

引文格式:

王芳芳, 潘宏, 何华美, 等. 基于代谢工程与生物正交反应的病毒原位标记技术研究[J]. 集成技术, 2019, 8(3): 1-9.

WANG FF, PAN H, HE HM, et al. Research on virus *in situ* labeling technology based on metabolic engineering and bioorthogonal reaction [J]. Journal of Integration Technology, 2019, 8(3): 1-9.

基于代谢工程与生物正交反应的 病毒原位标记技术研究

王芳芳^{1,2} 潘 宏¹ 何华美¹ 马轶凡¹ 蔡林涛¹

¹(中国科学院深圳先进技术研究院 深圳 518055)

²(中国科学院大学 北京 100049)

摘 要 示踪病毒在细胞内的感染路径对探究病毒的感染机制具有重要意义, 病毒标记是实现病毒示踪的关键。针对目前病毒标记方法中存在的不足, 该文提出了一种基于代谢工程的病毒原位生物正交标记技术。脂质/氨基酸/单糖的叠氮衍生物经细胞代谢将叠氮基团修饰在病毒表面, 被修饰病毒粒子识别结合宿主细胞后与携带二苯基环辛炔(DBCO)的荧光探针经生物正交反应连接从而实现病毒标记。结果显示, 叠氮基团在囊膜病毒和非囊膜病毒表面都有很好的修饰效果, 并且在原位生物正交中携带二苯基环辛炔基团的荧光探针可快速捕捉到叠氮修饰的病毒粒子实现病毒标记。该标记方法不仅操作简单, 而且适用于囊膜病毒与非囊膜病毒的标记。

关键词 原位生物正交; 代谢工程; 叠氮基团; 囊膜病毒; 非囊膜病毒

中图分类号 R 392.9 文献标志码 A doi: 10.12146/j.issn.2095-3135.20190226001

Research on Virus *in Situ* Labeling Technology Based on Metabolic Engineering and Bioorthogonal Reaction

WANG Fangfang^{1,2} PAN Hong¹ HE Huamei¹ MA Yifan¹ CAI Lintao¹

¹(Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

²(University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Tracking virus infection pathway in cells is of great significance for understanding the viral infection mechanism, and the successful labeling on viruses is the key to achieve viruses tracking. In this study, we proposed the *in situ* bioorthogonal strategy based on the bioorthogonal chemistry and metabolic engineering for overcoming defects of traditional virus labeling methods. Azido motifs were incorporated into virions through cell

收稿日期: 2019-02-26 修回日期: 2019-03-19

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81601552); 深圳市科技计划(自由探索)项目(JCYJ20170306160217433、JCYJ20170818163739458)

作者简介: 王芳芳, 硕士研究生, 研究方向为材料工程; 潘宏, 博士, 研究方向为病毒学与纳米颗粒介导的免疫应用; 何华美, 学士, 研究方向为纳米颗粒的免疫治疗; 马轶凡(通讯作者), 博士研究生导师, 研究方向为纳米材料介导的免疫治疗与纳米材料的免疫调控作用和机制, E-mail: yf.ma@siat.ac.cn; 蔡林涛(通讯作者), 博士研究生导师, 研究员, 研究方向为纳米功能材料与生物医用材料、分子诊断与靶向治疗, E-mail: lt.cai@siat.ac.cn.

metabolism with lipid/amino acid/monosaccharide azide derivatives, and the modified virions were *in situ* labeled with dibenzocyclooctyne-functionalized fluorescent probes through the bioorthogonal reaction. The results show that viruses incorporated with azide motifs could be quickly and effectively captured by fluorescent probes to achieve viruses *in situ* labeling. Significantly, the *in situ* bioorthogonal labeling strategy is a general method for enveloped and non-enveloped viruses labeling with simple operations.

Keywords *in situ* bioorthogonal; metabolic engineering; azido motifs; enveloped viruses; nonenveloped viruses

1 引 言

随着病毒荧光标记技术的发展,病毒学工作者跟随病毒在宿主细胞内或体内的感染路径,揭开了越来越多病毒株的结构功能和感染机制^[1-4],助益人类在病毒性传染疾病方面的治疗和预防。但是,面对形态结构和功能各异的病毒株,现存病毒标记技术依然存在诸多的限制及挑战。

