

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.7.11

反向遗传操作技术在瘟病毒属研究中的应用

洪焜¹,刁乃超¹,李建明²,时坤^{2*},杜锐^{2,3*}

(1.吉林农业大学动物科技技术学院,长春 130118;2.吉林农业大学中药材学院,长春 130118;

3.教育部动物生产及产品质量安全重点实验室,吉林省梅花鹿生产与产品应用研究室,长春 130118)

[收稿日期] 2017-01-17 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 07-0057-07 [中图分类号] S852.65

[摘要] 反向遗传操作技术已经成为研究瘟病毒属的一条有效的途径。针对反向遗传技术在瘟病毒属基因结构和功能研究、致病机制研究和新型疫苗研制中的应用以及瘟病毒属的感染性克隆策略的选择进行了综述,以期预防、控制和消灭瘟病毒属病毒提供参考。

[关键词] 反向遗传操作技术;瘟病毒属;致病机制;应用

Application of Reverse Genetics Technology in *Pestivirus* Research

HONG Kun¹, DIAO Nai-chao¹, LI Jian-ming², SHI Kun^{2*}, DU Rui^{2,3*}

(1. College of Animal Science & Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. College of Chinese Medicine Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

3. Key Laboratory of Animal Production, Product Quality and Security, Ministry of Education of the People's Republic of China, Laboratory of Production and Product Application of Sika Deer of Jinlin Province, Changchun 130118, China)

Corresponding author: SHI Kun, E-mail: sk1981521@126.com; DU Rui, E-mail: 104974602@qq.com

Abstract: In this paper, the application of reverse genetics in the study of the structure and function, the pathogenic mechanisms, the novel vaccines of *Pestivirus*, and the selection of infectious cloning strategies of *Pestivirus* has reviewed in order to provide reference for the prevention, control and eradication of *Pestivirus*.

Key words: reverse genetics technology; *Pestivirus*; pathogenesis; application

瘟病毒属(*Pestivirus*)属于黄病毒科(*Flaviviridae*),包括典型的猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)、牛病毒性腹泻病毒(Bovine viral diarrhea virus, BVDV)、绵羊边界病毒(Border disease virus, BDV)^[1]、非典型的Hobi样病毒(Hobi-like virus)^[2]、Bungowannah 瘟病毒(Bungowannah virus)^[3]等。由 CSFV 和 BVDV 引起的猪瘟和牛病毒性腹泻-粘膜

病给各国畜牧业造成了严重的危害和经济损失^[4]。瘟病毒属病毒的全基因组为单股正链 RNA,长度约为 12.3 kb,两端包含 5'非编码区(untranslated region, UTR)和 3'非编码区(UTR),中间是一个大的开放性阅读框架(open reading frame, ORF);ORF 翻译成含约 3898 个氨基酸残基、分子量约 438 kD 的多聚蛋白,在病毒和宿主细胞酶的作用下加工成

基金项目:国家自然科学基金(31372436);吉林省科技厅产业联盟项目(2014030918YY);吉林农业大学校内启动基金(201425)

作者简介:洪焜,男,硕士研究生,从事经济动物疫病研究。

通讯作者:时坤,E-mail: sk1981521@126.com;杜锐,E-mail: 104974602@qq.com

结构蛋白 C、E_{ns}、E₁、E₂ 和非结构蛋白 N^{pro}、p7、NS₂₋₃(NS₂、NS₃)、NS_{4A}、NS_{4B}、NS_{5A}、NS_{5B}^[5]。

反向遗传学通常是在获得生物基因信息的基础上,建立一个基因组的全长 cDNA 感染性克隆,对基因有目的地进行定点突变、基因的插入/缺失和基因置换等重组操作,来研究生物基因结构和功能的策略;其目的是研究病毒的复制,病毒蛋白的功能,病毒重组的发生率,病毒与宿主相互作用以及防治病毒策略和研发标记疫苗等^[6]。

