

• 综 述 •

猪流行性腹泻病毒反向遗传操作技术及其应用

于瑞嵩^{1,2}, 董世娟^{1,2}, 司伏生¹, 蒋凤英^{1,2}, 谢春芳^{1,2}, 陈冰清¹, 喻利¹, 李震^{1,2}

1 上海市农业科学院畜牧兽医研究所, 上海 201106

2 上海市农业遗传育种重点实验室, 上海 201106

于瑞嵩, 董世娟, 司伏生, 等. 猪流行性腹泻病毒反向遗传操作技术及其应用. 生物工程学报, 2017, 33(2): 205–216.
Yu RS, Dong SJ, Si FS, et al. Advances in reverse genetics to treat porcine epidemic diarrhea virus. Chin J Biotech, 2017, 33(2): 205–216.

摘 要: 猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 是引起猪 (特别是新生仔猪) 急性、高度传染性消化道疾病的主要病原之一; 2010 年底以来, 猪流行性腹泻 (PED) 的再次暴发给我国乃至全球养猪业造成了巨大经济损失。最近, 研究者已先后建立了基于靶向 RNA 重组技术、细菌人工染色体 (BAC) 载体系统和体外连接技术的 PEDV 反向遗传学操作技术, 为 PEDV 编码的蛋白质的功能、致病机制以及新型疫苗的研发开辟了新的思路。本文对 PEDV 反向遗传操作技术的研究进展及其在 PEDV 胰酶依赖性、S 蛋白和 ORF3 蛋白的功能以及新一代疫苗研制等方面的应用现状进行了综述与展望。

关键词: 猪流行性腹泻病毒, 反向遗传学, 胰酶, S 蛋白, ORF3 蛋白, 细胞适应性, 疫苗

Advances in reverse genetics to treat porcine epidemic diarrhea virus

Ruisong Yu^{1,2}, Shijuan Dong^{1,2}, Fusheng Si¹, Fengying Jiang^{1,2}, Chunfang Xie^{1,2}, Bingqing Chen¹, Li Yu¹, and Zhen Li^{1,2}

1 Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China

2 Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Shanghai 201106, China

Abstract: Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) is one of the major etiologies responsible for the acute, highly

Received: June 26, 2016; **Accepted:** September 30, 2016

Supported by: Shanghai Key Technology R&D Program (No. 13391901502), National Natural Science Foundation of China (Nos. 31402219, 315725199), Shanghai Key Project on Agricultural Development (No. 2015-6-1-9)

Corresponding author: Zhen Li. Tel: +86-21-62206391; Fax: +86-21-62207858; E-mail: zhenli60@163.com

上海市科技支撑项目 (No. 13391901502), 国家自然科学基金 (Nos. 31402219, 315725199), 上海市科技兴农重点攻关项目 (沪农科攻字 (2015) 第 6-1-9 号) 资助。

网络出版时间: 2016-10-24

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20161024.1103.003.html>

contagious disease in the digestive tract of pigs, especially neonatal piglets. Since PEDV was first identified in Europe in the late 1970s, it has resulted in significant economic losses in many Asian swine-raising countries, including China. Recently, reverse genetics techniques including targeted RNA recombination, bacteria artificial chromosome system and *in vitro* ligation have been successfully used to manipulate the genome of PEDV, which providing new strategies for the clear delineation of the functions of the viral proteins, the mechanisms behind PEDV pathogenesis and the design of novel vaccines against PEDV. Here, we review the progresses of different reverse genetics platforms developed for PEDV and their applications, covering the roles of trypsin in PEDV propagation, functions of S and ORF3 protein and the development of next generation PED vaccines, and the perspectives of reverse genetics for PEDV.

Keywords: porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), reverse genetics, trypsin, S protein, ORF3 protein, cell adaption, vaccine

猪流行性腹泻病毒 (Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 与猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV) 同属于尼多病毒目、冠状病毒科的 α 冠状病毒属, 为有囊膜的单股正链 RNA 病毒^[1]。PEDV 引起猪特别是初生仔猪的呕吐、腹泻和食欲下降; 严重时死亡率可以达到 100%。虽然猪流行性腹泻 (Porcine epidemic diarrhea, PED) 首次发现于欧洲, 并随后证实 PEDV 是导致猪流行性腹泻的病原, 但 20 世纪 80 年代以后 PED 主要在亚洲国家流行, 几十年来一直困扰着亚洲养猪业^[1]。2010 年 12 月以来, PED 再次在我国全国范围内呈暴发式流行, 给养猪业造成了巨大的经济损失^[2]。2013 年 3 月以后, PED 首次在美国报道, 并迅速蔓延至其他美洲、欧洲国家^[3]; 亚洲其他国家或地区也相继报道 PED 疫情的暴发。目前, PED 已蔓延至全球, 给全世

界养猪业的疾病防控带来了严峻的挑战。

PEDV 基因组全长约 28 kb, 除了 5' 和 3' 端非编码区外还包括 7 个开放阅读框 (ORF, 图 1)。PEDV 基因组 5' 端的 2/3 编码在病毒的复制和转录过程中发挥重要作用的多聚体蛋白 ORF1a 和 ORF1ab; 而 3' 端编码纤突蛋白 (S)、囊膜蛋白 (E)、膜蛋白 (M)、核衣壳蛋白 (N) 和一个辅助蛋白 ORF3。S 蛋白在病毒与受体结合、膜融合、病毒侵入宿主细胞过程中发挥重要作用; S 蛋白也包含主要的诱导宿主产生中和抗体的抗原表位。E 蛋白在病毒的组装和出芽过程中发挥作用。M 蛋白在病毒的组装过程中发挥作用, 也可以诱导感染宿主产生中和抗体。N 蛋白与病毒 RNA 结合, 为病毒的转录、复制和组装提供骨架。ORF3 蛋白可能与 PEDV 的细胞适应性和毒力有关^[4]。

