

## 人类及动物 RNA 病毒的反向遗传系统

黄耀伟\* \* 李 龙 于 涟\*

(浙江大学动物预防医学研究所, 杭州 310029)

**摘 要** 反向遗传系统可以对 RNA 病毒直接进行遗传操作, 为 RNA 病毒的分子生物学研究提供了一种强大的工具。在过去 20 年, 特别是自 90 年代中期第一例负链 RNA 病毒感染性克隆构建成功以来, 动物 RNA 病毒的分子生物学研究取得了长足的进展, 这很大程度上归功于各种动物 RNA 病毒反向遗传系统的建立。这里系统总结了人类及动物非反转录 RNA 病毒中各类代表性成员在建立反向遗传系统时的方案设计、遇到的困难及研究者如何克服这些困难。分类讨论到的代表性病毒种属有脊髓灰质炎病毒、冠状病毒(包括 SARS 病毒)、黄病毒、野田村病毒、流感病毒、传染性法氏囊病病毒以及呼肠孤病毒等。

**关键词** 人类及动物 RNA 病毒, 反向遗传, 感染性克隆, 拯救, 微基因组

**中图分类号** Q939.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)03-0311-08

RNA 病毒的反向遗传(reverse genetics)系统, 是采用病毒的遗传材料, 在培养细胞或易感宿主中重新拯救(rescue)出活病毒或类似病毒物质。能够拯救病毒的遗传材料称为感染性克隆, 一般是在细菌质粒中含有整个病毒基因组的 cDNA 拷贝, 使得 cDNA 本身或从 cDNA 体外转录所得的 RNA 具有感染性。RNA 病毒的反向遗传系统通过定向修饰病毒的基因组序列, 检测被拯救的人工改造病毒的表型, 可以在体内(in vivo)有效地研究病毒基因结构、功能和病毒-宿主相互作用。自 1978 年第一例 RNA 病毒 Q $\beta$  噬菌体的成功拯救以来<sup>[1]</sup>, 各类 RNA 病毒的分子生物学研究取得了长足的进展, 这主要归功于各种 RNA 病毒反向遗传系统的建立和发展。非反转录 RNA 病毒在其复制周期中不存在 DNA 中间体, 但对它们的操作却必须在 DNA 水平上进行, 这从某种程度上加大了其研究难度。其中, 建立动物(包括人类)RNA 病毒的反向遗传系统比植物 RNA 病毒要困难得多<sup>[2]</sup>, 原因在于后者的基因组较小, 并且复制效率高, 取材容易。事实上直到 90 年代中期, 动物负链 RNA 病毒的拯救才取得根本意义上的突破<sup>[3]</sup>。目前, 危害人、畜最烈的病毒许多都是 RNA 病毒。由于新的病毒性传染病(如 SARS 等)不断出现, 利用反向遗传学方法开展病毒的功能基因组学研究, 对有效防治病毒至关重要。

RNA 病毒的反向遗传系统实质上就是利用感染性克隆模拟真实病毒粒子感染宿主, 并复制、传代的过程。由于动物 RNA 病毒的种类繁多(正链、负链、双链、分节段、不分节

段), 其复制的分子机制差异较大, 早期的拯救策略对于结构复杂的病毒如流感病毒、呼肠孤病毒难以奏效。本文将详细综述各类代表性动物(包括人类)RNA 病毒反向遗传系统的最新进展。

### 1 RNA 病毒反向遗传系统的构建原则和各类表达体系

目前, 对不同的 RNA 病毒反向遗传系统的构建没有固定的程序, 但有基本的构建原则。

一般来说, 对长度较小(15kb 以下)的正链 RNA 病毒, 可以先通过 RT-PCR 扩增出病毒 cDNA, 再拼接成全长, 然后体外转录获得 cRNA, 直接转染 cRNA 进入细胞或易感动物拯救出活病毒。

对于负链 RNA 病毒、基因组长度较大的正链 RNA 病毒如冠状病毒, 一般遵循以下“三步流程”：第一, 获得一些在体外细胞培养系统中自然产生的亚基因组 RNA 成分(sub-genomic RNAs, sgRNAs)或 DI RNAs(缺损干扰 RNAs), 分析与病毒合成有关的位于病毒基因组上的顺式作用元件。对负链 RNA 病毒来说, 还需要得到负责病毒复制的必要反式作用蛋白基因。第二, 保留病毒基因组上的顺式作用元件和调控区(一般为病毒基因组两端的非编码区, NCR), 而病毒基因组的部分基因编码区则由报告基因( $\beta$ -gal, SEAP, CAT, GFP 等)代替, 构建人工的 sgRNAs(或称 minigenome, replicon), 在外源性表达体系驱动下转染细胞, 通过检测报告基因的表达

收稿日期 2003-10-08, 修回日期 2004-01-13。

基金项目 浙江省重点科技项目基金资助(No.2003C22002)。

\* 通讯作者。Tel: 86-571-86971894; Fax: 86-571-86971894; E-mail: yulian@zju.edu.cn

\* \* 现在美国 Virginia Polytechnic Institute and State University 工作, E-mail: yhuang@vt.edu

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

而优化条件。这一步的目的是检验病毒拯救的可行性。第三,用病毒全长基因组 cDNA(即构建感染性克隆)取代人工 sgRNAs,按第二步建立的实验条件实现病毒的遗传拯救。

一般地,在感染性克隆中引入沉默突变,即改变几个不影响表型的核苷酸使之区别于原有的野生型病毒序列,这称为遗传标记(genetic tags),使得在检测子代病毒时有充分的证据表明确实是病毒获得拯救而不是受到野生病毒的污染。

转染进细胞的病毒感染性克隆(cRNA 或含病毒全长基因组的质粒 DNA)一开始需要外源表达体系启动病毒复制必要成分(包括病毒的 RNA 模板和病毒 RNA 聚合酶)的产生;进而新合成的病毒 RNA 聚合酶识别病毒 RNA 模板,复制子代病毒基因组和翻译病毒结构蛋白,组装为病毒颗粒,进入病毒本身的复制循环,实现病毒的拯救。早期报道对 Q $\beta$  噬菌体<sup>[1]</sup>、脊髓灰质炎病毒<sup>[4]</sup>和植物类病毒(viroid)的拯救只需直接转染病毒基因组 cDNA 即可,此时“外源表达体系”是细胞自身的 RNA 聚合酶 II,它们可以识别病毒基因组上的信号序列。但这一方法不能推广到其它绝大部分 RNA 病毒特别是动物 RNA 病毒上,随后,几种独特的外源表达系统相继产生。

