

# 非天然氨基酸正交翻译技术：一种新型基因工程活病毒疫苗研发技术

李瑞洋<sup>1</sup>, 冉智光<sup>2</sup>, 罗炼钊<sup>1</sup>, 李安菲<sup>1</sup>, 曹立亭<sup>1</sup>, 马跃<sup>1</sup>

1 西南大学 动物科学学院, 重庆 402460

2 重庆澳龙生物制品有限公司, 重庆 402460

李瑞洋, 冉智光, 罗炼钊, 等. 非天然氨基酸正交翻译技术：一种新型基因工程活病毒疫苗研发技术. 生物工程学报, 2020, 36(5): 891–898.

Li RY, Ran ZG, Luo LZ, et al. Unnatural amino acid orthogonal translation: a genetic engineering technology for the development of new-type live viral vaccine. Chin J Biotech, 2020, 36(5): 891–898.

**摘要：**非天然氨基酸正交翻译技术利用外源的非天然氨基酸氨酰 tRNA 合成酶 (aaRS) 基因和对应的 tRNA 基因构建非天然氨基酸正交翻译系统 (Orthogonal translation system)。该正交翻译系统能利用终止密码子在蛋白翻译过程中将非天然氨基酸定点插入目标多肽链中。该技术不但是—种新的蛋白质生化研究工具，在新型基因工程病毒疫苗研究中更具有划时代的意义。利用人为构建的具有非天然氨基酸正交翻译系统的转基因细胞，通过在病毒复制的关键基因中引入提前终止密码子构建的突变病毒，在添加非天然氨基酸的情况下该基因仍能完整表达从而完成病毒的复制和传代，但该突变病毒在正常细胞（无非天然氨基酸正交翻译系统的宿主细胞）中因复制关键基因不能完整表达而无法复制传代，因而是一种复制缺陷型病毒。这种复制缺陷型病毒用作疫苗时兼具了减毒活疫苗免疫效果良好与灭活疫苗安全性高的优点，是一种较为理想的活病毒疫苗。文中简要综述了非天然氨基酸正交翻译技术在新型复制缺陷活病毒疫苗研究中的应用及其前景。

**关键词：**正交翻译技术，基因工程，非天然氨基酸，复制缺陷活病毒，疫苗

## Unnatural amino acid orthogonal translation: a genetic engineering technology for the development of new-type live viral vaccine

Ruiyang Li<sup>1</sup>, Zhiguang Ran<sup>2</sup>, Lianzhao Luo<sup>1</sup>, Anfei Li<sup>1</sup>, Liting Cao<sup>1</sup>, and Yue Ma<sup>1</sup>

1 College of Animal Sciences, Southwest University, Chongqing 402460, China

2 Chongqing Avleon Biological Products Co. LTD, Chongqing 402460, China

**Abstract:** Unnatural amino acid orthogonal translation machinery can insert unnatural amino acids at desired sites of protein

Received: August 28, 2019; Accepted: October 28, 2019

Corresponding author: Yue Ma. E-mail: mayue6399@126.com

through stop codon by means of foreign orthogonal translation system composed of aminoacyl-tRNA synthetase and orthogonal tRNA genes. This new genetic engineering technology is not only a new tool for biochemical researches of proteins, but also an epoch-making technology for the development of new-type live viral vaccines. The mutated virus containing premature termination codon in genes necessary for replication can be propagated in transgenic cells harboring unnatural amino acid orthogonal translation machinery in media with corresponding unnatural amino acid, but it cannot replicate in conventional host cells. This replication-deficient virus is a new-type of live viral vaccine that possesses advantages of high efficacy of traditional attenuated vaccine and high safety of killed vaccine. This article reviews the application and prospect of unnatural amino acid orthogonal translation machinery in the development of novel replication-deficient virus vaccines.

**Keywords:** orthogonal translation machinery, genetic engineering, unnatural amino acid, replication-deficient virus, vaccine

第 21 和 22 种蛋白氨基酸，即硒代半胱氨酸 (Sec) 和吡咯赖氨酸 (Pyl)，对于绝大多数生物细胞来说仍属于非天然氨基酸 (Unnatural amino acids, UAAs)<sup>[1]</sup>。本世纪初科学家发现产甲烷古菌中 Pyl 是由琥珀密码子 UAG 编码并在蛋白翻译过程中插入氨基酸序列中<sup>[2-4]</sup>。Pyl 插入蛋白质依靠吡咯赖氨酸氨酰 tRNA 合成酶 (PylRS) 和吡咯赖氨酸氨酰 tRNA ( $tRNA^{Pyl}$ ) 正交对，二者分别由 PylS 和 PylT 基因编码。图 1 所示即为产甲烷古菌利用琥珀密码子在蛋白质翻译过程中将 Pyl 掺入多肽链的过程<sup>[5]</sup>。该发现使得人们得以利用基因工程技术在普通生物细胞中将一种甚至多种非天然氨基酸定点插入蛋白质中，这一基因工程技术被称为非天然氨基酸正交翻译技术<sup>[6-12]</sup>。