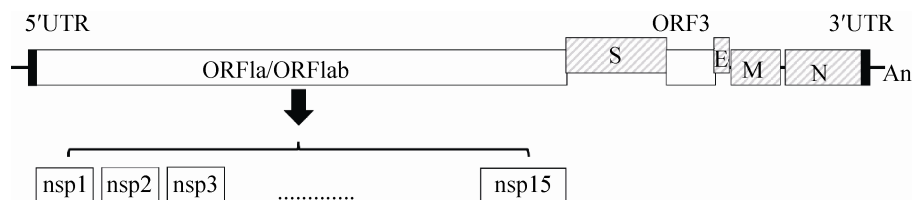


图 1 PEDV 基因组及其开放阅读框

Fig. 1 PEDV genome and its open reading frames.

由于长期缺乏有效的 PEDV 遗传操作系统,且临床分离毒株的细胞培养经常遇到困难,因此对 PEDV 的侵入机制、发病机理和免疫机制仍缺乏深入的研究。作为冠状病毒家族的成员, PEDV 约 28 kb 的基因组增加了其反向遗传学操作系统建立的难度,需要一个高容量的载体克隆 PEDV 的全长 cDNA 片段;而且 PEDV 含有的毒性序列会导致病毒基因组 cDNA 在高拷贝质粒中的不稳定;长基因组感染性克隆建立的另一个挑战是很难将病毒复制自然产生的突变与基因扩增和测序产生的突变区分开来。最近,借鉴其他冠状病毒反向遗传学操作技术,研究者建立了 3 种 PEDV 的反向遗传学操作系统,这 3 种操作系统分别基于靶向 RNA 同源重组技术、细菌人工染色体 (Bacterial artificial chromosome, BAC) 载体系统和体外连接技术。这些反向遗传操作技术的建立 (尽管存在各自的优点和不足),推动了 PEDV 复制和致病性研究的不断深入。

1 PEDV 的反向遗传学技术

1.1 靶向 RNA 同源重组技术

靶向 RNA 同源重组技术是最早建立的冠状病毒反向遗传学操作技术。该技术最早用于获得重组鼠肝炎病毒 (MHV) 并得到进一步完善^[5]。利用冠状病毒感染宿主过程中 RNA 的高重组率和 S 蛋白决定冠状病毒的严格细胞嗜性的特性,通过替换 *s* 基因来改变重组病毒细胞嗜性,从而简化了筛选重组体病毒过程^[5]。目前,该技术被应用到其他冠状病毒的反向遗传学操作,如猫传染性腹膜炎病毒 (FIPV)^[6] 和 PEDV^[7]。

通过与荷兰乌特勒支大学合作,本实验室

首先建立了基于靶向 RNA 重组技术的 PEDV 反向遗传学操作技术^[7]。重组 PEDV 的获得包括两步:构建严格鼠源细胞嗜性的携带 MHV *s* 基因 (S 蛋白胞外区编码序列) 的嵌合体 PEDV (mPEDV) 和拯救严格 Vero 细胞嗜性的目标重组 PEDV。首先构建重组供体质粒,依次包含噬菌体 T7 RNA 聚合酶 (体外 RNA 转录) 编码序列、*orf1a/1b* 部分片段 (同源重组的同源臂)、MHV S 蛋白胞外区编码序列 (替换 PEDV *s* 基因相应序列) 以及包括 *orf3*、*e*、*m* 和 *n* 基因的 PEDV 基因组下游序列。将供体质粒体外转录得到的 RNA 转染 PEDV 感染的 Vero 细胞,以鼠源 LR7 细胞筛选嵌合体病毒 mPEDV。第 2 步,构建包含相同基因组区域、携带 PEDV *s* 基因的第 2 个重组供体质粒。同时,在质粒构建时可以依研究目的改变 *s* 和/或其他基因 (*orf3*、*e*、*m*、*n*) 的序列或顺序,甚至删除 *orf3* 基因或以报告基因如荧光素酶基因替代 *orf3*。随后,将体外转录得到的 RNA 转染 mPEDV 感染的 LR7 细胞,然后在 Vero 细胞上拯救目标重组 PEDV (图 2)。

尽管靶向 RNA 同源重组技术在冠状病毒反向遗传学发展的进程中扮演着重要角色,但是该技术不能对基因组 5'-端包含复制酶的 2/3 区域进行操作。另外,由于利用 T7 RNA 聚合酶获得供体 RNA,需要仔细分析病毒的基因序列以防止出现隐含的转录终止信号。而且,需要对拯救得到的重组病毒进行噬斑纯化,操作程序相对繁琐。因此,虽然靶向 RNA 同源重组技术是全长感染性克隆构建成功之前值得尝试的冠状病毒反向遗传学操作技术,研究者一直没有放弃对构建全长 PEDV cDNA 感染性克隆的探索。

