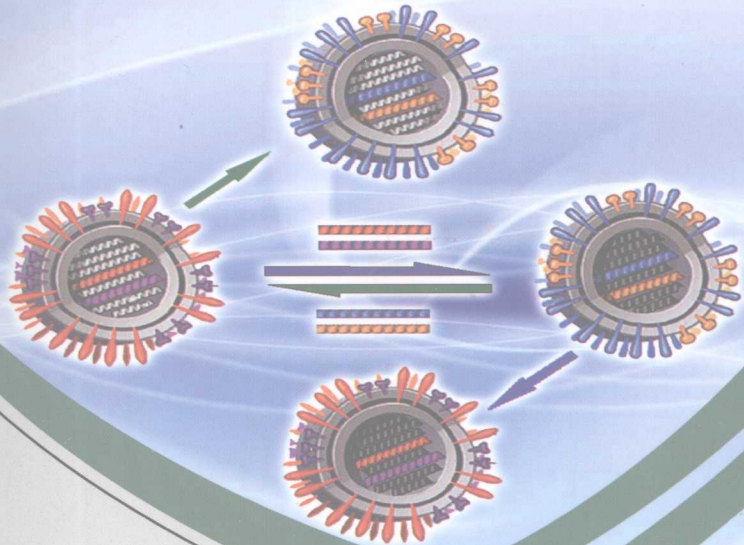


生命科学专论

反向遗传学

动物病毒

刘光清等编著



科学出版社
www.sciencep.com

生命科学专论

动物病毒反向遗传学

刘光清等 编著

浙江省农业科学院人才奔腾计划项目资助出版

科学出版社

北京

内 容 简 介

反向遗传学技术是 20 世纪末发展起来的一门新兴学科,已广泛应用于生命科学研究的各个领域,极大地推动了许多相关学科快速发展,病毒学的发展更是得益于此。

本书系统介绍了动物病毒反向遗传学的原理、发展历程、研究方法以及在病毒学研究领域中的应用等;并详细介绍了各科动物病毒反向遗传操作系统构建的一般原理或策略,并结合具体实例进行了详细阐述。此外,本书还反映了近年来动物病毒反向遗传学的最新研究进展,为读者了解相关病毒的最新研究动态提供了有益资料。

本书适用于从事病毒学基础研究的科研人员,也适于从事抗病毒药物与新型疫苗研发的技术人员,以及高等院校从事病毒学及相关专业教学和科研的广大师生。

图书在版编目(CIP)数据

动物病毒反向遗传学/刘光清等编著. —北京:科学出版社,2009
(生命科学专论)

ISBN 978-7-03-022695-2

I. 动… II. 刘… III. 兽医学:病毒学:遗传学 IV. S852.65 Q953

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 119105 号

责任编辑:李秀伟 李晶晶/责任校对:张 琪
责任印制:钱玉芬/封面设计:王 浩

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

源海印刷有限责任公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

2009 年 2 月第 一 版 开本:787×1092 1/16
2009 年 2 月第一次印刷 印张:23 1/4 插页:1
印数:1—1 500 字数:526 000

定价:75.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换<路通>)

序 一

反向遗传学是一门新兴学科，已广泛应用于生命科学的各个领域，尤其是在病毒学研究方面。许多用传统病毒学研究方法不能解决的科学问题都因反向遗传学技术的出现迎刃而解，这使得病毒学的许多研究都取得了突破性进展。因此，该技术已成为现代病毒学研究不可或缺的一种重要研究工具。目前，许多实验室都已开展或准备开展病毒学的反向遗传学研究。在此背景下，许多实验室和科学工作者迫切需要一本能系统介绍反向遗传学的原理、技术方法以及实际应用的专业书籍进行学习或参考，遗憾的是，国内外尚无这样的专著出现。

刘光清博士主编的《动物病毒反向遗传学》不仅对反向遗传学的基本原理、反向遗传学系统构建原则和方法等进行了系统而详细的介绍，而且结合一些具体实例阐述了反向遗传学在动物病毒学研究中的应用进展。该书对于正在从事或将要从事病毒反向遗传学研究的广大科研工作者具有重要的学习和参考价值，对于推动我国动物病毒学研究事业的发展也必将具有重要意义。

