

基于人 ANP32A 蛋白的 C 型流感病毒聚合酶纯化及 PB2 蛋白单克隆抗体的高效制备

屈玉杏, 郭兴, 韩佳岐, 张振宇, 王晓钧

中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室 马传染病与慢病毒病创新团队,
黑龙江 哈尔滨 150069

屈玉杏, 郭兴, 韩佳岐, 张振宇, 王晓钧. 基于人 ANP32A 蛋白的 C 型流感病毒聚合酶纯化及 PB2 蛋白单克隆抗体的高效制备. 生物工程学报, 2022, 38(8): 3041-3048.

QU YX, GUO X, HAN JQ, ZHANG ZY, WANG XJ. Purification of influenza C virus polymerase based on huANP32A protein and efficient preparation of monoclonal antibody targeting PB2 protein. Chin J Biotech, 2022, 38(8): 3041-3048.

摘要: C 型流感病毒是感染人的重要呼吸道病原, 也可感染猪、狗等动物。聚合酶是 C 型流感病毒复制的核心, 是研究病毒复制机制的重要靶标。然而目前没有商品化针对 C 型流感病毒聚合酶的单克隆抗体 (monoclonal antibody, MAbs), 一定程度制约了相关研究的开展。为了制备 C 型流感病毒碱性聚合酶 2 (polymerase basic protein 2, PB2) 的 MAbs, 本研究依据人酸性核磷酸蛋白 32A (human acidic nuclear phosphoprotein 32 family member A, huANP32A) 与流感病毒 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) 相互作用的特性, 利用免疫共沉淀技术在真核表达系统中通过融合 Flag 标签的 huANP32A (huANP32A-Flag) 纯化并富集 C 型流感病毒 RdRp (PB1、PB2、P3), 并以之作为免疫原免疫 BALB/c 小鼠, 利用间接 ELISA 与 Western blotting 方法筛选出 6 株 (7B11-5、8A4-5、13D9-6、8D4-1、8D4-3、9F9-4) 能稳定分泌识别 PB2 MAbs 的阳性杂交瘤细胞株。经鉴定 7B11-5、8A4-5、8D4-1 和 8D4-3 抗体亚型为 IgG1 型, 13D9-6 抗体亚型为 IgG2a 型, 9F9-4 抗体亚型为 IgG3, 轻链均为 κ 链。进一步选取 1 株效价高的杂交瘤细胞 8D4-1 来制备腹水, 测定收集的小鼠腹水抗体效价为 1:64 000。Western blotting 结果显示, 制备的 MAbs 能够与 C 型流感病毒 PB2 发生特异性免疫反应; 激光共聚焦试验结果表明, 该 MAbs 可准确检测 C 型流感病毒 PB2 的亚细胞定位。本研究通过 huANP32A 蛋白高效富集了 C 型流感病毒的 RdRp,

Received: March 15, 2022; **Accepted:** June 14, 2022

Supported by: Science Fund for Creative Research Groups of the National Natural Science Foundation of China (31521005); National Natural Science Foundation of China (31702269, 32002275)

Corresponding authors: WANG Xiaojun. E-mail: Wangxiaojun@caas.cn

ZHANG Zhenyu. E-mail: zhangzhenyu87@hotmail.com

基金项目: 国家自然科学基金创新研究群体科学基金 (31521005); 国家自然科学基金 (31702269, 32002275)

并以该复合物为抗原制备的 PB2 MAb 具有较好的特异性, 为 C 型流感病毒聚合酶检测、结构分析及机制研究奠定了基础。

关键词: C 型流感病毒; PB2; huANP32A; 单克隆抗体

Purification of influenza C virus polymerase based on huANP32A protein and efficient preparation of monoclonal antibody targeting PB2 protein

QU Yuxing, GUO Xing, HAN Jiaqi, ZHANG Zhenyu, WANG Xiaojun

Equine Infectious Diseases and Lentiviral Diseases Research Group, State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150069, Heilongjiang, China