1 反向遗传技术在瘟病毒属研究中的应用

1.1 在瘟病毒属基因组结构和功能研究中的应用

Moormann 等通过反向遗传操作技术成功构建了瘟病毒属 CSFV 的第一个感染性 cDNA 克隆,同年 Meyers 等成功构建了 BVDV 感染性 cDNA 克隆,并都得到了各自的感染性病毒粒子^[7-8]。Pankraz 等通过对感染性 BVDV cDNA 克隆的 3'UTR 的茎环结构引入碱基的缺失,去研究基因 3'UTR 的功能,发现 3'UTR 调节基因的复制^[9]。

Mischkale 等在 BVDV-2 890 株全长 cDNA 感染性克隆 p890 的基础上通过基因缺失构建了 BVDV-2 890 株 C 蛋白基因的缺失克隆 p890 ΔC,体外转录后的 p890 ΔC RNA 转染细胞,发现病毒亚基因组的自主复制和病毒蛋白表达,但未获得感染性病毒粒子;但是把 p890 ΔC RNA 转染进能稳定表达 BVDV-1 蛋白 C-E_{ns}-E₁-E₂ 的互补细胞 WT-R2,在 72 h 后能检测到病毒的自主复制,在转染后的上清和转染的细胞传代中存在感染性假病毒粒子 v890 ΔC-trans,但是 v890 ΔC-trans 不能在含有互补的 KOP-R 细胞上传代^[10]。Gladue 等通过酵母双杂交系统对 CSFV 的 C 蛋白基因的 OS9 结合位点进行替换,得到的重组 CSFV 在猪实验没有发现毒力的改变,但是在细胞培养中能显著降低病毒复制效率^[11]。

Risatti 等通过反向遗传技术构建了 CSFV 高致病性 Brescia 株和减毒疫苗 CS 株的嵌合体,又构建了含 BVDV NADL 株 E₂ 的同源氨基酸序列的 Brescia 突变体去研究 E₂ 糖蛋白的毒力作用,发现在 E₂ 基

因特定位置的氨基酸替换能导致 CSFV 毒力的部分或完全衰减^[12-13]。Fahnøe 等对 CSFV Koslov 株全长 cDNA 克隆的氨基酸序列重组,并在猪上实现病毒拯救,发现在 Koslov 株 E₂ 蛋白的两个单一氨基酸(S763L 和 P968H)的变化,导致病毒感染猪时感染能力的衰减,在非结构蛋白 NS₃ 的单一氨基酸(D2183G)的突变能减少病毒在体外细胞内生长^[14]。

Tratschin 等在 CSFV Alfort/187 株感染性克隆的基础上用鼠泛素基因代替 N^{pro} 基因,得到重组病毒 vA187-Ubi,发现 N^{pro} 对病毒的复制不是必须的^[15]。Mischkale 等构建了 BVDV 890 株的全长 cDNA 感染性克隆 p890 和缺失克隆 p890 ΔN^{pro},得到感染性病毒粒子 v890FL 和缺失 N^{pro} 基因的病毒粒子 v890 ΔN^{pro},发现 v890FL 与亲本毒株生长特性相似;而 v890 ΔN^{pro} 与亲本毒株相比,生长速度明显偏低,表明 N^{pro} 蛋白对病毒的复制不是必须的,但能影响病毒的生长^[10]。陶洁构建了 BVDV SH-28 株的全长 cDNA 感染性克隆,和缺失 N^{pro} 基因的亚克隆,得到感染性病毒 vASH 和缺失 N^{pro} 基因病毒 vASH ΔN^{pro},发现 vASH ΔN^{pro} 的复制速度远低于 vASH 和亲本病毒;进一步研究发现 N^{pro} 的过量表达可显著抑制 MDBK 细胞内抗病毒蛋白 OAS、Mx1 和 ISG15 的表达,而缺失 N^{pro} 蛋白后胞内抗病毒蛋白 OAS、Mx1 和 ISG15 的表达量显著增加,可能是 N^{pro} 影响复制的原因^[16]。

