

王文阳, 刘业兵, 徐璐, 等. 环状聚合酶链式反应技术及其在病毒学研究中的应用 [J]. 畜牧与兽医, 2026, 58 (10): 131-139.

Wang W Y, Liu Y B, Xu L, et al. Circular polymerase extension reaction (CPEr) and its application in virological research [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2026, 58 (10): 131-139.

环状聚合酶链式反应技术及其在病毒学研究中的应用

王文阳, 刘业兵, 徐璐, 吴睿智, 夏应菊*

(国家猪瘟参考实验室/中国兽医药品监察所, 北京 100081)

摘要: 反向遗传学技术作为解析病毒基因功能、阐明致病机制及开发新型疫苗的重要研究工具, 在现代微生物学基础研究及应用领域发挥着重要作用。环状聚合酶链式反应 (CPEr) 作为该技术的一种重要方法, 目前已被广泛应用于多种正链 RNA 病毒的体外拯救。特别是 SARS-CoV-2 疫情暴发后, 亟需建立高效、快速的反向遗传学平台以用于病毒生物学特性研究及疫苗药物研发。CPEr 技术因其操作简便、构建周期短等优势, 迅速成为人工构建冠状病毒基因组的关键技术之一, 显著推动了该技术在病毒研究中的应用。本文系统阐述 CPEr 技术的基本原理, 总结近年来该技术在多种 RNA 病毒研究中的实际应用情况, 以期病毒致病机制研究、相关诊断技术开发、疫病防控及抗病毒药物筛选等工作提供技术参考。

关键词: 反向遗传学技术; 环状聚合酶链式反应; 病毒拯救; RNA 病毒

中图分类号: S852.65 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2026)10-0131-09

Circular polymerase extension reaction (CPEr) and its application in virological research

WANG Wenyang, LIU Yebing, XU Lu, WU Ruizhi, XIA Yingju*

(National Reference Laboratory for Classical Swine Fever/China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: Reverse genetics serves as an essential tool in virology, enabling comprehensive investigation of viral gene functions, pathogenic mechanisms, and vaccine development, thereby bridging fundamental research on applied microbiology. Among the advanced techniques in this technology, circular polymerase extension reaction (CPEr) has emerged as a robust approach for *in vitro* rescue of positive-strand RNA viruses, demonstrating broad utility in viral reverse genetics systems. Since the outbreak of SARS-CoV-2, there has been an urgent need for the development of an expeditious reverse genetics platform to support studies on viral biological characteristics and to facilitate development of vaccines and therapeutics. Due to its advantages of operational simplicity and short construction cycle, CPEr has rapidly emerged as a pivotal technique for artificial assembly of coronavirus genomes, significantly advancing its application in virological research. This review systematically elucidates the fundamental principles of CPEr and summarizes its applications in the study of various RNA viruses, aiming to provide a technical reference for future research on virus pathogenesis, diagnostic techniques, disease control and prevention, as well as anti-viral drugs screening.

Keywords: reverse genetics technology; circular polymerase extension reaction; virus rescue; RNA virus

反向遗传学技术是一种通过操纵基因组的核酸序列来研究基因功能的方法。与之相对, 经典遗传学则主要借助杂交等技术手段改变生物性状与表型, 由此推断基因的功能, 其研究路径遵循由表及里的逻辑。随着 20 世纪中期分子遗传学及分子生物学技术的逐步发展, 在分子水平上对基因进行精准操作得以实

现。反向遗传学便是依托这一技术背景发展起来的研究策略: 该策略在已知基因序列的基础上, 通过定点突变、插入、缺失等定向修饰手段对基因进行改造, 再按照特定顺序进行组装, 最终获得具有生命活性的个体, 进而探究上述基因序列的改变对表型及功能产生的影响。该研究策略与经典遗传学“从表型到基因”的传统方向相反, 因而被称为反向遗传学, 其相关技术方法统称为反向遗传学技术。反向遗传学技术经过迭代发展, 新型技术不断涌现, 环状聚合酶链式反应 (circular polymerase extension reaction, CPEr) 便是其中具有代表性的一种, 作为一种高效的反向遗传学工具, CPEr 主要用于正链 RNA 病毒的研究。

收稿日期 2025-10-27; 修回日期: 2026-07-30

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFD1800805)

第一作者: 王文阳, 男, 硕士研究生

* 通信作者: 夏应菊, 博士, 高级兽医师, 研究方向: 猪瘟、非洲猪瘟等重要猪病检测技术及标准物质研究, E-mail: vet_xiajj@163.com。

正链 RNA 病毒中包括很多对人和公共卫生造成严重威胁的病毒,如黄病毒科 (Flaviviridae) 中的日本脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV), 猪瘟疫病毒 (classical swine fever, CSFV), 冠状病毒科 (Coronaviridae) 的新型冠状病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 以及小 RNA 病毒科 (Picornaviridae) 的口蹄疫病毒 (foot-and-mouth disease virus, FMDV) 等^[1], 而 CPER 技术的问世为研究正链 RNA 病毒的基因组构建、疫苗开发、病毒与宿主相互作用机制研究及病毒变异机制等提供了更多的可能。

传统上,正链 RNA 病毒的拯救首先是将病毒的基因组 RNA 反转录成 cDNA 并将其克隆至质粒载体中,以构建包含病毒基因组全长 cDNA 的感染性克隆,随后将此感染性克隆转染至易感细胞,利用细胞内的转录与翻译系统表达病毒蛋白,并复制病毒基因组,最终在细胞内完成病毒粒子的装配,并释放出具有感染性的子代病毒,从而实现病毒的复制与扩增。传统的反向遗传学方法为正链 RNA 病毒研究提供了重要工具,但其应用可能受到制约,如某些病毒基因作为外源基因会对细菌或酵母产生毒性,导致质粒表达活性降低,或病毒基因的插入造成宿主发生隐蔽转录 (cryptic transcription) 等问题。为解决上述技术瓶颈,现有研究尝试从多个方向对反向遗传系统进行优化,例如:(1) 使用低拷贝数载体系统以降低外源基因表达,从而减轻其对宿主细胞的毒性;(2) 对病毒基因组中非必需基因进行缺失或突变,以降低隐蔽转录的发生^[2-3]等方法。然而,由于技术本身的复杂性或病毒种属依赖性,上述优化在 RNA 病毒研究中的普适性与有效性仍需进一步验证。

