

# 猪瘟病毒 C 株(脾淋毒)全长 cDNA 分子几个突变位点的重组改造

张淼涛<sup>1,2</sup>, 冯霞<sup>1</sup>, 刘湘涛<sup>1\*</sup>, 张彦明<sup>2</sup>, 田宏<sup>2</sup>, 胡建和<sup>3</sup>, 冶贵生<sup>1,2</sup>, 谢庆阁<sup>1</sup>

(1. 中国农业科学院兰州兽医研究所, 兰州 730046; 2. 西北农林科技大学, 杨凌 712100;

3. 河南职业技术学院, 郑州 450046)

**摘要:** 采用 RT-PCR、Nested PCR 和 Half-nested PCR 技术从试验感染兔脾组织的总 RNA 中得到了猪瘟病毒 (CSFV) C 株全长 cDNA 的 3 个待改造片段, 分别克隆于 pMD18-T 载体后进行测序。用重组技术分别从前期构建的 5' 半长 cDNA 或 3' 半长 cDNA 中替换 F1、F3 和 F51, 构建成 2 个新的半长 cDNA, 进一步连接成新的全长 cDNA, 经测序证实全长 cDNA 中 3 个致死性突变位点均得到改正。初步鉴定证明该全长 cDNA 具有感染性。为猪瘟病毒 C 株反向遗传操作系统的建立奠定了基础。

**关键词:** 猪瘟病毒; C 株; 全长 cDNA; 改造

中图分类号: S852.65<sup>+</sup> 1

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)02-0166-06

猪瘟是世界范围内猪的最严重的疾病之一, 被 OIE 列为 A 类传染病。其病原为猪瘟病毒 (Hog Cholera Virus, HCV), 为了与非洲猪瘟区别, 欧洲人将其称为古典猪瘟 (Classical Swine Fever, CSF), 是黄病毒科 (*Flaviviridae*) 瘟病毒属 (*Pestivirus*) 成员, 属有囊膜的 RNA 病毒, 基因组为单股正链 RNA, 含有一个大的开放性阅读框 (Open Reading Frame, ORF), ORF 两侧分别是 5' 非翻译区 (5'-UTR) 和 3'-非翻译区 (3'-UTR)。CSFV 的所有结构蛋白和非结构蛋白均由 ORF 所编码, 翻译成一个含 3 898 个氨基酸的多聚前体蛋白, 这一大型前体蛋白以共翻译和后翻译的形式在细胞蛋白酶和病毒特异的蛋白酶作用下加工成结构蛋白和非结构蛋白<sup>[1]</sup>。

CSFV C 株被认为是最有效和最安全的活疫苗。但近年来, C 株的应用在许多发达国家受到限制, 这主要是由于它暴露出了一些严重的缺点, 如疫苗免疫动物与自然感染动物无法区分<sup>[2]</sup>, 另外, 近年来在不少地区存在野毒株不断远离疫苗株的现象, 导致以 C 株为主的弱毒疫苗免疫效果下降, 甚至免疫次数增加和免疫剂量加大到 600 个兔体热反应也

不能预防其感染, 且有蔓延之势。因此, 改造原有疫苗和研制新型疫苗已成为当务之急。构建具有感染性的 C 株全长 cDNA 克隆, 可以有效地克服 RNA 难以操作的缺点, 为在分子水平上研究猪瘟兔化弱毒疫苗株的复制机理、致弱机理、基因产物的功能、细胞和宿主嗜性等提供可靠的保障, 同时亦为标记疫苗的开发研究奠定基础<sup>[3]</sup>。

本研究室对前期构建的 CSFV C 株全长 cDNA 进行了序列测定, 但测序结果显示, ORF 中存在 3 个致死性突变位点, 即在 nt784 处缺失 1 个碱基 G, 在 nt7214 处缺失 1 个碱基 A, 在 nt4342 处碱基 G 变化为碱基 A, 从而导致 ORF 中密码子 TGG 变化为终止密码子 TAG, 为恢复该全长 cDNA 的结构, 检测其感染性, 进行了以下研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

