

基于感染性亚基因扩增子的口蹄疫病毒快速拯救方法建立

欧阳一凡^{1,2}, 孙普^{1,2}, 刘茹菊^{1,2,3}, 裴玉奇^{1,2,4}, 向知玉^{1,2}, 曹轶梅^{1,2},
白兴文^{1,2}, 马雪青^{1,2}, 李坤^{1,2}, 袁红^{1,2}, 卢曾军^{1,2}, 李平花^{1,2*}

- 1 中国农业科学院兰州兽医研究所/兰州大学 动物医学与生物安全学院, 动物疫病防控全国重点实验室, 甘肃 兰州
- 2 甘肃省病原生物学基础学科研究中心, 甘肃 兰州
- 3 甘肃农业大学 动物医学院, 甘肃 兰州
- 4 甘肃农业大学 生命科学技术学院, 甘肃 兰州

欧阳一凡, 孙普, 刘茹菊, 裴玉奇, 向知玉, 曹轶梅, 白兴文, 马雪青, 李坤, 袁红, 卢曾军, 李平花. 基于感染性亚基因扩增子的口蹄疫病毒快速拯救方法建立[J]. 微生物学报, 2026, 66(7): 3654-3663.

OUYANG Yifan, SUN Pu, LIU Ruju, PEI Yuqi, XIANG Zhiyu, CAO Yimei, BAI Xingwen, MA Xueqing, LI Kun, YUAN Hong, LU Zengjun, LI Pinghua. Establishment of a rapid rescue method for foot-and-mouth disease virus based on infectious subgenomic amplicons[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(7): 3654-3663.

摘要: 口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)反向遗传操作平台的建立是研究病毒致病机制、蛋白功能及疫苗研发等不可或缺的工具, 但传统构建 FMDV 感染性克隆的方法通常操作繁琐、周期长且成本高。【目的】基于感染性亚基因组复制子(infectious subgenomic amplicons, ISA)技术, 建立一种无需体外连接和细菌克隆、快速拯救 FMDV 的反向遗传学新方法。【方法】将 FMDV O/GDLe/Zh/2020 株全基因组分为 5 个重叠片段进行高保真 PCR 扩增, 在 5'端加入 T7 启动子序列, 在 3'端引入 poly(A)尾巴, 同时用融合 PCR 技术引入 poly(C)序列和分子标记。扩增片段经多轮融合 PCR 扩增, 最终获得覆盖 FMDV 全基因组的 2 个大片段。将这 2 个片段共转染表达 T7 RNA 聚合酶的 BSR/T7 细胞, 72 h 后收集转染上清, 并用 RT-PCR、间接免疫荧光、电镜观察、噬斑试验和一步生长曲线对拯救病毒进行鉴定和特性分析。【结果】两片段转染细胞 60 h 后观察到典型的 FMDV 致细胞病变效应(cytopathic effect, CPE), 序列测定、免疫荧光和电镜观察均证实拯救的病毒为 FMDV, 一步生长曲线和噬斑试验表明拯救病毒保持了与野生病毒相似的复制动力学和生物学特性。【结论】本研究成功建立了基于感染性 PCR 扩增子快速、高效拯救

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFD1802501); 兰州市创新创业项目(2024-HL-7)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFD1802501) and the Lanzhou Talent Innovation and Entrepreneurship Project (2024-HL-7).

*Corresponding author. E-mail: lipinghua@caas.cn

Received: 2026-01-04; Accepted: 2026-02-10; Published online: 2026-03-11

FMDV 的新方法, 为未来进一步完善病毒拯救技术体系并快速拓展其应用奠定了坚实基础。

关键词: 口蹄疫病毒; 感染性亚基因组复制子; 快速拯救

Establishment of a rapid rescue method for foot-and-mouth disease virus based on infectious subgenomic amplicons

OUYANG Yifan^{1,2}, SUN Pu^{1,2}, LIU Ruju^{1,2,3}, PEI Yuqi^{1,2,4}, XIANG Zhiyu^{1,2}, CAO Yimei^{1,2}, BAI Xingwen^{1,2}, MA Xueqing^{1,2}, LI Kun^{1,2}, YUAN Hong^{1,2}, LU Zengjun^{1,2}, LI Pinghua^{1,2*}

1 State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention, College of Veterinary Medicine and Biosafety, Lanzhou University, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu, China

2 Gansu Province Research Center for Basic Disciplines of Pathogen Biology, Lanzhou, Gansu, China

3 College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu, China

4 College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu, China

Abstract: A reverse genetics platform for foot-and-mouth disease virus (FMDV) is an indispensable tool for studying the pathogenic mechanism, protein function, and vaccine development. However, the conventional method of constructing infectious clones of FMDV is usually laborious, time-consuming, and costly. **[Objective]** To establish a new reverse genetics platform for rapid rescue of FMDV based on infectious subgenomic amplicons (ISA), which can avoid *in vitro* ligation and bacterial cloning. **[Methods]** The whole gene of FMDV O/GDLeizh/2020 strain was divided into five overlapping fragments and then individually amplified by high-fidelity PCR. The T7 promoter sequence was added to the 5'-end gene and the poly(A) tail was introduced at the 3'-end. At the same time, the poly(C) sequence and molecular markers were introduced by fusion PCR. Two large fragments covering the whole gene of FMDV were obtained by multiple rounds of fusion PCR amplification and co-transfected into BSR/T7 cells expressing T7 RNA polymerase. The cell supernatant was collected 72 h post-transfection. The rescued virus was identified and characterized by RT-PCR, indirect immunofluorescence, electron microscopy, plaque assay, and one-step growth curve assay. **[Results]** The typical cytopathic effect of FMDV was observed 60 h post-transfection. Sequencing, immunofluorescence, and electron microscopy collectively confirmed that infectious FMDV was successfully rescued. Furthermore, one-step growth curve and plaque assays demonstrated that the rescued virus retained replication kinetics and biological characteristics comparable to those of the wild-type virus. **[Conclusion]** This study successfully establishes a new method for rapid and efficient rescue of FMDV based on ISA, which will lay a solid foundation for further improving FMDV rescue technology and rapidly expanding its application in the future.

