



Y3393296

密级:

论文编号:

中国农业科学院 学位论文

宿主细胞对小反刍兽疫病毒天然免疫应答机制的研究

Mechanism of Immune Responses of Host Cells Induced by
Peste Des Petits Ruminants Virus

博 士 研 究 生: 马晓霞

指 导 教 师: 才学鹏 研究员

申 请 学 位 类 别: 农学博士

专 业: 预防兽医学

研 究 方 向: 动物疫苗与分子免疫学

培 养 单 位: 兰州兽医研究所

研究生院

2018 年 5 月



Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences Dissertation

**Mechanism of Immune Responses of Host Cells Induced
by Peste Des Petits Ruminants Virus**

Ph.D Candidate: Ma Xiaoxia

Supervisor: Professor Cai Xuepeng

Major: Preventive Veterinary Science

**Specialty: Animal Vaccine and Molecular
Immune**

May 2018

独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：马晓霞

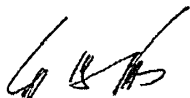
时间：2018年5月16日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

研究生签名：马晓霞

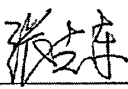
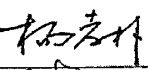
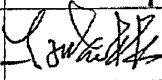
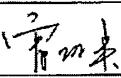
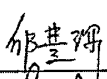
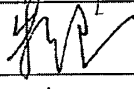
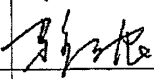
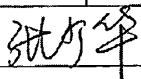
时间：2018年5月16日

导师签名：

时间：2018年5月16日

中国农业科学院

博士学位论文评阅人、答辩委员会签名表

论文题目		宿主细胞对小反刍兽疫病毒天然免疫应答机制的研究				
论文作者		马晓霞	专 业	预防兽医	研究方向	动物疫苗与分子免疫学
指导教师		才学鹏		培养单位(研究所、中心)		兰州兽医研究所
姓名		职称	硕(博)	单 位	专 业	签 名
评 阅 人	盲审		硕导□ 博导□			
	盲审		硕导□ 博导□			
	盲审		硕导□ 博导□			
答 辩 主 席	张志东	研究员	硕导□ 博导 ☒	兰州兽医研究所	预防兽医	
答 辩 委 员	杨孝朴	教授	硕导□ 博导□	甘肃农业大学	预防兽医	
	孙晓林	教授	硕导□ 博导□	甘肃农业大学	预防兽医	
	曾巧英	教授	硕导□ 博导□	甘肃农业大学	预防兽医	
	郭慧琛	研究员	硕导□ 博导□	兰州兽医研究所	预防兽医	
	朱兴全	研究员	硕导□ 博导□	兰州兽医研究所	预防兽医	
	骆学农	研究员	硕导□ 博导□	兰州兽医研究所	预防兽医	
			硕导□ 博导□			
会议记录(秘书)						
论文答辩时间地点		兰州兽医研究所寄生虫病研究室二楼会议室				

摘 要

小反刍兽疫 PPR(Peste des Petits Ruminants, PPR)是由 PPRV(Peste des Petits Ruminants Virus, PPRV)引起的高致病性疫病, 死亡率达 50-80%。是世界动物卫生组织(Office International des Epizooties, OIE)规定必须报告的烈性动物传染病。PPRV 对宿主的天然免疫抑制非常严重, 但目前关于宿主对 PPRV 感染的天然免疫应答过程、抗病毒药物以及新型抗病毒技术开发等方面的研究不多。本文对上述问题进行了初步研究, 取得如下结果:

1. PPRV 在遗传进化过程中, 其密码子使用模式受到基因组自身突变压力以及与宿主相关的翻译选择压力的影响。N 蛋白作为一种重要的病毒复制相关蛋白, 其编码基因高度适应宿主密码子使用模式, 并且在形成正确的蛋白结构的过程中, 其密码子使用偏嗜性以及宿主细胞 tRNA 丰度变化都受到影响。N 蛋白在 PPRV 复制过程中发挥着重要作用, 其蛋白高级构象的形成与密码子使用模式具有明显的相关性。

2. PPRV 感染 HEK293T 细胞后可诱导细胞内 IFN- β 、IFN- λ 2、IFN- λ 3 三种干扰素及 ISG15、ISG56、CXCL10 等几种抗病毒蛋白 (ISG) 的表达, 外源加入 IFN- α 2b 及 IFN- λ 3 后对 PPRV 复制有明显的抑制作用, 而 IFN 信号通路抑制剂 Jak-inhibitor, 对宿主细胞自身产生的 IFN 的应答无抑制作用, 反之, 未感染 PPRV 的 HEK293T 细胞对外源加入的 IFN 的应答具有显著抑制作用。

3. PPRV 感染细胞可以诱导宿主细胞自噬相关蛋白 Atg13 蛋白的表达, 该蛋白可以激活 I 型 IFN 及相关细胞因子的表达, 这些表达产物同样具有抗病毒作用。此外, Atg13 蛋白具有抑制 PPRV 的复制的功能, 说明宿主 Atg13 蛋白除了具有自噬功能之外还具有激活天然免疫及抗病毒等其它重要功能。

4. 病毒唑(Ribavirin)与霉酚酸(Mycophenolic)均具有显著的抗 PPRV 的作用, 深入研究发现, Ribavirin 通过抑制 IMPDH 酶的活性来阻止 GTP pool 的形成从而发挥抗病毒作用。

5. Vero 细胞敲除 Vinculin 基因后, 细胞的迁移率降低, PPRV 在细胞中的复制效率也有所降低。

6. 筛选到了抗 PPRV 感染的两种干扰素, 初步分析了 Ribavirin 及 Mycophenolic 两种药物治疗 PPRV 感染的可能性, 这也为藏羚羊等我国特有的珍稀小反刍动物感染 PPRV 后的治疗提供了可靠的依据。

以上研究结果为我们深入了解 PPRV 与宿主细胞天然免疫系统的相互关系奠定了基础, 为 PPR 的防控提供了新的思路。

关键词: 小反刍兽疫病毒, 抗病毒, 天然免疫, 病毒唑, 黏着斑蛋白

Abstract

Peste des petits ruminants disease (PPR) is a highly contagious, and immunosuppressive small ruminants disease caused by PPR virus (PPRV), with the mortality of 50-80%. It is seriously monitored by Food and Agriculture Organization of the United Nations. PPRV inhibited interferon (IFN) responses seriously, but there was a lack of reports that were related to innate immune response induced by PPRV infection, selection of drugs against PPRV infection and developments of new antiviral pathway. From this study, we can get conclusion:

1. During PPRV evolution, synonymous codon usage patterns of different viral genes were influenced by mutation pressure of nucleotide composition and natural selection of host. The secondary structure of PPRV N protein was obviously influenced by synonymous codon usage patterns of N gene and translation speed of tRNA abundances of host.

2. In this study, when PPRV invaded into HEK293T cell line, IFN- β , IFN- λ 2, IFN- λ 3 and several interferon stimulation genes (ISG), such as ISG56, ISG15 and CXCL10, can be strongly induced. When exogenous IFN- α 2b and IFN- λ 3 did with HEK293T cell line, PPRV infection can be blocked. However, Jak-inhibitor which is an inhibitor blocking signal pathway induced by IFN did not inhibit production of IFN and other cytokines, but it was able to block immune response by exogenous IFN.

3. Apart from autophagy, the autophagy-related (Atg) proteins take part in many physiological processes, such as viral replication, inflammatory immune response and so on. In the previous study, we studied for the roles of Atg proteins in the life cycle of viral infection, and found that Atg proteins can be activated and play important roles in regulating innate immunity system against viral infection. We get the conclusion that Atg13 protein inhibits PPRV proliferation by activating the signaling pathway of IFN- β .

4. Ribavirin and Mycophenolic are ribonucleoside analogs which have impact on IMPDH activities to stop GTP pool, which are used for antiviral infections. In this study, Ribavirin and Mycophenolic had strong antiviral effect on PPRV infection.

5. Furthermore, depending on CRISPR-cas9 method, Vinculin protein was knocked out from Vero cell line. Although this Vero cell line which did not contain *Vinculin* gene had a low growth rate, this cell line represented an obvious resistance to PPRV replication.

6. The two important IFNs were found during PPRV infection, the two effective antiviral drugs (Ribavirin and Mycophenolic) were primarily identified.

These findings might give new strategies to perform resistance to PPRV infection to some cherish wild small ruminants, especially Tibetan antelope. Interestingly, Atg13 protein of HEK293 cell line had an important role in mediating immune signalling pathway of innate immune response, and Vinculin protein of Vero cell line functioned as antiviral response during PPRV replication. These findings give new insights into some proteins of host cell performing antiviral

IIIfunctions during PPRV infection, at the same time; provide novel ideas for preventing and controlling PPR.