非天然氨基酸正交翻译技术利用终止密码子在蛋白翻译过程中将非天然氨基酸插入到蛋白质的氨基酸序列中，实际上扩展了氨基酸密码子的数量，因此非天然氨基酸正交翻译技术也被称为遗传密码子扩展技术<sup>[4,13]</sup>。由于利用密码子 UGA 定点插入硒代半胱氨酸 (Sec) 除了需要特定的氨酰 tRNA 合成酶和 tRNA 正交对外，还需要 mRNA 上的顺式作用元件 SECIS 及特殊的延伸因子 SelB<sup>[1]</sup>，而利用 UAG 密码子定点插入 Pyl 则只需要 PylS 和 PylT 基因表达产物即可实现<sup>[14]</sup>，所以非天然氨基酸正交翻译技术研究大都使用 PylRS/ $tRNA^{Pyl}$  正交对将吡咯赖氨酸或其衍生物插入多肽链。但非天然氨基酸正交翻译技术也可

以通过对某一常规蛋白氨基酸的氨酰 tRNA 合成酶和对应的 tRNA 基因进行定向进化突变而实现，有研究报道利用人为突变的大肠杆菌 TyrRS 和 tyrosyl  $tRNA_{CUA}$  正交对，在酵母细胞中利用 UAG 密码子将非天然氨基酸 p-acetyl-L-phenylalanine (p-乙酰基-L-苯丙氨酸) 插入到蛋白质中<sup>[15]</sup>。

绝大多数蛋白质是由 20 种天然蛋白氨基酸构成的，因此我们对蛋白质结构和功能的研究当然会受到这 20 种氨基酸的限制。而利用非天然氨基酸正交翻译技术在原核生物或真核生物蛋白质中定点引入非天然氨基酸无疑为蛋白质的生物化学研究和蛋白质操纵提供了全新的技术手段。非天然氨基酸正交翻译技术最直接的应用就是利用

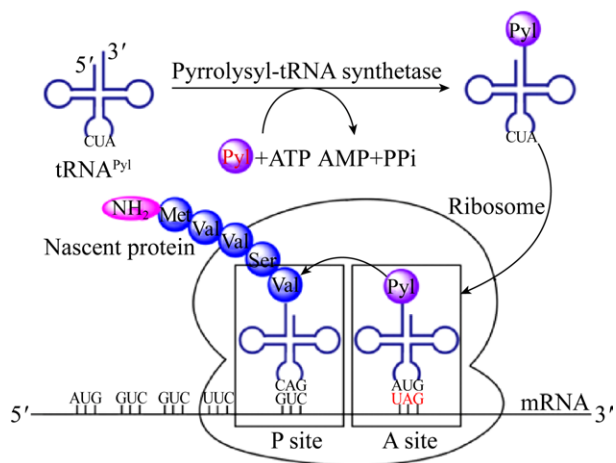


图 1 Pyl 在蛋白翻译过程中定点插入多肽链的机制  
Fig. 1 Mechanism of Pyl insertion into polypeptide chain during protein translation.

具有特定生物正交反应性质的非天然氨基酸在活细胞中对蛋白质进行标记,这对目标蛋白功能研究具有巨大的工具意义<sup>[16]</sup>。如有研究者将合成含有脂肪族叠氮化合物和/或烷基化合物的吡咯赖氨酸类似物定点插入蛋白质后通过“点击”化学修饰高效地进行蛋白标记<sup>[17]</sup>。将显色基团与插入目标蛋白的 UAAs 耦合后可用于蛋白质结构和动力学的光谱分析<sup>[18]</sup>。荧光基团与蛋白质上的 UAAs 偶联使探针与目标之间的距离最小化,为超分辨率显微镜的观察提供便利<sup>[19]</sup>。也有研究将光亲和性非天然氨基酸插入目标蛋白作为质谱识别标签,显著提高了对蛋白质相互作用的识别灵敏度<sup>[20]</sup>。赖氨酸乙酰化是一种蛋白质的翻译后修饰,它和蛋白质磷酸化一样对真核细胞具有重要的调控意义。有研究利用非天然氨基酸正交翻译技术通过大肠杆菌制备了插入 Ne-乙酰基赖氨酸的重组蛋白,为蛋白质乙酰化的细胞功能研究提供了新的手段<sup>[21]</sup>。