待改造 CSFV C 株(脾淋毒)全长 cDNA 克隆为中国农业科学院兰州兽医研究所病毒室构建<sup>[4]</sup>。

### 1.2 试剂与引物

TRIZOL Total RNA Isolation Reagent 购自 GIBCOBRL 公司。反转录系统用 Promega 公司的 Improm- II™ Reverse transcriptase。PCR 扩增片段的纯化回收, 采用 TaKaRa 公司的 Agarose Gel DNA Extraction Kit。重组质粒的提取采用 Promega 公司的 Wizard Plus Minipreps DNA Purification System。所用载体 pMD18-T 和 pGEM-5Zf

收稿日期: 2003-10-08

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(G19990119)

作者简介: 张淼涛(1963-), 男, 陕西礼泉县人, 博士生, 副教授, 主要从事病毒分子生物学和动物生理学研究。

\* 通讯作者: 刘湘涛, Tel: 0931-8342710; E-mail: hnxiaogtao@hotmail.com

(+), *Taq* 酶 (*rTaq*), 分别购自 TaKaRa 公司和 Promega 公司。快速连接试剂盒 DNA Ligation Kit Ver. 2 购自 TaKaRa 公司。限制性内切酶 *Not* I、*Pvu* I、*Acc* III、*Sna*BI、*Nhe* I、*Xba* I 和 *Sal* I 购自 Promega 公司; *Spl* I 购自 MBI 公司; DNA marker DL15 000 购自 TaKaRa 公司。体外转录试剂盒 MEGAscript™ High Yield Transcription Kit 购自 Ambion 公司。脂质体转染试剂 DMRIE-C Reagent、RNA Marker 0.24~9.5 kb RNA ladder、转染用无血清培养基 Opti-MEM 1 Reduced 等购自 Invitrogen 公司。RNA 纯化试剂盒 RNeasy mini kit 购自 QIAGEN 公司。细胞培养基采用 Hyclone 公司的 MEM。猪瘟荧光素标记抗体采用 FITC 标记抗体工作液(购自中国兽药监察所)。猪瘟病毒抗原检测采用 IDEXX 公司的 Classical Swine Fever Virus Antigen Test Kit。PCR 扩增引物由宝生物工程大连有限公司合成。