NS₂ 蛋白对病毒 RNA 复制和感染性病毒产生是重要的。Ling L 等构建了含有海肾荧光素酶 2A (Rluc2A) 报告基因的 CSFV 嵌合 cDNA 克隆 pA187-Rluc,并对 NS₂ 的 N 端的几个代表性的保守残留序列进行了基因突变;发现在 NS₂ 的 N-末端的 2 个天冬氨酸(NS₂/D60A 或 NS₂/D60K 和 NS₂/D78K)的突变导致感染性病毒不能产生,并且在 NS₂100 处的丙氨酸(NS₂/R100A)被精氨酸取代后导致病毒滴度显著降低。含有突变病毒基因组 RNA 分子(NS₂/A60D、NS₂/K60D 和 NS₂/K78D)的细胞在连续传代后,产生恢复突变,导致感染性病毒的恢复。

在 NS₂/R100A 突变体上游 NS₂/I90L 的突变能恢复感染性病毒产生。揭示 CSFV 的 NS₂ N-末端在调节病毒 RNA 中的新功能, NS₂ 的氨基酸残基在 RNA 复制水平上发生作用^[17]。Risager 等在大肠杆菌内对含有 CSFV 全长病毒 cDNA 的细菌人工染色体 (Bacterial artificial chromosome, BAC) 通过进行靶向重组修饰, 添加荧光素酶 (Rluc) 报道序列, 体外转录 RNA 并通过电穿孔转染细胞。通过荧光素酶蛋白表达的积累以及检测胞内的 CSFV NS₃ 蛋白产生去检测 RNA 的翻译和复制。发现复制子中包含的病毒 E₂ 编码区对于复制效率是有利的。来自高毒力的 Koslov 株或疫苗株 Riems 的等同序列取代来自 Paderborn 株的 NS₂ 和 NS₃ 编码区的嵌合 RNA, 复制被阻断^[18]。

Tamura 等构建了 CSFV 的 GPE⁻ 疫苗株与高毒力 Eustrup 株的 NS₄B 嵌合病毒复制子, 发现携带完整 Eustrup NS₄B 基因嵌合低毒力 GPE⁻ 衍生的病毒在猪中致病性增强。嵌合 GPE⁻ NS₄B 复制子的体外复制效率显著高于在 NS₄B 中仅携带两个 Eustrup 特异性氨基酸的复制子。发现 NS₄B 的 N-末端结构域可以确定细胞培养中的 CSFV 基因组复制和在猪中的病毒致病性^[19]。

Sheng Chun 等构建了 CSFV Shimen 株全基因克隆, 并在病毒 cDNA 相应的 NS₅B、NS₃、NS₅A 位置进行突变, 发现 NS₅B 上的依赖 RNA 的 RNA 聚合酶 (RdRp) 活性位点的突变能使 CSFV 病毒包装失败, 额外添加 NS₅B 不能使病毒的可育性恢复, 但 NS₅A 却可以用反式作用因子发挥作用^[20]。姬伟等通过对 CSFV 疫苗 C 株基因组 NS₅B 分段改造后, 结果发现该病毒复制、包装失败, 将 NS₅B 从基因组缺失之后额外补充 NS₅B 同样不能恢复病毒的可育性。可能是因为 NS₅B 上有 CSFV 复制或组装所需的顺式作用元件, 其缺失后导致缺失该基因的部分不能复制或正常组装到子代病毒^[21]。Risager 等用来自 Koslov 株的 RNA 聚合酶编码序列替换 Paderborn 株 NS₅B 编码序列能大大增强了复制子报道蛋白的表达。相比之下, 用 Riem NS₅B 序列替

换显著降低复制子的复制效率^[18]。

1.2 在瘟病毒致病机制研究中的应用 Tamura 等从猪扁桃体分离出的弱化疫苗 CSFV “GPE⁻” 株在传 11 代后的 GPE⁻/P-11 病毒存在 E₂ (T830A)、NS₄B (V2475A 和 A2563V) 3 个氨基酸突变位点, 用反向遗传学重建了这 3 个氨基酸突变的病毒, 通过在猪的感染性实验证实这 3 个氨基酸取代是致病性下降的原因, 而且 E₂ 中基因的置换影响病毒扩散, 并且 NS₄B 的改变增强了病毒 RNA 的复制^[22]。

