

DOI:10.13350/j.cjpb.240222

• 综述 •

冠状病毒的反向遗传学研究进展*

刘强¹, 牛小霞¹, 陈吉祥², 加华才让², 高辉¹, 方敏¹, 刘艳玲¹, 张思浓^{1**}, 李勇^{1**}

(1. 宁夏大学生命科学学院西部生物资源保护与利用教育部重点实验室, 宁夏银川 750021;

2. 甘肃省甘南州合作市佐盖曼玛镇畜牧兽医站)

【摘要】 冠状病毒是一种能够感染多种动物和人快速进化的病原体, 可引起轻度至重度呼吸道感染, 在全球范围内广泛流行, 尤其是2019年爆发了前所未有的SARS-CoV-2疫情, 给社会造成了严重的公共卫生危机和重大的经济损失, 迫切需要人们加深对冠状病毒生物学的了解。反向遗传学是研究病毒基因组结构和功能的强大平台, 已经广泛应用于病毒的复制和致病机理研究、蛋白功能表征、减毒疫苗研发和抗病毒治疗药物的筛选等方面。本文概述了冠状病毒和冠状病毒反向遗传系统的进展并进行展望, 期望为进一步开展冠状病毒致病与防治等基础研究及冠状病毒载体构建、新型疫苗研制等应用研究提供新见解。

【关键词】 冠状病毒; 反向遗传学; 感染性克隆; 病毒拯救; 综述

【中图分类号】 R373.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2024)02-0230-07

[*Journal of Pathogen Biology*. 2024 Feb;19(2):230-236.]

Research progress on reverse genetics of coronavirus

LIU Qiang¹, NIU Xiaoxia¹, CHEN Jixiang², JIAHUA Cairang², GAO Hui¹, FANG Ming¹, LIU Yanling¹, ZHANG Sinong¹, LI Yong¹ (1. Key Lab of Ministry of Education for Protection and Utilization of special Biological Resources in Western China, School of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750021, China; 2. Animal Husbandry and Veterinary Station, Zogimenma Town, Hezuo City, Gannan Prefecture)

【Abstract】 Coronaviruses are rapidly evolving pathogens capable of infecting a wide range of animals and humans, causing mild to severe respiratory infections, and are widely prevalent globally, especially with the unprecedented SARS-CoV-2 outbreak in 2019, which has resulted in a severe public health crisis and significant economic losses to society, and an urgent need to deepen the understanding of coronavirus biology. Reverse genetics is a powerful platform for studying the structure and function of viral genomes, and has been widely applied to the study of viral replication and pathogenesis, characterization of protein function, development of attenuated vaccines, and screening of antiviral therapeutics. In this paper, we summarize the progress of coronaviruses and the coronavirus reverse genetics system and provide an outlook, which is expected to provide new insights for further basic research on coronavirus pathogenicity and prevention, as well as applied research on the construction of coronavirus vectors and the development of novel vaccines.

【Key words】 coronavirus; reverse genetics; infectious cloning; rescue virus; review

***反向遗传学是当今分子生物学领域不可或缺的工具之一, 病毒的反向遗传学是在获得病毒基因组全部序列的基础上, 利用基因工程的手段将病毒的遗传物质以cDNA的形式生成感染性克隆, 在体外拯救出具有与母本相似感染性的病毒颗粒。目前, 研究者们已经建立了口蹄疫病毒、猪痘病毒、登革病毒等多种正链RNA病毒的反向遗传学系统, 并成功用于病毒拯救和生物学研究。该技术平台的建立和快速发展使得研究人员可以从基因分子水平进行研究, 突破生物领域中存在的技术瓶颈, 促进了对大RNA基因组生物学研究, 使得多种反向遗传学技术被先后应用于众多冠状病毒的研究中, 为冠状病毒基因组结构、功能、遗传致病因素、感染机制等基础研究和构建新型疫苗、病毒载体构建等应用研究提供了重要的技术支持。

1 冠状病毒概述

冠状病毒(coronavirus, CoV)是具囊膜、单股正链RNA病毒, 颗粒直径60~200 nm, 基因组全长约30 kb, 是目前为止已发现基因组最大的RNA病毒。根据系统发育树, CoV可分为

四个属: α 、 β 、 γ 、 δ , 现有研究显示 α 和 β 冠状病毒对哺乳类动物的具有宿主特异性, 而 γ 和 δ 冠状病毒则多感染禽类^[1]。自1937年^[2]首次在鸡身上发现CoV后, 陆续在不同的物种中发现多种CoV, 感染宿主后常引发肠道和呼吸道疾病, 严重程度从普通感冒到急性肾衰竭不等, 甚至造成宿主死亡, 对畜牧业的发展和人类的安全健康造成了严重威胁。尽管早在20世纪30年代就发现了CoV, 但对其的研究局限于兽医领域, 它真正引起关注是在2002-2003年SARS引起的疫情影响多个国家和地区, 造成人类大量死亡后, 使CoV受到各国的高度重视。

* **【基金项目】** 国家自然科学基金重点项目(No. 32130104), 宁夏回族自治区重点研发计划项目(No. 2021BEF02028)

** **【通讯作者】** 李勇, E-mail: liyong7732@nxu.edu.cn
张思浓, E-mail: sinongzhang@nxu.edu.cn

【作者简介】 刘强(1998-), 男, 河南安阳人, 在读硕士, 主要从事动物病原生物学研究。E-mail: liuqiang125210@163.com

迄今为止,已经出现了7种能够感染人的CoV(图1),分别是HCoV-229E^[3]、HCoV-OC43^[4]、SARS-CoV^[5]、HCoV-NL63^[6]、HCoV-HKU1^[7]和MERS-CoV^[8]以及目前流行的SARS-CoV-2^[9]。其中后出现的三种病毒为高致病性病毒,能够导致高发病率和死亡率。溯源研究表明,蝙蝠极有可能是其天然宿主^[10]。

