

研究报告

表达 EGFP 报告基因口蹄疫病毒亚基因组复制子的构建

袁红¹ 李平花¹ 袁子文² 白兴文¹ 孙普¹ 马雪青¹ 李坤¹ 寻广谨¹
卢曾军¹ 包慧芳¹ 陈应理¹ 曹轶梅¹ 付元芳¹ 张婧¹ 刘在新^{1*}

(1. 中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室
国家口蹄疫参考实验室农业部畜禽病毒学重点开放实验室 甘肃 兰州 730046)
(2. 甘肃农业大学动物医学院 甘肃 兰州 730070)

摘要: 【目的】构建含有 EGFP 报告基因的口蹄疫病毒(FMDV)亚基因组复制子系统。【方法】利用融合 PCR 方法,将 EGFP 报告基因替换 O 型 FMDV 全长 cDNA 克隆中的前导蛋白 Lb 和结构蛋白 P1 基因,构建含有 EGFP 报告基因的 FMDV 亚基因组复制子 FMDV-EGFP。复制子质粒连续转化、测序检验复制子载体的稳定性。*Not I* 线性化的复制子 FMDV-EGFP 用脂质体介导法转染表达 T7 RNA 聚合酶的 BSR/T7 细胞后,不同时间段观察 EGFP 荧光表达情况。转染的细胞用流式、间接免疫荧光、RT-PCR 和 Western blot 检测该复制子载体的自主复制能力和口蹄疫病毒蛋白的表达情况。【结果】复制子质粒的连续转化及测序表明报告基因可以稳定存在。FMDV-EGFP 复制子转染 BSR/T7 细胞 3 h 后在荧光显微镜下能够看到绿色荧光,EGFP 荧光信号随着转染时间的延长逐渐增加,并且荧光信号可持续 6 d 以上。转染 24 h 后的细胞流式分析显示转染的细胞中有 6.0%发出荧光,说明构建的复制子载体能够有效表达 EGFP 蛋白。另外,间接免疫荧光、RT-PCR 和 Western blot 方法也检测到该复制子 RNA 在 BSR/T7 细胞中能够进行自主复制,并且能够表达病毒的非结构蛋白。【结论】含有 EGFP 报告基因的 FMDV 亚基因组复制子的成功构建为进一步研究病毒复制、翻译机制及筛选抗病毒药物等奠定了坚实的基础。

关键词: EGFP, 口蹄疫病毒, 复制子

Foundation item: Gansu Province Agricultural Biotechnology Research and Development Project (No. GNSW-2015-26, GNSW-2014-22); The Central Level Public Welfare Scientific Research Institutes for Basic Scientific Research Special Fund (No. 1204NKCA109)

*Corresponding author: Tel: 86-931-8342587; E-mail: liuzaixin@caas.cn

Received: September 09, 2015; Accepted: November 30, 2015; Published online (www.cnki.net): January 07, 2016

基金项目: 甘肃省农业生物技术研发项目(No. GNSW-2015-26, GNSW-2014-22); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(No. 1204NKCA109)

*通讯作者: Tel: 86-931-8342587; E-mail: liuzaixin@caas.cn

收稿日期: 2015-09-09; 接受日期: 2015-11-30; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-01-07

Construction of sub-genomic replicon of foot-and-mouth disease containing EGFP reporter gene

YUAN Hong¹ LI Ping-Hua¹ YUAN Zi-Wen² BAI Xing-Wen¹ SUN Pu¹
MA Xue-Qing¹ LI Kun¹ XUN Guang-Jin¹ LU Zeng-Jun¹ BAO Hui-Fang¹
CHEN Ying-Li¹ CAO Yi-Mei¹ FU Yuan-Fang¹ ZHANG Jing¹ LIU Zai-Xin^{1*}

(1. State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, National Foot-and-Mouth Disease Reference Laboratory, Lanzhou Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730046, China)

