

一种用于体外转录 mRNA 的质粒载体、构建方法及其应用

技术领域

本发明属于基因工程领域。具体地，涉及一种能够提高质粒稳定性的 mRNA 体外转录载体、构建方法及其应用。

背景技术

mRNA 技术有许多优点：首先 mRNA 不会整合到基因组中，从而避免了对插入突变的担忧；更重要的是，mRNA 与相对稳定的 DNA 不同，行使过功能的 mRNA 随后便会降解，不会对人体产生其他的毒害或副作用；mRNA 可以以无细胞的方式制造，可通过体外转录技术快速、经济地大规模生产，因其研发周期短，从而可以实现快速、经济、高效的生产。此外，单个 mRNA 可以编码多种抗原、蛋白或多肽，工艺适用性强，理论上任何蛋白都可以被表达。

mRNA 新冠疫苗已经验证了 mRNA 技术平台在疫苗领域的适用性。除了新冠疫苗，mRNA 技术还可被广泛应用于传染病、肿瘤以及蛋白替换疗法等领域。

对于 mRNA 技术来说，良好的生产工艺起始于安全稳定高效的质粒载体设计。无论是从工艺生产的角度，还是治疗或者监管的角度，质粒 DNA 中大部分非必要序列均应被去除，使分子量尽可能减少，以便基因操作，因为质粒太大，会对宿主菌施加巨大的代谢负荷，减少细胞用于质粒复制的资源，从而导致质粒 DNA 产量下降。此外在工业生产中，质粒在不断传代的过程中还必须要维持高度的稳定性，以保证 mRNA 技术的广泛应用和稳定。

在 mRNA 质粒技术生产过程中存在一个难题，那就是质粒的 PolyA 序列随着细菌的不断扩增发生缩短，这会对携带 PolyA 尾巴质粒的克隆和扩

增造成麻烦,无法实现生产的质粒 PloyA 序列上的均一性,不符合 GMP 级别的生产工艺和药品监管要求。而且 PolyA 序列对于 mRNA 稳定性和翻译表达效率来说也是非常关键的元件,因此如何解决质粒发酵生产中 PolyA 序列缩短的问题,也是研发人员一直努力的方向。

Kyle Jacoby 等人为了消除环形质粒上 PolyA 尾巴的不稳定性,开发了源自 PJazz 质粒的 pEVL 线性质粒系统,与传统环形质粒相比,经连续传代培养, pEVL 质粒对于 PolyA 尾巴长度的维持有显著优势 (Kyle Jacoby, 2016, Mol Ther Nucleic Acids)。但 pEVL 质粒拷贝数非常低,不适于大规模生产。2019 年, Zeljka Trepotec 等人发现把 PolyA 序列间隔开来,可以减少质粒 DNA 扩增时发生的重组,维持 PolyA 尾巴长度。使用分段式 polyA 尾,代表性的为 BioNTech 公司的专利 US10717982B2 公开的技术方案,以及 Ethris 公司的专利 WO2020074642A1 公开的技术。Kristie Bloom 等人通过酶切连接开发出一种可以增加 PolyA 长度的质粒,作为 mRNA 体外共转录的模板,以改善质粒传代中 PolyA 长度缩短的情况。此外还有其他公司采用较短的 polyA 序列以达到稳定质粒的目的。

但上述大多数方法均是针对 polyA 本身的改进,即使为改善 PolyA 不稳定的情况开发了质粒系统,也被证明不适合用于大规模的生产使用。

发明内容

本发明针对适用于 RNA 技术的质粒开展进一步研究,突破大多数仅针对 polyA 的改进方法,考虑从质粒整体出发在不影响质粒复制和产量的前提下解决 PolyA 丢失的难题,提高质粒完整性和稳定性,适合大规模生产。

本发明提供一种用于提高细菌发酵中质粒传代过程中 PolyA 尾稳定性的核酸分子及其应用。

本发明术语“载体”在本文中为本领域技术人员所知的一般含义,包括

核酸的任何中间载体，例如使得所述核酸能够被引入原核和/或真核宿主细胞或者在适当的情况下被整合成一个基因组，载体优选在细胞中复制和/或表达。

本发明术语“药学上可接受的载体”是指与药学活性物质一起配制的非活性物质，以满足或促进活性物质在剂量、吸附、溶解度或药代动力学方面的要求。

本发明术语“质粒”通常涉及染色体外遗传物质的构建体，通常是环状DNA双链体，其可以独立于染色体DNA复制。

本发明术语“宿主细胞”是指可以用外源核酸转化或转染的任何细胞，包括原核(例如大肠杆菌)或真核细胞(例如酵母细胞和昆虫细胞)。特别优选哺乳动物细胞，例如来自人、小鼠、仓鼠、猪、山羊、灵长类动物的细胞。细胞可源自多种组织类型并包括原代细胞和细胞系。