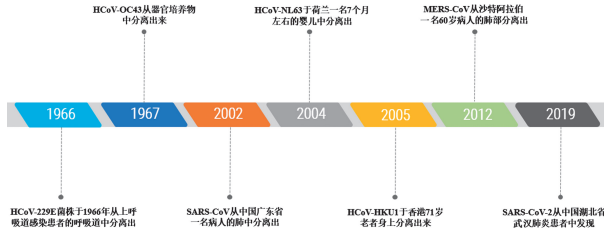


图1 人类CoV爆发时间
Fig. 1 Human coronavirus outbreak time

2 CoV 反向遗传学概述

反向遗传学系统是研究病毒基因组修饰和生成重组病毒

表1 反向遗传学在CoV科不同成员中构建及应用

Table 1 Construction and application of reverse genetics in different members of the coronavirus Family

冠状病毒科 Coronaviridae	病毒名称 VIRUS name	反向遗传学系统 Reverse genetics system	感染性克隆构建 Infectious cloning construction	评估 Evaluate
Alphacoronavirus	FIPV	靶向RNA同源重组 ^[13]	FIPV Δ 3abc FIPV Δ 7ab FIPV Δ 3abc/ Δ 7ab	单独缺乏3abc和7ab的突变体起保护性免疫,而FIPV Δ 3abc/ Δ 7ab没有保护作用
Alphacoronavirus	PEDV	体外连接 ^[14]	icPEDV- Δ ORF3-RFP	体外和体内有效复制,在猪中有效传播,产生致命疾病
Betacoronavirus	SARS-CoV	BAC ^[15]	rSARS-CoV- Δ E	rSARS-CoV- Δ E免疫小鼠产生高滴度抗体并保护肺部
Betacoronavirus	SARS-CoV-2	酵母系统的转化偶联重组 ^[16]	非传染性SARS-CoV-2复制子	证实E64-D和瑞德西韦药物对SARS-CoV-2复制的抑制作用
Betacoronavirus	SARS-CoV-2	CPER ^[17]	传染性SARS-CoV-2	病毒在体外和体内表现出与亲本病毒相当的特性
Gammacoronavirus	IBV	牛痘病毒载体 ^[18]	感染性IBV	生成含有gpt基因修饰的传染性重组IBV
Gammacoronavirus	IBV	靶向RNA同源重组 ^[12]	感染性rIBV	生成与亲本H52生长动力学特征相似的传染性重组嵌合IBV
Deltacoronavirus	PDCoV	体外连接 ^[19]	rPDCoV- Δ NS6-GFP rPDCoV- Δ NS7	rPDCoV- Δ NS6-GFP作为减毒活疫苗感染仔猪未有不良临床症状

3 基于RNA策略的CoV反向遗传学系统

3.1 基于靶向RNA同源重组的反向遗传学

RNA重组是生物界中普遍存在的现象,其作为一种遗传交换机制,为CoV提供了强大的进化属性^[20]。CoV庞大的基因组和特定的复制模式,使RNA重组以高频率快速发生。靶向RNA重组是第一个为CoV设计的反向遗传系统,通过供体RNA与具有某些特征的受体病毒同源重组,将特定的特征引入到CoV基因组中,从而使其被反向选择。

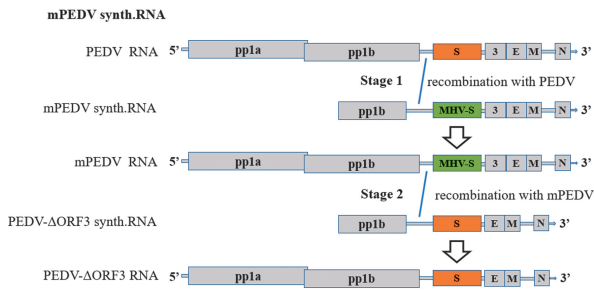
小鼠肝炎病毒(mouse hepatitis virus, MHV)是Kusters等^[21]第一个使用靶向RNA重组构建的感染性克隆。其通过将鸡传染性支气管炎病毒(infectious bronchitis virus, IBV)的S基因与MHV的S基因以同源重组的方式进行交换,成功构建携带MHV的S基因且具有严格小鼠细胞亲和力的嵌合CoV,

其作为当前病毒研究的强大平台,涵盖野生型或突变病毒颗粒的拯救、病毒复制和发病机制的研究、病毒蛋白功能的表征以及减毒活疫苗和抗病毒药物开发等多个方面(表1)。但是由于CoV基因组较大、病毒序列的突变以及毒性、一些CoV复制酶基因序列在细菌中作为克隆cDNA繁殖时不稳定和体外驱动全长转录本的困难,严重阻碍了CoV全长感染性cDNA克隆的生成,这使得之前CoV遗传学研究局限于温度敏感突变体、依赖于辅助病毒的缺陷性RNA病毒^[11]以及基于RNA的靶向同源重组技术构建的重组病毒^[12]。之后,科学家进一步研发出了基于病毒cDNA策略的更稳定简便的反向遗传学系统,基于细菌人工染色体载体、cDNA片段的体外连接、酵母系统的转化偶联重组、痘苗病毒载体以及利用环状聚合酶策略等反向遗传学技术用于操纵CoV基因组,并拯救出多种具有和亲本类似生物学特征的重组CoV,这对于研究病毒的生物学特征和病毒-宿主之间的相互作用以及为开发预防和治疗该病原体的新工具提供了有价值的思路。

并在病毒依赖的特定细胞中拯救该病毒。随后该方法被应用于猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)^[22](图2)和猫传染性腹膜炎病毒(feline infectious peritonitis virus, FIPV)^[13]等CoV感染性克隆的构建,从而加快实现对蛋白功能深入研究和减毒疫苗的合理开发。

靶向RNA重组为CoV全长基因组下游三分之一的结构和功能的研究提供了一种强有力工具。其中一个原因是它相对容易操作,即使最大的供体RNA载体仍然比整个基因组小三倍,可以在没有亚克隆的情况下进行DNA水平诱变。第二个原因是靶向重组涉及不同蛋白质之间的域交换、基因组元件的交换、产生位点特异性病毒突变体和嵌合体重组病毒的研究^[23]。但其也存在明显的局限性,它无法对基因组上游约三分之二的基因序列进行操作;不能研究病毒的复制和转录相关问