除了在蛋白质基础研究中具有多种应用外,非天然氨基酸正交翻译技术在应用性研究中也显露出巨大的潜力。有研究利用非天然氨基酸正交翻译技术引入 UAAs 以开发新型蛋白药物(如抗体和激素),或将插入了非天然氨基酸的抗体通过非天然氨基酸与细胞毒性药物偶联物以靶向癌细胞<sup>[22-23]</sup>。此外,通过非天然氨基酸正交翻译技术在酶中引入 UAAs 提高酶活或控制酶活在工业领域和医药领域均具有应用开发潜力<sup>[24]</sup>。下文将简要综述非天然氨基酸正交翻译技术在新型基因工程活病毒疫苗研究中的应用和前景。

## 1 传统疫苗和现有基因工程疫苗的优缺点

疫苗的发展是 1796 年英国医生 Edward Jenner 通过实验证明了牛痘能够预防天花开始的<sup>[25]</sup>,此后疫苗成为了预防(甚至治疗)很多感染性疾病,特别是病毒病最有力的手段。到目前为止,学界根据疫苗所含免疫原成分不同将疫苗划分 3 代:全病原体制备的疫苗为第一代疫苗,

包括灭活苗和弱毒(活)疫苗;利用基因工程技术重组表达抗原制备的疫苗为第二代疫苗;核酸(主要为 DNA)制备的疫苗为第三代疫苗<sup>[26]</sup>。第一代疫苗为具有悠久应用历史的传统疫苗,而第二代疫苗是 20 世纪 80 年代后才出现的新型基因工程亚单位疫苗,迄今已有一些此类疫苗应用于临床。第二代疫苗尽管安全性高、易于低成本大规模制备,但其免疫效果其实不如第一代疫苗,其主要原因是第二代疫苗只含有目标病原体的部分抗原,因此与第一代全病原体疫苗相比总是存在免疫原性的损失。第三代疫苗(核酸疫苗)因免疫效果不理想,目前基本还处于研究阶段或临床前研究阶段。

在至今仍为主流的第一代疫苗中,灭活疫苗是通过物理因素或者化学方法处理病毒后使病原丧失感染性和复制能力而变得无毒,其安全性得到有效的保证。但是灭活疫苗在灭活过程中会造成抗原变性因而带来免疫原性损失,且通过抗原递呈细胞(Antigen presenting cell, APC)内源性加工处理实现细胞毒性 T 淋巴细胞(Cytotoxic T lymphocyte, CTL)的活化、增殖的效率较低,因此尽管体液免疫效果尚可而细胞免疫效果较差,常需要刺激性较大的免疫佐剂和多次免疫才能达到较好的免疫效果。

减毒活疫苗是经过长期体外培养及减毒处理制备的活病原体疫苗,与野毒株相比其免疫原性几乎没有发生改变,作为疫苗进入动物体内后其能主动感染宿主的 APC 细胞从而高效呈递抗原,因此细胞免疫和体液免疫效果均良好。但是,减毒活疫苗可以在动物体内复制传代(只是复制能力没有野毒株强),从而发生变异和进化,存在毒力返强的风险<sup>[27-29]</sup>,因此安全性较低是传统减毒活疫苗最大的短板。那么有没有可能研发出兼具减毒活疫苗高效性与灭活疫苗高安全性的疫苗呢?基因工程技术的持续发展不断地为疫苗研发提供新的技术手段,上述非天然氨基酸正交翻译技术在新型

活病毒疫苗研究方面则展示出了巨大的潜力。

## 2 利用非天然氨基酸正交翻译技术制备复制缺陷型病毒的原理

病毒是严格的细胞内寄生生物,其基因组较小且各基因功能清楚。因此,通过反向遗传学技术在病毒复制必需的关键基因(病毒基因组复制酶基因或病毒粒子包装蛋白基因)中引入提前终止密码子(Premature stop codon, PTC),利用人为构建并含有非天然氨基酸正交翻译机制的转基因细胞,通过添加对应的UAA即可制备PTC突变病毒。Liu等<sup>[30]</sup>从合成生物学的角度将这一技术原理称为“条件性敲除”(Conditional knockout)。其实,其技术本质也可以理解为对目标病毒的遗传性灭活(Genetic inactivation)。