中国农业科学院兰州兽医研究所研究员



2009年1月1日

序 二

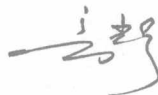
动物传染病中许多烈性传染病都是由病毒引起的，如口蹄疫、高致病性禽流感、新城疫、猪瘟等。这些动物传染病没有有效的药物可以治疗，因此，免疫接种是预防病毒性传染病最有效的手段。但是，对有些病毒，我们至今仍束手无策。

一直以来，人类对病毒的认识都是由表及里，由现象到本质。病毒外层的蛋白质对其在感染细胞和感染后与宿主免疫系统相互作用过程中起重要作用，病毒粒子的中心是核酸（RNA 或 DNA），核酸编码病毒的结构蛋白及病毒复制需要的部分酶。病毒是目前所知道的最小可繁殖生命体，经过几百或几千年的进化，病毒的基因组已十分精致，一个核苷酸的改变有可能使病毒的生物学特性发生显著的改变。病毒虽然很小，但我们对它的了解仍然很肤浅。

病毒在复制过程中会发生变异，这是病毒在进化过程中的一种适应性变化，这种变化可能使其致病力增强，也可能使其致病力减弱。我们通过序列分析可以发现强毒和弱毒在核苷酸或氨基酸水平的差异，但不知道哪个或哪些核苷酸或氨基酸的改变会导致病毒的生物学特性发生变化。传统的弱毒疫苗研制方法是将强毒在体外细胞上传代直到毒力减弱到不致病且遗传稳定的情况下才可以使用，但传代的时间可能很长，也可能在中途传丢了不得不从头再传。如果我们知道某种病毒的与致病相关的基因或片段，在体外进行遗传操作将致病基因删除或突变，这样有可能在很短的时间内获得致弱的病毒。如果能够获得病毒的具有感染性的 DNA 分子克隆，以上这些问题就可以解决。这种由本质（核酸）到表象的研究方法现称为反向遗传操作。利用反向遗传操作可以更容易了解病毒基因或序列的功能，可以更容易在较短的时间内按照我们的意愿构建基因工程标记疫苗（包括基因缺失疫苗、基因工程活载体疫苗、基因工程致弱活疫苗等）。

《动物病毒反向遗传学》全面阐述了动物病毒反向遗传操作系统的基本原理和方法，并且从不同的 RNA 病毒到 DNA 病毒，根据各病毒分子结构的基本特性，分别详细叙述了构建不同病毒感染性分子克隆的基本原理和方法。该书的作者大部分都有从事动物病毒反向遗传操作研究的经历，而且参考了国内外近年来在动物病毒反向遗传操作技术及其应用方面的最新研究进展，因此，该书对广大从事动物病毒研究和教学的人员具有重要的参考价值。

中国农业科学院上海兽医研究所研究员



2009年1月1日

前 言

反向遗传学技术已广泛应用于病毒学研究的各个领域，极大地推动了病毒学基础与应用研究的快速发展。可以说，利用反向遗传学技术开展病毒学研究已成为当前生命科学领域的一大热点和亮点。目前，国内外许多实验室都已经开展或即将开展这方面的研究。在此背景下，广大科研人员及在校师生迫切需要一本能系统和全面介绍病毒反向遗传学原理、方法和应用的参考书。遗憾的是，国内外尚无此方面的专著出现，一些关于反向遗传学的理论、技术或方法仅散见于一些科研论文或书籍中，很不系统，也很零碎，不便于学习和掌握。鉴于此，我们组织了一批工作在科研第一线、并有从事反向遗传学研究经历的青年科研工作者编著了本书。

本书共 20 章，分总论（第一章至第四章）和各论（第五章至第二十章）两部分。其中，总论部分系统介绍了反向遗传学的原理、发展历程、研究方法以及在病毒学研究领域中的应用等；各论部分则详细介绍了各科动物病毒反向遗传操作系统构建的一般原理或策略，并以具体实例予以详细阐述。此外，本书还介绍了近年来反向遗传学技术在动物病毒学研究中的新进展，为读者了解相关病毒的最新研究动态提供了有益的资料。