题;以及由于病毒传代的需要,无法研究致命突变。因此迫切需要研究更为全面的新型反向遗传学系统,来克服在当下工作中所出现的障碍。



注:在第一阶段,基于靶向 RNA 重组策略, PEDV-S 蛋白被 MHV-S 蛋白所取代,产生一种携带来自 MHV-S 蛋白的嵌合病毒 mPEDV。在第二阶段 mPEDV 病毒被用作受体病毒,通过靶向 RNA 重组技术重新引入 ORF3 基因的缺失的基因组,构建了一种缺乏 ORF3 基因的 PEDV (PEDV-ΔORF3)。

图 2 PEDV 靶向 RNA 重组策略

Note: In the first stage, PEDV-S protein is replaced by MHV-S protein based on a targeted RNA recombination strategy, resulting in a chimeric virus mPEDV carrying the MHV-S protein. In the second stage, mPEDV virus was used as a receptor virus to construct a PEDV lacking ORF3 gene (PEDV-ΔORF3) by reintroducing the ORF3 gene deletion genome through targeted RNA recombination technology.

Fig. 2 PEDV targeting RNA recombination strategy

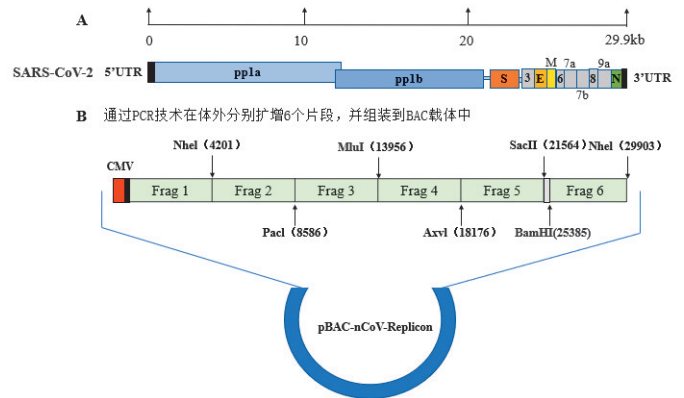
4 基于 cDNA 策略的 CoV 反向遗传学系统

4.1 基于质粒的 CoV 反向遗传学

4.1.1 基于细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome, BAC)的反向遗传学 BAC 系统是一种将病毒基因组的全长 cDNA 组装到 BAC 质粒中形成一种重组质粒生成感染性克隆的策略。BAC 是一种以 F 质粒为基础而构成的低拷贝、高容量克隆载体,其严格控制的复制导致每个细胞只存在一或两个质粒拷贝,最大限度地减少序列对宿主细胞的毒性,并以较高的表达效率快速高效地拯救重组病毒。2000 年 Almazan 等^[24]使用 BAC 方法首次生成传染性胃肠炎病毒(transmissible gastroenteritis virus, TGEV)的全长 cDNA 感染性克隆。随后基于这种策略构建 FIPV^[25]、SARS-CoV^[15]、MERS-CoV^[26] 和流行的 SARS-CoV-2^[27](图 3)的感染性克隆,为病毒特性与机制的进一步研究提供了有效材料。

除了被用于常规质粒的标准方案外, BAC 系统还可以通过将红色重组系统与归巢核酸内切酶相结合的同源重组策略轻松有效地修饰大肠埃希菌^[28-29]。这可以准确又高效地在 BAC 克隆中引入插入、缺失或点突变,避免保留不必要的外源序列^[30-32]。Gibson 组装方法被证明是生成新兴和预出现病毒病原体的感染性克隆的有效手段, Wang 等^[33]使用 Gibson 组装克隆系统高效地生成所感兴趣的突变,与 BCA 重组质粒中原有片段进行交换,此方法已成功应用于 SARS-CoV-2 所有片段。最近 Qi 等^[34]利用 CRISPR/Cas9 技术在 BCA 系统的基础上高效地挽救稳定传代的重组 RAJ3-ΔORF3-EGFP,为 PEDV 基因组操作提供了一个有效平台。需要注意的是,细菌转座子概率性插入 CoV 基因组的问题给该系统的感染性克隆的成功构建增添了障碍, Jengarn 等^[35]利用 DH10B 细胞来尽可能地减少转座子元件插入基因组中,以防止重组发生;同时,外源插入片段在 CoV 基因组中的位置是重组 CoV 遗传稳定性的关键因素,

如 ORF3 位置具有荧光素酶基因的重组 PEDV 显示出比位于 S 基因之前的外源基因高得多的活性^[13]。



A SARS-CoV-2 基因组示意图 B 将不含 S 基因的 SARS-CoV-2 基因组分离成 6 个片段进行 cDNA 合成,然后将所有片段组装在 pBAC-MCS 中产生 SARS-CoV-2 复制子,其中片段 1 的 5' 末端 CMV 启动子融合,片段 6 的 3' 末端与 PolyA、HDV(Hepatitis delta virus, HDV) 和 BGH(Bovine growth hormone, BGH) 终止子融合

图 3 基于 BCA 系统构建 SARS-CoV-2 复制子

A Genome diagram of SARS-CoV-2 B The SARS-CoV-2 genome without S gene was separated into 6 fragments for cDNA synthesis, and then all fragments were assembled in PC-MCS to produce SARS-CoV-2 replicators, in which the 5' terminal CMV promoter of fragment 1 was fused. The 3' terminus of fragment 6 was fused with PolyA, Hepatitis delta virus (HDV), and Bovine growth hormone (BGH) terminators

Fig. 3 Construction of SARS-CoV-2 replicators based on BCA system

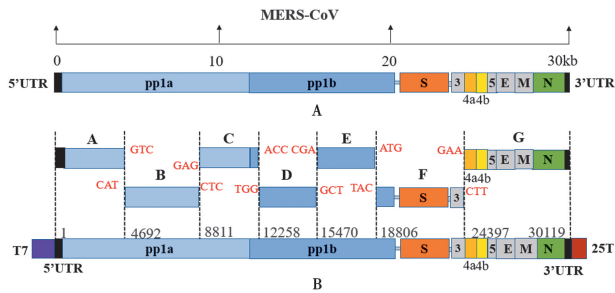
采用基于 BAC 的策略构建全长病毒克隆时,其具有几个优点,如外源序列的高稳定性、cDNA 克隆的无限扩增、操作病毒基因组的简便性和可行性、BAC 载体对于回收与细菌宿主序列毒性相关的病毒有效性以及易于病毒在细胞内高表达。然而该方法局限性也比较明显,尽管分子生物学技术发展迅速,但仅用一步法将 CoV 的全长 cDNA 克隆到 BAC 载体中仍然不可行;另外,全长基因组被分离成几个片段进行组装,大于 8 kb 的片段很难形成中间载体质粒;其次,载体的低拷贝数导致质粒回收率低,宿主 DNA 污染的可能性增加,因此需要进行测序步骤确保无错误突变,增加了实验时间和成本。