本发明术语“肽”和“蛋白质”包括不仅含有氨基酸成分而且含有非氨基酸成分例如糖和磷酸结构的物质，并且还包括含有键例如酯键、硫醚键或二硫键的物质。

本发明术语“编码肽或蛋白质的核苷酸片段”是指，如果存在于适当的环境中，优选地存在于细胞中，则可以在该过程中指导氨基酸组装以产生肽或蛋白质的翻译。

本发明术语“免疫反应”涉及免疫系统例如对免疫原性生物体例如细菌或病毒、细胞或物质的反应。术语“免疫反应”包括先天免疫反应和适应性免疫反应。优选地，免疫应答与免疫细胞的激活、细胞因子生物合成的诱导和/或抗体产生有关。优选地，免疫应答包括激活抗原呈递细胞如树突细胞和/或巨噬细胞、抗原或其片段由所述抗原呈递细胞呈递和由于该呈递而激活细胞毒性T细胞的步骤。

本发明第一方面，提供一种核酸分子，包含 1) 可转录的核酸片段或用于引入可转录的核酸片段的核酸；2) 包含多聚脱氧腺苷酸 polyA 的核酸片段；3) 包含回旋酶结合位点 (SGS) 的核酸片段。

所述可转录的核酸片段包括编码肽或蛋白的核酸片段。

所述用于引入可转录的核酸片段的核酸包括多克隆位点或同源重组位点。

所述 polyA 包括至少 50 个连续的脱氧腺苷酸。

所述包含 polyA 的核酸片段包括至少 2 个长度为至少 20 个连续脱氧腺苷酸序列的元件，所述 2 个元件中间至少间隔一个非 T 脱氧核苷酸。

在一些具体实施方式中，所述包含回旋酶结合位点的核酸片段来源于病毒或细菌；优选地，所述包含回旋酶结合位点的核酸片段来源于病毒；更优选地，所述包含回旋酶结合位点的核酸片段来源于噬菌体。

在一些具体实施方式中，所述包含回旋酶结合位点的核酸片段来源于质粒；优选的，所述包含回旋酶结合位点的核酸片段来源于 ColE1 型质粒。

在一些具体实施方式中，所述 SGS 核酸片段在质粒载体中构建入 T7 启动子的上游；在一些具体实施方式中，所述 SGS 核酸片段在质粒载体中构建入 PolyA 的下游。本领域技术人员根据本申请公开内容能够根据需要选择适宜的位置插入 SGS。

另一方面，本发明提供一种 DNA 表达载体或重组质粒，所述 DNA 表达载体或重组质粒序列包含 1) 编码 mRNA 分子的第一核酸片段；2) 包含多聚腺苷脱氧核酸 polyA 的第二核酸片段；3) 包含回旋酶结合位点的第三核酸片段。

