

生命科学专论

刘光清 主编

动物病毒 反向遗传学

(第二版)



科学出版社

生命科学专论

动物病毒反向遗传学

(第二版)

刘光清 主编

上海市闵行区高层次人才队伍建设专项资金资助

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书不仅系统介绍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;而且详细介绍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详细阐述。与第一版相比,本书不仅更新了各科动物病毒反向遗传学研究领域的部分内容,而且新增加了动物病毒的反向遗传学研究进展,使得本书能反映当前动物病毒反向遗传学研究领域的新发展,也使得该书更具有参考价值。

本书既注重对理论的阐述又注重与科研实践的结合,因此,既适于从事病毒学基础研究的科研人员,又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和相关专业教学与科研的广大师生参考阅读。

图书在版编目(CIP)数据

动物病毒反向遗传学/刘光清主编.—2版.—北京:科学出版社,2014.10
ISBN 978-7-03-042071-8

I. ①动… II. ①刘… III. ①动物病毒-遗传学 IV. ①S852.65

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 227337 号

责任编辑:李秀伟 李 悦 景艳霞/责任校对:赵桂芬

责任印制:赵德静/封面设计:陈 敬

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>

北京通州皇家印刷厂印刷

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

2014年10月第 二 版 印张:37 1/4 插页 4

2014年10月第二次印刷 字数:883 000

定价:198.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《动物病毒反向遗传学》(第二版) 编著者名单

主 编: 刘光清

副主编: 王桂军 郑海学 蔡雪辉

编写人员名单 (以姓氏汉语拼音排序):

蔡雪辉	博士	研究员	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所
陈 柳	博士	副研究员	浙江省农业科学院畜牧兽医研究所
陈鸿军	博士	副研究员	中国农业科学院上海兽医研究所
陈宗艳	博士	副研究员	中国农业科学院上海兽医研究所
独军政	博士	副研究员	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
窦永喜	博士	副研究员	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
高玉龙	博士	副研究员	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所
郭建宏	博士	副研究员	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
景志忠	博士	研究员	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
李传峰	博士	副研究员	中国农业科学院上海兽医研究所
刘长明	博士	研究员	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所
刘光清	博士	研究员	中国农业科学院上海兽医研究所
刘芹芳	博士后		美国马里兰大学
孟春春	博士	副研究员	中国农业科学院上海兽医研究所
祈小乐	博士	副研究员	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所
王玢瑛	博士		中国农业科学院上海兽医研究所
王桂军	博士	教授	安徽农业大学
王晓钧	博士	研究员	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所
韦祖璋	博士	副教授	广西大学
翁长江	博士	研究员	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所
云 涛	博士	副研究员	浙江省农业科学院畜牧兽医研究所
郑 浩	博士	副研究员	中国农业科学院上海兽医研究所
郑海学	博士	副研究员	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

第二版前言

六年前，我们编写了我国第一部《动物病毒反向遗传学》专著，得到了国内同行的鼓励和广大读者的热心支持，同时也提出了一些宝贵意见。“21 世纪是生命科学的世纪”，分子病毒学、分子免疫学、分子遗传学及相关学科的发展十分迅猛。在此过程中，作为研究病毒分子生物学的重要利器，反向遗传学技术发挥了重要作用。相应地，病毒的反向遗传学技术也日趋完善，不仅理论和技术发展日新月异，与其他学科的交叉和融合也越来越深入，应用也更为广泛。

为适应此学科的发展和读者的需要，我们在《动物病毒反向遗传学》第一版的基础上，删繁就简、弃故纳新，进一步丰富和完善了动物病毒反向遗传学的理论、增加了一些新的研究进展。同时，我们也根据读者的工作需求，增添了各病毒科代表病毒的反向遗传学内容，使之更具参考性和指导性；另外还注重增加了动物 DNA 病毒反向遗传学的新理论和新技术，如增加了 DNA 病毒感染性克隆的构建策略、痘病毒科的反向遗传操作等内容，尽量能满足不同层次、不同领域科研人员的工作需求。