由于PTC突变病毒只是用UAA替换了极少的氨基酸(一至数个),即使PTC突变位于病毒的主要抗原基因中(如病毒的Cap蛋白),对其免疫原性影响也是微乎其微的,因此PTC突变病毒几乎具有与野生型病毒相同的感染性和免疫原性,从激发宿主免疫反应的角度来说是一种优良的活病毒疫苗,完全可以与传统的减毒活疫苗相比。另一方面,由于正常宿主细胞(包括动物活体细胞)不具备非天然氨基酸正交翻译机制,也不含有非天然氨基酸,所以PTC突变病毒感染正常宿主细胞后不能产生子代病毒,因此是一种复制缺陷型病毒。在正常宿主细胞不能复制传代则意味着PTC突变病毒作为疫苗应用时在动物体内发生变异和进化的概率极低,也就是说发生毒力返强的概率极低。因此,相对于安全性较低的传统减毒活疫苗来说,通过非天然氨基酸正交翻译技术制备的PTC突变病毒可以称为安全的活病毒疫苗。

## 3 非天然氨基酸正交翻译技术用于新型活病毒疫苗研究进展

2013年Lin等利用PylRS/tRNA<sup>Pyl</sup>正交对在

哺乳动物细胞中将5种非天然氨基酸(均为Pyl类似物)定点插入HBV的L蛋白中,制备出含有UAA的活HDV病毒颗粒,并证实了可以通过点击化学方法并引入UAA对这些HDV病毒进行有效标记<sup>[31]</sup>。尽管该研究并非旨在疫苗研究,但其首次从技术上证实了非天然氨基酸正交翻译技术可以用于制备复制缺陷型PTC病毒。

2014年Jiantao Guo团队首次以新型活病毒疫苗研究为目的,利用非天然氨基酸正交翻译技术制备了在正常宿主细胞内不能复制传代的HIV-1病毒(图2)<sup>[32]</sup>。该研究利用源自大肠杆菌的AzFRS/tRNA<sup>Tyr</sup>正交对和琥珀密码子TAG,将非天然氨基酸4-azidophenylalanine(AzF, 络氨酸类似物)引入HIV-1 GAG基因、POL基因和HIV蛋白酶基因的不同位置制备了PTC病毒,并比较各种PTC病毒在含有AzFRS/tRNA<sup>Tyr</sup>正交对的转基因293T细胞中的滴度以及收获的子代病毒对不含AzFRS/tRNA<sup>Tyr</sup>正交对的TZM-bl细胞的感染性。结果发现在HIV蛋白酶基因的Tyr59位置引入TAG的PTC的病毒能够在含AzFRS/tRNA<sup>Tyr</sup>正交对的转基因293T细胞中复制并产生感染性PTC病毒颗粒。尽管该研究未进一步验证制备的PTC突变HIV-1病毒作为活疫苗的免疫效力和安全性,但是首次揭示和证实了利用非天然氨基酸正交翻译技术制备复制缺陷型活病毒疫苗的研究策略及其可行性。后来该团队在此基础上进一步将引入非天然氨基酸的琥珀密码子TAG扩展为四联码TAGA并制备出复制缺陷型HIV-1病毒<sup>[33]</sup>。这一改进的优点很明显,因为用四联码TAGA作为PTC与三联码TAG相比在病毒传代过程中发生回复突变(即PTC突变回有义密码子)的概率低得多。该团队在另一项研究中直接将AzFRS/tRNA<sup>Tyr</sup>正交对插入HIV-1病毒基因组中构建自带非天然氨基酸正交翻译系统的PTC病毒<sup>[34]</sup>,这一技术路线有两大优势,一是不再需要专门构建用以制备PTC病毒的转基因细胞;二是可以利用非天然氨基酸对感染细胞的PTC病毒的复制水平进行调

控，断绝非天然氨基酸的供应即可“关闭”PTC 病毒的复制。但该研究只是在培养的细胞中证实了可以通过非天然氨基酸对感染细胞内的 PTC 病毒的复制水平进行调控，尚未验证这一精致的病毒复制调控机制能否在活体动物上实现。

北京大学周德敏课题组在一项研究中构建了

几十个在不同基因的不同位置含有提前终止密码子的 PTC 流感病毒的感染性克隆，然后利用含有 MbpyIRS/tRNA<sub>CUA</sub> 正交对的转基因 293T 细胞并通过添加非天然氨基酸 Ne-2-azidoethyloxycarbonyl-L-lysine (NAEK) 制备了复制缺陷型流感病毒(图 3)<sup>[35]</sup>。研究结果显示构建的绝大部分 PTC 流

