生 物 工 程 学 报
journals.im.ac.cn
cjb@im.ac.cn

*Chin J Biotech* 2009, October 25; 25(10): 1441-1448
Chinese Journal of Biotechnology ISSN 1000-3061
© 2009 *Institute of Microbiology, CAS & CSM*, All rights reserved

综 述

# 反向遗传学技术在猪瘟病毒研究中的应用

刘大飞, 孙元, 仇华吉

中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室猪传染病研究室, 哈尔滨 150001

**摘 要:** 猪瘟目前在许多国家流行并对养猪业造成巨大损失。虽然常规疫苗(如中国猪瘟兔化弱毒疫苗, 即 C 株)在猪瘟防控中发挥巨大作用, 但近年来在猪瘟防控中出现的新情况, 如非典型感染、持续性感染及免疫失败等; 同时目前世界上许多国家正开展的猪瘟扑灭计划使得弱毒疫苗的应用受到很大限制。因此, 加强猪瘟病毒在致病机理、传播机制等方面的研究以及加快新型猪瘟疫苗的开发是当务之急。近年来, 反向遗传学技术的发展为猪瘟病毒基因功能研究和疫苗制备方面开辟了新思路。以下回顾了反向遗传操作技术在猪瘟病毒基因功能研究与标记疫苗株构建方面的研究进展, 同时提出了该领域目前面临的问题, 并对其未来发展方向进行了展望。

**关键词:** 猪瘟病毒, 反向遗传学技术, 功能研究, 标记疫苗

JOURNALS.IM.AC.CN

# Applications of reverse genetics in studying classical swine fever virus

Dafei Liu, Yuan Sun, and Huaji Qiu

*Division of Swine Infectious Diseases*, *State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology*, *Harbin Veterinary Research Institute*, *Chinese Academy of Agricultural Sciences*, *Harbin* 150001, *China*

**Abstract:** Classical swine fever (CSF), caused by classical swine fever virus (CSFV), has been epidemic or endemic in many countries, and causes great economical losses to pig industry worldwide. Attenuated vaccines (such as C-strain) have played an important role in the control of CSF. Recently some new phenomena appear, such as atypical and persistent infections of CSF, immunization failure and so on. Meanwhile, eradication programs have been implemented in many countries, restricting the widespread applications of attenuated vaccines. Thus, currently the priority is to strengthen the research in pathogenesis and transmission mechanisms, as well as to develop marker vaccines. Recently, the applications of reverse genetics technology open up a new way for research of structure and function of CSFV proteins and development of novel vaccines against CSF. This review focuses on the progress of applications of reverse genetics in the functional analysis and marker vaccine development of CSFV, and also discusses the problems confronted now and prospective aspects in the study of CSFV.

**Keywords**: classical swine fever, reverse genetics, functional analysis, marker vaccine

猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)属于黄病毒科瘟病毒属, 为单股正链 RNA 病毒, 同属的还有牛病毒性腹泻病毒(Bovine viral diarrhea virus, BVDV)和绵羊边界病病毒(Border disease virus,

**Received:** June 14, 2009; **Accepted:** August 17, 2009
**Supported by:** National Program on Key Basic Research Project (973 Program)(No. 2005CB523202).
**Corresponding author:** Huaji Qiu. Tel/Fax: +86-451-85935041; E-mail: huajiqiu@hvri.ac.cn
国家重点基础研究发展规划(973 计划)(No. 2005CB523202)资助。

BDV)等成员。病毒基因组约 12.3 kb, 由 3 部分组成: 两端分别为 5′端非编码区(5′-untranslated region, 5′-UTR)和 3′端非编码区(3′-UTR), 中间包含一个大的开放阅读框(Opening reading frame, ORF)。ORF 编码一个由 3898 个氨基酸残基组成的多聚蛋白。该多聚蛋白在病毒感染的宿主细胞内, 受宿主或病毒特有的蛋白酶的水解作用, 可裂解为 12 种病毒特异性蛋白, 包括 4 种病毒结构蛋白(C、$E^{rns}$、E1 和 E2)和 8 种非结构蛋白($N^{pro}$、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B)。

猪瘟(Classical swine fever, CSF)是由CSFV引起的严重危害养猪业的烈性传染病[1-2], 被世界动物卫生组织(Office International des Epizooties, OIE)列为须报告动物传染病。该病自 1833 年于美国俄亥俄州首次发现以来, 百余年来其流行几乎遍及全球[3-4]。疫苗接种是发展中国家防控猪瘟的主要措施。目前应用最广泛的主要为猪瘟弱毒疫苗, 包括中国猪瘟兔化弱毒疫苗(C 株)、日本 $GPE^-$疫苗和法国的 Thiverval 疫苗。但是, 近年来猪瘟疫苗质量难以保证(主要是滴度不够和污染 BVDV), 常常造成免疫失败, 不能有效预防猪瘟; 同时鉴于猪瘟流行和发病特点的变化, 及适应生猪对外贸易的需要, 一方面应加强对猪瘟病毒分子流行病学、病毒复制及其调控等领域的研究; 另一方面研制安全有效、并可区分动物自然感染与疫苗免疫(Differentiating infected from vaccinated animals, DIVA)的标记疫苗已势在必行[5]。