目前的病毒标记技术主要分为三大类:基因编辑标记法、直接标记法和自组装标记法^[5]。基因编辑标记法指将报告基因(荧光蛋白和荧光素酶基因)插入病毒基因组,通过病毒复制表达荧光蛋白从而达到自带荧光的效果^[6-7]。Chen 等^[8]通过在人类免疫缺陷病毒(HIV)的核糖核酸(RNA)中插入荧光蛋白序列探究在病毒组装过程中 RNA 的行为。然而,基因编辑标记法不仅技术要求较高、操作繁杂,而且在被改造病毒中插入或缺失相关基因都会影响病毒活性^[9]。病毒直接标记法通过荧光染料嵌入到病毒表面或与病毒表面活性基团经化学键连接^[10-11]。该方法虽然操作简单快捷,但缺乏标记特异性,极易造成荧光标记物占据病毒表面识别位点,干扰病毒与宿主细胞的结合而降低病毒感染效率^[12]。病毒自组装策略基于直接标记法将荧光探针或化学报告基团修饰在细胞内,病毒复制组装或出芽时将部分细胞内膜结构作为囊膜而实现对病毒的标记^[13]。Huang 等^[14]利用病毒自组装将生物素修饰在狂犬

病毒囊膜上,被修饰病毒与携带生物亲和素的荧光探针连接从而被标记。该方法虽然巧妙,但仅适用于部分囊膜病毒。目前的标记方法对病毒的活性都有不可忽略的影响,且常用于囊膜病毒的标记。

在过去的几十年中,生物正交化学由于其具有在不对细胞产生毒性的条件下对生物大分子进行功能结构研究的优势^[15],已经在蛋白质选择性修饰、核酸和脂质等的标记方面做出贡献^[16-18]。通常生物正交反应的实施需要通过化学、代谢或者遗传的方法将报告基团嵌入目标生物分子中,然后在生理环境中对目标分子进行荧光标记。叠氮基团作为最小的生物正交报告基团之一,其动力学稳定且不存在于天然的生物系统中^[19],常被引入氨基酸、单糖和脂质分子中作为生物正交报告基团^[17,20]。本文提出一种基于代谢工程的病毒原位生物正交标记技术,脂质/氨基酸/单糖的叠氮衍生物(AE-cho、Aha 和 Ac4ManNAz)经细胞代谢将叠氮基团修饰在病毒粒子表面,被修饰病毒识别结合宿主细胞后与携带二苯基环辛炔(DBCO)基团的荧光探针经生物正交反应连接^[19]从而实现病毒标记。叠氮基团的代谢修饰对病毒活性影响很小,同时原位生物正交标记避免了干扰病毒与宿主细胞间的识别。结果显示,原位生物正交标记无论是对囊膜病毒还是对非囊膜病毒都能实现简单快捷的标记。

2 材料与amp;方法

2.1 材料

人恶性胚胎横纹肌瘤细胞(RD 细胞)、人肾上皮细胞(HEK293T 细胞)和人腺癌肺泡基底上皮细胞(A549 细胞)均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库; 细胞培养基(DMEM)、磷酸盐缓冲液(PBS)均购自美国 Hyclone 公司; 去除甲硫氨酸营养缺陷型培养基购自上海笃马生物科技有限公司; 胰酶、胎牛血清(FBS)、青霉素和链霉素均购自美国 Gibco 公司; 细胞计数试剂盒(CCK-8)购自日本同仁化学研究所; 噻唑蓝(MTT)试剂盒购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 左旋丙氨酸(Aha)和 DBCO-Sata650 荧光染料购自美国 Click Chemistry Tools 公司; 抗肠道病毒 71 型(anti-EV71)抗体购自英国 Abcam 公司; 山羊抗小鼠 IgG1 交叉吸附二抗-Alexa Fluor 488 荧光抗体购自美国 Thermo Fisher 公司; 抗禽流感病毒血球凝集素(anti-H5N1 HA)抗体购自北京义翘神州科技有限公司; 驴抗兔 IgG (H+L)交叉吸附二抗-Alexa Fluor 488 荧光抗体购自美国 Life Technologies 公司。

2.2 实验方法

2.2.1 脂质叠氮衍生物 AE-cho 的制备

根据 Huang^[21]等和 Pan 等^[22]的报道, 本文脂质叠氮衍生物 AE-cho 的制备步骤如下: 首先, 将 1,2-二溴乙烷和叠氮化钠加入到二甲基甲酰胺(DMF)中进行反应, 冷却至室温; 然后, 将其放在饱和氯化钠的冰水混合物上, 用冰冷的戊烷萃取 3 次, 有机层经过冷盐水洗涤后用饱和硫酸钠(Na₂SO₄)和负压蒸干浓缩成叠氮-二溴乙烷; 最后, 将产物加入含有二甲基乙醇胺的四氢呋喃(THF)中, 0 °C 氩气(Ar)搅拌反应, 经二乙醚洗涤与真空干燥后得到纯净的白色粉末(AE-cho)。

2.2.2 细胞培养

本文选用 RD 细胞、HEK293T 细胞和 A549

细胞开展实验, 三种细胞都用 DMEM 完全培养基(含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗)进行培养, 并置于 5% CO₂、37 °C 的培养箱中培养。