如前所述，目前国内外尚无关于动物病毒反向遗传学的专著。因此，本书将是第一部系统介绍动物病毒反向遗传学的专著，其创新性不言而喻。概括来说，本书有以下特点：①系统性：本书不仅对动物病毒反向遗传学的一般原理、方法以及构建原则等进行了系统阐述，而且对各病毒科的反向遗传学操作进行了举例和说明，很容易被读者学习和掌握。②实用性：本书大部分作者都具有从事动物病毒反向遗传学研究的经历，具有丰富的实践经验和扎实的理论基础，在撰写本书时，常有些心得体会贯穿其间，对于读者有一定启发作用和参考价值。③新颖性：本书首次系统介绍了动物病毒反向遗传学的理论和应用情况，对于广大读者来说具有较强的可读性。此外，本书所引用的参考文献多来自近年来国内外著名学术期刊中的研究论文，体现了反向遗传学技术在动物病毒学研究中的新进展，有较强的参考价值。

在本书编写过程中，我们得到了浙江省农业科学院陈剑平院长等领导 and 同事们的大力支持与帮助，并获得浙江省农业科学院人才奔腾计划项目的资助，在此谨表谢意。此外，我还要感谢恩师谢庆阁研究员和童光志研究员的指导和鼓励，他们不仅在百忙之中审阅了本书，而且还欣然为之作序！

由于水平有限，本书距离我心中的理想专著尚有一定差距，谬误之处也一定很多，敬请广大读者和专家提出批评与指正！

刘光清

2008 年春于杭州

目 录

| | |
|----|--|
| 序一 | |
| 序二 | |
| 前言 | |

总 论

| | |
|------------------------|----|
| 第一章 反向遗传学概述 | 3 |
| 第一节 反向遗传学产生的背景 | 3 |
| 第二节 反向遗传学的概念 | 6 |
| 第三节 反向遗传学的原理 | 6 |
| 第四节 反向遗传学研究的方法 | 7 |
| 结语 | 8 |
| 参考文献 | 9 |
| 第二章 动物病毒反向遗传学发展历程 | 10 |
| 第一节 正链 RNA 病毒反向遗传学发展历程 | 10 |
| 第二节 负链 RNA 病毒反向遗传学发展历程 | 13 |
| 第三节 双股 RNA 病毒反向遗传学发展历程 | 16 |
| 第四节 反转录病毒反向遗传学的发展历程 | 17 |
| 第五节 DNA 病毒反向遗传学发展历程 | 18 |
| 结语 | 20 |
| 参考文献 | 20 |
| 第三章 反向遗传学系统构建的原理与方法 | 23 |
| 第一节 反向遗传学研究系统建立的基础 | 23 |
| 第二节 反向遗传学研究系统建立的前提 | 35 |
| 第三节 反向遗传学研究系统构建的策略 | 41 |
| 第四节 RNA 病毒的拯救 | 48 |
| 第五节 拯救病毒的鉴定 | 52 |
| 结语 | 56 |
| 参考文献 | 56 |
| 第四章 反向遗传学在动物病毒研究中的应用 | 58 |
| 第一节 在病毒基因组结构与功能研究中的应用 | 58 |
| 第二节 在病毒分子致病机理研究中的应用 | 60 |
| 第三节 在病毒与宿主相互作用研究中的应用 | 61 |
| 第四节 在新型疫苗研究中的应用 | 63 |
| 第五节 在研发新型病毒载体中的应用 | 65 |

