

## 基孔肯雅病毒感染性克隆构建及拯救

曹恒<sup>1,2</sup> 刘娜<sup>1,2</sup> 王永康<sup>1,2</sup> 王漫兮<sup>1,2</sup> 龙钢<sup>1,2Δ</sup>

(<sup>1</sup>复旦大学上海市重大传染病和生物安全研究院 上海 200032; <sup>2</sup>复旦大学基础医学院病原生物学系教育部/卫健委/中国医科院医学分子病毒学重点实验室 上海 200032)

**【摘要】** 目的 通过反向遗传学技术构建感染性质粒并拯救一株基孔肯雅病毒(Chikungunya virus, CHIKV)。方法 通过PCR、琼脂糖凝胶电泳、同源重组等分子克隆实验,构建CHIKV(Caribbean strain, isolate M100, Genbank序列号为LN898093.1)全长感染性克隆;通过体外转录、脂质体转染等方法将病毒mRNA转染至BHK-21细胞以拯救病毒;应用TCID<sub>50</sub>法和Reed-Muench法计算病毒滴度。通过Western blot和RT-qPCR检测CHIKV在感染BHK-21及Vero E6细胞后不同时间点的病毒蛋白及mRNA水平的变化。结果 成功构建了CHIKV感染性克隆全长cDNA编码质粒,并成功拯救出子代病毒。通过RT-qPCR和Western blot验证了病毒在感染过程中NS1蛋白的mRNA水平及BHK-21细胞中NS3、E1蛋白表达水平均显著上升。结论 成功构建CHIKV感染性克隆质粒并成功拯救病毒,为后续CHIKV基因结构、蛋白质功能和致病机制等研究提供了良好的工具。

**【关键词】** 基孔肯雅病毒(CHIKV); 感染性克隆; 病毒拯救

**【中图分类号】** R373 **【文献标志码】** A **doi:**10.3969/j.issn.1672-8467.2025.06.005

## Construction and rescue of Chikungunya virus infectious clone

CAO Heng<sup>1,2</sup>, LIU Na<sup>1,2</sup>, WANG Yong-kang<sup>1,2</sup>, WANG Man-xi<sup>1,2</sup>, LONG Gang<sup>1,2Δ</sup>

(<sup>1</sup>Shanghai Institute of Infectious Disease and Biosecurity, Fudan University, Shanghai 200032, China; <sup>2</sup>Department of Medical Microbiology and Parasitology, Key Laboratory of Medical Molecular Virology (MOE/NHC/CAMS), School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China)

**【Abstract】** **Objective** To rescue a strain of Chikungunya virus (CHIKV) using reverse genetics system. **Methods** Molecular cloning experiments, including PCR, agarose gel electrophoresis and homologous recombination were employed to generate an infectious cDNA clone (pFK-CHIKV-LN) derived from the isolated Caribbean Chikungunya strain (Caribbean strain, isolate M100, Genbank LN898083.1). The mRNA obtained from *in vitro* transcription were transfected into BHK-21 to rescue the CHIKV. The viral titer was determined by 50% tissue culture infection dose (TCID<sub>50</sub>), with calculations performed using the Reed-Muench method. Western blot (WB) and real time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) were employed to assess the levels of viral protein and mRNA at various time points during infection. **Results** The full-length cDNA clone of CHIKV was successfully constructed, enabling the rescue of CHIKV progeny. RT-qPCR and WB confirmed the significant increasing expression levels of NS1 mRNA and proteins (NS3, E1) of BHK-21 during the infection process. **Conclusion** The full-length infectious clone of CHIKV has been constructed successfully, which provides a good tool for subsequent studies on the gene structure, protein function and pathogenic mechanism of CHIKV.

上海市市级科技重大专项(ZXS002R2-3)

<sup>Δ</sup>Corresponding author E-mail: gang\_long@fudan.edu.cn

网络首发时间:2025-10-27 16:05:20 网络首发地址:https://link.cnki.net/urlid/31.1885.R.20251024.1648.006

**【Key words】** Chikungunya virus (CHIKV); infectious clone; virus rescue

\* This work was supported by Shanghai Municipal Science and Technology Major Project (ZXS002R2-3).

基孔肯亚病毒(Chikungunya virus, CHIKV)属于Togaviridae科<sup>[1]</sup>,甲病毒属(Alphaviridae),其中甲病毒可以分为8个抗原复合组,CHIKV属于塞姆利基森林病毒复合组,其基因组由一条11.8 kb的正义RNA链组成,5'端到3'端基因组包含1个开放阅读框(open reading frame, ORF)和一个26S亚基因启动子。其中,ORF1链编码4个非结构蛋白(nsP1、nsP2、nsP3和nsP4)经翻译后形成复制复合物并以全长正链RNA为模板合成负链RNA。负链RNA上有相应的保守序列元件(conserved sequence elements, CSEs),完全加工的复合物能与负链RNA 3'端CSE1结合,并合成全长的正链RNA,也能与CSE3结合并合成26S亚基因组mRNA。在26S亚基因启动子的控制下编码5个结构蛋白(Capsid、E3、E2、6K和E1)<sup>[2]</sup>。病毒的复制和成熟释放过程:病毒的E2蛋白与细胞表面结合,CHIKV通过内吞作用进入细胞,内体酸化导致E1中的融合肽插入内体膜<sup>[3-4]</sup>;随后病毒核衣壳的外壳解离,释放出正链基因组RNA后发生非结构蛋白(nsP)翻译,形成复制复合物P1234和P123,并作为复制酶发挥作用,以产生基因组、抗原组和亚基因组RNA;最后,核衣壳在细胞膜处与E2/E1组装,成熟后代病毒粒子出芽<sup>[5]</sup>,包膜蛋白E2和E1也在随后的细胞侵袭中起重要作用<sup>[3]</sup>。