Keywords: foot-and-mouth disease virus; infectious subgenomic amplicons; rapid rescue

反向遗传学(reverse genetics, RG)操作是一种在 DNA 水平上对病毒基因组进行编辑的关键技术,是指通过构建病毒的全长感染性 cDNA 克隆,实现在 DNA 水平上对病毒特定基因进行编辑(如敲除、插入、点突变和基因置换等)^[1-2],进而拯救重组病毒,研究基因改变对表型的影响,从而为阐明病毒蛋白功能、揭示致病机制及开发新型疫苗等提供重要研究手段^[3]。

传统 RNA 病毒感染性克隆的构建通常需分段扩增病毒基因组,并依赖酶切-连接方法将各片段依次组装进质粒载体中。该方法不仅步骤繁琐、耗时,而且成功率常受限于可用酶切位点及大片段连接效率;此外,部分病毒基因对宿主菌的毒性常导致克隆不稳定,难以获得完整克隆^[4-5]。上述因素严重制约了多种 RNA 病毒反向遗传操作技术的快速发展。

近年来,随着无缝克隆与体外组装技术的发展,基于感染性亚基因组复制子(infectious subgenomic amplicons, ISA)的无细菌克隆技术应运而生。该技术将经过末端修饰[含启动子、HDV 与 poly(A)信号]的病毒基因组重叠片段直接转染易感细胞,利用细胞内同源重组机制在体内高效组装并拯救病毒。ISA 技术由 Aubry 等^[6]首次建立,并成功用于黄病毒科病毒(日本脑炎病毒、西尼罗河病毒、蜱传脑炎病毒、登革病毒、黄热病病毒)、基孔肯雅病毒和柯萨奇病毒等的拯救。此后,该技术被广泛应用于多种 RNA 病毒的研究中^[7-9],包括发光病毒株的构建^[7]、疫苗候选株的研制^[8]以及病毒致病机制的解析^[9]等。ISA 技术的发展不仅有效规避了传统方法中对细菌克隆的依赖,而且显著提升了反向遗传学操作的效率与稳定性,为加速黄病毒、冠状病毒等 RNA 病毒的基础研究与疫苗开发提供了新的技术手段。

口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)是烈性传染病——口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)的病原。该病毒基因组为单股正链 RNA^[10],可直接作为 mRNA 进行翻译,

无需 DNA 中间体,这一特性致使在 RNA 水平直接操作病毒基因较为困难,从而限制了对其基因功能与表型关系的研究^[11]。RNA 病毒反向遗传操作技术的发展为攻克此难题提供了有效工具,极大地推动了 FMDV 的基础与应用研究^[12]。截至目前,FMDV 的反向遗传学研究仍完全依赖传统的多片段克隆策略组装病毒全长 cDNA 克隆,制约了相关基础研究的推进与应用开发的效率^[13-14]。鉴于此,本研究利用 ISA 技术建立一种快速、高效且无需细菌克隆的 FMDV 反向遗传操作技术,以期为进一步拓展其基础与应用研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、细胞和病毒

O 型 FMDV O/GDLeizh/2020^[15]及 BHK-21 细胞由中国农业科学院兰州兽医研究所宿主抗病毒感染与生物学团队提供,稳定表达 T7 RNA 聚合酶的 BSR/T7 细胞为 Karl-Klaus Conzelmann 教授惠赠^[16]。

1.2 引物设计

将 FMDV O/GDLeizh/2020 株全基因组分为 5 个片段,在扩增第 1 个片段的上游引物 5'端添加 6 个冗余碱基和 T7 RNA 聚合酶启动子序列,下游引物末端引入 15 个 G 碱基,在扩增第 2 个片段的上游引物 5'端引入 15 个 C 碱基,在扩增第 3 个片段的 3'末端和第 4 个片段的 5'端引入定点突变(消除 *Sac* I 酶切位点作为分子标记),在扩增第 5 个片段的 3'端添加含 17 个 T 的多聚腺苷酸尾巴。基因组分段如图 1 所示,引物序列见表 1。

1.3 FMDV RNA 的提取与扩增

用 RNeasy Mini Kit (Qiagen 公司)按说明书提取 FMDV O/GDLeizh/2020 株病毒总 RNA,以 5 个负链引物合成第一链 cDNA。以第一链 cDNA 为模板,分别用 F1(+)/F1(-)、F2(+)/F2(-)、F3(+)/F3(-)、F4(+)/F4(-)和 F5(+)/F5(-)引物扩增