《动物病毒反向遗传学》第二版涉及的病毒种类及研究内容比较多，因此，我们组织了一批在各个领域比较有经验的专家进行本书的撰写工作。他们所承担的编写任务分别如下：蔡雪辉研究员、韦祖璋博士和刘光清研究员编写第七章；蔡雪辉研究员和刘光清研究员编写第十章；陈鸿军博士与刘芹芳博士编写第十一章；陈柳博士和郭建宏博士编写第二十章；独军政博士和陈宗艳博士编写第十六章；窦永喜博士和孟春春博士编写第十二章；王晓钧研究员和高玉龙博士编写第十七章；景志忠研究员编写第二十一章；刘长明研究员编写第十八章；郑浩博士和李传峰博士编写第六章；祁小乐博士编写第十五章；王桂军教授编写第十九章；刘光清研究员和王玢瑛博士编写第八章；韦祖璋博士编写第七章；翁长江研究员和郑海学博士编写第五章；刘光清研究员和云涛博士编写第九章；郑海学博士和刘光清研究员编写第一章~第四章；刘光清研究员编写第十三、第十四章。在此，我们对上述专家致以衷心感谢！

在第二版书稿付梓之际，我们首先对参与本书第一版编写的全体专家致以崇高的敬意！正是在他们的基础上，第二版才能得以顺利完成。同时，我还要感谢我的研究生：缪秋红、梁瑞英、金红岩、朱杰等同学的帮助，他们在承担繁重科研任务的同时，为本书的文字、图表和参考文献等进行了认真的校对和修改，使本书的质量得到了保证。另外还要感谢中国农业科学院上海兽医研究所各级领导和同事们对我工作的理解和支持，为本书的编写提供了良好的工作环境。在此，我们表示衷心感谢！

在编写本书过程中，我们深感知识储备和能力的不足，也深知日新月异发展的病毒学知识的浩瀚，挂一漏万，本书一定会存在一些缺点或不足，我们真诚希望广大读者和专家提出宝贵的修改意见！

刘光清

2014 年夏于上海

第一版前言

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。

本书共二十章，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，有较高的参考价值。

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和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

第二版前言

第一版前言

第一章 反向遗传学概述.....	1
第一节 反向遗传学产生的背景.....	1
第二节 反向遗传学的概念.....	3
第三节 反向遗传学的原理.....	4
第四节 反向遗传学研究的方法.....	5
结语.....	7
参考文献.....	7
第二章 动物病毒反向遗传学发展历程.....	9
第一节 正链 RNA 病毒反向遗传学发展历程	9
第二节 负链 RNA 病毒反向遗传学发展历程	12
第三节 双股 RNA 病毒反向遗传学发展历程	15
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	21
参考文献	21
第三章 反向遗传学系统构建的原理与方法	25
第一节 反向遗传学研究系统建立的基础	25
第二节 反向遗传学研究系统建立的前提	37
第三节 反向遗传学系统构建的策略	43
第四节 RNA 病毒的拯救过程.....	61
第五节 拯救病毒的鉴定	65
第六节 影响病毒拯救的可能因素	69
第七节 DNA 病毒反向遗传学系统的构建策略.....	74
结语	77
参考文献	78
第四章 反向遗传学在动物病毒研究中的应用	82
第一节 在病毒基因组结构与功能研究中的应用	82
第二节 在病毒基因组复制与表达机制研究中的应用	84
第三节 在病毒分子致病机理研究中的应用	85
第四节 在病毒与宿主相互作用研究中的应用	87
第五节 在新型疫苗和抗病毒药物研究中的应用	89