2.2.3 细胞毒性实验

为了研究 Aha 与脂质叠氮类似物 AE-cho 的生物相容性, 分别使用 CCK8 实验与 MTT 实验对细胞进行毒性测试。

(1) CCK8 实验测试 Aha 与 RD 细胞的相容性

首先, 将 RD 细胞以 8×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板中, 培养 12 h 后更换为去除甲硫氨酸的 DMEM 完全培养基。然后, 补加终浓度分别为 0、50 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ 和 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 Aha 试剂, 继续培养 24 h 和 48 h。最后, 使用 CCK8 试剂盒测定评估细胞活性。

(2) MTT 实验测试胆碱类似物 AE-cho 与 HEK293T 细胞的相容性

首先, 将 HEK293T 细胞以 8×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板中, 培养 4 h 后更换培养基。然后, 分别加入终浓度为 0、0.4 mmol/L、0.8 mmol/L、1.6 mmol/L 和 3.2 mmol/L 的 AE-cho 试剂处理 24 h 和 48 h。最后, 使用 MTT 试剂盒测定评估细胞活性并确定具体用量。

2.2.4 叠氮在细胞内的代谢表征

(1) Aha 在 RD 细胞内的代谢表征

首先, 使用去除甲硫氨酸并补加 Aha 终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 DMEM 完全培养基对 RD 细胞进行 24 h 培养后, 使用胰酶消化下来并进行计数, 在激光共聚焦八孔小室中加入接种密度为 1×10^4 个/孔的 RD 细胞。随后, 用 4% 多聚甲醛固定 5 min, 加入浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ 的 DBCO-Sata650 溶液在培养箱中孵育 20 min。然后, 移除探针溶液并用 PBS 清洗 3 次去除游离探针, 再加入细胞核酸染色液 Hoechst 的稀释液, 在室温下孵育 5 min 后去除并用 PBS 清洗一次。最后, 在每孔中加入 200 μL 的 PBS 后, 使用激光共聚焦 63 倍油镜观察补加 Aha 试剂培养的 RD 细胞

与完全培养基培养的 RD 细胞, 并通过 408 和 633 激光通道采集荧光图片。

(2) AE-cho 在 HEK293T 细胞内的代谢表征

首先, 在 DMEM 完全培养基中补加终浓度为 1.6 mmol/L 的 AE-cho 试剂对 HEK293T 细胞培养 24 h。然后, 在激光共聚焦八孔小室中加入接种密度为 1×10^4 个/孔的 HEK293T 细胞。最后, 分别使用 DBCO-Sata650 和 Hoechst 荧光染料标记并在激光共聚焦下观察。

2.2.5 叠氮修饰的病毒粒子的制备

(1) Aha 代谢修饰 EV71 病毒粒子(N3-EV71)的制备

首先, 将 RD 细胞培养在补加 Aha 终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的去除甲硫氨酸的 DMEM 完全培养基中, 24 h 后细胞融合度达到 90%~95% 时, 去除上清, 用 PBS 洗涤一次, 补加血清含量为 2% 的、且添加 Aha 终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 Aha 去除甲硫氨酸的 DMEM 培养基。然后, 加入感染剂量(感染复数, MOI)为 10 的野生型 EV71 病毒粒子, 在细胞培养箱中培育 24 h 后收取上清, 使用 3 000 r/min 的转速离心 10 min, 取悬液。最后, 在贝克曼超速离心机的 SW28 转子中 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境下通过 20% 蔗糖垫以 25 000 r/min 的转速超速离心 2 h, 收取 N₃-EV71 病毒粒子。

(2) AE-cho 代谢修饰 H5N1 假型病毒(H5N1p)颗粒(N₃-H5N1p)的制备

首先, 将 HEK293T 细胞培养在含有 AE-cho 终浓度为 1.6 mmol/L 的 DMEM 完全培养基中, 孵育 24 h 后细胞融合度达到 80%。然后, 使用磷酸钙转染试剂盒在上述培养基中转染病毒包装质粒^[23], 6~8 h 后将细胞培养在补充有 AE-cho 终浓度为 1.6 mmol/L 的新鲜 DMEM 培养基中, 继续培养 48 h。最后, 按上述操作步骤收取 N₃-H5N1p 病毒粒子。

2.2.6 叠氮修饰的病毒粒子的表征

首先, 取等体积的 N₃-EV71 和 EV71 病毒粒

子, 加入终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 SYTO-82 稀释液和终浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ 的 DBCO-Sata650 稀释液在培养箱中共孵育 40 min, 分别标记病毒核酸和病毒表面叠氮基团。然后, 吸取 50 μL 病毒液滴加在载玻片上并采用热固定法固定。最后, 在激光共聚焦下使用 63 倍油镜观察, 并经 543 和 633 激光通道采集荧光图片。使用相同的方法对 N₃-H5N1p 病毒颗粒鉴定。