### 1.1 体外转录

开始,Ahlquist 等转染雀麦花叶病毒(BMV)基因组 cDNA 没有感染性。随之改变策略,先以病毒 cDNA 为模板体外转录产生 RNA,再用体外转录产物接种植物,结果获得成功<sup>[5]</sup>。稍后人鼻病毒(rhinovirus)以同样方法获得拯救,证实它完全适用于动物 RNA 病毒。以体外转录 RNA 转染来产生感染性病毒理论上可避免与 DNA 转染相关的 RNA 体内转录、RNA 拼接、核质穿梭等问题,使得病毒的拯救效率大大提高,这种方案随后广泛应用于各类 RNA 病毒的拯救,特别是基因组长度小于 15kb 的正链 RNA 病毒。而且,对于不能在体外培养细胞中复制传代的病毒的拯救,体外转录感染宿主动物是唯一可行的方法(如丙型肝炎病毒 HCV、戊型肝炎病毒 HEV 等)。

体外转录物的长度应与真实病毒基因组 RNA 的长度接近,在 5'或 3'端多出非病毒核苷酸对病毒的拯救成败或效率有重要影响。一般来说,5'端延伸极大地降低感染力,而 3'端延伸则易于容忍。造成 5'端延伸的原因是:在 PCR 扩增病毒 5'端 cDNA 序列时,5'引物前面连上 T7 启动子,使其融合到病毒序列的 5'端,所得的病毒 cDNA 再插入载体中。启动子和病毒 cDNA 之间通常插入 1~2 个 G,形成最适的启动子一致序列,以增强转录效率,这使 5'延伸似乎无法避免。对于转录物的 3'端,终止位置常取决于体外转录前的单酶切位点,但可以通过插入有自我剪切能力的核酶序列(如 HDV 的  $\delta$  核酶)来避免病毒 RNA 的 3'端延伸。

根据现有报道,帽子结构( $m^7GpppG$ )对病毒 RNA 转录物有最适感染力是必要的,可能由于它能有效起始 RNA 的翻译和抵抗宿主细胞核酸酶,从而增加了转录物的稳定性。另外,许多 RNA 病毒在其基因组 5'端常带有病毒基因组连接蛋白(VP<sub>g</sub>)而不是帽子结构,体外转录物的加帽可模拟 VP<sub>g</sub>,

在一定程度上部分或全部补偿 VP<sub>g</sub> 的损失。

与基于 DNA 转染的系统相比,体外转录法最大的缺点是病毒拯救效率低。原因是 T7 RNA 聚合酶的低保真转录造成转录群体差异。结果,由于转录产物中存在着不完整的缺陷病毒拷贝和全长转录物的竞争,使得被拯救病毒感染力较低甚至不产生感染性克隆。

### 1.2 RNA 聚合酶 II(RNA pol II)表达系统

即早期采用的基本方案:转染重组 DNA 质粒,直接使用真核生物 RNA pol II 启动子去驱动病毒 cDNA 转录。尽管操作简单,生物安全要求不高,但由于低效率和没有普适性,仅适用于基因组长度较短的正链 RNA 病毒如脊髓灰质炎病毒、野田村病毒、甲病毒等。近年来,该系统一般与其它系统联合使用,如下面提到的 RNA pol I 系统、甲病毒载体等。启动子一般选用 CMV 启动子,另外还有 SV40 启动子、肌动蛋白基因启动子等,它们都可被真核生物 RNA pol II 识别的。

### 1.3 痘苗病毒/T7 RNA 聚合酶(VV/T7)系统及基于 T7 RNA 聚合酶的替代系统

VV/T7 系统是目前应用在动物负链 RNA 病毒拯救上最广泛的表达系统。与真核细胞 RNA 聚合酶 II 相比,噬菌体 T7 RNA 聚合酶(T7 pol)可以提高外源基因表达特异性和表达量。当用重组 T7 pol 痘苗病毒(VV/T7)和由 T7 启动子驱动的重组质粒先后转染细胞,VV/T7 先在细胞内表达 T7 pol,再由 T7 pol 去转录插入 T7 启动子的外源病毒基因组(或反基因组,需要时还要求共转染含病毒反式作用蛋白基因的重组质粒),可以实现病毒的高效拯救<sup>[3,6]</sup>。实验表明该系统的基因表达量 400~600 倍于由 RNA pol II 启动子驱动的重组质粒。

VV/T7 系统的序列设计原则与体外转录法类似,如为维持病毒基因组长度的精确性,在 3'端通常加上一个 HDV  $\delta$  核酶,使病毒 mRNA 在细胞内转录时自动切除 3'端下游的非病毒序列。

但 VV/T7 系统也有局限性:首先,VV 的复制可能干扰被拯救病毒的产生。VV 在感染时产生细胞病变效应(CPE),最终会杀死细胞,因此外源基因表达并非一个连续过程,很可能外源病毒未被拯救,负载的细胞已经破裂;其次,对于在细胞核内复制的病毒,VV/T7 系统无能为力。许多学者寻求基于 T7 pol,但更为安全的替代系统。例如(1)FPV/T7 系统<sup>[7]</sup> FPV 即禽痘病毒,它只能在禽类及其衍生细胞中复制,可感染哺乳动物细胞但不能传代和产生子代病毒,因此,一般也不产生 CPE,其生物安全及控制要求远小于 VV;FPV 复制周期长,使得合成外源产物的时间延长。(2)MVA/T7 系统:MVA 是一种源自 Ankara 的复制缺陷型、有严格宿主范围限制的 VV,其特点与 FPV 类似,感染细胞后不能产生子代病毒颗粒,仅作为表达 T7 pol 的载体。(3)杆状病毒/T7(Bac/T7)系统<sup>[8]</sup> 与上述的 FPV/T7、MVA/T7 系统类似,载体病毒本身并不能在哺乳动物细胞复制,但可以进行瞬时表达。Bac/T7 更为优越的地方在于即使在高 MOI 感染下,都不出现 CPE,并且细胞没有显著的形态学改变,生长正常,但其缺

点是表达水平不如 VV/T7 系统(用该系统拯救的 poliovirus 滴度甚至低于 1982 年 poliovirus 首次被拯救时的“原始方案”),并且杆状病毒的嗜细胞性差别很大,对肝细胞更为易感,这限制了 Bac/T7 系统的进一步应用。(4)甲病毒/T7 系统:Agapov 等报道<sup>[9]</sup>,非致病型辛德毕斯病毒(SIN)载体可以顺利表达 T7 pol,进而拯救出 Mengo 病毒。非致病型 SIN 是为了克服普通 SIN 载体在复制时带来 CPE 而发展起来。这类甲病毒无毒力,已证实可与黄热病毒(YF)、MV、小 RNA 病毒相容,因此在此基础上建立的甲病毒/T7 系统预料会得到广泛应用。该系统与 VV/T7 相比,表达量仍略少,但其非特异性蛋白背景要低。(5)构建直接表达 T7 pol 的细胞系,使得往此细胞系转染含病毒基因组的重组 DNA 就可以拯救出病毒,但效率较低。