(2. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: [Objective] To construct sub-genomic replicon system of foot-and-mouth disease containing EGFP reporter gene. [Methods] Based on the infectious clone of serotype O FMDV, the subgenomic replicon FMDV-EGFP was constructed by replacing Lb and P1 gene of FMDV with EGFP reporter gene using fusion PCR method. The stability of replicon was detected by a series of transformation and sequencing. The replicon linearized with *Not* I was transfected into BSR/T7 cells expressing T7 RNA polymerase using liposome mediation. EGFP expression of different time of transfected cells was examined using fluorescence microscopy, the ability of self-replication and expression of protein of replicon were detected by flow analysis, immunofluorescence assay, RT-PCR and Western blot. [Results] The replicon vector was stable by a series of transformation and sequencing. After 3 h transfection, the EGFP fluorescence could be obviously observed under the fluorescence microscope, the level of EGFP protein was increased gradually as transfection time went on. The result of flow cytometry analysis showed that 6.0% transfected cells were able to generate fluorescence, indicating the effective expression of EGFP protein of replicon vector. In addition, the results of immunofluorescence, RT-PCR and Western blot assay demonstrated that the replicon could autonomously replicate and express non-structural protein of FMDV. [Conclusion] The construction of sub-genomic replicon of FMDV expressing EGFP reporter gene provides a foundation to study viral replication and translation mechanism and antiviral drugs.

Keywords: EGFP, FMDV, Replicon

口蹄疫(Foot-and-mouth disease, FMD)是猪、牛、羊等主要家畜和其它家养、野生偶蹄动物感染的一种急性、热性、高度接触性传染病。该病传播速度快,发病率高,曾多次在世界范围内发生流行性暴发,给发病地区的政治、经济造成巨大损失。因此,世界动物卫生组织(OIE)将其列为必报疫病,我国将其规定为一类动物传染病。

FMD 的病原为口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus, FMDV),属于小 RNA 病毒科(Picornaviridae),口蹄疫病毒属(Aphthovirus)。病毒基因组约含有 8 500 个核苷酸,由 5'和 3'非编码区及中间的单一的开放阅读框组成。开放阅读框编码一个多聚蛋白,该蛋白最终被成熟裂解为 4 种结构

蛋白(VP4、VP2、VP3 和 VP1)和 10 种非结构蛋白(L、2A、2B、2C、3A、3B1-3、3C 和 3D)。其中,由 60 个分子构成的结构蛋白聚合成病毒的衣壳,非结构蛋白则参与调控病毒 RNA 的复制、多聚蛋白的成熟裂解和宿主蛋白的合成等。

RNA 复制子(Replicon)是一种源于病毒基因组的能够自主复制的 RNA 载体,它具有自主复制、功能蛋白的表达不受细胞影响、表达效率高、安全性好等优点,近年来已被广泛应用于新型疫苗、导向载体制备、病毒复制与翻译、病毒致病研究以及抗病毒药物筛选等方面的研究^[1-4]。尽管 FMDV 基因的非编码区和非结构蛋白中存在一些保守的序列和二级结构参与病毒的复制和翻译的调控,但它

们在病毒生活周期中确切的机制仍不完全清楚。鉴于此,本研究在已经构建的 O 型 FMDV 全长感染性 cDNA 克隆的基础上,采用融合 PCR 的方法,将 FMDV 中编码前导蛋白 Lb 和结构蛋白 P1 基因用 EGFP 报告基因替换,构建含有 EGFP 的 FMDV 复制子 FMDV-EGFP,并验证该复制子载体的自主复制能力和 FMDV 蛋白的表达情况。该复制子载体的成功构建为深入研究 FMDV 的复制和翻译机制、发展疫苗载体及筛选抗病毒药物等提供了有力的工具。

1 材料与方 法

1.1 质粒、细胞和主要试剂及仪器

FMDV O/HN/93 的全长质粒 pOZK-K1234 和含该病毒基因 1-5 340 nt 的 pOZK-K123 质粒为中国农业科学院兰州兽医研究所宿主抗感染与免疫课题组构建保存^[5]。表达 T7 RNA 聚合酶的细胞系 BSR/T7 和 BHK-21 细胞由中国农业科学院兰州兽医研究所宿主抗感染与免疫课题组实验室保存。3A24 单克隆抗体由实验室制备; FITC 荧光标记的山羊抗鼠二抗 IgG,康为世纪公司; LipofectamineTM 2000 和 DMEM 细胞培养液, Invitrogen 公司。CO₂ 恒温细胞培养箱,美国 Thermo 公司; PCR 仪, Biometra 公司; 荧光显微镜,德国 Leica 公司。