第六节 在研发新型病毒载体中的应用	93
结语	98
参考文献	98
第五章 小 RNA 病毒科的反向遗传学	104
第一节 小 RNA 病毒科的基本特征	104
第二节 小 RNA 病毒基因组结构特征及表达产物	105
第三节 小 RNA 病毒科的繁殖与复制	113
第四节 猪脑心肌炎病毒反向遗传学系统的建立	117
第五节 口蹄疫病毒反向遗传学系统的建立	121
第六节 反向遗传学在小 RNA 病毒科研究中的应用	127
结语	136
参考文献	136
第六章 黄病毒科的反向遗传学	150
第一节 黄病毒科的基本特征	150
第二节 黄病毒基因组结构及其表达产物	151
第三节 黄病毒科的繁殖与复制	156
第四节 乙型脑炎病毒反向遗传学系统的建立	158
第五节 猪瘟病毒反向遗传学系统的建立	164
第六节 牛病毒性腹泻病毒反向遗传学系统的建立	168
第七节 反向遗传学在黄病毒科研究中的应用	171
结语	182
参考文献	182
第七章 动脉炎病毒科反向遗传学	186
第一节 动脉炎病毒科的基本特征	186
第二节 动脉炎病毒基因组结构及其表达产物	186
第三节 动脉炎病毒的繁殖	192
第四节 猪繁殖和呼吸综合征病毒反向遗传学系统的建立	194
第五节 马动脉炎病毒反向遗传学系统的构建	198
第六节 反向遗传学在动脉炎病毒科研究中的应用	200
参考文献	206
第八章 杯状病毒科的反向遗传学	211
第一节 杯状病毒科的基本特征	211
第二节 杯状病毒基因组结构及表达产物	212
第三节 杯状病毒科的繁殖与复制	216
第四节 兔出血症病毒反向遗传学系统的建立	218
第五节 猫杯状病毒反向遗传学系统的建立	223
第六节 鼠诺瓦克病毒反向遗传学系统的建立	226
第七节 反向遗传学在杯状病毒科研究中的应用	230

结语	232
参考文献	233
第九章 甲病毒科的反向遗传学	236
第一节 甲病毒科的基本特征	236
第二节 甲病毒基因组结构特征及其表达产物	237
第三节 甲病毒的繁殖	239
第四节 甲病毒反向遗传学系统的建立	241
第五节 反向遗传学在甲病毒科研究中的应用	243
结语	250
参考文献	250
第十章 冠状病毒科的反向遗传学	255
第一节 冠状病毒科的基本特征	255
第二节 冠状病毒基因组结构及其表达产物	256
第三节 冠状病毒的繁殖与复制	259
第四节 猪冠状病毒反向遗传学系统的建立	261
第五节 鸡传染性支气管炎病毒反向遗传学系统的建立	265
第六节 反向遗传学在冠状病毒科研究中的应用	268
结语	275
参考文献	275
第十一章 正黏病毒科反向遗传学	279
第一节 正黏病毒科的基本特征	279
第二节 正黏病毒基因组结构特征及编码产物	281
第三节 正黏病毒的繁殖与复制	282
第四节 流感病毒反向遗传学系统的建立	284
第五节 反向遗传学在正黏病毒科研究中的应用	296
结语	304
参考文献	304
第十二章 副黏病毒科的反向遗传学	310
第一节 副黏病毒科的基本特征	310
第二节 副黏病毒基因组结构及其表达产物	311
第三节 副黏病毒的繁殖与复制	314
第四节 新城疫病毒反向遗传学系统的建立	315
第五节 犬瘟热病毒反向遗传学系统的建立	322
第六节 小反刍兽疫病毒反向遗传学系统的建立	325
第七节 反向遗传学在副黏病毒科研究中的应用	329
结语	334
参考文献	335

第二十一章 痘病毒科的反向遗传学	537
第一节 痘病毒科的基本特征	537
第二节 痘病毒基因组结构及编码产物	542
第三节 痘病毒的繁殖与复制	557
第四节 痘病毒反向遗传学系统的建立	561
第五节 反向遗传学在痘病毒科研究中的应用	567
参考文献	573

彩图

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。人们很早就开始探讨有关亲代和杂交子代之间的性状遗传规律, 但一直未取得突破性进展。直到 1866 年奥地利学者 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, 提出两个影响深远的基本遗传法则, 即分离法则 (定律) (图 1-1) 和自由组合法则 (定律) (图 1-2), 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 (Cann, 2005)。1909 年英国遗传学家 Bateon 提出了“遗传学” (genetics) 这一学科名称, 并对其进行了定义, 认为遗传学是研究生物的遗传和变异, 即研究亲子之间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。自此, 遗传学正式成为一门学科。100 余年来, 遗传学家们都是在围绕这三个方面进行研究。

