

小反刍兽疫病毒分离株 China/Tib/07 辅助质粒及微型基因组的构建和鉴定

刘文华^{1,2,3}, 王志亮², 包静月², 吴晓东², 刘华雷², 赵永刚², 刘秀梵¹

(1. 扬州大学 兽医学院, 扬州 225009; 2. 中国动物卫生与流行病学中心 国家外来动物疫病诊断中心, 青岛 266032; 3. 青岛农业大学 动物科技学院, 青岛 266109)

摘要: 本研究旨在构建小反刍兽疫病毒(PPRV)的辅助质粒和微型基因组并验证其功能, 为建立 PPRV 反向遗传操作平台奠定基础。首先构建表达 PPRV 分离株 China/Tib/07 的 N、P 和 L 蛋白的辅助质粒 pCI-N、pCI-P 和 pCI-L。通过间接免疫荧光试验验证 3 个辅助质粒转染细胞后的蛋白表达情况, 并从 mRNA 水平上验证蛋白表达的正确性; 扩增 PPRV 基因组两末端序列和 eGFP 报告基因, 三者通过 overlap-PCR 连接并克隆至转录载体 pOL-TV5 中构建微型基因组。将构建的微型基因组分别与辅助病毒和 3 个辅助质粒进行共转染。经鉴定各辅助质粒完全正确, 构建的微型基因组不论与辅助病毒还是与 3 个辅助质粒共转染, 报告基因均表达。本试验成功构建了 PPRV 分离株的表达 N、P 和 L 蛋白的 3 个辅助质粒以及微型基因组, 并用微型基因组验证了 3 个辅助质粒可以作为 PPRV 反向遗传操作的辅助质粒, 为该病毒感染性克隆的构建奠定了基础。

关键词: 小反刍兽疫病毒; 微型基因组; eGFP; N 蛋白; P 蛋白; L 蛋白

中图分类号: S852.659.5

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)10-1497-06

Construction and Identification of Support Plasmids and Minigenome of a Peste des Petits Ruminants Virus Isolate, China/Tib/07

LIU Wen-hua^{1,2,3}, WANG Zhi-liang^{2*}, BAO Jing-yue²,

WU Xiao-dong², LIU Hua-lei², ZHAO Yong-gang², LIU Xiu-fan¹

(1. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. National Diagnostic Center for Exotic Animal Diseases, China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao 266032, China; 3. Animal Science and Veterinary Medicine College, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: The research was conducted to construct and identify the support plasmids and minigenome of Peste des petits ruminants virus (PPRV) in order to lay a foundation for the establishment of a reverse genetic system for rescue of PPRV. Support plasmids of pCI-N, pCI-P and pCI-L according to the PPRV isolate, China/Tib/07, were constructed and functions were identified by IFA and RT-PCR after transfection. At the same time, the two end sequences of the genome of the PPRV isolate, along with the reporter gene of eGFP were amplified, then the 3 fragments were connected by overlap-PCR and cloned into the transcription vector, pOLTV5, the minigenome was constructed and then co-transfected with the support virus and the 3 support plasmids respectively. As a result, the 3 support plasmids were identified to be correct and the reporter gene of eGFP expressed when the minigenome transfected with either the support virus or the 3 support plasmids. In conclusion, support plasmids of the N, P and L genes and minigenome of the PPRV were constructed successfully. Furthermore, the 3 plasmids worked well with the

收稿日期: 2011-06-22

基金项目: 农业部 948 项目(2006-G57(4)B)

作者简介: 刘文华(1970-), 女, 山东人, 副教授, 博士, 主要从事兽医微生物学与免疫学的教学和科研工作, E-mail: wenhualiu2668@126.com

* 通讯作者: 王志亮, Tel: 86-532-87839188; Fax: 86-532-87839922; E-mail: zlwang111@yahoo.com.cn

minigenome, which indicated that the 3 plasmids can work as the support plasmids for the study of reverse genetic operations of China/Tib/07.

