

# SARS-CoV 中国株基因组全长 cDNA 的构建及其恢复病毒的生物学性质

韩剑峰, 姜涛, 陈水平, 于曼, 秦鄂德\*

(军事医学科学院微生物流行病研究所 病原微生物生物安全国家重点实验室 北京 100071)

**摘要:** 严重急性呼吸综合征是 SARS-CoV 引起的一种重要新发传染病, 其致病机制的研究对于防治该病十分必要。为了利用反向遗传学技术研究 SARS-CoV 的致病机制, 将覆盖 SARS-CoV BJ01 株基因组全长的 7 个 cDNA 片段纯化后进行体外连接, 构建基因组全长 cDNA 分子, 以其为模板, 使用 T7 RNA 聚合酶系统在体外进行转录, 获得病毒 RNA。用电穿孔转染法将转录体 RNA 导入 Vero E6 细胞, 可观察到典型的 SARS-CoV 致细胞病变作用。对收获的恢复病毒采用 RT-PCR 方法进行鉴定, 结果表明获得的恢复病毒与 SARS-CoV BJ01 株原病毒序列一致。以针对 SARS-CoV 的抗体对感染细胞作间接免疫荧光反应, 证明获得了具有特异感染性的恢复病毒。同时用细胞病变法和空斑试验测定了恢复病毒及其亲本毒株的病毒滴度, 结果表明二者在致病性上没有明显差异, 恢复病毒具有与原型株相似的生物学特性。SARS-CoV BJ01 株基因组全长 cDNA 的成功构建及对恢复病毒生物学性质的研究将为进一步探索 SARS-CoV 致病的分子机制及研制新型疫苗奠定良好的基础。

**关键词:** SARS-CoV BJ01 株, 反向遗传学, 基因组全长 cDNA, 恢复病毒

中图分类号: R373.1 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)06-0922-06

严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)是由 SARS 冠状病毒(SARS coronavirus, SARS-CoV)引起的严重传染性疾病。自 2002 年 11 月首次在中国广东发现以来, 以其传播迅速、病情严重、病死率高等特点, 成为新出现的严重危害人类健康的传染性疾病<sup>[1-3]</sup>。继 2003 年 4 月加拿大 British Columbia Cancer Agency's Genome Science Centre 首先完成了 SARS-CoV Tor2 株全基因组测序<sup>[4]</sup>, 本实验室也成功分离了 SARS-CoV BJ01 株并对其进行了序列测定分析<sup>[5]</sup>。后续对其他 SARS-CoV 的测序与进化分析结果表明虽然 SARS-CoV 基因组序列与 II 组冠状病毒接近, 但它不是任何一种已知冠状病毒的突变体, 也不是已知冠状病毒的重组体<sup>[6-8]</sup>。尽管已发现从果子狸、蝙蝠等动物分离出的冠状病毒基因序列和 SARS-CoV 有 99% 以上的同源性, 但关于 SARS-CoV 的来源及这种病毒的传染链尚不十分清楚, 而且 SARS-CoV 复制及发病机制也尚未阐明<sup>[9]</sup>。SARS-CoV 是一种新型的冠状病毒, 其基因组为单股正链 RNA, 全长约为 30kb, 是目前已知 RNA 病毒中基因组最大的一类病毒, 并具有典型的冠状病毒基因组结构特征: 5'帽子结构-复制