1.2 引物

根据 EGFP 基因和 O 型 FMDV O/HN/93 株全基因组序列设计引物(表 1),并由上海桑尼生物技术有限公司合成。

1.3 含有 EGFP 报告基因的亚基因组复制子的构建

以 pOZK-K123 质粒为模板, OZ586(+)/OZLaEGFP(-)、OZEGFP2A(+)/OZ4817(-)为引物,分别扩增 A (612 bp)、B (987 bp)片段。以 pEGFP-N1 (Clontech) 质粒为模板, OZEGFP2A(+)/OZEGFP2A(-)为引物,扩增 EGFP 基因(741 bp)。以纯化的 A、B 和 EGFP 基因片段为模板,以 OZ586(+)/OZ4817(-)为引物融合扩增约 2 300 bp 的基因片段。该片段纯化后用 *Xba* I 和 *Sac* II 双酶切后连入 pOZK-K123 质粒中,得到阳性质粒 pOZK-K123-EGFP。该半长质粒用 *Spe* I 和 *Bgl* II 双酶切后连入 pOZK-K1234 中,得到全长质粒 FMDV-EGFP。最后用酶切鉴定和序列测定的方法验证该全长质粒的正确性。构建示意图如图 1 所示。

1.4 亚基因组复制子的稳定性分析

为了检测 EGFP 报告基因在病毒亚基因组复制子中的稳定性,将构建好的阳性质粒 FMDV-EGFP 在大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中连续传代,提取第 3、6、9 代质粒后用 RT-PCR 方法扩增 EGFP 报告基因,送上海桑尼生物技术公司测序。

1.5 转染

将构建好的复制子质粒用 *Not* I 线性化后,用 LipofectamineTM 2000 介导转染生长至 70%–80% 的 BSR/T7 细胞,同时设 pOZK-K123 质粒(该质粒中不含 FMDV 3A、3B、3C、3D 和 3'UTR)为对照。转染步骤按试剂盒操作手册进行,转染后 5 h 加入

表 1 用于构建表达 EGFP 的 FMDV 复制子所用的引物
Table 1 Primer used in the construction of FMDV replicon expressing EGFP

Primer	Sequence (5'→3')
OZ586(+)	ACGGTCTAAGCAGGTTTCCA
OZLaEGFP(-)	TCCTCGCCCTTGCTCACCATTTTTCCCTTGTGTTCGTGACA
OZLaEGFP(+)	TGTCACGAACACAAGGGAAAATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
OZEGFP2A(-)	AGCTTGAGGAGGTCGAAGTCTTGTACAGCTCGTCCATGC
OZEGFP2A(+)	GCATGGACGAGCTGTACAAGAAGTTCGACCTCCTCAAGCT
OZ4817(-)	ATTGTAACCGTCGAAGTGGTCA

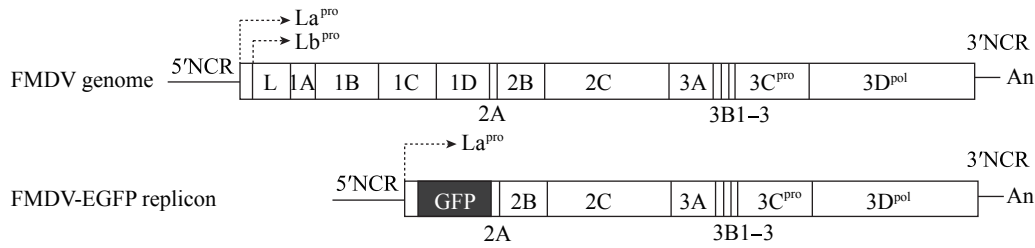


图 1 FMDV 亚基因组复制子的构建示意图

Figure 1 Diagram of the construction of sub-genomic replicon of FMDV

1 mL 含 8%胎牛血清的 DMEM 完全培养基,置 CO₂ 培养箱 37 °C 继续培养。细胞转染后 3、6、12 和 24 h 用倒置荧光显微镜观察,记录结果。同时,阳性质粒转染细胞后记录绿色荧光持续的时间,以检测绿色荧光蛋白在细胞中持续表达的时间。