Key words: Peste des petits ruminants virus; minigenome; *eGFP*; N protein; P protein; L protein

小反刍兽疫(Peste des petits ruminants, PPR)是由小反刍兽疫病毒(Peste des petits ruminants virus, PPRV)引起的一种急性、热性、接触性传染病,临床以眼鼻出现浆性分泌物、溃疡、坏死性口炎、肺炎及腹泻为特征。PPR主要感染山羊、绵羊等小反刍动物。该病传播速度快,发病率和死亡率在不同地域和种群中有所不同^[1-2]。自20世纪中叶在非洲西部发现以来,该病一直在中东^[3]、撒哈拉以南的非洲地区^[4]流行,并不断向东蔓延。2007年7月,我国首次报道西藏阿里地区的日土县暴发PPR疫情^[5]。由于与我国西南边境毗邻的印度^[6]、巴基斯坦^[7]、哈萨克斯坦^[8]等周边国家时有暴发,因此,我国的PPR防控工作形势依然严峻,开展针对该病的研究具有十分重要的意义。

PPRV属于副黏病毒科麻疹病毒属成员,基因组为不分节段的单股负链RNA,基因组全长为15 948 bp,是麻疹病毒属中序列最长的病毒。目前,麻疹病毒属中的牛瘟病毒^[9]、犬瘟热病毒^[10]和麻疹病毒^[11]已成功构建了感染性克隆,而国内外尚未见PPRV感染性克隆构建成功的报道。由于PPRV基因组较长,所以在构建感染性克隆之前,先用报告基因*eGFP*代替病毒编码区,保留与病毒转录复制和调控相关的前导序列(Leader序列)和尾随序列(Trailer序列)构建微型基因组来初步反映所构建的辅助质粒是否具有功能。负链RNA病毒基因组没有感染性,它必须先被N蛋白衣壳化,再与P蛋白和L蛋白合成的病毒自身RNA聚合酶结合形成核糖核蛋白复合物(RNP)才能作为转录和复制的功能性模板,从而在细胞内进行有效复制。所以能否形成RNP结构是负链RNA病毒复制增殖的关键。因此,进行PPRV的反向遗传研究,必须先构建能产生N、P和L蛋白的真核表达质粒。

1 材料与方法

1.1 毒株、血清及细胞

PPRV分离株China/Tib/07、PPRV阳性血清和阴性血清、BHK-21细胞、COS-1细胞由中国动物卫生与流行病学中心提供;痘苗病毒MVA由扬州大学动物医学院传染病室提供;转录载体pOLTV5为荷兰Animal Science and Health研究所的Peeters教授惠赠。

1.2 主要试剂

转染试剂为Roche公司产品;pGEM-T Vector、pCI-neo真核表达载体为Promega公司产品;peGFP-N1质粒为Clontech公司产品;内切酶及T4 DNA连接酶为NEB公司产品;兔抗羊IgG-FITC购自Solarbio公司;其它试剂为TaKaRa公司产品。

1.3 病毒RNA的提取及辅助质粒的构建

取China/Tib/07的Vero细胞培养病毒液按RNA提取试剂盒说明书步骤提取病毒总RNA,最后获得的RNA用RNase-free水溶解,-70℃冻存。

根据China/Tib/07的全基因组序列设计引物,分别扩增N、P和L基因,因L基因长达6.5 kb,为保证扩增产物的正确性,将其分为L1和L2两段进行扩增。并在上、下游引物5'端分别引入相应的酶切位点以便于连接(表1)。应用一步法RT-PCR试剂盒扩增N、P、L1和L2片段。RT-PCR产物纯化后克隆于pGEM-T Vector中,将鉴定正确的克隆进行相应的双酶切,然后亚克隆至经相同双酶切的pCI-neo真核表达载体中。重组质粒鉴定正确者进行测序验证。测序正确的质粒分别命名为pCI-N、pCI-P和pCI-L。