CHIKV可导致发热性疾病周期性暴发,其于1952年被首次分离<sup>[6]</sup>,主要通过伊蚊(*Stegomyia*亚属)叮咬传播,也可通过母婴传播<sup>[7]</sup>。CHIKV最初在撒哈拉沙漠以南的非洲地区和东南亚的热带和亚热带地区流行,主要由埃及伊蚊或者白纹伊蚊介导<sup>[8]</sup>。2013年,CHIKV到达美洲,在加勒比地区首次被发现。随后CHIKV迅速传遍整个美洲,造成了全球范围内超大规模的大流行<sup>[9]</sup>,本文毒株来源于加勒比海地区。

CHIKV引起的疾病主要是复发性骨骼肌肉疾病,急性感染后可持续数月或数年,对患者的生活质量及所在社区影响较大<sup>[10]</sup>。此外,CHIKV还会与其他病原体(比如虫媒病毒)出现共感染<sup>[11]</sup>和相互作用,影响病毒的增殖和变异,导致患者临床症状加重。

CHIKV致病机制尚不明确,目前缺乏针对性的疫苗和抗病毒药物,亟需加强相关基础研究。反向遗传学是重要的研究工具,可通过靶向修饰和突变来高效研究病毒复制和发病机制。1981年,研究者首次构建了RNA病毒(脊髓灰质炎病毒)的cDNA感染性克隆,为人类抵御脊髓灰质炎作出了卓越贡献<sup>[12]</sup>。然而染性克隆的构建也面临许多挑战:大片段的正链RNA病毒序列较长,容易在病毒序列中出现较多的细菌启动子,影响质粒在细菌中的扩增效果。克隆策略主要是在序列前直接添加CMV启动子,随后通过转染质粒拯救病毒<sup>[13]</sup>;或者在序列前添加T7启动子,随后通过体外转录合成病毒RNA,将RNA转染至相应的细胞用于直接拯救病毒。

本研究旨在通过优化病毒基因组序列,开发一个高效、稳定的CHIKV反向遗传学平台。优化后的感染性克隆系统将能够显著提高病毒拯救效率,为后续深入探究CHIKV的致病分子机制、解析病毒蛋白的功能与结构,乃至开发新型减毒疫苗候选株,提供可靠且高效的技术工具。

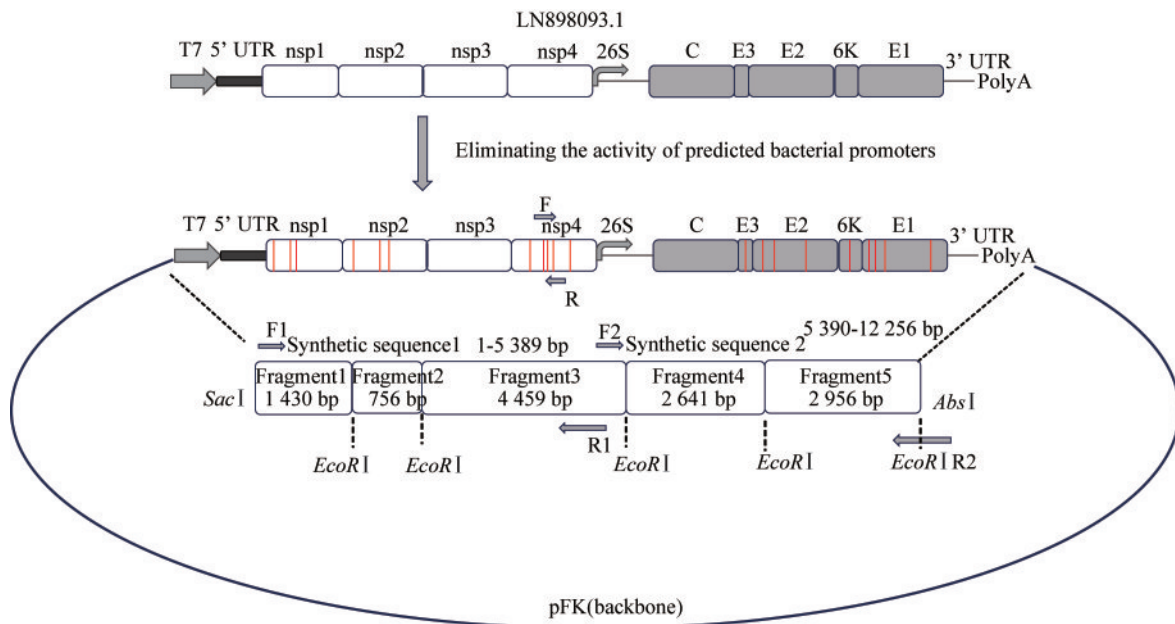
## 材料和方法

**细胞培养和试剂** BHK-21和VeroE6细胞,构建基孔肯雅感染性克隆全长cDNA编码质粒所用的低拷贝载体pFK-ZL1<sup>[14]</sup>均为本实验室保存。所有细胞于37℃、5% CO<sub>2</sub>的培养箱中,在含有10% FBS(A5669701)、Dulbecco改良的DMEM培养基(C11965500BT)中培养,含双抗(青霉素、链霉素,15140122)及非必需氨基酸(11140050)。上述试剂均购自美国Gibco公司。