以上 5 种,其共同点都是用某种表达系统取代 VV 去表达 T7 pol,使得转染了 DNA 的细胞减少甚至杜绝 CPE 的产生,从而保证所要拯救的病毒能顺利产生。

#### 1.4 RNA 聚合酶 I (RNA pol I) 表达系统

该系统是在构建流感病毒感染性克隆中发展起来的。在真核细胞中, RNA pol I 负责 rRNA 的转录,其特点是:高效转录、转录场所在细胞核、转录产物有精确的 5'端和 3'端、没有加帽和带上 poly A 尾巴的后加工过程。这对在细胞核中复制的病毒拯救尤为重要。转染含有反义插入的报告基因 CAT 的嵌合流感病毒节段(即病毒编码区被 CAT 取代,两端 NCR 保留,两边再加上 RNA pol I 启动子和终止子)和感染辅助流感病毒,可以拯救出含有 CAT 节段的嵌合流感病毒。基于该系统的流感病毒感染性全长 cDNA 克隆于 1999 年构建成功<sup>[10]</sup>。最近,该系统又用于拯救乌库病毒(UUKV,布尼亚病毒科)<sup>[11]</sup>和博尔纳(BDV)<sup>[12]</sup>的 minigenome。

## 2 正链 RNA 病毒反向遗传系统

#### 2.1 脊髓灰质炎病毒(poliovirus)无细胞体系的从头合成

poliovirus 属于小 RNA 病毒科(Picornaviridae),在病毒反向遗传学研究上一直扮演着“创新者”的角色。第一例动物 RNA 病毒的拯救就是 poliovirus,接着多个实验室通过各种改进系统优化病毒的拯救条件,通过定点突变阐明 Sabin 活疫苗致弱的遗传机制;通过构建嵌合的感染性克隆(chimeric clones)研究病毒非编码区的功能等等,对其它 RNA 病毒的拯救和反向遗传学都有着示例性的作用。最近,在无细胞体系中成功地从头合成 poliovirus,再次更新了人们对传统病毒拯救系统的认识,并在科学界内外引起了广泛争议。

早于 1991 年,人们就发现, poliovirus 在无细胞体系中有病毒颗粒的自发组装行为。在未感染 poliovirus 的 HeLa 细胞抽提物可以有效翻译病毒 RNA,蛋白产物再加入病毒基因组体外转录的 RNA 能自动组装为可复制的病毒粒子,最后拯救出 poliovirus。进一步设想,如果把 poliovirus 视作化学式为  $C_{332}H_{492}O_{388}N_{98}S_{235}O_{131}P_7S_{240}$  的化学超分子,则从头合成这种超分子无疑是对生命本质认识的一项突破,使得人们对病毒的生、遗传特性、复制机制研究可越过细胞膜屏障,直

接在试管中进行。

这一猜想于 2002 年得到验证<sup>[13]</sup>。首先在试剂公司订购了平均长度为 69nt 的寡聚核苷酸(代表 poliovirus 基因组 cDNA 全长),再装配成一些 400~600bp 的更大的 DNA 片段,然后这些片段再通过重叠部分连成代表 poliovirus 基因组的三个 cDNA 克隆(其中之一含 T7 pol),最后组装为 poliovirus 全长 cDNA,并在试管中拯救了 poliovirus。两只小白鼠被注射这种人造病毒以后,出现了类似小儿麻痹症的症状。这是历史上不通过病毒材料,凭借数据库上的基因组信息从商业公司订购 DNA 片段,首次完全依靠化学途径合成病毒,具有里程碑式的意义。然而结果发表后,许多人担心这会被恐怖分子利用,在实验室制造其它致命病毒,并廉价生产生物武器。这提醒人们必须重视病毒遗传拯救的负面影响和生物安全性。

#### 2.2 冠状病毒 最长 RNA 病毒基因组

冠状病毒是目前已知最大基因组长度的 RNA 病毒(27~32kb),也被认为是最难拯救的正链 RNA 病毒。冠状病毒共分三个组别:I 组包括猪传染性胃肠炎病毒(TGEV),人冠状病毒(HCoV-229E);II 组包括小鼠肝炎病毒(MHV),III 组包括禽传染性支气管炎病毒(IBV)。这 4 种动物 RNA 病毒都是目前研究冠状病毒反向遗传的模式病毒。在全长 cDNA 感染性克隆获得之前,构建冠状病毒反向遗传系统的策略主要是以 MHV 为模型的定向重组方法。2000 年,第 1 例 TGEV 的全长 cDNA 感染性克隆构建成功<sup>[14]</sup>,使得近两三年来冠状病毒反向遗传学成为研究热点。此外,这也意味着其它长度的 RNA 病毒在理论上都可以得到拯救。

实现冠状病毒拯救的难点在于其基因组片段太大,常规的基因工程质粒不能容纳,需要另找替代载体,此外还存在“不稳定克隆”问题。Almazan 等采用细菌人工染色体(BAC)来装载全长 TGEV cDNA<sup>[14]</sup>,接着,Yount 等尝试分段克隆,并在体外拼接 TGEV 全长,直接体外转录产生 RNA,用 RNA 转染细胞拯救病毒,其优点是简便、直接,避免了不稳定克隆的出现,他们还发现共转染表达 TGEV N 基因的质粒可提高 rTGEV 的感染力,提示 N 基因有反式激活作用<sup>[15]</sup>。Thiel 等在首次拯救 HCoV-229E 时用了新的克隆策略,直接把 HCoV cDNA 克隆到痘苗病毒载体上,然后再提取感染细胞的重组 VV 基因组 DNA 进行体外转录,获得感染性 HCoV<sup>[16]</sup>,稍后,Thiel 等在此基础上引入了表达 T7 pol 的 FPV,与含 IBV 全长 cDNA 的重组 VV 共转染细胞,直接在体内拯救出 IBV<sup>[17]</sup>,IBV 的拯救也需要 N 基因反式激活。2002 年底,Yount 等继 TGEV 后用类似的方案拯救了 MHV,这里 N 基因仍可增强 MHV 拯救效率<sup>[18]</sup>。至此,三个组别的 4 种冠状病毒的感染性克隆均已获得。

SARS 冠状病毒起初认为不属于已知的三个组别,但最近有学者认为源自第 II 组<sup>[19]</sup>。在 SARS 病毒 Urbani 株全序列发表后<sup>[20]</sup>,Yount 等仅用 2 个月时间拯救出源自该毒株的含有遗传标记的人工 SARS 病毒<sup>[21]</sup>。重组的活病毒与野生型毒株复制效率相当,都可以被一种蛋白酶抑制剂所抑制。