4.1.2 基于体外连接的反向遗传学 基于体外连接策略最初由 Rice 等^[36]开发用于产生黄热病病毒的感染性克隆,通过体外连接系统将整个病毒基因组的连续 cDNA 片段组装成全长 cDNA,将其用作合成病毒 RNA 转录本的模板。转染过程中这转录本与 N 基因转录本一起使用,增加了病毒的拯救效率,但其作用机制在很大程度上是未知的。

体外连接技术最早用于的 CoV 是构建 TGEV 病毒全长 cDNA^[37]。体外连接的策略是采用 No See'm 克隆技术来生成用于组装,通过在 cDNA 片段末端掺入 IIS 型限制性内切酶,使识别位点和切割位点之间的接头序列以及病毒序列侧翼的切割位点在 IIS 型限制性核酸内切酶切割后被去除,这种方法允许在病毒基因组序列不突变的情况下产生真实的 cDNA 克隆。此外,通过设计包含 IIS 型限制性内切位点和识别位点可变区域突变的引物,可以自由选择病毒基因组的任意氨基酸进行研究^[38]。这种强大的灵活性对表征多种病毒元件对宿主免疫应答的组合作用和分析病毒基因功能至关重要,也为探索 CoV 的

感染和发病机制提供了大量机会。

cDNA 质粒繁殖时的缺失和突变是该系统成功的关键障碍之一, Xie 等^[39] 通过优化大肠埃希菌的生长条件, 在较低温度 (25 °C) 和更长的时间 (长达 48 小时) 条件下培养, 以促进生成忠实于原始病毒序列的 cDNA, 使扩增序列的保真性得到较大改善。此外, 在进行体外连接时 cDNA 片段浓度需要足够高, 确保全长 cDNA 顺利组装。这种体外组装技术与合成生物学相结合的系统, 进一步成功地用于设计 IBV^[19]、蝙蝠 SARS 样 CoV^[40]、MERS-CoV^[41] (图 4) 和 SARS-CoV-2^[42] 的感染性克隆, 从而研究特定病毒蛋白在发病机制中的作用。该技术也能通过插入转录调节序列使不同病毒之间的基因片段发生重组^[43], 进而预测和研究自然界中可能发生的重组病毒事件。



A MERS-CoV 的基因组示意图 B 将全长 MERS-CoV 基因组最终被分成七个连续的 cDNA 片段, 命名为 A-F, 两侧是独特的 BglI 位点, 允许定向组装全长 cDNA。A 片段含有一个 T7 起始位点, 而 F 片段终止于 25 个胸腺嘧啶残基以体外连接的方式组装病毒全长 cDNA

图 4 通过体外连接系统组装 MERS-CoV 全长 cDNA 克隆

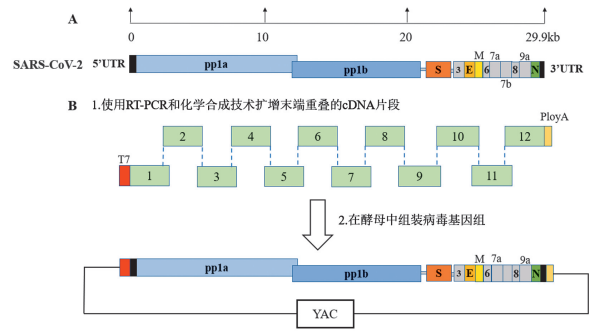
A Genome diagram of MERS-CoV B The full-length MERS-CoV genome was eventually divided into seven continuous cDNA fragments, named A-F, flanked by unique BglI sites, allowing directional assembly of full-length cDNA. The A fragment contains a T7 initiation site, while the F fragment terminates in the assembly of the virus full-length cDNA in vitro by 25 thymine residues.

Fig. 4 Full-length cDNA clones of MERS-CoV were assembled by an in vitro ligating system

总体来看, 该策略简单明了, 多数操作都是在常规分子克隆技术下进行扩增和诱变; 可以通过将有毒序列分成多个小片段来克服冠状病毒 cDNA 序列的不稳定性问题; 另外, 使用 No See'm 技术避免基因组上有限的限制性位点, 能够在符合体外连接的条件下对任意的片段进行组装。但与 BCA 系统相比, 增加了额外的步骤, 相对比较繁琐; 由于基本病毒结构基因的缺失, 通过该策略产生的生物安全复制子无法产生活病毒; 值得关注的是, 病毒基因组 RNA 的复制在很大程度上依赖于反向遗传学系统的稳定性, 在转录过程中它可能含有来自流产性转录本或错误模板组装的各种转录本, 无法保证来自体外连接策略的 RNA 产物的均一性, 因此, 往往导致产生的复制子在基因测序时效果不佳。

4.1.3 基于酵母系统的转化偶联重组技术 (transformation associated recombination, TAR) 的反向遗传学 基于酵母系统的反向遗传学系统是将含有病毒全基因组的多个亚基因组片段和 TAR 载体通过酿酒酵母的 TAR 克隆技术构建全长 cDNA 克隆, 酵母细胞中促使线性化的 TAR 载体与基因组序列发生同源重组, 进而筛选出正确组装含有全病毒基因组的酵母人工染色体 (yeast artificial chromosome, YAC) 进行病毒颗粒的挽救^[44]。TAR 克隆技术已经成功应用于蝙蝠 SARS 样

CoV^[40]、MERS-CoV^[18] 和 SARS-CoV-2^[16] (图 5) 等感染性克隆的构建。



A SARS-CoV-2 的基因组结构 B 全长基因组 cDNA 被分成 12 个末端重叠的连续片段 (1-12), 将所有片段和 TAR 载体, 利用同源重组以生成含有病毒全长 cDNA 的 YAC 载体