Abstract: Influenza C virus is an important respiratory pathogen not only infecting people, but also pigs, dogs, and other animals. Polymerase is central to the replication of influenza C virus and is an important target for studying the mechanism of viral replication. However, there is no commercial monoclonal antibody (MAb) targeting influenza C virus polymerase, which hampers the development of relevant research to some extent. In order to prepare MAb targeting the polymerase basic protein 2 (PB2) of influenza C virus, influenza C virus RNA-dependent RNA polymerase (RdRp, consists of PB1, PB2 and P3) was co-immunoprecipitated with Flag-tagged human acidic nuclear phosphoprotein 32A (huANP32A-Flag) from 293T cells based on the interaction between huANP32A and influenza virus RdRp. The purified RdRp was used as antigen to immunize BALB/c mice. Six positive hybridoma cell lines (7B11-5, 8A4-5, 13D9-6, 8D4-1, 8D4-3, 9F9-4) that stably secrete and recognize PB2 MAb were screened by indirect ELISA and Western blotting. The subtypes of MAb 7B11-5, 8A4-5, 8D4-1 and 8D4-3 antibody were identified as IgG1, the subtypes of MAb 13D9-6 and 9F9-4 were IgG2a and IgG3, respectively. All the light chains of the MAbs were κ chain. A hybridoma cell line 8D4-1 with high titer was further selected to prepare ascites. The titer of mouse ascites antibody was determined to be 1:64 000. Western blotting results showed that the MAb 8D4-1 had a specific immune response with ICV PB2; laser confocal assay showed that the prepared MAb 8D4-1 accurately detected the subcellular localization of PB2 subunits. Moreover, ICV RdRp was highly enriched by ANP32A. The high specific of the prepared PB2 MAb 8D4-1 may facilitate the polymerase detection, structural analysis and mechanism study of influenza C virus.

Keywords: influenza C virus; PB2; huANP32A; monoclonal antibody

C 型流感病毒 (influenza C virus, ICV) 属正黏病毒科 (Orthomyxoviridae) 流感病毒属, 有囊膜的负链 RNA 病毒, 其基因组分 7 个节段, 编码 9 种蛋白^[1]。ICV 感染在全球范围内广泛

存在, 主要感染婴幼儿, 通常会引起感冒样症状, 有时会导致下呼吸道感染与免疫反应^[2-6]。起初 ICV 被认为是一种人类病原体, 随后又在猪、狗和牛中被检测到, 有罕见的猪-人传播的报道^[7-10]。

ICV PB2 是由流感病毒基因组中第 1 节段 RNA 编码, 包含 774 个氨基酸, 是高度保守的结构蛋白。PB2 与 PB1、P3、NP 蛋白以及病毒 RNA 基因组相互结合构成流感病毒核糖核蛋白复合物 (viral ribonucleoprotein complexes, vRNPs)^[11], 在流感病毒遗传物质的复制、转录和组装中起到不可或缺的作用。然而目前对 ICV 聚合酶复制机制研究较少, 缺少有效研究试剂, 如针对其聚合酶的单克隆抗体 (monoclonal antibody, MAb) 等, 在一定程度上制约了相关研究的开展。

我们和其他实验室的研究表明, ANP32A 或 ANP32B 可与流感病毒聚合酶三亚基结合, 通过免疫共沉淀 (co-immunoprecipitation, Co-IP) 方法证明 ANP32 蛋白与 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) 有高亲和力互作^[12-14], 因此通过 Co-IP 方法可以高效纯化流感病毒 RdRp。为促进 ICV 聚合酶以及 PB2 的相关研究, 本实验利用免疫共沉淀技术, 通过融合 Flag 标签的 huANP32A 高效纯化 ICV RdRp, 用纯化的抗原免疫 BALB/c 小鼠, 通过杂交瘤细胞融合技术制备抗 ICV PB2 的 MAb, 为深入研究 ICV PB2 的功能机制与检测鉴定奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

pCAGGS-ICV_{Victoria}-PB1、pCAGGS-ICV_{Victoria}-PB2、pCAGGS-ICV_{Victoria}-P3、pCAGGS-huANP32A-Flag、pCAGGS-Flag、pCAGGS-ICV_{Victoria}-PB1-His、pCAGGS-ICV_{Victoria}-PB2-His、pCAGGS-ICV_{Victoria}-