猪瘟病毒属于RNA病毒, 利用经典遗传学对其基因组进行操作十分困难, 而反向遗传学技术解决了这一难题, 为猪瘟病毒的致病机制研究和新型猪瘟疫苗的研制提供了有效技术平台。以下主要从反向遗传学技术在猪瘟病毒基因功能研究中的应用及减毒活疫苗株拯救与标记疫苗株的研制等方面进行阐述。

## 1 反向遗传学技术概述

反向遗传学技术是指通过构建感染性分子克隆在DNA水平上进行分子操作, 从而研究病毒结构与功能的方法。感染性分子克隆包括感染性 cDNA 和感染性体外转录本。感染性 cDNA 主要是通过 RT-PCR 扩增 RNA 病毒基因组的 cDNA 片段, 然后利用其限制性酶切位点将各 cDNA 片段顺次相连并克隆于合适的载体中, 获得基因组全长 cDNA 克隆, 以其转染适当细胞, 全长 cDNA 在细胞内被转录并包装成感染性病毒粒子。而感染性体外转录本也是在获得病毒基因组全长 cDNA 基础上, 进行体外转录, 获得基因组全长 RNA, 用此 RNA 转染适当细胞以拯救出感染性病毒粒子。获得 RNA 病毒的感染性分子克隆后, 就可以在 DNA 水平上通过突变、缺失、插入和互补等手段来研究 RNA 病毒的基因结构和功能、RNA 的自发重组和诱导重组、RNA 病毒与宿主的相互作用(如病毒-细胞间的传递机制)等, 也可进行抗病毒策略研究, 还可用于构建新的病毒载体。

## 2 反向遗传学技术在猪瘟病毒研究中的应用

### 2.1 在猪瘟病毒基因功能研究中的应用

反向遗传学技术使得研究者可以通过对病毒基因组进行操作来快速定位病毒的致病因素、确定病毒侵入途径和传播机制等。

#### 2.1.1 *致病基因的研究*

通常认为, 猪瘟病毒 $E^{rns}$ 具有 RNase 催化活性, 与致病力有关, 但并非 CSFV 复制所必需。有研究者通过定点突变技术替换或缺失了 $E^{rns}$ 上其 RNase 活性区中的 $^{346}$His 和/或 $^{297}$His 后, 所得到的 RNase 阴性病毒均被致弱, 其中涉及 $^{346}$His 的所有突变病毒完全没有致病性(不引起 B 细胞数量减少, 不返祖), 而仅改变 273 位则引起临床症状几天后康复[6]。但 Freyburg 等[7]则证实这属于个案, 不代表 RNase 阴性病毒的一般特征, 他们用野生型和 RNase 阴性猪瘟病毒感染猪时, 均发现总白细胞减少, 不同亚群的细胞数(如 T 淋巴细胞、单核细胞和粒细胞)也减少。与 B 细胞结果类似, 野生型和 RNase 阴性病毒在感染初期, 在细胞数上的变化没有明显差异; 稍后 RNase 阴性病毒感染猪的细胞数则恢复到感染前的水平, 而野生型病毒感染猪的细胞数则维持在较低水平。但体内病毒载量存在很大差异, 野生型

病毒含量很高, RNase 阴性病毒含量则低, 致死率低, 但返祖后其毒力变强。因此推测毒力的强弱与 $E^{rns}$ 编码基因的存在有关。

猪瘟病毒的 $E^{rns}$ 主要以同源二聚体的形式存在于病毒粒子和感染细胞中。Tews 等研究发现, 将 $E^{rns}$ RNase 活性区的 $^{171}$Cys 突变, 能够抑制同源二聚体的形成, 从而导致病毒毒力减弱[8]。而 Mayer 等的研究结果与之恰恰相反, 该研究认为存在于猪瘟病毒 $E^{rns}$ 基因的突变对猪瘟病毒的毒力影响不大[9]。

研究表明, 在体内病毒糖蛋白可以影响病毒感染性[10]、病毒毒力[11]及宿主免疫反应[12]。Risatti 等将猪瘟病毒减毒疫苗株 CS 株和强毒株 Brescia 株基因组的相应区域进行替换后, 对构建一系列嵌合病毒研究表明, 只有包含 CS 株 E2 蛋白的嵌合病毒对猪体毒力减弱, 因而确定了 E2 蛋白是猪瘟病毒毒力的决定因素之一[13]。同样, 将猪瘟病毒 E1 蛋白 C 末端插入 19 个氨基酸后构建的重组病毒, 在原代猪巨噬细胞上的生长特性没有改变, 但其对猪只的毒力显著下降, 猪接种后不表现临床症状, 与其亲本株(接种猪 100%死亡)形成明显对比[14]。二者结果均证实, 不仅仅流感病毒的糖蛋白可以影响病毒毒力, 在猪瘟病毒中这种情况同样存在。