| | |
|------------|----|
| 结语 | 69 |
| 参考文献 | 69 |

各 论

| | |
|----------------------------------|-----|
| 第五章 小 RNA 病毒科的反向遗传学 | 75 |
| 第一节 小 RNA 病毒科的基本特征 | 75 |
| 第二节 小 RNA 病毒基因组结构特征及表达产物 | 76 |
| 第三节 小 RNA 病毒的繁殖与复制 | 79 |
| 第四节 小 RNA 病毒反向遗传学研究系统的建立 | 81 |
| 第五节 反向遗传学在小 RNA 病毒研究中的应用 | 86 |
| 结语 | 92 |
| 参考文献 | 92 |
| 第六章 黄病毒科的反向遗传学 | 95 |
| 第一节 黄病毒的基本特征 | 95 |
| 第二节 黄病毒基因组结构及表达产物 | 96 |
| 第三节 黄病毒的繁殖与复制 | 100 |
| 第四节 黄病毒反向遗传学研究系统的建立 | 100 |
| 第五节 反向遗传学在黄病毒研究中的应用 | 104 |
| 结语 | 107 |
| 参考文献 | 108 |
| 第七章 动脉炎病毒科的反向遗传学 | 110 |
| 第一节 动脉炎病毒的基本特征 | 110 |
| 第二节 动脉炎病毒基因组结构特征及表达产物 | 111 |
| 第三节 动脉炎病毒的繁殖与复制 | 114 |
| 第四节 动脉炎病毒反向遗传学研究系统的建立 | 115 |
| 第五节 反向遗传学在动脉炎病毒研究中的应用 | 120 |
| 结语 | 124 |
| 参考文献 | 125 |
| 第八章 杯状病毒科的反向遗传学 | 128 |
| 第一节 杯状病毒的基本特征 | 128 |
| 第二节 杯状病毒基因组结构及表达产物 | 129 |
| 第三节 杯状病毒的繁殖与复制 | 132 |
| 第四节 杯状病毒反向遗传学研究系统的建立 | 133 |
| 第五节 反向遗传学在杯状病毒研究中的应用 | 138 |
| 结语 | 140 |
| 参考文献 | 140 |
| 第九章 披膜病毒科的反向遗传学 | 143 |
| 第一节 披膜病毒的基本特征 | 143 |
| 第二节 甲病毒基因组结构特征及表达产物 | 144 |

| | |
|-------------------------|-----|
| 第三节 披膜病毒的繁殖与复制 | 146 |
| 第四节 甲病毒反向遗传学研究系统的建立 | 148 |
| 第五节 反向遗传学在甲病毒研究中的应用 | 150 |
| 结语 | 156 |
| 参考文献 | 157 |
| 第十章 冠状病毒科的反向遗传学 | 160 |
| 第一节 冠状病毒的基本特征 | 160 |
| 第二节 冠状病毒基因组的结构及其表达产物 | 161 |
| 第三节 冠状病毒的繁殖与复制 | 164 |
| 第四节 冠状病毒反向遗传学研究系统的建立 | 166 |
| 第五节 反向遗传学在冠状病毒研究中的应用 | 170 |
| 结语 | 176 |
| 参考文献 | 176 |
| 第十一章 副黏病毒科的反向遗传学 | 179 |
| 第一节 副黏病毒的基本特征 | 179 |
| 第二节 副黏病毒基因组的结构及其表达产物 | 180 |
| 第三节 副黏病毒的繁殖与复制 | 182 |
| 第四节 副黏病毒反向遗传学研究系统的建立 | 184 |
| 第五节 反向遗传学在副黏病毒研究中的应用 | 187 |
| 结语 | 193 |
| 参考文献 | 193 |
| 第十二章 正黏病毒科的反向遗传学 | 196 |
| 第一节 正黏病毒的基本特征 | 196 |
| 第二节 正黏病毒的基因组结构及表达产物 | 197 |
| 第三节 正黏病毒的繁殖与复制 | 199 |
| 第四节 正黏病毒反向遗传学研究系统的建立 | 200 |
| 第五节 反向遗传学在正黏病毒研究中的应用 | 203 |
| 结语 | 214 |
| 参考文献 | 214 |
| 第十三章 弹状病毒科的反向遗传学 | 219 |
| 第一节 弹状病毒的基本特征 | 219 |
| 第二节 弹状病毒基因组结构及其表达产物 | 220 |
| 第三节 弹状病毒的繁殖与复制 | 221 |
| 第四节 弹状病毒反向遗传学研究系统的建立 | 224 |
| 第五节 反向遗传学在弹状病毒研究中的应用 | 227 |
| 结语 | 230 |
| 参考文献 | 231 |
| 第十四章 丝状病毒科的反向遗传学 | 234 |
| 第一节 丝状病毒的基本特征 | 234 |