P3-His、pCAGGS-IAV_{SC09}-PB2-His、pCAGGS-IBV_{Yamagata}-PB2-His 和 pCAGGS-IDV_{Yamagata}-PB2-His 等质粒及 HEK293T 细胞、SP2/0 细胞由本实验室构建并保存; 6 周龄 SPF 级 BALB/c 雌性小鼠 (体重为 15–20 g) 购自辽宁长生生物技术股份有限公司, 动物实验方案遵守相关实验动物福利规定, 并获得中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物管理与使用委员会批准 (批准文号: 210224-02); 转染试剂聚乙烯亚胺盐酸盐 MAX (PEI MAX 40K) 购自 Polysciences 公司; 抗 Flag M2 磁珠、融合剂 PEG、HT Supplement (50×) (HT 培养基添加剂)、HAT Supplement (50×) (HAT 培养基添加剂)、抗 Flag MAb、抗 6×His-tag MAb、HRP 标记的羊抗鼠 IgG (IgG-HRP)、DyLight 800TM 标记的羊抗鼠 IgG、3×Flag 多肽均购自 Sigma 公司; 96 孔聚乙烯酶标板购自 Costar 公司; 胎牛血清 (FBS)、DMEM 培养基、蛋白 Marker 购自 Thermo Fisher 公司; TMB 显色液、QuickAntibody-Mouse 3W (3 周标准鼠单抗/多抗制备佐剂) 购自北京博奥龙免疫技术有限公司; 山羊抗小鼠 IgG Alexa Fluor 488 购自 Invitrogen 公司; 硝酸纤维素膜 (NC 膜) 购自 Millipore 公司。

1.2 ICV RdRp 的表达及纯化

在 75 cm² 细胞瓶中培养 HEK293T 细胞, 待细胞密度达 70%–80% 时, 将质粒 pCAGGS-ICV_{Victoria}-PB1、pCAGGS-ICV_{Victoria}-PB2、pCAGGS-ICV_{Victoria}-P3、pCAGGS-huANP32A-Flag 各 3 μg 以及 60 μL PEI 转染试剂进行共转染, 8 h 后更换细胞培养液, 36 h 后用碱性裂解液裂解细胞, 12 000 r/min 高速离心 10 min 后取部分上清加入 5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 98 °C 金属浴加热 10 min 制成细胞裂解液样品, 剩余上清加入抗 Flag M2 磁珠, 4 °C 旋转摇床孵育 2 h, 取部分流穿液加入 5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液加热制

成流穿液样品, PBS 充分洗涤 5–8 次, 加入 3×Flag 多肽, 4 °C 旋转摇床洗脱 30 min 收获目的蛋白, 取部分加入 5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 加热制成洗脱液蛋白样品, 通过 SDS-PAGE 分析目的条带的大小及表达量, 剩余目的蛋白用于免疫 BALB/c 小鼠或分装–80 °C 保存。

1.3 MAb 的制备

将目的蛋白与 QuickAntibody-Mouse 3W 快速佐剂等体积预混, 通过后腿小腿肌肉注射的方式免疫 BALB/c 小鼠, 每隔两周进行第 2 次和第 3 次免疫。在第 3 次免疫后尾尖采血, 通过间接 ELISA 方法检测血清效价, 当血清效价达到 1 : 12 800 以上时, 腹腔注射纯化的抗原来加强免疫。3 d 后, 取小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞在融合剂 PEG 作用下进行融合。融合后 1 周, 利用间接 ELISA 方法进行抗体检测, 通过有限稀释法经过 3 次克隆纯化, 直至筛选出能够稳定分泌抗 ICV RdRp 特异性 MAb 的阳性杂交瘤细胞株。将 HEK293T 细胞铺于 6 孔板中, 分别转染 pCAGGS-ICV_{Victoria}-PB1-His、pCAGGS-ICV_{Victoria}-PB2-His 和 pCAGGS-ICV_{Victoria}-P3-His 质粒各 1 μg, 24 h 后裂解细胞, 取上清制样并进行 Western blotting 实验, 杂交瘤细胞培养上清原液和抗 6×His-tag MAb 作为一抗, DyLight 800TM 标记的羊抗鼠 IgG (1 : 10 000 稀释) 作为二抗, 鉴定分泌 PB2 MAb 的阳性杂交瘤细胞株。选取 ELISA OD₄₅₀ 值最高且 Western blotting 结果特异性最好的 1 株, 将杂交瘤细胞腹腔注射 BALB/c 小鼠 (经弗氏不完全佐剂预处理), 2.0×10⁶ 个细胞/只, 7–10 d 后采集腹水并利用 protein A 抗体纯化柱进行抗体纯化, 将纯化后的 MAb 分装并于–80 °C 保存。

1.4 抗体亚型与腹水效价的鉴定

根据抗体亚型鉴定试剂盒的说明书进行亚型鉴定。采用间接 ELISA 的方法测定腹水纯化

后抗体的效价, 用纯化的 ICV RdRp 蛋白作为包被抗原, 腹水纯化后的抗体 (1 μg/μL) 作为一抗用 PBS (pH 7.4) 1 : 1 000 稀释, 之后等比稀释至 1 : 128 000, 羊抗鼠 IgG-HRP (1 : 5 000) 作为二抗进行 MAb 效价的检测。