1.6 流式细胞检测

将转染 24 h 的细胞收集,进行流式细胞检测,比较复制子载体转染的细胞和对照质粒转染的细胞的荧光强弱和产生荧光的细胞数量。

1.7 正负链 RNA 检测

收集转染 FMDV-EGFP 和 pOZK-K123 质粒 48 h 的 BSR/T7 细胞,提取总 RNA,经 DNase I 消化后,用扩增 EGFP 的正向和反向引物进行 RT-PCR,检测正负链 RNA。负链 RNA 的检测步骤为:以正向引物 OZLaEGFP(+)进行反转录得到扩增模板,并以引物 OZLaEGFP(-)和 OZLaEGFP(+)进行扩增;正链 RNA 的检测步骤为:以反向引物 OZLaEGFP(-)进行反转录,然后以 OZLaEGFP(-)和 OZLaEGFP(+)进行 RT-PCR 扩增。

1.8 间接免疫荧光试验(IFA)

为进一步鉴定复制子转染细胞后能否表达病毒特异性蛋白,24 h 时将转染复制子和对照质粒的 BSR/T7 细胞吸弃培养液按常规方法做间接免疫荧光试验。一抗用 3A24,二抗用 FITC 标记的山羊抗小鼠的 IgG,同时设正常细胞对照。

1.9 Western blot 检测

用 Western blot 的方法也可以检测 24 h 收集的两种转染细胞样品中是否表达病毒的特异性蛋白,

实验中使用的二抗和 IFA 实验中的一致。

2 结果与分析

2.1 含有 EGFP 报告基因 FMDV 亚基因组复制子酶切与测序鉴定

将构建的含 EGFP 报告基因的 FMDV 亚基因组复制子用 *Nhe* I 和 *Hind* III 进行酶切鉴定,结果切出与预期相符的目的片段(图略)。酶切正确的质粒经序列测定,结果也表明构建的复制子含预期的基因。

2.2 荧光显微镜观察 EGFP 蛋白表达

BSR/T7 细胞转染后 3、6、12 和 24 h 置荧光显微镜下观察,结果显示复制子转染的细胞 3 h 时即出现绿色荧光,随着时间的延长(观察至 48 h),发出荧光的细胞明显增多,对照细胞中则无可见绿色荧光(图 2),证实了构建的 FMDV 复制子载体能够有效表达外源蛋白 EGFP。

2.3 亚基因组复制子的稳定性分析

测序结果与已知的 EGFP 报告基因的序列对比可知,第 3、6、9 代亚基因组复制子质粒中的报告

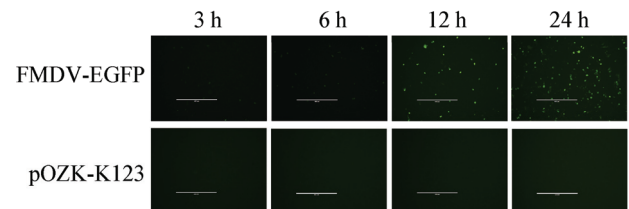


图 2 表达 EGFP 的 BSR/T7 细胞的荧光检测

Figure 2 Fluorescent detection of the BSR/T7 cells expressing EGFP

基因没有发生碱基突变、缺失或者插入(图略),表明报告基因可以在 FMDV 复制子载体中稳定存在。通过荧光显微镜观察,转染细胞产生的绿色荧光可以持续存在 6 d,表明在该转染体系中,瞬时表达的绿色荧光蛋白能够可见地存在 6 d。

2.4 流式细胞检测

24 h 时,将转染 FMDV-EGFP 和 pOZK-K123 质粒的 BSR/T7 细胞进行流式检测(图 3),结果显示在质粒 FMDV-EGFP 转染的细胞中有 6.0%的细胞发出荧光,对照质粒转染的细胞中有 0.1%的细胞发出荧光(图 3),表明 EGFP 获得了有效的表达。

2.5 RT-PCR 鉴定 FMDV 复制子载体复制水平

48 h 时,收集转染复制子和对照质粒的 BSR/T7 细胞后提取总 RNA,然后用扩增 EGFP 的正、负链引物进行 RT-PCR,结果显示转染复制子细胞的 RNA 能扩增出与预期相符的 EGFP 的特定片段,而转染对照质粒细胞的 RNA 未扩增出任何条带(图 4)。表明复制子转染 BSR/T7 细胞的总 RNA 中存在 EGFP 的正链和负链亚基因组 RNA,复制子 FMDV-EGFP 能够自我复制。