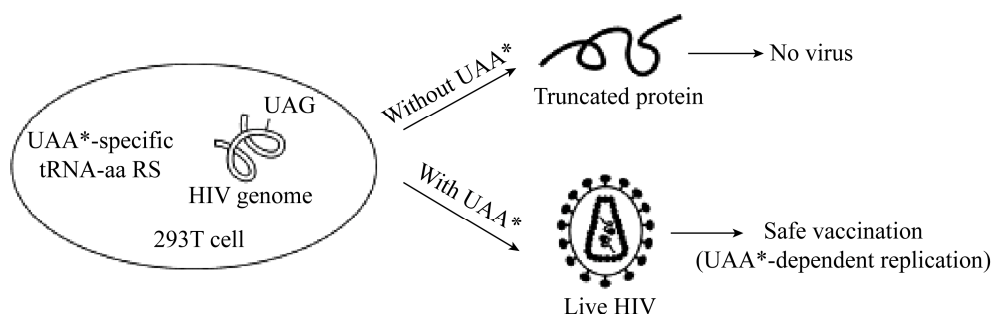


图 2 利用非天然氨基酸正交翻译技术制备复制缺陷型 HIV-1 病毒的原理

Fig. 2 Mechanism of replication-deficient HIV-1 virus preparation via orthogonal translation of unnatural amino acids.

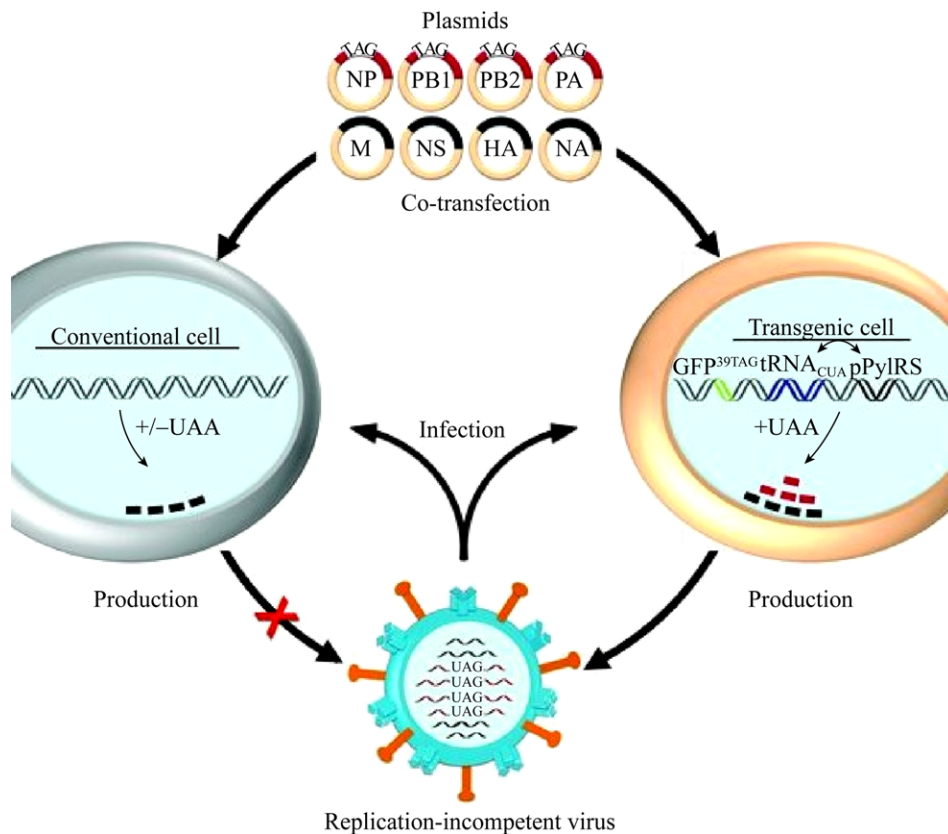


图 3 利用非天然氨基酸正交翻译技术制备复制缺陷型流感病毒的原理

Fig. 3 Mechanism of replication-deficient influenza virus preparation via orthogonal translation of unnatural amino acids.