Key words: PPRV, Antiviral, Innate, immunity, Ribavirin, IIIVinculin

目 录

第一章 引 言.....1

1.1 国内外研究进展.....1

1.1.1 PPRV 的分子病原学特点.....1

1.1.1.1 PPRV 的分布.....1

1.1.1.2 PPRV 感染的宿主范围.....1

1.1.1.3 病毒的传播及扩散.....2

1.1.1.4 病毒的分子生物学特征.....2

1.1.1.5 疫苗.....5

1.1.2 宿主对 PPRV 的天然免疫应答.....6

1.1.3 干扰素的抗病毒作用.....7

1.1.4 自噬相关蛋白在天然免疫中的作用.....8

1.1.5 病毒唑(ribavirin)在抗病毒临床中的应用9

1.1.6 宿主细胞黏着斑蛋白对病毒复制的影响.....10

1.2 研究的目的与意义.....11

第二章 PPRV 基因组遗传进化的特征.....12

2.1 实验材料.....12

2.1.1 PPRV 基因组序列.....12

2.1.2 宿主密码子数据.....13

2.2 实验方法.....14

2.2.1 PPRV 基因核苷酸使用偏嗜性的分析.....15

2.2.2 PPRV 基因密码子使用偏嗜性的分析.....15

2.2.3 PPRV 与宿主密码子使用的相似性.....16

2.2.4 PPRV 核衣壳蛋白（N）二级结构的分析.....16

2.3 实验结果.....17

2.3.1 PPRV 在基因水平上核苷酸使用模式.....17

2.3.2 PPRV 不同基因在密码子使用模式上与宿主的适应性.....20

2.3.3 PPRV 不同基因同义密码子使用的特点.....21

2.3.4 PPRV N 蛋白高级结构的分析.....24

2.3.5 密码子使用对于 PPRV N 蛋白折叠构象的影响.....24

2.3.6 翻译速率在两种不同折叠构象连接处的变化.....25

2.4 讨论.....27

第三章 宿主细胞抗 PPRV 感染的天然免疫应答.....29

3.1 实验耗材、试剂及其配制方法.....29

3.1.1 细胞、病毒、质粒和引物.....29

3.1.2 主要溶液的配制.....29

3.1.3 实验设备.....32

3.2 实验方法.....32

3.2.1 PPRV 在 HEK293T 细胞中的增殖.....32

3.2.2 PPRV 感染 HEK293T 细胞后激活 IFN 及 ISG.....32

3.2.3 外源 IFN 的抗病毒作用.....32

3.2.3.1 IFN alpha 2b 的抗病毒作用.....33

3.2.3.2 IFNλ3 的抗病毒作用.....33

3.2.4 Jak inhibitor 抑制 IFN 通路.....33

3.2.4.1 Jak inhibitor 抑制内源性的 IFN 通路.....33

3.2.4.2 Jak inhibitor 抑制外源性的 IFN 通路.....33

3.2.5 PPRV 激活 Atg13 基因的转录.....34

3.2.6 Atg13 蛋白对 PPRV 复制的调控作用.....34

3.2.6.1 过表达 Atg13 基因对 PPRV 复制的影响作用.....34

3.2.6.2 敲低 Atg13 基因对 I 型 IFN 信号通路的影响作用.....35

3.2.7 Atg13 蛋白激活产生的 IFN 抑制 PPRV 的作用.....35

3.2.8 荧光定量 PCR.....35

3.2.9 CCK8 检测药物对细胞的毒性实验.....36

3.2.10 统计学分析.....	36
3.3 实验结果.....	37
3.3.1 PPRV 在 HEK293T 细胞中的增殖.....	37
3.3.2 PPRV 感染 HEK293T 细胞后可激活产生 IFN- β 、IFN- λ 3 及相关 ISG.....	37
3.3.3 外源 IFN 的抗病毒作用.....	38
3.3.3.1 IFN- α 2b 在 HEK293T 细胞中的抗 PPRV 感染作用.....	38
3.3.3.2 IFN- λ 3 在 HEK293T 细胞中的抗 PPRV 感染作用.....	40
3.3.4 Jak inhibitor 抑制 IFN 通路.....	40
3.3.4.1 Jak inhibitor 抑制内源性的 IFN 通路.....	40
3.3.4.2 Jak inhibitor 抑制外源性的 IFN 通路.....	41
3.3.5 细胞毒性实验.....	41
3.3.6 PPRV 激活 Atg13 基因的转录.....	42
3.3.7 过表达 Atg13 基因对 PPRV 复制的影响作用.....	43
3.3.8 敲低 Atg13 基因对 I 型 IFN 信号通路的影响.....	43
3.3.9 Atg13 蛋白激活产生的 IFN 对 PPRV 的抑制作用.....	44
3.4 讨论.....	45
第四章 病毒唑和霉酚酸的抗 PPRV 作用.....	47
4.1 实验材料.....	47
4.1.1 细胞、病毒.....	47
4.1.2 实验耗材、试剂及其配制方法.....	47
4.1.3 实验设备.....	48
4.2 实验方法.....	48
4.2.1 药物毒性实验.....	48
4.2.2 Ribavirin 抑制病毒增殖实验.....	48
4.2.2.1 Ribavirin 抑制 PPRV 增殖的作用.....	48
4.2.2.2 Ribavirin 抑制 PPRV 增殖作用的时间-效应关系.....	49
4.2.2.3 Ribavirin 抑制 PPRV 增殖作用的剂量-效应关系.....	49

4.2.2.4 确定 Ribavirin 作用 72h 的最佳抗病毒作用浓度	49
4.2.2.5 Guanosine 抑制 ribavirin 抗 PPRV 增殖作用.....	49
4.2.3 Mycophenolic 抑制 PPRV 增殖作用	50
4.2.3.1 Mycophenolic 抑制 PPRV 增殖作用	50
4.2.3.2 Guansine 抑制 Mycophenolic 抗 PPRV 增殖作用	50
4.2.4 荧光定量 PCR.....	50
4.2.5 统计学分析.....	50
4.3 结果.....	50
4.3.1 药物毒性实验.....	50
4.3.2 Ribavirin 抑制 PPRV 增殖的作用及最佳作用浓度	51
4.3.3 Ribavirin 抑制 PPRV 增殖的时间效应	52
4.3.4 确定 Ribavirin 对 PPRV 作用的最佳浓度	52
4.3.5 Ribavirin-Guanosine 抑制病毒增殖实验	53
4.3.6 Mycophenolic 抑制 PPRV 增殖作用	53
4.3.7 Guansine 抑制 Mycophenolic 抗 PPRV/Nigeria 75/1 增殖作用	54
4.4 讨论.....	55
第五章 细胞内黏着斑蛋白对病毒复制的影响.....	57
5.1 实验材料.....	57
5.1.1 细胞、病毒及质粒.....	57
5.1.2 实验耗材、试剂及其配制方法.....	57
5.1.3 实验设备.....	58
5.2 实验方法.....	58
5.2.1 敲除质粒的构建.....	58
5.2.2 基因敲除细胞系构建.....	60
5.2.3 敲除细胞系的鉴定.....	60
5.2.4 细胞分选.....	60
5.2.5 Western-blot 检测.....	60

5.2.6 单克隆细胞的 PCR 及测序鉴定61

5.2.7 细胞迁移实验.....61

5.2.8 PPRV 在 Vero 细胞中的增殖实验.....61

5.2.9 统计学分析.....61

5.3 实验结果.....62

5.3.1 vinculin 敲除质粒的构建62

5.3.2 基因敲除细胞系.....62

5.3.3 敲除细胞系的 PCR 及测序鉴定62

5.3.4 Western-blot 检测.....62

5.3.5 细胞迁移实验.....63

5.3.6 PPRV 在 Vero 细胞中的增殖实验.....64

5.4 讨论.....64

第六章 全文结论.....66

参考文献.....67

致谢.....79

作者简历.....80

英文缩略表

英文缩写	英文全称	中文名称
Ala	Alanine	丙氨酸
Arg	Arginine	精氨酸
Asn	Asparagine	天冬酰胺
Asp	Aspartic acid	天冬氨酸
Atg	autophagy-related gene	自噬相关基因
BD	Boma disease	博尔纳病
BDV	Borna disease virus	博尔纳病毒
Cas genes	CRISPR-associated genes	CRISPR 相关基因
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats	成簇、规律间隔的短回文重复序 列
CV	Coxsackievirus	柯萨奇病毒
Cys	Cysteine	半胱氨酸
EMCV	Encephalomyocarditisvirus	病毒脑心肌炎病毒
FMDV	Foot-and-Mouth Disease Virus	口蹄疫病毒
Gln	Glutamine	谷氨酰胺
Glu	Glutamic acid	谷氨酸
Gly	Glycine	甘氨酸
His	Histidine	组氨酸
HIV	Human immunodeficiency virus	艾滋病病毒
HSV	herpes simplex virus	单纯疱疹病毒
IFN	interferon	干扰素
Ile	Isoleucine	异亮氨酸
IMPDH	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	肌苷酸-5-磷酸脱氢酶
IRFs	interferon-regulatory factors	干扰素调节因子
ISG	IFN-stimulated gene	IFN 活化基因
Leu	Leucine	亮氨酸
Lys	Lysine	赖氨酸
Met	Methionine	甲硫氨酸
MeV	Measles Virus	麻疹病毒
MPA	Mycophenolic acid	霉酚酸
MPA	Mycophenolic acid	霉酚酸
MV	Morbillivirus	麻疹病毒属

续 英文缩略表

英文缩写	英文全称	中文名称
NF-κB	nuclear factor-κB	核调节因子 κB
OIE	Office International des Epizooties	世界动物卫生组织
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns	病原相关分子模式
PPR	Peste des Petits Ruminants	小反刍兽疫
Phe	Phenylalanine	苯丙氨酸
PPRV	Peste des petitis virus	小反刍兽疫病毒
Pro	Proline	脯氨酸
PRRs	pattern recognition receptors	模式识别受体
RSC	Synonym codon	同义密码子
RSCU	relative synonymous codon usage value	相对密码子使用模式
Ser	Serine	丝氨酸
Thr	Threonine	苏氨酸
Trp	Tryptophane	色氨酸
TYK2	tyrosine kinase 2	酪氨酸激酶 2
Tyr	Tyrosine	酪氨酸
Val	Valine	缬氨酸

第一章 引言

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)引起的高致病性疫病,死亡率达 50-80%。是世界动物卫生组织(Office International des Epizooties, OIE)规定必须报告的烈性动物传染病。联合国粮农组织估计, 2012~ 2017 年间每年仅印度(世界最大养羊国)因 PPR 发病造成的经济损失超过 25 亿美元,全球小反刍动物约 62.5% (11.2 亿头)面临感染 PPRV 风险。PPRV 为有囊膜病毒,基因组由负链不分节段 RNA 组成,属副黏病毒科、麻疹病毒属成员。我国农业部将 PPR 列为一类动物传染病,是《国家动物疫病中长期防治规划(2012-2020 年)》明确规定重点防范的动物疫病之一(贺洞杰等, 2014; 刘斌等, 2017; 张学虎等, 2013)。PPRV 具有强大的逃避天然免疫应答的能力,所以加强 PPRV 分子生物学、免疫学等方面的研究、开发新的针对 PPRV 的防治技术迫在眉睫。

1.1 国内外研究进展

1.1.1 PPRV 的分子病原学特点

1.1.1.1 PPRV 的分布

埃及至少是在 1989 年就出现了 PPRV(Ismail and House,1990),北非的摩洛哥在 2008 年报道了 PPRV,这也是北非继埃及之后,第二个报道 PPRV 的国家。突尼斯在 2006 年时就已经出现了 PPRV 的病例(Ayari-Fakhfakh et al.,2011)。经过 2008 年的那次大暴发后,摩洛哥全国都实施了疫苗免疫措施,尽管接下来的几年内 PPRV 消失了,但 2015 年该国再次出现了 PPRV 病例。边境非法交易及频繁的羊群迁移加之广泛实施的育肥措施是造成这种现象的原因。摩洛哥的经验告诫我们,必须出台地区性的防控 PPR 的政策来保证在全国范围内可持续性的消灭 PPRV。

近几年,田间数据及实验室检测结果显示,PPRV 传播到了非洲南部,受影响的国家有加蓬、刚果、索马里、肯尼亚以及坦桑尼亚(Swai et al.,2009)。2015 年 7 月,赞比亚兽医组织向 OIE 提交了在该国南部检测到 PPRV 的报告。2012 年 10 月,安哥拉首次报道了 PPRV。所以,PPRV 入侵养羊业为主的国家的风险很大,尤其是与上述国家毗邻的国家,如南非和莫桑比克。

除了非洲外,许多亚洲国家也出现了 PPRV,包括我国。2007 年在中国的西藏鉴定出 PPR 后,又在 2013-14 年期间经历了一场 PPR 的大流行,因此也采取了大规模的疫苗强制免疫的举措(Wu et al., 2015)。然而有趣的是,在 2013-14 期间我国流行的 PPRV 毒株基因型更接近于在巴基斯坦及塔吉克斯坦鉴定的毒株,而非早期西藏出现的毒株。

1.1.1.2 PPRV 感染的宿主范围

PPR 可以感染山羊及绵羊,山羊更易感。然而,该疫病暴发后,在对山羊及绵羊的血清学检测中发现阳性率呈现不同规律,导致这种现象的因素很多,如家畜管理制度、养殖密度、病毒毒力以及宿主品种等。例如,萨赫勒山羊比几内亚矮山羊更易感 PPRV,而阿尔卑斯山羊在实验条件下也非常敏感 (Diop et al., 2005)。

尽管竟 10% 的牛及家养的或野生的非洲水牛在 PPRV 暴发时也会检测到血清学阳性,但普遍认为 PPRV 并非感染牛的病原(Abraham et al., 2005; Ayari-Fakhfakh et al., 2011)。2015 年,在塞内加尔实施的一项全国性的血清调查中,有些地区的血清阳性率达 80%,这些地区牛羊养殖很集中,但没有报道牛表现出明显的临床症状。相反的是,印度报道称其国内家养的水牛感染 PPRV 后,死亡率达 96%,且 PPR 在这些动物中迅速传播(Govindarajan et al.,1997)。此外,有研究者认为 PPRV 感染骆驼,在埃及、苏丹,骆驼感染 PPRV 后,呼吸综合征是最主要的症状(Khalafalla et al., 2010; Roger et al., 2000)。然而,实验表明,PPRV 无法在骆驼体内增殖(Wernery, 2011)。但感染了 PPRV 的患病水牛及骆驼是否是小反刍兽的传染源还不得而知。其它野生反刍动物,包括瞪羚、羚羊也会感染 PPRV。在有些特殊环境下,野生动物在 PPR 流行病学研究中扮演重要角色,这些野生动物也曾出现在阿拉伯伊比利亚半岛,但是至今还没有定论,野生动物是 PPRV 的携带者还是其受害者(Anderson,1995; Mahapatra et.al., 2015)。这个地区,野生反刍动物及山羊和绵羊的密度却很高,但人们对该病毒的认识却很缺乏,特别是对已感染病毒的骆驼、牛、野生动物的治疗及利用动物尿液和粪便鉴定 PPRV 等这些方面的知识很欠缺 (郭昌明, 2017; 李景玉等, 2014)。

