

赵银龙,李 健,朱海霞,等. 同源重组介导的重组病毒研究进展[J]. 江苏农业科学,2016,44(11):1-6.

doi:10. 15889/j. issn. 1002-1302. 2016. 11. 001

同源重组介导的重组病毒研究进展

赵银龙^{1,2}, 李 健¹, 朱海霞¹, 颜新敏¹, 赵志荀¹, 吴 健³, 张 强¹, 穆晓峰², 吴国华¹

(1. 中国农业科学院兰州兽医研究所/家畜疫病病原生物学国家重点实验室/农业部畜禽病毒学重点开放实验室,甘肃兰州 730046;

2. 西北民族大学,甘肃兰州 730124; 3. 吉林农业大学动物科学技术学院,吉林长春 130118)

摘要:病毒同源重组是以同源臂为基础的将目的基因整合到病毒基因组中的技术。将表达盒串联到转移载体,通过同源重组构建重组病毒从而实现病毒基因改造、外源基因表达以及重组活载体疫苗制备等。就重组病毒的优缺点、构建原理及应用进展进行了概述,对重组病毒构建的难点进行了分析,全面系统地阐述了重组病毒的构建模式,针对基因框(启动子-报告基因-目的基因-调控元件-终止子)给出具体的构建方案,同时对其未来发展前景进行了展望,以期今后重组病毒的构建提供理论基础。

关键词:同源重组;表达盒;转移载体;重组病毒;病毒载体

中图分类号: S852. 65 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)11-0001-05

病毒分子生物学和免疫学的发展使得从事病毒研究的人员得以从分子水平上对微生物的基因进行克隆和表达,对病毒进行体外改造逐渐成为现代病毒分子生物学的热点之一。国内外学者利用 DNA 重组技术先后开展了包括亚单位疫苗、合成肽疫苗和核酸疫苗等新型疫苗的研究,并取得了一定的成果,但这些疫苗大多免疫原性较低。后来人们利用基因工程技术将免疫原性基因插入病毒(如腺病毒、痘病毒、伪狂犬病毒等)构建活载体病毒,可产生一种具有常规弱毒疫苗和灭活苗效果的基因工程活载体疫苗。重组病毒作为疫苗可以部分模拟病毒入侵机体的过程,将病原的保护性抗原编码基因片段或者重组多肽克隆入载体,诱导产生特异性反应,使机体产生相应的细胞免疫和体液免疫。

重组病毒的构建是建立在体外同源重组的基础上,筛选一个含亲本毒株的复制非必需片段,通过质粒转移载体与病毒基因组 DNA 之间的同源重组将外源基因导入病毒基因组中,既保留了亲本毒株的生物学特性,又可使重组病毒得到复制增殖。目前,已有多种表达病原蛋白的重组病毒构建成功,表达 FMDV 衣壳蛋白前体的 *PI-2A* 基因和蛋白酶 *3C* 基因的 rPRV TK-/gE-/PI-2A-3C,能诱导产生高水平的中和抗体和 FMDV 特异的淋巴细胞反应^[1]。在国内,郭万柱教授率先系统地开展了伪狂犬病病毒(PRV)分子生物学研究^[2]。同源重组是基因工程中常用的技术手段,在基因打靶和基因克隆方面具有重要作用。但该技术应用于重组病毒研究又不同于反向遗传操作技术(病毒拯救)、RNA 干扰和 PCR 改造

等,该方法避免了基因的直接体外操作,不会引入额外的 DNA 序列,简化了试验步骤。Rumenapf 等利用杆状病毒囊膜糖蛋白 GP64 的跨膜区域(TM)和细胞质区域(CTD)在小鼠和猪中表达 JEV 的 E 蛋白也能诱导产生高效价的特异性抗体^[3]。利用鸡痘病毒成功表达了多种禽类病毒的保护性抗原基因,如 IBDV 的 *VP2* 基因、MDV 的 *gB* 基因、AIV 的 *HA* 基因、NDV 的 *HN* 和 *F* 基因及 REV 的 *env* 基因等^[4-8]。

1 转移载体构建原理

1.1 表达盒的构建

为了将外源基因插入亲本病毒基因组,使构建的重组病毒能真实有效地表达,必须串联启动子、增强子、标记基因、终止子和 Poly(A)等反应元件(图 1)。其中启动子最为重要,决定着外源基因的表达水平。一般构建表达盒带有真核启动子 CMV、T7 和 SV40 等就能顺利启动外源基因,也可以串联 2 个启动子。而痘病毒应用病毒自身的转录系统在胞浆内复制,所以外源基因的表达要求使用痘病毒自身的内源启动子 P7.5/11^[9-12]。P7.5/11 为早晚期串联启动子,其结构独特,最重要的是 P7.5/11 非常保守,在痘病毒科重组病毒领域有广阔的应用前景^[13]。另外,采用独立的早晚期启动子分别启动报告基因和外源基因的表达(图 2),避免了翻译时通读的发生,增加了重组病毒的稳定性。由于重组病毒表达的外源蛋白是宿主免疫反应的目标,因此使用病毒的晚期启动子表达外源基因有利于病毒逃避宿主的免疫反应,建立持续感染^[9]。