很多研究表明, 猪瘟病毒的囊膜蛋白在病毒吸附与靶细胞入侵、抗体产生、诱导保护性免疫反应及病毒毒力等方面发挥作用。Risatti 等研究发现, 存在于 E2 蛋白中 116 位的 N-糖基化位点在猪瘟病毒毒力减弱方面发挥重要作用, 而存在于 185 位的 N-糖基化位点对于病毒活性至关重要[15]。对于同为猪瘟病毒囊膜蛋白的 $E^{rns}$, Fernandez-Sainz 等研究证实, 269 位 N-糖基化位点突变(A269Q)将会导致病毒毒力减弱[16]; 而对 E1 蛋白的 3 个潜在 N-糖基化位点($N^{500}$、$N^{513}$ 和 $N^{594}$)进行修饰后发现: 如果将这 3 个位点同时突变, 不能获得子代病毒; 如果将 $N^{500}$ 和 $N^{513}$ 同时突变或者单独将 $N^{594}$ 突变, 获得的子代病毒毒力减弱[17]。这些研究显示, 囊膜蛋白的 N-糖基化位点与猪瘟病毒毒力具有密切关系。

Bauhofer 等[18]和 Seago 等[19]研究表明, 猪瘟病毒的 $N^{pro}$ 能够与干扰素调节因子 3(Interferon regulatory factor 3, IRF3)相互作用, 导致 IRF3 被蛋白酶降解, 从而抑制 IFN-α/β的产生。Ruggli 等[20]将猪瘟病毒整个 $N^{pro}$ 基因删除, 导致病毒在猪体上毒力减弱。为了深入研究 $N^{pro}$ 介导的 IRF3 降解作用在猪瘟病毒致病机理方面所发挥的作用, 该研究组分别将 $N^{pro}$ 基因的某几个氨基酸进行替换(这几个位点的替换可以降低 IRF3 降解作用)。研究结果证明, 对 IRF3 依赖的 IFN-α/β诱导作用的削弱并非猪瘟病毒毒力所必需[21]。

**2.1.2** *病毒复制的研究*

猪瘟病毒 $N^{pro}$ 不参与其他结构蛋白和非结构蛋白的加工, 而其在病毒复制过程中具体的功能目前也尚不清楚。Tratschin 等将 CSFV Alfort/187 株 $N^{pro}$ 基因用小鼠泛素基因替换后, 对构建的重组病毒研究发现, 重组病毒与亲本株在 SK6 细胞中的生长特性基本一致。据此推测, $N^{pro}$ 基因并非病毒体外培养所必需[22]。

猪瘟病毒非结构蛋白 NS2 和 NS3 是瘟病毒中最为保守的区域, 在猪瘟病毒与宿主细胞的相互作用中可能发挥重要作用。Moser 等在其构建的 Alfort/187 株感染性克隆 A187-1 和 A187-CAT 基础上, 分别删除 p7 和 E2 等基因构建了一系列突变株。对突变株进行研究发现, $N^{pro}$、C、$E^{rns}$、E1、E2、p7 和 NS2 等基因并非 RNA 复制所必需, 只是随着缺失基因的不同, RNA 复制效率会发生很大变化。包含完整 NS2-NS3 基因的 RNA 复制子能持续存在于转染的细胞中继续复制, 但不会对细胞形态和功能造成破坏; 如果只是 NS2 基因发生缺失, 则病毒复制效率提高并且会引起细胞病变, 这提示, 虽然 NS2 非 RNA 复制所必需, 但具有一定调节功能[23]。

目前, 有关非编码区与病毒毒力的关系以及其在病毒减毒机制中的作用方面的研究较少。Kolupaeva 等将猪瘟病毒 IRES 功能区 II 区删除后会降低病毒翻译效率, 但是这种降低只是轻微的[24]。Moser 等将 Alfort/187 株 5′-UTR IRES 区域插入 44 个核苷酸后, 经体内转录获得的 RNA 可以感染猪瘟病毒的易感细胞, 且重组病毒的复制动力学与亲本株无差别。有趣的是, 重组病毒经体外细胞培养传代之后, 插入的 44 个核苷中有 29 个丢失。经过分析, 研究者认为是这 44 个核苷酸的插入破坏了病毒复制过

程中极为重要的“茎-环结构”和“假节结构”[25]。

**2.1.3** *病毒进入机制的研究*

猪瘟病毒在体内增殖与体外增殖所产生病毒颗粒的表面性质存在差异，这种差异主要是由于体外培养所用细胞环境单一，而体内增殖受不同细胞因子和各种酶的作用而致。Hulst 等研究证实，猪瘟病毒在体外细胞培养时，主要以硫酸乙酰肝素(Heparan sulfate, HS)为 $E^{rns}$ 结合受体，而以 HS 为 $E^{rns}$ 结合受体的毒株，在 $E^{rns}$ C 端的 476 位氨基酸发生突变[26]。

研究表明，瘟病毒的 $E^{rns}$ 蛋白的 RNase 活性包括病毒的复制和致病性两个方面。$E^{rns}$ 蛋白在病毒粒子中以同源二聚体形式存在于囊膜表面，且二聚体通过 C 端半胱氨酸连接。为了研究该二聚体在病毒复制中的功能，van Gennip 等[27]将第 438 位氨基酸进行突变(C438S)，突变体只能表达单体 $E^{rns}$，表明 438 位半胱氨酸对于同源二聚体的形成是必要的，该研究同时发现，突变体对 HS 的亲和力降低。