图 5 基于酵母的 TAR 克隆的 SARS-CoV-2 感染性克隆的构建

A Genome structure of SARS-CoV-2 B The full-length genome cDNA was divided into 12 contiguous fragments with overlapping ends (1-12), and all fragments and TAR vectors were recombined by homologous combination to generate YAC vector containing the full-length cDNA of the virus

Fig. 5 Construction of SARS-CoV-2 infectious clone based on yeast TAR clone

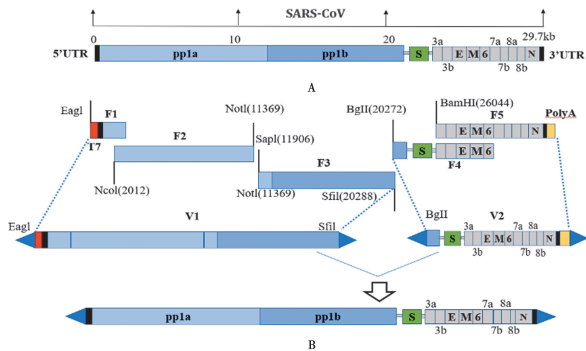
在大多数反向遗传学系统中, 与原病毒核衣壳 (nucleocapsid, N) 蛋白的 mRNA 转录本共转录到宿主细胞中可以提高拯救病毒颗粒的效率, 这在该系统中也同样适用, 如 MHV^[18]、TGEV^[37] 等。需要关注的是, 在使用 TAR 技术时应该仔细选择克隆区域的同源序列, 当 GC 含量丰富或者富含重复序列时会降低在酵母中的重组效率以及准确性^[45]。最近 Zhou^[46] 等结合 CRISPR/Cas9 体外编辑技术便捷地创建了表达绿色荧光蛋白的 PEDV 突变体, 此技术摆脱了酵母中 TAR 的限制, 生成的感染性克隆更加稳定。

酵母同源重组是到目前为止最高效的 DNA 大片段的组装方法, 在合成更长的 DNA 片段时有较大的优势。一方面酵母细胞生长迅速, 且对有毒的序列的敏感性较低, 有助于全长 cDNA 的快速繁殖, 为病毒的研究提供充足的材料, 显著缩短拯救病毒所需时间; 对于有经验的实验室, 感染性 cDNA 的构建可以在 1 周内完成; 另一方面 TAR 克隆系统具有快速重组至少 14 个片段和高达 250 kb 的大 DNA 片段的能力, 能够利用合成生物学直接克隆毒株用于基因组学研究, 无需多余的体外培养; 该系统在标准的实验室环境中不需要特定设备就可完成^[47]。但依旧存在一些不足, 如酵母质粒提取比细菌质粒提取更复杂、昂贵, 以及该系统很大程度上依赖于酵母的生长状态。

4.2 依赖辅助病毒的 CoV 反向遗传学

4.2.1 基于痘苗病毒载体的反向遗传操作技术 痘苗病毒载体系统将病毒整个基因组多个连续的 cDNA 以痘苗病毒载体为介质在体外连接成全长 cDNA, 用作感染性 RNA 转录本拯救重组病毒。该系统用于拯救病毒有两种途径, 一种是将全长冠状病毒 IBV 的 cDNA 转染到已经被重组鸡痘病毒感染的鸡肾细胞中。鸡痘病毒作为辅助病毒介导噬菌体 T7RNA 聚合酶的表达, 从不支持鸡痘辅助病毒生长的细胞中挽救 IBV, 这种途径避免了体外合成 CoV 全长转录本纯度不足的影响^[48]。另一种是将含有全长 cDNA 的重组痘苗病毒直接转染到相应的

宿主细胞中,得到相应的病毒,如 SARS-CoV 的拯救^[49](图 6)。牛痘病毒载体方法首先被 Thiel 等^[50]用于生成重组 HCoV-229E,随后成功应用于多种 CoV 的反向遗传学,包括 MHV^[51]、FIPV^[52]和 MERS-CoV^[18]等全长感染性克隆的构建,促进了 CoV 的复制和发病机制等基础理论研究。



A SARS-CoV 基因组示意图 B SARS-CoV 整个病毒基因组的分为五个连续 cDNA 片段(SARS-1 至 SARS-5),以产生 V1(1-20288)、V2(20272-29727)两种重组牛痘病毒,并通过体外连接以产生全长 cDNA 的感染性克隆

图 6 基于牛痘病毒的 SARS-CoV 复制子的组装

A SARS-CoV-2 genome diagram B The whole genome of SARS-CoV virus was divided into five continuous cDNA fragments (SARS-1 to SARS-5) to generate two recombinant vaccinia viruses V1 (1-20288) and V2(20272-29727), and the infected clones of full-length cDNA were generated by in vitro ligations.

Fig. 6 Assembly of SARS-CoV replicators based on vaccinia virus

目前开发了两种基于大肠埃希菌黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶基因(gpt)作为阳性和阴性选择标记进行重组的痘病毒反向遗传学^[53]。第一种方法被称为瞬时显性选择^[54,55],在启动子的作用下将 gpt 选择性标记插入到修饰过的 CoV 的 cDNA 区域,然后该完整序列通过同源重组瞬时整合到牛痘病毒中。表达 gpt 基因的重组牛痘病毒被阳性选择,从而获得所修饰的 cDNA。第二种方法^[56,57]是重组牛痘病毒中选定的 CoV 区域被大肠埃希菌 gpt 基因取代后。在宿主细胞的 gpt 阳性选择下分离出含有目标 CoV 基因组位置的 gpt 基因的牛痘病毒。通过重组质粒中的目的基因取代 gpt 基因,在细胞中对 gpt 阴性细胞筛选以便分离出含目的基因的重组病毒。