| | | | |
|-----------------------------|------|----------------------|-----|
| 081 | 第二节 | 丝状病毒的基因组结构及其表达产物 | 235 |
| 091 | 第三节 | 丝状病毒的增殖过程 | 237 |
| 098 | 第四节 | 丝状病毒反向遗传学研究系统的建立 | 239 |
| 091 | 第五节 | 反向遗传学在丝状病毒研究中的应用 | 243 |
| 101 | 结语 | | 244 |
| 091 | 参考文献 | | 244 |
| 第十五章 双 RNA 病毒科的反向遗传学 | | | 247 |
| 101 | 第一节 | 双 RNA 病毒的基本特征 | 247 |
| 101 | 第二节 | 双 RNA 病毒基因组结构及其表达产物 | 248 |
| 101 | 第三节 | 双 RNA 病毒的繁殖与复制 | 250 |
| 091 | 第四节 | 双 RNA 病毒反向遗传学研究系统的建立 | 251 |
| 101 | 第五节 | 反向遗传学在双 RNA 病毒研究中的应用 | 253 |
| 101 | 结语 | | 258 |
| 091 | 参考文献 | | 258 |
| 第十六章 呼肠孤病毒科的反向遗传学 | | | 261 |
| 081 | 第一节 | 呼肠孤病毒的基本特征 | 261 |
| 081 | 第二节 | 呼肠孤病毒基因组结构及其表达产物 | 262 |
| 101 | 第三节 | 呼肠孤病毒科的复制与繁殖 | 265 |
| 081 | 第四节 | 呼肠孤病毒反向遗传学研究系统的建立 | 267 |
| 091 | 第五节 | 反向遗传学在呼肠孤病毒研究中的应用 | 271 |
| 091 | 结语 | | 272 |
| 091 | 参考文献 | | 272 |
| 第十七章 反转录病毒科的反向遗传学 | | | 276 |
| 091 | 第一节 | 反转录病毒的基本特征 | 276 |
| 091 | 第二节 | 反转录病毒基因组结构及其表达产物 | 277 |
| 008 | 第三节 | 反转录病毒的繁殖与复制 | 283 |
| 103 | 第四节 | 反转录病毒反向遗传学研究系统的建立 | 286 |
| 113 | 第五节 | 反向遗传学在反转录病毒研究中的应用 | 289 |
| 101 | 结语 | | 294 |
| 101 | 参考文献 | | 294 |
| 第十八章 圆环病毒科的反向遗传学 | | | 296 |
| 102 | 第一节 | 圆环病毒的基本特征 | 296 |
| 102 | 第二节 | 圆环病毒基因组的结构特征及其表达产物 | 297 |
| 103 | 第三节 | 圆环病毒科的繁殖与复制 | 300 |
| 103 | 第四节 | 圆环病毒反向遗传学研究系统的建立 | 302 |
| 103 | 第五节 | 反向遗传学在圆环病毒研究中的应用 | 305 |
| 103 | 结语 | | 307 |
| 103 | 参考文献 | | 307 |

| | |
|----------------------|-----|
| 第十九章 腺病毒科的反向遗传学 | 310 |
| 第一节 腺病毒的基本特征 | 310 |
| 第二节 腺病毒基因组结构及其表达产物 | 311 |
| 第三节 腺病毒的繁殖与复制 | 315 |
| 第四节 腺病毒反向遗传学研究系统的建立 | 317 |
| 第五节 反向遗传学在腺病毒研究中的应用 | 328 |
| 结语 | 335 |
| 参考文献 | 335 |
| 第二十章 疱疹病毒科的反向遗传学 | 340 |
| 第一节 疱疹病毒的基本特征 | 340 |
| 第二节 病毒基因组的结构及其表达产物 | 341 |
| 第三节 疱疹病毒的繁殖与复制 | 344 |
| 第四节 疱疹病毒反向遗传学研究系统的建立 | 348 |
| 第五节 反向遗传学在疱疹病毒研究中的应用 | 353 |
| 结语 | 354 |
| 参考文献 | 355 |