感病毒都只能在添加 NAEK 的转基因细胞中复制,在非转基因细胞或不添加 NAEK 的转基因细胞中均不能复制,证实了制备的复制缺陷型流感病毒对正常细胞的安全性。该研究进一步对一株含有 4 个提前终止密码子 (PA-R266、PB2-K33、PB1-R52、NP-D101) 的复制缺陷型流感病毒 PTC-4A 作为候选疫苗株进行了深入的研究,同株野生型病毒对小鼠的 LD<sub>50</sub> 为  $8 \times 10^3$  PFU,而小鼠攻毒试验证实实用  $10^9$  PFU 的 PTC-4A 进行攻毒后 10 只小鼠无一发病或死亡。在  $10^5$  PFU 攻毒剂量下,PTC-4A 株与 CIAV 株 (商品化的冷适应弱毒疫苗株) 相比无论是体重情况和第 3 天组织带毒量均明显优于 CIAV 株,证实了 PTC-4A 株的安全性优于常规的弱毒疫苗株。在免疫效力方面,小鼠免疫实验证实 PTC-4A 株与 CIAV 株相比在 HI 抗体滴度、NT 抗体滴度、IgA 抗体滴度和特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞反应各方面均无显著差异,但显著优于灭活疫苗。小鼠免疫保护实验证实在两次免疫和 50 倍 LD<sub>50</sub> 攻毒情况下,PTC-4A 株与 CIAV 株免疫小鼠存活率均为 100%,而灭活疫苗免疫小鼠的存活率只有 70%。

该研究以流感病毒为目标,完整展现了利用非天然氨基酸正交翻译技术研发复制缺陷活病毒疫苗的策略,而且对这种缺陷型流感病毒作为候选疫苗的安全性方面进行了全面的验证,并用免疫保护实验证实了这种缺陷型流感病毒作为候选疫苗的效果优于已经商品化的传统减毒活疫苗。该研究论文于 2016 年底在 *Science* 上发表,至此非天然氨基酸正交翻译技术被视为革命性的新型基因工程活病毒疫苗研发技术。

## 4 展望

利用非天然氨基酸正交翻译技术制备的复制缺陷病毒作为疫苗在理论上具有与传统减毒活疫苗相当的免疫效果,而且其不能在动物体内复制传代,因此不能在动物体内发生变异和进化,所

以其安全性远高于能在动物体内传代的传统减毒活疫苗。根据所选 PTC 突变基因的不同,可以利用非天然氨基酸正交翻译技术制备的复制缺陷病毒分为两类:基因组复制缺陷型 PTC 病毒和包装缺陷型 PTC 病毒,二者的安全性会有所不同。基因组复制缺陷型 PTC 病毒构建时选择病毒基因组复制必需基因 (如核酸复制酶基因) 引入 PTC 突变,因此制备的 PTC 病毒作为疫苗感染动物细胞后其基因组不能在细胞内复制,所以发生终止密码子回复突变 (遗传逃逸) 的可能性为零。而包装缺陷型 PTC 病毒构建时选择病毒包装必需的基因 (通常是病毒的衣壳蛋白) 引入 PTC 突变,制备的 PTC 病毒作为疫苗感染动物细胞后其基因组能完成复制 (但是不能包装形成子代病毒颗粒),而在其基因组复制过程中就可能发生回复突变,因此其安全性应低于基因组复制缺陷型 PTC 病毒,但其安全性还是远高于传统减毒活疫苗。当然,如果构建在病毒基因组复制必需基因和病毒包装必需基因中均含有 PTC 突变的复制缺陷病毒,则其发生遗传逃逸的几率将更低。周德敏课题组的研究证实只含一个提前终止突变的病毒传 20 代后遗传逃逸率最高约为  $10^{-8}$ ,而含 2 个或多个 PTC 突变的病毒传 20 代后遗传逃逸率最高约为  $10^{-11}$ <sup>[35]</sup>。这些遗传逃逸率是在转基因细胞中和添加 UAA 情况下传代后测定的,而在免疫实验中从免疫后 3 d 小鼠的呼吸道组织中未检测到有任何回复突变的病毒,充分证实了利用非天然氨基酸正交翻译技术制备的复制缺陷病毒作为疫苗的安全性。

此外,利用非天然氨基酸正交翻译技术制备的复制缺陷病毒还具有极高的生物安全性,因为其作为疫苗应用时释放到生物环境中的基因是含有 PTC 突变的基因,含有 PTC 突变的基因是无毒的基因 (因为含 PTC 突变的基因在正常宿主细胞无法表达),它如果与生物环境中的同源基因发生重组也只能形成还有 PTC 突变的无毒基因。相