2.2.7 原位生物正交标记叠氮修饰的病毒粒子

首先, 将 N₃-EV71 病毒粒子在含血清 2% 的 DMEM 培养基中感染 RD 细胞 15 min 后, 去除培养基并用 PBS 清洗一次除去游离的病毒粒子。接着, 使用浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ 的 DBCO-Sata650 溶液在培养箱中孵育细胞 20 min, 去除探针溶液后用 PBS 缓冲液清洗 3 次除去游离探针, 再用 4% 多聚甲醛固定 5 min。然后, 使用浓度为千分之一的 anti-EV71 抗体作为一抗在培养箱中孵育 1 h, 浓度为两千万分之一的山羊抗小鼠-Alexa Fluor 488 作为二抗在室温下孵育 2 h, 再用 Hoechst 对细胞核染色。最后, 使用激光共聚焦 63 倍油镜观察, 经 355、488 和 633 通道采集荧光图片。

类似地, N₃-H5N1p 病毒粒子感染 A549 细胞后进行原位标记, 所用一抗为 anti-H5N1 HA 抗体, 二抗为驴抗兔-Alexa Fluor 488。

3 结果与分析

3.1 细胞毒性测试分析

病毒的叠氮化修饰来源于叠氮衍生物在宿主细胞内的代谢, 为提高叠氮衍生物的代谢效率及被修饰病毒粒子产量, 对叠氮衍生物的细胞毒性进行测试。Aha 作为一种常用的氨基酸叠氮衍生物可替代甲硫氨酸参与蛋白质的合成。如图 1(a) 所示, RD 细胞经 100 $\mu\text{mol/L}$ Aha 作用 48 h 后依然保持 85% 以上的存活率, 而在 200 $\mu\text{mol/L}$ Aha

作用下的细胞存活不到 75%。因此, 本研究优化选用 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 Aha 作用于 RD 细胞。类似地, 如图 1(b) 所示, 经细胞毒性测试优选 1.6 mmol/L 的脂质叠氮类似物 AE-cho 作用于 HEK293T 细胞。

3.2 叠氮衍生物在细胞内的代谢表征

因叠氮衍生物在宿主细胞内的代谢效率将直接影响叠氮基团在病毒粒子上的修饰效率, 故本研究对叠氮衍生物在细胞内的代谢进行了观察。如图 2 所示, 与 Aha 共培育的 RD 细胞中红色荧光充满整个细胞, 表明 24 h 后 Aha 在 RD 细胞内充分代谢; 而在 AE-cho 作用下的 HEK293T 细胞中, 绿色荧光主要分布在细胞膜及细胞核

周围。两种叠氮衍生物在细胞内代谢结果的差异来源于代谢途径的不同, Aha 经氨基酸代谢参与蛋白质的合成, 因此在整个细胞内都有分布。而 AE-cho 作为脂质叠氮衍生物主要参与细胞膜结构的构成, 故分布在细胞膜上和细胞内膜系统中。

3.3 叠氮基团修饰的病毒粒子的鉴定

未修饰亲本病毒株经过在被修饰细胞内复制扩增, 子代病毒衣壳蛋白或囊膜被叠氮基团修饰。为检测病毒粒子叠氮化修饰效果, 分别使用 SYTO-82 和 DBCO-Sata650 荧光探针标记病毒核酸和病毒表面叠氮基团。其中, SYTO 核酸染料只有与 RNA 结合后才能激发荧光, 并且对病毒