1.5 MAb 交叉反应性鉴定

将 HEK293T 细胞铺于 6 孔板中, 待细胞密度为 70%–80% 时分别转染表达 A 型流感病毒 (influenza A, A/Sichuan/01/2009, IAV_{SC09})、B 型流感病毒 (influenza B, B/Yamagata/PJ/2018, IBV_{Yamagata})、C 型流感病毒 (influenza C, C/Victoria/02/2012, ICV_{Victoria})、D 型流感病毒 (influenza D, D/bovine/Yamagata/10710/2016, IDV_{Yamagata}) 带 His 标签的 PB2 质粒 (pCAGGS-IAV_{SC09}-PB2-His、pCAGGS-IBV_{Yamagata}-PB2-His、pCAGGS-ICV_{Victoria}-PB2-His、pCAGGS-IDV_{Yamagata}-PB2-His) 1 μg, 每孔加 5 μL PEI 转染试剂。转染 8 h 后换液, 36 h 后裂解细胞, 12 000 r/min 高速离心 10 min 后取上清, 用上清样品加 5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液处理, 进行 Western blotting 实验分析 MAb 的交叉反应性。杂交瘤细胞上清和抗 6×His-tag MAb 为一抗, DyLight 800TM 标记的羊抗鼠 IgG (1 : 10 000 稀释) 为二抗进行检测。

1.6 MAb 对靶蛋白的细胞定位分析

将 HEK293T 细胞传代至 2 个 35 mm 共聚焦培养皿中, 转染 1 μg pCAGGS-ICV_{Victoria}-PB2-His 质粒继续培养 24 h。将上述细胞培养皿用 4% 多聚甲醛固定 15 min, 0.05% Triton X-100 通透 20 min, 5% 脱脂乳封闭 1 h 后, 室温分别孵育制备的 PB2 MAb 以及抗 6×His-tag MAb (1 : 1 000 稀释) 作为一抗; 将山羊抗小鼠 IgG Alexa Fluor 488 作为二抗 (1 : 500 稀释), 室温避光孵育 4 h; DAPI 染核 10 min。每孵育 1 种试剂用 PBS 润洗 3 次。利用高分辨率活细胞共聚焦显微镜 LSM800-ZEISS 进行观察, 检测转

染后 PB2 的亚细胞定位。

2 结果与分析

2.1 ICV RdRp 的表达及纯化

通过将 ICV 聚合酶三亚基与人 ANP32A 真核表达质粒在 HEK293T 细胞共转染后, 利用 Flag 单克隆抗体进行免疫共沉淀和纯化后经 SDS-PAGE 和 Western blotting 试验显示蛋白条带大约在 80 kDa 处, 目的蛋白条带大小与预期相符, 且获得纯度较高的 ICV RdRp (图 1)。

2.2 MAbs 的筛选与亚型和抗体效价鉴定

按照方法 1.3 制备单克隆抗体, 通过间接 ELISA 与 Western blotting 方法筛选出 6 株能够稳定分泌针对 ICV PB2 MAbs 的阳性杂交瘤细胞, 分别命名为 7B11-5、8A4-5、13D9-6、8D4-1、8D4-3 和 9F9-4, 将带 His 标签的 ICV PB1、PB2、P3 表达质粒转染并表达后进行 Western blotting 检测, 用这 6 种杂交瘤细胞上清作为一抗, 结果显示这 6 种杂交瘤细胞分泌的抗体能特异性识别 ICV PB2, 并不识别 ICV PB1 和 P3 蛋白, 且用抗 6×His-tag MAbs 检测证明 PB1、PB2 和 P3 均正常表达 (图 2)。根据抗体亚型鉴定试剂盒的说明对这 6 株进行亚型鉴定, 结果显示

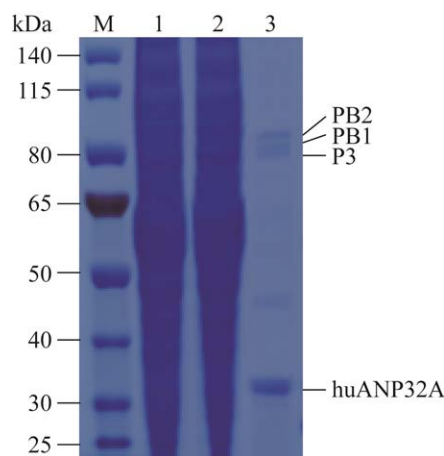


图 1 ICV RdRp 的纯化分析

Figure 1 Purification analysis of ICV RdRp. M: protein marker; 1: unpurified cell lysate supernatant of huANP32A-Flag; 2: purified cell lysate supernatant of huANP32A-Flag; 3: 3×Flag peptide eluent of huANP32A-Flag.