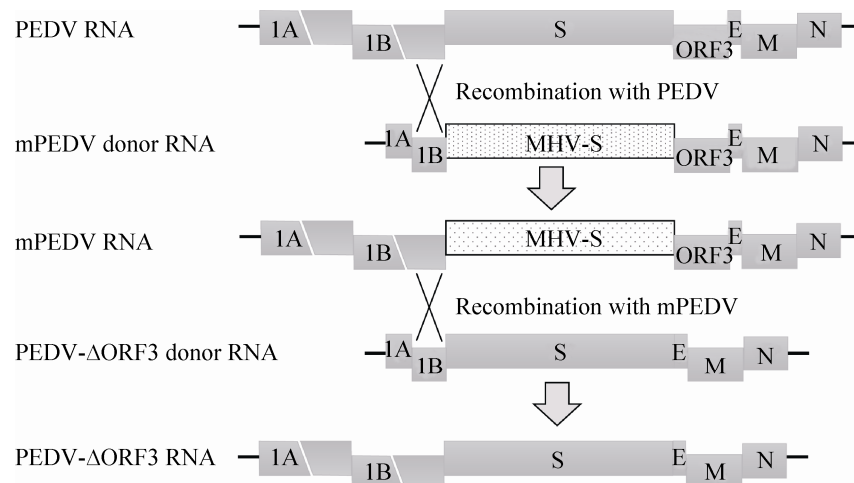


图2 利用靶向RNA同源重组技术构建重组PEDV(根据Li等^[7]修改)

Fig. 2 Targeted RNA recombination scheme to make recombinant PEDV (Adapted from Li et al^[7]).

1.2 基于BAC载体的反向遗传学操作技术

BAC可以容纳大片段外源DNA插入(300 kb)和低拷贝(1-2个拷贝)的特性解决了冠状病毒基因组中含有的毒性序列导致的cDNA在高拷贝质粒中的不稳定问题。利用BAC系统,已先后获得了TGEV、SARS-CoV、HCoV-OC43、FIPV、MERS-CoV和MHV的感染性克隆^[8-10]。最近,泰国学者利用BAC载体系统获得了PEDV的感染性克隆^[11]。

首先,他们根据PEDV AVCT12株基因组限制酶切位点的分布将其分为8个片段,每个片段的两端均带有合适的(本来或引入的)限制性酶切位点^[11];片段两两连接直到合成全长的cDNA。全长感染性克隆表达框依次包括:巨细胞病毒(CMV)启动子、PEDV基因组全长序列(包括5'-UTR和3'-UTR)、25个碱基的poly(A)、 δ 肝炎病毒(HDV)核糖体自切割序列和牛生长激素(BDH)终止和poly(A)序列。在表达框的两端各包含一个转录终止序列(T)以减少从隐性启动子的转录和对细菌的毒性,从而提高病毒cDNA在BAC载体中的稳定性(图3)。

然后,将携带PEDV cDNA的BAC载体转染Vero-E6-APN细胞系来拯救和增殖病毒。拯救得到的病毒表现出与亲本毒株相似的生长特性,表明限制性酶切位点序列的引入并没有影响PEDV在细胞上的复制。

利用BAC载体构建PEDV感染性克隆有效克服了冠状病毒含有的毒性序列在高拷贝质粒中的不稳定难题,理论上可以对整个基因组中的每个基因进行遗传操作;而且具有较高的转染效率和表达效率,病毒基因组RNA能够在被转染细胞中迅速复制。但是,由于需要删除和/或向病毒cDNA中引入新的限制性酶切位点序列,在选择限制性酶时需精心设计,避免引入的突变影响到病毒的复制而导致拯救病毒失败。另外,他们还发现细菌的转座子序列插入到感染性克隆的PEDV cDNA序列中而影响了病毒的拯救^[11]。虽然通过选择*E. coli* DH10B增殖克隆和亚克隆载体和测序验证所有克隆避免了转座子插入的问题,构建感染性克隆的每一步都必须验证cDNA的序列是该技术克隆成功的关键点。

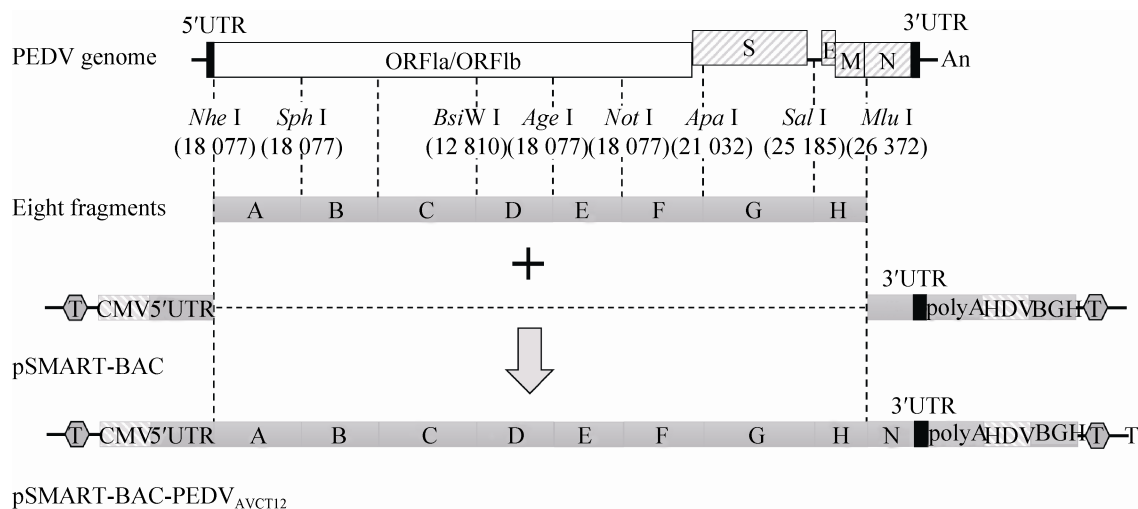


图3 利用BAC系统构建PEDV感染性克隆(根据Jengarn等^[11]修改)

Fig. 3 BAC system scheme to make infectious clone of PEDV (Adapted from Jengarn et al^[11]).

