Trop Dis 2016, 10(12): e0005264.
- [3] LI H, LU Q B, XING B, et al. Epidemiological and clinical features of laboratory-diagnosed severe fever with thrombocytopenia syndrome in China, 2011-17: a prospective observational study [J]. Lancet Infect Dis 2018, 18(10): 1127-1137.
- [4] MOON J, LEE H, JEON J H, et al. Aerosol transmission of Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus during resuscitation [J]. Infect Control Hosp Epidemiol 2019, 40(2): 238-241.
- [5] 杜燕华,黄学勇,王海峰,等.河南省信阳市动物中新布尼亚病毒感染情况调查[J].中国人兽共患病学报,2014,30(7):766-768.
- [6] LI Z F, BAO C J, HU J L, et al. Susceptibility of spotted doves (*Streptopelia chinensis*) to experimental infection with the severe fever with thrombocytopenia syndrome phlebovirus [J]. PLoS Negl Trop Dis 2019, 13(7): e0006982.
- [7] KIDA K, MATSUOKA Y, SHIMODA T, et al. A case of cat-to-human transmission of Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus [J]. Jpn J Infect Dis 2019, 72(5): 356-358.
- [8] LEE S Y, KANG J G, JEONG H S, et al. Complete genome sequences of two Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strains isolated from a human and a dog in the republic of Korea [J]. Microbiol Resour Announc 2019, 8(31): e01695-e01618.
- [9] WANG P P, LIU L, LIU A J, et al. Structure of Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus L protein elucidates the mechanisms of viral transcription initiation [J]. Nat Microbiol 2020, 5(6): 864-871.
- [10] GUARDADO-CALVO P, REY F A. The envelope proteins of the bunyavirales [J]. Adv Virus Res 2017, 98: 83-118.
- [11] SPIEGEL M, PLEGGE T, PÖHLMANN S. The role of phlebovirus glycoproteins in viral entry, assembly and release [J]. Viruses 2016, 8(7): 202.

(下转第 17 页)



- mediated colistin resistance in Gram - negative pathogens [J]. *Theranostics* 2020 ,10(23) : 10697-10711.
- [8] YI K F ,LIU S B ,LIU P Y ,et al.Synergistic antibacterial activity of tetrandrine combined with colistin against MCR-mediated colistin-resistant *Salmonella* [J].*Biomed Pharmacother* 2022 ,149: 112873.
- [9] XU C ,LIU C Y ,CHEN K C ,et al. Otilonium bromide boosts antimicrobial activities of colistin against Gram-negative pathogens and their persisters[J].*Commun Biol* 2022 ,5(1) : 613.
- [10] DOMALAON R ,OKUNNU O ,ZHANEL G G ,et al. Synergistic combinations of anthelmintic salicylanilides oxytetracycline ,rafoxanide and closantel with colistin eradicates multidrug-resistant colistin-resistant Gram-negative bacilli [J].*J Antibiot* ,2019 ,72(8) : 605-616.
- [11] MIRÓ-CANTURRI A ,AYERBE-ALGABA R ,VILLODRES Á R ,et al. Repositioning rafoxanide to treat Gram - negative bacilli infections [J].*J Antimicrob Chemother* 2020 ,75(7) : 1895-1905.
- [12] 孟志敏 李连缺.河北省鸡源大肠杆菌分离鉴定及药敏实验分析 [J].*养禽与禽病防治* 2010(10) : 7-8.
- [13] TIETGEN M ,SEDLACZEK L ,HIGGINS P G ,et al. Colistin resistance mechanisms in human and veterinary *Klebsiella pneumoniae* isolates [J].*Antibiotics* 2022 ,11(11) : 1672.
- [14] ONTONG J C ,OZIOMA N F ,VORAVUTHIKUNCHAI S P ,et al. Synergistic antibacterial effects of colistin in combination with aminoglycoside , carbapenems , cephalosporins , fluoroquinolones , tetracyclines ,fosfomycin ,and piperacillin on multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates [J]. *PLoS One* , 2021 , 16(1) : e0244673.
- [15] GUO T T ,LI M Y ,SUN X L ,et al.Synergistic activity of capsaicin and colistin against colistin - resistant *Acinetobacter baumannii*: *in vitro/vivo* efficacy and mode of action [J].*Front Pharmacol* ,2021 , 12: 744494.
- [16] DOMALAON R ,DE SILVA P M ,KUMAR A ,et al.The anthelmintic drug niclosamide synergizes with colistin and reverses colistin resistance in gram - negative bacilli [J]. *Antimicrob Agents Chemother* 2019 ,63(4) : e02574-e02518.
- [17] AYERBE-ALGABA R ,GIL-MARQUÉS M L ,MIRÓ-CANTURRI A ,et al.The anthelmintic oxytetracycline restores the activity of colistin against colistin-resistant Gram-negative bacilli [J].*Int J Antimicrob Agents* 2019 ,54(4) : 507-512.
- [18] TRAN T B ,CHEAH S E ,YU H H ,et al. Anthelmintic closantel enhances bacterial killing of polymyxin B against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* [J].*J Antibiot* 2016 ,69(6) : 415-421.
- [19] 胡功政 崔小蝶 翟亚军 等.细菌黏菌素耐药性及其逆转机制研究进展 [J].*生物技术通报* 2022 ,38(9) : 28-34.
- [20] SHENG Q S ,HOU X N ,WANG Y ,et al.Naringenin microsphere as a novel adjuvant reverses colistin resistance via various strategies against multidrug - resistant *Klebsiella pneumoniae* infection [J].*J Agric Food Chem* 2022 ,70(51) : 16201-16217.
- [21] AJIBOYE T O ,SKIEBE E ,WILHARM G. Contributions of ferric uptake regulator Fur to the sensitivity and oxidative response of *Acinetobacter baumannii* to antibiotics [J]. *Microb Pathog* ,2018 , 119: 35-41.
- [22] AJIBOYE T O ,SKIEBE E ,WILHARM G. Impact of zinc uptake regulator Zur on the susceptibility and oxidative stress response of *Acinetobacter baumannii* to antibiotics [J].*Int J Antimicrob Agents* , 2019 ,53(4) : 467-473.
- [23] YU Z L ,ZHU Y Y ,QIN W R ,et al.Oxidative stress induced by polymyxin E is involved in rapid killing of *Paenibacillus polymyxa* [J].*Biomed Res Int* 2017 2017: 5437139.
- [24] DAI C S ,CICCOTOSTO G D ,CAPPAI R ,et al.Curcumin attenuates colistin-induced neurotoxicity in N2a cells via anti-inflammatory activity ,suppression of oxidative stress ,and apoptosis [J]. *Mol Neurobiol* 2018 ,55(1) : 421-434.
- [25] YU Z L ,ZHU Y Y ,FU J N ,et al.Enhanced NADH metabolism involves colistin - induced killing of *Bacillus subtilis* and *Paenibacillus polymyxa* [J].*Molecules* 2019 ,24(3) : 387. (011)