7B11-5、8A4-5、8D4-1、8D4-3 抗体亚型为 IgG1 型, 13D9-6 抗体亚型为 IgG2a 型, 9F9-4 抗体亚型为 IgG3, 轻链均为 κ 链。挑选效价高的 1 株 (8D4-1) 用于制备 MAbs, 将 8D4-1 杂交瘤细胞腹腔注射小鼠 1 周后收集腹水, 并根据抗体亚型选择 protein A 抗体纯化柱纯化腹水, 最终得到 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 PB2 MAbs, 通过方法 1.4 的间接 ELISA 方法测定该抗体效价为 1 : 64 000。

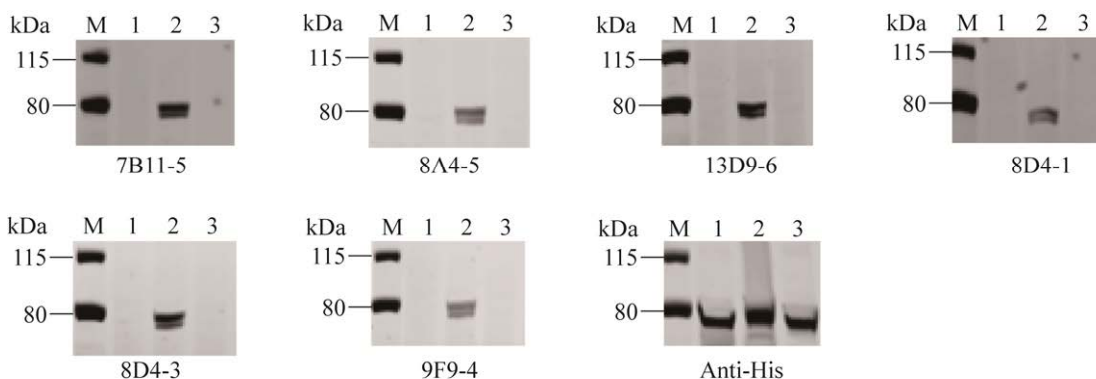


图 2 Western blotting 筛选分泌 PB2 抗体杂交瘤细胞

Figure 2 Western blotting screen for hybridoma cells with secreted PB2 antibody. M: protein marker; 1: pCAGGS-ICV_{Victoria}-PB1-His; 2: pCAGGS-ICV_{Victoria}-PB2-His; 3: pCAGGS-ICV_{Victoria}-P3-His.

2.3 MAb 的交叉反应性鉴定结果

为了鉴定 8D4-1 单抗的特异性, 分别利用 A 型流感病毒 SC09 株, B 型流感病毒 Yamagata 株, C 型流感病毒 Victoria 株和 D 型流感病毒 Yamagata 株的 PB2 表达载体转染 HEK293T 细胞, 36 h 后, 通过 Western blotting 对细胞裂解物进行检测, 结果显示 4 种蛋白均表达, 且本研究制备的 ICV PB2 MAb 与 ICV PB2 蛋白特异性结合, 但与 A、B、D 型流感病毒 PB2 均不结合 (图 3), 说明本研究制备的 8D4-1 单抗可特异性识别 ICV PB2, 而不识别 IAV、IBV 和 IDV 的 PB2。

2.4 MAb 对靶蛋白的亚细胞定位分析

利用激光共聚焦实验方法分析纯化的 PB2 MAb 与表达的 PB2 之间的免疫反应及蛋白定位情况。结果显示, 在 HEK293T 细胞中表达的 PB2 蛋白与被 Alexa Fluor 488 标记的 PB2 MAb

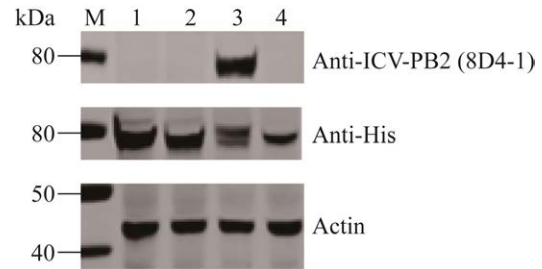


图 3 PB2 8D4-1 MAb 交叉反应性的 Western blotting 鉴定

Figure 3 Cross-reactivity test identified by Western blotting. M: protein marker; 1: pCAGGS-IAV_{SC09}-PB2-His; 2: pCAGGS-IBV_{Yamagata}-PB2-His; 3: pCAGGS-ICV_{Victoria}-PB2-His; 4: pCAGGS-IDV_{Yamagata}-PB2-His.