酶基因-S 基因-E 基因-M 基因-N 基因-3' PolyA 尾, 分别编码基因组复制所必需的聚合酶、刺突糖蛋白、包膜蛋白、膜蛋白和核衣壳蛋白<sup>[10]</sup>。3C 样蛋白酶(3C like proteinase, 3CL-Pro)是 SARS-CoV 最重要的蛋白酶, 调节病毒的转录和复制, 是被广泛看好的 SARS 治疗靶点<sup>[11]</sup>。SARS-CoV S 蛋白不仅介导病毒与宿主细胞受体的结合和膜融合, 还包含许多重要的抗原表位, 极大地影响病毒的毒力与宿主细胞嗜性<sup>[12]</sup>, 其也被应用于 siRNA 等 SARS 防治研究<sup>[13]</sup>。SARS-CoV 功能受体血管紧张素转化酶(angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)的发现更为寻找抗病毒途径提供了新的角度和思路<sup>[14]</sup>。虽然目前针对该病的药物与疫苗正在研制中, 但对 SARS-CoV 的致病机制仍不清楚。

RNA 病毒的反向遗传操作技术包括病毒基因组全长 cDNA 克隆的构建及由其转录成病毒 RNA 而获得的拯救病毒, 从而在分子水平分析和改造病毒基因组, 以期对病毒的复制过程、致病机理以及防治新途径进行探讨<sup>[15]</sup>。目前对 SARS-CoV 的基因组结构与功能、致病的分子机理等了解甚少, 病毒基因组全长感染性克隆的构建为深入开展这一领域的研

基金项目: 国家 973 项目(2003CB514119), 国家自然科学基金(30340021)

\* 通讯作者。Tel: 86-10-66948604; Fax: 86-10-63898239; E-mail: qinede@sohu.com

作者简介: 韩剑峰(1976-), 男, 山西太原人, 博士, 主要从事分子病毒学研究。E-mail: qinede@sohu.com

其他作者: 赵卓, 李晓峰, 秦成峰, 邓永强, 赵慧, 赵海龙, 李晓英

收稿日期: 2006-01-20; 接受日期: 2006-03-01; 修回日期: 2006-05-11

究提供了技术平台。本研究采用反向遗传学技术将覆盖 SARS-CoV BJ01 株病毒全基因组的 7 个 cDNA 片段通过体外连接构建出病毒基因组全长 cDNA, 然后经体外转录获得 SARS-CoV BJ01 株恢复病毒, 并对恢复病毒的生物学特性进行了观察。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 病毒、细胞及重组质粒**: SARS-CoV BJ01 株 (GenBank 登录号: AY278488) 为本室于 2003 年从 SARS 死亡病例尸解肺组织中分离。该病毒全基因组 cDNA 亚克隆质粒: F<sub>1</sub>-Teasy、F<sub>2</sub>-Topo、F<sub>3</sub>-Topo、F<sub>4</sub>-Topo、F<sub>5</sub>-Topo、F<sub>6</sub>-Topo 和 F<sub>7</sub>-pWSK<sub>29</sub> 由本室构建<sup>[16]</sup>。Vero E6 传代细胞系引自北京生物制品研究所, 由本室保存。

**1.1.2 主要试剂**: DNA 纯化试剂盒 (Endofree® Plasmid Giga Kit, QIAGEN 公司); 凝胶回收试剂盒 (QIAquick® Gel Extraction Kit, QIAGEN 公司); Bgl I、Sal I、Not I 等限制性内切酶、T4 DNA 连接酶 (NEB

公司); LA DNA Taq 聚合酶 (TaKaRa 公司); RNA 提取试剂盒 (RNeasy™ Mini Kit, QIAGEN 公司); 逆转录酶 (SuperScript™ II Reverse Transcriptase, Invitrogen 公司); RNA 体外转录试剂盒 (RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems, Promega 公司); RNA 帽子结构模拟物 (RNA Cap Structure Analog, Promega 公司)。SARS-CoV 特异性小鼠多抗为本实验室保存, FITC 标记的兔抗鼠 IgG 为本室制备。

### 1.2 病毒基因组全长 cDNA 的构建

提取 F1-F7 质粒并酶切纯化覆盖 SARS-CoV BJ01 株的 cDNA 片段, 将获得的各 cDNA 片段经紫外分光光度计测其 OD<sub>260</sub> 值进行定量。将纯化的各片段分别进行等量连接, 再将回收的半分子连接成全长 cDNA。