1.3 基于体外连接的反向遗传学操作技术

完全避免在细菌细胞内扩增病毒cDNA是避免病毒cDNA在细菌中的不稳定性和毒性的最有效措施。基于体外连接的反向遗传学操作技术就是在体外将病毒cDNA片段连接成全长的cDNA,然后利用T7 RNA聚合酶体外转录获得感染性病毒基因组RNA,随后将基因组RNA电转至合适的细胞来拯救(重组)病毒。Yount等首先利用这种体外组装大片段DNA的技术获得了TGEV感染性克隆^[12],随后该技术扩展到其他冠状病毒,如MHV、传染性支气管炎病毒(IBV)、SARS-CoV、HKU3、HCoV-NL63和MERS-CoV的反向遗传学操作中^[13-14]。

最近,Beall等采用体外连接技术获得了PEDV北美强毒株PC22A的感染性cDNA克隆^[15]。他们首先扩增得到6个PEDV cDNA片段并分别插入到亚克隆载体中,每一片段的两侧分别添加特定的II型限制性酶切位点(用于

产生无缝连接的粘性末端)。另外,第一个cDNA片段的5'-端带有T7 RNA聚合酶启动子,最后一个cDNA片段的3'-端带有25个碱基的poly(A)序列以用于后续的体外转录和RNA加帽。这些片段随后经酶切、连接和体外转录产生病毒的全长RNA(图4)。最后,将RNA与n基因的转录物共电转至Vero细胞中拯救得到感染性的(重组)PEDV。

体外连接技术不仅具有BAC系统优点,如可以操作整个PEDV的基因组、避免了冠状病毒毒性基因在细菌中的不稳定性等。这种体外连接组装大片段DNA的方法也可以替代BAC和靶向RNA重组系统中的DNA片段的连接方法,从而省去繁琐的限制性内切酶的选择和设计过程。而且,它不需要一个稳定的细菌载体(如BAC)来克隆全长的cDNA,分离的cDNA片段各自保存在亚克隆载体中。通过体外连接cDNA片段获得感染性克隆的另一个优点是只需对发

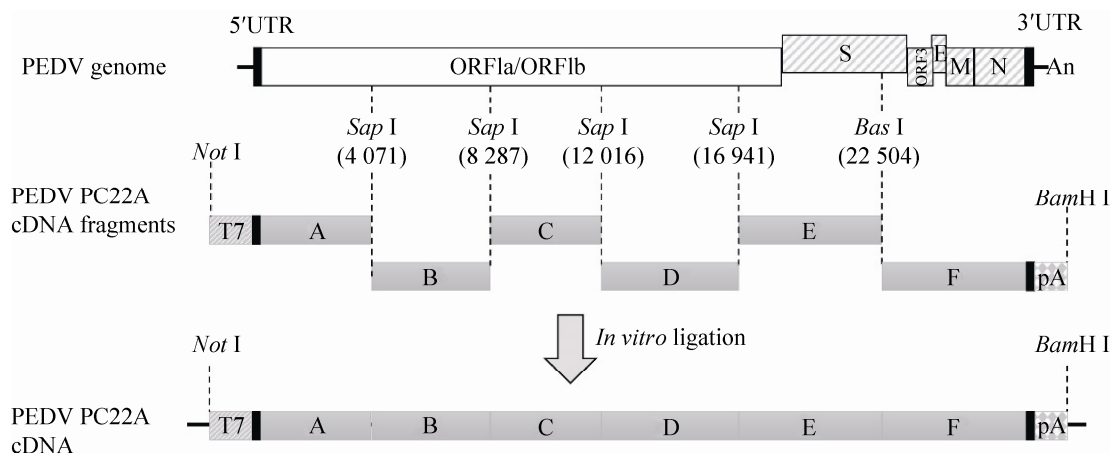


图4 利用体外连接法构建 PEDV 感染性克隆 (根据 Beall 等^[15]修改)

Fig. 4 *In vitro* ligation scheme to make infectious clone of PEDV (Adapted from Beall et al^[15]).

生变异的 cDNA 片段进行操作就能够在最短的时间内获得新发病毒的感染性克隆, 不需要将所有片段连接载体来构建全长感染性克隆, 可以及时应对具有高变异特性的冠状病毒如 PEDV 的新疫情。由于需要体外转录获得病毒基因组 RNA, 这项技术也放大了靶向 RNA 重组方法的某些缺点。如全长 RNA 的正确性取决于 T7 RNA 聚合酶的保证度, 可能每次试验都会不同, 且不能事先确证。而且, 虽然已有研究证明将复制酶基因在特定的区域成分分离的片段可以帮助减轻复制酶的毒性问题, 但是即使将复制酶片段插入到亚克隆载体中仍然存在复制酶片段的毒性问题^[13]。

1.4 其他值得尝试的反向遗传学操作技术

1.4.1 利用痘病毒载体的反向遗传学技术

痘病毒基因组中存在大量的非必需区, 可允许大片段外源基因的插入, 且外源基因的插入不影响病毒的复制; 痘病毒很容易培养到高滴度, 可以有效地感染包括原代细胞、哺乳动物和非哺乳动物的细胞系; 因此痘病毒载体是

构建包括 PEDV 在内的冠状病毒感染性克隆的理想载体。目前, 痘病毒载体已经被用于 IBV、MHV、FCoV 和 SARS-CoV 的反向遗传学操作^[16-17]。虽然, 还没有将痘病毒载体用于 PEDV 反向遗传学的报道, 它具有的优势值得尝试。