**基孔肯雅感染性克隆全长cDNA编码质粒构建** 所构建的序列选自2016年在加勒比地区传播的CHIKV毒株(Caribbean strain, isolate M100, Genbank序列号为LN898093.1),通过在线工具([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html))预测并通过同义突变去除病毒cDNA序列中细菌原核启动子毒性。基孔肯雅全长感染性克隆构建策略示意图见图1。随后将同义突变后的序列送至

基因合成公司(上海捷瑞生物工程有限公司)分段合成全长cDNA,并在5'UTR前添加T7启动子序列(TAATACGACTCACTATAG),3'UTR后添加相应的*AbsI*酶切位点(CCTCGAGG)。设计引物时需加上前后所连接片段约20 bp的同源臂,最后通过PCR(2×Phanta Max Master Mix,南京诺唯赞生物科技股份有限公司P515-02)扩增所需片段,并对pFK载体进行酶切。将这两部分进行琼脂糖

凝胶电泳并胶回收目的片段后,通过无缝克隆(ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit V2,南京诺唯赞生物科技股份有限公司,C116-02)进行同源重组反应,以实现片段和载体的连接。最后通过细菌转化实验将重组质粒转化到DH5 $\alpha$ 感受态细胞,挑取单菌落进行摇菌,提取质粒后进行*EcoRI*(英国New England Biolabs公司R3101S)限制性内切酶酶切验证,鉴定无误后测序。



To eliminate the activity of predicted bacterial promoters, 19 silent mutations were introduced into the CHIKV genomic cDNA. The red bars indicate the precise sites of these silent mutations. Details of mutations are described in Table 1. The full-length sequence was synthesized in two segments. T7 promoter required for *in vitro* transcription was added upstream of the 5' UTR region and an *AbsI* restriction site was inserted downstream of the 3' UTR.

图1 基孔肯雅全长感染性克隆构建策略示意图

Fig 1 Schematic diagram of the full-length CHIKV infectious cDNA clone

**线性化及体外转录实验** 使用限制性内切酶*AbsI*[西酶科技(北京)有限公司SE-E535,L],对去内毒素后质粒大提后的感染性克隆的质粒取10  $\mu$ g进行酶切(37  $^{\circ}$ C,2 h)。随后,使用酚氯仿抽提法回收线性化DNA,后续使用体外转录试剂盒(美国Invitrogen公司mMACHINE™ T7,AM1344)对线性化DNA进行体外转录(37  $^{\circ}$ C,2 h),并通过氯化锂沉淀法回收RNA,最终取1  $\mu$ L样品进行1%琼脂糖凝胶电泳验证。

**TCID<sub>50</sub>实验** 将2×10<sup>4</sup>/孔的BHK-21细胞种植于96孔板中过夜培养,第二天将冻存病毒液用无血清DMEM(美国Gibco公司,C11965500BT)进行梯度稀释,每孔加入100  $\mu$ L稀释后的病毒液。4 h

后用PBS清洗1遍,然后更换含3% FBS的DMEM培养基继续培养。每个稀释度下设定8个复孔,并进行3次独立重复实验。48 h后使用光学显微镜观察每个稀释度下出现的细胞病变效应(cytopathic effects,CPE)的孔数并进行统计。最后通过Reed-Muench法计算病毒滴度。

**转染实验** 提前一天将24孔板铺2×10<sup>5</sup>个细胞/孔,第2天使用Lipofectamine 3000转染试剂(美国Invitrogen公司,L3000015),每孔转染0.5  $\mu$ g体外转录的RNA,使得最终培养体积为200  $\mu$ L。4 h后使用PBS清洗2遍,随后更换为3% FBS的DMEM培养基,并在不同时间点(4、24、48、72、96 h)收取RNA及蛋白样品用于后续检测。

**感染实验** 提前一天将24孔板铺 $2 \times 10^5$ 个细胞/孔,按照预定感染复数(multiplicity of infection, MOI),即病毒滴度(TCID<sub>50</sub>/mL)×病毒体积(mL/细胞个数)进行感染,使得最终培养体积为200 μL。4 h后使用PBS清洗2遍,随后更换为3% FBS的DMEM培养基,并在不同时间点收取RNA及蛋白样品用于后续检测。

**RT-qPCR实验** 采用Trizol Up总RNA提取试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)提取细胞RNA(24孔板使用500 μL Trizol),并使用HiScript III qRT SuperMix(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)将RNA反转录成对应的cDNA。以GADPH(鼠源)作为内参,引物序列F:5'-GAAGGCCGGG GCCACTTGA-3', R:5'-CTGGGTGGCAGTG ATGGCATGG-3'; GADPH(人源),引物序列F:5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3', R:5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3';病毒非结构蛋白NS1特异性引物1:5'-AATCAAGTGGCTGT TACGCAAGG-3',引物2:5'-GTTCTGCTTCT CGTTCTTCCTCTG。随后配制 $2 \times$  ChamQ Blue Universal SYBR qPCR Master Mix(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)、ddH<sub>2</sub>O、Primer F(10 pmol)和Primer R(10 pmol)混合液,最终体系体积为20 μL。反应条件为95 °C 10 s、60 °C 30 s,共进行40个循环以测量CT值。