在获得半分子及全长 cDNA 后, 分别以其为模板, 利用 DNASTAR 软件设计 6 对引物, 对各 cDNA 片段的接头处进行 PCR 扩增鉴定。另外在接头序列上游重新设计引物, 对扩增产物进行序列测定 (引物序列见表 1)。

表 1 SARS-CoV BJ01 株基因组全长 cDNA 接头处序列的 PCR 扩增及测序所用引物

Table 1 Primers used to amplification and sequencing of the junctions in the genomic full-length cDNA of SARS-CoV BJ01 strain

Junction primer	Sequence(5'→3')	Fragment generated/bp	Sequencing primer(5'→3')
F1/F2	S947 + TCTACTGCTGCCGTGACCAT S1958 - GCTCTTTGCAAATCAGGAAT	1011	GTTCATGGCAGACGTGCGAC
F2/F3	S3701 + CGGTTCTGACACAGGTTTAT S4831 - GATGAAACTGACGGGGCTC	1130	GGTAGGTGATGTTATCACTAG
F3/F4	S8254 + CTTTATCTGAACAGCTGCGT S9389 - ATAAAGTAGTAGGCAGCACA	1135	ATTCGTAGTGCTGCCAAGAAG
F5/F6	S18182 + TATGTTTATCACCCGCGAAG S19384 - GTAGCAGATTTGAGTGGAAC	1202	TACGGTAACCTTCAGACTAA
F6/F7	S23214 + CCTTGCTCTTTTGGGGTGT S24413 - TTGTACTCCGCCTCGACTT	1199	CCTTGCTCTTTTGGGGTGTGA
5'/3'	10160 + TTCGCAAATCCAACCATAGC 12158 - TCACGGTCAAACCTCAGATT	1998	GCTCGATAACCGTGTCTACTC

### 1.3 体外转录及恢复病毒的制备

取纯化的全长 cDNA 分子作为模板应用 RNA 转录试剂盒按其操作说明进行体外转录。体外转录反应后, 将转录体与预先胰酶消化制备的 Vero E6 细胞悬液混匀后进行转染。电转参数为: 电压 850V、电容 25μF、电阻 200Ω、脉冲数 2 次、脉冲间隔 1s。转染后继续培养观察细胞状态。在转染后第 4 天, 反复冻融细胞并收集上清进行病毒传代。

为了进一步鉴定转录得到的恢复病毒是否为 SARS-CoV BJ01 株序列, 应用 RNeasy Mini Kit 提取 RNA, 进行常规反转录并对恢复病毒的特定区段进行扩增, 并克隆入 T 载体进行测序鉴定, 反转录引物

及 PCR 扩增引物序列见表 2。

表 2 SARS-CoV BJ01 株恢复病毒 RT-PCR 引物

Table 2 Primers used to RT-PCR amplification with the rescued virus of SARS-CoV BJ01 strain

Primer	Sequence(5'→3')	Fragment generated/bp
15042 - 29744 -	CTACGGTGGCAGCTCTATTCTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTCAATTCTCCT AAGAAGC	RT primer
8049 + 8938 -	CGAGTTAGCAAAGGGTGT GAACGCAAGCAGAGGTAG	889
18719 + 19663 -	GGTAACCTTCAGAGTAA ATACCATCTACCTTTGTG	944
23211 + 24182 -	TCACCTTGCTCTTTTGGG AACATTTTGGGTAACCTCC	971

### 1.4 细胞病变法测定病毒滴度

将病毒感染 96h 的细胞反复冻融并离心收集上清,用于病毒滴度测定。将恢复病毒进行 10 倍系列稀释后接种于 96 孔培养板的 Vero E6 细胞,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 7d,每日观察细胞病变。根据 Reeds-Muench 的方法计算病毒的组织培养半数感染剂量(TCID<sub>50</sub>)。