如果能在同一载体中插入来自不同病原的保护性抗原基因,实现多种抗原的共表达,这样既可以同时对多种疾病进行预防,又可以避免疫苗载体之间的相互干扰,最大限度地发挥重组病毒的效用(图 3)。重组病毒在遗传上可能不稳定,连续传代后位于相同启动子之间的外源基因可能丢失^[14]。为了降低重组病毒的遗传不稳定性,并克服多个相同启动子之间可能存在的干扰现象^[15],在 1 个 MFG 载体上使用了 2 个 IRES 元件,使 3 个外源基因同时得到有效表达。目前,研究

收稿日期:2015-09-16

基金项目:国家质检总局公益性行业科研专项(编号:201310093);国家自然科学基金(编号:31201892);国家“863”计划(编号:2012AA101304);甘肃省自然科学基金(编号:1208RJZA101)。

作者简介:赵银龙(1989—),男,河北邢台人,硕士,主要从事病原微生物研究。E-mail:515911538@qq.com。

通信作者:吴国华,博士,助理研究员。E-mail:wuguohua@caas.cn。

穆晓峰,博士,教授。E-mail:871240531@qq.com。

外源基因多是 B 细胞表位和 T 细胞表位、抗原肽等。进一步研究表明,应用免疫转移电泳法也确定了许多病毒中和抗原的主要结构蛋白均为衣壳蛋白和糖蛋白,它们暴露于病毒粒子表面,可以诱导机体产生中和抗体^[16]。由于传统灭活疫苗是外源性抗原,不能通过 MHC I 类抗原递呈途径来有效激活 T 淋巴细胞,诱导的细胞免疫水平较低,因此利用病毒载体表达病原体抗原基因和适当类型的细胞因子,通过表达细胞因子来发挥特定的免疫调节作用以提高重组病毒免疫效力,很多研究者在设计的抗原基因中增加了 Th 刺激因子,如 2B、3ABC、3D、IFN- γ 以及 IL-1 等部分序列^[17]。

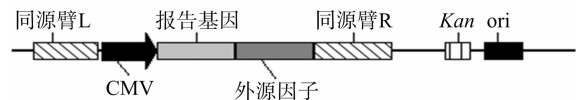


图1 单启动子单向表达盒

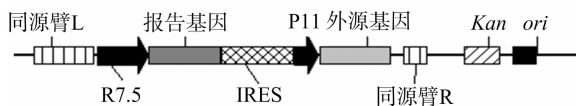


图2 双启动子单向表达盒

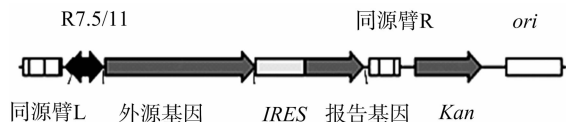


图3 双启动子双向表达盒

1.2 外源基因的靶向位点

作为良好的重组表达系统,亲本病毒复制非必需区的克隆与筛选是先决条件。亲本病毒基因组庞大,其中许多基因是病毒复制非必需的,可供作为外源基因靶向位点。但是,外源基因在不同的部位插入病毒基因组,可能会产生不同的效果。通常是构建某段基因缺失的同源重组臂,这些基因是病毒的主要毒力基因,删除相关的基因,使其不带毒力或致弱毒力;但是病毒粒子仍然保持较好的抗原性,可以组装成成熟的病毒粒子,为下一步重组病毒做准备。在重组痘病毒、腺病毒、猪伪狂犬病毒和传染性喉气管炎病毒等研究中,广泛采用了 *TK*^[18]、*US2*^[19]、*US10*^[19]、*gB*^[20]、*gD*^[20]、*E3*^[21]、*FLI1*^[22] 等外源基因的靶向位点。最初确定非必需区常常采用鸟枪法,盲目地克隆病毒基因组,再用于筛选,工作量大且繁琐。随着各病毒全基因组的逐渐公布,复制非必需区遗传背景研究的深入,为确定非必需区的研究建立了丰富的理论基础,可以实现仅用 PCR 技术就能获得靶向位点,容易进行遗传操作。同源臂的长短也是影响重组病毒构建的重要因素,一般情况下在 0.13 ~ 6.00 kbp 之间都可以进行有效的重组,Amano 等采用 P7.5 启动下的 *lacZ* 作为报告基因,检测同源臂长度对于转染效果的影响,当片段长度在 0.73 ~ 4.50 kbp 范围时,获得同源重组得到重组病毒的概率为 0.073% ~ 0.620%,说明重组的效率主要和同源臂的长度有关,和插入的基因无关^[23]。

同源臂的构建策略分为 2 类(图 4)。一类是外源基因靶向位点(TK 为例)左右各延伸 1 段基因片段,因复制非必需区中包含酶切位点,单酶切后平末端需要 Klenow 补平,CIP 去磷酸化,再去串联表达盒(图 5),此方法连接效率低,影响同源重组;另一类是分别延伸靶向位点两侧的基因,构建非必需区中间缺失的同源臂(图 6)。人为引入酶切位点,有利于