**2.2** 在研制猪瘟病毒减毒活疫苗株中的应用

目前，世界范围内用于猪瘟防控的疫苗主要为 C 株，但该疫苗在生产和应用中存在很多问题，所以研制新型疫苗迫在眉睫，反向遗传学技术为此提供了高效技术平台。

之前研究表明，猪瘟病毒 $N^{pro}$ 基因缺失将导致病毒毒力下降，这为猪瘟病毒减毒活疫苗株的构建提供了新思路。Mayer 等分别将 CSFV Alfort/187 株和 Eystrup 株 $N^{pro}$ 基因缺失后，发现重组病毒与亲本株相比，二者毒力均减弱；而将它们分别免疫猪只，均可诱导猪体产生良好的抗体反应，并且均能保护猪只抵抗致死剂量强毒的攻击。该研究表明，将 CSFV 株 $N^{pro}$ 基因缺失可达到构建减毒活疫苗的目的[28]。

据推测，C 株较石门株毒力减弱的原因可能在于其 3′端非编码区有 12 个核苷酸(CTTTTTTCTTTT)插入。Xiao 等研究发现，如果删除 C 株 3′-UTR 插入的 12 个核苷酸，病毒 RNA 合成会增加；相反在石门株 3′-UTR 引入这 12 个核苷酸，会导致病毒 RNA 合成降低。该研究进一步提示可能由于这 12 个核苷酸的插入导致石门株毒力减弱。同时研究发现，如果将 C 株 3′-UTR 插入的这 12 个核苷酸删除，其 3′-UTR 二级结构将会更加稳定；相比之下，引入这 12 个核苷酸的石门株的 3′-UTR 二级结构变得不稳定[29]。受此启发，王毅等[30]在石门株感染性克隆 pT7SM 的 3′-UTR 的第 61 位插入此 12 个连续核苷酸或者用 C 株的 3′-UTR 替换掉 pT7SM 的相应区域，得到 2 株嵌合病毒 vT7SM3′-+12 和 vT7SM3′-239，与亲本株相比，二者病毒滴度均降低 100 倍左右；感染和攻毒试验表明，2 株嵌合病毒均对猪只毒力减弱，均可诱导猪只产生中和抗体，并保护猪只抵抗致死剂量的猪瘟病毒强毒的攻击[31]。该研究开辟了构建猪瘟病毒减毒活疫苗株的新途径。

**2.3** 在猪瘟病毒标记活疫苗株构建中的应用

与传统疫苗相比，利用反向遗传学技术构建的减毒标记疫苗的优点显而易见。标记疫苗不但应具备稳定、安全和长效等优点，同时在免疫动物后，通过与之相配套的检测方法，可以将免疫动物和自然感染动物区分开来。这样一方面可减少在执行猪瘟扑灭计划时的大量错杀导致的经济损失，另一方面又可及早发现感染动物，以便及时采取措施控制疫情。目前利用反向遗传学技术在研制猪瘟病毒标记疫苗方面取得较大研究进展。

**2.3.1** *基于猪瘟病毒 C 株的标记疫苗株*

由于 C 株具有公认的优良免疫特性，因而许多研究者对 C 株进行改造，期望得到带标记的减毒活疫苗。Moormann 等最先开展了猪瘟病毒感染性分子克隆和标记疫苗的研究，该研究组用 Brescia 株 E2 基因 5′端编码主要抗原结构域的序列置换 C 株 E2 基因的相应序列，得到了抗原性不同于亲本 C 株的重组病毒 Flc-h6 株。Flc-h6 与亲本病毒在细胞培养上的生长特性相同，但可用能区分 Brescia 株和 C 株 E2 蛋白 N 端的不同特异性单抗进行鉴别[32]。之后的兔体和猪体接种试验证实，该重组病毒仍然保持非致病性和良好免疫原性。

$E^{rns}$ 具有 RNase 活性，改变或缺失 RNase 的活性位点可导致病毒毒力减弱。Widjojoatmoajo 等构建 2 株感染性 C 株 $E^{rns}$ 缺失突变株 FL22 和 FL23。猪只接种该突变体疫苗后能抵抗致死剂量 Brescia 株强毒的攻击。由于缺失 $E^{rns}$，免疫后检测不到 $E^{rns}$ 抗体，

因此可用作标记疫苗来鉴别动物是野毒感染与疫苗免疫[33]。

由于 E2 蛋白能诱导产生中和抗体, 从而导致猪体能够抵御致死性 CSF 强毒的攻击, 因而 E2 蛋白被认为是最具免疫原性的糖蛋白[34-35]。很多研究者对该基因进行修饰, 用于构建疫苗株。van Gennip 等分别将 C 株 E2 基因的不同区域氨基酸缺失, 构建了 3 株突变株 Flc4、Flc47 和 Flc48。以此 3 个突变株分别皮内接种猪只, 结果只有 Flc4 能完全保护动物抵抗 CSFV 致死性强毒攻击, 而 Flc47 及 Flc48 只能提供部分保护。同时此重组病毒可用基于 E2 蛋白的血清学方法进行鉴别诊断, 因而 Flc4 株具备成为标记疫苗的潜力[36]。