1.4 pCI-N、pCI-P和pCI-L的表达及鉴定

将生长状态良好的COS-1细胞铺于24孔板中,待细胞密度达到80%时进行转染。首先用无血清无抗生素的DMEM培养液洗涤细胞3次,然后按转染试剂说明书要求将pCI-N、pCI-P和pCI-L质粒各0.5 μg分别与0.75 μL的转染试剂混合物转染细胞,37℃作用6~8 h后,换含10%小牛血清的DMEM培养基,阴性对照孔只转染pCI-neo空载体。48 h后进行间接免疫荧光试验。首先用丙酮-乙醇(体积比为3:2)固定细胞10 min,加入抗PPRV阳性山羊血清,37℃孵育1 h,PBS洗涤后加入兔抗山羊IgG-FITC,37℃孵育1 h,PBS洗涤后在荧光显微镜下观察蛋白表达情况。为排除非特异性荧光对结果造成的干扰,将转染48 h的平行转染孔中的细胞刮下,利用RNA提取试剂盒分别提取总RNA并用RNase-free DNase I处理以排除残留质粒的影响,将处理后的RNA分别利用N、P和L蛋白的特异性引物进行RT-PCR扩增,从而在mRNA水平上验证N、P和L蛋白的表达。

表 1 扩增 China/Tib/07 的 *N*、*P* 和 *L* 基因的引物Table 1 Primers for amplification of *N*, *P* and *L* gene from China/Tib/07

引物 Primers	序列 (5'→3') Sequence	内切酶 Endonuclease	长度/bp Size
<i>N</i>	Nfwd CG GAATTCATGGCGACTCTCCTTAAAAG	<i>EcoR</i> I	1 578
	Nrev ATA <u>GTCGACT</u> TAGCCGA1GGAGATCCTTGTC	<i>Sal</i> I	
<i>P</i>	Pfwd TCG <u>ACGCGT</u> ATGGCAGAAGAACAAGCATAC	<i>MLu</i> I	1 530
	Prev TAAA <u>GCGGCCG</u> CTTACGGGTGCTTGCGGAGAAT	<i>Not</i> I	
<i>L1</i>	Lfwd <u>ACGCGTCC</u> ATGGACTCCCTATCAGTCAATCAGGTCTTGTA	<i>MLu</i> I	3 345
	Lmid-r ATCGGAATTGTTTCATAATCATAATTGG	/	
<i>L2</i>	Lmid-f ACCAAAGGTCTGATTAGAACAAGTATGAAAC	/	3 331
	Lrev <u>GCGGCCG</u> CAGATGTATAGCTAACTAGCCTCTGATGAGT	<i>Not</i> I	

引物中的酶切位点以下划线表示

Restriction sites are underlined in primers

1.5 微型基因组的构建

利用 Primer Premier 5.0 设计引物(表 2),应用一步法 RT-PCR 试剂盒扩增 Leader 和 Trailer 序列;以质粒 peGFP-N1 为模板扩增 eGFP 序列。将胶回收纯化的 Leader、eGFP 和 Trailer 3 个片段通过 overlap-PCR 顺次相连,PCR 产物纯化后克隆于 pGEM-T Vector 中。取 PCR 鉴定正确的质粒为模

板,以 5'磷酸化修饰的 LP1 和 TP2 为引物,使用扩增产物为平滑末端的高保真酶进行 PCR 扩增并纯化,转录载体 pOLTV5 进行 *Sma* I 和 *Stu* I 双酶切后去磷酸化,然后与上述纯化 PCR 产物连接转化。重组质粒进行 PCR 鉴定,将鉴定阳性的质粒进行测序验证。测序结果完全正确并反向插入 pOLTV5 的质粒即为构建的微型基因组,命名为 pLGT。