1.4.2 利用 Gibson 组装系统的反向遗传学技术

Gibson 组装系统是 2009 年由 Gibson 等发明的一种可以将 DNA 片段连接成几十 Mb 长片段的新方法^[18]。设计相邻 DNA 片段 3'-和 5'-端包含 20-40 bp 相互重叠序列, 通过 3 个关键的成分, 即 5'-外切酶 (产生粘性末端)、DNA 聚合酶 (补平粘性末端退火后留下的缺口)、DNA 连接酶, 将多个 DNA 片段一步等温反应连接起来。虽然 Gibson 组装系统尚未用于冠状病毒感染性克隆的构建, 这种方法已经被成功用于同为尼多病毒目的猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 感染性克隆的构建^[19]。由于不需要限制性酶切位点的设计, 这种方法也可以作为体外连接法的有益补充, 或用于将 cDNA 克隆至 BAC 或痘病毒载体。

2 反向遗传学技术在 PEDV 研究中的应用

2.1 胰酶与 PEDV 体外增殖

冠状病毒的 S 蛋白决定其严格的宿主细胞嗜性,作为 I 型融合蛋白,S 通过与宿主细胞上特定受体结合及其膜融合活性发挥功能。I 型融合蛋白通常以前体蛋白形式表达出来,随后被蛋白酶裂解为 2 个亚基 (S1 和 S2) 而释放出活化的融合肽。然而,冠状病毒融合肽的活化似乎还需要 S2 中的第二个裂解位点 (S2') 的裂解^[20-21]。根据与其他冠状病毒 S 蛋白的同源比对,PEDV 的 S 蛋白也可以分为 2 个亚基 (S1 和 S2);然而,与 TGEV 相似,在预测的 PEDV S1 和 S2 交界处并不存在 β 和 γ 冠状病毒 S 蛋白含有的弗林蛋白酶 (Furin) 识别序列^[22]。根据 PEDV 的肠道嗜性 (富含胰酶),很可能在体内这种低特异性的胰酶介导了 PEDV S 蛋白的裂解活化。因此,PEDV 的细胞传代和增殖需要胰酶的存在;这个 Vero 细胞-胰酶系统现在已经成为 PEDV 体外培养的标准体系。PEDV 在表达跨膜 II 型丝氨酸蛋白酶 2 的 Vero 细胞上增殖显示胰酶的功能可以被其他蛋白酶替代^[23]。

目前,已有利用反向遗传学工具来尝试回答关于 PEDV 胰酶依赖性问题的报道。Wicht 等利用靶向 RNA 重组技术,构建携带来源于胰酶依赖毒株 CV777 的 *s* 基因 (s^{CV777}) 或胰酶不依赖毒株 DR13 的 *s* 基因 (s^{DR13}) 的重组 PEDV,验证了胰酶对病毒侵入的影响^[24]。受体结合后以胰酶处理可以显著提高携带 s^{CV777} 重组病毒的相对感染率,而降低携带 s^{DR13} 重组病毒的相对感染率^[24],表明与 SARS-CoV 相似,PEDV S 蛋白被胰酶的裂解可能发生在受体结合后,受体结合诱导的构象变化增加了 S 蛋白的可及

性^[25]。随后,他们通过构建系列携带嵌合体 *s* 基因的重组 PEDV,将胰酶的依赖性定位到 S2 亚基中包含融合肽和第 1 个七肽重复序列的区域^[24]。他们推测位于融合肽上游 S2' 位点的精氨酸残基 R⁸⁹⁰ (精氨酸或赖氨酸是胰酶的靶点,在细胞适应株 DR13 S 中突变为甘氨酸),可能是胰酶依赖性的关键位点。当把这个区域突变为 furin 裂解识别基序后,重组 PEDV 在 Vero 细胞的增殖不再依赖于胰酶 (虽然滴度较低),证实了 S2' 裂解位点可能是 PEDV 胰酶依赖性关键位点^[26]。

2.2 PEDV S 蛋白突变体

根据 PEDV *s* 基因遗传进化分析可以把 PEDV 流行株分为两组^[1]。第 1 组为 PEDV 优势流行毒株,与 CV777 相比,它们的 S 蛋白在 55 和 135 位分别插入 4 个氨基酸和 1 氨基酸,在 160 位缺失 2 个氨基酸。第 2 组中 PEDV 的 S 蛋白失去了第 1 组中 S 蛋白的插入和缺失变异,其 *s1* 基因序列反而与 CV777 等早期分离株和疫苗株的同源性更高^[1]。而且第 2 组的某些毒株的毒力与第 1 组中流行毒株的毒力相比出现了不同程度的减弱^[27-30]。由于基因组背景、细胞适应性、攻毒剂量和实验动物特征的不同,很难对此进行比较和解释,以确定导致这些毒株毒力改变的关键变异。利用反向遗传学技术来拯救包含这些变异位点的重组病毒,将能够在更一致的条件分析这些变异对 PEDV 毒力的影响。

除了上述特异位点的插入或缺失外,*s* 基因的大片段缺失也见于多个 PEDV 分离株中^[31-33]。这些缺失可以在 S1 亚基的 C-端^[31,33]或 N-端编码区^[32],可以是自然突变产生或细胞适应过程中产生;这些毒株的细胞适应性也各不相同。*s* 基因的这种大片段的缺失在其他冠状病毒中也有

发现, TGEV S1 N 端 224 个氨基酸的缺失产生了抗原性不同的感染猪呼吸道的猪呼吸道冠状病毒。缺失的区域编码多糖结合结构域, 因此被认为引起了 TGEV 肠道嗜性的丧失^[34]。与猫肠道冠状病毒 (FECV) 具有完整的 *s* 基因不同, 大约 20% FIPV *s* 基因含有大片段缺失 (未发表数据)。这很容易使人推测 *s* 基因的大片段缺失可能改变了受体或多糖结合结构域, 从而影响受体结合和使用的效率或选择性。反向遗传学技术将有助于阐明这些编码区域与病毒入侵、嗜性和致病性的关系。