### 1.3 RT-PCR 及 3 个待替换 cDNA 片段的亚克隆

对 3 个待替换片段(见图 1)进行了套式或半套

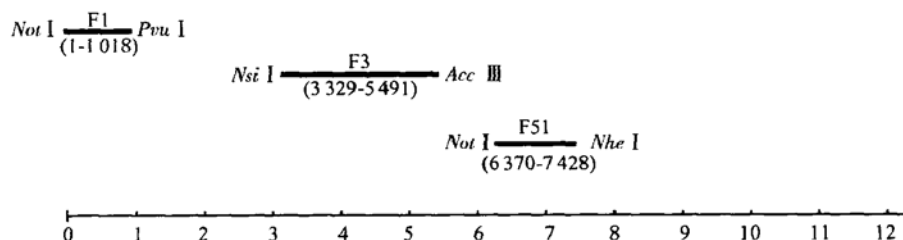


图 1 PCR 扩增得到的 3 个待替换片段

Fig. 1 PCR amplified 3 substituting fragments

### 1.4 全长 cDNA 的改造

1.4.1 5' 半长 cDNA 中 F1 片段的替换改造 提取重新构建的重组质粒 pMD-18T/F1, 做 *Not*I、*Sal*I 双酶切, 电泳, 纯化回收 1 007 bp 的 F1 片段, 再做 *Pvu*I 单酶切, 纯化回收 996 bp 的 F1 双酶切片段。对前期构建的 5' 半长 cDNA 重组质粒 pGEM-5zf(+)/F1~4 做 *Not* I、*Sal* I 双酶切, 获 2 条带, 2 957 bp 的 pGEM-5zf(+ ) 空载体和约 6 520 bp 的 F1~F4 片段, 分别进行纯化回收。对纯化回收的 F1~F4 双酶切片段进一步做 *Pvu*I 单酶切, 纯化回收 5 471 bp F2~F4 双酶切片段。用 Ligation Kit Ver. 2 对纯化回收的 pGEM-5zf(+ ) 空载体、F1 双酶切片段、F2~F4 双酶切片段进行重新连接, 获得替换 F1 的 5' 半长 cDNA, 表示为 5' half(NF1)。

式 PCR 扩增。F1 一扩的上游引物为 5' CGACTCACTATAGTATACGAGGTTAGTTCATTCTC 3', 套扩的上游引物为 5' ATGCGGCCGCTAATACGACTCACTATAGTATACGAGG3', 2 次扩增下游引物均为 5' TTTACTCCTTCCACCAGGATCG3'。F3 扩增上游引物为 5' TCAAGGTGCATGCATCAGATG3', 下游引物为 5' ACATAACACCTAGCTCCTTCC3'。F51 扩增上游引物为 5' GGCAGTGGAGACAGCAAAGAAATTG3', 下游引物为 5' GCATAATTGGTCATGGCTTCCACAC3'。所得片段分别亚克隆入 pMD18-T 载体, 转化感受态细菌 JM109, 得到 pMD18-T/F1、pMD18-T/F3 和 pMD18-T/F51 3 个重组菌。F1 从基因组 1~1 018 bp, F3 从基因组 3 229~5 491 bp, F51 从基因组 6 370~7 428 bp。提取重组质粒, 进行单酶切、双酶切和 PCR 鉴定后, 送由宝生物工程(大连)有限公司, 采用 ABI PRISM™ 377XL DNA Sequencer 进行测序。

1.4.2 5' half(NF1) 中 F3 片段的替换改造 对 5' half(NF1) 分别用 *Sna*BI、*Acc* III 做 2 次单酶切, 得到 2 条带, 1 932 bp 的 F3 双酶切片段和 7 545 bp 除去 F3 的 5' half(NF1), 表示为 5' half(NF1)-F3, 弃去 F3 双酶切片段, 纯化回收 5' half(NF1)-F3。提取 pMD-18T/F3 重组质粒, 分别用 *Sna*BI、*Acc* III 做 2 次单酶切, 得到 2 条带, 1 932 bp 的 F3 双酶切片段, 纯化回收, 另一条带为 3 008 bp 的 pMD18-T 空载体, 弃去。用 Ligation Kit Ver. 2 对纯化回收的 5' half(NF1)-F3 和 F3 双酶切片段进行重新连接, 获得新的 5' 半长 cDNA, 表示为 pGEM-5zf/N5'。

1.4.3 3' 半长 cDNA 中 F51 片段的替换改造 用重新构建的 F51 重组菌提取 F51 重组质粒, *Spl* I 和 *Nhe* I 做双酶切, 纯化回收 899 bp F51 片段。同

样,用 *Spl*I 和 *Nhe*I 对前期构建的 3' 半长 cDNA 做双酶切,纯化回收 7 931 bp 除去 F51 的 3' 半长 cDNA 重组质粒,表示为 3' half-F51,将纯化回收的 F51 双酶切片段和 3' half-F51 重新连接,获得新的 3' 半长 cDNA,表示为 pGEM-5zf/N3'。

1.4.4 全长 cDNA 的重新连接 对重组质粒 N5' 做 *Not*I *Spl*I 双酶切,纯化回收 6 471 bp 的 F1~F4 双酶切片段,对重组质粒 N3' 做 *Spl*I *Sal*I 双