### 1.5 间接免疫荧光<sup>[17]</sup>

病毒感染 Vero E6 细胞 96h 时,用胰酶消化配制成细胞悬液(10<sup>6</sup> 细胞/mL),按常规方法制备成抗原片。先滴加 SARS-CoV 抗体作用 30min,再加入 FITC 标记的兔抗鼠 IgG 抗体反应 45min,室温干燥后于荧光显微镜下观察。

### 1.6 病毒的空斑滴定<sup>[18]</sup>

将 SARS-CoV BJ01 株及恢复病毒悬液 10 倍系列稀释,加至 Vero E6 细胞单层,吸附并加入营养琼脂,37℃ 倒置培养 36h,加入 0.2% 的中性红染液。继续培养 24 ~ 72h,观察空斑形态与数量。按 Dullbecco R 方法计算病毒空斑滴度(PFU/mL)。

## 2 结果

### 2.1 SARS-CoV BJ01 株病毒基因组全长 cDNA 的构建与鉴定

由于 SARS-CoV 基因组较大,故采用分段克隆的方法对其进行全长 cDNA 的构建。将纯化的 F1-F4 和 F5-F7 cDNA 片段分别进行连接,得到 SARS-CoV 基因组 5'和 3'端大小为 13.4kb 和 17.6kb 的半分子 cDNA。为了确证各 cDNA 分子接头处序列的正确性,以所获得的半分子 cDNA 为模板,对接头处 DNA 片段进行 PCR 扩增,扩增产物经凝胶电泳鉴定,其大小约为 1kb,与预期一致。经测序及比对分

析,结果表明接头处 DNA 序列与病毒原基因组序列一致。

将 5'和 3'半分子体外连接成全长 cDNA 分子,经凝胶电泳观察大小约为 30kb,结果与预期一致。并对两个半分子 cDNA 的接头处序列进行 PCR 扩增,扩增产物大小为 2kb,测序证实与原序列一致,表明获得的全长 cDNA 为 SARS-CoV BJ01 株基因组特异的。

### 2.2 SARS-CoV BJ01 株的体外转录及恢复病毒的鉴定

在获得 SARS-CoV BJ01 株基因组全长 cDNA 分子的基础上,以其为模板进行体外转录。为了保证转染细胞的转录产物中不含病毒 DNA 分子,用 RNA 酶对转录产物进行消化。凝胶电泳结果显示转录产物被 RNA 酶降解,表明转录产物为病毒 RNA。

获得恢复病毒后,为了验证其序列来自 SARS-CoV BJ01 株,分别针对病毒基因组序列的两端及中间不同区段设计引物,经 RT-PCR 扩增病毒特征序列,用 *Sca* I 及 *Not* I 限制酶进行酶切鉴定,电泳结果可见到约 900bp 目的片段,经测序证实与 SARS-CoV BJ01 株序列一致。

### 2.3 SARS-CoV BJ01 株恢复病毒的生物学性质

为证实体外转录的恢复病毒具有感染性,本研究将恢复病毒 RNA 电转导入对 SARS-CoV 敏感的 Vero E6 细胞,观察产生细胞病变情况及恢复病毒在该细胞中的传代稳定性。

结果表明,在接种后 72 ~ 96h,细胞开始出现聚集成团、变圆、细胞出现空泡、脱落等细胞病变现象(图 1)。进一步传 3 ~ 6 代,结果也出现相同的细胞病变作用,表明恢复病毒可稳定传代。恢复病毒的滴度 TCID<sub>50</sub> 为 10<sup>3.5</sup>,阳性对照病毒 TCID<sub>50</sub> 为 10<sup>4.5</sup>。