2.6 IFA 检测 FMDV 非结构蛋白的表达

FMDV-EGFP 和 pOZK-K123 质粒转染 BSR/T7 细胞 24 h 时,以 FMDV 3A 单抗 3A24 为一抗进行 IFA。结果表明转染 FMDV-EGFP 质粒的细胞在 24 h 时可看到明显的绿色荧光,而转染 pOZK-K123 质粒的细胞则未出现可见的绿色荧光(图略)。说明所构建的 FMDV 复制子 FMDV-EGFP 在 BSR/T7 细胞中可以表达 FMDV 的非结构蛋白。

2.7 Western blot 检测 FMDV 非结构蛋白的表达

转染 24 h 后,收集 FMDV-EGFP 和 pOZK-K123 质粒转染的 BSR/T7 细胞,裂解煮沸后进行蛋白电泳。经过转膜、封闭以及一抗、二抗孵育后最终得出了预期的蛋白条带(图 5),表明了构建的复制子可以在转染细胞中进行表达。

3 结论与讨论

近些年来,病毒复制子已经成国内外学者研究

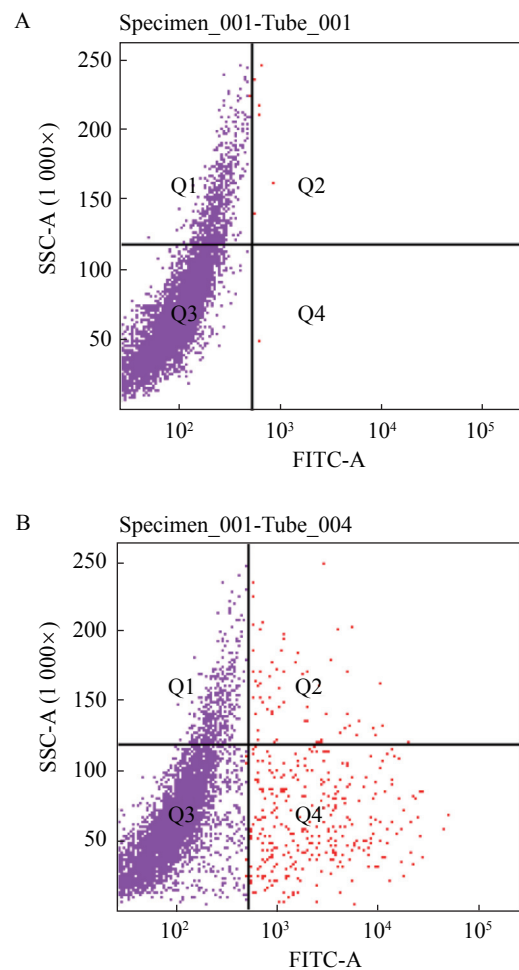


图 3 质粒 FMDV-EGFP 转染 BSR/T7 后 24 h 的流式细胞检测

Figure 3 Detection of flow cytometry of the BSR/T7 cells transfected by plasmid FMDV-EGFP at 24 h post-transfection

注: A: 对照质粒转染的细胞(Q1+Q2=0.1%); B: FMDV-EGFP 转染的细胞(Q1+Q2=6.0%)。

Note: A: Cells transfected by control plasmid (Q1+Q2=0.1%); B: Cells transfected by plasmid FMDV-EGFP (Q1+Q2=6.0%).