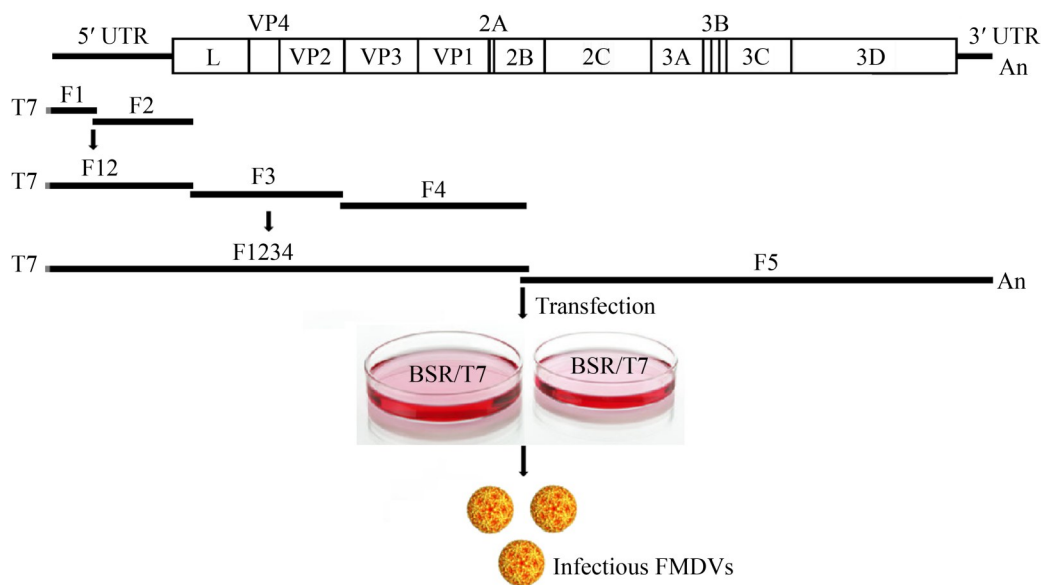


图1 ISA拯救FMDV方案示意图

Figure 1 Schematic diagram of the rescue of FMDV by ISA.

表1 扩增FMDV全基因组的引物

Table 1 Primers for amplification of FMDV whole genome

Primer names	Primer sequences (5'→3')	Sequence position
F1(+)	ACTAGT <i>TAATACGACTCACTATAG</i> GGTTGAAAGGGGGGCTAGGGTC	1-20
F1(-)	AGCGACGGTGTTACTTGGGAGGGGGGGGGGGGGG	371-406
F2(+)	TCACCCGAAGCCCGCCTTTCACCCCCCCCCCCCCC	350-386
F2(-)	AGTGACCTCCTCCAGGTTGTCGAT	1 309-1 330
F3(+)	ATCGACAACCTGGAGGAGGTCACT	1 309-1 330
F3(-)	TCTCTCTTGGTGATGGAACA <i>c</i> AGCTCCGGCACCATCGCCA	2 288-2 327
F4(+)	TGGCGATGGTGCCGGAGCT <i>g</i> TGTTCCATCACCAAGAGAGA	2 288-2 327
F4(-)	GTTGACAGTGTCTACCAGTTTCGT	3 955-3 978
F5(+)	TCCTGAACCTCGACCTCCTCAAGC	3 869-3 892
F5(-)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTGAAATAGGAAGCGGGGAAAACC	8 101-8 140

Italic type denotes the T7 promoter sequence, while lowercase letters indicate the introduced molecular tags.

含该病毒全基因组的 5 个片段，分别命名为 F1-F5 片段。随后以 F1 和 F2 扩增片段为模板，以 F1(+)/F2(-)为引物融合扩增 F12 片段；以 F12、F3 和 F4 为模板，以 F1(+)和 F4(-)为引物融合扩增 F1234 片段。采用 PrimeSTAR® HS DNA Polymerase 试剂盒(TaKaRa 公司)进行扩增。反应体系：5×PrimeSTAR Buffer 10 μL，dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 4 μL，上、下游引物

(10 μmol/L) 各 0.5 μL，PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/μL) 0.5 μL，cDNA 5 μL，RNase Free dH₂O 29.5 μL。扩增程序：94 °C预变性 5 min；94 °C变性 50 s，58 °C退火 50 s，72 °C延伸 60 s，共 30 个循环；72 °C终延伸 8 min。将 PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后，用 DNA 凝胶纯化回收试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]纯化目的 DNA 片段。

1.4 FMDV 的拯救

将 BSR/T7 细胞铺于六孔板中,待细胞密度达到 80%–90% 后用脂质体 Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen 公司)介导转染,具体步骤如下:(1)取灭菌的 1.5 mL 离心管,加入 250 μ L Opti-MEM 溶液(Gibco 公司)和 1.5 μ g F1234 及 F5 片段,吹打混匀;另取一管加入 250 μ L Opti-MEM 溶液和 20 μ L 脂质体,轻柔混匀,室温放置 5 min 后将 2 管混合,继续室温孵育 20 min;(2)用 PBS (pH 7.4, BI 公司)溶液温和洗涤细胞 2 次,每孔加入 1 mL Opti-MEM 溶液;(3)将 PCR 片段与脂质体复合物缓慢加入 BSR/T7 细胞中,轻柔混匀,置于含 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中培养;(4)转染 5 h 后,加入 1 mL GMEM (Gibco 公司)完全培养基[含 10% 胎牛血清(BI 公司)],置于含 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中继续培养,每日观察致细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)。

1.5 拯救病毒的鉴定

1.5.1 RT-PCR 鉴定^[17]

取转染细胞上清,按 RNeasy Mini Kit (Qiagen 公司)操作说明书提取总 RNA,用 F3(+)和 F4(-)引物进行 RT-PCR 扩增 F34 基因片段,采用 PrimeScript One Step RT-PCR Kit v2 (TaKaRa 公司)进行扩增。反应体系(50 μ L): PrimeScript 1 Step Enzyme Mix 2 μ L, 2 $\times$ One Step Buffer 25 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, RNA 5 μ L, RNase Free dH₂O 16 μ L。扩增程序:50 °C 逆转录 30 min; 94 °C 酶激活 2 min; 94 °C 变性 30 s, 68 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 3 min, 共 30 个循环。将扩增产物纯化回收后送上海桑尼生物科技有限公司测序。

1.5.2 间接免疫荧光

将 BHK-21 细胞铺于六孔板,待细胞生长至 70% 时接种转染上清,同时设正常细胞对照。37 °C 孵育 6 h 后,用 4% 多聚甲醛 4 °C 固定 20 min, PBS 漂洗 3 次, Triton X-100 室温通透