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, 在广泛和深入研究的基础上, 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、结构等仍然是个谜。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 (赵寿元和乔守怡, 2001)。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改变来探索生物遗传的规律, 解释遗传的本质, 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。

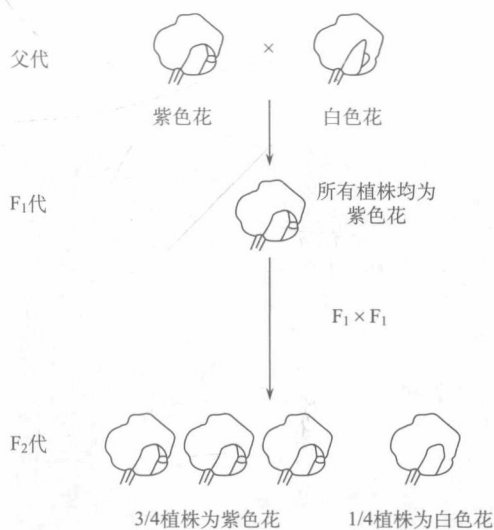


图 1-1 孟德尔分离定律示意图

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。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 $3:1$

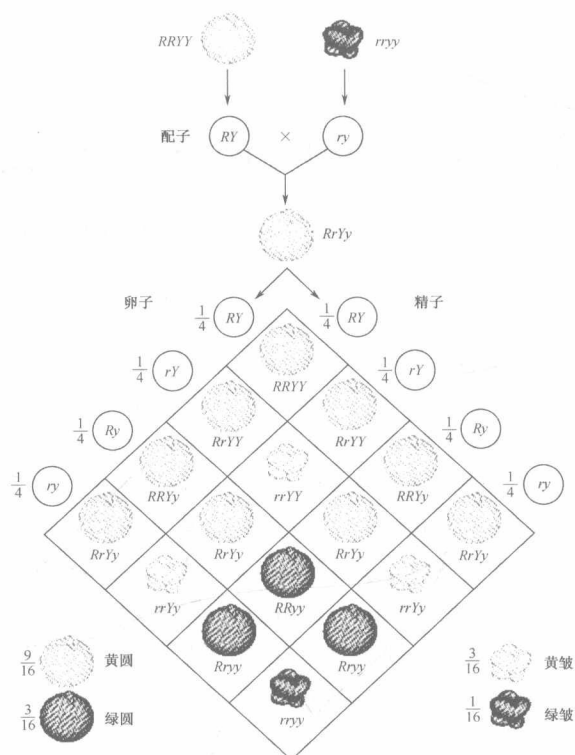


图 1-2 孟德尔自由组合定律示意图

侧交证明杂交种 F_1 代的非等位基因在配子形成时可以自由组合到不同配子中。孟德尔设计了双交和三交实验，均证实所研究的豌豆的 7 对性状是独立遗传的



图 1-3 Watson 和 Crick 提出 DNA 的双螺旋结构模型

1953 年 Watson 和 Crick 提出了 DNA 的双螺旋结构模型 (图 1-3), Crick 继而于 1958 年又提出“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,也阐明遗传信息的传递途径,从而开创了遗传学的新纪元,也标志着遗传科学进入一个新阶段,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或揭示。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。

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被建立与发展。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;Smith等(1970)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的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,它以RNA为模板,反转录生成DNA,等等(吴乃虎,2003)。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。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,所以称之为反向遗传学。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(antisense 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,对基因进行操作,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有力推动植物学、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是指对微生物(包括细菌和病毒)的反向遗传操作和研究,尤其是RNA病毒的反向遗传学操作。这是由于RNA病毒的基因组一般比较小,更有利于反向遗传操作。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相对容易,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则显得较为滞后。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,病毒 RNA 一旦脱离病毒核衣壳的保护就难以存在。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,在 DNA 分子水平上研究 RNA 病毒成为可能,RNA 病毒的研究也因此取得巨大进展。