Shirato 等^[35]发现, PEDV S 蛋白内质网-高尔基体中间体定位信号基序 (K-x-H-x-x, x 为任意氨基酸残基) 中的 ¹³⁸¹H→R 突变不仅可以提高 S 蛋白的融合活性, 而且增加了其对小鼠的毒性。但这是不是 PEDV 及其他冠状病毒的一个普遍特性? 这些问题的阐明也需要利用反向遗传学技术拯救包含这些突变的系列重组 PEDV 并对它们的特性进行分析。

2.3 ORF3 蛋白功能和细胞适应性

ORF3 蛋白是目前发现的 PEDV 的唯一辅助性蛋白。PEDV 强、弱毒株的序列比对发现弱毒/疫苗株的 *orf3* 基因存在不同程度碱基的缺失, 从而导致其编码氨基酸残基的缺失或翻译的提前终止^[36-37]。因此, ORF3 蛋白截短被认为影响 PEDV 的致病性。然而, 并不是所有的 ORF3 蛋白截短都可以与致病性减弱关联起来。最近, 分离自我国福建地区某猪场临床样品的 PEDV 编码截短 ORF3 蛋白, 但它的毒力与具有全长 *orf3* 基因的分离株相比并没有不同^[38]。在另一项对 PEDV YN1 分离株细胞传代的研究中发现第 15 代病毒 YN15 的 *orf3* 基因有 8 个氨基酸编

码序列发生突变并导致了翻译的提前终止, 然而其对仔猪的致病性与 YN1 相似, YN1 的子代病毒获得截短的 ORF3 蛋白似乎对其适应细胞更为重要^[39]。

细胞适应株 PEDV 具有截短的 ORF3 蛋白暗示它在细胞培养上的非必要性。这已经得到反向遗传学方法的证实, Li 等和 Jengarn 等相继利用反向遗传学技术成功拯救了缺失 *orf3* 基因的重组 PEDV^[7,11]。然而, Jengarn 等尝试拯救恢复 *orf3* 基因的重组病毒并没有成功, 并认为 *orf3* 基因可能对病毒在细胞上的生长产生有害的影响^[11]。而在另一项研究中, 带有完整 *orf3* 基因的 PEDV 强毒株 PC22A 感染性克隆能够拯救成功^[15]。而且, *orf3* 基因的删除并没有显著影响重组病毒在仔猪上的致病性, 所有接种的仔猪都死于疾病, 或在实验结束时由于疾病而不得被安乐死^[15]。我们最近也拯救到了携带完整 *orf3* 基因的重组 PEDV Dr13 株 (结果未发表)。

关于 ORF3 蛋白的作用和在体内外对病毒复制和致病性的重要性, 目前研究结果仍存在争议。ORF3 蛋白的功能和重要性可能依病毒和宿主细胞背景的不同而不同。应用反向遗传学技术将有助于控制每项研究的不同, 也可以使分析其他病毒蛋白在介导 PEDV 细胞适应和致病性的影响与 ORF3 蛋白的影响结合起来成为可能。

2.4 研制新型 PED 疫苗

目前的 PED 疫苗大部分 (如果不是全部) 都是为母体免疫设计的, 这是因为新生仔猪通常不能及时产生足够的初次免疫应答以防止疾病的发生, 特别是对于那些与烈性病毒感染相关的疾病。它们依赖于从初乳和乳汁中获得的母源被动免疫^[40]。PEDV 主要通过直接侵入小

肠绒毛壁上皮细胞感染其宿主,且病毒不需要系统性的传播,因此黏膜免疫,特别是分泌性IgA,参与病毒的中和作用和免疫保护^[40]。虽然PEDV特异性的IgG在母猪的初乳中大量存在,但其在产后母猪的乳汁中迅速下降,因此保护时间非常短^[41]。越来越多的证据表明,以活的PEDV口服免疫怀孕母猪是刺激母猪产生充足的乳源免疫来保护仔猪所必需的^[41-43]。

PED口服疫苗的效力很大程度上取决于其在猪肠上皮细胞上的感染和增殖能力。然而PEDV对Vero细胞培养的适应似乎影响到它作为口服疫苗的病毒效力。与在Vero细胞传代75或90代的细胞适应毒株相比,PEDV Dr13亲本株经口服接种母猪可诱导更强的免疫反应^[44]。Chen等最近通过以低(YN15)或高(YN144)传代次数PEDV口服接种哺乳仔猪的毒力实验也证实YN144几乎没有感染仔猪的小肠上皮细胞^[39]。其他实验室的结果也显示Vero细胞适应的PEDV毒株在猪小肠上皮细胞上感染和复制效率比在Vero细胞上的效率要差^[45]。

为了开发有效的PED疫苗,接种的疫苗不仅要保持在体外的高生长特性,而且在保证毒力减弱的同时必须尽量保持病毒对小肠细胞的适应性。PEDV反向遗传学操作系统的快速发展给新型疫苗的研发提供了巨大的潜力。随着对临床分离株和细胞适应株差异了解的不断深入,将可能利用反向遗传学技术来改造具有高生长滴度的PEDV毒株,将其细胞嗜性从猴源的Vero细胞转换为猪源细胞。对重组病毒侵入Vero细胞和猪小肠上皮细胞的机制研究的不断深入将揭示涉及细胞适应的关键氨基酸残基,这将为利用反向遗传学技术改造Vero细胞适应PEDV以增加其小肠细胞嗜性提供关键信息。通