**病毒蛋白的Western blot检测** 在24孔板中,使用200 μL  $1 \times$  SDS上样缓冲液对细胞进行裂解,置于95 °C金属浴30 min。随后,将8 μL样品点至SDS-PAGE凝胶中进行电泳使得蛋白分离。使用湿转法将蛋白转移至PVDF膜上(90V, 90 min),随后用5%的脱脂奶粉进行封闭1 h, TBST清洗1次后加入一抗、E1抗体(GTX637973)、NS3抗体(GTX638828)(均购自美国基因泰克公司),于4 °C孵育过夜。隔天,用TBST清洗3遍(每次10 min),随后加入二抗[山羊抗兔IgG(H+L)辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP),上海圣尔生物科技有限公司,SB-AB0101]室温孵育1 h, TBST清洗4遍,最后使用ECL化学发光超敏显色试剂盒[翌圣生物科技(上海)股份有限公司,36208ES76]进行曝光显影。

**统计学方法** 实验数据用GraphPad Prism 8软件进行统计分析并制图,两组间比较采用 $t$ 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结 果

**病毒序列的细菌原核启动子毒性去除** 感染性克隆的毒株源自加勒比地区的流行株,根据课题组之前拯救寨卡病毒的经验,通过原核启动子预测网站(见前文)来预测CHIKV-LN全长序列中的原核启动子位置和数量并进行无义突变(表1),以最大程度降低细菌毒性,从而提高大片段克隆的成功率<sup>[15]</sup>。此外,在5' UTR区域前方增加了体外转录所需要的T7启动子,并在3' UTR后添加酶切位点*Abs I*。最后将序列分为两段,交由上海捷瑞生物工程有限公司合成病毒基因组cDNA片段。

**pFK-CHIKV-LN感染性克隆全长cDNA编码质粒的构建和体外转录mRNA获取** 通过PCR反应扩增CHIKV的两段序列,并将质粒pFK-ZL1进行双酶切获取pFK载体,通过同源重组的方式构建重组质粒。使用*EcoRI*限制性内切酶进行酶切鉴定,电泳结果(图2A)和测序结果均符合预期(图3D)。使用*AbsI*将质粒进行线性化(pFK-CHIKV-LN, 10 μg),随后通过酚氯仿抽提进行回收,电泳结果正确(图2B)。将1 μg线性化模版进行体外转录,琼脂糖凝胶电泳结果显示正确,其中pFK-ZL1为阳性对照(图2C),该质粒构建于本实验室<sup>[14]</sup>。

**成功拯救CHIKV** 体外转录的RNA转染BHK-21细胞后,随后于不同时间点收取细胞样品进行WB和RT-qPCR检测。RT-qPCR相对定量结果表明,使用针对病毒NS1特异性引物和内参蛋白GADPH的引物进行检测时,病毒RNA在转录水平上随着时间的推移显著上升(图3A)。WB结果表明病毒E1和NS1蛋白在24 h时明显表达。由于48 h后细胞已几乎全部死亡,故NS1和E1蛋白均出现了下降(图3B)。将转染72 h后的病毒液感染BHK-21细胞,并于4、12、24、36、48、72 h后收集病毒液,于-80 °C进行冻存,通过TCID<sub>50</sub>法对第二代病毒滴度进行检测,结果表明重组病毒感染BHK-21细胞24~72 h内,基孔肯雅病毒出现大量扩增,并于感染后48~72 h感染力水平达到峰值(图3C)。随后提取重组病毒RNA进行逆转录反应获取cDNA后,使用特定引物经PCR扩增,随后对PCR产物于1%琼脂糖凝胶(图3D)进行电泳和一代测序,测序结果表明成功构建重组病毒(图3E)。

表1 基孔肯雅序列全长原核启动子的预测及沉默突变

Tab 1 Prediction and silent mutation of bacterial promoter sequences of full-length CHIKV genome