Wu Rd 等以高毒力 CSFV 的 Shimen 株 (vSM) 为主干, 构建的包含 CSFV 疫苗 C 株 E₂ 基因的嵌合病毒 (CSFV) vSM/CE₂, 在猪的攻毒实验中出现毒力的致弱, 但是 vSM/CE₂ 在 PK15 细胞中传了几代后毒力能被恢复, 进一步研究发现, vSM/CE₂ 第 11 代的突变体 vSM/CE₂-p11 在 E₂ 的 T745I 和 M979K 处有 2 个氨基酸突变。通过感染猪的试验表明在 M979K 氨基酸的置换是致病性改变的主要原因。体外研究表明, E₂ 的 T745I 和 M979K 能增加感染性病毒的复制和产生。同时发现, 位于 E₂ 蛋白的 745 和 979 位置的 2 个氨基酸残基对嵌合病毒 (CSFV) vSM/CE₂ 体外的复制和体内的致病性改变是重要的^[23]。

Velazquez-Salinas 等通过基因突变构建了 CSFV 强毒株 Brescia (BICv) 株 E₂ 基因的 4 个不同的突变克隆 (pCSFm1 ~ pCSFm4), 但只有三个克隆产生了感染性病毒粒子 (CSFm2v、CSFm3v 和 CSFm4v)。猪感染 CSFm2v 后呈现病毒血症减少和扩散, 但没有显现出任何与猪瘟 (CSF) 相关的临床症状, 原因是在感染猪后, CSFm2v 复制能力与亲本 BICv 相比严重下降。动物感染 CSFm2v 后检测到动物感有病毒血症的减少和扩散, 但没有显示任何猪瘟 (CSF) 相关的临床症状, 并能耐受亲本病毒 BICv 的攻毒^[24]。

Tamura 等通过活减毒 CSF 疫苗株 GPE⁻ 的全长 cDNA 感染性克隆体外拯救了多个含有 N^{pro} 突变和缺失 N^{pro} 的病毒, 并接种猪, 发现携带在 N^{pro} 的 N136D 取代的病毒恢复了降解 IRF3 和体外抑制

IFN- α/β 诱导的能力。并且在猪中, N^{pro} 显著降低淋巴器官中的局部 IFN- α mRNA 表达, 同时增加循环中 IFN- α/β 的量, 并增强中等毒性病毒的致病性。缺失 N^{pro} 可以减少毒性和诱导免疫无特定病原体 (SPF) 的猪^[25]。Lamp B 等将以 CSFV p447 株为模板的 NS₃ 突变序列插入到 cp CSFV 复制子克隆 p447rep 中, 得到 NS₃ 编码区突变的病毒, 发现 NS₃ 的编码区是瘟病毒属基因组复制和编码的一个关键组件; NS₃ 编码区突变, 并不直接影响病毒基因组的复制速度^[26]。Fahnøe 等在研究 CSFV 高毒力的 Koslov 株时, 从感染 Koslov 株的猪血液中提取 RNA, 得到非功能性的 cDNAs, 通过逐步定点突变, 消除非同义突变, 得到了与 CSFV 高毒力株 Koslov 全部功能性一致的 CSFV 的 cDNA。通过感染猪的实验, 发现通过功能 cDNA 重组得到的病毒在强毒力上与亲本病毒 (Koslov 株) 一致, 伴随着感染动物出现明显的临床症状并导致高的死亡率, 证明了几个氨基酸的改变能有效改变病毒的功能, 在自然宿主动物上降低病毒的毒力^[14]。