1.1.1.3 病毒的传播及扩散

已感染病毒的动物(大多数家养的反刍动物)是 PPRV 的传染源。在感染初期,主要通过呼吸向空气中散毒。相比 RPV, PPRV 可在数米的距离内实现非接触性传播(Idnani,1944)。口鼻分泌物、唾液及排泄物中同样含有大量病原。山羊感染 PPRV 2 个月后,会在粪便中排出 PPRV RNA 或抗原,但还不确定是否具有感染性。由于 PPRV 在环境中会快速失活,所以 PPRV 的传播通常是通过被感染与健康动物的直接接触进行的。然而,也不能完全排除短时间内接触感染物造成的间接传播。

1.1.1.4 病毒的分子生物学特征

1.1.1.4.1 病毒蛋白功能

小反刍兽疫病毒 (peste des petits ruminants virus, PPRV), 在分类学上属副粘病毒科 (Paramyxoviridae), 麻疹病毒属 (Morbillivirus, MV), 单股负链无节段 RNA 病毒。PPRV 的基因组全长 15,948bp (Bailey et al., 2005), 最近在中国但最近在中国疫区检测到的 PPRV 比之前报道的病毒多了 6 个碱基 (Bao et al., 2014; Su et al., 2015)。该病毒基因包含 6 个转录单元, 按照序列顺序依次为, 核衣壳蛋白(N)、磷蛋白(P)、基质蛋白(M)、融合蛋白(F)、血凝素蛋白(H)、大蛋白(L), L 蛋白与 P 蛋白共同构成病毒的 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (骆学农等, 2007; 翟军军等, 2009; 蒙雪莲等, 2014; 邓瑞雪等, 2016)。基因组 RNA 被核衣壳蛋白所包裹, 避免了其被 RNA 酶降解。部分 P 蛋白、L 蛋白与核衣壳蛋白结合, 因为感染性

病毒负链基因组的翻译起始需要一些 P 蛋白及 L 蛋白的参与。PPRV 病毒衣壳中 N 蛋白的结构与麻疹病毒的相关蛋白很相似,最近研究者通过冷冻电镜观察到麻疹病毒 N 蛋白类似原子的结构特征(信爱国等, 2003; 李翠翠等, 2016; Gutsche et al., 2015)。

基质蛋白在病毒粒子中的定位及其所发挥的功能尚待进一步研究。已有研究表明, M 蛋白具有连接 N 蛋白与细胞膜的作用,但目前还没有证据表明 N 蛋白与病毒囊膜蛋白的胞质区结构域有稳定的互作。最新研究表明,通过杆状病毒载体共表达 PPRV V、M、N 或 M 蛋白与 PPRV 的任何一种囊膜蛋白均可组装病毒空衣壳(VLP),而在 PPRV 感染的细胞中阻止 M 蛋白的合成则导致更多的细胞间的融合并减少病毒的释放(Liu et al.2015)。这些数据表明, M 蛋白参与病毒包装过程,这些已在麻疹病毒中得到证实(Cathomen et al., 1998)。通过麻疹病毒的生物学特征我们推断, PPRV M 蛋白以一种稳定的结构形式包裹病毒核衣壳(Liljeroos et al., 2011),且病毒的成熟可以调节 F 蛋白活性,从而改变 M 蛋白的分布(Cathomen et al.,1998b)。

病毒囊膜蛋白包含两种糖蛋白 H 及 F,病毒吸附到宿主细胞表面及与细胞膜融合的过程都发生在细胞质膜上。F 蛋白属于 I 型膜蛋白, PPRV F 基因的 5'非翻译区(UTR)长约 500bp,可以通过在细胞中稳定 mRNA 提高下游蛋白的翻译效率(Chulakasian et al., 2013)。相反, RPV 及犬瘟热病毒 F 基因的 5'UTR 对下游蛋白翻译没有影响(Evans et al.1990)。MV F 基因的 5'UTR 则对 F 蛋白翻译有抑制作用 (Takeda et al., 2005) 或者没有影响 (Chulakasian et al., 2013)。这可能是由于研究者采用了不同的检测系统以及不同的病毒株,所以未来还需要进一步确定是病毒还是宿主的因素。

H 蛋白参与结合到宿主细胞的受体, PPRV 与同属其它病毒一样都将淋巴细胞表面的 CD150 (即 SLAM, 淋巴细胞信号激活分子)及上皮细胞表面的 nectin-4 作为其受体 (Birch et al., 2013)。有趣的是,尽管麻疹病毒属病毒都利用同样的受体分子,且这些受体在能感染 PPRV 的哺乳动物中很保守,而不同的麻疹病毒成员的 H 蛋白则不如 F 蛋白保守性高 (Baron,2011)。H 蛋白的变异大的区域位于蛋白的“茎”的结构域而非与细胞受体结合的“球状”结构域。这种“球状”结构域属于 H 蛋白自身寡聚化及与 F 蛋白结合的区域 (Lee et al., 2008)。麻疹病毒属不同病毒的该区域的变异性可能是由于 PPRV H 及 F 蛋白可发生功能互作而不会与 RPV 的 H 或 F 互作的原因 (Das et al., 2000)。

目前,只有 MV 的 H 蛋白结构已经很明确,其可与 SLAM (Hashiguchi et al., 2011)及 nectin-4 (Zhang et al., 2013b) 形成晶体复合物。PPRV H 蛋白球状头部部分与 MV H 蛋白与 SLAM 及 nectin-4 结合的区域结构相似。该区域的氨基酸只在 Pro⁵⁴⁵(PPRV H 为 Thr)及 Phe⁴⁸³(PPRV H 为 Leu)两个位点有差异。然而, PPRV H 及 MV H 在 191-195 位氨基酸序列也有差异,该区域介导了 H-SLAM 的互作,决定病毒与宿主识别敏感性,该区域单个氨基酸改变有可能增加病毒对人细胞的敏感性,而 PPRV 通常对人的细胞不敏感 (Bailey et al., 2013)。

目前还不确定麻疹病毒属成员对不同 SLAM 的偏嗜性是否可以归为病原对宿主的选择性 (Birch et al., 2013; Tatsuo et al., 2001)。我们知道, PPRV 可以使一些物种(绵羊和山羊)致病,而另一些物种(如奶牛,水牛)呈现亚临床感染状态,如血清中可以检测到 PPRV 抗体。所以了解 SLAM 及 nectin-4 的偏嗜性是否是造成上述现象的主要因素是很有意义的。通过基因

突变麻疹病毒属病毒是否可以更有效的利用其它宿主的 SLAM 受体? 这是否将扩大它们的宿主范围? 进一步的对 PPRV H 蛋白与山羊/绵羊 SLAM 复合体及 PPRV H 蛋白与非敏感细胞 SLAM 复合体晶体结构的研究将帮助我们掌握 PPRV 感染其它哺乳动物细胞所需要的条件。

决定 PPRV H 宿主嗜性的其它因素也需要考虑 (李景玉等, 2014; 蒙学莲等, 2014)。如 MV H 蛋白结合宿主受体的区域是保守的中和抗原表位区域(Tahara et al., 2013)。麻疹病毒属病毒 H 蛋白具有相同的结合 SLAM 及 nectin-4 的结构域, 由于病毒识别宿主受体的需要, 基因突变型的免疫逃避是无法实现的。这也许可以解释为什么麻疹病毒属病毒均只有一种血清型并且几十年来很少发生抗原性转换。PPRV 是通过宿主进行传播的, 病毒感染早期主要在淋巴结中, 当病毒通过受体 nectin-4 进入上皮组织, 在感染后期才能在这些组织中检测到病毒。nectin-4 只存在于上皮细胞中, 所以 PPRV 感染出现病毒血症后, 这些细胞才能被感染。目前对 PPRV 受体功能的研究还不十分透彻, 进一步的深入研究需要建立 H 基因修饰的 PPRV 的感染性克隆株(即 H 基因修饰后不能感染细胞)。与其它麻疹病毒属成员相似, PPRV P 基因编码 P 蛋白, 随后与 N、L 蛋白及非结构蛋白 C 蛋白及 V 蛋白共同作用形成功能性复制体(Bailey et al., 2007)。V 蛋白及 C 蛋白有多种功能, 麻疹病毒属病毒 V 蛋白可抑制 I 型干扰素(IFN- β 及 IFN- α)的诱导产生及其抗病毒作用(Chinnakannan et al., 2013), PPRV V 蛋白不仅可以结合信号分子 STAT1 及 STAT2(Chinnakannan et al., 2013; Ma et al., 2015), 还可以通过抑制 IFN 受体相关激酶 Jak1 及 Jak2 来阻碍 STAT1 及 STAT2 的磷酸化(Chinnakannan et al., 2014)。此外, V 蛋白结合 STAT1 对 II 型干扰素(IFN- γ)也有抑制作用(Chinnakannan et al., 2013)。

PPRV V 蛋白通过多种方式抑制 IFN 诱导产生 MDA5(识别双链 RNA)或 RIG-I(识别双链或者单链 RNA)。这两种病原相关受体(PPRS)可以识别细胞质内复制的病毒(Gitlin et al., 2016; Habjan et al.2008)。PPRV V 蛋白通过结合 MDA5 来阻碍其对胞内双链 RNA 的识别(Andrejeva et al., 2004)。除了 MDA5, PPRV V 蛋白还可以结合与之相关的两种蛋白, LGP2 及 RIG-I。LGP2 的出现不会增强 RIG-I 与 V 蛋白的结合, 二者的结合的功能还不清楚。LGP2 对病毒感染诱导产生的 IFN 同时有正向及负向的调控作用(Rodriguez et al., 2014), 但它对 MDA5 及 RIG-I 介导的抗病毒作用非常重要(Satoh et al., 2010)。正如 PPRV V 蛋白在 IFN 信号通路的多个位点阻碍 IFN 的作用, 所以我们推测 V 蛋白可与 IFN 信号通路多个重要接头分子作用从而干扰 IFN 的激活。

PPRV C 蛋白同样对 IFN 的激活具有调控作用, 且可能在病毒感染初期发挥比 V 蛋白更重要作用。研究者通过反向遗传技术敲除 PPRV V 或 C 蛋白来研究其在 IFN 诱导产生中的抑制作用。有趣的是, V 蛋白敲除后病毒感染依然可以抑制 IFN 的诱导产生, 相反, 敲除 C 蛋白后病毒感染则不能抑制 IFN 的诱导。此外, V 蛋白敲除的 PPRV, 同野生型一样在病毒感染的 24 小时不产生 IFN, 但 C 蛋白敲除的 PPRV 却可产生 IFN。以上这些表明, PPRV V 蛋白通过 MDA5 途径来抑制 IFN 的诱导产生且这种作用发生在病毒感染后期 (Killip et al., 2011)。而 C 蛋白对 IFN 通路的抑制作用更加严格且发生在病毒感染早期, 但目前还不清楚 C 蛋白是否通过调控 IFN 翻译来抑制 IFN 诱导产生的 (Pfaller et al., 2014)。