连接,提高同源重组水平,为随后的重组病毒构建提供可靠的材料保证。

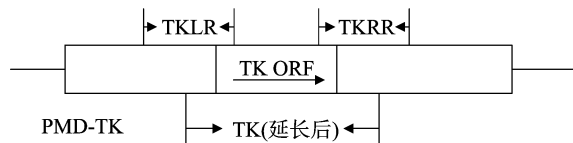


图4 同源臂的构建

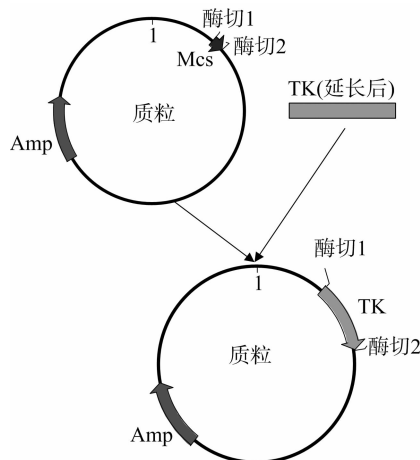


图5 同源臂构建流程一

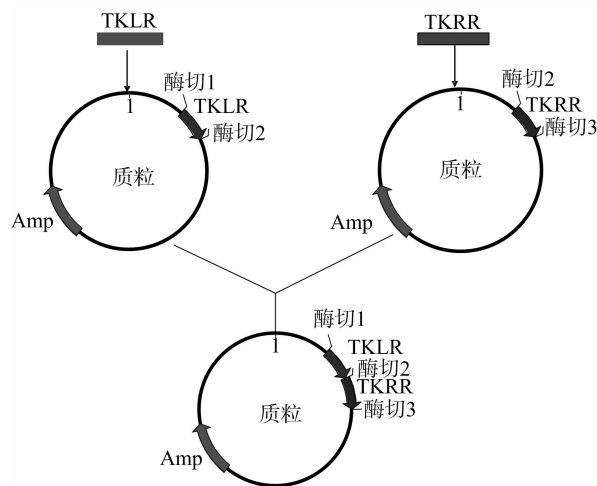


图6 同源臂构建流程二

1.3 同源重组

利用 PCR 技术以病毒基因组为模板克隆目的基因,构建亲本病毒某段非必需区缺失的突变株,含左右同源臂。由于亲本病毒一般基因组庞大,而且基因组 DNA 又没有感染性,不便直接操作,通常是将转移载体分开构建,既可以保证将外源基因灵活地插入转移载体,也可以准确地选择合适的其他反应元件,得到表达盒和同源臂 2 个独立的系统,解决病毒构建的前期工作。各个反应元件都需要适合的酶切位点进行串联。最后将构建好的含有表达盒的转移载体和脂质体共转染病毒预先感染的哺乳动物细胞,完成同源重组。基于所设计的转移载体特性,传统的同源重组方法是亲本病毒感染哺乳动物细胞后再转染。这种方法虽然可以产生重组病毒,但将亲本病毒和重组病毒分开较难,因为重组效率本身低,重组病

毒与亲本病毒相比更不具有生长优势,因而需要筛选多代才能获得纯化的重组病毒。目前常采用转移载体和亲本病毒基因组共转染的方法,一般经 3 代筛选即可获得具有感染活性的重组子,方便以后重组病毒高效地表达外源基因^[24]。

利用病毒存在广泛的复制非必需区,构建 1 个或多个不同病原体保护性基因的重组病毒。但病毒载体核酸序列较长,对病毒基因进行酶切和直接连接外源基因等遗传操作比较困难,因此,同源重组在构建重组病毒的研究中崭露头角。实际上重组病毒的效率不高,涉及诸多影响因素:(1)病毒载体的选择。重组子表达的量依赖于亲本病毒 DNA 的复制情况,由于病毒的复制能力具有较强的种类特异性,需要选择适合的载体构建不同的重组病毒。(2)外源基因的长短。插入的目的片段太长时,同源重组的效率很低,只有较短时才比较有效。(3)同源臂的长短。研究表明常用的左右同源臂片段约是 1.0 kbp,过长或过短都会影响重组。(4)就基因表达调控机理和重组活疫苗的生物安全而言,应首选病毒自身的启动子,但是应用中要选择强启动子,才能使病毒滴度增高,外源基因在细胞中得以有效表达,并且有良好的免疫原性和遗传稳定性。(5)表达盒的串联方式多种多样,可以双启动子顺向连接、双启动子反向连接、双标记基因等。如果标记基因的启动子和另外一个外源基因的启动子是不同的,那么 2 个启动子无论相对位置如何,各自的启动效率和重组病毒的稳定性都是一样的,但如果 2 个启动子是相同的,且启动子的 2 个基因顺向连接,那么重组病毒在传代的过程中就有可能发生分子内的启动子同源重组,将 2 个启动子之间的基因剪除,从而失去这一基因的表型。最终能筛选得到不带选择标记的重组痘苗病毒,并具有筛选周期短、工作量大、较能准确筛选重组病毒等优点,非常适用于疫苗株的构建^[25]。