酶切,纯化回收 5 830 bp 的 F5~F7 双酶切片段,将以上 2 个纯化片段和 1.4.1 中获得的 pGEM-5Zf (+) 空载体进行连接,获得新的全长 cDNA,表示为 NFL (技术路线参见图 2~4)。转化感受态 JM109 菌,涂板,筛选阳性菌落,提取重组质粒,做酶切鉴定,并将改造后的全长 cDNA 送宝生物工程(大连)有限公司做全长测序。

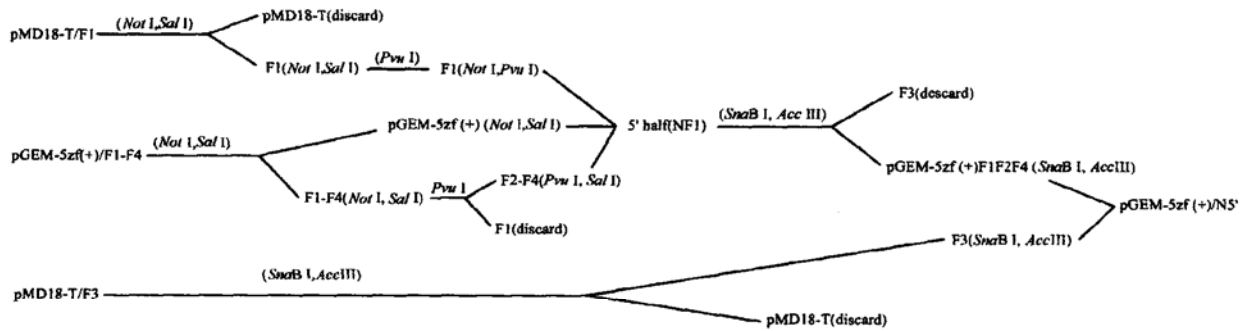


图 2 5' 半长 cDNA 改造流程图  
Fig. 2 Flow chart of 5' half cDNA reconstruction



图 3 3' 半长 cDNA 改造流程图  
Fig. 3 Flow chart of 3' half cDNA reconstruction

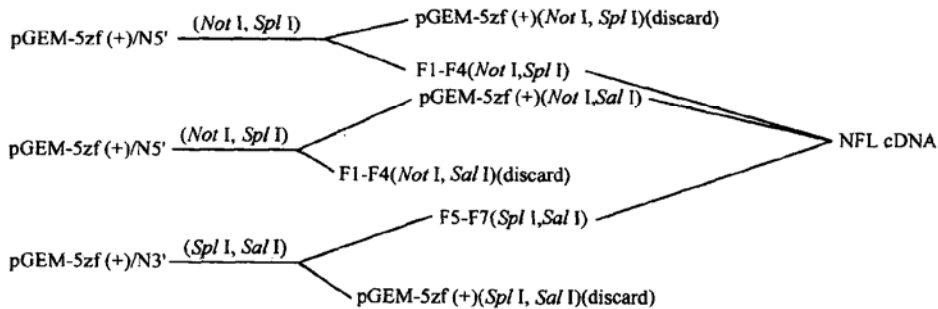


图 4 全长连接流程图  
Fig. 4 Flow chart of full length cDNA ligation

## 1.5 感染性的初步鉴定

1.5.1 模板 DNA 的线性化 参考 Ruggli<sup>[5]</sup>的方法,用 *Not* I 和 *Sal* I 对改造得到的全长重组质粒进行双酶切,蛋白酶 K 处理后,纯化回收 12 340 bp (含有 T7 和酶切序列)的线性化全长 cDNA。

1.5.2 体外转录及纯化处理 按照转录试剂盒操作说明对纯化的线性化模板进行转录,用 RNA 纯化试剂盒对转录产物做纯化处理。

1.5.3 转录产物的电泳鉴定 清洗电泳槽和梳子等,用无水乙醇擦洗干净,最后用 DEPC 处理的水冲洗干净。称取 0.75g 琼脂糖溶解于 50mL MOPS buffer 中,制备胶板。取 2  $\mu$ L RNA 加到 20  $\mu$ L RNA Sample buffer 中,然后再加 5  $\mu$ L RNA Loading buffer,混匀后在 65~70  $^{\circ}$ C 变性 10 min 后上样,电泳检测,观察电泳情况,并照相。