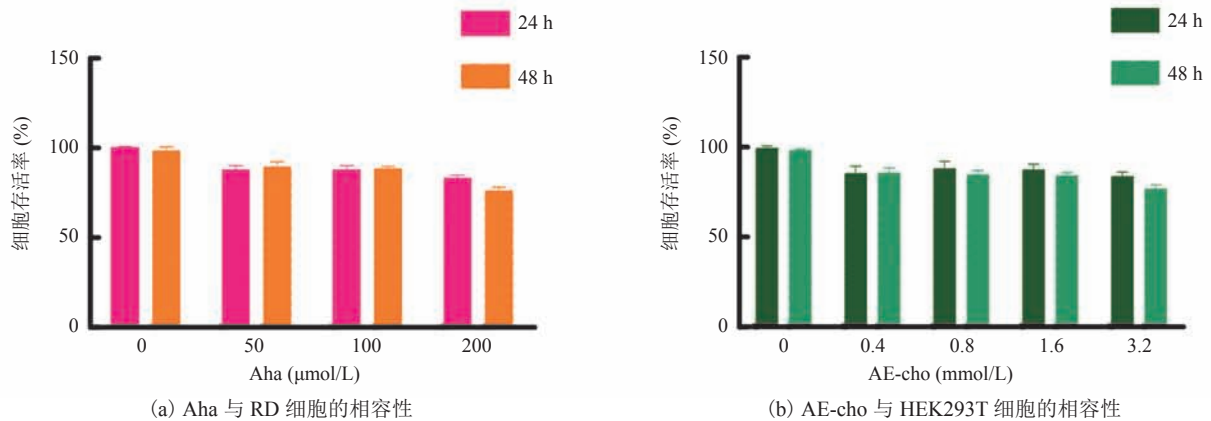


图 1 Aha 与 AE-cho 生物相容性测试

Fig. 1 The biocompatibility evaluation of Aha and AE-cho in cells

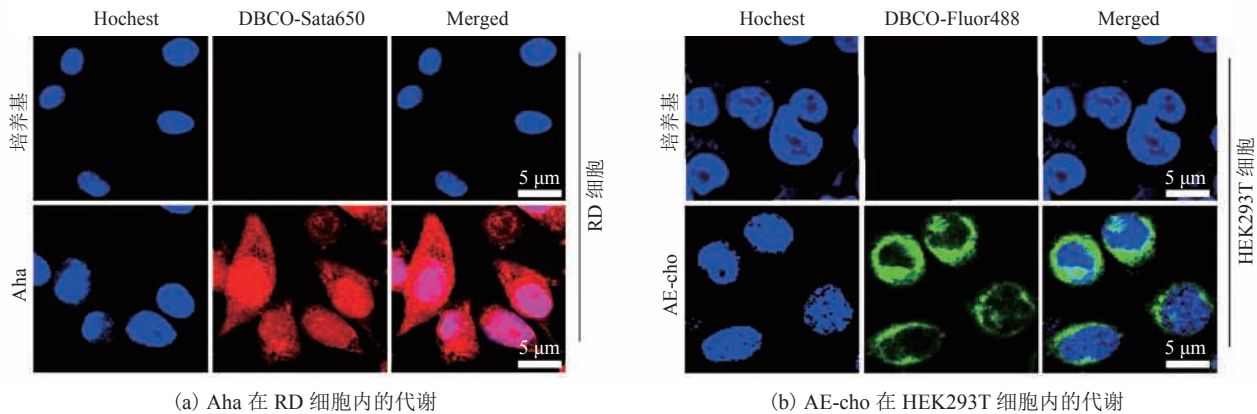


图 2 Aha 和 AE-cho 在细胞内的代谢检测

Fig. 2 The evaluation of Aha and AE-cho metabolism in cells

活性无影响^[24]。如图 3(a)所示, N_3 -EV71 病毒粒子不仅被标记核酸的 SYTO-82 探针标记发出绿色荧光, 且几乎 90% 的 N_3 -EV71 病毒粒子同时被 DBCO-Sata650 探针标记发出红色荧光, 两者共定位显示为黄色荧光。该结果表明, 经 Aha 代谢修饰, 叠氮基团在 EV71 病毒粒子表面有很高的修饰效率。类似地, 图 3(b)结果显示, 经过 AE-cho 代谢修饰, 叠氮基团在 H5N1p 病毒粒子表面具有很好的修饰效果, 约 90% 的被修饰病毒粒子被两种荧光探针标记。

3.4 原位生物正交标记叠氮修饰的病毒粒子

病毒粒子被叠氮基团修饰以后并不具备荧光性能。为避免荧光探针干扰病毒与宿主细胞的识

别结合, 在叠氮基团修饰的病毒粒子感染宿主细胞后使用 DBCO 荧光探针对其标记。如图 4(a)所示, 被 N_3 -EV71 病毒粒子感染的 RD 细胞不仅被 anti-EV71 标记发出绿色荧光, 且被 DBCO-Sata650 探针标记发出红色荧光, 两者在 RD 细胞的细胞质中普遍共定位结果显示为黄色荧光。如图 4(b)所示, 被 N_3 -H5N1p 病毒粒子感染的 A549 细胞的细胞质中也分布有大量的黄色荧光。而被 EV71 感染的 RD 细胞和被 H5N1p 感染的 A549 细胞周围都只分布有绿色荧光。两组实验结果都表明, 叠氮修饰的病毒粒子经原位生物正交标记都可被 DBCO 荧光探针特异性捕获而实现标记。