反，通过改变氨基酸序列构建的基因工程弱毒疫苗，其应用于生产实践时释放到生物环境中的基因同生物环境中的同源基因发生重组则可能产生毒力恢复或毒力更强的毒株。

利用非天然氨基酸正交翻译技术制备的复制缺陷病毒除了可用作预防性疫苗之外还具有作为治疗性疫苗的潜力。其机理是带有提前终止突变的 PTC 病毒可能与野生型病毒发生基因重组或重排（分节段基因组病毒）从而降低已感染野生型病毒的复制效率，周德敏课题组的研究证实 PTC 流感病毒与野生型病毒共感染正常宿主细胞时能明显降低野生型病毒的复制效率<sup>[35]</sup>。

理论上说，任何一种病毒只要能构建其反向遗传系统就可以应用非天然氨基酸正交翻译技术研究 and 开发该病毒的复制缺陷型活病毒疫苗。但是该技术用于复制缺陷型活病毒疫苗研究也存在两大难点：一是由于其涉及的基因工程技术机制过于精致、复杂，技术门槛较高；二是由于引入的 PTC 突变在非天然氨基酸正交翻译过程中将与细胞内的延伸因子 eRF1 发生竞争<sup>[36]</sup>，导致插入非天然氨基酸的效率不高，降低突变病毒在转基因细胞中的复制效率（即复制缺陷活病毒疫苗的生产效率）。尽管如此，非天然氨基酸正交翻译技术依然是一种创新的、潜力巨大的新型基因工程活病毒疫苗技术，可以预见会有更多利用非天然氨基酸正交翻译技术研究复制缺陷型活病毒疫苗见诸报道。如能解决上述复制缺陷活病毒疫苗生产效率的限制性难题，则基于非天然氨基酸正交翻译技术的复制缺陷型活病毒疫苗就可以走向实用化。

## REFERENCES

- [1] Zhang Y, Baranov PV, Atkins JF, et al. Pyrrolysine and selenocysteine use dissimilar decoding strategies. *J Biol Chem*, 2005, 280(21): 20740–20751.
- [2] Srinivasan G. Pyrrolysine encoded by UAG in *Archaea*: Charging of a UAG-decoding specialized tRNA. *Science*, 2002, 296(5572): 1459–1462.
- [3] Blight SK, Larue RC, Mahapatra A, et al. Direct charging of tRNA<sub>CUA</sub> with pyrrolysine *in vitro* and *in vivo*. *Nature*, 2004, 431(7006): 333–335.
- [4] Fekner T, Chan MK. The pyrrolysine translational machinery as a genetic-code expansion tool. *Curr Opin Chem Biol*, 2011, 15(3): 387–391.
- [5] Wan W, Tharp JM, Liu WR. Pyrrolysyl-tRNA synthetase: an ordinary enzyme but an outstanding genetic code expansion tool. *Biochim Biophys Acta (BBA) Prot and Proteom*, 2014, 1844(6): 1059–1070.
- [6] Wang WY, Takimoto JK, Louie GV, et al. Genetically encoding unnatural amino acids for cellular and neuronal studies. *Nat Neurosci*, 2007, 10(8): 1063–1072.
- [7] Xiao H, Chatterjee A, Choi SH, et al. Genetic incorporation of multiple unnatural amino acids into proteins in mammalian cells. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013, 125(52): 14330–14333.
- [8] Köhrer C, Sullivan EL, RajBhandary UL. Complete set of orthogonal 21st aminoacyl-tRNA synthetase-amber, ochre and opal suppressor tRNA pairs: concomitant suppression of three different termination codons in an mRNA in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(21): 6200–6211.
- [9] Namy O, Zhou Y, Gundllapalli S, et al. Adding pyrrolysine to the *Escherichia coli* genetic code. *FEBS Letters*, 2007, 581(27): 5282–5288.
- [10] Amiram M, Haimovich AD, Fan CG, et al. Evolution of translation machinery in recoded bacteria enables multi-site incorporation of nonstandard amino acids. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(12): 1272–1279.
- [11] Mukai T, Kobayashi T, Hino N, et al. Adding l-lysine derivatives to the genetic code of mammalian cells with engineered pyrrolysyl-tRNA synthetases. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 371(4): 818–822.
- [12] Wang KH, Sachdeva A, Cox DJ, et al. Optimized orthogonal translation of unnatural amino acids enables spontaneous protein double-labelling and FRET. *Nat Chem*, 2014, 6(5): 393–403.
- [13] Chin JW. Expanding and reprogramming the genetic code. *Nature*, 2017, 550(7674): 53–60.
- [14] Ambrogelly A, Gundllapalli S, Herring S, et al. Pyrrolysine is not hardwired for cotranslational