1.5.4 转染 SK6 细胞 待细胞在培养瓶的丰度达到约 80% 时,按照脂质体转染试剂 DMR1E-C Reagent 的操作说明进行转染。转染后对转染的细胞继续培养,准备鉴定。

1.5.5 病毒抗原和核酸序列的鉴定 (1)病毒抗原的夹心 ELISA 检测,设转染组和未转染 SK6 对照组(阴性对照)和接毒对照组(阳性对照),取保存的第 4 代细胞,按照试剂盒操作说明做 ELISA,终止反应后,用 450nm 波长测量待检细胞和对照组的 OD 值,计算每个样品的 OD 校正值。(2)病毒 RNA 的 RT-PCR 检测,提取和纯化各组第 2 代细胞 RNA,纯化产物做模板进行反转录,反转录引物为 5' TCACACTTAAGCCCTGTATCGACAACCAC 3',以反转录产物为模板进行 PCR 扩增,上游引物为 5' GTCATGAGTGCTTGATCGGTAACACG 3',下游引

物与反转录引物相同,扩增区段位于猪瘟病毒 C 株基因组的 3 199~6 534 位,长度 3 364 bp。对扩增产物进行电泳检测。

## 2 结果

### 2.1 cDNA 合成及 PCR

分别用 3 个待替换片段的一扩下游引物作为反转录引物,获得各片段 cDNA 的第一链,用一扩引物 PCR 扩增后,再利用套式引物或半套式引物,分别进行套式或半套式 PCR。成功地扩增出了 3 个待替换片段。

### 2.2 PCR 产物的克隆及序列测定

F1 的连接产物转化感受态 JM109 后,对菌落进行了阳性筛选和鉴定,结果见图 5。选取菌落 2 送由宝生物工程(大连)有限公司进行测序,结果显示缺失的碱基得到恢复,未出现新的突变。

F3 的连接产物转化感受态 JM109 后,进行了阳性筛选和鉴定,结果见图 6。经宝生物工程(大连)有限公司进行测序验证终止密码子得到改造,未出现新的突变。

F51 的连接产物转化感受态 JM109 后,进行了阳性筛选和鉴定,结果见图 7。经宝生物工程(大连)有限公司进行测序验证缺失的碱基恢复,未出现新的突变。

### 2.3 全长 cDNA 的改造及鉴定

2.3.1 5' 半长 cDNA 和 3' 半长 cDNA 的改造 经过一系列酶切和连接反应,成功地将重新构建的 3 个片段分别替换到 5' 半长 cDNA 和 3' 半长 cDNA 中。对重新构建的 5' 半长 cDNA 和 3' 半长 cDNA 进行了 *Not* I, *Sal* I 双酶切鉴定,结果见图 8。

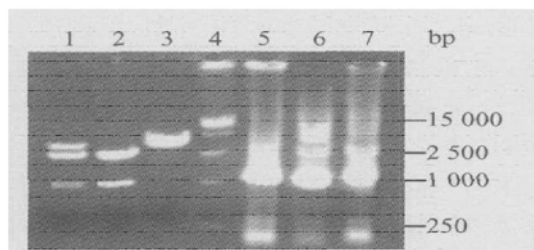


图 5 F1 重组质粒的鉴定

Fig. 5 Identificaton of F1 recombination plasmid  
1. *Not*I and *Sal*I digestion of clone 1; 2. *Not*I and *Sal*I digestion of clone 2; 3. *Not*I and *Sal*I digestion of clone 3; 4. Marker; 5. PCR of clone 1; 6. PCR of clone 2; 7. PCR of clone 3