CPER 是一种基于聚合酶链式反应 (PCR) 的反向遗传学技术,该技术通过直接在体外组装病毒基因组 cDNA,形成环状 DNA 作为模板来实现病毒基因组在体外的无缝组装,规避传统细菌克隆依赖,从而直接生成具有感染性的重组病毒,突破了传统的反向遗传学技术的限制,更为高效。目前,CPER 技术已被广泛用于研究黄病毒科成员——西尼罗病毒 (West Nile virus, WNV), 寨卡病毒 (Zika virus, ZIKV), 黄热病毒 (yellow fever virus, YFV), 登革病毒 (Dengue virus, DENV) 及 JEV 的关键毒力因子鉴定及致病机制解析^[4-11], 并可能用于其他 RNA 病毒研究^[12]。本文通过对 CPER 技术的发展历程、工作原理、应用现状、与其他反向遗传技术的比较以及展望进行全面综述,系统阐释了 CPER 技术在病毒基因功能解析、入侵机制探索等基础研究方面的应用^[13-14], 并为新型病毒防控技术的开发提供

参考^[12]。

1 反向遗传学技术在病毒研究中的应用

反向遗传学技术的出现为 RNA 病毒的研究带来了革命性的变化,该技术通过构建病毒的感染性克隆,从基因水平对病毒进行操作,从而深入研究病毒的生物学特性、致病机制、疫苗研发、抗病毒药物筛选等诸多方面。当前,病毒反向遗传学技术发展迅速,已形成多种方法并行的技术格局,主要包括以下几类:基于靶向 RNA 同源重组的反向遗传学,基于细菌人工染色体 (bacterial artificial chromosome, BAC) 的反向遗传学,基于体外连接的反向遗传学,基于酵母系统的转化偶联重组技术 (transformation associated recombination, TAR) 的反向遗传学,依赖辅助病毒的反向遗传学以及基于 CPER 的反向遗传学等^[15]。对于基因组较小的 RNA 病毒,如流感病毒、CSFV、FMDV 等,其经典反向遗传学技术路径是将病毒基因组全长 cDNA 克隆至质粒载体,通过转染使重组质粒进入宿主细胞,并借助质粒启动子驱动病毒基因组 RNA 的转录与翻译,进而完成病毒结构蛋白、非结构蛋白的表达与病毒粒子的装配,最终实现感染性病毒的拯救。该技术在流感病毒领域的应用最为广泛,目前临床使用的 H5N1 禽流感疫苗即采用该技术平台构建,主要通过对高致病性毒株进行定点突变,修饰其关键毒力位点,从而获得具有致病性减弱疫苗株。人用季节性流感病毒疫苗则借助 PR8、X31 等标准毒株骨架,通过替换血凝素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA) 糖蛋白基因,可快速匹配当前流行毒株的抗原特性,实现疫苗株的及时更新。该策略显著提升了针对流感病毒的防控效果^[16]。

基因组较大的 RNA 病毒 (如冠状病毒科成员),如果采取同流感病毒相同的策略,用常规质粒载体构建可能出现重组或基因组断裂,因此通常使用基于 BAC 或酵母人工染色体 (yeast artificial chromosome, YAC) 的反向遗传学系统,借助同源重组或 Gibson 组装等无缝克隆技术,将病毒全长 cDNA 高效整合到细菌或酵母人工染色体中,并利用大肠杆菌或酵母等宿主微生物系统进行扩增与保存。随后从细菌或酵母中提取经验证正确的重组载体,经脂质体转染或电穿孔技术导入哺乳动物宿主细胞后,借助细胞内转录翻译系统,启动病毒基因组的复制与表达,经过特定时间培养后收获具有感染性的病毒颗粒^[17]。2000 年 Almazan 等^[18]使用 BAC 方法首次将人工构建的猪传染性胃肠炎病毒 (transmissible gastroenteritis virus, TGEV) 的全长 cDNA 克隆到 BAC 上,拯救获得重组 TGEV。通过对重组 TGEV 基因组序列进行鉴定,并

对重组病毒的生长特性和致病力进行分析发现,该病毒基因组序列与构建到 BAC 中的 cDNA 序列一致,生长特性及致病力也与亲本毒株一致。而该病毒在置换了 1 株能在肠道高滴度增殖且致病力强的 TGEV 刺突蛋白基因后,在肠道的增殖能力和致病性上较亲本毒株都得到了提高,与置换毒株一致,证明刺突蛋白可影响 TGEV 在肠道的增殖及对猪的致病力。Zhang 等^[19]则开发了基于 BAC 的 SARS-CoV-2 复制子系统,该系统为抗病毒药物筛选及病毒-宿主相互作用机制研究提供了有效平台。针对冠状病毒基因组 3' 端 1/3 区域(主要编码结构蛋白)的功能解析,基于靶向 RNA 同源重组的反向遗传学技术则提供了一种高效的研究策略。该技术通过设计与靶序列具有同源性的引导 RNA (homology-directed recombination RNA, hrRNA),借助宿主细胞内的 RNA 依赖性 RNA 聚合酶复合物等修复机制,实现 hrRNA 与病毒基因组间的特异性同源重组,从而能够精确引入定点突变、缺失或插入,进行病毒功能性研究。Li 等^[20]成功建立了基于靶向 RNA 重组的猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)反向遗传学平台,通过构建 PEDV 感染性克隆,为病毒蛋白功能解析与减毒疫苗研发提供了关键技术支撑。总之,反向遗传学技术在 RNA 病毒研究中具有不可或缺的作用,其在病毒基因功能解析、致病机制探索、疫苗开发及抗病毒药物筛选等多个研究方向均提供了技术支持。