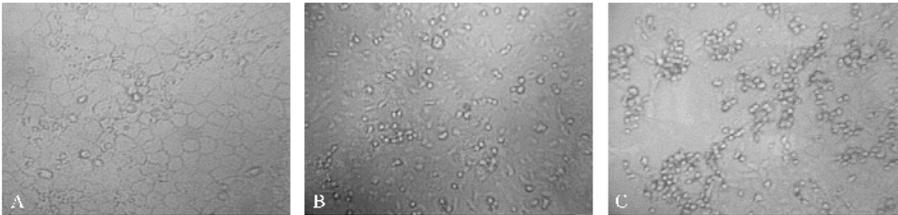


图 1 SARS-CoV BJ01 株及恢复病毒对 Vero E6 细胞的致细胞病变作用

Fig. 1 CPE of the rescued virus and SARS-CoV BJ01 strain infected Vero E6 cells. A: Vero E6 as control; B: The transfection of the rescued virus; C: The infection of SARS-CoV BJ01 strain.

为了进一步观察恢复病毒能否在感染细胞中表达 SARS-CoV 特异蛋白,对恢复病毒感染的 Vero E6 细胞进行间接免疫荧光实验。从图 2 可以看出,在 SARS-CoV BJ01 株恢复病毒感染的细胞胞浆观察到

特异性的绿色荧光,这与 SARS-CoV 感染该细胞后可在胞浆中表达其特异蛋白是一致的。

采用空斑实验对恢复病毒进行滴定。SARS-CoV BJ01 株恢复病毒和原病毒均可在第 3 天规律的

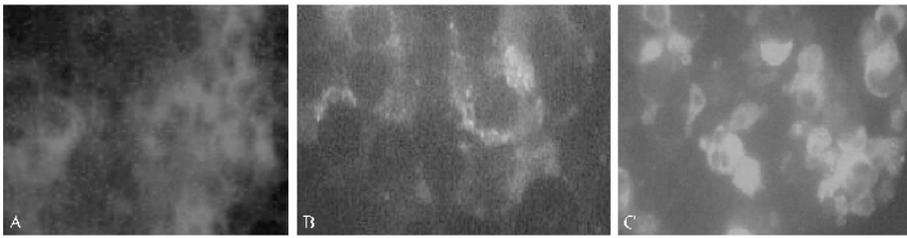


图2 SARS-CoV BJ01 株及恢复病毒的间接免疫荧光结果

Fig.2 The IFA results in Vero E6 cells of the rescued virus and SARS-CoV BJ01 strain. A :Negative control(PBS);B :The rescued virus ; C :Positive control(SARS-CoV BJ01 strain).

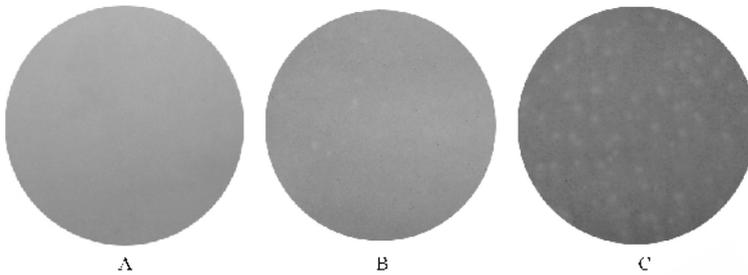


图3 SARS-CoV BJ01 株及恢复病毒空斑滴定

Fig.3 Plaque assay of the rescued virus and SARS-CoV BJ01 strain. A :Negative control(PBS);B :The rescued virus ; C :Positive control(SARS-CoV BJ01 strain).