的热点。目前,报道的已经构建成功的复制子有甲病毒、小 RNA 病毒、黄病毒、冠状病毒、麻疹病毒、流感病毒等 RNA 病毒的复制子。其中研究最为成熟的是甲病毒复制子,其作为真核表达载体研制成功,已经用于商业化生产。病毒复制子载体的构建主要用于复制子疫苗和病毒基因组的结构和功能的研究。如 Vander Veen 等^[6]将猪流感病毒血凝素 HA 基因插入复制缺陷型委内瑞拉马脑炎病毒

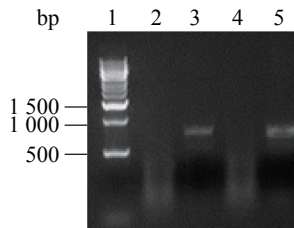


图 4 RT-PCR 检测 FMDV 亚基因组复制子在 BSR/T7 细胞中的复制

Figure 4 Detection of replication of sub-genomic replicon of FMDV in the BSR/T7 cells by RT-PCR

注: 1: DL12000 DNA marker; 2, 4: 对照质粒转染细胞中 EGFP 的正、负链引物 RT-PCR; 3, 5: 复制子转染细胞中 EGFP 的正、负链引物 RT-PCR.

Note: 1: DL12000 DNA marker; 2, 4: RT-PCR product of EGFP in the cells transfected by control plasmid; 3, 5: RT-PCR product of EGFP in the cells transfected by replicon plasmid.

(VEEV)载体系统中,小鼠和猪的免疫结果表明高剂量的该疫苗免疫动物后,不引起 VEEV 的散播,免疫之后也没有出现毒力返强的现象。Ward 等^[7]利用昆津病毒(KUN)复制子表达由 7 个 HCV 的 CTL 抗原表位和 1 个流感病毒的 CTL 抗原表位构成的多表位的 RNA,证实了复制子疫苗能够使免疫小鼠产生细胞介导的免疫反应。Liu 等^[4]利用昆津病毒复制子研究 NS2A 和 NS3 的功能,证实了 NS2A 在病毒组装和 NS3 在 RNA 复制中的作用,确定了 2 个氨基

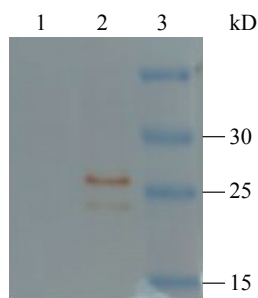


图 5 Western blot 检测 FMDV 非结构蛋白的表达

Figure 5 Detection of non-structural protein expression in FMDV by Western blot

注: 1: 对照质粒转染细胞的 WB; 2: 复制子转染细胞的 WB; 3: 蛋白 Marker.

Note: 1: WB of cells transfected by control plasmid; 2: WB of cells transfected by replicon plasmid; 3: Protein marker.

酸的改变导致病毒的复制和包装受阻。Wang 等^[8]构建的兔出血性病毒(RHDV)复制子系统表明,5' NCR 和 VPg 可能在 RHDV 的复制和翻译中发挥重要作用。

2000 年,国外学者 McInerney 等^[9]率先构建了表达氯霉素乙酰转移酶(CAT)的 FMDV 复制子载体系统。2014 年,国内外学者^[10-11]又分别构建了表达报告基因海肾萤光素酶(Rluc)和 EGFP 的 FMDV 亚基因组复制子。他们的研究为 FMDV 新型疫苗、病毒复制、以及抗病毒药物筛选等方面的研究奠定了基础,但是构建出的复制子载体必须用 T7 RNA 聚合酶体外转录 RNA,然后转染至特定细胞。这样的操作具有所需试剂盒价格昂贵,操作繁琐,技术要求高,而且 RNA 在体外易降解的缺点。因此本研究在前期构建的携带 T7 启动子的 FMDV 的感染性克隆的基础上改造复制子载体,然后将线性化的复制子载体质粒直接转染稳定表达 T7 RNA 聚合酶的细胞系 BSR/T7 细胞,通过 T7 启动子在宿主细胞内启动载体的转录,从而高效稳定表达外源基因,即操作方便,也大大提高了成功率和精确性。

现如今,含有标签蛋白的蛋白重组表达技术已经广泛应用于生物学各个领域,特别是体内功能研究和蛋白质的大规模生产。在口蹄疫病毒的研究中,通过构建融合有标签蛋白的重组质粒,可以深入研究病毒的复制、翻译机制、发展疫苗载体以及研制抗病毒药物等。本研究中使用的是 EGFP 标签,该绿色荧光蛋白标签由 238 个氨基酸构成,相对原子质量为 27 kD。由于不用破碎组织细胞和不加任何底物,直接通过荧光显微镜就能在活细胞中观察到 EGFP 标签蛋白发出的稳定的绿色荧光,从而实时显示目的基因的表达情况,因此该标签蛋白被誉为活细胞探针。本研究中选择报告基因 EGFP 替代 FMDV 的前导蛋白 Lb 和结构蛋白 P1 基因,而非选择常用的萤火虫萤光素酶(LUC)基因或氯霉素乙酰转移酶 (CAT)基因,就是考虑到载体的稳定性及克隆操作的难易程度。