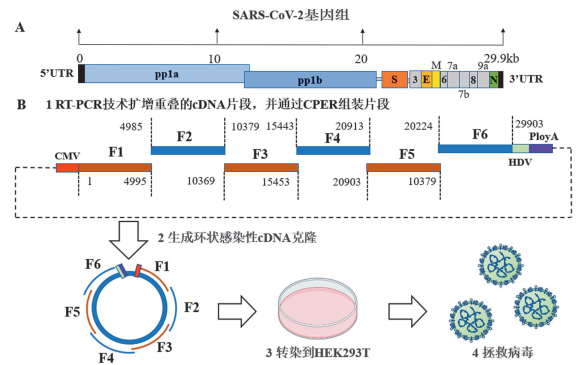
痘病毒反向遗传学的研究表明,N 蛋白被证明有助于病毒 RNA 基因组的复制,从而有益于提高病毒颗粒的产量^[58]。这些反向遗传系统在不同程度上依赖于 N 转录本,如 N 转录本增加从重组牛痘病毒中拯救 IBV 效率^[48,59];在 N 蛋白存在的情况下,从体外组装的全长感染性克隆中拯救 MHV 和 TGEV 的能力显著增强^[26],而 SARS-CoV 和 MERS-CoV 在生成重组病毒的过程中与 N 蛋白的共表达无关^[60]。目前对于 N 蛋白在重组病毒产生中的重要性尚不清楚,作用机理也并无阐述。

之所以选择痘病毒载体有几个原因。首先,痘病毒载体适用于大 cDNA 的克隆,形成的重组痘病毒基因组是稳定的,且在培养中高效复制,能产生高滴度菌株;另外,痘病毒载体与外源病毒全长基因直接连接,减少了对 cDNA 插入片段的质粒中间体的需求;还有一个优点是牛痘病毒介导的同源重组可用于在牛痘病毒繁殖期间修饰 CoV 基因组 cDNA,这种简便策略被广泛应用于 CoV 的基因组中外源序列的引入,甚至可

以修复在反转录过程中突变的核苷酸^[61]。

4.3 基于合成生物学的 CoV 反向遗传学

4.3.1 基于环状聚合酶延伸反应(Circular polymerase extension reaction,CPER)策略的反向遗传学 基于 CPER 的反向遗传系统通过环状聚合酶 PCR 方法可直接用于生成全长病毒 cDNA,从而快速获得病毒的感染性克隆。这一想法首先在利用 CPER 策略构建黄病毒感染性克隆中得到了实现^[62]。直到最近,Alberto 等^[17]基于 CPER 成功生成 SARS-CoV-2 的感染性克隆,为 RNA 病毒建立了一个简单快速、通用的反向遗传学平台,也为 CoV 反向遗传学构建提供了一个新方向(图 7)。同时,该技术可以用于不同毒株之间 cDNA 片段的组合,以产生具有所需突变重组病毒,以便快速地识别新的传播重组毒株和发病决定因素。



A SARS-CoV-2 基因组示意图 B 全长基因组分为 6 个含有 10 个核苷酸重叠序列的片段。接头片段包括病毒 5'端 CMV 启动子、3'端含有 HDV 和 PolyA,利用 CPER 生成环状感染性 cDNA 克隆,转染到 HEK293T 细胞中进行病毒回收。

图 7 基于 CPER 策略的 SARS-CoV-2 反向遗传学系统

A SARS-CoV-2 genome diagram B The full-length genome is divided into 6 fragments containing 10 nucleotide overlapping sequences. The fragment included the 5'-end CMV promoter and the 3'-end HDV and PolyA,and was transfected into HEK293T cells to generate circular infectious cDNA clones using CPER.

Fig. 7 Reverse genetics system of SARS-CoV-2 based on CPER strategy

虽然 CPER 与以上策略类似,但研究表明 CPER 产物的转染效率和病毒的复制效率对于生产重组病毒特别重要,而且重组病毒只有在使用特定的引物集和启动子片段时产生的片段才能回收。同时也发现有些病毒只能在特定的宿主细胞中复制,如昆虫特异性黄病毒只能在昆虫来源的细胞中复制^[63];SARS-CoV-2 重组病毒仅能在 HEK293-3P6C33 细胞中回收^[64]。也有人发现尽管与 N 蛋白的共表达在许多反向遗传学系统中增加了病毒的拯救效率,然而这种效应在基于 CPER 系统中却消失了^[65]。

CPER 操作具有快速简便的优点,一些长片段聚合酶可以扩增长达 40 kb 的 DNA 片段,直接生成全长病毒 cDNA,而无需构建包含组分片段的中间克隆。同时,也有值得注意的缺陷,仍需进一步改进,如在 CPER 中使用 DNA 聚合酶进行体外合成会在 DNA 产物中引入不可预测的突变以及生成环病毒基因组 cDNA 的效率低下;PCR 体系中各因素轻微变化导致 DNA 不稳定。

5 结语与展望

冠状病毒的不断变异与进化,使其作为一种潜在的高传染

和高致病性的病原体,对人类生命健康构成严重威胁,COVID-19 疫情在时刻提醒我们今后应更加重视对 CoV 和其他快速变异病毒的研究,以便在未来新毒株感染的预防和控制中快速给出相应对策。反向遗传学系统作为一种研究病毒和确定应对策略的关键工具,在 RNA 病毒相关研究工作的许多方面发挥着至关重要的作用,尤其是为那些基因组庞大且具有高致病性的冠状病毒研究提供了一个安全且又简便的平台。基于 cDNA 的冠状病毒多种反向遗传学技术的应用与开发有助于更好地了解其毒力、复制、感染、传播、抗病毒机制以及新型疫苗的开发策略,以有效应对未来可能出现的动物健康和公共卫生安全问题。