Virus and <i>E.coli</i> promoter	Start (bp)	Virus sequence (5'-3')	End (bp)	Viral protein	Score
1WT	147	TGTTTGAGGTGGAACCTAGGCAGGTCACATCAAATGACCATGCTAATGCT	192	NS1	0.99
Mutant		TGTTTGAGGTGGAACCTAGGCAGGTCACATCAAACGACCATGCTAATGCT			ND
2WT	493	CTCATGTAGACAGAGAGCAGACGTCGCGATATACCAAGACGCTATGCTG	547	NS1	0.96
Mutant		CTCATGCAGACAGAGAGCAGACGTCGCGATATACCAAGACGCTATGCTG			ND
3WT	745	CAAATTGTCTATCATGAGAGGGAAAAAGCTAAAACCGTGCGACCGTGTGC	790	NS1	0.91
Mutant		CAAATTATCTATCATGAGAGGGAAAAAGCTAAAACCGTGCGACCGTGTGC			ND
4WT	1 655	GAACAACCTGAGGATAGAGCTGGTGTGGAATAATAGAGACTCCGAGAGG	1 700	NS2	0.90
Mutant		GAACAACCTGAGGATAGAGCTGGTGTGGAATAATAGAGACTCCGAGAGG			ND
5WT	2 538	TCTTCAATATGATGCAGATGAAAGTCAACTACAATCATAACATCTGCACT	2 583	NS2	0.94
Mutant		TCTTCAATATGATGCAGATGAAAGTCAACTACAACCCATAACATCTGCACT			ND
6WT	2 636	GCCATTGTGTCGTCGTTGCATTACGAAGGCAAAATGCGCACTACGAATGA	2 681	NS2	0.97
Mutant		GCCATCGTGTGTCGTCGTTGCATTACGAAGGCAAAATGCGCACTACGAATGA			ND
7WT	3 926	AGAGCATTGAAACCACCATGTATCACCAGTAATACTGAGATGTTCTTCCT	3 971	NS2	0.94
Mutant		AGAGCATTAAAACCACCATGTATCACCAGTAATACTGAGATGTTCTTCCT			ND
8WT	3 980	AGCAGTTTTGACAATGGCAGAAGGAATTTTACAACGCATGTTATGAACAA	4 025	NS2	0.94
Mutant		AGCAGTTTTGACAATGGCAGAAGGAATTTTACAACGCATGTTATGAACAA			ND
9WT	6 620	CTATGTGGAATTCACAGAGAATTGGTTAGGAGATTGAACGCCGTCCTCCT	6 665	NS4	0.95
Mutant		CTATCGGAATTCACAGAGAATTGGTTAGGAGATTGAACGCCGTCCTCCT			ND
10WT	6 750	CCGTTTTAGAAACGGACATAGCCTCCTTTGATAAGAGCCAGGATGATTCA	6 795	NS4	0.94
Mutant		CCGTTTTAGAAACGGACATAGCCTCCTTTGACAAGAGCCAGGATGATTCA			ND
11WT	6 852	TGTTGGACCTGATAGAGGCTGCTTTGGAGAGATTTCCAGCTGTCACCTG	6 897	NS4	0.93
Mutant		TGTTAGACCTGATAGAGGCTGCTTTGGAGAGATTTCCAGCTGTCACCTG			ND
12WT	7 163	TACTTTTGTGGAGGGTTTATACTGCATGATACTGTGACAGGAACAGCTTG	7 208	NS4	0.99
Mutant		TACTTCTGTGGAGGGTTTATACTGCATGATACTGTGACAGGAACAGCTTG			ND
13WT	8 447	TGCTTGAAGACAATGTCATGAGCCCCGGGTACTATCAGCTGCTACAAGCA	8 492	E3	0.98
Mutant		TGCTCGAAGACAATGTCATGAGCCCCGGGTACTATCAGCTGCTACAAGCA			ND
14WT	8 711	GCCATGATTGGACCAAGCTGCGTTATATGGACAATCACATGCCAGCAGAC	8 756	E2	0.92
Mutant		GCCATGACTGGACCAAGCTGCGTTATATGGACAATCACATGCCAGCAGAC			ND
15WT	9 142	GACTCAAGTGAAGGATTAACCACTACAGATAAAGTGATTAATAACTGCAA	9 187	E2	0.92
Mutant		GACTCAAGTGAAGGATTAACCACTACAGACAAGTGATTAATAACTGCAA			ND
16WT	9 898	AACTGTCTGAGACTCTTACCATGCTGTTGTAATAATGTTGACTTTTTTAGC	9 943	6K	0.97
Mutant		AACTGTCTCAGACTCTTACCATGCTGTTGTAATAATGTTGACTTTTTTAGC			ND
17WT	10 105	TGTTTGAGGTGGAACCTAGGCAGGTCACATCAAATGACCATGCTAATGCT	10 150	E1	0.90
Mutant		TGTTTGAGGTGGAACCTAGGCAGGTCACATCAAACGACCATGCTAATGCT			ND
18WT	10 299	CTCATGTAGACAGAGAGCAGACGTCGCGATATACCAAGACGCTATGCTG	10 344	E1	0.95
Mutant		CTCATGCAGACAGAGAGCAGACGTCGCGATATACCAAGACGCTATGCTG			ND
19WT	10 749	CAAATTGTCTATCATGAGAGGGAAAAAGCTAAAACCGTGCGACCGTGTGC	10 794	E1	0.95
Mutant		CAAATTATCTATCATGAGAGGGAAAAAGCTAAAACCGTGCGACCGTGTGC			ND