SARS 病毒反向遗传系统的建立对病毒致病的分子机制探索、疫苗设计和药物治疗有重要意义,并可能为彻底阐明 SARS 冠状病毒的起源提供一种“病毒重建”的方法。

### 2.2.3 黄病毒:不稳定克隆和准种特性

80 年代大量的正链 RNA 病毒不断拯救出来,然而在黄病毒科成员上却屡屡碰壁,原因是这些病毒的基因组 cDNA 亚克隆存在不稳定性,使得病毒感染性克隆不能成功构建。该问题同时存在于冠状病毒。

所谓“不稳定克隆”指病毒基因组 cDNA 全长或部分克隆在大肠杆菌中倾向于自发重排,接入外源序列,缺失核苷酸和发生点突变,变异部位严重影响了原来病毒的复制、转录。造成不稳定克隆的原因有多方面,其机制至今未完全明确,原因之一是表达的病毒基因产物对大肠杆菌有毒性,结果不是载有克隆的细菌死亡就是病毒克隆为了存活而产生适应性突变,造成“*E. coli* 偏好性选择”(bias selection)。

为克服不稳定克隆问题,病毒学家陆续提出多种解决方案。

(1) 体外拼接/转录法:体外扩增病毒基因组,拼接为全长后,不经过 *E. coli* 培养而直接体外转录,所得 RNA 转染细胞从而拯救病毒。显然,这避开了 *E. coli* 培养环节。这是随着长距离 RT-PCR 产生而发展起来的方案,早期的黄热病毒(YF)、日本脑炎病毒(JE)和登革 2 型病毒(DEN2)就是这样获救的。冠状病毒 MHV<sup>[18]</sup>、TGEV<sup>[15]</sup>等也通过这种方法获得感染性克隆。

(2) 选用适当的克隆载体:选用低拷贝数的 *E. coli* 载体可以得到可接受稳定性的克隆。这些载体包括 BAC 和 pBR322;另外还需要选择合适宿主菌。目前普遍使用 pBR322 和 *E. coli* HB101 菌株。DEN4<sup>[22]</sup>和库宁病毒(Kunjin virus)即使用这种克隆方案。最近,肆虐美国的西尼罗 I、II 型病毒(WNV)<sup>[23]</sup>也通过这种方法获得相对稳定的感染性克隆。这种以牺牲高产量 DNA 为代价的重组质粒称为“中性稳定(metastable)克隆”。另外,由于在 *E. coli* 中不稳定的 DNA 序列通常在真核系统中是稳定的,有人用酵母载体来克隆 DEN2 基因组并拯救,前面提到以 VV 为载体容纳冠状病毒 HCoV 和 IBV,既可满足大片外源基因(组)插入,又能解决不稳定克隆问题。

(3) 插入内含子法:真核生物在 RNA 后加工时要进行 RNA 拼接,删除初始转录 mRNA 的内含子,所以如果在病毒 cDNA 特定部位引入内含子,可能会避免 *E. coli* 克隆的不稳定性,而内含子在真核细胞表达时又被切除,产生与病毒原来序列相同的 RNA。该方案由 Yamshchikov 等提出,并在 JE 拯救中取得成功<sup>[24]</sup>。TGEV 的拯救后来也采用这种策略提高效率。

(4) 最小启动子法:通过抑制病毒蛋白的表达而避免不稳定克隆可以直接在转录水平上进行。在原核生物中,增强子丧失了真核生物中特有的位置效应,如果把增强子转移,则病毒基因在细菌的转录活性极低,使有毒产物的表达水平降至最少,从而可以有相当稳定的克隆。模式病毒仍是 JE,

只须把 CMV 增强子重置于病毒全长 cDNA 的下游,则可产生稳定的感染性克隆<sup>[25]</sup>。

黄病毒科的丙肝病毒(HCV)是更为极端的例子。除了不稳定克隆外,HCV 存在准种特性(quasi-species,即 HCV 病毒以极快的速度进化或变异,使得在某个病人体内的存在形式是由一群相近的但有差别的 HCV 突变体组成),这样,用 RT-PCR 扩增出来的病毒 cDNA 需要比较多个独立扩增子序列而确定其一致序列,否则不能反映可存活病毒的真实基因组。由于 HCV 本身在血液中含量极低,对于指定的血样,独立的 RT-PCR 也很难进行多次,而且 HCV 没有体外细胞培养系统,这使得 HCV 从基因组克隆、cDNA 一致序列确定和感染性克隆构建都要比其它黄病毒困难。两个小组几乎同时报道了 HCV 的拯救<sup>[26,27]</sup>。他们都要费力地通过定点突变修改 HCV 全长 cDNA 上与一致序列不同的点突变,同时又要避免不稳定克隆,最后获得的感染性克隆(对黑猩猩致病)已经过多次修饰。

### 2.4 野田村病毒:病毒-宿主相互作用

病毒作为生物宿主的寄生物,不能脱离宿主系统而单独存在。必须借助宿主编码产物的帮助。分离并鉴定这些被“借用”的蛋白,对于认识病毒-宿主相互作用十分重要。在研究这种相互作用时并没有系统的研究方法,直接纯化与病毒复制有关的蛋白在技术难度上很大。为了能够有系统地高效研究这些相互作用,必需寻求可受控背景的宿主系统。酿酒酵母遗传背景清晰,在遗传方法学上已经成熟,并且其全基因组已经测出,如果直接把感染高等生物的病毒引入酵母宿主中加以研究,则分离鉴定宿主基因的进程会大大加快(只需通过数据库搜索高等生物与酵母相关基因的同源物即可)。

Alquist 等把野田村病毒科成员 Flock house virus(FHV)引入酿酒酵母。开始,先转染 FHV 基因组双节段(RNA1、RNA2)的体外转录 RNA,结果产生了 FHV 病毒粒子,并且这种 FHV 可在酵母中持续复制。如果用报告基因替换 RNA2 的编码区,可以使这种 FHV-酵母系统获得筛选标志<sup>[28]</sup>。接着,发展到通过引入诱导型表达载体来启动 FHV RNA1 的复制,大幅提高表达水平。进一步,含有报告基因的 RNA2 重组复制子通过转染 DNA 穿梭载体而获得,并且报告基因作为筛选标志,其表达绝对依赖于 RNA1 的复制,这样 FHV 酵母复制系统完全可以受控<sup>[29]</sup>,有利于进一步分离宿主基因和鉴定与 FHV 复制相关的病毒自身的顺式作用元件。