本发明还提供一种表达载体或重组质粒的制备方法，将上述表达载体或重组质粒转化到大肠杆菌感受态细胞，取适量涂布于抗性 LB 培养基平

板培养，挑取单克隆菌落、测序，获得测序正确的阳性菌液，进行大规模培养。

本发明提供一种扩增核酸分子的方法，包括在宿主细胞中复制上述核酸分子和繁殖所述宿主细胞。

在一些具体实施方式中，所述宿主细胞为真核细胞或原核细胞；优选的，所述宿主细胞为大肠杆菌。

本发明提供一种获得 RNA 的方法，包括根据上述方法扩增核酸分子，将核酸分子作为模版在体外转录成 RNA。

本发明提供一种获得肽或蛋白质的方法，包括根据上述获得 RNA 的方法获得编码肽或蛋白质的 mRNA，将 mRNA 翻译成肽或蛋白质氨基酸片段。

本发明提供一种产生真核生物可翻译 mRNA 的系统，包括 1) 含有上述核酸分子的载体或质粒；2) 宿主细胞。

另一方面，本发明提供一种编码回旋酶结合位点的核酸核苷酸片段在构建质粒或载体中的应用，所述质粒或载体用于体外转录成 RNA。

另一方面，本发明提供一种组合物，包含根据上述方法获得的 RNA、肽或蛋白质。

在一些具体实施方式中，所述组合物包括药学上可接受的辅料、载体、缓冲剂、保护剂、稳定剂、表面活性剂、渗透压调节剂、佐剂、防腐剂、灭活剂中的一种或多种。

本发明所述缓冲剂包括 HEPES、HIS、TRIS、PB、琥珀酸、柠檬酸中的一种或多种；所述保护剂包括明胶、乙醇、二乙氨四乙酸（EDTA）、二乙氨四乙酸二钠（EDTA-2Na）和氯化镁中的一种或者多种；所述稳定剂包括蔗糖、甘露醇、岩藻糖和麦芽糖中的一种或多种；所述表面活性剂包括吐温、司盘、甘油中的一种或者多种；所述渗透压调节剂包括氯化钠或省

去；所述辅料组分包括甘露醇，蔗糖，氯化钠，氯化镁，HEPES，聚山梨酯80，甘油的一种或者多种。

在一些具体实施方式中，本发明所述组合物可以制备为黏膜免疫制剂、体液免疫制剂、细胞免疫制剂、皮肤免疫制剂。

在一些具体实施方式中，本发明所述组合物可以制备为液体剂型、固体剂型、半固体剂型、气体剂型、吸入剂型。

在一些具体实施方式中，所述的组合物给药方式为静脉注射、肌肉注射、皮下注射、口服给药、口腔给药、舌下给药、直肠给药、呼吸道给药、经皮给药，呼吸道给药为经口吸入、经鼻吸入或经雾化给药装置雾化后吸入。

本发明的核酸分子、含有核酸分子的质粒或载体可用于重组蛋白在细胞转录和表达中的表达。更具体地，当生产重组蛋白时，可以使用本发明的表达载体在基于细胞的系统中转录重组核酸和表达重组蛋白。例如，重组抗体、激素、细胞因子、酶等的制备。

本发明的核酸分子、含有核酸分子的质粒或载体可用于例如基因的瞬时表达，可能的应用领域是基于RNA的疫苗，其在体外转染到细胞中或施用直接在体内、体外瞬时表达功能性蛋白。

本发明提供上述组合物的用途，包括用于医药，用于递送转基因至宿主细胞中，用于在动物中引发初级免疫反应治疗或预防至少一种疾病，用于在动物中加强免疫反应，用于在动物中诱导打破针对自体抗原的耐受性的免疫反应。所述免疫反应包括用于预防癌症、治疗性肿瘤疫苗、预防病毒感染、预防细菌感染、预防真菌感染的疫苗。

本发明提供上述任一核酸分子、表达载体或组合物在制备用于治疗或预防疾病的药物或疫苗中的用途。

在一些具体实施方式中，所述疾病由以下病毒、细菌或原生动物中的一种或多种引起：新型冠状病毒、登革热病毒、疟原虫、带状疱疹病毒、猫细小病毒、猫杯状病毒、猫疱疹病毒、猫白血病毒、猫冠状病毒、猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒、单纯疱疹 1 型病毒、单纯疱疹 2 型病毒、脑炎病毒、乳头瘤病毒、水痘带状疱疹病毒、爱泼斯坦-巴尔病毒、人类巨细胞病毒、人类疱疹病毒 8 型、人乳头状瘤病毒、BK 病毒、JC 病毒、天花、脊髓灰质炎病毒、乙型肝炎病毒、人类博卡病毒、细小病毒 B19、人类星状病毒、诺沃克病毒、柯萨奇病毒、甲型肝炎病毒、鼻病毒、严重急性呼吸综合征病毒、丙型肝炎病毒、黄热病病毒、登革热病毒、西尼罗病毒、风疹病毒、戊型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒(HIV)、流感病毒 A 型或 B 型、瓜纳里托病毒、胡宁病毒、拉沙病毒、马丘波病毒、萨比亚病毒、克里米亚-刚果出血热病毒、埃博拉病毒、马尔堡病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、副流感病毒、呼吸道合胞病毒、人类偏肺病毒、亨德拉病毒、尼帕病毒、狂犬病病毒、丁型肝炎、轮状病毒、环状病毒、大肠杆菌病毒、人类肠道病毒、日本脑炎病毒、水泡状疱疹病毒、东部马脑炎病毒、汉坦病毒、中东呼吸道冠状病毒、基孔肯雅病毒或版纳病毒。