表 2 构建微型基因组的引物

Table 2 Primers for construction of the minigenome

引物 Primers	序列 (5'→3') Sequence	片段长度/bp Size
Leader	LP1 ACCAAACAAAGTTGGGTAAGG (5'磷酸化)	107
	LP2 tcaccatagtc aaagaTCTTGCTCCTC	
Trailer	TP1 caagtaattagctatacATCTGCCCCCT	109
	TP2 ACCAGACAAAGCTGGGAATAGATAC (5'磷酸化)	
eGFP	eGFP1 tctctgattatgtgaGCAAGGGCGAGGAG	720
	eGFP2 gtatagctaattacttgTACAGCTCGTCCATG	

引物中的重叠部分以小写字母表示

Overlap sequences are expressed in lowercase letters in primers

1.6 pLGT 及 pCI-N、pCI-P 和 pCI-L 的功能鉴定

将生长状态良好的 BHK-21 细胞铺于 24 孔板中,待细胞密度达到 80% 时进行转染。细胞洗涤后每孔感染 1 MOI 的痘苗病毒 MVA 于 37 °C 感作 1.5 h。弃上清,按转染试剂说明书要求于微型基因组鉴定孔中加入 pLGT 质粒 0.5 μg 和 0.75 μL 的转染试剂混合物,37 °C 作用 6 h,再加入 1 MOI 的 PPRV 疫苗毒 Nigeria 75/1 于 37 °C 感作 1 h,然后换含 10% 小牛血清的 DMEM 培养,阴性对照孔不感染 PPRV。辅助质粒鉴定孔转染时 pLGT 质粒与 pCI-N、pCI-P 和 pCI-L 质粒的比例为 2 : 2 : 1 : 1,

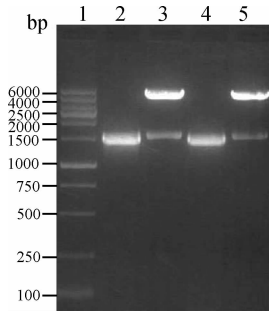
转染后 37 °C 作用 6~8 h 后,换含 10% 小牛血清的 DMEM 继续培养,阴性对照孔中不含辅助质粒 pCI-L。37 °C 培养 48 h 后荧光显微镜下观察 eGFP 的表达情况。按 1.4 的方法处理平行转染孔细胞。将处理后的 RNA 利用 eGFP1 和 eGFP2 引物进行 RT-PCR 扩增,在 mRNA 水平上验证 eGFP 的转录。

2 结果

2.1 辅助质粒 pCI-N、pCI-P 和 pCI-L 的构建

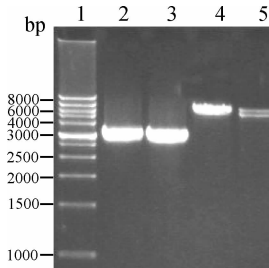
PCR 扩增得到与预期大小相符的 *N*、*P*、*L1* 和 *L2* 片段。*L1* 和 *L2* 扩增片段通过 *Xho* I 和引物上的 *Not* I 切点进行酶切后连接为完整的 *L* 片段。从

测序质粒中获得了氨基酸序列完全正确的重组质粒 pCI-N、pCI-P 和 pCI-L。各片段的扩增和重组质粒的鉴定结果见图 1 和图 2。



1. DNA Marker; 2. PCR product of *N* gene; 3. Identification of the recombinant plasmid pCI-N by *EcoR* I and *Sal* I; 4. PCR product of *P* gene; 5. Identification of the recombinant plasmids pCI-P by *Mlu* I and *Not* I

图 1 *N* 基因和 *P* 基因的扩增和重组质粒的鉴定结果
Fig. 1 Amplification of *N* gene and *P* gene and identification of the recombinant plasmids



1. DNA Marker; 2. PCR product of *L1* fragment; 3. PCR product of *L2* fragment; 4. PCR product of *L* gene; 5. Identification of the recombinant plasmid pCI-L by *Mlu* I and *Not* I