过利用反向遗传学技术构建携带嵌合体或突变体s基因的重组PEDV可以在核苷酸水平上证实决定病毒嗜性的碱基序列,从而为获得带有小肠上皮细胞入侵必需结构域、同时保持诱导保护性体液免疫所必需抗原位点的新型、高效重组PED疫苗铺平道路。

3 小结与展望

2010年底以来,全球范围内的PED爆发使PEDV再次成为研究热点。PEDV反向遗传学技术为研究病毒蛋白质的功能、揭示病毒复制及其致病机制开辟了新的途径。然而,反向遗传学技术最具潜力的应用在于研发新型疫苗,可以通过突变或删除毒力相关基因并同时引入分子标记在短时间内迅速研制出标记疫苗,通过与之相配套的检测方法,将野毒感染和疫苗免疫区分开来;及时应对爆发的PED新疫情。虽然近年来分子病毒学发展迅速,但是对PEDV的研究才刚刚起步。与MHV、SARS-CoV等相比,PEDV结构蛋白的研究还较少;复制酶复合体蛋白ORF1a和ORF1ab裂解形成的15个非结构蛋白的功能还不清楚;ORF3蛋白虽然不是PEDV复制所必需的,但是对于其具体功能仍存在争议。

因此,未来PEDV的研究重点可能主要会集中在以下几个方面:PEDV免疫逃逸的分子机制研究-阐明哪些蛋白质参与了宿主天然免疫的抑制及其信号通路;PEDV自身编码蛋白间的相互作用及其对病毒自身复制的调控;PEDV粘膜免疫机制研究-探索PEDV如何诱发肠道-乳腺-sIgA轴的反应模式。反向遗传学技术作为这些研究中的一种必不可少的工具,必定会发挥出巨大的作用。

REFERENCES

- [1] Lee C. Porcine epidemic diarrhea virus: an emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Virology*, 2015, 521: 193.
- [2] Shi B, Dong SJ, Zhu YM, et al. Advances in study of molecular epidemiology of porcine epidemic diarrhea virus in China. *Sci Agric Sin*, 2013, 46(20): 4362–4369 (in Chinese).
施标, 董世娟, 朱于敏, 等. 中国猪流行性腹泻病毒分子流行病学研究进展. *中国农业科学*, 2013, 46(20): 4362–4369.
- [3] Diel DG, Lawson S, Okda F, et al. Porcine epidemic diarrhea virus: an overview of current virological and serological diagnostic methods. *Virus Res*, 2016, doi: 10.1016/j.virusres.2016.05.013.
- [4] Teeravechyan S, Frantz PN, Wongthida P, et al. Deciphering the biology of porcine epidemic diarrhea virus in the era of reverse genetics. *Virus Res*, 2016, doi: 10.1016/j.virusres.2016.05.003.
- [5] Kuo L, Godeke GJ, Raamsman MJB, et al. Retargeting of coronavirus by substitution of the spike glycoprotein ectodomain: crossing the host cell species barrier. *J Virol*, 2000, 74(3): 1393–1406.
- [6] Haijema BJ, Volders H, Rottier PJM. Switching species tropism: an effective way to manipulate the feline coronavirus genome. *J Virol*, 2003, 77(8): 4528–4538.
- [7] Li CH, Li Z, Zou Y, et al. Manipulation of the porcine epidemic diarrhea virus genome using targeted RNA recombination. *PLoS ONE*, 2013, 8(8): e69997.
- [8] Almazán F, Dediego ML, Sola I, et al. Engineering a replication-competent, propagation-defective Middle East respiratory syndrome coronavirus as a vaccine candidate. *mBio*, 2013, 4(5): e00650–13.
- [9] Fehr AR, Athmer J, Channappanavar R, et al. The nsp3 macrodomain promotes virulence in mice with coronavirus-induced encephalitis. *J Virol*, 2015, 89(3): 1523–1536.
- [10] Bálint Á, Farsang A, Zádori 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 Virol*, 2012, 86(11): 6258–6267.
- [11] Juggragarn J, Phonphimon W, Nanchaya W, et al. Genetic manipulation of porcine epidemic diarrhoea virus recovered from a full-length infectious cDNA clone. *J Gen Virol*, 2015, 96(8): 2206–2218.
- [12] Yount B, Curtis KM, Baric RS. Strategy for systematic assembly of large RNA and DNA genomes: transmissible gastroenteritis virus model. *J Virol*, 2000, 74(22): 10600–10611.
- [13] Scobey T, Yount BL, Sims AC, et al. Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(40): 16157–16162.
- [14] Youn S, Leibowitz JL, Collisson EW. *In vitro* assembled, recombinant infectious bronchitis viruses demonstrate that the 5a open reading frame is not essential for replication. *Virology*, 2005, 332(1): 206–215.
- [15] Beall A, Yount B, Lin CM, et al. Characterization of a pathogenic full-length cDNA clone and transmission model for porcine epidemic diarrhea virus strain PC22A. *mBio*, 2016, 7(1): e01451–15.
- [16] Van Den Worm SHE, Eriksson KK, Zevenhoven JC, et al. Reverse genetics of SARS-related coronavirus using vaccinia virus-based recombination. *PLoS ONE*, 2012, 7(3): e32857.
- [17] Tekes G, Hofmann-Lehmann R, Stallkamp I, et al. Genome organization and reverse genetic analysis of a type I feline coronavirus. *J Virol*, 2008, 82(4): 1851–1859.
- [18] Gibson DG, Young L, Chuang RY, et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods*, 2009, 6(3): 343–345.
- [19] Suhardiman M, Kramyu J, Narkpuk J, et al. Generation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by *in vitro* assembly of viral