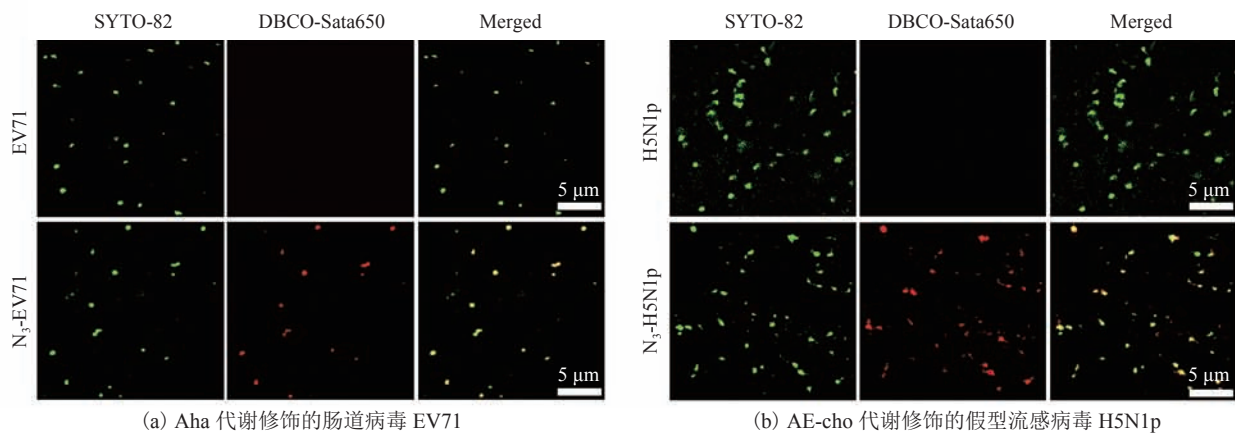


图 3 N_3 -EV71 和 N_3 -H5N1p 病毒粒子的鉴定

Fig. 3 The identification of N_3 -EV71 and N_3 -H5N1p particles

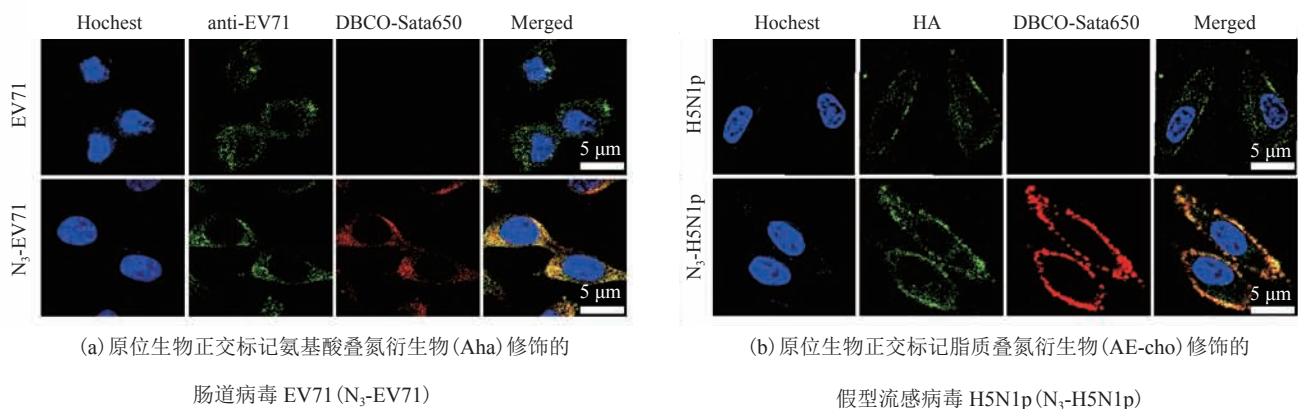


图 4 原位生物正交标记叠氮修饰的病毒粒子

Fig. 4 The labeling of viral particles modified by azido through *in situ* bioorthogonal labeling strategy

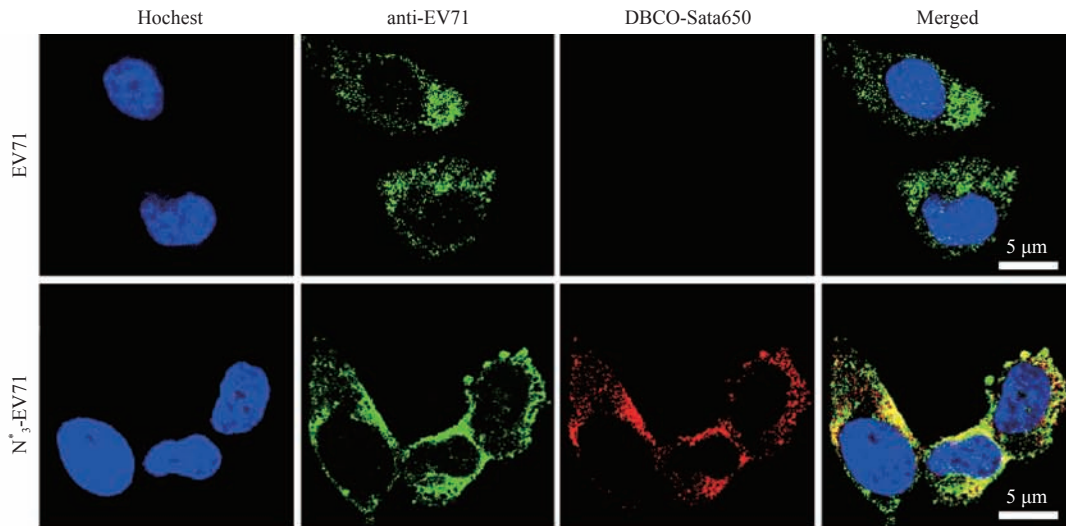


图 5 原位生物正交标记 Ac4ManNAz 代谢修饰的 EV71 病毒粒子

Fig. 5 The labeling of EV71 particles modified by Ac4ManNAz through *in situ* bioorthogonal labeling