图版

总 论

第一章 反向遗传学概述

第一节 反向遗传学产生的背景

反向遗传学 (reverse genetics) 是相对于经典遗传学而言的一门方法学, 在认识反向遗传学之前, 首先要了解遗传学产生与发展的过程。所谓“遗传”, 是指生物通过各种方式保证生命在自然界中延续, 并使子代与亲代保持某些相似特征的现象。人们很早就开始了探讨亲代和杂交子代的性状之间遗传规律的研究, 但一直未取得突破性进展。直到 1866 年奥地利学者孟德尔 (Mendel) 根据他的豌豆杂交实验结果发表了《植物杂交试验》的论文, 提出了两个影响深远的基本遗传法则, 即分离法则 (定律) 和自由组合法则 (定律), 这两条法则后来被称为孟德尔定律, 奠定了现代遗传学的基础^[1] (图 1-1, 图 1-2)。1909 年英国遗传学家 Bateon 提出了“遗传学” (genetics) 这一学科名称, 并为其进行了定义, 认为遗传学是研究生物的遗传和变异, 即研究亲子间的异同的生物学分支学科。其研究范围包括: 遗传物质的本质、遗传物质的传递和遗传信息的实现三个方面。从此, 遗传学正式成为一门学科。一百多年来, 遗传学家们都是在围绕这三类问题进行研究。

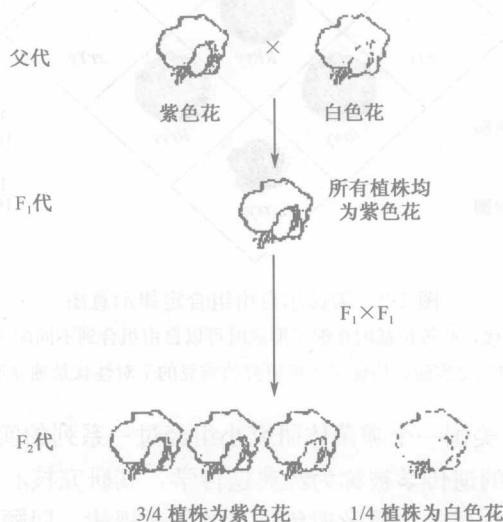


图 1-1 孟德尔分离定律示意图

孟德尔的分离定律可表述为一对等位基因在杂合状态 (Aa) 下, 互不干预, 保持其独立性, 在形成配子时各自 (A 或 a) 分配到不同配子中去。在一般情况下, F_1 代配子分离比为 $1:1$, F_2 代基因型分离比为 $1:2:1$, 子二代表现型分离比是 $3:1$

1909 年, 在 Morgan 的领导下, 一批科学家以果蝇作为遗传研究的材料, 经过广泛和深入的研究, 提出了第三条经典遗传规律, 即连锁和交换规律。但此时的基因被认为只是一个交换、重组和突变时无法再分的单位, 其物理和化学性质、结构等仍然是个