结合, 呈绿色, DAPI 将细胞核染成蓝色, 二者叠加图 (Merge) 可清晰观察 PB2 在细胞内的表达情况及位置, PB2 主要定位于细胞核内, 部分定位在胞质中, 其细胞内分布与对照组 His 签抗体的鉴定结果一致 (图 4)。

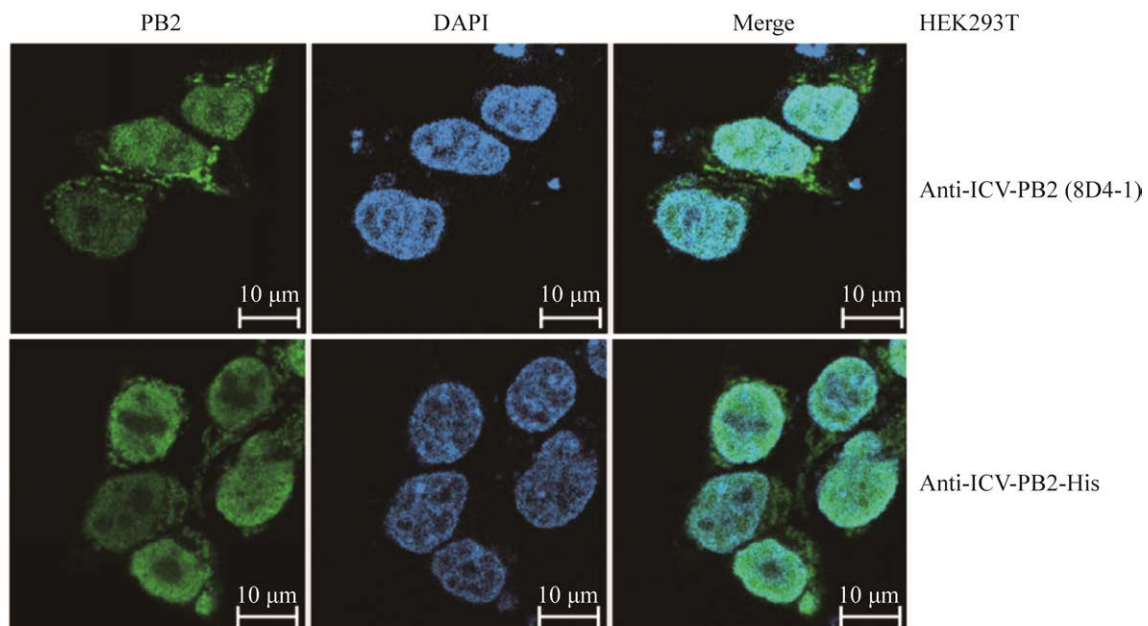


图 4 利用激光共聚焦试验检测 PB2 MAb 与其靶蛋白的亚细胞定位

Figure 4 Subcellular co-localization of PB2 MAb and their target proteins *in vivo* under confocal microscopy.

3 讨论

ICV 于 1947 年在美国首次从一名上呼吸道疾病患者中发现,而后从猪和狗中分离到毒株,近期在牛中也发现了 ICV^[7-10]。与研究较为深入的 A 型和 B 型流感病毒相比^[15-16],目前对于 ICV 的研究与了解较少,其低致病性以及诊断检测的局限性阻碍了对 ICV 的监测,虽然 ICV 的致病性较弱,但其感染十分常见^[17-19]。最近的 1 项研究强调,ICV 可能通过感染下呼吸道和周期性暴发而导致更严重的疾病^[20],因此 ICV 相关研究不容忽视。

ICV PB2 属于流感病毒 PB2 家族,能识别并结合用于生成病毒转录引物的带帽 pre-mRNAs,并调节 RNP 复合物的活性,在转录起始和夺帽机制中起着重要作用^[21]。在世界范围内传播的 ICV 谱系中,PB2 具有较高的保守性,其同源性可达 98%^[22]。因此以靶向 ICV PB2 制备的单克隆抗体对于 ICV 的检测可能具有很好的广谱性,制备 ICV PB2 的 MAbs 有助于对 ICV 进行深入研究。