2 CPER 技术的发展历程与原理

分子克隆技术是分子生物学的基础,可分为序列依赖和非序列依赖两大类^[21]。20 世纪 80 年代 PCR 技术诞生后,为体外核酸扩增提供了技术基础和思路,科学家们开始探索基于聚合酶的各种核酸操作技术,CPER 技术的基本原理在这一时期逐渐形成,在 21 世纪初,CPER 技术正式被 Quan 等^[21]提出,其旨在通过一种具有链置换活性的 DNA 聚合酶,以环状 DNA 为模板进行扩增,从而产生重组 DNA 分子。2013 年 Edmonds 等^[8]首次提出将 CPER 作为一种不依赖细菌载体操作的体外重组体系,实现了黄病毒科病毒感染性 cDNA 的高效快速组装。此后,研究人员发现 CPER 技术可以快速生成携带特定突变或缺失的重组黄病毒,为研究病毒蛋白功能、病毒与宿主相互作用以及致病机制等提供了有力工具。随后几年,CPER 技术的应用范畴从黄病毒科延伸至多种 RNA 病毒研究领域。该技术在冠状病毒等病原体研究中展现出在病毒基因组操作与功能解析方面的重要潜力^[8]。在 2021 年,Alberto 等^[7]利用 CPER 方法建立

了一种新型的基于 PCR 的 SARS-CoV-2 反向遗传系统,这一系统比以往的方法更简单、更快,通过将病毒的 cDNA 片段进行组装,然后将 CPER 反应混合物直接转染到 HEK 293T 细胞中培养,成功地在 HEK 293T 细胞中合成了具有感染性的 SARS-CoV-2 病毒,这为研究新冠病毒的基因功能、病毒复制机制以及疫苗研发等提供了重要平台。在 SARS-CoV-2 的研究中,基于 CPER 技术,研究者可高效解析 SARS-CoV-2 特定突变的生物学特性,并通过构建携带特定突变的重组病毒,系统性比较其与亲本病毒在复制能力、致病性等表型特征上的差异。

CPER 是一种用于高效扩增环状 DNA 模板的感染性克隆组装技术,它无需依赖传统 BAC 系统中烦琐的全长 cDNA 质粒组装及大肠杆菌转化步骤^[8]。该技术核心设计包括:1) 针对病毒基因组设计一系列特异性引物,相邻引物间含 20 bp 左右同源重叠序列;2) 引入特殊设计的 Linker 序列实现病毒 5'UTR 与 3'UTR 的有效连接,该序列包含以下关键功能元件:核酶(ribozyme)编码区、特异性间隔序列(spacer)、多聚腺苷酸信号(polyA signal)以及可选的 RNA 聚合酶 II 型启动子(如 CMV 启动子)或 RNA 聚合酶 I 型启动子。这些元件的协同作用确保了病毒基因组在宿主细胞内的准确环化与高效表达。具体操作流程为:首先通过 PCR 分别扩增病毒基因组片段获得片段大小相近、前后片段有相互重叠的多条 PCR 产物;随后将等摩尔浓度的片段与 Linker 共同加入包含链置换 DNA 聚合酶的体外重组反应体系,通过重叠序列介导的同源重组实现病毒基因组序列的体外环化;最后,将环状 DNA 转染给易感细胞进行病毒拯救,并对产生的重组病毒进行检测鉴定。这一技术避免了传统反向遗传学平台中必需的体内重组、细菌克隆筛选或体外转录等中间环节^[22-25]。

3 CPER 技术在病毒研究中的应用

CPER 凭借其自身的特点和优势,在黄病毒科、冠状病毒科等威胁人与动物健康的病毒研究中发挥了重要作用。

3.1 CPER 技术在正链 RNA 病毒拯救与研究中的应用

3.1.1 对黄病毒科病毒的拯救与研究

传统的反向遗传学系统用于拯救黄病毒和冠状病毒,对操作人员的技术要求高且耗时长,在一定程度上阻碍了对病毒的研究。2013 年,Edmonds 研究团队^[8]首次将 CPER 技术应用于黄病毒科西尼罗河病毒亚型的昆津病毒(Kunjin virus, KUNV) NSW-AUS/2011 的拯救。通过构建病毒基因组的 cDNA 片段并

利用定点 PCR 诱变技术, 研究团队获得 E 蛋白 S156F、NS5 蛋白 R47G 及 NS5 蛋白 V49I 三种特异性氨基酸位点突变的拯救病毒, 并验证了拯救病毒与亲本病毒在基因组及表型上的不同。这一研究首次验证了 CPER 技术可用于黄病毒的拯救, 标志着黄病毒学研究方法学的革新, 为高致病性虫媒病毒快速遗传操作与疫苗开发奠定了技术基础。

随后在 2023 年, Dong 等^[26]通过优化 JEV 减毒疫苗株 SA14-14-2 的基因组结构, 在 JEV SA14-14-2 的全长基因组上游引入巨细胞病毒立即早期启动子 (CMV promoter)、丁型肝炎病毒核酶 (HDVr) 及多聚腺苷酸化信号 (PolyA), 构建真核表达调控单元; 同时, 针对基因组第 2 291 位点实施 G→A 同义突变, 特异性消除 IIS 型限制性内切酶 *SapI* 的识别位点, 以避免后续试验中的非特异性酶切干扰; 最后通过 CPER 技术将线性病毒 DNA 片段组装为环状基因组后转染至 Vero 细胞, 成功获得具有典型噬斑形态与复制活性的 JEV SA14-14-2 拯救病毒, 避免了构建全长感染性克隆和转化宿主的步骤, 建立了标准化黄病毒科病毒体外重构技术平台。Dong 等^[26-27]进一步利用该技术框架, 构建了表达绿色荧光蛋白 (GFP) 的库蚊黄病毒 (*Culex flavivirus*, CxFV) 重组报告毒株, 其荧光信号在有限传代周期内 (≤3 代) 可检测到, 为病毒入侵机制解析及抗病毒药物高通量筛选提供了可视化追踪工具^[28]。这些研究验证了 CPER 技术可用于黄病毒科病原体反向遗传学, 并为高致病性黄病毒的基因功能研究与疫苗开发建立了高效、可扩展的技术平台。