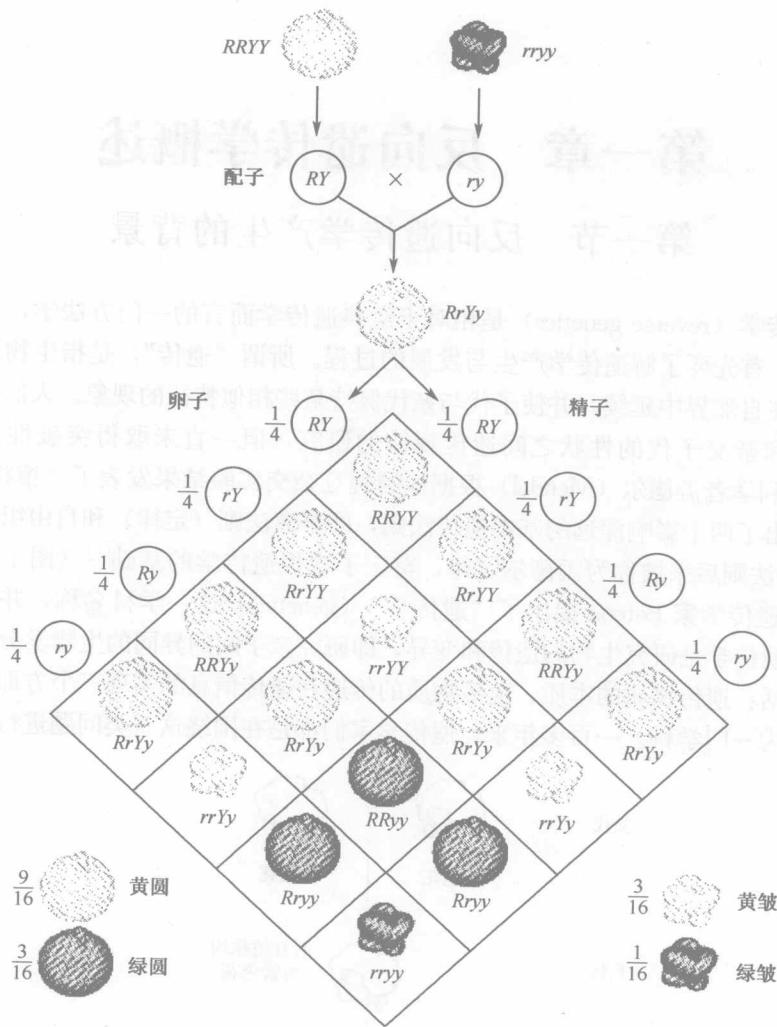


图 1-2 孟德尔自由组合定律示意图

测交证明，在杂种 F_1 代，非等位基因在配子形成时可以自由组合到不同配子中去；孟德尔设计了双交和三交实验，均证实了所研究的豌豆的 7 对性状是独立遗传的

谜^[2]。1930~1952 年，美国一个噬菌体研究小组经过一系列的实验，最终确定 DNA 是遗传物质^[3]。这一阶段的遗传学被称为经典遗传学，其研究核心是通过研究生物的性状或表型，进而研究遗传物质的本质及遗传信息的传递规律。回顾一下经典遗传学的发展历程，不难发现，早期的遗传学家都是通过观察和研究生物表型和性状的变化来探索生物遗传的规律、解释遗传的本质的，所使用的一些研究方法主要是研究系谱和杂交育种，上述一些遗传规律或法则就是运用这些研究方法得到的。

1953 年 Watson 和 Crick 提出了 DNA 的双螺旋结构模型 (图 1-3)，继而后于 1958 年 Crick 又提出了“中心法则”。这些理论不仅让人们了解到遗传信息的分子结构，也说明了遗传信息的传递途径，从而开创了遗传学的新纪元，标志着遗传学进入了一个新阶段，即分子遗传学阶段。分子遗传学是建立在微生物学和经典遗传学的基础之上，借助

生物大分子的研究来阐明生物的遗传和变异规律的遗传学分支学科。经典遗传学与分子遗传学都是遵循“性状→基因”的研究路线，从分析生物个体的表型入手，研究决定这些表型性状的基因及其调控序列。可以说，分子遗传学是遗传学发展的高级阶段，经典遗传学的许多原理已经或正在被分子水平的实验所验证，有的得到进一步发展，有的被修正或摒弃，许多经典遗传学无法解决的问题或无法破译的奥秘也在不断被解决。分子遗传学的诞生不仅发展了经典遗传学，也为反向遗传学的产生奠定了理论基础。



图 1-3 Watson 和 Crick 提出 DNA 的双螺旋结构模型

随着分子遗传学的发展，许多以基因为操作对象的实验方法或技术也在不断建立与发展。例如，1967 年吴瑞博士建立了第一种 DNA 测序方法，即引物-延伸测序策略；1970 年，Smith 等^[4]发现了限制性内切核酸酶在分子遗传中的作用，为基因工程奠定了基础；1972 年，以 Berg 为代表的一批美国科学家发明了人工重组 DNA 技术，并得到了第一个重组 DNA 分子；1974 年，人们首次实现异源真核生物基因在大肠杆菌中的表达；1975 年，美国的 Temin 和 Baltimore 在 RNA 肿瘤病毒中发现了反转录酶，它可以以 RNA 为模板，反转录生成 DNA 等^[5]。如此一系列基因工程技术的建立与发展不仅方便了人们在分子水平上对生物遗传规律的研究，也为开展反向遗传学研究提供了技术支撑。