本研究在已经构建好的 FMDV 感染性克隆的基础上,应用融合 PCR 方法,构建了表达 EGFP 的 FMDV 亚基因组复制子系统。实验证实该复制子系统既能有效地在转染细胞中自主复制,又能表达插入的外源蛋白和病毒的非结构蛋白。构建的 FMDV 亚基因组复制子可以用于以下领域的研究:(1) FMDV 复制和翻译调控机制研究:利用含有 EGFP 报告基因的体外复制子模型,构建非结构蛋白和非编码区缺失突变体,可研究非结构蛋白和非编码区中与复制和翻译相关的一系列作用元件和关键基序;(2) 表达 EGFP 的 FMDV 复制子的进一步改进,有可能作为复制子载体应用于复制子疫苗的研制;(3) 通过进一步改造筛选可稳定表达复制子的细胞系,构建基于 EGFP 报告基因复制子技术的抗病毒药物筛选体系,可用于未来抗 FMDV 药物的筛选研究。

参 考 文 献

- [1] Jeeva S, Lee JA, Park SY, et al. Development of porcine respiratory and reproductive syndrome virus replicon vector for foot-and-mouth disease vaccine[J]. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 2014, 3(1): 100-109
- [2] Segundo FDS, Dias CCA, Moraes MP, et al. Venezuelan equine encephalitis replicon particles can induce rapid protection against foot-and-mouth disease virus[J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(10): 5447-5460
- [3] Pouliot JJ, Thomson M, Xie M, et al. Preclinical characterization and *in vivo* efficacy of GSK8853, a small-molecule inhibitor of the hepatitis C virus NS4B protein[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2015, 59(10): 6539-6550
- [4] Liu WJ, Chen HB, Khromykh AA. Molecular and functional analyses of Kunjin virus infectious cDNA clones demonstrate the essential roles for NS2A in virus assembly and for a nonconservative residue in NS3 in RNA replication[J]. *Journal of Virology*, 2003, 77(14): 7804-7813
- [5] Cao WJ, Li PH, Bai XW, et al. Rescue and identification of virus activity of foot-and-mouth disease virus strain O/HN/93 from full-length cDNA clone[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2010, 25(3): 32-37 (in Chinese)
曹伟军, 李平花, 白兴文, 等. 口蹄疫病毒 O/HN/93 疫苗株的拯救及病毒活性鉴定[J]. *华北农学报*, 2010, 25(3): 32-37
- [6] Vander Veen RL, Loynachan AT, Mogler MA, et al. Safety, immunogenicity, and efficacy of an alphavirus replicon-based swine influenza virus hemagglutinin vaccine[J]. *Vaccine*, 2012, 30(11): 1944-1950
- [7] Ward SM, Tindle RW, Khromykh AA, et al. Generation of CTL responses using Kunjin replicon RNA[J]. *Immunology & Cell Biology*, 2003, 81(1): 73-78
- [8] Wang BB, Zhe MJ, Chen ZY, et al. Construction and applications of rabbit hemorrhagic disease virus replicon[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e60316
- [9] McInerney GM, King AMQ, Ross-Smith N, et al. Replication-competent foot-and-mouth disease virus RNAs lacking capsid coding sequences[J]. *Journal of General Virology*, 2000, 81(7): 1699-1702
- [10] Sun C, Yang DC, Gao RY, et al. Construction of sub-genomic replicon of O serotype foot-and-mouth disease virus[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2014, 36(8): 611-614 (in Chinese)
孙超, 杨德成, 高荣远, 等. O 型口蹄疫病毒亚基因组复制子的构建及其鉴定[J]. *中国预防兽医学报*, 2014, 36(8): 611-614
- [11] Tulloch F, Pathania U, Luke GA, et al. FMDV replicons encoding green fluorescent protein are replication competent[J]. *Journal of Virological Methods*, 2014, 209: 35-40