本研究前期将 PB2 基因连接于 pCAGGS 载体中,在 HEK293T 细胞中得到了很好的表达效果,但单独纯化 PB2 单体需要添加标签,在免疫小鼠体内会产生带有标签的抗体,并且标签氨基酸基序的插入可能会影响到 PB2 蛋白的正常折叠,从而隐藏某些具有潜在研究价值的抗原决定簇,为避免该情况发生,本研究用 huANP32A 免疫共沉淀聚合酶三亚基,使得纯化的聚合酶蛋白具有更加稳定的天然构象,在去除标签的同时最大程度保留了聚合酶活性。与此同时,利用本研究中所采取的表达、纯化策略制备的 ICV 聚合酶重组蛋白复合物免疫后的 BALB/c 小鼠 B 淋巴细胞进行细胞融合,也能够同时筛选到分泌 ICV PB1 和 P3 蛋白的单克隆抗体的杂交瘤细胞,甚至特异性靶向 IVC RNA

聚合酶复合物的空间表位抗体。但因为每个聚合酶亚基的抗原性不同,因此细胞融合后筛选到分泌各聚合酶亚基单克隆抗体的杂交瘤细胞比例可能也各不相同。因此,本研究策略也适用于 ICV PB1 和 P3 聚合酶亚基单克隆抗体的研发。

ANP32 蛋白家族主要包括 ANP32A、ANP32B 和 ANP32E^[23],有研究发现两个 ICV 聚合酶分子通过 ANP32A 的 N 端富含亮氨酸重复结构域 (LRR) 形成不对称二聚体,并解出了 ICV 聚合酶二聚体和 huANP32A 蛋白复合体的低温电镜结构从而证实了二者相互作用的相关功能研究^[24]。纪玉洁等通过免疫共沉淀方法高效纯化不含标签的 B 型流感病毒 (influenza B virus, IBV) RdRp 且同时获得多株识别 IBV 不同聚合酶亚基的 MAbs^[25]。本研究基于该方法的高效性以及 huANP32A 与 ICV RdRp 的高亲和作用成功筛选到 ICV PB2 的 MAbs,且纯化的抗体具有较高的特异性,这是目前已知的首个针对 ICV 聚合酶 PB2 的单克隆抗体。本研究在真核细胞表达纯化 ICV 聚合酶,极大保留了蛋白的天然构象以及转录和复制活性,为 ICV 聚合酶的基础研究提供了物质基础。

综上所述,本研究通过高效纯化 ICV 聚合酶的方法来制备 PB2 MAbs,最终成功地筛选出 6 株能稳定分泌 MAbs 的杂交瘤细胞株,并对其中的 1 株 8D4-1 进行了抗体制备与分析。应用 ELISA、Western blotting 以及免疫荧光检测方法能够很好地鉴定 PB2,为 ICV 聚合酶和 PB2 的相关研究及其检测提供了有效的技术支持。

REFERENCES

- [1] Halldorsson S, Sader K, Turner J, et al. *In situ* structure and organization of the influenza C virus surface glycoprotein. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1694.
- [2] Sato K, Hayashi H, Shimotai Y, et al. TMRSS₂ activates hemagglutinin-esterase glycoprotein of