4 讨论

生物正交反应由于其高效特异性, 在病毒示踪领域引起广泛关注。Hao 等^[25]利用病毒表面氨基与亚胺反应在病毒粒子表面直接叠氮化修饰, 该修饰方法由于缺乏连接特异性难免影响病毒的功能结构。在本研究中, 叠氮衍生物经宿主细胞代谢将叠氮基团修饰在病毒粒子表面。其中, 叠氮基团因具备良好的生物相容性, 在细胞代谢过程中对细胞生物功能基本无影响^[25-26], 而且由于叠氮基团体积小^[19], 不会对被修饰病毒粒子的结构功能带来过多干扰, 有效地保护了病毒活性。通过细胞代谢对病毒进行修饰适用于所有细胞性寄生病毒, 因此该修饰方法具有广泛的应用范围。其中, 脂质叠氮衍生物经细胞的脂类代谢参与病毒囊膜的构成, 从而将叠氮基团修饰在囊膜病毒表面; 氨基酸叠氮衍生物经氨基酸代谢参与蛋白质合成, 并将叠氮基团修饰在病毒表面蛋白中。同时, 单糖叠氮衍生物经糖类代谢在蛋白质糖基化过程中将叠氮基团修饰在病毒表面蛋白上^[16-18]。氨基酸/单糖叠氮衍生物可同时

对病毒与非囊膜病毒进行叠氮化修饰。使用单糖叠氮类似物 Ac4ManNAz 代谢修饰 EV71 病毒株, 如图 5 所示, N₃-EV71 经原位生物正交标记被 DBCO-Sata650 探针成功标记。

Zhao 等^[27]经代谢方式对麻疹病毒进行叠氮化修饰, 通过生物正交反应将量子点和被修饰病毒直接连接。该标记方法虽然在叠氮化修饰过程中保护了子代病毒的活性, 但之后的病毒标记过程与传统的病毒标记手段同样都存在标记物占据病毒识别位点而降低病毒感染效率甚至改变病毒入胞途径的问题。本研究提出的病毒原位生物正交标记技术(图 6), 荧光探针在叠氮修饰的病毒

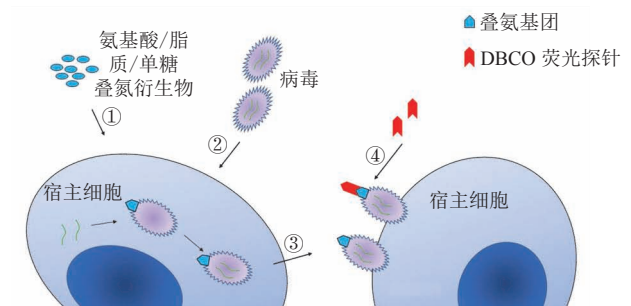


图 6 基于代谢工程的原位生物正交标记策略原理图

Fig. 6 The schematic of *in situ* bioorthogonal labeling strategy basing on the metabolic engineering

粒子识别结合宿主细胞后对其进行荧光标记, 避免了标记物占据病毒识别位点。

因此, 本研究提出的基于叠氮衍生物代谢修饰的原位生物正交方法, 不仅弥补了传统标记方法中由于标记而影响病毒活性和感染效率的不足, 而且通过细胞代谢对病毒修饰, 具有很好的普适性, 尤其适用于功能结构未知的病毒感染机制的探索研究。结合本实验利用生物正交对细胞改造以及在活体内示踪囊膜病毒侵染与致病性的研究基础^[22,26,28], 原位生物正交标记技术有望实现在活体内对非囊膜病毒的标记示踪。