FHV-酵母复制系统的例子具有重要的研究意义,尽管其它高等动物 RNA 病毒不一定也能感染酵母,但随着多种模式生物(果蝇、小鼠、人)的全基因组序列的确定,以及基因敲除、转基因技术的日益成熟,在更为复杂的宿主背景下研究病毒-宿主相互作用在将来可望达到。

## 3 负链 RNA 病毒反向遗传系统

负链 RNA 病毒分两大类(分节段或不分节段)共 7 科,其中,分节段病毒包括正粘病毒科(6 个)、布尼亚病毒科(3 个)、

节段)沙粒病毒(双节段),不分节段病毒包括弹状病毒、丝状病毒、副粘病毒和博尔纳病毒。正粘病毒科和博尔纳病毒科成员在细胞核中复制,而其它 5 科病毒在细胞质中复制。负链 RNA 病毒成员中许多是危害人类和动物的致命病毒,如埃博拉病毒、流感病毒、呼吸道合胞病毒、新城疫病毒等。由于负链 RNA 病毒在病毒粒子结构上的特殊性,其反向遗传学研究长期滞后于正链 RNA 病毒,一直到 90 年代中期才取得突破<sup>[3]</sup>。目前,7 科病毒的代表成员已经构建了感染性克隆或微基因组(minigenome),为研究及防治这些病毒提供了强大的分子工具。

### 3.1 流感病毒(正粘病毒):负链 RNA 病毒遗传拯救的发展见证

流感病毒属于正粘病毒科,有 8 个节段。与其它负链 RNA 病毒的结构类似,其基因组节段与相应的病毒结合组成核糖核蛋白(RNPs)复合体。RNPs 作为病毒基因组复制和转录的“工厂”,一般情况下其中的病毒蛋白与基因组 RNA 紧密结合,这也是单独转染病毒 RNA 或 cDNA 不能拯救负链 RNA 病毒的关键原因。

因此,为实现流感病毒包括其它负链 RNA 病毒的拯救,必须对 RNPs 进行重建。另一方面,由于流感病毒在细胞核复制,其 RNPs 的成分 NP、PB1、PB2 和 PA 蛋白在细胞质翻译后都要运送到核内与病毒 RNAs 装配,还需要创建特有的表达系统以构建感染性克隆,这就是前面已提及的 RNA pol I 系统。

1989 年 Luytjes 等首先用辅助病毒法拯救出含有报告基因的嵌合流感病毒<sup>[30]</sup>,Enami 等进一步对流感病毒 NA 基因进行了定点突变,也通过辅助病毒法拯救了含突变的流感病毒,这是第一例对负链 RNA 病毒进行反向遗传操作,但不是真正意义上的构建病毒全长感染性克隆<sup>[31]</sup>。经过近 10 年的努力,Neumann 等率先完成这项工作<sup>[10]</sup>。Neuman 的拯救系统要求并不复杂,仅用到 DNA 克隆、质粒纯化和 DNA 转染技术。总共要转染 12 个质粒,其中 8 个是 RNA pol I 系统驱动的,各编码 8 个流感病毒基因组 RNA 节段;另外 4 个由 RNA pol II 系统驱动,分别编码 NP、PB1、PB2、PB 基因,预期在细胞内表达的产物可体内重建 RNPs。结果,大约 1000 个细胞中有一个能产生感染性病毒( $8 \times 10^7$  个病毒/mL)。为进一步提高转染效率,尽量减少共转染质粒的数量十分必要。Hoffmann 等构建了一种“双义”编码方法,即先在 CMV 启动子和 polyA 信号间正向插入病毒基因组 cDNA,然后在两端反向加入 RNA pol I 启动子和终止子。这样,一种质粒可在表达病毒蛋白的同时大量转录病毒负链 RNA,共需 8 种质粒转染细胞即可。该系统产生子代病毒的效率与 Neumann 的方法相当,被称为 RNA pol I / II 系统<sup>[32]</sup>。

流感病毒反向遗传学研究由此得到长足的进展。除了阐明病毒基因和非编码区的功能外,对研究病毒的致病机制、发展疫苗和构建流感病毒载体也起着关键的作用。最突出的例子是对 1997 年香港爆发的禽流感致人类疾病事件在分子生物学上作出初步解答<sup>[33]</sup>。日本学者采用 Neumann 建

立的系统重现了香港禽流感病毒 H5N1 株致病过程,发现 PB2 蛋白在 627 位 aa 上的突变使 H5N1 病毒可以感染人体,而 HA 蛋白的高效剪切能力就是对哺乳动物致命的直接原因。

### 3.2 其它分节段负链 RNA 病毒:双义编码

1996 年布尼亚病毒科原型株布尼奥罗病毒(Bunyamwera BUN,三节段)全长感染性克隆构建成功<sup>[7]</sup>。尽管病毒由 VV/T7 系统驱动并可以获救,但效率极低。直到现在,也只有 BUN 获得全长感染性克隆,其它布尼亚病毒如裂谷热病毒(RVSV)和乌库病毒(UUKV)都只是构建了 minigenome<sup>[11]</sup>。

UUKV 和 RVSV 属于布尼亚病毒科的白蛉属,这一病毒属与沙粒病毒科有一个共同的特征是基因组有 1~2 个节段(前者:只有 S 节段;后者:双节段都是)是双义编码(ambisense)的,即这些节段既可正向编码,又可反向编码。以前人们认为这对构建这类病毒的感染性克隆是一个难点,因为外源表达系统不能双向启动。而在 UUKV 的例子中,S 节段反基因组编码的非结构蛋白 NS5 对 minigenome 的拯救并不需要。

最近沙粒病毒科原型病毒——淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)的 minigenome 构建成功<sup>[34]</sup>。LCMV 基因组的特殊性在于其双节段都是双义编码,任一节段上、下游的编码区(不同方向转录)之间隔着一个基因间区域(intergenic region, IGR)。把报告基因 CAT 反向置换 S 节段的 3' 端编码区,而 5' 端编码区删除,仅保留 IGR 和两端 NCR,用 VV/T7 系统表达 LCMV NP、L 蛋白及重组 CAT-S 节段,可检测到高效 CAT 活性、亚基因组 CAT mRNA 和相应的反义 RNA。接着,换用 RNA pol II 系统驱动 LCMV minigenome,同样证实病毒顺式作用元件包括了 IGR,而 NP、L 蛋白为必需的反式作用因子。

### 3.3 不分节段负链(NNS)RNA 病毒:反基因组编码策略

开始,流感病毒体外重建 RNPs 再转染细胞的拯救策略对 NNS RNA 病毒并不成功,这可能由于 NNS RNA 病毒的基因组长度一般超过 11kb,使得 RNPs 重建的技术难度加大。直接构建感染性克隆也长期未有突破。Schnell 等发现了关键所在。他们用 VV/T7 系统表达狂犬病毒(RV)基因组和 N、P、L 蛋白(这三种蛋白构成 vRNPs),开始的实验并不理想,20 次实验只有 2 次产生感染性病毒。当改变策略——表达反基因组(正义)而不是基因组 RNA(反义)时,意外地取得了成功<sup>[3]</sup>。这是第一篇负链 RNA 病毒完全从全长 cDNA 克隆中拯救出来的报道。