3.1.2 对冠状病毒科及其他正链 RNA 病毒的拯救与研究

Torii 等^[29]于 2021 年基于 CPER 技术建立了 SARS-CoV-2 的高效反向遗传学系统。研究者以 SARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020 毒株为模板, 通过分段扩增策略将其约 30 kb 的基因组拆解为多个片段, 经体外重组反应快速拼接为完整基因组环状 cDNA, 并在转染 HEK293T-3P6C33 细胞系后 2 周内成功获得高滴度重组病毒。为拓展病毒功能研究工具, 该团队进一步构建了携带 GFP 或 HiBiT 荧光素酶标签的重组病毒。定量分析显示, GFP 标记病毒在感染后 36 h 的最高病毒滴度显著低于野生型病毒 (WT) 在 48 h 的峰值滴度; 而 HiBiT 标记病毒则维持与 WT 相似的复制动力学曲线, 证实小分子 HiBiT 标签对病毒增殖干扰极小^[9], 提示其可作为药物高通量筛选及体内外感染模型构建的理想工具。该技术仅用 7 d 即可快速构建携带特定突变的疫苗候选株, 为解析 SARS-CoV-2 增殖与致病分子机制开辟了新

途径。

2021 年, Alberto 等^[7]利用 CPER 技术成功构建了 SARS-CoV-2, 罗斯河病毒 (Ross river virus, 简称 RRV, 披膜病毒科 *Togaviridae*), 小鼠诺如病毒 (murine norovirus, 简称 MNV, 杯状病毒科 *Caliciviridae*) 及人类诺如病毒 (human noroviruses, HuNoVs) 的感染性克隆, 系统验证了该技术对多科属 RNA 病毒的普适性。针对 HuNoVs 的拯救, 研究团队直接从患者粪便样本中提取病毒总 RNA, 通过 CPER 技术成功获得具有复制活性的病毒颗粒, 证实该技术可绕过传统体外培养限制, 实现从临床样本至感染性病毒的转化。此外, 通过 CPER 构建的 SARS-CoV-2 D614G 刺突蛋白突变体及携带 ZsGreen 荧光报告基因的重组病毒, 在至少连续 3 次传代后仍保持基因组稳定性, 为活病毒动态示踪、中和抗体效价检测及抗病毒药物高通量筛选提供了可靠工具。此项研究确立了 CPER 作为多种正链 RNA 病毒反向遗传学的标准化平台地位, 显著提升了对新发病毒性传染病的应急研究能力。

3.2 CPER 技术在单股负链 RNA 病毒拯救与研究中的初步探索

尽管 CPER 技术在正链 RNA 病毒研究中已日趋成熟, 但其应用范围并未止步于此。研究人员正尝试将这一平台拓展至基因组结构与复制机制更为复杂的病毒类别, 例如单股负链 RNA 病毒。呼吸道合胞病毒 (respiratory syncytial virus, RSV) 为单股负链 RNA 病毒, 可感染婴幼儿、老年人及免疫缺陷人群, 并造成严重下呼吸道症状, 是公共卫生安全领域的重大威胁^[30-31]。2025 年, Masaaki 研究团队^[32]选择 RSV 作为模式病原体, 将 RSV 基因组 (属单股负链 RNA 病毒) 拆分为 1.2~2.5 kb 的片段, 通过 CPER 技术与含 T7 启动子的连接子序列进行体外重组, 成功构建环状全长病毒 cDNA 克隆。鉴于 RSV 基因组 RNA 在宿主细胞中不具备直接翻译功能, 研究者将上述环状 cDNA 与包含编码 RSV A2 株和 B 株的病毒核衣壳蛋白 (N)、磷蛋白 (P)、RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (L) 和 M2-1 基因的辅助质粒共转染至 BHK/T7-9 细胞, 利用 T7 启动子驱动病毒基因组转录, 最终实现重组 RSV 的高效拯救。此项工作创新性地建立了基于 CPER 技术的 RSV 反向遗传学研究体系, 为单股负链 RNA 病毒的遗传操作系统优化提供了新策略。该方法通过简化病毒基因组组装与拯救流程, 显著提升重组单股负链病毒制备效率, 在病毒复制机制解析、减毒疫苗构建及抗病毒药物筛选等领域展现出重要应用潜力^[33]。但需指出的是, 目前该技术仅在 RSV 模型中完成验证, 是否能应用于其他单股负链

RNA 病毒的拯救仍需通过系统试验评估。况进行了总结。

表 1 对近年来 CPER 技术在病毒研究中的应用情

表 1 CPER 技术在病毒研究中的应用				
病毒科	病毒名称	核心操作	研究意义	文献
黄病毒科	KUNV	构建病毒基因组 cDNA 片段，定点 PCR 诱变获特定氨基酸突变体	首次验证 CPER 适用于黄病毒反向遗传学，为虫媒病毒研究与疫苗开发奠基	[8]
黄病毒科	JEV、CxFV	优化 JEV 基因组（引入调控元件+同义突变），CPER 组装环状基因组；构建 CxFV-GFP 报告株	建立黄病毒体外重构平台，提供病毒机制解析、药物筛选的可视化工具，验证 CPER 普适性	[26]
黄病毒科	波瓦桑病毒（POWV）	构建 POWV NS1 糖基化位点突变体（N85Q、N208Q、N224Q）及 NS1-GFP11 报告病毒	明确 NS1 突变对病毒复制/毒力的影响，建立反向遗传系统，助力减毒活疫苗设计	[34]
冠状病毒科	SARS-CoV-2	分段扩增基因组，CPER 拼成全环状 cDNA；构建 GFP/HiBiT 标签重组病毒	建立 SARS-CoV-2 高效反向遗传系统，HiBiT 标签干扰小，可用于药物筛选与疫苗研究	[29]
冠状病毒科	SARS-CoV-2	直接用 HuNoVs 临床样本构建感染性克隆；	验证 CPER 对多科正链 RNA 病毒普适性，	[7]
披膜病毒科	RRV	构建 SARS-CoV-2 突变/荧光重组株	提升新发传染病应急研究能力	
杯状病毒科	MNV、HuNoVs			
黄病毒科	HCV、BVDV-1	改良 CPER：用 RNA 聚合酶 I 启动子替代 II，优化共培养体系；针对 I、II、III 类 IRES 病毒优化	实现多 IRES 类型病毒拯救（含临床标本），构建报告病毒，为抗病毒药物评估提供工具	[35]
小 RNA 病毒科	HAV、EMCV			
黄病毒科	朝阳病毒（昆虫特异性）、嵌合寨卡病毒	将 CMV 启动子更换为 OpIE2-CA 启动子，将 CPER 技术拓展至蚊虫细胞	首次在蚊虫细胞中拯救该类病毒，扩展黄病毒 CPER 拯救技术的应用场景	[36]
副黏病毒科	RSV	分段扩增 RSV 基因组，CPER 重组环状 cDNA，与辅助质粒共转染细胞	建立 RSV 的 CPER 反向遗传体系，简化单股负链病毒拯救流程（目前仅 RSV 验证）	[32]