10 min, PBS 洗涤 3 次;加入 FMDV 3A 单抗 3A24 (1:200 稀释), 37 °C 孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次,加入二抗[山羊抗小鼠 IgG-FITC (BOSTER 公司) 1:400 稀释], 37 °C 作用 1 h, 洗去二抗后用荧光显微镜观察结果。

1.5.3 电镜观察

采用 BHK-21 细胞分别繁殖亲本病毒和拯救病毒各 100 mL, 冻融 2–3 次后, 12 000 r/min 离心 1 h 去除细胞碎片, 上清加 BEI (Sigma-Aldrich 公司)灭活。灭活完成后, 4 °C、35 000 r/min 离心 3 h, 沉淀用 PBS (pH 7.6)缓冲液重悬, 磷钨酸负染后在电镜下观察病毒粒子形态。

1.6 拯救病毒的生长特性

1.6.1 噬斑试验

将第 6 代亲本病毒和拯救病毒分别进行 10 倍系列稀释, 取 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 稀释度的病毒液 (200 μ L/孔)分别接种长满 BHK-21 细胞的六孔板, 37 °C 孵育, 每 15 min 轻轻摇动 1 次, 1 h 后加入 2 mL 黄芪胶混合液(2 $\times$ MEM:1.2% 黄芪胶=1:1), 摇匀后静置培养 48 h。加入固定液(甲醇:丙酮=1:1), -20 °C 固定 3–4 h, 经 0.1% 结晶紫室温染色 2 h 后观察病毒噬斑表型, 并计算病毒噬斑形成单位(PFU/mL)。

1.6.2 一步生长曲线

将第 6 代拯救病毒和亲本病毒稀释至 5 $\times$ 10⁶ PFU/mL, 分别接种 BHK-21 细胞, 37 °C 孵育 1 h, 弃去未结合的病毒液, 用 MEM (Gibco 公司)洗涤 2 次, 加 5 mL MEM 培养基继续培养。分别于接种后 4、8、12、20 h 收取样品, 反复冻融 3 次, 通过噬斑法^[18]在 BHK-21 细胞上测定各时间点的病毒滴度(PFU/mL)。实验重复 2 次, 并绘制一步生长曲线。

2 结果与分析

2.1 FMDV PCR 扩增片段鉴定

以 FMDV O/GDLeizh/2020 株病毒总 RNA 合成的 cDNA 为模板, 用 5 对引物扩增覆盖

FMDV 全基因组的 5 个片段, 电泳结果显示成功扩增到与预期大小相符的 5 条目的条带(图 2); 以纯化的 F1 和 F2 扩增片段为模板, 以 F1(+)和 F2(-)为引物融合扩增 F12 片段; 以 F12、F3 和 F4 为模板, 以 F1(+)和 F4(-)为引物融合扩增 F1234 片段, 电泳结果显示成功获得与预期大小相符的目的条带(图 3)。

2.2 感染性亚基因组复制子拯救 FMDV

F1234 和 F5 片段共转染 BSR/T7 细胞, 60 h 后细胞出现明显的 FMDV 致病变效应, 表现为

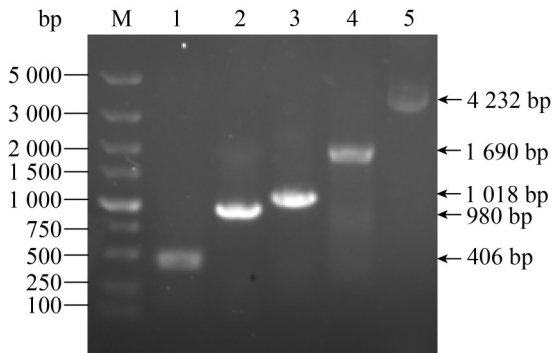


图2 FMDV基因组的PCR扩增

Figure 2 PCR amplification of FMDV genome. Lane M: 5 000 bp DNA marker; Lane 1: F1 fragment (406 bp); Lane 2: F2 fragment (980 bp); Lane 3: F3 fragment (1 018 bp); Lane 4: F4 fragment (1 690 bp); Lane 5: F5 fragment (4 232 bp).

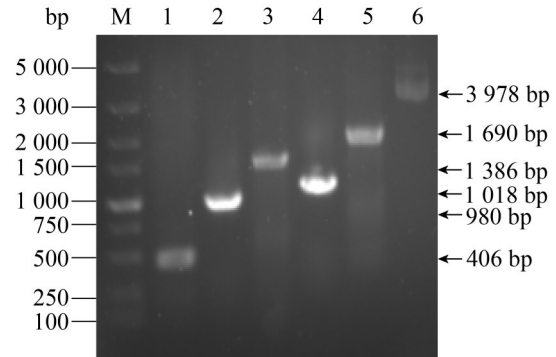


图3 FMDV基因组的融合PCR

Figure 3 Fusion PCR of FMDV genome. Lane M: 5 000 bp DNA marker; Lane 1: F1 fragment (406 bp); Lane 2: F2 fragment (980 bp); Lane 3: F12 fragment (1 386 bp); Lane 4: F3 fragment (1 018 bp); Lane 5: F4 fragment (1 690 bp); Lane 6: F1234 fragment (3 978 bp).