**2.3.2** *基于猪瘟病毒强毒株的标记疫苗株*

许多病毒感染性克隆的构建都以细菌的氯霉素乙酰转移酶(CAT)作为报告基因, 如流感病毒等。Moser 等将 CAT 基因引入 CSFV 感染性 cDNA 中, 产生的重组克隆 pA187-CAT 仍保持感染性, 同时检测到预期的 CAT-$N^{pro}$ 聚合蛋白既保留 CAT 基因的活性, 也保留 $N^{pro}$ 基因的蛋白裂解酶活性[37]。

Frey 等将 Alfort/187 株的 $E^{rns}$ 基因缺失, 构建了可在 SK6 细胞中复制而不能产生子代病毒的猪瘟复制子颗粒 A187del$E^{rns}$, 并对 A187del$E^{rns}$ 经皮内注射和口服两种方式免疫猪只的效果进行评价, 经检测皮内注射可刺激猪只产生针对猪瘟 E2 基因的特异性抗体, 但检测不到针对 $E^{rns}$ 的特异性抗体, 并且免疫猪可完全抵御猪瘟病毒 Eystrup 株的攻击, 为猪瘟病毒新型标记疫苗研制开辟了新思路[38]。

研究表明, E2 是猪瘟病毒毒力的决定因素之一, 已经确定 E2 蛋白上的表位 $^{829}$TAVSPTTLR$^{837}$ 是影响猪瘟病毒毒力的重要位点[13]。Holinka 等在此基础之上, 开展猪瘟病毒减毒标记疫苗株的研究。他们在 Brescia 株感染性克隆中引入“阴、阳双标签”: 即将猪瘟病毒 E2 蛋白的表位(第 829~834 位氨基酸)由 TAVSPT 突变为 TSFNMD 作为“阴性标签”, 在 E1 基因羧基端插入 19 个氨基酸的 Flag 标签作为阳性标签。该研究既可使猪瘟病毒毒力减弱, 又可达到 DIVA 的目的, 是构建猪瘟减毒标记疫苗的又一尝试[39]。

**2.3.3** *基于嵌合猪瘟病毒的标记疫苗株*

嵌合猪瘟病毒标记疫苗株是在基因组感染性克隆的基础上, 将不同病毒抗原基因嵌合在一起, 构建嵌合病毒粒子, 从而达到构建重组疫苗株的目的。这样做有以下两方面优点:

1)开发二价/多价疫苗株: 张淼涛等[40]将猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV) GP5 基因插入 CSFV $N^{pro}$ 基因的起始密码子 ATG 之后, 构建了重组猪瘟病毒, GP5 基因在重组病毒连续传代 10 代后仍然稳定存在。因而该重组体可望用于开发同时预防 CSF 和 PRRS 的二价标记疫苗。

2)开展猪瘟的鉴别诊断: van Gennip 等[41]分别用 BVDV 5250 株的 E2 的 N-端抗原域编码区和完整 $E^{rns}$ 基因替换 C-株的相应区域, 得到了重组病毒 Flc-9 和 Flc-11。将二者免疫猪只后, 可以抵抗强毒攻击, 并且可用检测 CSFV 的 $E^{rns}$/E2 抗体的 ELISA 区别 Flc-9 或 Flc-11 免疫猪与 CSFV 野毒感染猪, 也可用检测 BVDV 的 $E^{rns}$/E2 抗体 ELISA 区分 CSFV 和 BVDV 感染猪。

Hofmann 等将重组克隆 pA187-CAT 的 5′-UTR 和 IRES 分别用 BVDV 的相应区域替换后, 构建嵌合病毒 vA187CAT-5UTRBVD 和 vA187CAT-IRESBVD, 并且同时建立了同时检测 CAT 基因和 5′-UTR 的实时定量 RT-PCR 方法[42]。同年, Reimann 等[43]将 BVDV CP7 株 E2 基因用 CSFV Alfort/187 株的 E2 基因替换后, 构建了嵌合病毒 CP7-⊿E2PacI。研究发现, CP7-⊿E2PacI 可以保护猪只免于 CSFV 的致死性感染。免疫动物攻毒试验发现, 该重组病毒可以完全保护动物免于 CSFV 强毒的攻击。对免疫后 3 周动物的血清进行 ELISA 检测, 结果只能检测到针对 CSFV E2 蛋白的特异性抗体, 而检测不到针对 CSFV $E^{rns}$ 蛋白的抗体。因而, 该重组病毒是一株安全、有效的标记疫苗候选株[44]。受此启发, Wehrle 等将 CSFV Riems 株(由 C 株衍生而来)E2 基因的 3 个抗原区单个或者完全用 BDV Gifhorn 株相应氨基酸序列替换后, 发现嵌合病毒 vRiems-ABC-Gif 和 vRiems-BC-Gif 可以在 SK6 细胞中传代增殖, 而且还可通过特异性单抗鉴别诊断野毒感染与疫苗接种动物。同时, 以口服和肌注两种方式对