- influenza C virus. *J Virol*, 2021, 95(21): e0129621.
- [3] Thielen BK, Friedlander H, Bistodeau S, et al. Detection of influenza C viruses among outpatients and patients hospitalized for severe acute respiratory infection, Minnesota, 2013–2016. *Clin Infect Dis*, 2018, 66(7): 1092-1098.
- [4] Odagiri T, Matsuzaki Y, Okamoto M, et al. Isolation and characterization of influenza C viruses in the Philippines and Japan. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(3): 847-858.
- [5] Shimizu Y, Abiko C, Ikeda T, et al. Influenza C virus and human *Metapneumovirus* infections in hospitalized children with lower respiratory tract illness. *Pediatr Infect Dis J*, 2015, 34(11): 1273-1275.
- [6] Sederdahl BK, Williams JV. Epidemiology and clinical characteristics of influenza C virus. *Viruses*, 2020, 12(1): 89.
- [7] Taylor RM. Studies on survival of influenza virus between epidemics and antigenic variants of the virus. *Am J Public Health Nations Health*, 1949, 39(2): 171-178.
- [8] Kimura H, Abiko C, Peng G, et al. Interspecies transmission of influenza C virus between humans and pigs. *Virus Res*, 1997, 48(1): 71-79.
- [9] Manuguerra JC, Hannoun C. Natural infection of dogs by influenza C virus. *Res Virol*, 1992, 143: 199-204.
- [10] Zhang HW, Porter E, Lohman M, et al. Influenza C virus in cattle with respiratory disease, United States, 2016–2018. *Emerg Infect Dis*, 2018, 24(10): 1926-1929.
- [11] Yokota M, Nakamura K, Sugawara K, et al. The synthesis of polypeptides in influenza C virus-infected cells. *Virology*, 1983, 130(1): 105-117.
- [12] Bradel-Tretheway BG, Mattiaccio JL, Krasnoselsky A, et al. Comprehensive proteomic analysis of influenza virus polymerase complex reveals a novel association with mitochondrial proteins and RNA polymerase accessory factors. *J Virol*, 2011, 85(17): 8569-8581.
- [13] Zhang HL, Li HX, Wang WQ, et al. A unique feature of swine ANP32A provides susceptibility to avian influenza virus infection in pigs. *PLoS Pathog*, 2020, 16(2): e1008330.
- [14] Zhang ZY, Zhang HL, Xu L, et al. Selective usage of ANP32 proteins by influenza B virus polymerase: implications in determination of host range. *PLoS Pathog*, 2020, 16(10): e1008989.
- [15] 赵江艳, 朱颜笑, 胡娇, 等. 一株针对 H7N9 亚型禽流感病毒血凝素蛋白茎部的单克隆抗体的表征. *生物工程学报*, 2022, 38(1): 160-173.
- Zhao JY, Zhu YX, Hu J, et al. Characterization of a monoclonal antibody against the hemagglutinin stem of H7N9 subtype avian influenza virus. *Chin J Biotech*, 2022, 38(1): 160-173 (in Chinese).
- [16] 焦鹏涛, 范文辉, 孙业平, 等. B 型流感病毒研究进展. *生物工程学报*, 2018, 34(6): 821-831.
- Jiao PT, Fan WH, Sun YP, et al. Research advance of influenza B viruses. *Chin J Biotech*, 2018, 34(6): 821-831 (in Chinese).
- [17] Zhang X, Abel T, Su S, et al. Structural and functional analysis of the roles of influenza C virus membrane proteins in assembly and budding. *J Biol Chem*, 2022, 298(3): 101727.
- [18] Matsuzaki Y, Sugawara K, Shimotai Y, et al. Growth kinetics of influenza C virus antigenic mutants that escaped from anti-hemagglutinin esterase monoclonal antibodies and viral antigenic changes found in field isolates. *Viruses*, 2021, 13(3): 401.
- [19] Okda FA, Griffith E, Sakr A, et al. New diagnostic assays for differential diagnosis between the two distinct lineages of bovine influenza D viruses and human influenza C viruses. *Front Vet Sci*, 2020, 7: 605704.
- [20] Sreenivasan CC, Sheng ZZ, Wang D, et al. Host range, biology, and species specificity of seven-segmented influenza viruses—a comparative review on influenza C and D. *Pathogens*, 2021, 10(12): 1583.
- [21] Fodor E, Te Velthuis AJW. Structure and function of the influenza virus transcription and replication machinery. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2020, 10(9): a038398.
- [22] Matsuzaki Y, Sugawara K, Furuse Y, et al. Genetic lineage and reassortment of influenza C viruses circulating between 1947 and 2014. *J Virol*, 2016, 90(18): 8251-8265.
- [23] 张振宇. ANP32 家族蛋白在 B 型流感病毒复制及其跨物种传播中的作用机制研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.
- Zhang ZY. The mechanism of ANP32 family protein in the replication of influenza B virus and its cross-species transmission[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021 (in Chinese).
- [24] Carrique L, Fan HT, Walker AP, et al. Host ANP32A mediates the assembly of the influenza virus replicase. *Nature*, 2020, 587(7835): 638-643.
- [25] 纪玉洁, 郭兴, 张振宇, 等. 基于 ANP32 蛋白的 B 型流感病毒聚合酶的纯化及其单克隆抗体的高效制备. *中国预防兽医学报*, 2022, 44(2): 162-168.
- Ji YJ, Guo X, Zhang ZY, et al. Purification and efficient preparation of monoclonal antibodies of influenza B virus polymerase based on ANP32 protein. *Chin J Prev Vet Med*, 2022, 44(2): 162-168 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)