1.4 重组病毒的筛选

以报告基因对表达盒的功能进行验证,筛选出具有高效表达蛋白能力的重组病毒。常用的途径:(1) β -半乳糖苷酶基因(*LacZ*)是来自大肠杆菌乳糖操纵子中的一个基因,其最大的优势是易于用组织化学法检测其原位表达,而且其表达产物对细胞的存活和生长基本无毒性作用。但由于 *LacZ* 基因组较大,约 3.1 kbp,串联它时很困难,外源基因表达盒构建会受影响。(2)*gpt* (黄嘌呤鸟嘌呤磷酸转移酶)也是常用的筛选标记之一。由于在鸟嘌呤合成途径中,催化 IMP 到 XMP 反应的是 IMP 脱氢酶,而 MPA 是该酶的不可逆阻断剂。鸟嘌呤只能通过替代途径在 *gpt* 的参与下合成。动物细胞本身不能合成 *gpt*,但重组的病毒可以提供 *gpt* 从而使病毒完成核酸代谢,使细胞分裂得以生长、增殖^[26]。(3)GFP 来源于海洋生物水母,EGFP 是一种优化的突变型 GFP,它所产生的荧光要比野生型 GFP 强 35 倍,大大增强了该报告分子的灵敏度^[27]。作为动植物以及微生物基因工程研究上的一种选择性标记,它具有检测灵敏度高、操作简便、对机体毒性小且不需要任何底物或辅助因子等优点^[28]。(4)胸腺嘧啶脱氢核苷激酶(*thymidine kinase*, TK),是核苷酸合成补救中的一种酶,能把胸苷转化为胸苷磷酸,保证核苷酸的顺利合成。在 HAT 选择培养基中,TK 基因缺陷受体细胞不生长,相反外源基因转化细胞生长。这种筛选系统前提是单一选择 TK 基因作为非必需片段构建重组病毒,不能被广泛采用,十分局限。

2 病毒活载体的应用

载体是供插入目的基因并将其导入宿主细胞内表达或复制的运载工具。近几年,以病毒载体为基础构建的重组活载体疫苗成为疫苗研究领域的主要方向^[29]。目前,作为载体的病毒多为哺乳动物病毒,如腺病毒(*adenovirus*)、伪狂犬病毒(*Pseudorabies virus*)、痘病毒(*Pox virus*)、杆状病毒(*baculovirus*)等,其中杆状病毒表达载体系统也是应用同源重组技术,是近些年研究的热点。

2.1 腺病毒载体

腺病毒(*adenovirus*, Adv)属于腺病毒科,线状、无包膜的双链 DNA 病毒,基因组大小约 36 kbp,由 240 个六邻体和 12 个五邻体构成二十面体病毒壳体。五邻体位于二十面体顶角,均有 1 个纤维蛋白突起与其相连,纤维蛋白头部与腺病毒的组织亲合性密切相关。腺病毒感染细胞分 4 个阶段:感染、早期事件、晚期事件和包装。

第 1 代腺病毒 *E1/E3* 基因表达盒,插入外源基因的长度可达 8 kbp。去除 *E1* 区阻止了依赖 *E1* 区和 *E2* 区功能蛋白的转录与随后病毒 DNA 的复制及病毒外壳蛋白的产生,这种方法效率很低^[30]。第 2 代腺病毒建立在第 1 代基础上,在 *E1/E3* 缺失的基础上进一步去除 *E4* 区,减弱病毒自身蛋白表达,降低炎症反应。第 3 代腺病毒载体又称辅助病毒依赖型腺病毒载体(helper-dependent adenovirus, HD-Ad)^[31],表达系统分为 3 部分:(1)空壳载体;(2)腺病毒自身编码序列;(3)辅助病毒。外源 DNA 的装载容量提高,表达外源基因时间延长。

2.2 猪伪狂犬病毒载体

猪伪狂犬病毒(PRV)属于疱疹病毒科中的猪疱疹病毒型。病毒基因组为线状双链 DNA,长度为 150 kbp,由长独特区(UL)、短独特区(US)、US 两侧的重序列(TRS)、内部重序列(IRS)组成。猪伪狂犬病(PR)是由猪伪狂犬病毒(PRV)引起的急性传染病,每年给养猪业造成巨大的经济损失,多种家畜和野生动物均可被感染^[32]。对猪伪狂犬病的控制主要是使用疫苗。猪伪狂犬病毒以其特殊的基因组结构、宿主的广泛性和生物安全性成为研制活载体疫苗的重要载体工具。

目前,PRV 基因缺失疫苗株常常是通过缺失 *gE*、*gI*、*gG*、*gC*、*TK* 等非必需基因,缺失分为单基因缺失和多基因缺失。Zhang 等构建了表达口蹄疫病毒衣壳前体肽 P12A 和非结果蛋白 3C 的伪狂犬病毒载体疫苗(PRV-P12A3C),结果表明部分仔猪的临床症状减轻,囊泡出现延迟^[33]。

2.3 痘病毒

2.3.1 鸡痘病毒载体 鸡痘病毒(*Fowlpox virus*, FVP)基因组大小为 288 kbp,基因组是双链 DNA,包括 1 个由相同的 2 个 9.5 kbp 大小的末端倒置重复序列包围的核心编码区,它含有 260 个开放阅读框,大小为 260~309 kbp,比其他已报导的脊椎动物的基因组都大。过去对 FVP 基因组的研究工作,主要是利用纯组织培养的 FVP 传代毒株,并且获得了约 1/3 的病毒基因组信息,包括免疫逃避假说和宿主范围功能。鸡痘病毒(FPV)是近些年来研究开发并逐渐转向实际应用的一种新的病毒载体。为了设计更安全、有效、合理的 FPV 疫苗