使用编码病毒反基因组(正义)的质粒去构建感染性克隆后来广泛应用到其它 NNS 病毒上。成功的原因可能是转录产生的正义全长 RNA 与提供反式作用因子的 mRNA 之间不会形成杂交,否则一旦形成杂交,可能会干扰 vRNPs 复合体的形成或介导由于干扰素诱发的病毒抑制效应,从而难以拯救病毒。然而,后来对仙台病毒和人副流感 3 型病毒(均为副粘病毒科)的拯救可以使用负义的基因组(尽管拯救效率低于使用正义的)。最近,埃博拉病毒也可用编码基因组的

DNA 片段拯救<sup>[35]</sup>。这一“反基因组编码规则”对流感病毒同样不适用,这似乎表明“杂交”的解释并不足够。

第一种副粘病毒感染性克隆是麻疹病毒(MV)<sup>[36]</sup>。之后,大量的副粘病毒被拯救出来,这可能是负链 RNA 病毒被拯救的成员数目最多的一科。

### 3.4 负责负链 RNA 病毒拯救的反式作用蛋白比较

综合所有报道,比较用于拯救负链 RNA 病毒的各种反式作用蛋白,发现病毒 RdRp(L 蛋白)、核蛋白 N 和磷蛋白 P 对弹状病毒科、副粘病毒科、博尔纳病毒科的拯救是必需的;对丝状病毒科(埃博拉病毒),除 L、NP、VP30 与 P 蛋白功能等价蛋白外,还需要 VP30 蛋白;对布尼亚病毒科和沙粒病毒科,只需 L 和 NP 两种蛋白即可维持其 minigenome;流感病毒需要 N 蛋白和 RdRp 的三个亚基 PB1、PB2、PA 蛋白。

反式作用蛋白之间的比例对病毒拯救也很重要。例如,拯救博尔纳病毒(BDV) minigenome 需要精确的 N:P 比例,而 L:P 比例并非关键<sup>[12]</sup>。有时一些病毒蛋白有反作用,如 LC-MV 的一种含有锌指结构的 Z 蛋白、BDV 的 p10 蛋白对各自的 minigenome 转录和复制起强烈抑制作用<sup>[12,37]</sup>。

## 4 双链 RNA 病毒反向遗传系统

在所有双链 RNA 病毒中,反向遗传学研究技术最为成熟的是噬菌体  $\Phi$ (囊状病毒科),但其研究模式不能套用在其它两类动物病毒上。对于双 RNA 病毒科(Birnaviridae),其拯救方法类似于正链 RNA 病毒,而呼肠孤病毒科目前还没有感染性克隆。

### 4.1 传染性法氏囊病病毒

鸡传染性法氏囊病病毒(IBDV)是世界范围内危害养鸡业最严重的几种病毒之一,属于双 RNA 病毒科,其特征是基因组具有双节段,每节段都是双链 RNA。IBDV 的大节段(A 节段)上两个相互重叠的阅读框(ORF)分别编码非结构蛋白 VP5(上游 ORF)和多聚蛋白 VP2-4-3(下游 ORF),较短的 B 节段编码病毒的依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶(RdRp)基因。IBDV 是第一种获得感染性克隆的动物双链 RNA 病毒,当时是用体外转录法拯救的<sup>[38]</sup>。该系统的建立随后极大地促进了 IBDV 分子生物学的基础研究。

考虑到 IBDV 的双节段基因组长度较短,分别为 3.2kb 和 2.8kb,采用 RNA pol II 系统应该适用于病毒拯救,并且操作相对简易。另外,本实验室此前对 IBDV DNA 疫苗的影响因素作了系统研究,发现 pCI 载体比 pcDNA3 载体效果要好<sup>[39]</sup>,往 Vero 细胞单独转染以 pCI 质粒为骨架的 IBDV A 节段可以检测到病毒 RNA 和特异性病毒蛋白的表达。最近,我们以 pCI 载体为骨架构建 IBDV 感染性克隆,并在 IBDV 双节段 cDNA 重组子上引入沉默突变的遗传标记,转染 Vero 细胞后拯救出人工 IBDV<sup>[40]</sup>。

在 IBDV 反向遗传系统的基础上可以进一步发展减毒活疫苗或基因缺失疫苗。研究发现 IBDV VP5 基因的沉默不影响病毒复制,甚至使弱毒株丧失毒力<sup>[41]</sup>。目前我们正以靶向缺失 VP5 基因为目标开发新一代抗 IBDV 疫苗。

### 4.2 呼肠孤病毒(Reovirus)

呼肠孤病毒粒子由多层壳蛋白组成。最内层的核心颗粒(core)包裹着由 10~12 个 dsRNA 节段组成的基因组,结构比负链 RNA 病毒的 RNPs 还要复杂。构建 Reovirus 感染性克隆难点也在于病毒核心颗粒结构复杂,基因组节段比流感病毒还要多,并存在独有的基因组节段(genomic segments,gs)特异性重分配,即 Reovirus 基因组中某些节段比其它节段更倾向于排斥(或接受)外来的同源基因节段,这对进行 Reovirus 的反向遗传操作十分不利,因为很难在其基因组中引入外源或被修饰的遗传信息。

1990 年,Roner 等构建了一个 Reovirus 感染性 RNA 系统<sup>[42]</sup>。该系统与用体外重建 RNPs 转染细胞再感染辅助病毒拯救流感病毒极为相似。所需的材料除了 10 种 gs 的 ssRNA 外,还需要辅助病毒,以提供必要的反式作用蛋白。经过 11 年的努力,Roner 最近又前进了一步:构建可以表达 CAT 的 Reovirus 反向遗传系统<sup>[43]</sup>。这一步能实现得益于一项技术改进,即可以除去 10 个 gs 中的任一特定 gs,这对构建无选择性表型的人工突变 Reovirus 必不可少。此外,还需要任一 gs 的 cDNA 克隆,在 DNA 水平上进行人工突变、缺失和插入等反向遗传操作,用以取代被除去的对应 gs RNA。由于被除去的 gs 上有病毒编码产物可能作为病毒复制和装配必需的反式作用因子,因此,在被转染的细胞中还需要补偿性地提供这种蛋白,这通过构建表达该蛋白的转化细胞系获得。