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,拯救出与母本病毒具有相同特性的活病毒。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,而且要构建一些辅助质粒,其中含有 RNA 复制酶及核蛋白的编码序列,然后将这些重组质粒共同转染宿主细胞,经过内转录过程实现负链 RNA 病毒的拯救,如 Schnell 等 (1994) 将含狂犬病病毒 NP、P 和 L 基因的重组表达质粒与含病毒全长反义基因组的质粒共转染能稳定表达 T7 RNA 聚合酶的细胞系,在细胞内形成 RNPs,然后在 T7 RNA 聚合酶的作用下进行转录和翻译,并装配成完整的病毒粒子,实现了狂犬病病毒的拯救 (Mertens and Diprose, 2004)。早期的禽流感病毒的拯救则需要共转染 12 个质粒,其中包括能转录 8 个基因片段的 8 个转录质粒,以及表达 PB2、PB1、PA 和 NP 蛋白的 4 个表达质粒,后来建立起转录/翻译载体后才把质粒数减少到 8 个。由于这种拯救病毒来自于病毒基因组的 cDNA 分子,因此,可以在 DNA 水平上对病毒基因组进行操作,研究拯救病毒基因型的改变对病毒表型的影响,进而对病毒基因组结构与功能、表达与调控进行研究,甚至还可以研究病毒的致病机制、分子免疫机理等。另外,依赖于反向遗传学系统,研究者还能设计出一种能输送治疗基因的载体,甚至研制出一种毒力减弱的活病毒疫苗以预防由 RNA 病毒引起的许多疾病,这种研究疫苗的方法被称为反向疫苗学 (reverse vaccinology) (Sommerfelt, 1999)。

理论上所有的 RNA 病毒都可以通过构建感染性克隆来开展病毒的分子生物学研究,然而,这种研究策略取决于病毒是否有体外增殖系统 (主要是敏感细胞系)。因为,所构建的感染性克隆必须首先能在体外培养系统内实现病毒的拯救,然后才能进行反向遗传操作。事实上,许多 RNA 病毒都缺乏敏感细胞系,如丙型肝炎病毒、诺瓦克病

毒、兔出血症病毒，等等。显然，利用感染性克隆技术研究这些病毒的致病机理、遗传变异和毒力进化等是行不通的。但是，利用反向遗传学技术在研究这些病毒的基因组复制或表达机制等方面仍具有明显的技术优势，这就需要引入复制子 (replicon) 的概念。通常复制子是指 DNA 中能发生独立复制的一段 DNA 序列，在该序列中不仅有复制起点和复制终点，而且含有调节 DNA 复制的一些顺式元件。在真核生物中，DNA 的复制是从许多起始点同时开始的，所以每个 DNA 分子上有许多个复制子。每个复制子都含有一个复制起点。原核生物的染色体和质粒、真核生物的细胞器 DNA 都是环状双链分子，它们都是单复制子，都在一个固定的起点开始复制，复制方向大多数是双向的，少数是单向复制。就 RNA 病毒而言，复制子是指保留了病毒基因组复制所必需的非结构蛋白编码基因和非编码区的顺式作用元件的一种缺陷型基因组，它能够在宿主细胞内有效复制；但由于缺失了结构蛋白编码基因，因此复制子在细胞内无法形成感染性的病毒颗粒。图 1-4 是黄病毒科昆津病毒复制子的结构示意图，该复制子以外源基因置换了病毒的结构蛋白编码基因，而保留了所有的非结构蛋白和两侧的非编码区 (5'/3' UTR)，为便于筛选能支持复制子持续性复制的细胞系，在非结构蛋白的下游还插入一个抗性基因。由于抗性基因的表达受控于外加的内部核糖体结合位点元件 (IRES)，而外源基因的表达则利用昆津病毒的表达元件来实现。因此，这种复制子又被称为选择性 (双顺反子) 复制子系统。