4 CPER 技术与其他反向遗传技术的比较

反向遗传学技术通过操纵病毒基因组研究其功能、复制机制及开发疫苗和抗病毒药物。随着技术发展，多种方法已被提出，这些技术在操作流程、适用范围、效率及保真性上存在显著差异。

当前主流反向遗传学技术因其设计原理不同，适用于不同的研究场景（表 2）。CPER 常用于快速组装环状 DNA 模板。其核心优势在于对大基因组 RNA 病毒的高效兼容性，长片段高保真 DNA 聚合酶可一次性扩增长达 40 kb 的 DNA 片段，并通过体外延伸反应实现多位点突变的精准引入，为病毒适应性进化研究提供灵活的技术平台。然而，CPER 技术仍存在亟待优化的局限性：首先，其高度依赖高保真聚合酶以控制碱基错误率，且引物重叠区需严格设计（≥ 20 bp 同源序列）以避免嵌合体形成；其次，体外延伸反应中环状 cDNA 的合成效率受多重因素制约，并且残留线性 DNA 片段可能干扰后续转染效率。尽管存在上述挑战，CPER 凭借其快速迭代能力与免克隆

特性，已在 SARS-CoV-2 变异株构建^[29]、黄病毒属功能基因组解析^[26]等领域成为不可替代的工具。

然而，其他反向遗传学技术在特定研究场景中仍具不可替代性：BAC 系统因外源基因组的超稳定性，仍是大型 DNA 病毒（如疱疹病毒科成员）功能研究的金标准^[37]；酵母转化偶联重组（TAR）技术作为目前大片段 DNA 组装领域效率最高的技术平台，其核心优势体现在对超长 DNA 序列（>100 kb）的精准组装能力^[38]。此外，不同技术平台的保真性也存在差别。Yuri 团队^[46]为评估 CPER 与 BAC 反向遗传学系统的基因组构建准确性，以 SARS-CoV-2 Wuhan/Hu-1/2019 毒株为模型，分别通过 BAC 和 CPER 技术独立构建 5 批次拯救病毒。通过对 10 份拯救病毒样本进行深度测序，统计分析频率>10%的核苷酸置换事件，发现在使用 BAC 系统时所有 5 批次病毒储备液中均未检测到频率>10%的非必需核苷酸置换；使用 CPER 系统时 4/5 批次样本中检出 3~5 个频率>10%的非目标突变，3 批次样本中进一步发现 4 个频率>20%的高频置换位点。上述数据表明，

CPER 技术构建病毒基因组的保真性低于 BAC 系统，在采用 CPER 技术时应严格控制试验条件，并通过多

批次独立试验及深度测序验证突变背景，以降低技术依赖性误差对病毒表型研究的干扰。

表 2 CPER 技术与其他反向遗传技术的比较

技术名称	核心原理	应用的病毒	优势	局限性	参考文献
CPER	通过设计重叠引物分段 PCR 扩增病毒基因组，利用 DNA 聚合酶延伸能力连接为环状 DNA 模板，直接转染宿主细胞	猫杯状病毒 SH/2014 株与 SARS-CoV-2 的拯救	兼容大基因组（如 30~40 kb）、快速、多位点、精准突变	依赖高保真聚合酶；引物设计严格；线性 DNA 残留干扰转染效率	[29, 39]
基于体外连接的反向遗传学	体外连接病毒 cDNA 片段组装完整基因组，通过体外转录生成感染性 RNA	黄热病病毒与 TGEV	分段连接，突破基因组尺寸限制	操作复杂；大基因组片段（> 10 kb）连接效率低	[40-41]
基于靶向 RNA 同源重组的技术	利用宿主 RNA 修复机制，通过 hrRNA 与病毒基因组重组定向引入突变	鸡传染性支气管炎病毒（IBV）与小鼠肝炎病毒（MHV）S 基因嵌合病毒	无需体外转录或克隆；研究冠状病毒基因组下游 1/3 区域的关键工具	重组效率依赖宿主细胞类型（如 Vero E6）；同源片段长度限制（<3 kb）	[42]
TAR 技术	通过酵母同源重组将病毒亚基因组片段与 TAR 载体组装为 YAC，转染哺乳动物细胞拯救病毒	MERS-CoV、SARS-CoV-2	高效重组（14 片段/250 kb）；快速周期（1 周左右）；毒性序列耐受性强	酵母培养与 YAC 纯化耗时（2~3 周）；成本高；重组效率依赖酵母生理状态	[43-44]
BAC 技术	病毒基因组分步克隆至 BAC 载体，转染哺乳动物细胞生成感染性病毒	TGEV 全长 cDNA 克隆与 SARS-CoV-2 复制子系统构建	外源序列高稳定性；cDNA 克隆的无限扩增；适用范围广	基因组需分步组装（≤ 8 kb）；质粒回收率低；试验周期较长（2 个月以上）	[18, 45]