细胞变大、变圆, 呈纤维状分布(图 4), 而对照细胞未出现任何变化。转染细胞孵育至 72 h 后收获细胞, 反复冻融 3 次后接种 BHK-21 细胞连续传代。

2.3 拯救病毒的鉴定

2.3.1 RT-PCR 和序列测定

以转染上清提取的总 RNA 为模板, 用 F3(+)和 F4(-)引物成功扩增出 2 708 bp 的目的条带, 与预期相符(图 5)。测序峰图结果表明, 拯救的

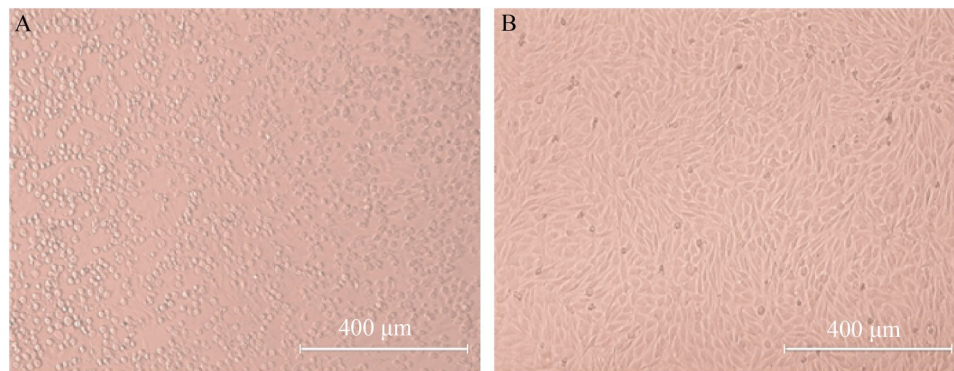


图4 转染BSR/T7细胞72 h后的细胞病变效应(400×)

Figure 4 Cytopathic effects in BSR/T7 cells at 72 h post-transfection (400×). A: Lesioned BSR/T7 cells; B: Normal BSR/T7 cells.

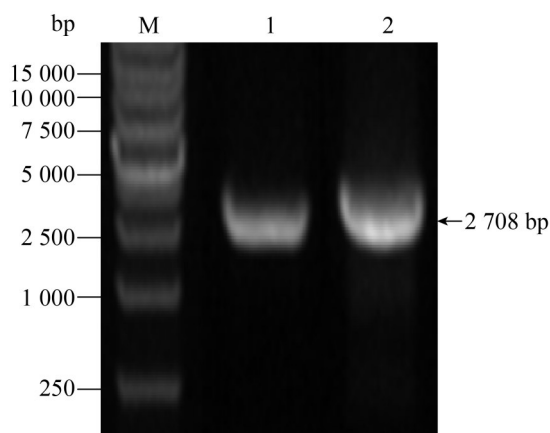


图5 拯救FMDV的RT-PCR

Figure 5 RT-PCR for rescuing FMDV. Lane M: 15 000 bp DNA marker; Lane 1: O/GDLeiZh/2020; Lane 2: R-O/GDLeiZh/2020.

重组病毒含有预期的分子标记(图 6), 说明拯救的病毒来源于 2 个亚基因组复制子的共转染, 而非亲本病毒污染。

2.3.2 免疫荧光检测

用 FMDV 特异的 3A 单抗检测重组病毒 3A 蛋白的表达。结果表明, 亲本病毒与两片段共转染拯救的病毒感染的 BHK-21 细胞均能与 FMDV 3A 单抗反应, 出现特异的绿色荧光, 而对照细胞与 3A 单抗作用未见任何可见荧光(图 7), 说明拯救的病毒为 FMDV。

2.3.3 电镜观察

亲本病毒与拯救病毒经磷钨酸负染后在电

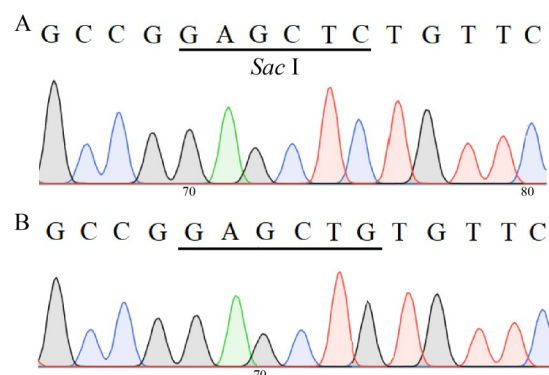


图6 亲本与拯救FMDV的序列测定峰图

Figure 6 Sequence chromatograms of parent and rescued FMDV. A: O/GDLeiZh/2020; B: R-O/GDLeiZh/2020.

镜下观察, 结果显示拯救病毒与亲本病毒形态一致, 均为直径约 25 nm 的球形病毒粒子, 与 FMDV 的形态完全一致(图 8)。

2.4 拯救病毒的生长特性

2.4.1 噬斑试验

拯救病毒与亲本病毒的噬斑试验结果表明, 2 株 FMDV 均可在 BHK-21 细胞上形成大小不一的噬斑, 且噬斑形态相似(图 9A)。

2.4.2 一步生长曲线

病毒生长动力学结果表明, 两片段共转染拯救的重组病毒与亲本病毒具有相似的复制动力学(图 9B)。

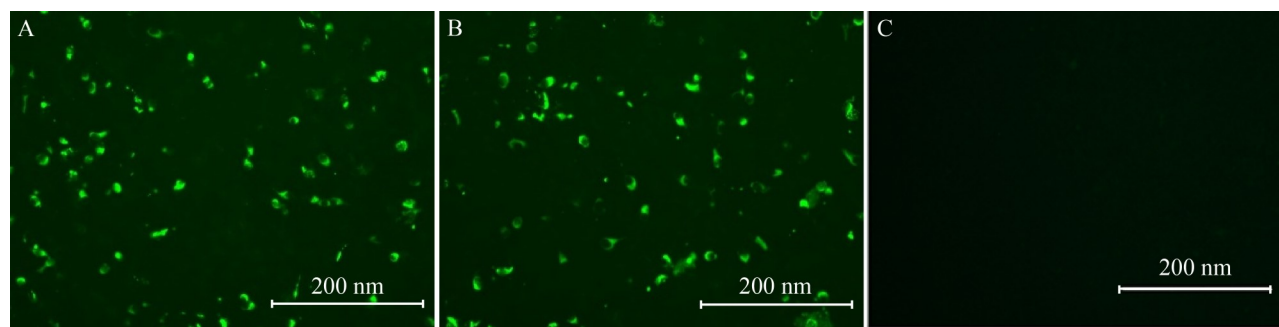


图7 拯救FMDV的IFA鉴定(1 000×)

Figure 7 IFA identification of rescued FMDV (1 000×). A: O/GDLeiZh/2020; B: R-O/GDLeiZh/2020; C: Mock.