1.1.1.5 疫苗

1.1.1.5.1 减毒活疫苗

由于 PPRV 的传播是已感染动物与健康动物密切接触造成的,所以最有效的防控措施是将易感动物隔离至非疫区。可以采取扑杀、消毒及对农民的补偿等方式控制疫情暴发。由于大多数 PPR 流行地区在发展中国家,这些强制措施实施起来比较困难,所以,在发展中国家,疫苗免疫是现有的最有效的防控措施(蒙学莲等,2014)。

如其它麻疹属病毒一样,PPRV 感染后最主要的病理学特征是病毒诱导产生的免疫抑制,并增加动物感染几率及导致更多动物感染该病毒(Baron et al., 2014a; Pope et al., 2013)。这种免疫抑制不仅是由病毒在淋巴细胞中增殖引起的,而且也是由于病毒在感染的不同阶段,发生了针对宿主天然免疫及适应性免疫应答反应。然而,这种免疫抑制效应是短暂的,当机体康复后也会获得针对该病原的特异、长效的免疫保护力(Cosby et al., 2006)。相比野生型毒株,麻疹属病毒弱毒苗引起机体的免疫抑制较弱,但依然可以产生有效的免疫保护力(Cosby et al., 2006; Rajak et al., 2005)。正是由于这些特征,致弱的牛瘟弱毒苗在全球消灭牛瘟的运动中发挥重要作用(Plowright and Ferris, 1962)。有了牛瘟弱毒苗的成功经验,研究者也尝试了 PPR 的减毒活疫苗,但起初并没有成功(Benazet, 1973; Gilbert and Monnier, 1962)。有了失败的经历后,后来的学者对 PPR 及 PPRV 的抗原性进行了对比并尝试利用 RPV 的减毒活疫苗免疫小反刍动物做免疫保护实验。尽管在免疫动物血清中检测不到 PPRV 的中和抗体,但这些动物可以得到有效保护,所以可作为预防 PPRV 的疫苗(Bourdin et al., 1970; Taylor et al., 1990)。随后在 1989 年,研究者通过将 PPRV Nigeria75/1 在 Vero 细胞中连续传代而得到了致弱的 PPR 减毒活疫苗(Diallo et al., 1989)。在 1989 年至 1996 年期间多次对该弱毒苗开展了田间试验并证实了其对山羊及绵羊的保护性。免疫动物所产生的抗 PPRV 抗体可至少持续三年,足以对动物进行有效保护。在该疫苗试验阶段,科研人员用不同的野生型 PPRV 去感染免疫动物,但均未发病,表明其可用于针对 PPRV 任何基因群的免疫接种。幸运的是科学家能开发出 PPRV 的疫苗,因为随着牛瘟在全球范围的消灭,牛瘟疫苗的使用也是被禁止的。

有了前期的经验,科学界也成功的将其它 PPRV 病毒株进行传代致弱。其中,PPRV Nigeria75/1(品系 II)及 PPRV Sungri/96(品系 IV)是现阶段使用最多、效果最好、基因组信息最清楚的弱毒苗(Diallo,2003, Diallo et al., 2007; Singh and Bandyopadhyay, 2015)。和其它副黏病毒一样,PPRV 也是热敏感性的。PPRV 疫苗从疫苗厂到田间的运输需要冷链条件。然而,大多数 PPR 流行的地区处于热带,而且供电等基础设施欠缺。这个问题的解决方案是改善 PPRV 弱毒苗冻干工艺,使其性能更加稳定,确保其可在 45℃保藏至少 14 天(Riyesh et al., 2011; Silva et al., 2014)。

1.1.1.5.2 新型疫苗

PPRV 减毒活疫苗最大的缺陷是无法通过血清学方法区分免疫了该疫苗的动物与自然感染及感染后康复的动物。所以对即将及已经实施疫苗免疫的地区开展流行病学调查增加了困难。解决这个问题并且能很好地防控 PPV 的办法就是使用一种能够区分自然感染与疫苗免

疫的疫苗。随着 DNA 重组技术的出现,人们可以通过不同的方法开发新型疫苗,方便暴发疫情的国家同时进行疫苗免疫及流行病学调查活动(Diallo et al., 2007)。

一种可能性是开发表达 PPRV 的抗原蛋白或抗原表位的重组疫苗,如采用 RPV 及新城疫病毒标记疫苗的制备方法(Walsh et al., 2000; Peeters et al., 2001)。但至今此种 PPRV 疫苗尚未报道。目前可行的方案是利用其它病毒作为载体表构建 PPRV 囊膜蛋白 H 及 F 或二者之一的重组表达质粒。由于此系统不表达 N 蛋白(免疫刺激蛋白),免疫动物后不产生 N 蛋白的抗体,所以可以区分自然感染及疫苗免疫的动物。

研究人员最初使用的载体是羊痘病毒(山羊及绵羊痘病毒)疫苗株,这样可以获得预防小反刍兽的两种重要疫病,PPR 及羊痘的二价疫苗。策略是将 PPRV H 及 F 蛋白基因分别插入致弱的羊痘病毒载体中,该重组质粒可以表达 PPRV 蛋白并能高效地保护免疫动物免受 PPRV 和羊痘的感染 (Berhe et al., 2003; Caufour et al., 2014)。这种载体系统自身的免疫反应不会对表达的 PPRV 蛋白有影响,但会对 PPRV 的感染起到保护作用(Caufour et al., 2014)。

另一种 PPR DIVA 疫苗利用了腺病毒载体。大量研究报道显示腺病毒可作为疫苗制备载体(Tatsis and Ertl, 2014)。它们通常可以很稳定地在细胞中进行复制并且成本较低,蛋白表达量却很高。由于腺病毒载体应用性很广,所以人 5 型腺病毒作为 PPRV 疫苗载体,不会因为其具有免疫原性影响对小反刍兽的保护性。研究人员还开发了许多提高 PPRV 疫苗的热稳定性的方法,方便去储存、运输及在热带地区的使用。实验证明,PPRV 的腺病毒载体疫苗可使免疫动物有效引起特异性的体液免疫及 T 细胞介导的细胞免疫,从而很好地使接种动物免于 PPRV 感染(Herbert et al., 2014; Rojas et al., 2014)。此外,犬腺病毒也用于 PPRV H 的表达载体,可诱导产生 PPRV 中和抗体,但是否具有免疫保护力尚无定论(Qin et al., 2012)。

1.1.2 宿主对 PPRV 的天然免疫应答

天然免疫是机体防御病毒入侵的第一道防线,通过模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs),识别病毒的核酸和蛋白质等病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs),将信号传导至细胞内重要的枢纽分子 Myd88/TRIF/MAVS/STING /caspase-1 等进行整合,激活相应的转录因子 IRF3/IRF7/NF- κ B/AP-1 及 STAT6,诱导 I 型干扰素和炎症因子的表达,进而激活 JAK/STAT 信号通路和细胞内的信号级联反应,诱导多种抗病毒蛋白表达。抗病毒蛋白主要通过抑制病毒基因转录、降解病毒 mRNA、阻断病毒的翻译起始、限制病毒蛋白生理功能等途径,介导抗病毒效应。另一方面病毒以多种方式逃避免疫监视,对抗模式识别受体及其信号通路,以建立有效的持续性感染。PPRV 就是这场博弈的一个典型实例 (Alexopoulou, 2001; Andrejeva, 2002)。病毒进入细胞后,其核酸和蛋白质等 PAMPs 将遭遇到胞内的 PRRs,识别后进一步激活下游信号,如 NF- κ B(nuclear factor- κ B)和干扰素调节因子(interferon-regulatory factors, IRFs)的活化、炎性小体(inflammasome)的组装等,诱导蛋白酶、核酸酶、干扰素(interferon, IFN)等效应分子的表达,清除 PAMPs。细胞的主要的 PRRs 包括 TLRs (Toll-like receptors)家族、NLRs (NOD-like receptors)家族、PYHIN (Pyrin and HIN domain-containing)家族和 RLRs (RIG-I-like receptors)家族等 (李天亮等, 2016)。副粘病毒 RNA 会在感染后释放到细胞质内,宿主细胞通过 MDA5、LGP2 或 RIG-I 等胞内 PRRs 识

别病毒 RNA, 激活的 PPRs 结合线粒体上的 MAVS 蛋白, 将信号转导至 IRF3/7, 最终激活 IRF3/7 形成异源二聚体, 作为反式作用因子结合宿主细胞基因组 IFN 启动子区, 启动 IFN 的表达, 经下游信号转导, 激活 IFN 活化基因(IFN-stimulated gene, ISG)的表达。可检测到副黏病毒诱导的抗病毒因子及 ISG 产物, 包括 dsRNA 依赖的蛋白激酶、2'-5'寡腺苷酸合成酶和 Mx 蛋白等抗病毒因子 (Berke, 2002; Blom et al., 1999; Blumberg, 1988)。研究显示, PPRV 感染的绵羊外周血淋巴细胞中 IFN- γ 、ISG15、IRF3 和 IL10 等表达量升高, 这些天然免疫因子在抗 PPRV 感染过程中可能发挥作用。

然而, 副黏病毒通过多条途径对抗天然免疫应答。逃避宿主的免疫监视, 是病毒建立感染的前提。病毒的逃避策略包括: (1) 干扰 IFN 的信号转导; (2) 抑制 IFN 的产生; (3) 抑制 IFN 诱导的抗病毒蛋白功能。副黏病毒科成员多利用第 2 类方式达到逃避宿主免疫系统的目的。相关研究起始于仙台病毒和副流感病毒 3 型, 发现副黏病毒能改变细胞的 IFN 信号转导途径, 使细胞对自分泌的 IFN 失去应答的能力。几乎所有副黏病毒的 V 蛋白都能通过阻碍 Tyk2 的磷酸化, 抑制 STAT1 及 STAT2 的活化, 阻断 I 型 IFN 信号通路。麻疹病毒 (Measles Virus, MeV) V 蛋白可以通过结合 MDA5、LGP2、IRF3 及 IRF7 来抑制 IFN 的产生。V 蛋白富含半胱氨酸的 C 端不仅可以结合 MDA5 及 IKK α 来抑制 IRF7 的活性, 还可以结合 NF- κ B 的亚基 P56 来抑制 IFN- β 及相关细胞因子的产生。MeV P 蛋白通过上调泛素修饰酶 A20 活性来干扰 TLR4 信号通路, 进而负调控 NF- κ B 活性。牛瘟病毒 (RPV) 及 MeV C 蛋白可以通过结合细胞核内的 IRF3 来影响 IFN- β 的转录而非通过抑制 IRF3 活性(Blom, 1999)。RPV 及 MeV N 蛋白也可以干扰 STAT1 及 STAT2 向细胞核内的运输, 从而影响 IFN 下游信号的活化。

PPRV 的 V、N 及 P 蛋白都被发现能通过抑制 ISRE 及 GAS 启动子活性来阻碍 IFN 信号转导, 以 V 蛋白的抑制活性最强。PPRV V 蛋白的 C 端利用其 Cys 残基和 Trp 残基结合 STAT2, 改变 STAT2 的细胞定位, 抑制 STAT2 介导的干扰素的信号转导; 而 PPRV V 蛋白的 N 端 Y110 位残基参与结合 STAT1, 改变 STAT1 的细胞定位, 抑制 STAT1 介导的干扰素的信号转导。PPRV C 蛋白虽不与 MAD5 或 RIG-I 结合, 但 C 蛋白缺失的 PPRV 病毒失去抑制 MAD5、RIG-I 介导的 IFN- β 产生的能力。PPRV 所编码的 8 种蛋白中有 4 种能借助不同途径介导免疫逃避, 由此赋予病毒强大的压制天然免疫反应的能力, 这很可能是 PPR 急性暴发和形成巨大危害的原因 (Blumberg, 1988)。