1.3 在新型疫苗研制中的应用 反向遗传操作技术已经成为研究新型疫苗的实用的工具, 如研发标记疫苗, 减毒疫苗, 嵌合疫苗等。Holinka LG 等构建了 CSFV 的 FlagT4v 株的双抗标记疫苗, 在 FlagT4v 的 E1 处插入 19mer, 作为阳性标记, 并在 E₂ 处引入单克隆抗体 WH303 (mAbWH303) 表位的结合位点作为阴性标记, 用于区分天然感染的和接种的猪, 突变 FlagT4v 在接种猪后的早期 (2 d 或 3 d) 和后期 (28 d) 的猪能 CSFV Brescia 株感染, FlagT4V 在猪中诱导的抗体反应对 Flag[®] 表位强烈反应, 但不能抑制 mAbWH303 与代表 WH303 表位的合成肽的结合^[27]。付强等通过构建具有 T7 RNA 聚合酶活性和较好稳定性的 MDBK-T7RNAP 细胞, 构建了 BVDV NADL 毒株的 E₂ 和 NS₄B 定点突变株 BVDV E₂M 和 NS₄BM; 与亲本 NADL 株相比, BVDV E₂M 和 NS₄BM mRNA 的复制水平能力和增殖能力有所下降; 并且得到的 BVDV 点突变株 E₂M 和 NS₄BM 具有好的遗传稳定性^[28]。

Li Yongfeng 等以高毒性 CSFV 石门株的遗传背景构建了含有 EGFP 标签和自疫苗株 HCLV (C 株) 3'UTR 的标记嵌合病毒。标记嵌合病毒与仅有 EGFP 标签的重组 CSFV 病毒或亲本病毒相比, 有低约 100 倍的病毒滴度, 更低的病毒基因组复制水平和更弱的荧光强度。并且标记嵌合体在接种的猪后没有显示病毒血症, 接种 15 d 后能免于致死性 CSFV 攻击^[29]。

高飞等在高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 细胞致弱疫苗株 HUN4-F112 的全长感染性克隆上, 插入 CSFV 疫苗株 C 株的 E₂ 基因, 得到能表达猪瘟 C 株 E₂ 蛋白的重组 PRRSV vA-C-E₂。重组病毒 vA-C-E₂ 传代过程中至少在 20 代保持遗传稳定; 且发现此突变病毒与亲本病毒 vHuN4-F112 在病毒滴度、空斑形态、蛋白表达等方面差异不显著; 在病毒的峰滴度和病毒增殖趋势上相似^[30]。董超等在 CSFV 疫苗 C 株和强毒石门株感染性克隆的基础上, 对两个毒株不同蛋白区段进行相互置换, 构建了一系列重组嵌合病毒, 发现非结构蛋白 NS₂-NS₄B 区以及 NS₂ 跨膜区域对猪瘟病毒的增殖是重要的, 在疫苗 C 株基因组两端的 UTR 以及结构蛋白区域能够介导兔体发热反应^[31]。

2 感染性克隆策略的选择

目前, 国内外构建感染性克隆构建方法, 主要有典型的细菌质粒载体重组策略、基于细菌人工染色体 (BAC) 重组策略和酵母菌的重组策略。由于瘟病毒属的基因组对大肠杆菌质粒载体具有毒性, 存在不稳定性, 所以典型的瘟病毒属全长 cDNA 克隆大都需在细菌低拷贝质粒载体中构建, 但是重组克隆质粒在大肠杆菌传代过程中也存在不稳定性。

2.1 基于细菌人工染色载体的克隆 BAC 载体已经被用于多种病毒全基因感染性克隆的构建, 如人巨细胞病毒 (HCMV) 等^[32]。Rasmussen 等通过 RT-PCR 扩增与参考毒株基因一致的全长 cDNA 复制子, 插入到单拷贝的 BAC 载体 pBeloBAC11 的策略, 构建了 4 个病毒 (BVDV-CP7、BDV-Gifhorn、CSFV-C、CSFV-Paderborn) 的全长 cDNA 克隆^[33]。Risager

PC 等通过 BAC 构建 CSFV 的复制子去分析影响病毒 RNA 复制的因素^[19]。Kamboj 等通过 over-lap PCR 和重组技术在 BAC 载体构建了 CSFV 野生分离株感染性 cDNA 克隆,通过使用 CSFV 特异多克隆血清的 FAT 实验和 RT-PCR 对拯救出的 vCSFV 与亲本 CSFV 进行分析,发现两者的特性相似^[34]。