对 Reovirus 重配的分子机制进一步阐明将为构建不依赖辅助病毒的全长 Reovirus 感染性克隆打下基础。由于 Reovirus 病毒粒子结构的复杂性,最终实现这一目标仍是任务艰巨,这应该是实现动物 RNA 病毒反向遗传系统全部建立的最后挑战了。

## 5 展望

各类动物(包括人类)非反转录 RNA 病毒反向遗传系统的建立不仅大大促进其分子生物学研究进程,而且具有巨大的应用价值,例如在此基础上衍生的反向疫苗学,以及通过构建 RNA 病毒载体作为新型疫苗或进行基因治疗。甲病毒载体是其中最具有发展前景的<sup>[9]</sup>。

展望将来:

(1)随着拯救技术的发展成熟,反向遗传系统在 RNA 病毒功能基因组研究上将担当无可替代的作用。病毒的未知甚至已知基因和 RNA motifs 的实际作用,最终要反映在体内(in vivo)研究上。以 SARS 病毒为例,一些与其它冠状病毒相比有显著差异的新闻阅读框 ORFs、未明确功能的蛋白结构域、组特异性亚基因组 mRNAs 和转录调控序列<sup>[19~21,44]</sup>,都需要通过构造突变或缺失这些序列的人工病毒来阐明其具体功能。

(2)应用 RNA 病毒反向遗传系统重现病毒的生活周期和感染模式,对阐明病毒的起源和致病机制提供一种切实可行的方法。这方面禽流感病毒 H5N1 株和 1918 西班牙流感

病毒株'的例子可供借鉴。目前 SARS 病毒的家猫、雪貂动物模型已经建立<sup>[45]</sup> ;从野生动物上分离到的 SARS 病毒也测出全序列<sup>[44]</sup> ,最近又有人重新分析 SARS 病毒基因组序列 ,发现 SARS 病毒可能是两种未知的哺乳动物前体病毒和禽类前体病毒的重组杂交体<sup>[46]</sup> 。将来可结合感染性克隆对病毒起源和致病性进行调查。

(3)开展病毒拯救的机制研究。直到现在 ,RNA 病毒的感染性克隆是如何模拟野生病毒感染的具体机理还没有系统研究 ;另外 ,poliovirus 的化学从头合成能否推广到其它病毒甚至进一步合成人工生命<sup>[13]</sup> ；“自下而上”的微生物或高等生物基因组或染色体重建能否借鉴病毒的感染性克隆构建而取得成功<sup>[15,18]</sup> ;从病毒反向遗传系统延伸到模式生物基因组背景下的“病毒-宿主反向遗传系统” ,等等 ,都将是富于挑战性的前沿研究。

(4)正确看待病毒拯救技术的利弊 ,注意负面影响 ,因为致命的病毒作为生物武器也可能以这种方式制造出来。即使出于生物安全性的考虑 ,也应该防止“不致病”病毒的流散和传播。

# REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Taniguchi T , Palmieri M , Weissmann C. Q $\beta$  DNA-containing hybrid plasmids giving rise to Q $\beta$  phage formation in the bacterial host. *Nature* ,1978 **274** :223 – 228
- [ 2 ] Boyer JC , Haenni AL. Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virology* ,1994 **198** :415 – 426
- [ 3 ] Schnell MJ , Mebatsion T , Conzelmann KK. Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *EMBO J* ,1994 **13** :4195 – 4203
- [ 4 ] Racaniello VR , Baltimore D. Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science* ,1981 **214** :916 – 919.
- [ 5 ] Ahlquist P , Janda M. cDNA cloning and in vitro transcription of the complete brome mosaic virus genome. *Mol Cell Biol* ,1984 **4** :2876 – 2882
- [ 6 ] Bridgen A , Elliott RM. Rescue of a segmented negative-strand RNA virus entirely from cloned complementary DNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1996 **93** :15400 – 15404
- [ 7 ] Britton P , Green P , Kottier S *et al.* Expression of bacteriophage T7 RNA polymerase in avian and mammalian cells by a recombinant fowlpox virus. *J Gen Virol* ,1996 **77** :963 – 967
- [ 8 ] Yap CC , Ishii K , Aoki Y *et al.* A hybrid baculovirus-T7 RNA polymerase system for recovery of an infectious virus from cDNA. *Virology* ,1997 **231** :192 – 200
- [ 9 ] Agapov EV , Frolov I , Lindenbach BD *et al.* Noncytopathic Sindbis virus RNA vectors for heterologous gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1998 **95** :12989 – 12994
- [ 10 ] Neumann G , Watanabe T , Ito H *et al.* Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1999 , **96** :9345 – 9450
- [ 11 ] Flick R , Pettersson RF. Reverse genetics system for Uukuniemi virus (Bunyaviridae) : RNA polymerase I-catalyzed expression of chimeric viral RNAs. *J Virol* ,2001 **75** :1643 – 1655
- [ 12 ] Perez M , Sanchez A , Cubitt B *et al.* A reverse genetics system for Borna disease virus. *J Gen Virol* ,2003 **84** :3099 – 3104
- [ 13 ] Cello J , Paul AV , Wimmer E. Chemical synthesis of poliovirus cDNA : generation of infectious virus in the absence of natural template. *Science* 2002 **297** :1016 – 1018