1.1.3 干扰素的抗病毒作用

干扰素是一种具有广谱的抗肿瘤、抗病毒、免疫佐剂及免疫调节作用的细胞因子, 在免疫调控中处于中心位置。干扰素有一个大家族, 包括 I 型、II 型及 III 型。I 型干扰素由多基因家族 IFN- α 、IFN- β 、IFN- ϵ 、~~IFN- δ~~ 等成员构成, II 型由单基因家族 IFN- γ 组成。而新发现的 III 型干扰素 IFN- λ 与 I 型 IFN 类似。干扰素与特异性受体结合, 起着第一信号的作用, 活化细胞膜腺苷酸环化酶, 促使 cAMP 增高作为第二信使, 从而激活细胞内抗病毒作用机制, 产生一组抗病毒物质。由于干扰素具有如此强大的功能, 因此在人类临床医学中得到了广泛应用。IFN 类药物中, IFN- α 2a 和 IFN- α 2b 被用于抗各种病毒感染, 特别是由 HBV、HCV 引起的慢性非活动性肝炎、人 T 细胞白血病病毒骨髓症等。IFN- γ 可激活 Th1 细胞从

而促进细胞免疫功能,使免疫原性弱的癌细胞可激活细胞免疫应答。 $\text{IFN-}\gamma$ 也有可能成为慢性肉芽肿、慢性风湿性关节炎及部分肿瘤的治疗药物。 $\text{IFN-}\lambda$ 具有抗病毒功能,但科学界对其的研究还处于初期,将 $\text{IFN-}\lambda$ 开发为临床药物相关药物有很长的路要走。研究表明,在HepG2细胞上,重组的人源IL-29和IL-28a可以有效的减弱单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)在细胞中的复制和对细胞的毒性。当流感病毒感染肺脏后,外源性的IL-28a/b具有很强的抗病毒活性,这在一定程度上说明 $\text{IFN-}\lambda$ 在黏膜免疫方面发挥重要作用。HIV侵入人巨噬细胞后,IL-29和IL-28a可有效抑制HIV在细胞中的活性,甚至 $\text{IFN-}\lambda$ 可以有效阻止耐药性HIV侵入巨噬细胞(Belgnaoui et al., 2011)。这些实验结果表明, $\text{IFN-}\lambda$ 在抗击人类病毒感染的过程中其抗病毒功能与I型 IFN 极为相似,暗示了二者在一些生物学功能上具有相似性。但是需要指出的是,I型 IFN 与 $\text{IFN-}\lambda$ 作用的效应靶细胞不同。I型 IFN 的受体 IFNARs 在哺乳动物细胞上普遍存在,而 $\text{IFN-}\lambda$ 受体 $\text{IL-28R}\alpha$ 仅能在上皮细胞或者免疫细胞(诸如,树突状细胞和巨噬细胞)中表达。因此, $\text{IFN-}\lambda$ 的免疫功能在黏膜组织中的作用更加明显。

随着体外实验对 $\text{IFN-}\lambda$ 抗病毒活性的不断被证实,研究者开始利用小鼠模型来研究 $\text{IFN-}\lambda$ 在体内的抗病毒功能。当疱疹类病毒感染小鼠后,利用外源重组 $\text{IFN-}\lambda$ 可以有效抵抗诸如HSV和牛痘病毒在小鼠表皮上的增殖。腮腺炎病毒能够借助RIG-I与MAVS模式识别受体途径,在IRF3的参与下,激活 $\text{IFN-}\lambda$ 与 $\text{IFN-}\beta$ 编码基因,从而令机体进入抗病毒模式(Bellini, 1985)。为了评估I型 IFN 与III型 IFN 在抗病毒方面的权重,研究人员利用重组 $\text{IFN-}\lambda$ 治疗被流感病毒感染缺失I型 IFN 受体小鼠($\text{IFNAR}^{-/-}$ 基因鼠)后发现,外源重组 $\text{IFN-}\lambda$ 可以有效在患鼠肺部开展抗病毒效应。这些实验进一步证实 $\text{IFN-}\lambda$ 在抗击病毒感染过程中发挥着与I型 IFN 相似的功能。是由此推测,在I型 IFN 存在的情况下, $\text{IFN-}\lambda$ 似乎是一个“双保险”。这也给机体免疫系统提出了一个新的问题,病毒所表现出来的对I型 IFN 免疫逃避的功能对 $\text{IFN-}\lambda$ 也是有效的。然而,酪氨酸激酶2 (tyrosine kinase 2, TYK2)这种在I型、III型 IFNs 以及众多白细胞介素相关的信号转导中十分重要的信号分子活性受到抑制的时候,虽然I型 IFN 的抗病毒效果明显降低,但是III型 IFN 与自然杀伤细胞组成的抗病毒防线依旧抵抗着病毒感染。

1.1.4 自噬相关蛋白在天然免疫中的作用

细胞自噬(autophagy),又称为II型细胞死亡,是细胞在自噬相关基因(autophagy-related gene, Atg)的调控下利用溶酶体降解自身受损的细胞器和大分子物质的过程(Samie et al. 2018)。细胞自噬与细胞凋亡、细胞衰老一样,是十分重要的生物学现象,参与生物的发育、生长等多种过程(Subramani and Malhotra, 2013; Kemp et al., 2017; Wani et al., 2018)。自噬的发生依赖于Atg编码的自噬相关蛋白,已发现的8个Atg及5个自噬相关因子组成了5个功能复合体:Atg1/ULK1蛋白激酶复合体、Vps34-Atg6/Beclin1和III型PI3K复合体、Atg9/mAtg9、Atg5-Atg12-Atg16连接系统和Atg8/LC3连接系统,其中ULK1激酶复合体由ULK1、RB1CC1及ATG101构成,在调控自噬起始过程中发挥重要作用(Bestebroer et al., 2013; Mauthe et al., 2016; Zhou et al., 2017)。而Atg13蛋白是ULK1复合体的核心蛋白,可作为一个纽带招募ULK1、RB1CC1及ATG101形成ULK1复合物,从而迈出自噬发生的第一步(图1.1)。

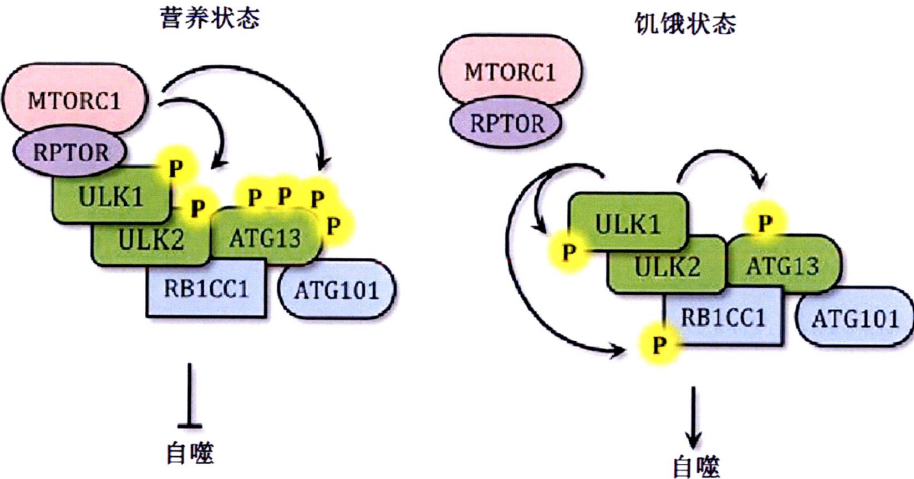


图 1.1 Atg13 蛋白生物学功能机制

Fig.1.1 Mechanism of biological functions of Atg13 protein

Atg13 蛋白由三个功能结构域组成，其中 N 端为 HORMA 结构域，结合 Atg101，是 ULK1 复合体形成的基础；C 端及中部的 MAP1LC3/LC3 结合结构域可结合除 ULK1 复合体之外的自噬相关蛋白，但具体的功能还不十分清楚。Atg13 蛋白在自噬过程中发挥重要的生理功能，是自噬研究的焦点之一 (Popelka and Klionsky, 2017)。随着研究的深入，研究者发现 Atg13 蛋白除了启动自噬过程外，还参与了细胞其他重要的生理过程，如基因修复、蛋白逆转运、细胞凋亡以及免疫应答等。与其它 Atg 基因不同，当敲除 *Atg13* 基因后，小鼠胚胎发育停滞且心肌发育缺陷，最终导致胚胎在子宫中死亡。此外，Atg13 及 FIP200 敲除的个体，对 TNF α 诱导的细胞凋亡也更敏感 (Niu et al., 2018)。Mauthe 等通过 siRNA screen 方法筛选到至少 36% 的 Atg 蛋白参与调控 6 种病毒的复制，证实其中 Atg13 及 FIP200 两种蛋白参与调控小 RNA 病毒脑心肌炎病毒(Encephalomyocarditisvirus, EMCV)及柯萨奇病毒(Coxsackievirus, CV)的复制。研究者还发现，Atg13 敲除后 CV 复制受到了抑制，而 EMCV 及其它小 RNA 科病毒的复制能力却提高了，提示 Atg13 蛋白具有自噬以外的生理功能 (Luo et al. 2017; Wallot-Hieke et al., 2017)。研究者也发现其他 Atg 蛋白同样会参与自噬以外的生理功能，其中 ATG5-ATG12 能正向调控 NF- κ B 信号通路，参与口蹄疫病毒 (Foot-and-Mouth Disease Virus, FMDV) 的复制。与正常细胞相比，FMDV 在 ATG5-ATG12 敲除的 PK-15 细胞中的复制能力显著提高 (Fan et al., 2017)。

1.1.5 病毒唑(ribavirin)在抗病毒临床中的应用

病毒唑(三氮唑核苷, Ribavirin)是一种具有广谱的抗病毒功能的核苷类似物，经体内及体外实验证实对多种 DNA 和 RNA 病毒有明显的抑制作用，临床使用广泛，用于防治流感、

副流感、甲、乙、丙型肝炎、麻疹、腮腺炎、水痘、单纯疱疹、带状疱疹、病毒性眼角膜炎、疱疹性口腔炎、小儿腺病毒肺炎,可能还有抗肿瘤作用 (Fuji et al., 1999)。Ribavirin 是一种临床上常用的药物,它通常单独或与其它药物结合使用,对治疗 HCV 感染、呼吸综合征病毒感染及拉沙热病毒感染引起的疾病有良好的疗效。动物病毒实验表明, Ribavirin 具有抗口蹄疫病毒、三文鱼贫血症病毒、病毒性出血性败血症病毒、副流感病毒的活性。在小鼠体内, Ribavirin 与黄岑素结合治疗流感的效果好于单独使用其中任何一种药物。值得一提的是,博尔纳病毒 (Borna disease virus, BDV) 是一种高度嗜神经的 RNA 病毒,是人畜共患病博尔纳病 (Borna disease, BD) 的病原体,可引起从鸟到灵长类的多种动物的中枢神经系统感染,表现为以中枢神经系统功能障碍为特征的 BD。研究人员利用浓度为 1 到 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 Ribavirin 处理感染 BDV 的 MDCK 细胞,发现 BDV 的复制被抑制。此外,当用 20 μM Ribavirin 处理急性感染 BDV 的神经细胞,发现病毒的毒价及基因转录水平均明显下降。Ribavirin 可能通过以下几种机制来抑制病毒复制的:①减少细胞内的 GTP;②调控免疫应答;③致死突变;④抑制病毒聚合酶活性;⑤通过阻遏翻译起始因子 4E 从而阻碍病毒基因翻译过程。研究证实 Ribavirin 抑制 HEV 感染可能是通过抑制肌苷酸-5'-磷酸脱氢酶 (inosine-5'-monophosphate dehydrogenase, IMPDH), 阻断肌苷酸转化为鸟苷酸,减少细胞内的 GTP pool,从而抑制病毒的 RNA 和 DNA 合成的机制。霉酚酸 (Mycophenolic acid, MPA), 是一种免疫抑制剂,可逆地抑制 T 和 B 淋巴细胞的增殖以及抗体形成,也是一种 IMPDH 非竞争性的抑制剂,通过取代烟酰胺腺嘌呤二核苷酸辅因子的烟酰胺部分和一个催化的水分子,抑制 IMPDH 活性,而 IMPDH 是嘌呤合成过程中一种关键的酶,所以也被国内外广泛用作一种抗病毒药物。