vRiems-ABC-Gif 的免疫效果进行评价，结果表明，口服接种 vRiems-ABC-Gif 的猪只部分得到保护，而肌注接种的猪只完全得到保护，并且血清学检测不到二者产生针对 E2 的特异性抗体。该研究为开发标记疫苗奠定了基础[45]。BDV 与 CSFV 同属瘟病毒，因而 Rasmussen 等将 BDV Gifhorn 株的 E2 基因插入到 pA/CP7-⊿E2PacI 中，构建出嵌合病毒 CP7-E2gif。用哨兵动物通过水平感染的方式研究疫苗安全性发现，该嵌合病毒对易感动物不具有感染性，攻毒保护试验显示，该嵌合病毒可以保护猪只抵抗猪瘟强毒的攻击。该研究的创新之处在于：一方面研究者利用瘟病毒之间的血清学交叉反应性构建出“非猪瘟病毒”疫苗株用于猪瘟的防控；另一方面可用针对 BDV E2 基因的 IFA 与猪瘟鉴别诊断[46]。

## 3 结语

反向遗传学技术为研究猪瘟病毒开辟了新途径，利用该技术可以了解病毒生命活动过程中的各种调控机制[47]，可以很容易地对病毒的复制及致病性分子机理进行研究，从而开发相应的抗病毒药物。同时由于猪瘟病毒属于 RNA 病毒，较之 DNA 病毒载体，其生命活动中不经历 DNA 阶段，不会整合至宿主细胞染色体引起低水平表达或基因沉默，不会改变宿主的遗传性状等，这些优势使得猪瘟病毒用作新型载体成为可能。反向遗传操作技术最具潜力、最吸引人的应用在于新型疫苗株的筛选，其优越性一方面在于可以解决疫苗研制的时效问题，另一方面可以通过体外基因修饰的方式，将决定毒力的基因删除同时又可引入分子标记以研制标记疫苗。

目前，对猪瘟病毒非结构蛋白的定位已经清楚，除 $N^{pro}$ 外，编码其他非结构蛋白序列位于基因组 3′端 2/3 部分。对主要非结构蛋白(NS3 和 NS5B)结构与功能进行了深入研究，但对于猪瘟病毒其他非结构蛋白的确切功能，如它们是不是病毒复制酶的成分？它们在对抗宿主细胞抗病毒防御中的作用如何？E2-p7 对猪瘟病毒在自然宿主适应性方面发挥何种作用？NS3-4A、NS4B 和 NS5A 如何相互作用形成复制复合体？RdRp(NS5B)的晶体结构如何？非编码区与病毒复制和毒力的关系如何？这些都值得深入研究。

反向遗传学技术的出现在病毒功能研究及疫苗研制等方面有着巨大的理论与实践意义，然而反向遗传学技术也是一把“双刃剑”，在有效地利用它的同时，应当警惕其可能产生的危害，加强生物安全方面的管理，避免“制造”出对动物生产和人类健康造成威胁的病毒株。

## REFERENCES


[1] Paton DJ, Greiser-Wilke I. Classical swine fever—an update. *Res Vet Sci*, 2003, **75**(3): 169–178.

[2] Moennig V. Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy. *Vet Microbiol*, 2000, **73**(2/3): 93–102.

[3] Artois M, Depner KR, Guberti V, *et al*. Classical swine fever (hog cholera) in wild boar in Europe. *Rev Sci Tech*, 2002, **21**(2): 287–303.

[4] Edwards S, Fukusho A, Lefevre PC, *et al*. Classical swine fever: the global situation. *Vet Microbiol*, 2000, **73**(2/3): 103–119.

[5] van Oirschot JT. Vaccinology of classical swine fever: from lab to field. *Vet Microbiol*, 2003, **96**(4): 367–384.

[6] Meyers G, Saalmuller A, Buttner M, *et al*. Mutations abrogating the RNase activity in glycoprotein $E^{rns}$ of the pestivirus classical swine fever virus lead to virus attenuation. *J Virol*, 1999, **73**(12): 10224–10235.

[7] Freyburg MV, Ege A, Saalmüller A, *et al*. Comparison of the effects of RNase-negative and wild-type classical swine fever virus on peripheral blood cells of infected pigs. *J Gen Virol*, 2004, **85**(7): 1899–1908.

[8] Tews BA, Schürmann EM, Meyers G. Mutation of cysteine 171 of pestivirus $E^{rns}$ RNase prevents homodimer formation and leads to attenuation of classical swine fever virus. *J Virol*, 2009, **83**(10): 4823–4834.

[9] Mayer D, Thayer TM, Hofmann MA, *et al*. Establishment and characterization of two cDNA-derived strains of classical swine fever virus, one highly virulent and one avirulent. *Virus Res*, 2003, **98**(2): 105–116.

[10] Abe Y, Takashita E, Sugawara K, *et al*. Effect of the addition of oligosaccharides on the biological activities and antigenicity of influenza A/H3N2 virus hemagglutinin. *J Virol*, 2004, **78**(10): 9605–9611.