- insertion at UAG codons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(9): 3141–3146.
- [15] Chin JW. An expanded eukaryotic genetic code. *Science*, 2003, 301(5635): 964–967.
- [16] Neumann H. Rewiring translation-genetic code expansion and its applications. *FEBS Lett*, 2012, 586(15): 2057–2064.
- [17] Nguyen DP, Lusic H, Neumann H, et al. Genetic encoding and labeling of aliphatic azides and alkynes in recombinant proteins via a pyrrolysyl-tRNA S chemistry. *J Am Chem Soc*, 2009, 131(25): 8720–8721. ynthetase/tRNA<sub>CUA</sub> Pair and Click.
- [18] Nikić I, Plass T, Schraidt O, et al. Minimal tags for rapid dual-color live-cell labeling and super-resolution microscopy. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, 53(8): 2245–2249.
- [19] Vreja IC, Nikić I, Göttfert F, et al. Super-resolution microscopy of clickable amino acids reveals the effects of fluorescent protein tagging on protein assemblies. *Acs Nano*, 2015, 9(11): 11034–11041.
- [20] Yang Y, Song HP, He D, et al. Genetically encoded protein photocrosslinker with a transferable mass spectrometry-identifiable label. *Nat Commun*, 2016, 7: 12299.
- [21] Neumann H, Peak-Chew SY, Chin JW. Genetically encoding N<sup>ε</sup>-acetyllysine in recombinant proteins. *Nat Chem Biol*, 2008, 4(4): 232–234.
- [22] Takács K, Du Roure C, Nabarro S, et al. The regulated long-term delivery of therapeutic proteins by using antigen-specific B lymphocytes. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2004, 101(46): 16298–16303.
- [23] Sun SB, Schultz PG, Kim CH. Therapeutic applications of an expanded genetic code. *Chembiochem*, 2015, 15(12): 1721–1729.
- [24] Hu C, Wang J. Chapter five-method for enzyme design with genetically encoded unnatural amino acids. *Methods Enzymol*, 2016, 580: 109–133.
- [25] Moss B. Vaccinia virus: a tool for research and vaccine development. *Science*, 1991, 252(5013): 1662–1667.
- [26] Robinson HL, Pertmer TM. DNA vaccines for viral infections: basic studies and applications. *Adv Virus Res*, 2000, 55: 1–74.
- [27] Petrova VN, Russell CA. The evolution of seasonal influenza viruses. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 16(1): 47–60.
- [28] Woolthuis RG, Van Dorp CH, Kesmir C, et al. Long-term adaptation of the influenza A virus by escaping cytotoxic T-cell recognition. *Sci Rep*, 2016, 6: 33334.
- [29] Plyusnin A, Morzunov SP. Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2001, 256: 47–55.
- [30] Liu P, Jiang L. Conditional knockout tools: Application of site-specific incorporation of unnatural amino acid via genetic code expansion in viral and parasite vaccine development. *Synth Syst Biotechnol*, 2017, 2(1): 2–4.
- [31] Lin SX, Yan H, Li L, et al. Site-specific engineering of chemical functionalities on the surface of live hepatitis D virus. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013, 52(52): 13970–13974.
- [32] Wang NX, Li Y, Niu W, et al. Construction of a live-attenuated HIV-1 vaccine through genetic code expansion. *Angew Chem Intl Ed Engl*, 2014, 53(19): 4867–4871.
- [33] Chen Y, Wan YM, Wang NX, et al. Controlling the replication of a genomically recoded hiv-1 with a functional quadruplet codon in mammalian cells. *ACS Synth Biol*, 2018, 7(6): 1612–1617.
- [34] Yuan Z, Wang NX, Kang GB, et al. Controlling multicycle replication of live-attenuated hiv-1 using an unnatural genetic switch. *ACS Synth Biol*, 2017, 6(4): 721–731.
- [35] Si LL, Xu H, Zhou XY, et al. Generation of influenza A viruses as live but replication-incompetent virus vaccines. *Science*, 2016, 354(6316): 1170–1173.
- [36] Schmied WH, Elsässer SJ, Uttamapinant C, et al. Efficient multisite unnatural amino acid incorporation in mammalian cells via optimized pyrrolysyl tRNA synthetase/tRNA expression and engineered eRF1. *J Am Chem Soc*, 2014, 136(44): 15577–15583.

(本文责编 郝丽芳)