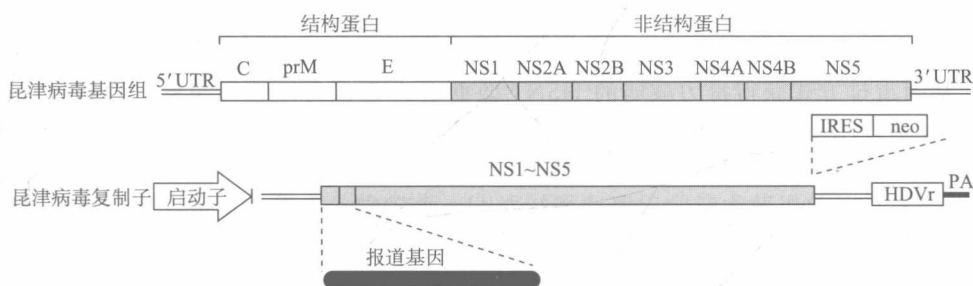


图 1-4 昆津病毒复制子结构示意图 (引自 Pijlman et al., 2006)

复制子在 RNA 病毒研究中应用非常广泛，而且它的应用不受培养系统限制。因为可以将 RNA 病毒复制子构建成重组质粒，然后将质粒直接转染细胞系，通过报道基因的瞬时或稳定表达来评价反向遗传操作对 RNA 病毒的复制或表达的影响。此外，复制子系统对研究一些生物安全级别比较高的病毒，如口蹄疫病毒、新城疫病毒和禽流感病毒等也提供了一个很方便的操作平台，研究这些病毒的复制和表达调控的分子机理等不需要操作具有感染性的病毒就可以实现。但复制子在 RNA 病毒研究领域中的应用，更多地体现在新型病毒载体和新型疫苗的研制以及基因治疗等方面。

第四节 反向遗传学研究的方法

病毒的反向遗传学研究系统建立后，人们可以根据不同的研究目标，采用不同的研

究技术开展研究,比较常用的方法有以下几种。

一、基因突变

基因突变是通过改变基因组中特定序列,从而使其相应的表型发生改变,根据对功能的不同影响,来确定基因的功能及其他遗传因素特性(梁国栋,2003)。DNA 突变可以是单个碱基发生改变,也可以是多个碱基发生改变。DNA 突变技术多用于研究病毒基因组的结构与功能,也可以研究病毒的受体。例如,Leippert 等(1997)在口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)基因组 RGD 序列内部及其附近区段分别制造了 13 个点突变,然后观察这些突变对病毒感染性的影响,结果证明 FMDV 的 RGD 序列在病毒吸附过程中具有重要作用。

二、基因重组

当两种以上病毒感染同一种宿主细胞时,会发生遗传物质核酸片段的交换,这被称为基因重组。其结果是产生稳定的新基因组合的子代,它们具有两亲代所没有的特性。自然界中,这种变异对病毒的进化是有利的。在实验室里,我们也可以人为地对病毒基因组进行重组,拯救出一种新病毒,观察其表型的变化及其与基因型改变的关系等。基因重组方法常应用于基因组为多节段的 RNA 病毒的反向遗传学研究中,如禽流感病毒、呼肠孤病毒等。利用这种方法,可以进行基因组结构与功能研究、病毒的致病性研究及新型疫苗研究等。例如,Subbarao 等(2003)利用 8 质粒病毒拯救系统,以“6+2”的基因重排方式获得毒力减弱的 H5N1 型重组 A 型流行性感冒病毒,将其制备成灭活疫苗并免疫小鼠,可刺激实验动物产生较强的免疫应答,能抵抗野生型 H5N1 病毒的侵袭。

三、基因缺失

基因缺失是指将病毒基因组中某一特定区段人为删除,然后利用反向遗传操作系统进行病毒拯救,观察基因缺失对病毒侵染性、病毒复制或病毒结构蛋白表达等的影响,借此可以了解靶基因的结构和功能。还可以利用基因缺失方法,将病毒的毒力基因进行敲除,获得毒力减弱的毒株,为研制基因工程疫苗作准备。例如,研究资料表明,FMDV 的前导蛋白(leading protein, L)可能是 FMDV 的一种毒力因子,Chinsangaram 等(1998)利用反向遗传技术成功构建了缺失 L 基因的基因工程毒株,将其制成疫苗后,进行动物实验。结果表明它与灭活疫苗具有同等的免疫效力,不仅能保护实验动物免受强毒的攻击,而且具备不散毒的优点。此外,利用该方法还可以研制病毒载体系统,目前使用的复制缺陷型腺病毒载体就是通过缺失 E1 区建立起来的。