【参考文献】

- [1] Wu A, Peng Y, Huang B, et al. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China [J]. *Cell Host Microbe*, 2020, 27(3): 325-328.
- [2] Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(3): 181-192.
- [3] Chen B, Tian EK, He B, et al. Overview of lethal human coronaviruses [J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2020, 5(1).
- [4] Forni D, Cagliani R, Arrigoni F, et al. Adaptation of the endemic coronaviruses HCoV-OC43 and HCoV-229E to the human host [J]. *Virus Evolution*, 2021, 7(2).
- [5] Peiris JS, Lai ST, Poon LL, et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome [J]. *Lancet*, 2003, 361(9366): 1319-1325.
- [6] Van Der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, et al. Identification of a new human coronavirus [J]. *Nat Med*, 2004, 10(4): 368-373.
- [7] Woo PC, Lau SK, Chu CM, et al. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia [J]. *J Virol*, 2005, 79(2): 884-895.
- [8] Coleman CM, Frieman MB. Emergence of the Middle East respiratory syndrome coronavirus [J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9(9): e1003595.
- [9] Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China [J]. *Lancet*, 2020, 395(10223): 497-506.
- [10] Hotez PJ, Bottazzi ME, Corry DB. The potential role of Th17 immune responses in coronavirus immunopathology and vaccine-induced immune enhancement [J]. *Microbes Infect*, 2020, 22(4-5): 165-167.
- [11] Narayanan K, Makino S. Cooperation of an RNA packaging signal and a viral envelope protein in coronavirus RNA packaging [J]. *J Virol*, 2001, 75(19): 9059-9067.
- [12] Van Beurden SJ, Berends AJ, Kramer-Kuhl A, et al. A reverse genetics system for avian coronavirus infectious bronchitis virus based on targeted RNA recombination [J]. *Virology*, 2017, 14(1): 109.
- [13] Li C, Li Z, Zou Y, et al. Manipulation of the porcine epidemic diarrhea virus genome using targeted RNA recombination [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e69997.
- [14] Beall A, Yount B, Lin C M, et al. Characterization of a pathogenic full-length cDNA clone and transmission model for porcine epidemic diarrhea virus strain PC22A [J]. *mBio*, 2016, 7(1): e01451.
- [15] Jin YY, Lin H, Cao L, et al. A convenient and biosafe replicon with accessory genes of SARS-CoV-2 and its potential application in antiviral drug discovery [J]. *Virology*, 2021, 36(5): 913-923.
- [16] Wang B, Zhang C, Lei X, et al. Construction of non-infectious SARS-CoV-2 replicons and their application in drug evaluation [J]. *Virology*, 2021, 36(5): 890-900.
- [17] Amarilla AA, Sng JDJ, Parry R, et al. A versatile reverse genetics platform for SARS-CoV-2 and other positive-strand RNA viruses [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 3431.
- [18] Thao TTN, Labrousseau F, Ebert N, et al. In-yeast assembly of coronavirus infectious cDNA clones using a synthetic genomics pipeline [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2203: 167-184.
- [19] Fang S, Chen B, Tay FP, et al. An arginine-to-proline mutation in a domain with undefined functions within the helicase protein (Nsp13) is lethal to the coronavirus infectious bronchitis virus in cultured cells [J]. *Virology*, 2007, 358(1): 136-147.
- [20] Nagy PD, Simon AE. New insights into the mechanisms of RNA recombination [J]. *Virology*, 1997, 235(1): 1-9.
- [21] Kusters JG, Jager EJ, Niesters HG, et al. Sequence evidence for RNA recombination in field isolates of avian coronavirus infectious bronchitis virus [J]. *Vaccine*, 1990, 8(6): 605-608.
- [22] Haijema BJ, Volders H, Rottier PJ. Switching species tropism: an effective way to manipulate the feline coronavirus genome [J]. *J Virol*, 2003, 77(8): 4528-4538.
- [23] Keep S, Stevenson-Leggett P, Dowgier G, et al. A temperature-sensitive recombinant of avian coronavirus infectious bronchitis virus provides complete protection against homologous challenge [J]. *J Virol*, 2022, 96(17): e0110022.
- [24] Almazan G, Liu HN, Khorchid A, et al. Exposure of developing oligodendrocytes to cadmium causes HSP72 induction, free radical generation, reduction in glutathione levels, and cell death [J]. *Free Radic Biol Med*, 2000, 29(9): 858-869.
- [25] Balint A, Farsan G A, Zadori Z, et al. Molecular characterization of feline infectious peritonitis virus strain DF-2 and studies of the role of ORF3abc in viral cell tropism [J]. *J Virol*, 2012, 86(11): 6258-6267.
- [26] Almazan F, Dediego ML, Sola I, et al. Engineering a replication-competent, propagation-defective Middle East respiratory syndrome coronavirus as a vaccine candidate [J]. *mBio*, 2013, 4(5): e00650-00613.
- [27] Nguyen HT, Falzarano D, Gerdt V, et al. Construction of a noninfectious SARS-CoV-2 replicon for antiviral-drug testing and gene function studies [J]. *J Virol*, 2021, 95(18): e0068721.
- [28] Almazan F, Dediego ML, Galan C, et al. Construction of a severe acute respiratory syndrome coronavirus infectious cDNA clone and a replicon to study coronavirus RNA synthesis [J]. *J Virol*, 2006, 80(21): 10900-10906.
- [29] Fehr AR. Bacterial artificial chromosome-based lambda red recombination with the I-sceI homing endonuclease for genetic alteration of MERS-CoV [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2099: 53-68.
- [30] Almazan A, Tsai S, Miller PE, et al. Iridocorneal angle measurements in mammalian species: normative data by optical coherence tomography [J]. *Vet Ophthalmol*, 2013, 16(2): 163-166.