[11] Hulse, DJ, Webster RG, Russell RJ, *et al*. Molecular determinants within the surface proteins involved in the pathogenicity of H5N1 influenza viruses in chickens. *J Virol*, 2004, **78**(10): 9954–9964.

[12] Panda A, Elankumaran S, Krishnamurthy S, *et al*. Loss of N-linked glycosylation from the hemagglutinin-neuraminidase protein alters virulence of Newcastle disease virus. *J Virol*, 2004, **78**(10): 4965–4975.

[13] Risatti GR, Borca MV, Kutish GF, *et al*. The E2 glycoprotein of classical swine fever virus is a virulence determinant in swine. *J Virol*, 2005, **79**(6): 3787–3796.

[14] Risatti GR, Holinka LG, Lu Z, *et al*. Mutation of E1 glycoprotein of classical swine fever virus affects viral virulence in swine. *Virology*, 2005, **343**(1): 116–127.

[15] Risatti GR, Holinka LG, Fernandez-Sainz I, *et al*. N-linked glycosylation status of classical swine fever virus strain Brescia E2 glycoprotein influences virulence in swine. *J Virol*, 2007, **81**(2): 924–933.

[16] Fernandez-Sainz I, Holinka LG, Lu Z, *et al*. Removal of a N-linked glycosylation site of classical swine fever virus strain Brescia $E^{rns}$ glycoprotein affects virulence in swine. *Virology*, 2008, **370**(1): 122–129.

[17] Fernandez-Sainz I, Holinka LG, Gavrilov BK, *et al*. Alteration of the N-linked glycosylation condition in E1 glycoprotein of classical swine fever virus strain Brescia alters virulence in swine. *Virology*, 2009, **386**(1): 210–216.

[18] Bauhofer O, Summerfield A, Sakoda Y, *et al*. Classical swine fever virus $N^{pro}$ interacts with interferon regulatory factor 3 and induces its proteasomal degradation. *J Virol*, 2007, **81**(7): 3087–3096.

[19] Seago J, Hilton L, Reid E, *et al*. The $N^{pro}$ product of classical swine fever virus and bovine viral diarrhea virus uses a conserved mechanism to target interferon regulatory factor-3. *J Gen Virol*, 2007, **88**(11): 3002–3006.

[20] Ruggli N, Tratchin JD, Schweizer M, *et al*. Classical swine fever virus interferes with cellular antiviral defense: evidence for a novel function of $N^{pro}$. *J Virol*, 2003, **77**(13): 7645–7654.

[21] Ruggli N, Summerfield A, Fiebach AR, *et al*. Classical swine fever virus can remain virulent after specific elimination of the interferon regulatory factor 3 degrading function of $N^{pro}$. *J Virol*, 2009, **83**(2): 817–829.

[22] Tratschin JD, Moser C, Ruggli N, *et al*. Classical swine fever virus leader proteinase $N^{pro}$ is not required for viral replication in cell culture. *J Virol*, 1998, **72**(9): 7681–7684.

[23] Moser C, Stettler P, Tratschin JD, *et al*. Cytopathogenic and noncytopathogenic RNA replicons of classical swine fever virus. *J Virol*, 1999, **73**(9): 7787–7794.

[24] Kolupaeva VG, Pestova TV, Hellen CU. Ribosomal binding to the internal ribosomal entry site of classical swine fever virus. *RNA*, 2000, **6**(12): 1791–1807.

[25] Moser C, Bosshart A, Tratschin JD, *et al*. A recombinant classical swine fever virus with a marker insertion in the internal ribosome entry site. *Virus Gene*, 2001, **23**(1): 63–68.

[26] Hulst MM, van Gennip HGP, Moormann RJM. Passage of classical swine fever virus in cultured swine kidney cells selects virus variants that bind to heparan sulfate due to a single amino acid change in envelope protein $E^{rns}$. *J Virol*, 2000, **74**(20): 9553–9561.

[27] van Gennip HG, Hesselink AT, Moormann RJ, *et al*. Dimerization of glycoprotein $E^{rns}$ of classical swine fever virus is not essential for viral replication and infection. *Arch Virol*, 2005, **150**(11): 2271–2286.

[28] Mayer D, Hofmann MA, Tratschin JD. Attenuation of classical swine fever virus by deletion of the viral $N^{pro}$ gene. *Vaccine*, 2004, **22**(3-4): 317–328.

[29] Xiao M, Gao J, Wang Y, *et al*. Influence of a 12-nt insertion present in the 3′ untranslated region of classical swine fever virus HCLV strain genome on RNA synthesis. *Virus Res*, 2004, **102**(2): 191–198.

[30] Wang Y, Wu HX, Zhang CY, *et al*. Construction and pathogenicity of infectious cDNA clone of classical swine fever virus (CSFV). C*hin J Virol*, 2005, **21**(1): 43–47.
王毅, 吴海祥, 张楚瑜, 等. 猪瘟病毒感染性 cDNA 克隆的构建及其致病性. 病毒学报, 2005, **21**(1): 43–47.

[31] Wang Y, Wang Q, Lu XL, *et al*. 12-nt insertion in 3′ untranslated region leads to attenuation of classic swine fever virus and protects host against lethal challenge. *Virology*, 2008, **374**(2): 390–398.