本发明的有益效果包括：

第一方面，通过 SGS 序列提升 Poly A 的稳定性，解决 Poly A 丢失/缩短问题。

第二方面，通过 SGS 序列提升核酸分子的稳定性。

第三方面，SGS 序列减少质粒在扩增期间的重组概率，进一步提升质粒应用的安全性。

第四方面，通过 SGS 序列，可获得纯度更高且符合 GMP 级别的生产工艺和药品监管要求的 RNA 分子、肽或蛋白质，适合大规模生产。

附图说明

图 1、无抗性条件下不同来源 SGS 序列对 polyA 序列的稳定性影响。

图 2、Kana 抗性条件下不同来源 SGS 序列对 polyA 序列的稳定性影响。

图 3、无抗性条件下 SGS Mu398 序列对不同长度类型 PolyA 稳定性的影响。

图 4、Kana 抗性条件下 SGS Mu398 序列对不同长度类型 PolyA 稳定性的影响。

图 5、无抗性条件下 SGS Mu398 序列对不同目的抗原序列的适用性。

图 6、Kana 抗性条件下 Mu398 SGS 序列对不同目的抗原序列的适用性。

图 7、F001 重组质粒第 10 代转录 mRNA 完整性检测结果。

图 8、F002 重组质粒第 10 代转录 mRNA 完整性检测结果。

图 9、F003 重组质粒第 10 代转录 mRNA 完整性检测结果。

图 10、F004 重组质粒第 10 代转录 mRNA 完整性检测结果。

图 11、F005 重组质粒第 10 代转录 mRNA 完整性检测结果。

具体实施方式

实施例 1 不同来源 SGS 序列对质粒 polyA 稳定性的影响

为了探究 SGS 序列对质粒稳定性的影响,将不同来源的 SGS 序列插入到载体 polyA 的下游或 T7 启动子的上游,其中 polyA 为连续的 100A 序列,同时在质粒载体中插入目的基因序列,观察 SGS 序列对质粒稳定性的影响,设计方式如表 1 所示。结果表明,SGS 序列的插入能够显著提升 polyA 在无抗和 Kana 抗性条件下的传代稳定性(图 1 和图 2)。

本发明的转录载体包含 5'UTR 序列、Kozak 序列、抗原编码序列、3'UTR 序列、polyA 尾序列和 SGS 序列,其中所述序列分别通过南京金斯瑞生物科技有限公司合成到 pUC57-kana 载体中,然后通过同源重组的方式

将其分别依次连接至通用型转录载体。构建的质粒转入 Trans1-Blue 大肠杆菌感受态细胞，取适量涂布于 Kana 抗性 LB 培养基平板在 37℃进行培养一定时间，挑取单克隆菌落、测序，将测序正确的阳性菌液保存。随后将含有阳性质粒的菌液在 37℃进行摇菌、大提质粒后获得体外转录模板，通过共转录加帽方式进行 mRNA 制备。

表 1. SGS 序列对质粒稳定性影响设计方式

序号	PolyA	回旋酶结合位点	插入位置	序列
1	100A	Mu82	PolyA 下游	SEQ ID NO: 1
2		Mu82'	T7 启动子上游	
3		Mu286	PolyA 下游	SEQ ID NO: 2
4		Mu286'	T7 启动子上游	
5		Mu398	PolyA 下游	SEQ ID NO: 3
6		Mu398'	T7 启动子上游	
7		pBR322-164	PolyA 下游	SEQ ID NO: 4
8		pBR322-164'	T7 启动子上游	
9		pBR322-282	PolyA 下游	SEQ ID NO: 5
10		pBR322-282'	T7 启动子上游	
11		pSC101-74	PolyA 下游	SEQ ID NO: 6
12		pSC101-74'	T7 启动子上游	
13		O157 Sakai-177	PolyA 下游	SEQ ID NO: 7
14		O157 Sakai-177'	T7 启动子上游	
15		HiB-236	PolyA 下游	SEQ ID NO: 8
16		HiB-236'	T7 启动子上游	

17		Sty-214	PolyA 下游	SEQ ID NO: 9
18		Sty-214'	T7 启动子上游	
对照组		无	N/A	N/A

实施例 2 SGS 序列对不同长度类型 PolyA 稳定性的影响

为了进一步验证 SGS 序列是否能够提高不同长度类型 PolyA 序列的稳定性，将 Mu398 SGS 序列和不同类型 polyA 序列插入到上述质粒载体中，观察 polyA 序列的传代稳定性，具体设计如表 2 所示。