1.1.6 宿主细胞黏着斑蛋白对病毒复制的影响

黏着斑蛋白 (Vinculin), 是一种细胞骨架蛋白兼粘着斑组成蛋白,主要分布于细胞骨架及其信号通路,在病毒吸附及进入细胞过程中发挥不可或缺的作用。Vinculin 通过与多种粘着斑蛋白、细胞骨架蛋白及细胞骨架 F-肌动蛋白相结合并相互作用,参与细胞的动力学、化学信号转导,在细胞粘附、伸展、运动、增殖、存活等过程中起重要作用 (Garakani et al., 2017)。黏着斑复合体发挥整合细胞骨架及细胞表面信号的功能。黏着斑蛋白是黏着斑的成员之一,主要介导整合素与细胞骨架的连接,该蛋白具有 8 个 α 螺旋束组成的 5 个结构域 (Huang et al., 2017)。Vinculin 通过与自身结构域与踝蛋白、桩蛋白等其它黏着斑蛋白相互作用,共同参与信号转导从而参与信号转导调节黏着斑及细胞骨架动力学 (Sehgal et al., 2018)。研究表明,黏着斑蛋白可通过介导黏着斑的形成、解散以及微丝与细胞膜的连接、解聚来促使细胞迁移,也可以通过稳定黏着斑抑制细胞迁移。所以我们推测, Vinculin 可能会介导病毒进入细胞后沿着细胞骨架迁移过程。研究发现,在逆转录病毒感染过程中, Vinculin 参与整合素蛋白与肌动蛋白的结合,当过表达 Vinculin 基因时,宿主细胞对艾滋病病毒 (HIV) 及鼠白血病病毒的敏感性降低。相反,当 Vinculin 基因被瞬时敲低后, HIV 及猿猴免疫缺陷病毒对宿主细胞的感染性增强,表明 Vinculin 蛋白具有抑制逆转录病毒的功能。

CRISPR/CAS (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) 系统由 CRISPR 基因簇和 CAS 蛋白组成,是古细菌和细菌应对噬菌体感染的一种适应性免疫应答机制,最早

在大肠杆菌基因中发现。CRISP 通常由前导区 (leader)、间隔区(speacer)以及重复序列区(repeats)三部分组成。原间隔序列旁侧存在一个保守的短序列, 称为 PAM (protospacer-adjacent motif), 该序列作为 Cas 蛋白对原间隔序列识别的一个序列信号。在 CRISPR 位点侧旁通常包含一组保守的 CRISPR 相关基因(CRISPR-associated genes, Cas genes), 可以编码具有核酸酶和解旋酶活性的 Cas 蛋白。Cas 蛋白与 CRISPR 转录出来的 RNA 共同组成蛋白质核酸复合物, 并发挥免疫功能 (Kennedy et al., 2015)。Cas9 是 Cas 蛋白家族中的一员, 与 CRISPR 共同构成 II 型 CRISPR/Cas 系统, 行使其核酸内切酶功能, 对靶点 DNA 序列进行特异性切割, 从而实现对基因组的精确编辑 (Yin et al., 2015)。原核细胞大多缺乏非同源末端连接修复系统, 需对切割的基因组 DNA 进行人工同源重组修复, 进而实现原核基因组精确的敲除、修饰等 (Jia et al., 2017)。自 1987 年首次发现 CRISPR 基因簇, 到如今仅仅经历了三十年时间, CRISPR/Cas 技术得到了广泛应用, 如构建动物模型、修复突变基因、敲除致病基因、诱导多能干细胞等, 随着该技术的进一步优化, 相信该系统必将在以后的临床治疗中发挥更重要的作用 (Bartkowiak et al., 2015; Mefferd et al., 2015)。

1.2 研究的目的与意义

综上所述, 在 PPRV 相关的研究领域内, PPRV 所表现出来针对易感动物的高度宿主适应性以及抵抗机体免疫反应的能力仍旧是困扰广大研究人员的难题。本研究借助病毒遗传特征分析手段、成熟的抗病毒免疫筛选技术以及细胞特定基因定点敲除技术来开展针对 PPRV 在遗传进化以及哺乳动物细胞在抗击 PPRV 侵染过程中相关免疫因子以及细胞自身蛋白对病毒复制的抵抗作用。通过本研究所获得的相关结果可以为今后在开发防控 PPRV 侵染宿主新技术提供具有参考价值的实验数据。

第二章 PPRV 基因组遗传进化的特征

PPRV 是一种高度传染性和烈性的致病原，PPRV 被划归在副黏病毒科，麻疹病毒属。这种具有囊膜结构的病毒在长度约为 16,000nt 的负链 RNA 中含有 6 个编码结构蛋白的基因。分别是核衣壳蛋白基因 (N 基因)、磷酸化蛋白基因 (P 基因)、基质蛋白基因 (M 基因)、融合蛋白基因 (F 基因)、血凝素蛋白基因 (H 基因)以及多聚蛋白基因 (L 基因)。H 和 F 蛋白（两种膜表面糖基化蛋白）在 PPRV 侵染靶细胞的过程中起到粘附和侵入细胞的生物学作用，M 蛋白是维持病毒颗粒稳定的重要蛋白，而 L 蛋白、P 蛋白和 N 蛋白是 PPRV 产生病毒 RNA 多聚酶学活性的重要病毒蛋白。其中，N 基因在 PPRV 病毒基因组复制过程中起到重要作用，且 N 蛋白在麻疹病毒属中十分保守。当前，由于 PPRV 流行毒株全序列被公布的较为稀少，对于深入研究 PPRV 在遗传进化过程中遗传特质的改变带来了种种限制。为了在有限的全序列资源中找到更多 PPRV 的遗传特点，本研究分析比较现已公布的 PPRV 全序列，分析了不同基因在遗传进化中的特点，并且深入分析了 N 基因遗传物质的结构布局对于 N 蛋白高级结构的正确形成过程中所发挥的潜在作用。

2.1 实验材料

2.1.1 PPRV 基因组序列

45 株 PPRV 在世界上流行并且被研究人员成功获取全基因组序列的相关信息是从 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 网站的 Genbank 数据库中 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) 获得的。所有 PPRV 毒株序列的背景信息参见表 2.1。

表 2 1 45 个 PPRV 全基因组的背景信息
Table 2.1 Information about 45 PPRV genomes

毒株名称	分离地点	分离年代	Genbank 序列号	遗传谱系
Nigeria/75/1	尼日利亚	1975	X74443	I 型
Sungri 1996 MSD	印度	1996	KJ867542	IV 型
China/Tib/07	中国	2007	JF939201	IV 型
China/Tibet/30/2007	中国	2007	FJ905304	IV 型
China/33/2007	中国	2007	KX421388	IV 型
China/Tibet/Bharal/2008	中国	2008	JX217850	IV 型
Cote d'Ivoire 89	科特迪瓦	1989	EU267273	I 型
Nigeria 76/1	尼日利亚	1976	EU267274	II 型
Turkey 2000	土耳其	2000	NC-006383	IV 型
CIV 01 P 2009	科特迪瓦	2009	KR781451	II 型

Ethiopia 1994	埃塞俄比亚	1994	KJ867540	III 型
Ethiopia 2010	埃塞俄比亚	2010	KJ867541	IV 型
Ghana NK1 2010	加纳	2010	KJ466104	II 型
Oman 1983	阿曼	1983	KJ867544	III 型
UAE 1986	沙特阿拉伯	1986	KJ867545	III 型
India/TN/Gingee/2014	印度	2014	KR261605	IV 型
Uganda 2012	乌干达	2012	KJ867543	III 型
Morocco 2008	墨西哥	2008	KC594074	IV 型
China/XJYL/2013	中国	2013	KM091959	IV 型
China/XJ2/2013	中国	2013	KX421384	IV 型
China/XJ3/2013	中国	2013	KX421385	IV 型
China/XJ4/2013	中国	2013	KX421386	IV 型
China/XJ5/2013	中国	2013	KX421387	IV 型
China/GS2014	中国	2014	MF443351	IV 型
China/NX2014	中国	2014	MF443340	IV 型
ChinaLN2014	中国	2014	MF443341	IV 型
ChinaCQ2014	中国	2014	MF443353	IV 型
ChinaHLJ2014	中国	2014	MF443346	IV 型
ChinaYN2014	中国	2014	MF443336	IV 型
ChinaSaX2014	中国	2014	MF443339	IV 型
ChinaJX2014	中国	2014	MF443342	IV 型
ChinaJL2014	中国	2014	MF443344	IV 型
ChinaJS2014	中国	2014	MF443343	IV 型
ChinaHeN2014	中国	2014	MF443347	IV 型
ChinaHB2014	中国	2014	MF443348	IV 型
ChinaAH2014	中国	2014	MF443354	IV 型
ChinaSX2014	中国	2014	MF443337	IV 型
ChinaGX2014	中国	2014	MF443350	IV 型
ChinaGZ2014	中国	2014	MF443349	IV 型
ChinaZJ2014	中国	2014	MF443335	IV 型
ChinaHN2014	中国	2014	MF443345	IV 型
ChinaGD2014	中国	2014	MF443352	IV 型
ChinaSC2014	中国	2014	MF443338	IV 型
PPRV-FY 2016	中国	2016	KX354359	IV 型
PPRV/Mongolia/9/2016	蒙古国	2016	KY888168	IV 型

2.1.2 宿主密码子数据

羊（*Ovis aries*）是 PPRV 的易感动物，羊的密码子使用数据是参考已有研究报告而获得的（参见表 2.2）。

表 2.2 羊密码子相对使用频率
Table 2.2 The relative synonymous codon usage values (RSCU) of *Ovis aries*

Codon	RSCU	Codon	RSCU
UUU(F)	0.94	GCU(A)	1.18
UUC(F)	1.06	GCC(A)	1.55
UUA(L)	0.24	GCA(A)	0.90
UUG(L)	0.49	GCG(A)	0.37
CUU(L)	0.74	UAU(Y)	0.72
CUC(L)	1.83	UAC(Y)	1.28
CUA(L)	0.24	CAU(H)	1.08
CUG(L)	2.46	CAC(H)	0.92
AUU(I)	0.63	CAA(Q)	0.57
AUC(I)	1.74	CAG(Q)	1.43
AUA(I)	0.63	AAU(N)	0.49
GUU(V)	0.46	AAC(N)	1.51
GUC(V)	0.91	AAA(K)	0.68
GUA(V)	0.36	AAG(K)	1.32
GUG(V)	2.27	GAU(D)	0.66
UCU(S)	0.91	GAC(D)	1.34
UCC(S)	1.28	GAA(E)	0.75
UCA(S)	0.48	GAG(E)	1.25
UCG(S)	0.28	UGU(C)	0.72
AGU(S)	1.48	UGC(C)	1.28
AGC(S)	1.58	CGU(R)	0.82
CCU(P)	1.26	CGC(R)	1.15
CCC(P)	1.29	CGA(R)	0.89
CCA(P)	1.03	CGG(R)	0.86
CCG(P)	0.42	AGA(R)	1.12
ACU(T)	0.78	AGG(R)	1.16
ACC(T)	2.05	GGU(G)	0.92
ACA(T)	0.78	GGC(G)	1.33
ACG(T)	0.38	GGA(G)	1.05
		GGG(G)	0.71