和以 FPV 为基础的表达载体,要求研究者对与病毒毒力和宿主范围有关的基因有一个全面的认识,对这些基因在病毒致病机理、免疫逃避和宿主范围方面的作用有深入的了解。

对于鸡痘病毒载体研究的内容主要集中在鸡痘病毒载体启动子的优化,提高外源基因在鸡痘病毒载体中的表达需要强启动子,FPV 自身启动子研究还不够详细、表达量偏低。目前大部分鸡痘病毒载体都选用痘苗病毒(Vaccinia virus, VV)的早、晚期启动子^[34]。

2.3.2 羊痘病毒载体 羊痘病毒是痘病毒科(Poxviridae),脊索动物痘病毒亚科(Chordopoxirinae),羊痘病毒属(*Capripox virus*)成员。基因组由共价结合的双股 DNA 组成,基因组呈线性,全长约 150 kbp, DNA 无感染性,编码至少 147 种基因。病毒基因组保守区的非复制区域可以整合外源 DNA,羊痘病毒是继痘苗病毒和禽痘病毒(*Fowlpox virus*, FPV)之后一种重要的动物病毒载体,因为对人不具有感染性,对外源基因的耐受性强,是一种更为理想的活病毒载体。羊痘病毒毒力有关基因如胸苷激酶基因(*TK*)、核苷酸还原酶基因(*RR*)、蛋白激酶基因(*RK*)和 *P32* 基因等。*TK* 基因缺失不影响病毒的增殖,却能显著降低病毒毒力,*TK* 基因缺失的羊痘病毒被广泛地应用于疫苗的研究中。

羊痘病毒基因组庞大复杂,不易在某一个特定的位置直接插入外源基因,所以要先利用 1 个质粒载体构建 1 个转移载体。不仅可以预防羊痘的发生,还可以插入其他外源病毒保护性抗原,重组病毒所表达的外源基因随载体病毒复制、转录、蛋白合成加工,诱导产生针对相应病原的免疫应答。Diallo 等构建了表达小反刍兽疫病毒(*Peste des petits ruminants virus*, PPRV) *H* 基因的重组山羊痘病毒,动物试验中需要 10 TCID₅₀ 才能保护小反刍兽疫^[35]。张强等构建了 Asia1 型口蹄疫病毒 *PI-2A* 和 *3C* 基因的重组山羊痘病毒弱毒株^[36]。

2.3.3 痘苗病毒载体 痘苗病毒基因组的大小约为 187 kbp,可以编码 150~200 种多肽,包括早期蛋白和晚期蛋白。以侵入细胞后病毒 DNA 开始复制的时间为界,人为地将病毒复制分为早期和晚期 2 个过程。其中应用得最多的是早、晚期蛋白启动子 P7.5。而痘苗病毒基因组允许插入较长的外源 DNA 片段(25 kbp)并且不会造成病毒感染性的丧失^[37]。目前有很多痘苗病毒毒株用作载体表达各种类型的外源基因,较为常用的毒株是痘苗病毒 WR 株(western reserve strain)。此外,还有很多毒株如痘苗病毒天坛株^[38]、Wyeth 株、Copenhagen 株及 NYCBH 株等。

2.4 杆状病毒载体

杆状病毒(baculovirus)是一类具有囊膜包裹的双链环状 DNA 病毒,自然界中主要感染鳞翅目、膜翅目和双翅目昆虫。其基因组大小为 80~160 kbp,位于直径为 30~60 nm、长 300 nm 的杆状核衣壳中,具有较大的柔韧性,可以容纳较大片段的外源基因插入。苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(*Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus*, AcMNPV)是众多杆状病毒中研究最多的。它异于其他病毒载体,成为病毒载体研究热点是因为杆状病毒表达载体适合翻译后修饰和重组蛋白的高水平表达。有研究发现,昆虫杆状病毒可以进入多种哺乳动物细胞,并在合适的哺乳动物启

动子控制下表达外源基因,但其基因组在细胞中不复制,且对哺乳动物细胞的生长无明显影响^[39]。Lu 等研究发现含有 PRRSV ORF7 的 C 端编码区域的特异 shRNA 的 VSV-G 假型化杆状病毒成功地抑制了 PRRSV 在 Marc145 细胞中的复制^[40]。Starkey 等构建了表达乙肝病毒(Hepatitis B virus, HBV)特异的 shRNA 重组杆状病毒,在体外能成功地阻断 HBV 复制^[41]。由于杆状病毒具有最理想疫苗转移载体的典型特征,所以杆状病毒作为哺乳动物基因转运载体不断发展,研究也表明杆状病毒载体是疫苗发展过程中极其有效的工具。