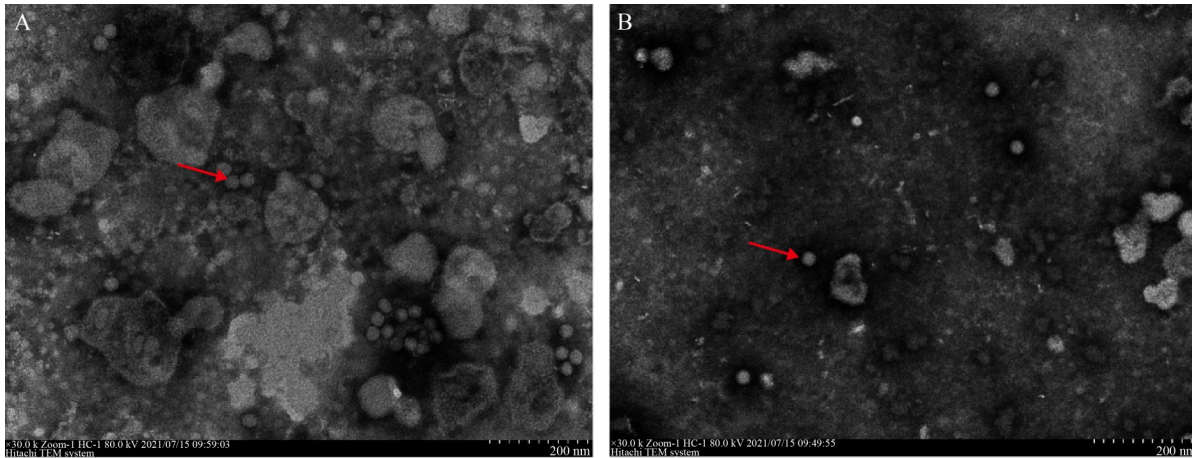


图8 FMDV粒子的电镜观察(30 000×)

Figure 8 FMDV particles were observed by electron microscopy (30 000×). A: O/GDLeizh/2020; B: R-O/GDLeizh/2020.

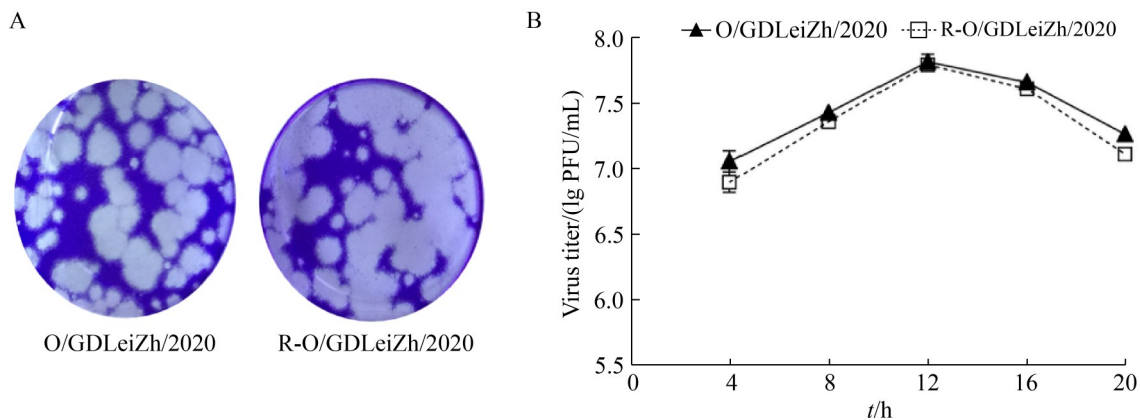


图9 FMDV的噬斑表型和一步生长曲线

Figure 9 Plaque phenotype and one-step growth curves of FMDVs. A: Plaque morphology; B: One-step growth curves.

3 讨论

FMDV 基因组全长约 8 400 bp, 若无特殊结构且无须引入分子标记, 理论上可将其分为 2 个覆盖全基因组并带有重叠区的亚基因组复制子, 直接转染即可拯救病毒。然而, FMDV 基因组 5'端非编码区含有一段连续的多聚胞嘧啶序列[poly(C)]特殊结构, 长度通常在 100–400 bp 之间^[12]。该区域 G+C 含量极高, 使用常规 RT-PCR 难以直接从病毒 RNA 中扩增获得^[19],

通常需通过融合 PCR 或基因合成方式引入。前期研究表明, 将 poly(C)序列长度控制在 12–17 个核苷酸之间对拯救病毒的毒力无明显影响^[20]。此外, 为区分拯救病毒与野生型病毒, 通常还需在病毒编码区内引入分子标记。同时, 在融合 PCR 过程中若 2 个模板片段长度差异过大也会显著降低扩增效率^[21]。基于上述考虑, 本研究首先将全长基因组划分为 5 个具有重叠序列的片段(F1–F5)分别进行扩增, 随后通过融合 PCR 将 F1–F4 连接为一个较长的片段, 再与 F5

共转染细胞进行病毒拯救。该分段扩增与融合策略不仅规避了高 G+C 区域和长片段扩增的技术瓶颈,也减少了最终转染所需的 DNA 片段数量,从而有效提高了病毒拯救效率。