[32] Moormann RJM, van Gennip HGP, Miedema GKW, *et al*. Infectious RNA transcribed from an engineered full-length cDNA template of the genome of a pestivirus. *J Virol*, 1996, **70**(2): 763–770.

[33] Widjojoatmoajo MN, Van Gennip HGP, Bouma A, *et al*. Classical swine fever virus $E^{rns}$ deletion mutants: trans-complementation and potential use as nontransmissible, modified, live-attenuated marker vaccines. *J Virol*, 2000, **74**(7): 2973–2980.

[34] Weiland E, Stark R, Haas B, *et al*. Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. *J Virol*, 1990, **64**(8): 3563–3569.

[35] König M, Lengsfeld T, Pauly T, *et al*. Classical swine fever virus: independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins. *J Virol*, 1995, **69**(10): 6479–6486.

[36] van Gennip HG, Bouma A, van Rijn PA, *et al*. Experimental non-transmissible marker vaccines for classical swine fever (CSF) by trans-complementation of $E^{rns}$ or E2 of CSFV. *Vaccine*, 2002, **20**(11/12): 1544–1556.

[37] Moser C, Tratschin JD, Hofmann MA. A recombinant classical swine fever virus stably expresses a marker gene. *J Virol*, 1998, **72**(6): 5318–5322.

[38] Frey CF, Barhofer O, Ruggli N, *et al*. Classical swine fever virus replicon particles lacking the $E^{rns}$ gene: a potential marker vaccine for intradermal application. *Vet Res*, 2006, **37**(5): 655–670.

[39] Holinka L G, Fernandez-Sainz I, O'Donnell V, *et al*. Development of a live attenuated antigenic marker classical swine fever vaccine. *Virology*, 2009, 384 (1): 106–113.

[40] Zhang MT. Infectivity resume of the full-length clone of C strain and the construction of its marker vaccine. Yangling: Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry,

2005.
张淼涛. 猪瘟病毒C-株全长cDNA感染性的恢复及其标记疫苗的构建. 杨凌: 西北农林科技大学, 2005.

[41] van Gennip HG, van Rijn PA, Widjojoatmodjo MN, *et al.* Chimeric classical swine fever viruses containing envelope protein $E^{rns}$ or E2 of bovine viral diarrhoea virus protect pigs against challenge with CSFV and induce a distinguishable antibody response. *Vaccine*, 2000, **19**(4/5): 447–459.

[42] Hofmann MA. Construction of an infectious chimeric classical swine fever virus containing the 5'UTR of bovine viral diarrhea virus, and its application as a universal internal positive control in real-time RT-PCR. *J Virol Methods*, 2003, **114**(1): 77–90.

[43] Reimann I, Depner K, Trapp S, *et al.* An avirulent chimeric pestivirus with altered cell tropism protects pigs against lethal infection with classical swine fever virus. *Virology*, 2004, **322**(1): 143–157.

[44] Koenig P, Lange E, Reimann I, *et al*. CP7-E2alf: a safe and efficient marker vaccine strain for oral immunization of wild boar against classical swine fever virus (CSFV). *Vaccine*, 2007, **25**(17): 3391–3399.

[45] Wehrle F, Renzullo S, Faust A, *et al*. Chimeric pestiviruses: candidates for live-attenuated classical swine fever marker vaccines. *J Gen Virol*, 2007, **88**(8): 2247–2258.

[46] Rasmussen TB, Uttenthal Å, Reimann I, *et al.* Virulence, immunogenicity and vaccine properties of a novel chimeric pestivirus. *J Gen Virol*, 2007, **88**(2): 481–486.

[47] Myung J, Khalap N, Kalkeri G, *et al*. Inducible model to study negative strand RNA synthesis and assembly of HCV from a full-length cDNA clone. *J Virol Methods*, 2001, **94**(1/2): 55–67.

## 科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

### 抗病毒天然免疫

(现代生物技术前沿丛书)
舒红兵 主编
**978-7-03-025488-7 ￥68.00 2009年9月 出版**

天然免疫，又称固有免疫(Innate immunity)，是宿主抵抗病毒感染的第一道防线，也是激活适应性免疫的基础，在宿主清除病毒的免疫反应中具有关键作用。本书对抗病毒天然免疫这一生物医学的热点领域的最新研究成果做了比较深入的介绍，包括病毒的感染与复制，宿主限制因子介导的内源性免疫，模式识别受体介导的抗病毒天然免疫，补体系统、NK和NKT细胞在抗病毒天然免疫中的作用，抗病毒天然免疫与适应性免疫的关系及病毒逃逸免疫反应的机制等。

本书对病毒学、免疫学及细胞生物学等领域的科学工作者、研究生、本科生、感染性疾病防治领域的医务工作者和相关科技管理人员都具有重要的参考价值。

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书（免邮费）
邮购地址：北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编： 100717
联系人：李韶文（010-64000849） 周文宇（010-64031535）
更多精彩图书请登陆网站 http://www.lifescience.com.cn，欢迎致电索要书目