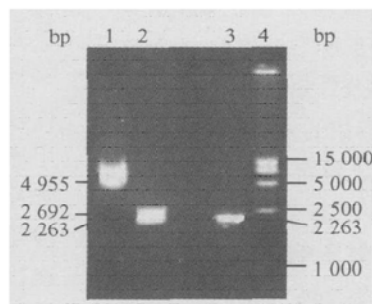


图 6 F3 重组质粒鉴定

Fig. 6 Identificaton of F3 recombination plasmid  
1. pMD18-T/F3 control; 2. *Xba*I and *Sal*I digestion; 3. F3 PCR; 4. Marker

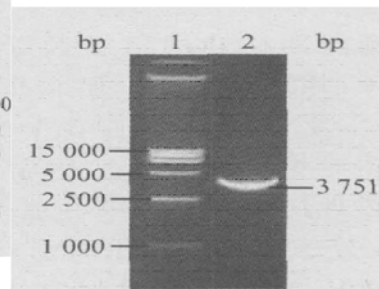


图 7 F51 重组质粒的鉴定

Fig. 7 Identificaton of F51 recombination plasmid

1. Marker; 2. *Not*I digestion

2.3.2 全长 cDNA 的重新连接和鉴定 对重新构建的两个半长重组质粒进行特定的双酶切和连接后成功地构建出改造后的全长 cDNA,对重新构建的全长 cDNA 进行了 *Sal* I 单酶切鉴定,结果见图 9。将 NFLcDNA 送宝生物工程(大连)有限公司进行全长测序,将本次测序结果与原测序结果进行了对比,结果表明 3 个致死性突变位点均得到改造。

## 2.4 感染性的初步鉴定

2.4.1 病毒抗原的夹心 ELISA 检测结果 对各组第 4 代细胞的检测结果见表 1。根据试剂盒说明,标准阳性对照的 OD 值要求大于 0.500,标准阴性对照的 OD 值不能大于标准阳性对照 OD 值的 20%,可见试验结果符合要求。阳性判定的标准是

OD 校正值应大于 0.300,可见,转染组和接毒对照组细胞呈现阳性,而 SK6 对照组为阴性。

表 1 3 组细胞 ELISA 检测结果

	标准阳性对照	标准阴性对照	转染组	SK6 对照组	接毒对照组
OD 值	1.360	0.075	0.852	0.066	0.871
OD 校正值	1.285	0.000	0.777	-0.009	0.796

2.4.2 病毒 RNA 的 RT-PCR 检测结果 对各组 RT-PCR 检测,电泳结果见图 10。转染组和接毒对照组出现特异性扩增产物,而 SK6 对照组未出现相应产物。

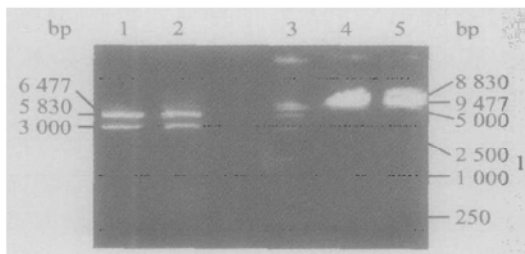


图 8 5' 半长 cDNA 和 3' 半长 cDNA 的鉴定

Fig. 8 Identificaton of 5' half cDNA and 3' half cDNA

1. *Not* I and *Sal* I digestion of 3' half cDNA; 2. *Not* I and *Sal* I digestion of 5' half cDNA; 3. Marker; 4. Control of 3' half cDNA plasmid; 5. Control of 5' half cDNA plasmid