- genomic cDNA fragments. *Virus Res*, 2015, 195: 1–8.
- [20] Belouzard S, Chu VC, Whittaker GR. Activation of the SARS coronavirus spike protein *via* sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(14): 5871–5876.
- [21] Millet JK, Whittaker GR. Host cell entry of Middle East respiratory syndrome coronavirus after two-step, furin-mediated activation of the spike protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(42): 15214–15219.
- [22] Duarte M, Laude H. Sequence of the spike protein of the porcine epidemic diarrhoea virus. *J Gen Virol*, 1994, 75(5): 1195–1200.
- [23] Shirato K, Matsuyama S, Ujike M, et al. Role of proteases in the release of porcine epidemic diarrhea virus from infected cells. *J Virol*, 2011, 85(15): 7872–7880.
- [24] Wicht O, Li WT, Willems L, et al. Proteolytic activation of the porcine epidemic diarrhea coronavirus spike fusion protein by trypsin in cell culture. *J Virol*, 2014, 88(14): 7952–7961.
- [25] Matsuyama S, Ujike M, Morikawa S, et al. Protease-mediated enhancement of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(35): 12543–12547.
- [26] Li WT, Wicht O, van Kuppeveld FJM, et al. A single point mutation creating a furin cleavage site in the spike protein renders porcine epidemic diarrhea coronavirus trypsin independent for cell entry and fusion. *J Virol*, 2015, 89(15): 8077–8081.
- [27] Grasland B, Bigault L, Bernard C, et al. Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea S gene indel strain isolated in France in December 2014. *Genome Announc*, 2014, 3(3): e00535–15.
- [28] Lin CM, Annamalai T, Liu XS, et al. Experimental infection of a US spike-insertion deletion porcine epidemic diarrhea virus in conventional nursing piglets and cross-protection to the original US PEDV infection. *Vet Res*, 2015, 46: 134.
- [29] Wang LY, Byrum B, Zhang Y. New variant of porcine epidemic diarrhea virus, United States, 2014. *Emerg Infect Dis*, 2014, 20(5): 917–919.
- [30] Yamamoto R, Soma J, Nakanishi M, et al. Isolation and experimental inoculation of an S INDEL strain of porcine epidemic diarrhea virus in Japan. *Res Vet Sci*, 2015, 103: 103–106.
- [31] Park S, Kim S, Song D, et al. Novel porcine epidemic diarrhea virus variant with large genomic deletion, South Korea. *Emerg Infect Dis*, 2014, 20(12): 2089–2092.
- [32] Masuda T, Murakami S, Takahashi O, et al. New porcine epidemic diarrhoea virus variant with a large deletion in the spike gene identified in domestic pigs. *Arch Virol*, 2015, 160(10): 2565–2568.
- [33] Oka T, Saif LJ, Marthaler D, et al. Cell culture isolation and sequence analysis of genetically diverse US porcine epidemic diarrhea virus strains including a novel strain with a large deletion in the spike gene. *Vet Microbiol*, 2014, 173(3/4): 258–269.
- [34] Rasschaert D, Duarte M, Laude H. Porcine respiratory coronavirus differs from transmissible gastroenteritis virus by a few genomic deletions. *J Gen Virol*, 1990, 71(11): 2599–2607.
- [35] Shirato K, Maejima M, Matsuyama S, et al. Mutation in the cytoplasmic retrieval signal of porcine epidemic diarrhea virus spike (S) protein is responsible for enhanced fusion activity. *Virus Res*, 2011, 161(2): 188–193.
- [36] Park SJ, Song DS, Ha GW, et al. Cloning and further sequence analysis of the spike gene of attenuated porcine epidemic diarrhea virus DR13. *Virus Genes*, 2007, 35(1): 55–64.
- [37] Wang K, Lu W, Chen JF, et al. PEDV ORF3 encodes an ion channel protein and regulates virus production. *FEBS Lett*, 2012, 586(4): 384–391.
- [38] Chen X, Zeng LL, Yang JX, et al. Sequence heterogeneity of the ORF3 gene of porcine epidemic diarrhea viruses field samples in Fujian, China, 2010–2012. *Viruses*, 2013, 5(10): 2375–2383.
- [39] Chen FZ, Zhu YX, Wu MZ, et al. Comparative genomic analysis of classical and variant virulent

- parental/attenuated strains of porcine epidemic diarrhea virus. *Viruses*, 2015, 7(10): 5525–5538.
- [40] Chattha KS, Roth JA, Saif LJ. Strategies for design and application of enteric viral vaccines. *Annu Rev Anim Biosci*, 2015, 3: 375–395.
- [41] Paudel S, Park JE, Jang H, et al. Evaluation of antibody response of killed and live vaccines against porcine epidemic diarrhea virus in a field study. *Vet Q*, 2014, 34(4): 194–200.
- [42] Goede D, Murtaugh MP, Nerem J, et al. Previous infection of sows with a "mild" strain of porcine epidemic diarrhea virus confers protection against infection with a "severe" strain. *Vet Microbiol*, 2015, 176(1/2): 161–164.
- [43] Scherba G, Bromfield CR, Jarrell VL, et al. Evaluation of responses to both oral and parenteral immunization modalities for porcine epidemic diarrhea virus in production units. *J Swine Health Prod*, 2016, 24(1): 29–35.
- [44] Song DS, Yang JS, Oh JS, et al. Differentiation of a Vero cell adapted porcine epidemic diarrhea virus from Korean field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF 3. *Vaccine*, 2003, 21(17/18): 1833–1842.
- [45] Cong YY, Li XX, Bai YY, et al. Porcine aminopeptidase N mediated polarized infection by porcine epidemic diarrhea virus in target cells. *Virology*, 2015, 478: 1–8.

(本文责编 郝丽芳)