综上，CPER、BAC、TAR 等技术均为重要的反向遗传体系。在实际研究中，技术选择需综合权衡病毒基因组特性、核心研究目标（快速构建、高保真、超大片段组装）以及实验室技术储备与资源配置，以期在操作效率、技术难度与结果可靠性之间达成最优平衡。

5 展望

CPER 技术作为一项革命性的反向遗传学技术，凭借其不依赖质粒克隆、快速及免克隆筛选的特性，已在 RNA 病毒的功能解析、疫苗研发及抗病毒药物筛选中展现出显著优势，尤其在研究 SARS-CoV-2 等新发病的致病机制等方面中发挥了关键作用。然而，随着病毒学研究需求的日益复杂化，CPER 技术的进一步优化与应用扩展仍面临诸多挑战与机遇。

目前存在的挑战主要涉及 2 个方面：一是理论层面，通过 CPER 技术拯救获得的病毒群体并非单克隆来源，其原因在于聚合酶介导的突变引入，CPER 技术只是通过桥接退火片段之间的间隙来使环状 DNA 的量加倍^[5]，但是在使用 PCR 进行体外合成 DNA 片段时可能会引入不可预测的突变；其次，CPER 技术

还可能存在生成环状病毒基因组 cDNA 的效率较低、PCR 体系中各因素的变化可能导致 DNA 不稳定等问题。二是技术层面，传统 CPER 方法在环化效率、细胞系适配性等方面存在局限。例如，在构建 SARS-CoV-2 感染性克隆时，传统 CPER 方法存在两大主要局限：首先，体外延伸反应合成的环状 cDNA 常残留交错切口，导致其在哺乳动物细胞中的转录效率降低；其次，病毒复制依赖的宿主细胞特异性因子可能未被充分满足，尽管 HEK 293 来源的细胞系因其高转染效率而被广泛应用于多种病毒家族的反向遗传学系统，但由于 SARS-CoV-2 具有独特的细胞嗜性，且病毒进入与复制过程高度依赖特定宿主细胞因子的协同作用，利用 HEK 293 细胞系进行病毒拯救时往往效率较低。

针对这些挑战，相应的优化策略也在积极探索中。例如，为了提高 CPER 技术的效率和稳健性，Liu 等^[47]通过三步关键性优化显著提升 CPER 技术的实用性：1) 在标准 CPER 流程中引入 *Taq* DNA 连接酶切口密封步骤；2) 为进一步确保 RNA 聚合酶 II 转录终止效率并防止其在连接区发生通读，研究人员对原有载体结构进行了优化，即将位于多聚腺苷酸信

号与 CMV 增强子/启动子之间的“间隔”序列替换为人 $\alpha 2$ 珠蛋白基因来源的功能性 Pol II 转录暂停信号^[48]；3) 采用 Vero E6-TMPRSS2 细胞取代 HEK 293 细胞进行转染。由于 Vero E6-TMPRSS2 细胞表达 SARS-CoV-2 进入宿主细胞所必须的 ACE2 及关键侵入辅助蛋白酶跨膜丝氨酸蛋白酶 2 (TMPRSS2)，可支持病毒的高效进入和复制^[49]。另外，Vero 细胞因先天缺乏产生 I 型干扰素 (IFN) 的能力，使其成为一个独特的细胞平台^[50]，这一特性恰好为那些因基因修饰而缺失了固有免疫拮抗功能的减毒重组病毒提供了理想的扩增环境。试验数据显示，优化后流程可在 72 h 内完成 SARS-CoV-2 病毒拯救，较传统 CPER 方法 (通常需 5 d) 缩短至少 2 d。基于优化的 CPER 技术，可系统性解析重组病毒的基因功能及其关键残基在病毒复制、致病性与免疫逃逸中的作用机制，该技术还可拓展至其他病毒相关机制研究。

针对正链 RNA 病毒翻译机制的多样性，Tamura 等^[35]基于病毒基因组对 5' 帽结构的依赖性差异，对 CPER 技术进行了定向优化。通过整合内部核糖体进入位点 (internal ribosomal entry site, IRES) 介导的翻译路径及 RNA 聚合酶 I (RNA pol I) 启动子-终止子基因盒，成功构建了非 5' 帽子依赖性正链 RNA 病毒的高效反向遗传学平台。该平台利用 IRES 直接招募宿主核糖体启动翻译，并通过 RNA pol I 基因盒实现病毒基因组在细胞核内的精准转录，突破了传统方法对 5' 帽结构及帽结合复合物的依赖性，这一平台为不依赖 5' 帽结构的正链 RNA 病毒的拯救与功能研究提供了高效且普适的策略。

此外，CPER 技术与其他前沿技术的结合将极大拓展其应用维度，如探索 CPER 技术与 CRISPR-Cas9 等基因编辑技术的结合，有望为实现病毒基因组的精准编辑和高通量功能研究开辟新的路径。尽管目前尚无研究直接整合两者，但 CRISPR-Cas9 与其他反向遗传学平台，如 TAR^[51]、BAC^[52] 的联合已获得初步成功，也有望与 CPER 技术联合应用，为病毒致病机制解析、减毒疫苗研发及抗病毒药物高通量筛选提供兼具速度与精度的解决方案。

总之，CPER 为构建 RNA 病毒的反向遗传学技术平台提供了便捷高效的通用方案，其高保真基因操作特性可系统解析病毒关键生物学特性，如复制调控、宿主适应性等，并为新型疫苗研发策略的创新设计提供理论支撑；基于该技术建立的快速病毒拯救体系，可显著提升对动物健康及公共卫生领域新发病毒性疫病的应急响应能力，从而提升生物安全防控体系的科学性与时效性。