- [31] E J W. Short- and Long-Term Outcomes After Status Epilepticus [J]. *Epilepsy Curr*, 2002, 2(4): 111.
- [32] Kim UJ, Birren BW, Slepak T, et al. Construction and characterization of a human bacterial artificial chromosome library [J]. *Genomics*, 1996, 34(2): 213-218.
- [33] Wang W, Peng X, Jin Y, et al. Reverse genetics systems for SARS-CoV-2 [J]. *J Med Virol*, 2022, 94(7): 3017-3031.
- [34] Qi P, Fang L, Ding Z, et al. Rapid manipulation of the porcine epidemic diarrhea virus genome by CRISPR/Cas9 technology [J]. *J Virol Methods*, 2020, 276: 113772.
- [35] Jengarn J, Wongthida P, Wanasen N, et al. Genetic manipulation of porcine epidemic diarrhoea virus recovered from a full-length infectious cDNA clone [J]. *J Gen Virol*, 2015, 96(8): 2206-2218.
- [36] Rice CM, Grakoui A, Galler R, et al. Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by in vitro ligation [J]. *New Biol*, 1989, 1(3): 285-296.
- [37] Yount B, Curtis KM, Baric RS. Strategy for systematic assembly of large RNA and DNA genomes; transmissible gastroenteritis virus model [J]. *J Virol*, 2000, 74(22): 10600-10611.
- [38] Guo J, He Y, Wang X, et al. Stabilization of a full-length infectious cDNA clone for duck Tembusu virus by insertion of an intron [J]. *J Virol Methods*, 2020, 283: 113922.
- [39] Xie X, Lokugamage KG, Zhang X, et al. Engineering SARS-CoV-2 using a reverse genetic system [J]. *Nat Protoc*, 2021, 16(3): 1761-1784.
- [40] Becker MM, Graham RL, Donaldson EF, et al. Synthetic recombinant bat SARS-like coronavirus is infectious in cultured cells and in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(50): 19944-19949.
- [41] Scobey T, Yount BL, Sims AC, et al. Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of the Middle East respiratory syndrome coronavirus [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(40): 16157-16162.
- [42] Fahnoe U, Pham LV, Fernandez-Antunez C, et al. Versatile SARS-CoV-2 Reverse-Genetics Systems for the Study of Antiviral Resistance and Replication [J]. *Viruses*, 2022, 14(2): 172.
- [43] Yount B, Roberts RS, Lindesmith L, et al. Rewiring the severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) transcription circuit; engineering a recombination-resistant genome [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(33): 12546-12551.
- [44] Kouprina N, Larionov V. TAR cloning: Perspectives for functional genomics, biomedicine, and biotechnology [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2019, 14: 16-26.
- [45] Vashee S, Stockwell TB, Alperovich N, et al. Cloning, assembly, and modification of the primary human cytomegalovirus isolate toledo by yeast-based transformation-associated recombination [J]. *mSphere*, 2017, 2(5): e00331-17.
- [46] Zhou Y, Li C, Ren C, et al. One-step assembly of a porcine epidemic diarrhea virus infectious cDNA clone by homologous recombination in yeast; rapid manipulation of viral genome with CRISPR/Cas9 gene-editing technology [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 787739.
- [47] Kouprina N, Larionov V. Transformation-associated recombination (TAR) cloning for genomics studies and synthetic biology [J]. *Chromosoma*, 2016, 125(4): 621-632.
- [48] Casais R, Thiel V, Siddell SG, et al. Reverse genetics system for the avian coronavirus infectious bronchitis virus [J]. *J Virol*, 2001, 75(24): 12359-12369.
- [49] Zhao JZ, Xu LM, Zhang ZY, et al. Recovery of recombinant infectious hematopoietic necrosis virus strain Sn1203 using the mammalian cell line BHK-21 [J]. *J Virol Methods*, 2019, 265: 84-90.
- [50] Thiel V, Herold J, Schelle B, et al. Infectious RNA transcribed in vitro from a cDNA copy of the human coronavirus genome cloned in vaccinia virus [J]. *J Gen Virol*, 2001, 82(Pt 6): 1273-1281.
- [51] Coley SE, Lavi E, Sawicki SG, et al. Recombinant mouse hepatitis virus strain A59 from cloned, full-length cDNA replicates to high titers in vitro and is fully pathogenic in vivo [J]. *J Virol*, 2005, 79(5): 3097-3106.
- [52] Curtis KM, Yount B, Baric RS. Heterologous gene expression from transmissible gastroenteritis virus replicon particles [J]. *J Virol*, 2002, 76(3): 1422-1434.
- [53] Boyle DB, Coupar BE. A dominant selectable marker for the construction of recombinant poxviruses [J]. *Gene*, 1988, 65(1): 123-128.
- [54] Keep S, Britton P, Bickerton E. Transient dominant selection for the modification and generation of recombinant infectious bronchitis coronaviruses [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2203: 147-165.
- [55] Liu L, Cooper T, Eldi P, et al. Transient dominant host-range selection using Chinese hamster ovary cells to generate marker-free recombinant viral vectors from vaccinia virus [J]. *Biotechniques*, 2017, 62(4): 183-187.
- [56] Holzer GW, Mayrhofer J, Gritschenberger W, et al. Dominant negative selection of vaccinia virus using a thymidine kinase/thymidylate kinase fusion gene and the prodrug azidothymidine [J]. *Virology*, 2005, 337(2): 235-241.
- [57] Thiel V, Siddell SG. Reverse genetics of coronaviruses using vaccinia virus vectors [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2005, 287: 199-227.
- [58] Zhang XB, Yuan ZF, Gen JJ, et al. Bovine coronavirus nucleocapsid suppresses IFN-beta production by inhibiting RIG-I-like receptors pathway in host cells [J]. *Arch Microbiol*, 2022, 204(8): 536.
- [59] Zhao Y, Cheng J, Xu G, et al. Successful establishment of a reverse genetic system for QX-type infectious bronchitis virus and technical improvement of the rescue procedure [J]. *Virus Res*, 2019, 272: 197726.
- [60] Cockrell AS, Beall A, Yount B, et al. Efficient reverse genetic systems for rapid genetic manipulation of emergent and preemergent infectious coronaviruses [M]. *Reverse Genetics of RNA Viruses*. 2017: 59-81.
- [61] Cardenas-Garcia S, Afonso CL. Reverse genetics of newcastle disease virus [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1602: 141-158.
- [62] Edmonds J, Van Grinsven E, Prow N, et al. A novel bacterium-free method for generation of flavivirus infectious DNA by circular polymerase extension reaction allows accurate recapitulation of viral heterogeneity [J]. *J Virol*, 2013, 87(4): 2367-2372.
- [63] Piyasena TBH, Setoh YX, Hobson-Peters J, et al. Infectious DNAs derived from insect-specific flavivirus genomes enable identification of pre- and post-entry host restrictions in vertebrate cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 2940.
- [64] Torii S, Ono C, Suzuki R, et al. Establishment of a reverse genetics system for SARS-CoV-2 using circular polymerase extension reaction [J]. *Cell Rep*, 2021, 35(3): 109014.
- [65] Suzuki T, Saito A. Advances in the reverse genetics system for RNA viruses [J]. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 2022, 157(2): 134-138.