- [ 14 ] Almazan F , Gonzalez JM , Penzes Z *et al.* Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* ,2000 , **97** :5516 – 5521
- [ 15 ] Yount B , Curtis KM , Baric RS. Strategy for systematic assembly of large RNA and DNA genomes : transmissible gastroenteritis virus model. *J Virol* ,2000 **74** :10600 – 10611
- [ 16 ] 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 Gen Virol* ,2001 , **82** :1273 – 1281
- [ 17 ] Casais R , Thiel V , Siddell SG *et al.* Reverse genetics system for the avian coronavirus infectious bronchitis virus. *J Virol* 2001 **75** :12359 – 12369
- [ 18 ] Yount B , Denison MR , Weiss SR *et al.* Systematic assembly of a full-length infectious cDNA of mouse hepatitis virus strain A59. *J Virol* ,2002 **76** :11065 – 11067.
- [ 19 ] Snijder EJ , Bredenbeek PJ , Dobbe JC *et al.* Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus , an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J Mol Biol* ,2003 **331** :991 – 1004
- [ 20 ] Rota PA , Oberste MS , Monroe SS *et al.* Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* ,2003 **300** :1394 – 1399
- [ 21 ] Yount B , Curtis KM , Fritz EA *et al.* Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc Natl Acad Sci USA* ,2003 **100** :12995 – 13000
- [ 22 ] Lai CJ , Zhao BT , Hori H *et al.* Infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA of dengue type 4 virus. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1991 **88** :5139 – 5143
- [ 23 ] Shi PY , Tilgner M , Lo MK *et al.* Infectious cDNA clone of the epidemic west Nile virus from New York City. *J Virol* ,2002 **76** :5847 – 5856
- [ 24 ] Yamshchikov VF , Mishin V , Cominelli F. A new strategy in design of ( + ) RNA virus infectious clones enabling their stable propagation in *E. coli*. *Virology* 2001 **281** :272 – 280
- [ 25 ] Mishin VP , Cominelli F , Yamshchikov VF. A 'minimal' approach in design of flavivirus infectious DNA. *Virus Res* 2001 **81** :113 – 123
- [ 26 ] Kolykhalov AA , Agapov EV , Blight KJ *et al.* Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science* ,1997 **277** :570 – 574
- [ 27 ] Yanagi M , Purcell RH , Emerson SU *et al.* Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1997 , **94** :8738 – 8743
- [ 28 ] Price BD , Rueckert RR , Ahloui P. Complete replication of an animal virus and maintenance of expression vectors derived from it in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1996 **93** :9465 – 9470
- [ 29 ] Price BD , Ahlquist P , Ball LA. DNA-directed expression of an animal virus RNA for replication-dependent colony formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Virol* 2002 , **76** :1610 – 1616
- [ 30 ] Luytjes W , Krystal M , Enami M *et al.* Amplification , expression , and packaging of foreign gene by influenza virus. *Cell* ,1989 , **59** :1107 – 1113
- [ 31 ] Enami M , Luytjes W , Krystal M , Palese P. Introduction of site-specific mutations into the genome of influenza virus. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1990 **87** :3802 – 3805
- [ 32 ] Hoffmann E , Neumann G , Hobom G *et al.* “ Ambisense ” approach for the generation of influenza A virus : vRNA and mRNA synthesis



- [ 33 ] Hatta M , Hatta M , Gao P *et al.* . Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* , 2001 , **293** :1840 – 1842
- [ 34 ] Lee KJ , Novella IS , Teng MN *et al.* . NP and L proteins of lymphocytic choriomeningitis virus ( LCMV ) are sufficient for efficient transcription and replication of LCMV genomic RNA analogs. *J Virol* , 2000 , **74** :3470 – 3477
- [ 35 ] Neumann G , Feldmann H , Watanabe S *et al.* . Reverse genetics demonstrates that proteolytic processing of the Ebola virus glycoprotein is not essential for replication in cell culture. *J Virol* , 2002 , **76** :406 – 410
- [ 36 ] Radecke F , Spielhofer P , Schneider H *et al.* . Rescue of measles viruses from cloned DNA. *EMBO J* , 1995 , **14** :5773 – 5784
- [ 37 ] Cornu TI , de la Torre JC. Characterization of the arenavirus RING finger Z protein regions required for Z-mediated inhibition of viral RNA synthesis. *J Virol* , 2002 , **76** :6678 – 6688
- [ 38 ] Mundt E , Vakharia VN. Synthetic transcripts of double-stranded Birnavirus genome are infectious. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1996 , **93** :11131 – 11136
- [ 39 ] Li J , Huang Y , Liang X *et al.* . Plasmid DNA encoding antigens of infectious bursal disease viruses induce protective immune responses in chickens : factors influencing efficacy. *Virus Res* , 2003 , **98** :63 – 74
- [ 40 ] Huang YW ( 黄耀伟 ) , Li L ( 李龙 ) , Li JR ( 李建荣 ) *et al.* . Rapid construction of infectious clones of infectious bursal disease virus. *Acta Biochim Biophys Sin* ( 生物化学与生物物理学报 ) , 2003 , **35** :338 – 344
- [ 41 ] Yao K , Goodwin MA , Vakharia VN. Generation of a mutant infectious bursal disease virus that does not cause bursal lesions. *J Virol* , 1998 , **72** :2647 – 2654
- [ 42 ] Roner MR , Sutphin LA , Joklik WK. Reovirus RNA is infectious. *Virology* , 1990 , **179** :845 – 852
- [ 43 ] Roner MR , Joklik WK. Reovirus reverse genetics : Incorporation of the CAT gene into the reovirus genome. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2001 , **98** :8036 – 8041
- [ 44 ] Guan Y , Zheng BJ , He YQ *et al.* . Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science* , 2003 , **302** :276 – 278
- [ 45 ] Martina BE , Haagmans BL , Kuiken T *et al.* . SARS virus infection of cats and ferrets. *Nature* , 2003 , **425** :915
- [ 46 ] Stavrinides J , Guttman DS. Mosaic evolution of the severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol* , 2004 , **78** :76 – 82

## The Reverse Genetics Systems for Human and Animal RNA Viruses

HUANG Yao-Wei\* \* LI Long YU Lian\*

( Institute of Preventive Veterinary Medicine , Zhejiang University , Hangzhou 310029 , China )

**Abstract** The recovery of the virus from genetic materials in *in vitro* culture systems or sensitive animals is called virus rescue. A functional infectious clone of RNA virus provides unlimited possibility for genetic studies and the related reverse genetics system that allows directed genetic manipulation of an RNA virus is an extremely powerful research tool. In the past twenty years , especially since the first infectious clone of a negative-stranded RNA virus was reported in the mid-1990's , the reverse genetics systems have been available for nearly all the major human and animal RNA virus groups. The article reviews the progress of this technology , highlighting the obstacles in the construction of reverse genetics systems for major groups of human as well as animal RNA viruses and how the virologists overcame them. There are mainly four external expression systems for construction of the RNA virus reverse genetics systems basing on the kind of RNA viruses. These systems include *in vitro* RNA transcripts , RNA polymerase I -driven expression plasmids , RNA polymerase II -driven expression plasmids and modified vaccinia virus/T7 RNA polymerase-driven expression system. In particular , the viral nucleoprotein and polymerase proteins are required to assemble the viral ribonucleoprotein ( RNP ) complexes for the rescue of the negative-stranded RNA viruses . Relevant topics about the rescue of the typical viruses are discussed , including poliovirus with the *de novo* synthesis , *Coronaviridae* with the largest size of genome , *Flaviviridae* with the instable clones , HCV with the quasispecies nature , nodaviruses with the virus-host interaction , influenza virus with the RNA pol I transcription system , *Arenaviridae* with the ambisense coding strategies *etc.*

**Key words** human and animal RNA viruses , reverse genetics , infectious clones , rescue , minigenome

Received : 10-08-2003

This work is supported by Grand from Key Project of Zhejiang Province ( No.2003C22002 ).

\* Corresponding author. Tel : 86-571-86971894 ; Fax : 86-571-86971894 ; E-mail : yulian@zju.edu.cn

\* \* Present address : CMMID , Virginia Polytechnic Institute and State University , USA , E-mail : yhuang@vt.edu