3 重组病毒的优、缺点

新型重组病毒不断涌现,不但保持了原有病毒的优点,更对许多不足之处作出了重大改进,从而使这方面的研究有了新突破,重组病毒表达外源基因的优点在于:(1)宿主范围广,可用于多种动物,也包括人类。(2)有大量的非必需片段可用作插入外源基因的位点,方便串联表达多个目的片段,构建多价苗。(3)免疫期长,可对机体产生持久的免疫力。(4)安全性好,易于被人们接收,目前常采用基因操作技术,将病原微生物中与致病性有关的毒力基因敲除或插入其他外源基因,使之成为无毒株或弱毒株。(5)重组毒易于大量生产、成本低、保存和使用相对比较方便。(6)诱导位点专一,免疫方式简单、易控制。但是在实际应用中也发现,重组病毒目前也存在许多不可忽视的缺点:(1)与临床要求相比,病毒滴度低。(2)重复给予时机体可能产生免疫耐受。(3)在体外获得同源重组的效率很低,并且有可能造成外源基因的丢失而丧失感染性。总之,利用重组病毒可治疗一些特殊疾病,同时探索病毒载体所面临的安全性和毒性问题^[42]。但是,需要进一步改善和开发能高效转移基因、表达高度组织特异性、安全可靠的重组病毒。

4 总结与展望

通过体外连接构建重组病毒的方法,其基本过程是将含外源基因的转移载体与经过酶切处理的亲本毒株基因组 DNA 臂在体外同源重组,然后将连接产物转染已预先感染亲本病毒的哺乳动物细胞,这种嵌合的基因组在亲本病毒的作用下组装成为重组病毒粒子。这种技术可在 DNA 靶标分子的任意位点进行基因敲除、敲入、点突变等操作,利用这种方法构建重组病毒首先要满足一个基本条件,就是从亲本病毒基因组复制非必需区内找到一个唯一的限制性内切酶位点或通过基因操作技术在基因内引入适当的位点,以供外源基因的插入。*TK*、*gE*、*gI* 基因决定病毒的毒力,为重要的毒力因子。*TK* 基因的缺失能显著降低病毒毒力,但不影响病毒的增殖,是外源基因插入的首选位点^[43]。但要在重组病毒领域有重大突破,还有大量的工作要做。首先对亲本毒株基因组的认识还有待进一步深入,其次了解亲本毒株各个基因的精确功能也很重要,基于感染重组病毒疫苗应用到自然宿主以后,有可能发生毒力返强的现象。另外,重组病毒毒株在自然环境下能否与流行毒株发生基因组交换或重组,也是需要考虑的。

重组病毒可用于基因治疗、活载体疫苗、转基因动物、基

因功能研究等领域,以病毒为载体构建重组病毒有助于蛋白的体外表达及功能研究,同时对研究病毒的致病机理和研制活载体疫苗都有积极作用^[44]。近些年,科研人员对重组病毒进行了大量的研究,重组病毒技术得以不断成熟和完善,进一步提高了重组病毒的安全性,优化了不同表达盒及病毒载体。另外,多价载体疫苗将是未来疫苗开发研究的主要方向之一,构建一个成功而实用的重组病毒疫苗,并进行动物免疫试验,实现一针多效,达到免疫接种的目的,为下一步商业化疫苗奠定了坚实的理论基础。总之,随着病毒分子生物学研究不断深入和研究方法不断更新,重组病毒将取得更大的突破,有望获得更广泛的应用前景。

参考文献:

- [1] Zhang K S, Huang J, Wang Q G, et al. Recombinant pseudorabies virus expressing *P12A* and *3C* of FMDV can partially protect piglets against FMDV challenge [J]. Res Vet Sci, 2011, 91(1): 90–94.
- [2] 凌宗帅, 郭文龙, 刘冠华, 等. 伪狂犬病基因缺失疫苗的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2009(4): 25–28.
- [3] Rumenapf T, Stark R, Meyers G, et al. Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus; further characterization and induction of protective immunity [J]. Journal of Virology, 1991, 65(2): 589–597.
- [4] Zhou J, Cheung A K L, Tan Z, et al. PD1 – based DNA vaccine amplifies HIV – 1 GAG – specific CD8⁺ T cells in mice [J]. The Journal of Clinical Investigation, 2013, 123(6): 2629–2642.
- [5] Kulkarni V, Rosati M, Valentin A, et al. HIV – 1 p24 (gag) derived conserved element DNA vaccine increases the breadth of immune response in mice [J]. PloS One, 2013, 8(3): e60245.
- [6] Janes H, Friedrich D P, Krambrink A, et al. Vaccine – induced gag – specific T cells are associated with reduced viremia after HIV – 1 infection [J]. Journal of Infectious Diseases, 2013, 208(8): 1231–1239.
- [7] 秦晓冰, 牛晋国, 杨瑞梅, 等. 猪圆环病毒与口蹄疫病毒二联重组鸡痘病毒的鉴定和 BALB/c 小鼠的免疫试验 [J]. 中国兽医学报, 2012, 32(2): 161–166.
- [8] 朱羿龙, 李 昌, 郭 焱, 等. 表达 HIV – 1 gag 重组鸡痘病毒的构建与筛选 [J]. 中国生物工程杂志, 2014, 34(1): 57–63.
- [9] di Pilato M, Mejías – Pérez E, Gómez C E, et al. New vaccinia virus promoter as a potential candidate for future vaccines [J]. Journal of General Virology, 2013, 94(12): 2771–2776.
- [10] Wennier S T, Brinkmann K, Steinhauser C, et al. A novel naturally occurring tandem promoter in modified vaccinia virus ankara drives very early gene expression and potent immune responses [J]. PloS One, 2013, 8(8): e73511.
- [11] 曲林茂, 陈伟业, 胡倩倩, 等. 表达小反刍兽疫病毒 F 蛋白的重组山羊痘病毒疫苗的研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2009, 31(6): 415–420.
- [12] 李继东, 朱学亮, 李 辉, 等. 启动子 p7. 5/p11 在山羊痘病毒和羊口疮病毒中的启动功能验证 [J]. 中国预防兽医学报, 2014, 36(11): 829–833.
- [13] 谢梅梅, 李翠翠, 张家林, 等. 用于山羊痘病毒载体的强痘病毒启动子筛选 [J]. 中国预防兽医学报, 2015, 37(7): 502–505.
- [14] 乔传玲, 于康震, 贾永清, 等. 表达 H5 亚型禽流感病毒血凝素和神经氨酸酶双基因重组禽流感病毒的构建 [J]. 中国预防兽医学报, 2000, 22(增刊 1): 537–539.
- [15] 楚素霞, 姚伦广, 邢延豪, 等. 多基因表达系统研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2011, 31(6): 116–123.
- [16] Seago J, Jackson T, Doel C, et al. Characterization of epitope – tagged foot – and – mouth disease virus [J]. J Gen Virol, 2012, 93(11): 2371–2381.
- [17] Kumar S, Ahi Y S, Salunkhe S S, et al. Effective protection by high efficiency bicistronic DNA vaccine against infectious bursal disease virus expressing VP2 protein and chicken IL – 2 [J]. Vaccine, 2009, 27(6): 864–869.
- [18] 程小文, 胡 森, 王喜军, 等. 表达外源绿荧光蛋白重组山羊痘病毒的构建及纯化 [J]. 农业生物技术学报, 2006, 14(5): 798–802.
- [19] 张雪莲. 表达血清 1,3 型马立克氏病病毒 gB 主要抗原表位的重组 CV1988 病毒构建及其免疫保护作用 [D]. 南京: 南京农业大学, 2003.
- [20] 徐美玉, 赵 焱, 朱发江, 等. 表达 *ILTV gB* 和 *UL32* 基因的重组鸡痘病毒疫苗安全性及稳定性分析 [J]. 中国兽医杂志, 2015, 51(2): 6–8.
- [21] 李永清, 杨 敬, 罗长保, 等. 表达禽流感病毒 *M2* 基因的重组马立克氏病病毒的构建 [J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(9): 24–30.
- [22] Boulanger D, Baier R, Erfle V, et al. Generation of recombinant fowlpox virus using the non – essential F11L orthologue as insertion site and a rapid transient selection strategy [J]. Journal of Virological Methods, 2002, 106(1): 141–151.
- [23] Amano H, Morikawa S, Shimizu H, et al. Identification of the canarypox virus thymidine kinase gene and insertion of foreign genes [J]. Virology, 1999, 256(2): 280–290.
- [24] 刘召明, 张丽萍, 王秀丽, 等. 重组马立克病毒通用转移载体的构建及初步应用 [J]. 中国动物检疫, 2008, 25(1): 26–28.
- [25] 周小云, 刘 颖, 饶力群, 等. 适用于疫苗株筛选的痘病毒载体的构建 [J]. 病毒学报, 2005, 20(4): 315–321.
- [26] 王艳丽, 李俊辉, 姜永萍, 等. 以 GPT 和 GFP 为双重筛选标记的禽痘病毒转移载体的构建及鉴定 [J]. 中国预防兽医学报, 2009, 31(7): 501–504.
- [27] Seago J, Juleff N, Moffat K, et al. An infectious recombinant foot – and – mouth disease virus expressing a fluorescent marker protein [J]. J Gen Virol, 2013, 94(7): 1517–1527.
- [28] Rodger G, Smith G L. Replacing the SCR domains of vaccinia virus protein B5R with EGFP causes a reduction in plaque size and actin tail formation but enveloped virions are still transported to the cell surface [J]. Journal of General Virology, 2002, 83(2): 323–332.
- [29] Rowe W J. Long space missions, gene therapy, and the vital role of magnesium: a three – pronged plan for the next 50 years [J]. International Journal of Nephrology and Renovascular Disease, 2010, 3: 123–127.
- [30] Baltzer A W, Lattermann C, Whalen J D, et al. Genetic enhancement of fracture repair: healing of an experimental segmental defect by adenoviral transfer of the *BMP – 2* gene [J]. Gene Therapy – Basingstoke, 2000, 7(9): 734–739.
- [31] Li H, Zhou R, Chen J, et al. A recombinant replication – defective human adenovirus type 3: a vaccine candidate [J]. Vaccine, 2009, 27(1): 116–122.
- [32] 白挨泉, 王晓清, 甄劲松, 等. 广东部分集约化猪场猪伪狂犬病毒

刘力,阮荣平. 气候变暖对粮食安全的影响综述[J]. 江苏农业科学,2016,44(11):6-10.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.11.002

气候变暖对粮食安全的影响综述

刘力¹, 阮荣平²

[1. 中国石油大学(北京)工商管理学院, 北京 102249; 2. 中国人民大学农业与农村发展学院, 北京 100872]