基于感染性亚基因组复制子(infectious subgenomic amplicons, ISA)的无克隆技术为 RNA 病毒反向遗传学研究提供了高效技术平台,尤其适用于基因组在大肠杆菌中不稳定或具有毒性的病毒。在该策略中,通常在病毒基因组 5'端上游插入人巨细胞病毒(CMV)或 T7 启动子,并在 3'末端引入丁型肝炎病毒核酶(HDV)序列与 SV40 多聚腺苷酸化信号(pA)^[6],以便在细胞核内转录出带有完整 poly(A)尾的病毒 RNA,并促进其向细胞质转运^[22]。然而,本团队前期基于常规克隆方法构建 FMDV 感染性克隆的研究表明,其拯救过程对转录终止信号的依赖程度较低,仅需在 5'端引入 T7 启动子,在基因组 3'末端直接添加 poly(A)尾及紧随其后的限制性内切酶位点(用于线性化全长),无需额外的核酶或多聚腺苷酸化信号即可实现病毒的高效拯救^[18]。因此,本研究采用了该简化设计,在覆盖全基因组的亚基因组复制子中 5'端添加 T7 启动子序列,3'端添加一段含 17 nt 的 poly(A)尾。经验证,将 2 个覆盖全基因组的亚基因组复制子共转染至表达 T7 RNA 聚合酶的 BSR/T7 细胞后可成功拯救出具有感染性的 FMDV。此外,本研究同时进行了 3 个亚基因组复制子(F123+F4+F5)的共转染,结果也能成功拯救 FMDV,但病毒 CPE 出现的时间明显滞后于两片段转染。事实上,对于基因组更大的病毒,如新型冠状病毒,已有研究通过 7 个甚至更多片段实现拯救,但效率随片段数增加而降低^[23]。

科学技术的发展通常具有双面性,反向遗传学技术也不例外。基于感染性亚基因组复制子(ISA)的无克隆病毒拯救技术在新发或突发病毒性传染病的应急研究中具有不可替代的速度优势^[22]。然而,该技术也存在固有的局限性,尤其在重复性以及单个基因突变引起表型变化等研究中,稳定可靠的传统克隆平台依然不可

或缺^[24]。因此,ISA 病毒拯救技术与传统全长感染性克隆技术并非相互替代,而是功能互补、各有侧重的工具,研究者应根据具体研究目标和时间要求灵活选择应用。

4 结论

本研究基于 ISA 技术成功构建了 FMDV 高效拯救体系。该方案完全避免了体外连接及细菌克隆等繁琐步骤,可在 2–4 d 内实现病毒的快速拯救,为 FMDV 疫苗候选株的快速研发及疫情株的变异评估等提供了高效、便捷的技术平台。

作者贡献声明

欧阳一凡:实验操作、论文撰写;孙普:实验指导;刘茹菊:实验操作;裴玉奇:实验操作与数据处理;向知玉:图片处理;曹轶梅:软件程序;白兴文:论文指导;马雪青:协助实验操作;李坤:协助实验设计;袁红:论文修改;卢曾军:协助实验设计和论文审阅;李平花:提出概念、实验设计、论文指导。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] Semkum P, Thangthamniyom N, Chankeeree P, Keawborisuth C, Theerawatanasirikul S, Lekcharoensuk P. The application of the Gibson assembly method in the production of two pKLS3 vector-derived infectious clones of foot-and-mouth disease virus[J]. *Vaccines*, 2023, 11(6): 1111.
- [2] Biswal JK, Subramaniam S, Sharma GK, Mahajan S, Ranjan R, Misri J, Pattnaik B. Megaprimer-mediated capsid swapping for the construction of custom-engineered chimeric foot-and-mouth disease virus[J]. *Virus Genes*, 2015, 51(2): 225–233.
- [3] Yun T, Ni Z, Liu GQ, Yu B, Chen L, Huang JG, Zhang YM, Chen JP. Generation of infectious and pathogenic duck hepatitis virus type 1 from cloned full-length cDNA[J]. *Virus Research*, 2010, 147(2): 159–165.
- [4] Li PH, Yao C, Wang T, Wu T, Yi WF, Zheng Y, Miao YJ, Sun JH, Tan ZY, Liu Y, Zhang XW, Wang HZ, Zheng ZH. Recovery of a far-eastern strain of tick-borne encephalitis virus with a full-length infectious cDNA clone[J].