表 2. SGS 序列对不同长度类型 PolyA 稳定性影响设计方式

组别	序号	回旋酶结合位点 (SGS)	PolyA
实验组	1	Mu398	60A
	2		80A
	3		100A
	4		120A
	5		150A
	6		30A*2
	7		30A*3
	8		40A*2
	9		40A*3
	10		50A*2
	11		50A*3
	12		60A*2
对照组	1	无	60A
	2		80A
	3		100A
	4		120A
	5		150A
	6		30A*2
	7		30A*3
	8		40A*2

	9		40A*3
	10		50A*2
	11		50A*3
	12		60A*2

结果表明，添加 Mu398 SGS 序列可以增加各种类型 polyA 序列的传代稳定性，并且能够维持其在 10 代以内的完整性（图 3 和图 4）。

实施例 3 通用型高稳定性质粒载体的确定

为了进一步验证上述质粒载体的通用性，本发明将来源于新型冠状病毒（COVID-19）、登革热病毒（DENV）、疟疾（Malaria）、带状疱疹病毒（VZV）和猫细小病毒（FPV）5 个不同病原体来源的目的基因序列分别插入到含有 SGS 序列的上述载体中，分别构建为表达载体 F001、F002、F003、F004 和 F005。观察质粒传代过程中连续 100A 的传代稳定性。结果表明，SGS 序列可通用于不同的目的基因序列，并且能够保证各重组质粒 polyA 在 10 代以内的传代稳定性（如图 5 和图 6 所示）。

为了进一步观察该转录载体的转录效果，将上述构建的重组载体质粒第 10 代经过大提质粒后进行体外转录，结果显示，各质粒均可以转录出高质量的 mRNA（如图 7-图 11，数据参见表 3）。

表 3.图 7-11 检测结果数据

峰	大小（nt）	从(nt)	到（nt）	相对浓度百分比	浓度（ng/μl）	摩尔浓度（nmole/ml）
图 7						
1	15（LM）	0	79		0.5194	104.5892
2	2583	1290	3001	8.1	16.3378	21.5772
3	3453	3001	4185	91.9	184.9824	167.7085
图 8						
1	15（LM）	0	61		0.2057	36.6907
2	1858	977	1866	6.8	5.2221	10.6669
3	1978	1866	2513	93.2	72.0742	113.3759

图 9						
1	15 (LM)	1	90		0.5140	97.2189
2	1091	505	1097	7.9	8.7014	29.1149
3	1257	1097	1468	92.1	100.7645	252.2252
图 10						
1	15 (LM)	0	72		0.5431	96.8544
2	2013	1864	2026	1.9	1.0126	1.6075
3	2260	2026	2864	98.1	52.0452	71.9007
图 11						
1	15 (LM)	0	69		0.5194	28.2489
2	1428	463	1434	5.4	7.9329	20.9317
3	1564	1434	1826	94.6	138.8152	277.9095