图 2 *L1* 和 *L2* 片段的扩增及 *L* 基因重组质粒的鉴定结果
Fig. 2 Amplification of *L1* and *L2* and identification of the recombinant plasmid pCI-L

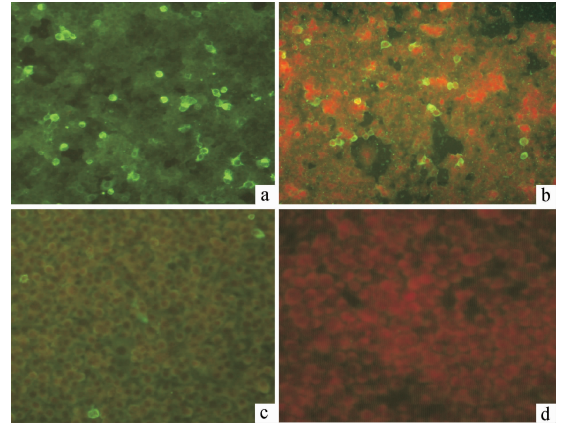
2.2 *N*、*P* 和 *L* 蛋白的表达鉴定

在荧光显微镜下观察进行 IFA 的各转染孔,发现 pCI-N、pCI-P 和 pCI-L 转染孔均出现黄绿色荧光(图 3a~d),其中 pCI-N 转染孔荧光量最多,pCI-P 次之,pCI-L 转染孔荧光量最少。不同蛋白表达量的差异可能与质粒的转染效率有关。以 RNase-free DNaseI 处理的 RNA 为模板,分别以引物对 Nfwd 和 Nrev、Pfwd 和 Prev、Lfwd 和 Lrev 扩增 *N*、*P* 和 *L* 基因,结果均有特异性扩增条带,而空载体对照无条带(图略)。上述结果说明 *N*、*P* 和 *L* 蛋白均表达。

2.3 China/Tib/07 微型基因组的构建

Leader、Trailer 和 eGFP 均获得预期大小的扩增片段,通过 overlap-PCR 将三者顺次连接得到约

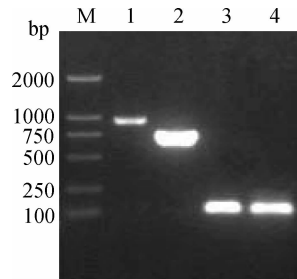
940 bp 的预期大小片段(图 4)。



a. The expression of *N* protein; b. The expression of *P* protein; c. The expression of *L* protein; d. Control of pCI-neo vector

图 3 IFA 鉴定 *N*、*P* 和 *L* 蛋白的表达

Fig. 3 Identification of the expression of *N*, *P* and *L* proteins by IFA



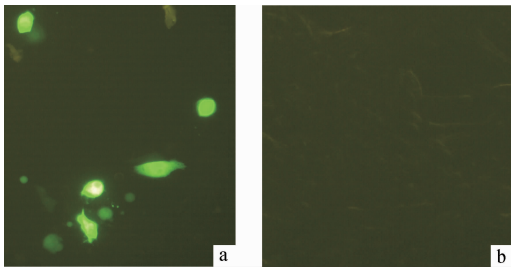
M. DL2000 DNA Marker; 1. Fragment of *LP*, eGFP and *TP* by overlap-PCR; 2. Fragment of eGFP; 3. Fragment of Trailer; 4. Fragment of Leader