2.2 基于酵母同源重组的克隆 酵母菌同源重组的方法已经应用在多种病毒的 cDNA 克隆的构建,如登革热病毒^[35]。与其他重组 DNA 技术相比,酵母菌同源重组克隆是一个有效率的和节约成本的方法,酵母菌同源重组中,需 DNA 片段末端含有与载体末端同源的序列,两者在宿主细胞内经过同源重组能直接克隆^[36]。Arenhart 等通过酵母同源重组在非致细胞病变型 BVDV 的 N^{pro} 和 C 蛋白编码区插入 Gluc 报告基因,构建全长 cDNA 克隆,得到能表达 Gluc 报告基因且能复制的病毒,拯救病毒在细胞培养中能稳定传 15 代以上,与母本的病毒复制动力学,大小,形态学保持相似性;通过 Gluc 活性检测证明了报告蛋白能正确表达,表明基因增加了 555 bp 后在酵母菌重组中能被简单组装并且 cDNA 克隆能稳定表达^[37]。Arenhart 等又通过酵母同源重组技术把 BVDV NADL 株的两端的 UTRs 和巴西 BVDV IBSP4ncp 株的 ORF 的连接起来,成功得到 BVDV 的嵌合 cDNA 感染性克隆,通过病毒拯救,得到了能扩增的病毒 IBSP4ncp,病毒 IBSP4ncp 在复制动力学、大小和形态学上与亲本病毒具有相似性。而且病毒 IBSP4ncp 能够在细胞培养中能够稳定传 10 代,并且在细胞中能维持其复制能力不被改变^[38]。

3 展望

随着反向遗传操作技术在基因组操作中的出现,推进了瘟病毒属病毒研究的发展。我们就反向遗传技术在过去和当前在瘟病毒属的研究和应用展开描述,虽然对病毒的复制和翻译的研究已经有很多,但是病毒蛋白质的机制研究仍处于起步阶段。反向遗传技术可能为瘟病毒属的急需解决的问题如疾病防治、致病机制、持续性感染机制、疫苗研

究等提供一个实用的工具。我们认为关键的是通过该技术推进瘟病毒属的病毒毒力、病毒种群适应性、病毒致病机制,病毒疫苗方面的研究。通过整合反向遗传技术、动物实验,设计新颖的宿主细胞等方法的优点,对下一代疫苗的开发、应对未来瘟病毒属乃至其他黄病毒科的病毒爆发是至关重要的。

参考文献:

- [1] Becher P, Ramirez R A, Orlich M, *et al.* Genetic and antigenic characterization of novel *Pestivirus* genotypes: implications for classification[J]. *Virology*, 2003, 311(1):96-104.
- [2] Weber M N, Mósena A C S, Simões S V D, *et al.* Clinical presentation resembling mucosal disease associated with ‘HoBi’-like *Pestivirus* in a field outbreak[J]. *Transboundary & Emerging Diseases*, 2014, 63(1):92-100.
- [3] Richter M, König P, Reimann I, *et al.* N^{pro} of Bungowannah virus exhibits the same antagonistic function in the IFN induction pathway than that of other classical *Pestiviruses* [J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 168(2-4):340-347.
- [4] Ji W, Guo Z, Ding N Z, *et al.* Studying classical swine fever virus: Making the best of a bad virus[J]. *Virus Research*, 2015, 197:35-47.
- [5] Moennig V, Plagemann P G. The *Pestiviruses* [J]. *Advances in Virus Research*, 1992, 41(1):53-98.
- [6] 刘光清. 动物病毒反向遗传学[M]. 科学出版社, 2014: 3-7. Liu G Q. Reverse genetics of animal viruses[M]. Science Press, 2014: 3-7.
- [7] Moormann R J M, Gennip H G P V, Miedema G K W, *et al.* Infectious RNA transcribed from an engineered full-length cDNA template of the genome of a *Pestivirus* [J]. *Journal of Virology*, 1996, 70(2):763-770.
- [8] Meyers G, Tautz N, Becher P, *et al.* Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhea viruses from cDNA constructs[J]. *Journal of Virology*, 1996, 70(12):8606-8613.
- [9] Pankraz A, Thiel H J, Becher P. Essential and nonessential elements in the 3' nontranslated region of bovine viral diarrhea virus[J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(14):9119-9127.
- [10] Mischkale K, Reimann I, Zemke J, *et al.* Characterisation of a new infectious full-length cDNA clone of BVDV genotype 2 and generation of virus mutants[J]. *Veterinary Microbiology*, 2010, 142(1/2):3-12.
- [11] Gladue D P, O'Donnell V, Fernandez-Sainz I J, *et al.* Interac-