参考文献：

- [1] Hulo C, de Castro E, Masson P, et al. ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39 (suppl 1): D576-D582.
- [2] Hermance M E, Thangamani S. Powassan virus: an emerging arbovirus of public health concern in North America [J]. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2017, 17 (7): 453-462.
- [3] McLean D M, Donohue W L. Powassan virus: isolation of virus from a fatal case of encephalitis [J]. *Can Med Assoc J*, 1959, 80 (9): 708-711.
- [4] Tamura T, Torii S, Kajiura K, et al. Secretory glycoprotein NS1 plays a crucial role in the particle formation of flaviviruses [J]. *PLoS Pathog*, 2022, 18 (6): e1010593.
- [5] Setoh Y X, Prow N A, Peng N, et al. *De novo* generation and characterization of new Zika virus isolate using sequence data from a microcephaly case [J]. *mSphere*, 2017, 2 (3): e00190-17.
- [6] Setoh Y X, Prow N A, Rawle D J, et al. Systematic analysis of viral genes responsible for differential virulence between American and Australian West Nile virus strains [J]. *J Gen Virol*, 2015, 96 (Pt 6): 1297-1308.
- [7] Amarilla A A, Sng J D J, Parry R, et al. A versatile reverse genetics platform for SARS-CoV-2 and other positive-strand RNA viruses [J]. *Nat Commun*, 2021, 12: 3431.
- [8] Edmonds J, van Grinsven E, Prow N, et al. A novel bacterium-free method for generation of flavivirus infectious DNA by circular polymerase extension reaction allows accurate recapitulation of viral heterogeneity [J]. *J Virol*, 2013, 87 (4): 2367-2372.
- [9] Tamura T, Igarashi M, Enkhbold B, et al. *In vivo* dynamics of reporter Flaviviridae viruses [J]. *J Virol*, 2019, 93 (22): e01191-e01119.
- [10] Sanchez-Velazquez R, de Lorenzo G, Tandavanitj R, et al. Generation of a reporter yellow fever virus for high throughput antiviral assays [J]. *Antivir Res*, 2020, 183: 104939.
- [11] Tamura T, Zhang J, Madan V, et al. Generation and characterization of genetically and antigenically diverse infectious clones of dengue virus serotypes 1-4 [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2022, 11 (1): 227-239.
- [12] Hobson-Peters J, Harrison J J, Watterson D, et al. A recombinant platform for flavivirus vaccines and diagnostics using chimeras of a new insect-specific virus [J]. *Sci Transl Med*, 2019, 11 (522): eaax7888.
- [13] Setoh Y X, Amarilla A A, Peng N Y G, et al. Determinants of Zika virus host tropism uncovered by deep mutational scanning [J]. *Nat Microbiol*, 2019, 4 (5): 876-887.
- [14] Slonchak A, Hugo L E, Freney M E, et al. Zika virus noncoding RNA suppresses apoptosis and is required for virus transmission by mosquitoes [J]. *Nat Commun*, 2020, 11: 2205.
- [15] 刘强, 牛小霞, 陈吉祥, 等. 冠状病毒的反向遗传学研究进展 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2024, 19 (2): 230-236.
- [16] 李呈军, 陈化兰. 反向遗传学技术在流感病毒研究和防控中的应用 [J]. *中国科学 (生命科学)*, 2015, 45 (10): 1051-1066.