2.2 实验方法

2.2.1 PPRV 基因核苷酸使用偏嗜性的分析

我们利用生物分析软件 MEGA5.0 将每条全基因组序列中六种病毒基因（F、H、L、M、N 和 P 基因）的核苷酸成分进行计算。然后利用信息熵（information entropy）对四种核苷酸成分变化进行综合评价（Wang et al., 2017）。所分析的内容包括核苷酸在基因水平上的使用偏嗜性（Total）、核苷酸在密码子第一位核酸位置处的使用偏嗜性（N1）、核苷酸在密码子第二位核酸位置处的使用偏嗜性（N2）以及核苷酸在密码子第三位核酸位置处的使用偏嗜性（N3）。计算公式如下：

$$Entropy = -\frac{\sum f_i \times \log_2(f_i)}{4}$$

$$f_i = \frac{F_i}{F(A) + F(T) + F(G) + F(C)}$$

其中：F(A)、F(T)、F(G)和 F(C)分别是四种核苷酸 A、T、G 和 C 的百分含量， F_i 是任意一种核苷酸的含量， f_i 是任意核苷酸含量的比值。*Entropy* 数值的值域为[0,1]，其反映的是四种核苷酸含量变化导致整体核苷酸使用模式的离散程度大小。*Entropy* 数值越低说明整体核苷酸使用离散度越小，也就是核苷酸使用模式的偏嗜性越强；与之相反，*Entropy* 数值越高说明整体核苷酸使用离散度越大，也就是核苷酸使用模式的偏嗜性越强。

2.2.2 PPRV 基因密码子使用偏嗜性的分析

为了在分析密码子的过程中不被所分析基因的长度以及所编码氨基酸成分变化所影响，我们利用相对密码子使用模式（relative synonymous codon usage value, RSCU）的计算公式来进行相关计算。计算公式如下：

$$RSCU = \frac{g_{ij}}{\sum_j g_{ij}} \cdot n_i$$

其中， g_{ij} 是第 j 个氨基酸对应的第 i 个密码子的实际观测值， n_i 是这个氨基酸所对应的同义密码子的个数。RSCU 数值大于 1.0 说明密码子使用程度强，反之，RSCU 数值小于 1.0 说明密码子使用程度弱。当 RSCU 值等于 1.0 说明此种同义密码子在使用上是等均机会并且是随机的(Sharp and Li, 1986)。

我们将 45 株 PPRV 按照分离地点和分离时间分为 6 组，I~VI 组分别对应的是中国以外国家和地区流行的三种遗传谱系（lineage I-III）的毒株，IV 组为国外流行 PPRV 遗传谱系 IV（lineage IV）的病毒株，V 组为 PPRV 遗传谱系为 lineage IV 的病毒首次在中国西藏地区（2007 年-2008 年）暴发的病毒株，VI 组为 PPRV 遗传谱系为 lineage IV 在 2013 至 2015 年大流行于中国多个地区的病毒株。利用 RSCU 计算公式针对这 6 组病毒株的计算，可以很

好地分析我国两次暴发 PPRV 疫情所流行的毒株与国外已经报道的毒株之间同义密码子使用的异同点。

2.2.3 PPRV 与宿主密码子使用的相似性

通过 CAIcal 服务器进行相关计算 (<http://genomes.urv.es/CAIcal>) (Puigbo et al., 2008), 我们借助密码子适应指数 (codon adaptation index, CAI) 来分析 PPRV 不同基因对于易感宿主在密码子使用方面的适应程度 (Sharp and Li, 1987)。CAI 的值域为[0,1], 数值越大说明 PPRV 基因在密码子使用模式上与宿主密码子使用模式的相似性越高。

2.2.4 PPRV 核衣壳蛋白 (N) 二级结构的分析

由于 PPRV N 蛋白在病毒基因组复制过程中发挥着关键作用, 并且 N 蛋白在麻疹病毒属成员中十分保守, 这就为分析 PPRV N 蛋白结构提供了可信度高的参考模板。麻疹病毒 N 蛋白的高级结构已经通过晶体衍射的方法获得, 相关信息将为 PPRV N 蛋白利用 SWISS-MODEL 服务器 (<https://swissmodel.expasy.org/>) 来进行 PPRV N 蛋白高级结构的模拟提供可靠的信息支持。通过计算模拟所获得的 PPRV N 蛋白结构文件可以利用 DeepView (Swiss Pdb Viewer) 软件进行读取和分析。

依靠模拟出来的 PPRV N 蛋白的结构信息, 三种多肽折叠构象 (α -螺旋、 β -折叠和无规卷曲) 在 PPRV N 蛋白结构中的分布和组成结构就可以确定。根据计算 PPRV N 蛋白含有的特定折叠构象对密码子使用的选择偏嗜性来鉴定同义密码子使用的偏嗜性与不同折叠构象之间的相关性。计算公式如下:

$$P = \frac{f_{obs}}{f_{exp}}$$

$$f_{obs} = \frac{N_{(i, sec-k)}}{N_{(k)}}$$

$$f_{exp} = \frac{\sum N_{(i, sec-j)}}{N_{total}}$$

其中, $N_{(i, sec-k)}$ 是氨基酸对应特定同义密码子在特定的折叠构象中的实际观测值, $sec-k$ 代表了目标折叠构象 (α -螺旋、 β -折叠或者无规卷曲); $N_{(k)}$ 代表特定折叠构象中特定氨基酸的实际观测值。 $\sum N_{(i, sec-j)}$ 是特定折叠构象中氨基酸的总数, $sec-j$ 是特定折叠构象 (α -螺旋、 β -折叠或者无规卷曲) 的代号, 而 N_{total} 则是 PPRV N 蛋白中密码子的总数。当 P 值大于 1.5 的时候, 说明这个密码子具有强偏嗜来翻译对应氨基酸于特定的折叠构象中; 而当 P 值小于 0.5 的时候, 则说明特定折叠构象所对应的目标氨基酸避免使用此种同义密码子来进行翻译表达 (Zhou et al., 2013)。

此外, 我们依靠 PPRV 易感宿主 (羊) 密码子使用频率的数据 (表 2.2) 来模拟宿主细胞 tRNA 丰度的变化对两种不同折叠构象过渡节点处翻译速率的影响, 从而分析宿主细胞中翻译速率对不同折叠构象之间的转换是否有影响。计算公式如下:

$$R=\sqrt[n]{\prod_1^n(W_{ij}/W_j)}$$

其中， R 值代表 PPRV N 基因特定密码子位点的总体密码子使用偏嗜性， W_y 代表氨基酸(j)所对应的特定密码子(i)， W_j 代表氨基酸(j)所对应的最大使用频率（RSCU 值）的同义密码子，而 n 代表 45 个 PPRV N 基因数量。当某种密码子位点对应的 R 值接近于 1.0 的时候，则表示此处密码子位点所对应的是高丰度 tRNA，反之，密码子位点对应的 R 值接近于 0.00 的时候，则说明 tRNA 丰度在此处密码子位点的丰度低。

2.3 实验结果

2.3.1 PPRV 在基因水平上核苷酸使用模式

通过分析 PPRV 6 个基因核苷酸成分以及密码子每个位点核苷酸成分的变化，A%、A1%、U2% 以及 A3% 在 F 基因中含量较高；A%、A1%、U2% 以及 U3% 在 H 基因中的含量较高；A%、A1%、A2% 以及 C3% 在 L 基因中含量较高；A%、A1%、U2% 以及 C3% 在 M 基因中含量较高；A%、G1%、U2 以及 G3% 在 N 基因中含量较高；A%、G1%、A2%以及 C3% 在 P 基因中含量较高（表 2.3）。

表 2.3 PPRV 6 种基因核苷酸成分
Table 2.3 Nucleotide usages in the six genes of PPRV

	F 基因	H 基因	L 基因	M 基因	N 基因	P 基因
U%	24.16±0.27	26.46±0.22	25.97±0.09	23.91±0.34	21.31±0.24	20.97±0.30
C%	21.93±0.22	22.22±0.17	21.97±0.11	22.34±0.23	23.21±0.21	23.78±0.24
A%	29.97±0.25	27.02±0.12	29.11±0.09	29.41±0.29	27.76±0.18	31.06±0.20
G%	23.95±0.20	24.30±0.17	22.95±0.09	24.35±0.22	27.73±0.17	24.19±0.28
U1%	17.28±0.31	19.08±0.24	20.84±0.19	17.76±0.32	15.67±0.32	15.18±0.25
C1%	18.02±0.23	20.17±0.15	19.11±0.16	18.37±0.43	18.93±0.28	19.22±0.31
A1%	33.96±0.28	30.98±0.29	31.81±0.14	32.18±0.17	29.00±0.32	30.35±0.25
G1%	30.74±0.24	29.76±0.26	28.24±0.08	31.69±0.33	36.40±0.27	35.25±0.23
U2%	31.82±0.30	32.35±0.25	30.67±0.04	32.72±0.15	28.69±0.13	22.68±0.19
C2%	23.97±0.69	21.24±0.29	20.45±0.05	18.82±0.20	23.60±0.11	24.53±0.23
A2%	27.15±0.29	27.38±0.18	31.15±0.06	29.39±0.24	28.56±0.12	36.02±0.37
G2%	17.07±0.32	19.03±0.16	17.74±0.10	19.07±0.20	19.14±0.12	16.76±0.29
U3%	23.38±0.56	27.96±0.59	26.40±0.31	21.23±0.95	19.57±0.76	25.06±0.85
C3%	23.80±0.83	25.26±0.44	26.35±0.38	29.83±0.99	27.08±0.69	27.58±0.63
A3%	28.79±0.76	22.69±0.46	24.36±0.29	26.64±0.89	25.70±0.56	26.81±0.31
G3%	24.03±0.34	24.10±0.62	22.89±0.31	22.30±0.66	27.64±0.37	20.55±0.47

通过单因素方差分析,整体基因水平上每种核苷酸成分的变化都是与不同密码子位点相应核苷酸成分变化差异显著的($p < 0.0001$) (图 2.1)。这也充分体现出核酸成分的变化是因病毒基因种类的差异而改变的。

值得注意的是,四种核酸含量变化无法量化整体核酸使用模式的偏嗜性,因此利用信息熵的计算方法来将图 2.1 中核酸使用模式进行量化后发现,整体核酸使用模式以及不同密码子位点核酸使用模式之间差异极显著 ($p < 0.0001$) (图 2.2)。对于最强偏嗜的整体核酸使用模式出现在 H 基因 (图 2.2a); 密码子第一位点核酸使用模式的最强偏嗜存在于 L 基因 (图 2.2b); 密码子第二位点核酸使用模式的最强偏嗜性存在于 N 基因 (图 2.2c); 密码子第三位点核酸使用模式的最强偏嗜性存在于 L 基因 (图 2.2d)。量化后的核酸使用模式进一步表明 PPRV 不同基因在核酸成分变化过程中主要是根据基因种类的不同而形成差异的,而不是单纯受到整体 PPRV 基因组核酸成分变化的特点来改变的。