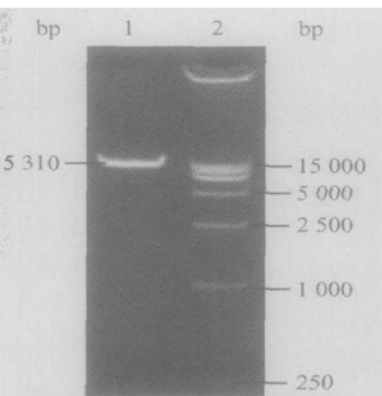


图 9 改造后全长 cDNA 重组质粒的鉴定

Fig. 9 Identificaton of reconstructed full length cDNA

1. *Sal* I digestion of full length cDNA plasmid; 2. Marker

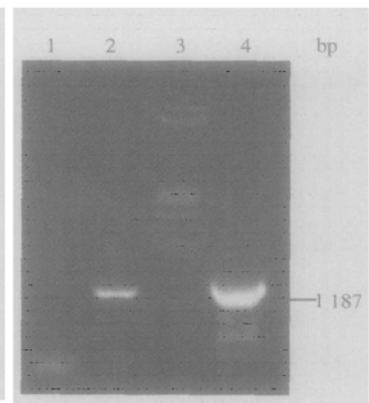


图 10 3 组细胞 RT-PCR 检测结果

Fig. 10 The RT-PCR result of three groups

1. SK6 control; 2. Transfected group; 3. Marker; 4. Inoculated control

## 3 讨论

猪瘟病毒全长 cDNA 分子结构是否正确,是其转录本感染性有无的重要影响因素<sup>[5]</sup>。经过对本研究室前期构建的猪瘟病毒全长 cDNA 分子结构的测序,并将其与几个已报道有感染性的序列对比分析<sup>[6]</sup>,发现其 ORF 中 3 个不同位置存在由于碱基缺失和突变产生的终止密码子,这些突变位点的存在,势必对其复制及感染性造成致命影响。在全长 cDNA 分子构建过程中所引入的这些错误很可能存在于逆转录和 PCR 过程中,解决的办法一方面在于改进酶制剂和优化扩增方法,另一方面在于使用各亚克隆片段前先要测序,从而减少连接构建的盲目性。我们在前期的研究中使用的各个亚克隆片段直接来源于逆转录和 PCR 产物,由于逆转录和 PCR 过程

中的随机出错,导致最终的全长 cDNA 分子出现严重缺陷。本研究从测序的重组质粒中酶切获得所需要的连接片段,减少了全长构建的盲目性。应用高保真长片段 RT-PCR 技术,可以减少全长 cDNA 分子构建过程的环节,但对酶制剂的要求较高,扩增条件较难掌握,且难以进行定点突变。因此,我们仍沿用原 cDNA 分子构建的基本方法。在用多个亚克隆片段及 pGEM-5Zf(+ ) 的双酶切片段一次性连接构建 5' 半长和 3' 半长时曾多次失败,其原因是由于连接的片段太多,成功连接的概率太小。后来采用单个片段或最多 2 个片段进行连接时获得成功。因此,对于分子较大的 RNA 病毒,在 PCR 引物的设计、连接片段的长度和位置、酶切位点的选择等 cDNA 分子构建方案中,应充分考虑每次连接的片段不能过多。

经过改造,重新构建的 CSFV 全长 cDNA 分子,全长 12 310 bp,ORF 长度为 11 694 bp,其中无碱基的缺失、增加及终止密码子等严重影响读码框编码的突变,给感染性的鉴定提供了基础。

体外转录对模板 DNA 含量和纯度的要求较高,本研究在提取全长重组质粒、双酶切线性化和相应的纯化回收过程中,通过加大提取量、蛋白酶 K 处理和减少回收体积等方法得到解决。另外,本研究在模板线性化过程中除在全序列的 3' 末端采用 *SaI*I 酶切外,在 5' 末端还采用 *Not*I 进行酶切处理,在全长克隆过程中已在 5' 末端加上了 T7 启动子的核心序列,如果载体上的 T7 不被除去,体外转录产物 RNA 的 5' 末端可能外加一段载体序列,从而影响 mRNA 的空间结构和转录,影响病毒的复制和感染性。