出现空斑,恢复病毒所产生的空斑形态与 SARS-CoV BJ01 株的类似(图3)。SARS-CoV BJ01 株恢复病毒在 Vero E6 细胞上的空斑滴度为  $5 \times 10^4$  PFU/mL,而原病毒的空斑滴度则为  $2 \times 10^5$  PFU/mL,表明恢复病毒具有 SARS-CoV 的感染特性。

### 3 讨论

反向遗传操作是研究 RNA 病毒的重要手段,运用该技术可以在分子水平上分析和改造病毒基因组。SARS 冠状病毒为单股正链 RNA 病毒,其基因组复制不涉及 DNA 中间体。借助感染性克隆技术可实现 DNA 水平上对该病毒基因组的人工操作,从而为深入阐明病毒基因组结构与功能、病毒致病的分子机理以及研制候选疫苗株、发展新型病毒载体等方面奠定良好的基础。虽然目前已成功构建了多种冠状病毒的基因组全长 cDNA<sup>[19-22]</sup>,但由于冠状病毒基因组较大,构建基因组全长 cDNA 克隆具有很大困难,构建全长 cDNA 克隆必须使用大容量的载体,而且长片段 cDNA 克隆在菌体内的不稳定性常常使 DNA 在复制过程中发生碱基突变或缺失,最终导致转录体的感染性下降甚至丧失<sup>[23]</sup>。因此目前普遍采用体外连接构建基因组全长 cDNA 的方法来解决这一研究难题,而国内对我国 SARS-CoV 病毒分离株感染性克隆的研究尚处于空白。

本研究采用的是我国分离的 SARS-CoV 重要毒

株 BJ01 株<sup>[5]</sup>,在构建出该病毒基因组 cDNA 亚克隆的基础上<sup>[16]</sup>,采用体外拼接的方法获得了 SARS-CoV 基因组 5'和 3'端的半分子 cDNA,然后进一步构建出了基因组全长 cDNA 分子。在此基础上,利用 5'端引入的 T7 启动子核心序列直接进行体外转录,以获得 SARS-CoV BJ01 株恢复病毒并鉴定其生物学性质。然而对于大片段的 DNA 分子,其回收效率和连接效率都显著下降。DNA 分子两个粘端的连接可认为是双分子反应,在标准条件下,其反应效率主要由互相匹配的 DNA 末端的有效浓度决定。因此,DNA 分子的连接效率不仅与内切酶的纯度、DNA 纯度、连接酶活性、DNA 末端碱基完整性、反应体系及反应条件等因素有关,而且与 DNA 末端的有效浓度有很大关系。在转录反应中,一定的模板量(1.5 $\mu$ g 以上)及一定的反应时间对于提高体外转录的效率都是有必要的。这些因素都影响到 SARS-CoV BJ01 株全长 cDNA 的构建和其恢复病毒的产生。

在全长 cDNA 构建成功的基础上,本研究最终获得了 SARS-CoV BJ01 株的恢复病毒,并对其生物学特性进行了鉴定。保持序列的完整性与真实性是构建病毒感染性克隆中的重要问题,诸多因素包括 PCR 反应中 *Taq* 酶的错配率,切胶回收时的紫外线照射,限制性内切酶的非特异性切割,质粒在大肠杆菌中的繁殖都有可能使 DNA 发生突变或缺失。如果 DNA 发生致死性突变或缺失,则会导致病毒拯救

失败,恢复病毒不具有感染性。本实验中获得的恢复病毒可导致 Vero-E6 细胞产生 SARS-CoV 引起的典型细胞病变,该结果证实了构建的 SARS-CoV BJ01 株恢复病毒具有感染性。经多次传代(3~6代),恢复病毒仍能导致感染的细胞产生上述典型病变,这表明该病毒具有很好的稳定性。SARS-CoV 为单股正链 RNA 病毒,复制主要在细胞浆进行,所以病毒抗原主要位于细胞浆内,故在感染的细胞浆内发出特异性的绿色荧光。间接免疫荧光实验显示该病毒与 SARS-CoV BJ01 株抗体发生特异性反应,表明其具有 SARS-CoV 的抗原结构。对病毒滴度的测定表明尽管恢复病毒可导致与原病毒相似的病变,但其病毒滴度略低于原病毒,这种现象在其他病毒的感染性克隆研究中也经常发生,其详细的发生机制尚不清楚,但可通过某些辅助措施增强恢复病毒的毒力,如在病毒感染性克隆感染细胞的同时辅以核衣壳蛋白转染<sup>[24]</sup>。最后对恢复病毒的序列测定证实所获得的病毒序列与 SARS-CoV BJ01 株一致,表明其来自 BJ01 株的亲代序列。这些结果表明我们获得了 SARS-CoV BJ01 株的恢复病毒,而且其具有预期的感染性。