- tion of structural core protein of classical swine fever virus with endoplasmic reticulum-associated degradation pathway protein OS9[J]. *Virology*, 2014, s 460-461(1):173-179.
- [12] Risatti G R, Borca M V, Kutish G F, *et al.* The E₂ glycoprotein of classical swine fever virus is a virulence determinant in swine [J]. *Virology*, 2005, 343(1):116-127.
- [13] Risatti G R, Holinka L G, Carrillo C, *et al.* Identification of a novel virulence determinant within the E₂ structural glycoprotein of classical swine fever virus [J]. *Virology*, 2006, 355(1):94-101.
- [14] Fahnøe U, Pedersen A G, Risager P C, *et al.* Rescue of the highly virulent classical swine fever virus strain "Koslov" from cloned cDNA and first insights into genome variations relevant for virulence[J]. *Virology*, 2014, s 468-470:379-387.
- [15] Tratschin J D, Moser C, Ruggli N, *et al.* Classical swine fever virus leader proteinase N^{pro} is not required for viral replication in cell culture[J]. *Journal of Virology*, 1998, 72(9):7681-7684.
- [16] 陶洁. 猪源 BVDV-2 感染性克隆的构建及非结构蛋白 N~(pro)的相关功能探析[D]. 扬州大学, 2014:93-94.
Tao J. Construction of infectious cDNA clone of pig BVDV-2 and relative function of the N^{pro} nonstructural protein[D]. Yangzhou University, 2014:93-94.
- [17] Ling L, Rui W, Zheng F, *et al.* The N-terminus of classical swine fever virus (CSFV) nonstructural protein 2 modulates viral genome RNA replication [J]. *Virus Research*, 2015, 210:90-99.
- [18] Risager P C, Fahnøe U, Gullberg M, *et al.* Analysis of classical swine fever virus RNA replication determinants using replicons [J]. *Journal of General Virology*, 2013, 94(8):1739-1748.
- [19] Tamura T, Ruggli N, Nagashima N, *et al.* Intracellular membrane association of the N-terminal domain of classical swine fever virus NS₄B determines viral genome replication and virulence [J]. *Journal of General Virology*, 2015, 96(9):2623-2635.
- [20] Sheng C, Zhu Z, Yu J, *et al.* Characterization of NS₃, NS₅A and NS₅B of classical swine fever virus through mutation and complementation analysis [J]. *Veterinary Microbiology*, 2010, 140(1/2):72-80.
- [21] 姬伟. 猪瘟疫病毒疫苗株反向遗传学改造并拯救及疫苗在病毒进化中的影响[D]. 山东师范大学, 2014:90-94.
Ji W. Rescue of classical swine fever virus C-strain and its effect on evolution of classical swine fever virus[D]. Shandong Normal University, 2014:90-94.
- [22] Tamura T, Sakoda Y, Yoshino F, *et al.* Selection of classical swine fever virus with enhanced pathogenicity reveals synergistic virulence determinants in E₂ and NS₄B[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(16):8602-8613.
- [23] Wu R, Li L, Zhao Y, *et al.* Identification of two amino acids within E₂ important for the pathogenicity of chimeric classical swine fever virus[J]. *Virus Research*, 2016, 211:79-85.
- [24] Velazquez-Salinas L, Risatti G R, Holinka L G, *et al.* Recoding structural glycoprotein E₂ in classical swine fever virus (CSFV) produces complete virus attenuation in swine and protects infected animals against disease[J]. *Virology*, 2016, 494:178-189.
- [25] Tamura T, Nagashima N, Ruggli N, *et al.* N^{pro} of classical swine fever virus contributes to pathogenicity in pigs by preventing type I interferon induction at local replication sites [J]. *Veterinary Research*, 2014, 45(1):411-412.
- [26] Lamp B, Riedel C, Wentz E, *et al.* Autocatalytic cleavage within classical swine fever virus NS₃ leads to a functional separation of protease and helicase[J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(21):11872-11883.
- [27] Holinka L G, Fernandez-Sainz I, O'Donnell V, *et al.* Development of a live attenuated antigenic marker classical swine fever vaccine[J]. *Virology*, 2009, 384(1):106-113.
- [28] 付强. 牛病毒性腹泻病毒持续性感染的分子机制研究及其定点突变株的构建[D]. 石河子大学, 2015:148-149.
Fu Q. Study on the molecular mechanisms of persistent replication of bovine viral diarrhea virus and construction of site-directed mutation of bovine viral diarrhea virus[D]. Shihezi University, 2015:148-149.
- [29] Li Y, Xiao W, Yuan S, *et al.* Generation and evaluation of a chimeric classical swine fever virus expressing a visible marker gene[J]. *Archives of Virology*, 2016, 161(3):563-571.
- [30] 高飞, 曲泽慧, 姜一峰, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒重组猪瘟疫 C 株 E₂ 蛋白全长感染性克隆的构建及初步应用[C]. 中国畜牧兽医学动物传染病学分会第十六次学术研讨会论文集, 2015:71-72.
Gao F, Qu Z H, J Y F, *et al.* Construction and preliminary application of full-length infectious clone of recombinant porcine reproductive and respiratory syndrome virus including E₂ protein of classical swine fever Virus[C]. The Sixteenth Academic Symposium of Animal Infectious Diseases Branch of Society of Animal Husbandry and Veterinary Medicine in China, 2015:71-72.
- [31] 童超. 猪瘟疫病毒石门株和疫苗 C 株嵌合病毒构建及其特性鉴定[D]. 浙江大学, 2015:90-93.
Dong C. Construction and characterization of chimeric classical