5 结 论

针对目前病毒标记方法中存在的操作繁杂、影响病毒活性和感染效率的不足, 本研究提出了基于代谢工程的病毒原位生物正交标记策略。该标记方法通过天然的代谢途径将叠氮基团修饰在病毒表面, 叠氮基团由于其体积小且生物相容性良好对病毒活性基本无影响, 并且原位生物正交标记避免了干扰病毒与宿主细胞的识别。该标记技术利用病毒的寄生性对病毒进行叠氮化修饰, 同时适用于囊膜病毒与非囊膜病毒的标记示踪, 尤其在新发现的病毒机制研究中具有广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Liu SL, Wang ZG, Zhang ZL, et al. Tracking single viruses infecting their host cells using quantum dots [J]. *Chemical Society Reviews*, 2016, 45(5): 1211-1224.
- [2] Wang IH, Burckhardt CJ, Yakimovich A, et al. Imaging, tracking and computational analyses of virus entry and egress with the cytoskeleton [J]. *Viruses*, 2018, 10(4): 166-180.
- [3] 王亚林, 仇华吉, 孙元. 疱疹病毒的示踪技术: 看到了什么? 还能看到什么? [J]. *生物工程学报*, 2018, 34(11): 1721-1733.
- [4] 梁振普, 王彩平, 张小霞, 等. 单颗粒示踪技术及其在病毒侵染机制研究中的应用 [J]. *病毒学报*, 2017, 33(4): 638-645.
- [5] Huang LL, Xie HY. Progress on the labeling and single-particle tracking technologies of viruses [J]. *The Analyst*, 2014, 139(13): 3336-3346.
- [6] McDonald D, Vodicka MA, Lucero G, et al. Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2002, 159(3): 441-452.
- [7] Greber UF, Way M. A superhighway to virus infection [J]. *Cell*, 2006, 124(4): 741-754.
- [8] Chen J, Rahman SA, Nikolaitchik OA, et al. HIV-1 RNA genome dimerizes on the plasma membrane in the presence of gag protein [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(2): 201-208.
- [9] Tyagi S. Imaging intracellular RNA distribution and dynamics in living cells [J]. *Nature Methods*, 2009, 6(5): 331-338.
- [10] Lakadamyali M, Rust MJ, Babcock HP, et al. Visualizing infection of individual influenza viruses [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(16): 9280-9285.
- [11] Lakadamyali M, Rust MJ, Zhuang X. Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes [J]. *Cell*, 2006, 124(5): 997-1009.
- [12] Rust MJ, Lakadamyali M, Zhang F, et al. Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry [J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2004, 11(6): 567-573.
- [13] Joo KI, Lei Y, Lee CL, et al. Site-specific labeling of enveloped viruses with quantum dots for single virus tracking [J]. *ACS Nano*, 2008, 2(8): 1553-1562.
- [14] Huang BH, Lin Y, Zhang ZL, et al. Surface labeling of enveloped viruses assisted by host cells [J]. *ACS Chemical Biology*, 2012, 7(4): 683-688.
- [15] Li J, Chen PR. Development and application of bond cleavage reactions in biorthogonal chemistry

- [J]. *Nature Chemical Biology*, 2016, 12(3): 129-137.
- [16] Krall N, Da Cruz FP, Boutureira O, et al. Site-selective protein-modification chemistry for basic biology and drug development [J]. *Nature Chemistry*, 2016, 8(2): 103-113.
- [17] Johnson JA, Lu YY, Van Deventer JA, et al. Residue-specific incorporation of non-canonical amino acids into proteins: recent developments and applications [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2010, 14(6): 774-780.
- [18] Salic A, Mitchison TJ. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis *in vivo* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(7): 2415-2420.
- [19] Patterson DM, Nazarova LA, Prescher JA. Finding the right (bio)orthogonal chemistry [J]. *ACS Chemical Biology*, 2014, 9(3): 592-605.
- [20] Laughlin ST, Bertozzi CR. Metabolic labeling of glycans with azido sugars and subsequent glycan-profiling and visualization via staudinger ligation [J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(11): 2930-2944.
- [21] Huang LL, Lu GH, Hao J, et al. Enveloped virus labeling via both intrinsic biosynthesis and metabolic incorporation of phospholipids in host cells [J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(10): 5263-5270.
- [22] Pan H, Li WJ, Yao XJ, et al. *In situ* bioorthogonal metabolic labeling for fluorescence imaging of virus infection *in vivo* [J]. *Small*, 2017, 13(17): 196-214.
- [23] Pan H, Zhang Y, Luo Z, et al. Autophagy mediates avian influenza H5N1 pseudotyped particle-induced lung inflammation through NF-kappaB and p38 MAPK signaling pathways [J]. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2014, 306(2): 183-195.
- [24] Zheng LL, Yang XX, Liu Y, et al. *In situ* labelling chemistry of respiratory syncytial viruses by employing the biotinylated host-cell membrane protein for tracking the early stage of virus entry [J]. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 2014, 50(99): 15776-15779.
- [25] Hao J, Huang LL, Zhang R, et al. A mild and reliable method to label enveloped virus with quantum dots by copper-free click chemistry [J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(19): 8364-8370.
- [26] Pan H, Yao X, Chen W, et al. Dissecting complicated viral spreading of enterovirus 71 using *in situ* bioorthogonal fluorescent labeling [J]. *Biomaterials*, 2018, 181(7): 199-209.
- [27] Zhao X, Shen Y, Adogla EA, et al. Surface labeling of enveloped virus with polymeric imidazole ligand-capped quantum dots via the metabolic incorporation of phospholipids into host cells [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2016, 4(14): 2421-2427.
- [28] Pan H, Zhang P, Gao D, et al. Noninvasive visualization of respiratory viral infection using bioorthogonal conjugated near-infrared-emitting quantum dots [J]. *ACS Nano*, 2014, 8(6): 5468-5477.