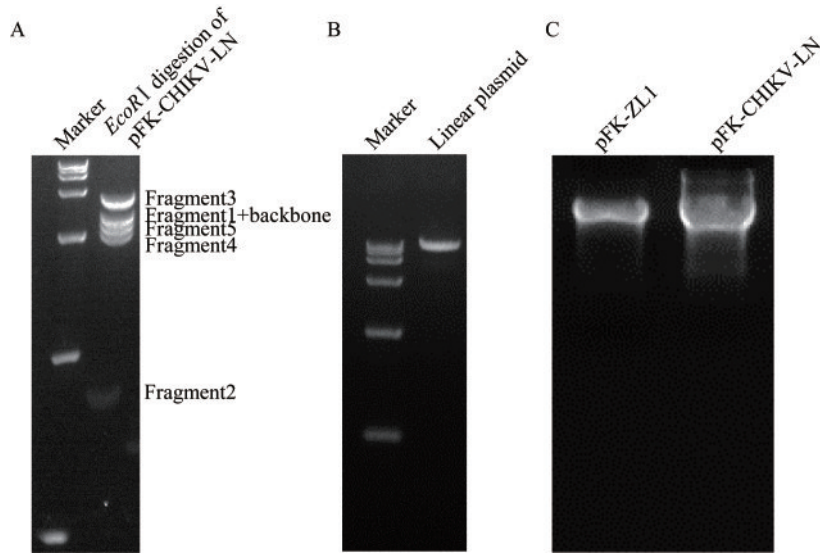
The red nucleotides represent the mutation site. ND: Not detectable; WT: Wild type.

**CHIKV 在 BHK-21 和 VeroE6 的生长特征检测** 将二代病毒以 MOI=0.1 感染 BHK-21 和 VeroE6 细胞, 48 h 后可观察到细胞出现细胞病变效应(明显变圆、皱缩、聚团)(图 4A)。在不同时间点收取细胞样品进行 WB 和 RT-qPCR 检测, 结果显示在 BHK-21 和 VeroE6 细胞中, NS1 的 mRNA 水平在 12 h 后显著升高(图 4B、4D)。此外, BHK-21

细胞中 E1、NS3 蛋白在 24 h 后显著表达(图 4C、4E)。

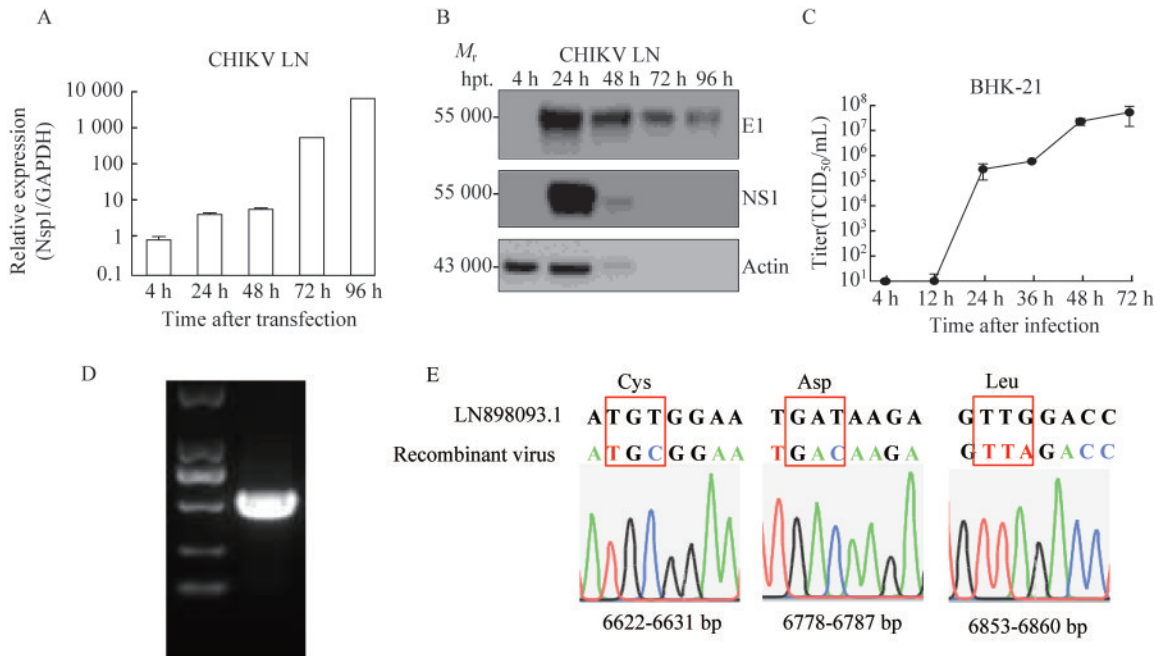
## 讨 论

CHIKV 主要通过蚊虫叮咬传播, 最早于 1952 年在坦桑尼亚被成功分离。随后该病毒在几十年



A: *EcoR* I digested identification of CHIKV infectious clone on 1% agarose gel. B: Linearized CHIKV infectious clone on 1% agarose gel DL15000 (Takara). C: *In vitro* transcription RNA of CHIKV infectious clone on 1% agarose gel. The pFK-ZL1 is the positive control of ZIKA full-length infectious clone constructed in our lab.