图 4 Leader、eGFP 和 Trailer 的扩增和连接片段

Fig. 4 Amplification and connection of Leader, eGFP and Trailer

2.4 pLGT、pCI-N、pCI-P 和 pCI-L 的功能鉴定结果

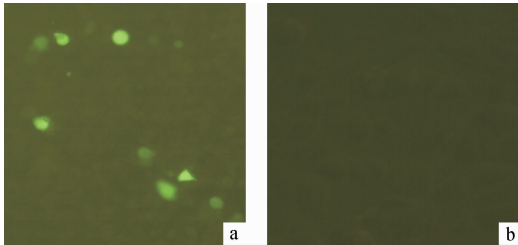
微型基因组的转录、表达需要 T7 RNA 聚合酶,这需要 PPRV 提供的 *N*、*P* 和 *L* 蛋白,因此,利用 PPRV 疫苗株 Nigeria 75/1 可鉴定 pLGT 的功能。转染后 48 h 观察,发现 PPRV 疫苗株感染孔在荧光显微镜下可看到特异的黄绿色荧光(图 5a),而对照孔无荧光(图 5b)。分别用试验孔和对照孔细胞提取的处理 RNA 扩增 eGFP 基因,结果试验孔出现约 720 bp 的特异条带,而阴性对照孔无,说明 China/Tib/07 微型基因组 pLGT 功能正常。在荧光显微镜下观察 pLGT 与辅助质粒 pCI-N、pCI-P 和 pCI-L 共转染的结果,发现有黄绿色荧光出现(图 6a),而缺少 pCI-L 质粒的对照孔无荧光(图 6b),并从 mRNA 水平上验证了 GFP 蛋白的表达。



a. Transfectional result of the minigenome with support virus; b. Negative control

图 5 微型基因组 pLGT 的功能鉴定

Fig. 5 Functional identification of minigenome pLGT



a. Co-transfection result of the minigenome and pCI-N, pCI-P, pCI-L; b. Negative control

图 6 pCI-N、pCI-P 和 pCI-L 的功能鉴定

Fig. 6 Functional identification of pCI-N, pCI-P and pCI-L

3 讨论

单股负链 RNA 在体外进行衣壳化的效率极低,为此,学者们开始探索能在体内形成 RNP 结构的途径。1991 年 Park 等^[12]将氯霉素乙酰转移酶(CAT)作为报告基因取代了仙台病毒的整个编码区而构建出一个嵌合基因,然后将该嵌合基因置于 T7 启动子之后构建出转录载体。痘苗病毒 T7 RNA 聚合酶系统是目前应用于动物负链 RNA 病毒拯救上最广泛的表达系统^[13]。将 T7 启动子驱动的表达质粒转染痘苗病毒感染过的细胞,在痘苗病毒产生的 T7 RNA 聚合酶的作用下,表达质粒得以表达,从转染的表达质粒中获得辅助蛋白来代替辅助病毒的感染,从而大大提高了拯救效率。Pattanaik^[14]等和 Curran^[15]等分别将水泡性口炎病毒和仙台病毒的 N、P 和 L 基因的表达质粒转染痘苗病毒感染过的细胞,之后用它们的缺陷性干扰病毒粒子感染转染细胞,成功拯救出了传染性水疱性口炎病毒和仙台病毒的缺陷性干扰病毒粒子,从而证明与病毒基因组复制相关的蛋白为 N、P 和 L 蛋白。

本试验通过 overlap-PCR 将 PPRV 分离株 China/Tib/07 基因组 3'端的 Leader 序列和 N 基因

5'端的非编码区(1~107 nt)、增强型绿色荧光蛋白(eGFP)基因(720 nt)、L 基因 3'端非编码区和 5'端 Trailer 序列(15 840~15 948 nt)的片段顺次连接,该连接片段反向克隆入转录载体 pOLTV5 的 T7 启动子与丁型肝炎病毒的核酶裂解位点之间构建了微型基因组。反向克隆的目的是避免报告基因在无辅助病毒蛋白存在情况下直接表达。用 PPRV 疫苗株 Nigeria 75/1 直接感染 BHK-21 细胞时报告基因表达,表明此微型基因组 RNA 可被辅助病毒提供的 N、P 和 L 蛋白翻译,即所构建的微型基因组具有功能。将所构建的 3 个辅助质粒 pCI-N、pCI-P 和 pCI-L 与微型基因组共转染时,报告基因表达,说明 3 个辅助质粒具有辅助病毒的功能。