目前,关于 SARS-CoV 病毒基因组全长克隆的构建,仅见到美国 Yount 等<sup>[24]</sup>报道获得的 SARS-CoV Urbani 株的感染性转录体。但国内目前尚未见相关报道,本报道是继美国 Yount 之后我国首次获得的 SARS-CoV BJ01 株基因组全长 cDNA 及其恢复病毒。SARS-CoV BJ01 株病毒全长 cDNA 分子及恢复病毒的获得为进一步研究 SARS-CoV 病毒致病的分子机理奠定了基础,也为其在疫苗研制等方面的应用建立了技术平台。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, *et al.* A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *New Engl J Med*, 2003, **348**(20):1953-1966.
- [ 2 ] Drosten C, Gunther S, Preiser W, *et al.* Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *New Engl J Med* 2003, **348**(20):1967-1976.
- [ 3 ] Peiris JSM, Lai ST, Poon L, *et al.* Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*, 2003, **361**(9366):1319-1325.
- [ 4 ] Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, *et al.* Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science*, 2003, **300**(5624):1394-1398.
- [ 5 ] 秦鄂德,于曼,祝庆余,等.SARS 相关病毒(BJ01 株)的全序列及其比较分析.科学通报,2003, **48**(11):1127-1134.
- [ 6 ] Marra MA, Jones SJM, Astell C, *et al.* The genome sequence of the SARS associated coronavirus. *Science*, 2003, **300**(5624):1399-1404.
- [ 7 ] The Chinese SARS Molecular Epidemiology Consortium. Molecular evolution of the SARS coronavirus during the course of the SARS epidemic in China. *Science*, 2004, **303**:1666-1669.
- [ 8 ] Ruan YJ, Wei LC, Ee LA, *et al.* Comparative full length genome sequence and analysis of 14 SARS coronavirus isolates and common mutations associated with putative origins of infection. *Lancet*, 2003, **361**(9371):1779-1785.
- [ 9 ] Guan Y, Zheng BJ, He YQ, *et al.* Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in Southern China. *Science* 2003, **302**:276-278.
- [ 10 ] Peiris JSM, Guan Y, Yuen KY. Severe acute respiratory syndrome. *Nat Med*, 2004, **10**(12):S88-S97.
- [ 11 ] Anand K, Ziebuhr J, Wadhwani P, *et al.* Coronavirus main proteinase(3CL Pro) structure: basis for design of anti-SARS drugs. *Science*, 2003, **300**:1763-1767.
- [ 12 ] Simmons G, Reeves JD, Rennekamp AJ, *et al.* Characterization of severe acute respiratory syndrome associated coronavirus(SARS-CoV) spike glycoprotein mediated viral entry. *Proc Natl Acad Sci*, 2004, **101**:4240-4245.
- [ 13 ] Zhang Y, Li T, Fu L, *et al.* Silencing SARS-CoV spike protein expression in cultured cells by RNA interference. *FEBS Lett*, 2004, **560**:141-146.
- [ 14 ] Li W, Moore MJ, Vasileva N, *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*, 2003, **426**:450-454.
- [ 15 ] Boyer JC, Haenni AL. Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virology*, 1994, **198**:415-426.
- [ 16 ] 赵卓,韩剑峰,范宝昌,等.我国 SARS 病毒 BJ01 株基因组 cDNA 克隆的构建与鉴定.军事医学科学院院刊,2004, **28**(4):301-303.
- [ 17 ] 于曼,彭文明,秦鄂德,等.SARS 病毒 BJ01 株空斑测定方法的建立.解放军医学杂志,2003, **28**(8):701-702.
- [ 18 ] 司炳银,杨保安,祝庆余,等.SARS 病毒抗体间接免疫荧光检测方法的建立.解放军医学杂志,2003, **28**(8):699-700.
- [ 19 ] Yount B, Curtis KM, Baric RS. Strategy for systematic assembly of large RNA and DNA genomes: transmissible gastroenteritis virus model. *J Virol*, 2000, **74**(22):10600-10611.
- [ 20 ] Yount B, Denison MR, Weiss SR, *et al.* Systematic assembly of a full-length infectious cDNA of mouse hepatitis virus strain A59. *J Virol* 2002, **76**(21):11065-11078.
- [ 21 ] Coley SE, Lavi E, Sawichi SG, *et al.* Recombinant mouse hepatitis virus strain A59 from cloned, full-length cDNA replicates to high titers *in vitro* and is fully pathogenic *in vivo*. *J Virol* 2005, **79**(5):3097-3106.
- [ 22 ] Casais R, Thiel V, Siddell SG, *et al.* Reverse genetics system for the avian coronavirus infectious bronchitis virus. *J Virol* 2001, **75**(24):12359-12369.
- [ 23 ] Almazan F, Gonzalez JM, Penzes Z, *et al.* Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, **97**(10):5516-5521.