- swine fever viruses based on Shimen strain and C-strain [D]. Zhejiang University, 2015:90-93.
- [32] Murrell I, Wilkie G S, Davison A J, *et al.* Genetic stability of BAC-derived Human cytomegalovirus during culture *in vitro* [J]. Journal of Virology, 2016, 594(9):46-53.
- [33] Rasmussen T B, Reimann I, Uttenthal A, *et al.* Generation of recombinant *Pestiviruses* using a full-genome amplification strategy [J]. Veterinary Microbiology, 2009, 142(1/2):13-17.
- [34] Kamboj A, Saini M, Rajan L S, *et al.* Construction of infectious cDNA clone derived from a classical swine fever virus field isolate in BAC vector using *in vitro*, overlap extension PCR and recombination [J]. Journal of Virological Methods, 2015, 226(4):60-66.
- [35] Santos J J, Cordeiro M T, Bertani G R, *et al.* A two-plasmid strategy for engineering a dengue virus type 3 infectious clone from primary Brazilian isolate [J]. Anais Da Academia Brasileira De Ciências, 2014, 86(4):1749-1759.
- [36] Joska T M, Mashruwala A, Boyd J M, *et al.* A universal cloning method based on yeast homologous recombination that is simple, efficient, and versatile [J]. Journal of Microbiological Methods, 2014, 100(1):46-51.
- [37] Arenhart S, Flores E F, Weiblen R, *et al.* Insertion and stable expression of *Gaussia luciferase* gene by the genome of bovine viral diarrhea virus [J]. Research in Veterinary Science, 2014, 97(2):439-448.
- [38] Arenhart S, Junior S J, Flores E F, *et al.* Use of homologous recombination in yeast to create chimeric bovine viral diarrhea virus cDNA clones [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2016, 47(4):993-999.

(编辑:李文平)