考虑到“6 碱基原则”在副黏病毒基因组复制中的重要作用^[16],本试验在构建微型基因组时选择的序列全长为 936 bp,恰好为 6 的倍数,为该体系的有效运行提供了良好保证。所使用的转录载体 pOLTV5 为复制严谨型的低拷贝质粒,可以提高重组质粒的稳定性,减少突变率,同时载体中含有高效的 T7 启动子以及丁型肝炎病毒的核酶裂解位点和 T7 转录终止子,可以保证转录的高效性和准确性。

质粒的浓度和纯度对转染成败具有重要影响。转染质粒的浓度必须达到 $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 以上,纯度要求 $\text{OD}_{260 \text{ nm}}/\text{OD}_{280 \text{ nm}}$ 在 1.8~1.85。为了去除内毒素及其它杂质影响,使质粒的浓度和纯度均达到转染级别要求,首先摇菌时间应控制在 14~16 h,以保证得到足够的菌体而细菌又没有因衰老而释放大量内毒素。由于所用转染试剂及细胞板的体积不同,各转染质粒没有固定用量,需根据转染试剂使用说明要求选择适宜用量。转染效率也与转染质粒的比例有关。不同学者在进行转染时曾采用了不同的比例^[17-19],本试验经优化后选择 3 个辅助质粒 pCI-N、pCI-P 和 pCI-L 的使用比例为 2:1:1,报告基因得到较好表达。由于基因组转录过程存在极性现象^[20],因此不论采用那种比例,pCI-N 质粒的量都要比另外两种质粒多一些。

本试验中用来产生 T7 RNA 聚合酶的是高度致弱的 MVA 病毒,这是一种严格的宿主范围限制性痘苗病毒,宿主谱狭窄,只能在有限的几种宿主细胞上生长^[21]。为了保证转染的可行性,必须选择 MVA 和 PPRV 两种病毒都易感的细胞。PPRV 的宿主谱相对较广,通常情况下,PPRV 大多用 Vero 细胞进行增殖,本试验选择 BHK-21 作为转染细胞,是考虑到 MVA 和 PPRV 两种病毒都能在该细胞系上生长。阳性对照中使用的辅助病毒为 PPRV 疫苗毒 Nigeria 75/1,转染结果有荧光产生,但荧光

数量不是很多,排除转染效率的影响,可能与病毒对宿主细胞的敏感性有很大关系。MVA 病毒可以致细胞病变,因此感染剂量不宜过大,本试验选择 1MOI 的感染剂量既没有引起细胞病变,也产生了足够的 T7 RNA 聚合酶使报告基因转录和表达。

常用的报告基因还有 CAT, Bailey 等^[22]以 CAT 作为报告基因构建了 PPRV 的 Turkey 2000 株的微型基因组。本试验以 eGFP 作为报告基因,结果观察更直观。但当细胞孔中含有杂质或存在大量死细胞时,非特异性荧光往往会干扰结果的判定,所以本试验在进行微型基因组和辅助质粒功能鉴定时,还分别以特异性引物进行 RT-PCR 扩增,以便在 mRNA 水平上证明目的蛋白的表达。

参考文献:

- [1] AL-DUBAIB M A. Peste des petitis ruminants morbillivirus infection in lambs and young goats at Qassim region, Saudi Arabia[J]. *Trop Anim Health Prod*, 2009, 41(2): 217-220.
- [2] NDAMUKONG K J, SEWELL M M, ASANJI M F. Disease and mortality in small ruminants in the North West Province of Cameroon[J]. *Trop Anim Health Prod*, 1989, 21(3): 191-196.
- [3] LEFEVRE P C, DIALLO A, SCHENKEL F, et al. Serological evidence of peste des petits ruminants in Jordan[J]. *Vet Rec*, 1991, 128(5): 110.
- [4] ANDERSON J, MCKAY J A. The detection of antibodies against peste des petits ruminants virus in cattle, sheep and goats and the possible implications to rinderpest control programmes[J]. *Epidemiol Infect*, 1994, 112(1): 225-231.
- [5] WANG Z, BAO J, WU X, et al. Peste des petits ruminants virus in Tibet, China[J]. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15(2): 299-301.
- [6] SINGH R P, SARAVANAN P, SREENIVASA B P, et al. Prevalence and distribution of peste des petits ruminants virus infection in small ruminants in India[J]. *Rev Sci Tech*, 2004, 23(3): 807-819.
- [7] AMJAD H, QAMAR ul I, FORSYTH M, et al. Peste des petits ruminants in goats in Pakistan[J]. *Vet Rec*, 1996, 139(5): 118-119.
- [8] LUNDERVOLD M, MILNER-GULLAND E J, O'CALLAGHAN C J, et al. A serological survey of ruminant livestock in Kazakhstan during post-Soviet transitions in farming and disease control[J]. *Acta Vet Scand*, 2004, 45(3-4): 211-224.
- [9] BARON M D, BARRETT T. Rescue of rinderpest virus from cloned cDNA[J]. *J Virol*, 1997, 71(2): 1265-1271.
- [10] GASSEN U, COLLINS F M, DUPREX W P, et al. Establishment of a rescue system for canine distemper virus[J]. *J Virol*, 2000, 74(22): 10737-10744.
- [11] RADECKE F, SPIELHOFER P, SCHNEIDER H, et al. Rescue of measles viruses from cloned DNA[J]. *EMBO J*, 1995, 14(23): 5773-5784.
- [12] PARK K H, HUANG T, CORREIA F F, et al. Rescue of a foreign gene by Sendai virus[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88(13): 5537-5541.
- [13] 黄耀伟,李 龙,于 涟. 人类及动物 RNA 病毒的反向遗传系统[J]. *生物工程学报*, 2004, (03): 311-318.
- [14] PATTNAIK A K, WERTZ G W. Replication and amplification of defective interfering particle RNAs of vesicular stomatitis virus in cells expressing viral proteins from vectors containing cloned cDNAs[J]. *J Virol*, 1990, 64(6): 2948-2957.
- [15] CURRAN J, BOECK R, KOLAKOFSKY D. The Sendai virus P gene expresses both an essential protein and an inhibitor of RNA synthesis by shuffling modules via mRNA editing[J]. *EMBO J*, 1991, 10(10): 3079-3085.
- [16] KOLAKOFSKY D, PELET T, GARCIN D, et al. Paramyxovirus RNA synthesis and the requirement for hexamer genome length: the rule of six revisited[J]. *J Virol*, 1998, 72(2): 891-899.
- [17] PEETERS B P, de LEEUW O S, KOCH G, et al. Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence[J]. *J Virol*, 1999, 73(6): 5001-5009.
- [18] KRISHNAMURTHY S, HUANG Z, SAMAL S K. Recovery of a virulent strain of newcastle disease virus from cloned cDNA: expression of a foreign gene results in growth retardation and attenuation[J]. *Virology*, 2000, 278(1): 168-182.
- [19] MINET C, YAMI M, EGZABHIER B, et al. Sequence analysis of the large (L) polymerase gene and trailer of the peste des petits ruminants virus vaccine strain Nigeria 75/1: expression and use of the L protein in reverse genetics[J]. *Virus Res*, 2009, 145(1): 9-17.
- [20] IVERSON L E, ROSE J K. Sequential synthesis of 5'-proximal vesicular stomatitis virus mRNA sequences[J]. *J Virol*, 1982, 44(1): 356-365.
- [21] MEYER H, SUTTER G, MAYR A. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence[J]. *J Gen Virol*, 1991, 72(5): 1031-1038.
- [22] BAILEY D, CHARD L S, DASH P, et al. Reverse genetics for peste-des-petits-ruminants virus (PPRV): promoter and protein specificities[J]. *Virus Res*, 2007, 126(1-2): 250-255.