- [24] Yount B ,Curtis KM ,Fritz EA ,*et al.* Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc Natl Acad Sci* ,2003 ,**100**(22) : 12995 – 13000.

## Construction of genomic full-length cDNA of SARS coronavirus BJ01 strain and identification of its biological characteristics

HAN Jian-feng ,JIANG Tao ,CHEN Shui-ping ,YU Man ,QIN E-de\*

( State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity ,Institute of Microbiology and Epidemiology , Academy of Military Medical Sciences , Beijing 100071 , China )

**Abstract** Severe acute respiratory syndrome ( SARS ) is an important emerging infectious disease which caused by SARS coronavirus ( SARS-CoV ) , and the study of its pathogenesis is needed for the treatment and prevention of this disease . To study the pathogenesis of SARS-CoV using reverse genetics technology , by *in vitro* ligation using 7 contiguous cDNAs that span the entire genome of the SARS-CoV BJ01 strain , a genomic full-length cDNA was assembled , then using T7 RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems with the genomic full-length cDNA as template , the RNA transcript was attained . The typical SARS-CoV-resulted cell pathogenic effects were observed when RNA transcript was electroporated into Vero E6 cells . The results of RT-PCR and sequencing of the rescued virus showed that it originated from transcript which derived from the full-length cDNA construct . Rescued virus-infected cells were detected by indirect fluorescent antibody staining demonstrated that it can specifically reaction with SARS-CoV . By CPE method and plaque assay , the titers of the rescued virus and wild-type virus were assessed , which demonstrated there are no significant difference between the viruses and they have similar biological characteristics . Construction of the genomic full-length cDNA of SARS-CoV BJ01 stain successfully and study of the biological characteristics of the rescued virus will provide a useful tool serving for the discovery of molecular pathogenesis and development of candidate vaccines against SARS-CoV .

**Keywords** : SARS-CoV BJ01 strain ;Reverse genetics ;Genomic full-length cDNA ;Rescued virus

Foundation item : National Key Basic Research and Development Program ( 2003CB514119 ) ; Chinese National Natural Science Foundation ( 30340021 )

\* Corresponding author . Tel 86-10-66948604 ; Fax 86-10-63898239 ; E-mail : qinède@sohu.com

Other authors : ZHAO Zhuo , LI Xiao-feng , QIN Cheng-feng , DENG Yong-qiang , ZHAO Hui , ZHAO Hai-long , LI Xiao-yu

Received : 20 January 2006 / Accepted : 1 March 2006 / Revised : 11 May 2006