如前文所述，经典遗传学是遵循“性状→基因”的研究路线，探讨遗传物质的本质及遗传信息的传递规律的。但事实证明，要进一步探索生命世界的奥秘，从根本上揭示生命的遗传规律，仅走这一条研究路线是不够的。随着越来越多生物体基因的发现及其序列的测定，人们发现可以直接从基因入手开展遗传学研究，即采用“基因→性状”的研究路线。由于这种研究生物遗传学的思路是与经典遗传学研究中所使用的思路逆向而行的，因而称之为反向遗传学。目前反向遗传学已经广泛应用于生命科学研究中的各个领域，如反向疫苗学、转基因动（植）物、寄生虫学以及微生物学等。当今比较流行的 RNA 干扰（RNA interference, RNAi）、基因敲除（gene knockout）、反义 RNA（an-

tisense RNA)、基因过表达 (gene overexpression)、定点诱变 (site-directed mutagenesis) 或体外诱变 (*in vitro* mutagenesis) 等都是属于反向遗传学范畴。

第二节 反向遗传学的概念

广义的反向遗传学泛指从生物基因组及其所含生物信息出发, 采用“基因→性状”的研究路线, 对生物体进行遗传和变异规律的研究, 揭示生物的表现型与基因型之间的关系, 探讨生命遗传规律的分子遗传学分支学科。从方法学角度而言, 反向遗传学是在获得生物基因信息的基础上, 对基因进行修饰, 如基因定点突变、基因插入/缺失和基因置换等, 来研究生物基因结构和功能的策略。其所涉及的技术包括: 基因的定点突变、基因插入/缺失和基因置换等。目前, 反向遗传学已成为最能有效推动植物学、动物学及微生物学研究的前沿学科之一。

狭义的反向遗传学仅指对微生物 (包括细菌和病毒) 的反向遗传操作和研究, 尤其是病毒的反向遗传操作。这是由于病毒的基因组一般比较小, 更利于反向遗传操作。目前已有许多病毒的反向遗传学研究系统被建立起来, 成功实现了病毒的体外拯救。在此基础上, 人们可以很方便地从基因组入手研究病毒的分子特征、致病机理、病毒与宿主之间的相互作用以及开展新型疫苗的研究等工作, 从而开创了分子病毒学研究领域的新局面。

第三节 反向遗传学的原理

由于几乎所有的基因工程技术都是以 DNA 为操作对象, 因此 DNA 病毒的反向遗传操作比较容易, 许多 DNA 病毒的基因组结构与功能、基因的复制与表达机制、分子致病机理等不断被揭示, 其研究领域也因此得到不断扩展和纵深。相比之下, RNA 病毒的分子生物学研究显得较为滞后。因为非反转录 RNA 病毒的复制周期并不经历 DNA 阶段, 其基因组分别以各自特有的 RNA 形式存在于自然界中, RNA 的分子结构特征决定了它的不稳定性和易降解性, 一旦它脱离核衣壳的保护, 病毒 RNA 就难以存在。因此, 在体外操作 RNA 病毒基因组比较困难。而反向遗传操作技术的发明改变了这种状况, 通过将病毒 RNA 转换为 cDNA, 使得在 DNA 分子水平上研究 RNA 病毒成为可能, RNA 病毒研究也因此取得了巨大进展。

RNA 病毒反向遗传学研究的核心是构建感染性 cDNA 分子克隆, 即在获得病毒基因组序列的基础上, 借助于载体构建病毒的全长 cDNA 分子克隆, 同时将 RNA 聚合酶的启动子元件也导入该分子克隆中, 通过体外转录过程, 合成病毒 RNA, 然后用该转录物侵染宿主或敏感细胞系, 拯救出与母本毒具有相似特性的活病毒。这种病毒拯救过程是针对正链 RNA 病毒而言。由于负链 RNA 病毒裸露的基因组或由其 cDNA 转录而来的 RNA 没有感染性, 它们必须与核衣壳蛋白、RNA 依赖性 RNA 聚合酶等形成核糖核蛋白复合物 (RNP), 才能进行正常的复制和病毒粒子的包装。因此, 建立负链 RNA 病毒的反向遗传学研究系统, 不仅要构建含有病毒全基因组的 cDNA 分子克隆, 而且要构建一些其中含有 RNA 复制酶及核蛋白的编码序列的辅助质粒, 然后将这些重