影响脂质体转染效率的因素主要有转录产物 RNA 的纯度和全长转录体 RNA 在转录产物总 RNA 中的比例,根据报道<sup>[3]</sup>,全长转录体的含量达到总 RNA 的 25% 即可达到良好的转染效率。本研究通过 RNA 纯化试剂盒对转录产物进行纯化处理,并通过 RNA 在 MOPs 电泳液中的电泳初步判定了全长转录体达到要求,保证了转染的进行。

在夹心 ELISA 检测中发现,尽管转染组和接毒组均可判定阳性,但其 OD 值明显低于试剂盒提供的标准阳性对照的 OD 值,可能也与检测对象为 C 株弱毒有关,这一点与荷兰学者 Moormann 对 C 株细胞生长特性的研究报道符合<sup>[3]</sup>。在 RT-PCR 检测病毒特异序列中,选用从 nt3199 到 nt6534 这段,

位于病毒基因组的中部,具有一定的代表性。通过以上的鉴定,初步判定经过重组改造的全长 cDNA 具有感染性。

#### 参考文献:

- [1] Meyers G, Saalmuller A, Buttner M. Mutations abrogating the Rnase activity in glycoprotein E<sup>ms</sup> of the pestivirus classical swine fever virus lead to virus attenuation[J]. *Journal of Virology*, 1999, 73(5): 10224 ~ 10235.
- [2] 王 镇,丁明孝. 猪瘟病毒致病机制及防治的研究进展[J]. *畜牧兽医学报*, 1998, 29(5): 449~ 454.
- [3] Moormann R J M, Van Gennip H G P, Miedema G K W. Infectious RNA transcribed from an engineered full-length cDNA template of the genome of a pestivirus[J]. *Journal of Virology*, 1996, 70(2): 763~ 770.
- [4] 胡建和,刘湘涛,张彦明. 中国猪瘟 C-株(脾淋毒)全长 cDNA 的分子克隆[J]. *畜牧兽医学报*, 2003, 34(5): 490~ 493.
- [5] Ruggli N, Tratschin J D, Mittelholzer C. Nucleotide sequence of classical swine fever virus strain Alfort/187 and transcription of infectious RNA from stably cloned full-length cDNA [J]. *Journal of Virology*, 1996, 70(6): 3478~ 3487.
- [6] Moser C, Bosshart A, Tratschin J D. A recombinant classical swine fever virus with a marker insertion in the internal ribosome entry site[J]. *Virus Genes*, 2001, 23(1): 63~ 68.

### Recombinant Reconstruction of Full-length cDNA of Chinese CSFV C-strain (Derived from Spleen)

ZHANG Miao-tao<sup>1,2</sup>, FENG Xia<sup>1</sup>, LIU Xiang-tao<sup>1\*</sup>, ZHANG Yan-ming<sup>2</sup>, TIAN Hong<sup>2</sup>,  
HU Jian-he<sup>3</sup>, YE Gu-sheng<sup>1,2</sup>, XIE Qing-ge<sup>1</sup>

(1. Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, China;

2. Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China;

3. Henan Vocational-Technical Teachers' College, Zhengzhou 450046, China)

**Abstract:** Using RT-PCR, Nested PCR and Half-nested PCR, 3 substitutes of cDNA fragments were amplified from total RNA extracted from spleens of experimentally infected rabbits. After cloned in pMD18-T vector, they were analyzed by sequencing. F1, F3 and F51 fragments in 5' half cDNA or 3' half cDNA were substituted by genetic engineering recombination. The reconstructed 5' half cDNA and 3' half cDNA were then ligated to a new full length cDNA. The mutation sites were confirmed to be corrected by the method of sequencing. The reconstructed cDNA show infectivity by primary identifications. The study established a foundation for reverse genetic system of CSFV.

**Key words:** classical swine fever virus; C-strain; full-length cDNA; reconstruction

\* Corresponding author