四、基因置换

基因置换即用外源基因置换病毒基因组中的某个基因,借以研究被替换基因的功能或病毒的致病机理等。例如,用猪水泡病病毒(swine vesicular disease virus, SVDV)基因组的 3'NCR 替换 FMDV 基因组的 3'NCR,获救的嵌合病毒在 FMDV 的敏感细胞

系中将丧失复制能力。与缺失 3'NCR 的 FMDV 相比,这种嵌合的 FMD 病毒在延长转染细胞时间后,能使病毒 RNA 的合成维持在较低水平,但是在敏感细胞上连续传代以后,不能收获可见的病毒粒子,表明 FMDV 的 3'NCR 在完成 FMDV 的完整复制循环过程中起关键作用,而且 FMDV 与 SVDV 的 3'NCR 不能交换发挥功能 (Saiz et al., 2001)。

此外,还有其他的一些方法常用于反向遗传学研究,如基因敲除、基因沉默等。在实际的反向遗传学操作中,上述方法常常是联合使用的。例如,在进行 H5N1 流感病毒疫苗致弱株的研发时,需要对高致病性 H5N1 的 HA 裂解位点进行删除 4 个碱性氨基酸,同时还要突变 2 个碱性氨基酸为非碱性氨基酸,然后把获得的修饰过的 HA 与具有高性能的流感病毒毒株的内部基因(如对鸡胚高度适应的 PR8 株)重排,从而拯救获得毒力减弱的高产 H5 疫苗候选株(卢建红等, 2005)。

结 语

随着反向遗传学不断走向成熟和基因工程技术的不断发展,一些重大病毒传染病的神秘面纱已被逐渐揭开,它们在宿主体内的表达调控机制和致病机理也得以澄清,新型疫苗的研制也迈入新的里程。有理由相信,在反向遗传学操作系统这一技术平台上,还将会有更多的 RNA 病毒被人们所了解和掌握,从而为消灭它们奠定坚实的基础。一切事物都有其两面性,在使用反向遗传学技术时应注意以下几个方面:①从理论上讲,运用反向遗传学技术拯救的病毒与母本毒株具有相似的生物学特性,但感染性有可能增强(Huang et al., 2004),在使用时应严加防范。②利用反向遗传学技术获得的病毒,由于基因突变或重组,有可能产生一种自然界中不存在的新病毒或新的基因型,要防止这种变异病毒逃逸实验室,危害生物安全。③通过反向遗传学技术获得的病毒在动物体内的“命运”不一定与母本病毒一样,有可能朝不同的方向变异和演化,因而其致病性可能有差异,在利用其研究病毒的致病机理时应予以注意(Dzianott and Bujarski, 1989)。④虽然反向遗传学为快速制造流感疫苗和了解发病机理提供了巨大的优势,但这一技术优势也为恐怖分子研制威胁人类的病原体提供了潜在的可能,一旦失控,对人类来说可能将是一场灾难。

参 考 文 献

- 梁国栋. 2003. 最新分子生物学实验技术. 北京: 科学出版社.
- 卢建红, 龙进学, 邵卫星, 等. 2005. 用反向遗传操作技术产生致弱的 H5 亚型重组流感病毒. 微生物学报, 45: 53-56.
- 特怀曼. 2000. 高级分子生物学要义. 陈淳, 徐心等译. 北京: 科学出版社.
- 王亚馥, 戴灼华. 2001. 遗传学. 北京: 高等教育出版社.
- 吴乃虎. 2003. 基因工程原理. 北京: 科学出版社.
- 杨业华. 2000. 普通遗传学. 北京: 高等教育出版社.
- 赵寿元, 乔守怡. 2001. 现代遗传学. 北京: 高等教育出版社.
- Chinsangaram J, Mason P W, Grubman M J. 1998. Protection of swine by live and inactivated vaccines