摘要:回顾梳理国内外有关气候变暖对粮食安全影响的文献,发现现有文献研究的角度主要有2个:一个是对作物产量的影响,一个是对农户经济收入的影响。这2种研究视角又大体对应着2类主要的研究方法:一类是生产函数法(production function approach),一类是享乐评价法(hedonic approach)。现有文献关于气候变暖对粮食安全影响的判断往往因研究方法、地区、作物的不同而不同。最后指出现有文献的不足之处和值得进一步研究的地方。

关键词:气候变暖;粮食安全;影响评价;作物产量;农户收入

中图分类号: S162.5⁺3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)11-0006-05

农业生产的影响因素除了土地、资本、劳动力等经济变量以外,还有温度和湿度等自然变量。相对于土地、资本、劳动力等因素而言,近些年变化最大的就是温度和湿度等气候条件。有证据表明自1750年以来,特别是1950年以来全球温度一直在不断升高。目前这一因素已经成为影响粮食安全新的驱动因素之一^[1-2],在很多地方气候变暖已经成为粮食安全的关键影响因素^[3]。因此,研究和预测粮食安全必须要考虑这一因素。

气候变暖对粮食安全的影响已经得到了越来越多国内外学者的重视,并且已经形成了相对成熟的研究和预测方法。《Science》等杂志上有多位作者关于气候变暖对粮食安全影

响的文章,如Brown等^[2]、Wojtkowski^[3]、Lal^[4]等。纵观这些研究可以发现,气候变暖对不同国家和地区有不同的影响,其影响程度及方向会因地区不同而不同^[5]。所以对其他国家或者地区气候变暖的研究不能直接用来估计中国粮食安全的情况。

在中国粮食安全的研究中,气候变暖的影响没有得到足够的重视。在中国粮食生产预测的几个研究中^[6-9],这一重要的影响因素没有被考虑进来^[10]。

气候变暖对中国部分地区的影响已经越来越显著,如广东省受全球气候变暖影响,近10年来降雨时空分布极度不均匀,旱涝交替、旱涝急转、旱涝无常的自然灾害频繁发生;气候变暖导致黑龙江省现在春季干旱年份已由过去的“十年九旱”变成了“十年十旱”^[11];气候变暖也对青海省农业生产带来了显著影响^[12]。

在此背景下,研究气候变暖对中国粮食安全的影响已经成为一个亟待解决的问题。解决这一问题的办法之一就是通过对回顾相关文献来总结目前研究的大体情况,以及所使用的

收稿日期:2016-02-16

基金项目:中国石油大学(北京)科学研究基金(编号:2462013YJRC035);

中国人民大学科学研究基金(编号:14XNJ017,14XNQ019)。

作者简介:刘力(1983—),女,四川绵阳人,博士,讲师,主要从事农业经济与能源研究。Tel:(010)89731556;E-mail:liulicau@126.com。

野毒感染的血清学调查[J]. 中国畜牧兽医,2005,32(3):55-57.

[33] Zhang K, Huang J, Wang Q, et al. Recombinant pseudorabies virus expressing *PI2A* and *3C* of FMDV can partially protect piglets against FMDV challenge[J]. Research in veterinary science, 2011, 91(1): 90-94.

[34] 朱爱华, 彭大新. 鸡痘病毒载体启动子的优化[J]. 病毒学报, 2000, 16(4): 347-351.

[35] Diallo A, Minet C, Berhe G, et al. Goat immune response to capripox vaccine expressing the hemagglutinin protein of peste des petits ruminants[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2002, 969(1): 88-91.

[36] 张强, 鞠厚斌, 吴国华, 等. 表达 Asia 1 型口蹄疫病毒 *PI-2A* 和 *3C* 基因的重组山羊痘病毒弱毒株的构建[J]. 中国兽医科学, 2009, 39(3): 209-213.

[37] Tim D, David M K. Replication-defective viruses as vaccines and vaccine vectors[J]. Virology, 2006, 5(1): 230-239.

[38] 王文玲, 黄保英, 邓瑶, 等. 甲3型流感病毒 *M2* 基因在痘苗病

毒天坛株中的表达[J]. 病毒学报, 2007, 24(5): 377-383.

[39] 万婧, 周向阳, 方维焕. 杆状病毒在载体疫苗中应用的研究进展[J]. 生物技术通报, 2012(3): 35-40.

[40] Lu L Q, Ho Y F, Kwang J, et al. Suppression of porcine arterivirus replication by baculovirus-delivered shRNA targeting nucleoprotein[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 340(4): 1178-1183.

[41] Starkey J L, Chiari E F, Isom H C. Hepatitis B virus (HBV) - specific short hairpin RNA is capable of reducing the formation of HBV covalently closed circular (CCC) DNA but has no effect on established CCC DNA *in vitro*[J]. J Gen Virol, 2009, 90(1): 115-126.

[42] Stone D. Novel viral vector systems for gene therapy[J]. Viruses, 2010, 2(4): 1002-1007.

[43] 培园, 李结, 朱兴全, 等. 重组病毒载体研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2012, 28(3): 284-288.

[44] Scheller E L, Krebsbach P H. Gene therapy: design and prospects for craniofacial regeneration[J]. Journal of Dental Research, 2009, 88(7): 585-596.