图2 pFK-CHIKV-LN质粒验证及体外转录  
Fig 2 Construction of CHIKV full-length cDNA clone

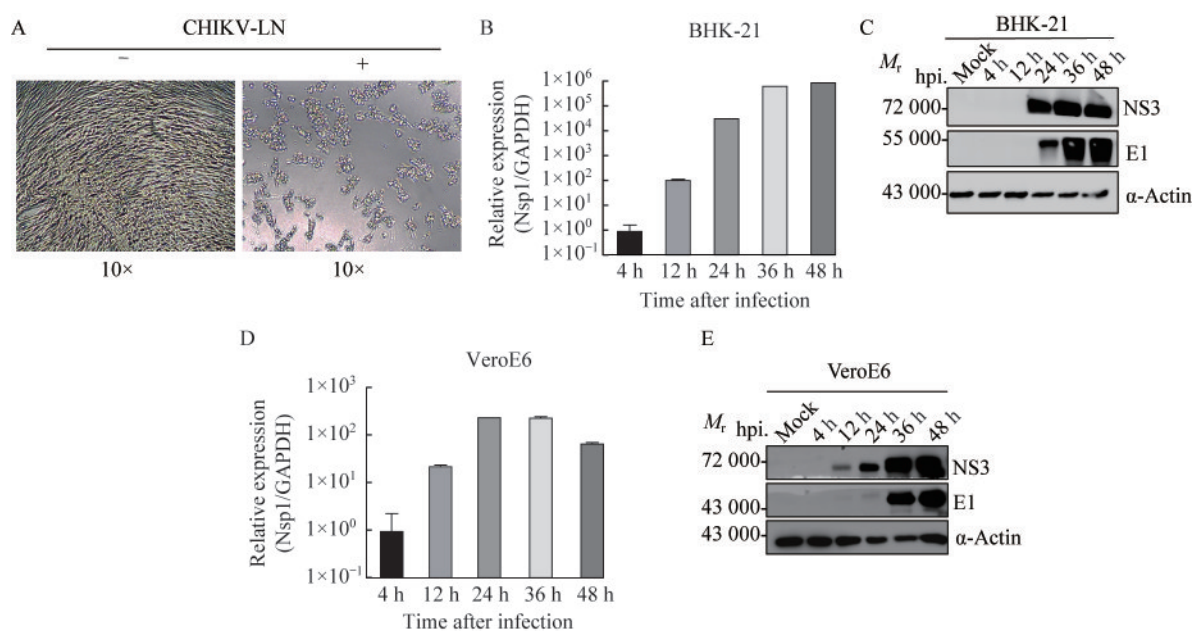


A: Analysis of CHIKV loads in BHK-21 cells transfected with *in vitro* transcribed CHIKV RNA by RT-qPCR assay; B: Western blot analysis of CHIKV protein expression; hpt: hours post transfection; C: TCID50 results after viral infection in BHK-21 cells, based on three independent experiments. The Reed-Muench method was employed to calculate the virus titer. D: Corresponding cDNA of the recombinant virus on 1% agarose gel. Marker: DL2000 (Takara). E: Sequencing after reverse transcription of the recombinant virus.

图3 CHIKV全长感染性克隆拯救  
Fig 3 Rescue of full-length CHIKV infectious clone

内传播至全球众多国家(包括中国),造成了几次规模较大的疫情。中国于1987年在云南一名患者血

清中首次分离出CHIKV<sup>[16]</sup>。2010年,CHIKV在广东引起了一次中等规模的疫情,确诊病例达156例,



A: Cytopathic effects (CPEs) in BHK-21 cells infected with the rescued CHIKV-LN strain (MOI=0.1) at 48 hpi in light microscope (10 $\times$ ); B and C: CHIKV RNA and protein expression in BHK-21 cells infected with CHIKV (MOI=0.1) by RT-qPCR assay and Western blot at different time points; hpi: hours post infection; D and E: CHIKV RNA and protein expression in VeroE6 cells infected with CHIKV (MOI=0.1) by RT-qPCR assay and Western blot at different time points; hpi: hours post infection. CHIKV-specific antibodies were purchased from Gentax. Mock represents the uninfected group.

图4 CHIKV-LN感染后生长特征检测

Fig 4 Growth characteristic of CHIKV-LN

属于ECSA型(东/中/南非基因型)<sup>[17]</sup>。2019年,云南省瑞丽市再次出现了中小规模的CHIKV传播,确诊病例达112例,其中21例来自缅甸的输入性病例是造成此次本土流行的主要传播源头<sup>[18]</sup>。2008—2020年,我国报道了约200多例境外输入的CHIKV病例,早期主要集中在西南和华南地区,随后逐渐向华中转移,显示出由沿海向内部发展的趋势,且境外输入发生的频率也明显加快。因此,对于CHIKV的防范工作仍需引起重视。

CHIKV在传播过程中会获得适应性突变,一个著名的突变事件是ECSA亚型进化成IOL(印度洋谱系)分支后,病毒E1蛋白第226位突变,即丙氨酸突变为缬氨酸,这一突变使得白纹伊蚊更适应病毒,增强了病毒通过传播媒介传播的能力<sup>[19]</sup>,导致短时间内CHIKV在东南亚大规模暴发,造成了较大的公共卫生负担。此外,CHIKV作为人类重要病原体之一,目前尚无高效疫苗和药物获得批准。所以仍需进行更多CHIKV感染过程中病毒复制及组装相关的基础研究。反向遗传学所构建的质粒系统能够很好地应用于CHIKV新的突变毒株以及相关致病机制研究。

反向遗传学可作为研究病毒结构以及功能的重要工具,CHIKV作为一种单正链RNA病毒,全长片段约12 kb,对于这类大片段分子克隆始终存在PCR扩增时容易出现突变、片段连接困难以及重组DNA分子的转化效率较低的问题,可能较大的分子量导致其在细菌内扩增的难度增加。