- Virologica Sinica, 2021, 36(6): 1375-1386.
- [5] Wang DF, Cui LY, Zhang L, Ma ZN, Niu YB. Complete genome sequencing and infectious cDNA clone construction of soybean mosaic virus isolated from Shanxi[J]. The Plant Pathology Journal, 2021, 37(2): 162-172.
- [6] Aubry F, Nougairède A, de Fabritus L, Quérat G, Gould EA, de Lamballerie X. Single-stranded positive-sense RNA viruses generated in days using infectious subgenomic amplicons[J]. Journal of General Virology, 2014, 95(11): 2462-2467.
- [7] Park CJ, Lee YA, Yoo SM, Kim GA, Lee MS, Park C. Efficient reverse genetics approach involving infectious subgenomic amplicon for engineering dengue virus[J]. Journal of Medical Virology, 2023, 95(8): e28978.
- [8] Singh PP, Le NPK, Karniychuk U. Infectious subgenomic amplicon strategies for Japanese encephalitis and West Nile viruses[J]. Journal of Medical Virology, 2025, 97(2): e70205.
- [9] Atieh T, Baronti C, de Lamballerie X, Nougairède A. Simple reverse genetics systems for Asian and African Zika viruses[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 39384.
- [10] Li YW, Zeng WJ, Niu XN, Yuan ZM, Li SR, Lin JR, Xie KY, Zhu ZX, Yi L, Ding HX, Zhao MQ, Fan SQ, Chen JD. Foot-and-mouth disease virus-like particle vaccine incorporating dominant T and B cell epitopes: enhanced immune response in piglets with CD154 molecules[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2025, 12: 1540102.
- [11] 任林柱, 王兴龙, 崔丽瑾, 张辉, 孟柯音. 口蹄疫病毒 WFL 株 ORF 基因真核表达质粒的构建及病毒的拯救[J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(4): 27-31.
Ren LZ, Wang XL, Cui LJ, Zhang H, Meng KY. Rescue of FMDV from cotransfecting full length infectious RNA of WFL strain and eukaryotic expression plasmid of FMDV ORF gene[J]. China Biotechnology, 2008, 28(4): 27-31 (in Chinese).
- [12] 白兴文, 李平花, 刘在新, 刘湘涛, 谢庆阁. 口蹄疫病毒反向遗传学研究进展[J]. 微生物学通报, 2009, 36(1): 106-112.
Bai XW, Li PH, Liu ZX, Liu XT, Xie QG. Recent advances on reverse genetics of foot-and-mouth disease virus[J]. Microbiology China, 2009, 36(1): 106-112 (in Chinese).
- [13] Zhang XJ, Xiong YL, Zhang J, Shao T, Chen SB, Miao BC, Wang ZY, Du Q, Huang Y, Tong DW. Autophagy promotes porcine parvovirus replication and induces non-apoptotic cell death in porcine placental trophoblasts[J]. Viruses, 2020, 12(1): 15.
- [14] Liu H, Zheng HF, Xiang WY, Song YP, Li BW, Yin JL, Liu MZ, Liu XX, Wang LQ, Yang SP, Xu K, Zhi HJ. Construction and characterization of the infectious cDNA clone of the prevalent Chinese strain SC3 of soybean mosaic virus[J]. Phytopathology Research, 2023, 5: 9.
- [15] Zha JJ, Zhang KQ, Zhang XZ, Sun P, Li D, Cao YM, Bai XW, Ma XQ, Li K, Yuan H, Fu YF, Zhang J, Zhao ZX, Wang J, Bao HF, OuYang YF, Qi SY, Liu ZX, Lu ZJ, Li PH. Foot-and-mouth disease virus vaccine with VP1 G-H loop substitution of the Cathay strain broadens antigen spectrum[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2025, 109: 199.
- [16] Buchholz UJ, Finke S, Conzelmann KK. Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter[J]. Journal of Virology, 1999, 73(1): 251-259.
- [17] 李平花, 白兴文, 卢曾军, 孙普, 郭建宏, 李冬, 曹伟军, 陈应理, 刘湘涛, 殷宏, 刘在新. 细胞内转录拯救 Asia1 型口蹄疫病毒[J]. 中国农业科学, 2009, 42(2): 688-693.
Li PH, Bai XW, Lu ZJ, Sun P, Guo JH, Li D, Cao WJ, Chen YL, Liu XT, Yin H, Liu ZX. Rescue of infectious foot-and-mouth disease virus *in vivo* from full-length cDNA clone of Asia1 type[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2009, 42(2): 688-693 (in Chinese).
- [18] 袁子文, 李平花, 孙普, 白兴文, 袁红, 马雪青, 卢曾军, 刘在新, 魏彦明. 一株 A 型口蹄疫流行毒株全序列的测定及其全长感染性克隆的构建[J]. 微生物学通报, 2016, 43(9): 2019-2027.
Yuan ZW, Li PH, Sun P, Bai XW, Yuan H, Ma XQ, Lu ZJ, Liu ZX, Wei YM. Complete genome sequence analysis and construction full-length infectious cDNA clone of an epidemic Foot-and-mouth disease virus of serotype A[J]. Microbiology China, 2016, 43(9): 2019-2027 (in Chinese).
- [19] Kim RH, Chu JQ, Park JN, Lee SY, Lee YJ, Ko MK, Hwang JH, Lee KN, Kim SM, Tark D, Ko YJ, Lee HS, Seo MG, Park ME, Kim B, Park JH. Antigenic properties and virulence of foot-and-mouth disease virus rescued from full-length cDNA clone of serotype O, typical vaccine strain[J]. Clinical and Experimental Vaccine Research, 2015, 4(1): 114.
- [20] 白兴文, 李平花, 孙普, 李永亮, 包慧芳, 卢曾军, 曹轶梅, 郭建宏, 刘在新. 不同长度 poly(C) 对口蹄疫病毒基因工程毒的毒力影响[J]. 微生物学报, 2008, 48(12): 1654-1658.
Bai XW, Li PH, Sun P, Li YL, Bao HF, Lu ZJ, Cao YM, Guo JH, Liu ZX. Virulence comparison of genetic engineering virus containing different length poly(C) tract of foot-and-mouth disease virus[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(12): 1654-1658 (in Chinese).
- [21] Shevchuk NA. Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously[J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(2): 19e-119.
- [22] Atieh T, El Ayoubi MD, Aubry F, Priet S, de Lamballerie X, Nougairède A. Haiku: new paradigm for the reverse genetics of emerging RNA viruses[J]. PLoS One, 2018, 13(2): e0193069.
- [23] Mélade J, Piorkowski G, Touret F, Fourié T, Driouich JS, Cochlin M, Bouzidi HS, Coutard B, Nougairède A, de Lamballerie X. A simple reverse genetics method to generate recombinant coronaviruses[J]. EMBO Reports, 2022, 23(5): e53820.
- [24] Cochlin M, Driouich JS, Moureau G, Piorkowski G, de Lamballerie X, Nougairède A. *In vivo* rescue of arboviruses directly from subgenomic DNA fragments[J]. Emerging Microbes & Infections, 2024, 13: 2356140.