(上接第 12 页)

- [12] WU Y ,ZHU Y H ,GAO F ,et al. Structures of phlebovirus glycoprotein Gn and identification of a neutralizing antibody epitope [J].*Proc Natl Acad Sci USA* 2017 ,114(36) : E7564-E7573.
- [13] SONG P X ,ZHENG N ,LIU Y ,et al.Deficient humoral responses and disrupted B-cell immunity are associated with fatal SFTSV infection [J].*Nat Commun* 2018 ,9(1) : 3328.
- [14] KWAK J E ,KIM Y I ,PARK S J ,et al.Development of a SFTSV DNA vaccine that confers complete protection against lethal infection in ferrets [J].*Nat Commun* 2019 ,10(1) : 3836.
- [15] ZHAO Z X ,ZHENG W W ,YAN L N ,et al.Recombinant human adenovirus type 5 co-expressing RABV G and SFTSV gn induces protective immunity against rabies virus and Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in mice [J].*Front Microbiol* 2020 , 11: 1473.
- [16] 田冰 邓宝成.发热伴血小板减少综合征患者病死率及临床特征的 Meta 分析 [J].*中国现代医学杂志* 2020 ,30(12) : 74-82.
- [17] KATO H ,YAMAGISHI T ,SHIMADA T ,et al.Epidemiological and clinical features of severe fever with thrombocytopenia syndrome in Japan 2013 - 2014 [J].*PLoS One* 2016 ,11(10) : e0165207.
- [18] HOFMANN H ,LI X X ,ZHANG X A ,et al. Severe fever with thrombocytopenia virus glycoproteins are targeted by neutralizing antibodies and can use DC-SIGN as a receptor for pH-dependent entry into human and animal cell lines [J].*J Virol* ,2013 ,87(8) : 4384-4394.
- [19] GUO X L ,ZHANG L ,ZHANG W S ,et al. Human antibody neutralizes Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus ,an emerging hemorrhagic Fever virus [J].*Clin Vaccine Immunol* 2013 , 20(9) : 1426-1432.
- [20] YOSHIKAWA T ,TANIGUCHI S ,KATO H ,et al.A highly attenuated vaccinia virus strain LC16m8-based vaccine for severe fever with thrombocytopenia syndrome [J]. *PLoS Pathog* , 2021 , 17(2) : e1008859.
- [21] DONG F F ,LI D D ,WEN D ,et al.Single dose of a rVSV-based vaccine elicits complete protection against Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus [J].*NPJ Vaccines* 2019 ,4: 5.
- [22] LI J X ,HOU L H ,GUO X L ,et al.Heterologous AD5-nCOV plus CoronaVac versus homologous CoronaVac vaccination: a randomized phase 4 trial [J].*Nat Med* 2022 ,28(2) : 401-409.
- [23] XU F ,WU S P ,YI L N ,et al. Safety ,mucosal and systemic immunopotency of an aerosolized adenovirus - vectored vaccine against SARS - CoV - 2 in rhesus macaques [J]. *Emerg Microbes Infect* 2022 ,11(1) : 438-441.

(011)