- [17] Aubry F, Nougairède A, Gould E A, et al. Flavivirus reverse genetic systems, construction techniques and applications: a historical perspective [J]. *Antivir Res*, 2015, 114: 67–85.
- [18] Almázón F, González J M, Péñzes Z, et al. Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97 (10): 5516–5521.
- [19] Zhang Y, Song W, Chen S, et al. A bacterial artificial chromosome (BAC) –vectored noninfectious replicon of SARS–CoV–2 [J]. *Antiviral Res*, 2021, 185: 104974.
- [20] Li C, Li Z, Zou Y, et al. Manipulation of the porcine epidemic diarrhea virus genome using targeted RNA recombination [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (8): e69997.
- [21] Quan J, Tian J. Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways [J]. *PLoS One*, 2009, 4 (7): e6441.
- [22] Almázón F, Sola I, Zuñiga S, et al. Coronavirus reverse genetic systems: infectious clones and replicons [J]. *Virus Res*, 2014, 189: 262–270.
- [23] Hou Y J, Okuda K, Edwards C E, et al. SARS–CoV–2 reverse genetics reveals a variable infection gradient in the respiratory tract [J]. *Cell*, 2020, 182 (2): 429–446. e14.
- [24] Thi Nhu Thao T, Labroussaa F, Ebert N, et al. Rapid reconstruction of SARS–CoV–2 using a synthetic genomics platform [J]. *Nature*, 2020, 582 (7813): 561–565.
- [25] Xie X, Muruato A, Lokugamage K G, et al. An infectious cDNA clone of SARS–CoV–2 [J]. *Cell Host Microbe*, 2020, 27 (5): 841–848. e3.
- [26] Dong H L, He M J, Wang Q Y, et al. Rapid generation of recombinant flaviviruses using circular polymerase extension reaction [J]. *Vaccines*, 2023, 11 (7): 1250.
- [27] Dong H L, Wang H J, Liu Z Y, et al. Visualization of yellow fever virus infection in mice using a bioluminescent reporter virus [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2021, 10 (1): 1739–1750.
- [28] Baker C, Xie X, Zou J, et al. Using recombination–dependent lethal mutations to stabilize reporter flaviviruses for rapid serodiagnosis and drug discovery [J]. *EBioMedicine*, 2020, 57: 102838.
- [29] Torii S, Ono C, Suzuki R, et al. Establishment of a reverse genetics system for SARS – CoV – 2 using circular polymerase extension reaction [J]. *Cell Rep*, 2021, 35 (3): 109014.
- [30] Li Y, Wang X, Blau D M, et al. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in children younger than 5 years in 2019: a systematic analysis [J]. *Lancet*, 2022, 399 (10340): 2047–2064.
- [31] Savic M, Penders Y, Shi T, et al. Respiratory syncytial virus disease burden in adults aged 60 years and older in high–income countries: a systematic literature review and meta – analysis [J]. *Influenza Other Respir Viruses*, 2023, 17 (1): e13031.
- [32] Nakashima M, Funabiki K, Izume S, et al. Development of a reverse genetic system for mononegaviruses using a circular polymerase extension reaction [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2025, 754: 151493.
- [33] Luongo C, Winter C C, Collins P L, et al. Increased genetic and phenotypic stability of a promising live – attenuated respiratory syncytial virus vaccine candidate by reverse genetics [J]. *J Virol*, 2012, 86 (19): 10792–10804.
- [34] Conde J N, Himmler G E, Mladinich M C, et al. Establishment of a CPER reverse genetics system for Powassan virus defines attenuating NS1 glycosylation sites and an infectious NS1–GFP11 reporter virus [J]. *MBio*, 2023: e01388–23.
- [35] Tamura T, Yamamoto H, Ogino S, et al. A rapid and versatile reverse genetics approach for generating recombinant positive – strand RNA viruses that use IRES – mediated translation [J]. *J Virol*, 2024, 98 (3): e0163823.
- [36] 董好龙. 以昆虫特异性黄病毒为骨架的寨卡疫苗候选株的构建及评价 [D]. 北京: 军事科学院, 2024.
- [37] 吴志敏, 苏博, 伊淑帅, 等. 细菌人工染色体系统及其在后基因组学中的应用研究进展 [J]. *经济动物学报*, 2023, 27 (1): 68–73.
- [38] Kurhade C, Xie X, Shi P Y. Reverse genetic systems of SARS–CoV–2 for antiviral research [J]. *Antivir Res*, 2023, 210: 105486.
- [39] Wang X, Zhang D, Tang A, et al. Establishment of a reverse genetics system for virulent systemic feline calicivirus using circular polymerase extension reaction [J]. *J Virol Meth*, 2024, 330: 115031.
- [40] Rice C M, Grakoui A, Galler R, et al. Transcription of infectious yellow fever RNA from full–length cDNA templates produced by in vitro ligation [J]. *New Biol*, 1989, 1 (3): 285–296.
- [41] Yount B, Curtis K M, Baric R S. Strategy for systematic assembly of large RNA and DNA genomes: transmissible gastroenteritis virus model [J]. *J Virol*, 2000, 74 (22): 10600–10611.
- [42] van Beurden S J, Berends A J, Krämer–Kühl A, et al. A reverse genetics system for avian coronavirus infectious bronchitis virus based on targeted RNA recombination [J]. *Virol J*, 2017, 14 (1): 109.
- [43] Thao T T N, Labroussaa F, Ebert N, et al. In–yeast assembly of coronavirus infectious cDNA clones using a synthetic genomics pipeline [M] // *Coronaviruses: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer US, 2020: 167–184.
- [44] Wang B, Zhang C, Lei X, et al. Construction of non–infectious SARS–CoV–2 replicons and their application in drug evaluation [J]. *Virol Sin*, 2021, 36 (5): 890–900.
- [45] Jin Y Y, Lin H, Cao L, et al. A convenient and biosafe replicon with accessory genes of SARS–CoV–2 and its potential application in antiviral drug discovery [J]. *Virol Sin*, 2021, 36 (5): 913–923.
- [46] Furusawa Y, Yamayoshi S, Kawaoka Y. The accuracy of reverse genetics systems for SARS–CoV–2: circular polymerase extension reaction versus bacterial artificial chromosome [J]. *Influenza Other Respir Viruses*, 2023, 17 (3): e13109.
- [47] Liu G, Gack M U. An optimized circular polymerase extension reaction–based method for functional analysis of SARS–CoV–2 [J]. *Virol J*, 2023, 20 (1): 63.
- [48] Eggermont J, Proudfoot N J. Poly (A) signals and transcriptional pause sites combine to prevent interference between RNA polymerase II promoters [J]. *EMBO J*, 1993, 12 (6): 2539–2548.
- [49] Chu H, Chan J F, Yuen T T, et al. Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS – CoV – 2 and

- SARS-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: an observational study [J]. *Lancet Microbe*, 2020, 1 (1): e14-e23.
- [50] Osada N, Kohara A, Yamaji T, et al. The genome landscape of the African green monkey kidney-derived vero cell line [J]. *DNA Res*, 2014, 21 (6): 673-683.
- [51] Zhang X, Zhu J, Zhang D, et al. Development of a yeast-based CRISPR genome editing system for feline coronavirus [J]. *Front Microbiol*, 2025, 16: 1627509.
- [52] Masud H M A A, Watanabe T, Yoshida M, et al. Epstein-Barr virus BKRF4 gene product is required for efficient progeny production [J]. *J Virol*, 2017, 91 (23): e00975-17.

· 信息 ·

倡导健康养殖新理念 解读疫病防控新技术

欢迎订阅 2027 年《畜牧与兽医》

ISSN 0529-5130, CN 32-1192/S

《畜牧与兽医》月刊由教育部主管、南京农业大学主办。1935 年创刊，由原中央大学畜牧兽医系编辑出版，著名兽医学家罗清生教授首任主编。始终遵循“为社会服务，为畜牧生产服务”和“理论与实践相结合，普及与提高并举”的办刊宗旨。本刊连续入选《中文核心期刊要目总览》、“中国科技核心期刊”和“中国农林科技核心期刊”，先后荣获华东地区优秀期刊、江苏期刊方阵双效期刊、全国高校优秀期刊、江苏省高校优秀科技期刊、全国畜牧兽医类优秀期刊等。

读者对象：畜牧、兽医科技工作者和大专院校师生等。

主要内容：主要刊登畜牧、兽医两学科各领域的研究报告、文献综述等。主要栏目有遗传繁育、动物营养、环境卫生、基础兽医、预防兽医、临床兽医和专题综述等。

征订办法：本刊为月刊，大 16 开，定价：28.00 元，全年 12 期共 336.00 元。邮发代号：28-42，全国各地邮局均可订阅。邮局漏订者可直接汇款至本刊杂志社补订。

地 址：江苏省南京市江北新区滨江大道 666 号南京农业大学行政楼 A320《畜牧与兽医》编辑部

邮 编：211800

电 话：025-84395701 (编辑部)

E-mail：muyizz@njau.edu.cn