本研究通过反向遗传学构建了基孔肯雅病毒全长感染性克隆,采用低拷贝载体pFK作为插入病毒全长序列的载体,从而提高了克隆的成功率并尽可能消除细菌启动子毒性。在拯救过程中,选择了T7启动子作为原核表达的启动子,通过体外合成相应的RNA并转染细胞,使其能够在胞质直接进行翻译,更好地模拟病毒感染过程,提高了拯救成功率。本研究拯救的CHIKV滴度较高,达到10<sup>7</sup>/mL。

该质粒系统除了能够研究病毒结构和功能之外,还能用于表达外源基因。由于甲病毒自身的特点,在结构蛋白与非结构蛋白之间含有26S的亚基因启动子,因此可以将目的基因插入至26S亚基因启动子之后,产生相应的外源基因mRNA并表达相应的目的蛋白,且目标基因的mRNA和表达蛋白在较长时间内保持较高水平。因此可以通过定向改

造质粒以应对未来新突变位点所带来的病毒致病效应。综上,该反向遗传学工具为研究 CHIKV 的致病机制和功能结构提供了良好的分子工具。

**作者贡献声明** 曹恒 实验实施,数据整理和分析,论文撰写。刘娜 研究构思,数据分析,论文修订。王永康,王漫兮 数据整理和分析,文献调研。龙钢 研究构思,论文指导。

**利益冲突声明** 所有作者均声明不存在利益冲突。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] STRAUSS JH, STRAUSS EG. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution [J]. *Microbiol Rev*, 1994, 58(3): 491-562.
- [ 2 ] KHAN AH, MORITA K, PARQUET M DC, *et al*. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site [J]. *J Gen Virol*, 2002, 83(Pt 12): 3075-3084.
- [ 3 ] SOURISSEAU M, SCHILTE C, CASARTELLI N, *et al*. Characterization of reemerging chikungunya virus [J]. *PLoS Pathog*, 2007, 3(6): e89.
- [ 4 ] VAN DUIJL-RICHTER MK, HOORNWEG TE, RODENHUIS-ZYBERT IA, *et al*. Early events in Chikungunya virus infection-from virus cell binding to membrane fusion [J]. *Viruses*, 2015, 7(7): 3647-3674.
- [ 5 ] KNIPE DM, HOWLEY PM. *Fields virology* [M]. Philadelphia, Pennsylvania, USA: Lippincott, Williams, and Wilkins, 2013: 629-650.
- [ 6 ] LUMSDEN WH. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. II. General description and epidemiology [J]. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1955, 49(1): 33-57.
- [ 7 ] GÉRARDIN P, BARAU G, MICHAULT A, *et al*. Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Réunion [J]. *PLoS Med*, 2008, 5(3): e60.
- [ 8 ] DIALLO D, SALL AA, BUENEMANN M, *et al*. Landscape ecology of sylvatic chikungunya virus and mosquito vectors in southeastern Senegal [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012, 6(6): e1649.
- [ 9 ] GANESAN V, DUAN B, REID S. Chikungunya virus: pathophysiology, mechanism, and modeling [J]. *Viruses*, 2017, 9(12): 368.
- [ 10 ] COUTURIER E, GUILLEMIN F, MURA M, *et al*. Impaired quality of life after chikungunya virus infection: a 2-year follow-up study [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2012, 51(7): 1315-1322.
- [ 11 ] 郑夔, 孙芳芳, 袁帅, 等. 一例基孔肯雅病毒和寨卡病毒混合感染病例的发现 [J]. *华南预防医学*, 2019, 45(5): 481-485.
- [ 12 ] RACANELLO VR, BALTIMORE D. Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells [J]. *Science*, 1981, 214(4523): 916-919.
- [ 13 ] ALMAZÁN F, SOLA I, ZUNIGA S, *et al*. Coronavirus reverse genetic systems: infectious clones and replicons [J]. *Virus Res*, 2014, 189: 262-270.
- [ 14 ] ZHAO F, XU Y, LAVILLETTE D, *et al*. Negligible contribution of M2634V substitution to ZIKV pathogenesis in AG6 mice revealed by a bacterial promoter activity reduced infectious clone [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 10491.
- [ 15 ] PU SY, WU RH, YANG CC, *et al*. Successful propagation of flavivirus infectious cDNAs by a novel method to reduce the cryptic bacterial promoter activity of virus genomes [J]. *J Virol*, 2011, 85(6): 2927-2941.
- [ 16 ] 施华芳, 张海林, 自登云, 等. 云南首次从患者体内分离到基孔肯雅病毒 [J]. *中国人兽共患病杂志*, 1990(1): 2-4, 2.
- [ 17 ] LI XF, JIANG T, DENG YQ, *et al*. Complete genome sequence of a chikungunya virus isolated in Guangdong, China [J]. *J Virol*, 2012, 86(16): 8904-8905.
- [ 18 ] LIU LB, LI M, GAO N, *et al*. Epidemiological and clinical characteristics of the chikungunya outbreak in Ruili City, Yunnan Province, China [J]. *J Med Virol*, 2022, 94(2): 499-506.
- [ 19 ] MCINTOSH BM, PATERSON HE, MCGILLIVRAY G, *et al*. Further studies on the Chikungunya outbreak in Southern Rhodesia in 1962. I. mosquitoes, wild primates and birds in relation to the epidemic [J]. *Ann Trop Med Parasitol*, 1964, 58: 45-51.

(收稿日期:2024-11-04; 编辑:张秀峰)