综上，本发明提供了一种通用型高稳定性的质粒载体，该载体具有普遍适用性，可解决 mRNA 领域由 polyA 序列引起的质粒不稳定性问题。

权 利 要 求 书

- 1.一种核酸分子，其特征在于，所述核酸分子包含 1) 可转录的核酸片段和/或用于引入可转录的核酸片段的核酸；2) 包含多聚脱氧腺苷酸 polyA 的核酸片段；3) 包含回旋酶结合位点的核酸片段。
- 2.如权利要求 1 所述的核酸分子，其特征在于，所述可转录的核酸片段
5 编码肽或蛋白。
- 3.如权利要求 1 或 2 所述的核酸分子，其特征在于，所述用于引入可转录的核酸片段的核酸片段包括多克隆位点或同源重组位点。
- 4.如权利要求 1-3 中任一项所述的核酸分子，其特征在于，所述 polyA 包括至少 50 个连续的脱氧腺苷酸。
- 10 5.如权利要求 1-4 中任一项所述的核酸分子，其特征在于，所述包含 polyA 的核酸片段包括至少 2 个长度为至少 20 个连续脱氧腺苷酸序列的元件，所述 2 个元件中间至少间隔一个非 T 脱氧核苷酸。
6. 如权利要求 1-5 中任一项所述的核酸分子，其特征在于，所述包含回旋酶结合位点的核酸片段来源于病毒或细菌；优选的，所述包含回旋酶结合
15 位点的核酸片段来源于病毒；更优选的，所述包含回旋酶结合位点的核酸片段来源于噬菌体。
7. 如权利要求 1-5 中任一项所述的核酸分子，其特征在于，所述包含回旋酶结合位点的核酸片段来源于质粒；优选的，所述包含回旋酶结合位点的核酸片段来源于 ColE1 型质粒。
- 20 8.一种质粒载体，其特征在于，所述质粒载体包含 1) 编码 mRNA 分子的第一核酸片段；2) 包含 polyA 的第二核酸片段；3) 包含回旋酶结合位点的第三核酸片段。
- 9.一种质粒载体的制备方法，其特征在于，将如权利要求 8 所述的质粒载体转化到大肠杆菌感受态细胞，取适量涂布于抗性 LB 培养基平板培养，
25 挑取单克隆菌落、测序，获得测序正确的阳性菌液，后进行大规模培养。

10.一种扩增核酸分子的方法，其特征在于，包括在宿主细胞中繁殖权利要求 1-7 所述的核酸分子和繁殖所述宿主细胞，所述宿主细胞包括细菌或真菌；所述宿主细胞优选为大肠杆菌。

11.一种获得 RNA 的方法，其特征在于，包括根据权利要求 10 方法扩增核酸分子，将核酸分子作为模版在体外转录成 RNA。

12.一种获得肽或蛋白质的方法，其特征在于，包括根据权利要求 11 的方法获得编码肽或蛋白质的 mRNA，将 mRNA 翻译成肽或蛋白质氨基酸片段。

13.一种产生真核生物可翻译 mRNA 的系统，其特征在于，包括 1) 含有权利要求 1-7 所述的核酸分子的质粒载体；2) 宿主细胞。

14.一种编码回旋酶结合位点的核酸片段在构建质粒载体中的应用，其特征在于，所述质粒载体用于体外转录成 RNA。

15.一种组合物，其特征在于，包含根据权利要求 11 或 12 所述方法获得的 RNA、肽或蛋白质。

16.根据权利要求 15 所述的组合物，其特征在于，所述组合物包括药学上可接受的辅料、载体、缓冲剂、保护剂、稳定剂、表面活性剂、渗透压调节剂、佐剂、防腐剂、灭活剂中的一种或多种。

17.如权利要求 1-7 任一所述核酸分子、如权利要求 8 所述质粒载体或如权利要求 15-16 任一所述的组合物在制备用于治疗或预防疾病的药物或疫苗中的用途。

18.根据权利要求 17 所述的用途，其特征在于，所述疾病由以下病毒、细菌或原生动物中的一种或多种引起：新型冠状病毒、登革热病毒、疟原虫、带状疱疹病毒、猫细小病毒、猫杯状病毒、猫疱疹病毒、猫白血病毒、猫冠状病毒、猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒、单纯疱疹 1 型病毒、单纯疱疹 2 型病毒、脑炎病毒、乳头瘤病毒、水痘带状疱疹病毒、爱泼斯坦-巴尔病毒、

人类巨细胞病毒、人类疱疹病毒 8 型、人乳头状瘤病毒、BK 病毒、JC 病毒、
天花、脊髓灰质炎病毒、乙型肝炎病毒、人类博卡病毒、细小病毒 B19、人
类星状病毒、诺沃克病毒、柯萨奇病毒、甲型肝炎病毒、鼻病毒、严重急性
呼吸综合征病毒、丙型肝炎病毒、黄热病病毒、西尼罗病毒、风疹病毒、戊
5 型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒(HIV)、流感病毒 A 型或 B 型、瓜纳里托病
毒、胡宁病毒、拉沙病毒、马丘波病毒、萨比亚病毒、克里米亚-刚果出血热
病毒、埃博拉病毒、马尔堡病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、副流感病毒、呼
吸道合胞病毒、人类偏肺病毒、亨德拉病毒、尼帕病毒、狂犬病病毒、丁型
肝炎、轮状病毒、环状病毒、大肠杆菌病毒、人类肠道病毒、日本脑炎病毒、
10 水泡状疱疹病毒、东部马脑炎病毒、汉坦病毒、中东呼吸道冠状病毒、基孔
肯雅病毒或版纳病毒。