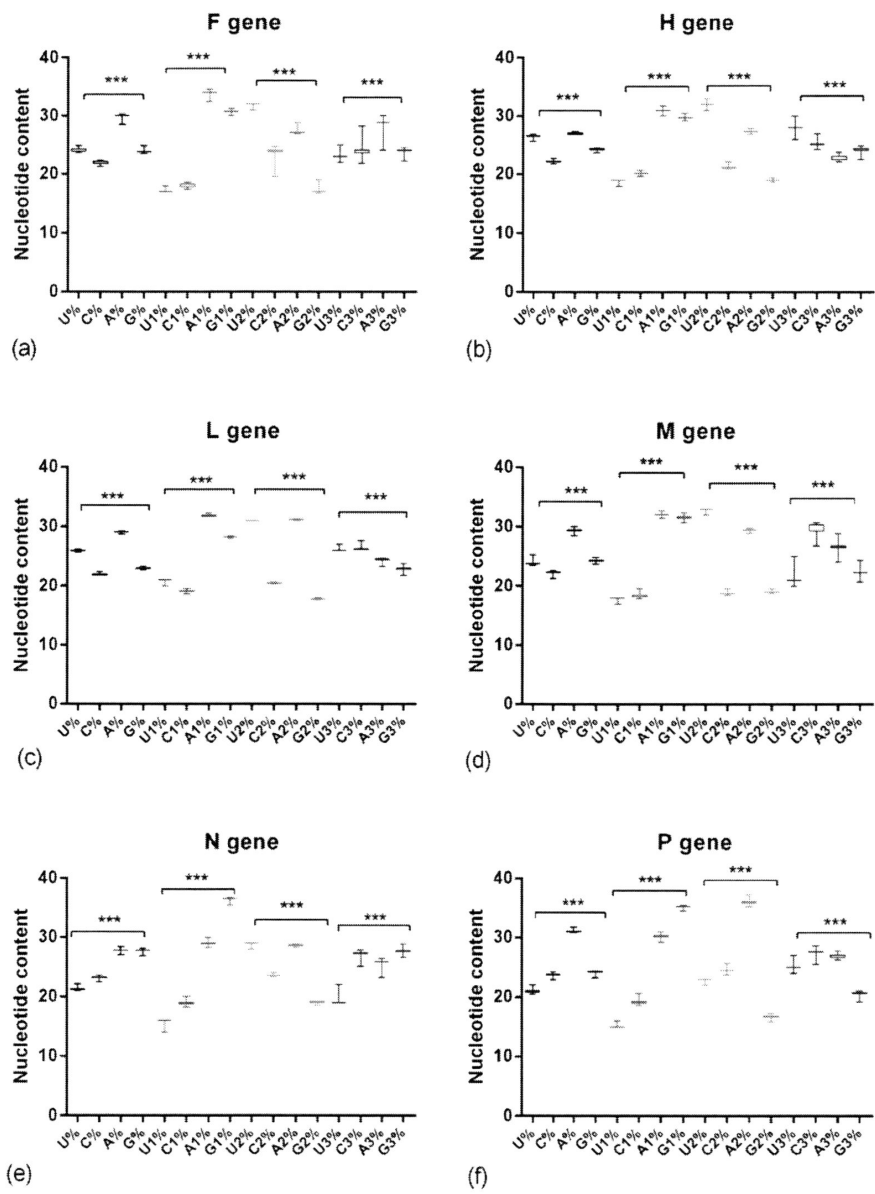


图 2.1 PPRV 不同基因的核苷酸成分

Fig.2.1 Nucleotide content of PPRV coding sequences and different codon positions.

U%、C%、A% 和 G% 代表整体含量；U1%、C1%、A1% 和 G1% 代表密码子第一位的含量；U2%、C2%、A2%以及 G2% 代表密码子第二位的含量；U3%、C3%、A3%以及 G3% 代表密码子第三位的含量。(a)F 基因；(b)H 基因；(c)L 基因；(d)M 基因；(e)N 基因；(f)P 基因。单因素方差分析分别分析这四种核酸成分变化的差异性，当 $p < 0.001$ 的时候，利用 ***进行标注。

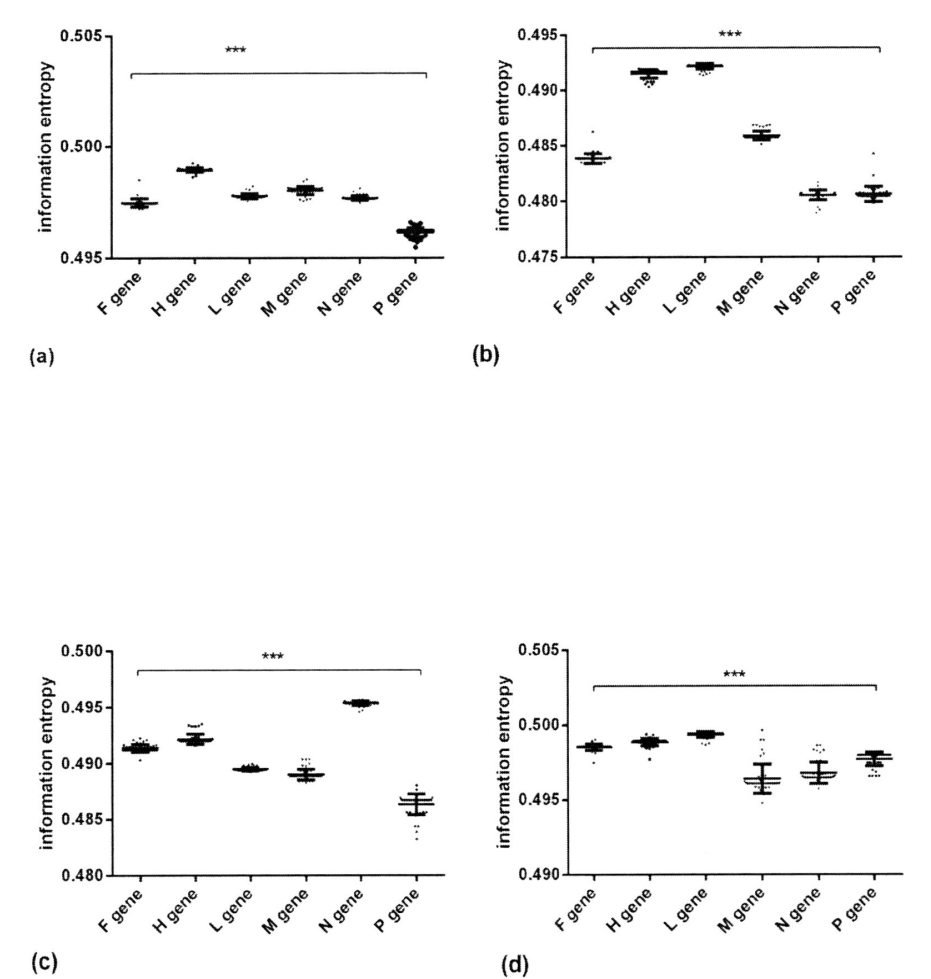


图 2.2 信息熵量化 PPRV 不同基因核酸使用模式的偏嗜性

Fig.2.2 The analysis of nucleotide usage bias of PPRV coding sequences performed by information entropy.

(a) 整体核酸使用模式偏嗜性在 PPRV 不同基因中的偏嗜程度 ($p<0.0001$); (b) PPRV 不同基因中密码子第一位点核酸使用偏嗜性($p<0.0001$); (c) PPRV 不同基因中密码子第二位点核酸使用偏嗜性($p<0.0001$); (d) PPRV 不同基因中密码子第三位点核酸使用偏嗜性($p<0.0001$)。单因素方差分析的 p 值 <0.001 时, 标记为“***”。

2.3.2 PPRV 不同基因在密码子使用模式上与宿主的适应性

通过 CAI 计算公式分析 PPRV 的不同基因在易感宿主（羊）体内密码子使用模式的相似性来评判病毒基因对宿主细胞的适应性后发现，6 种基因在宿主细胞内的密码使用适应性较强（CAI>0.5）（图 2.3），这说明病毒基因可以有效利用密码子使用模式的相似性来实现其自身蛋白产物的表达。进一步分析发现，N 基因比其他病毒基因在密码子使用模式上更加

表现出极强的适应性（图 2.3）。这些遗传特点说明 PPRV 通过进化使其自身病毒基因有效适应宿主细胞，从而提高病毒蛋白产物的加工合成。

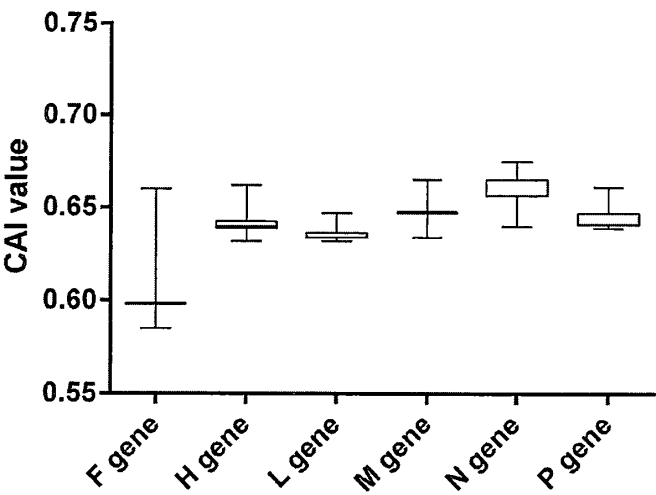


图 2.3 PPRV 不同基因在密码子使用方面与宿主的相似性
Fig. 2.3 The adaptation of PPRV genes to host at codon usage pattern.

2.3.3 PPRV 不同基因同义密码子使用的特点

通过 RSCU 对不同基因的计算，所有 PPRV 基因中优势同义密码子的使用并不是像其它 RNA 病毒那样以核苷酸 G/C 或者 A/T 结尾，并且大多数劣势密码子均含有 CG 核苷酸对（表 2.4）。这一结果表现出 PPRV 基因在进化过程中除了受到突变压力的进化选择，同时还受到其他进化压力的影响。

通过比对不同 PPRV 不同遗传谱系以及在中国流行的遗传谱系 N 基因密码子使用模式后发现，遗传谱系 II、III 和 IV 以及在中国流行的遗传谱系 IV 均不会利用两种同义密码子 UGU (Cys)和 CAU (His)来翻译半胱氨酸和组氨酸；而对于遗传谱系 I 来说，N 基因也是以劣势密码子来对其进行选择翻译的（表 2.5）。这一遗传特点也进一步表明 PPRV N 基因遗传进化是受到多种进化压力选择的。

表 2.4 PPRV 不同基因中优势 / 劣势的同义密码子

Table 2.4 The over- / under-representative synonymous codons in genes of PPRV genome

	Over-representative synonymous codons	Under-representative synonymous codons
F	UCA for Ser, CCA for Pro, GGG for Gly	<u>CCG</u> for Pro, <u>ACG</u> for Thr, <u>GCG</u> for Ala, GGU for Gly, <u>CGC</u> , <u>CGA</u> and <u>CGG</u> for Arg
H	UCA for Ser, AGA and AGG for Arg	<u>UCG</u> for Ser, <u>ACG</u> for Thr, <u>GCG</u> for Ala, <u>CGU</u> , <u>CGC</u> and <u>CGA</u> for Arg
L	AGA and AGG for Arg	<u>UCG</u> for Ser, <u>ACG</u> for Thr, <u>GCG</u> for Ala, <u>CGU</u> and <u>CGC</u> for Arg
M	UCA for Ser, CCC for Pro, UGC for Cys and AGA for Arg	UCC and <u>UCG</u> for Ser, <u>CCG</u> for Pro, <u>ACG</u> for Thr, <u>GCG</u> for Ala, UGU for Cys, <u>CGU</u> and <u>CGG</u> for Arg
N	UCA for Ser, AGA and AGG for Arg, and GGU for Gly	UUA for Leu, AGC for Ser, <u>ACG</u> for Thr, <u>GCG</u> for Ala, <u>CGU</u> , <u>CGC</u> , <u>CGA</u> and <u>CGG</u> for Arg
P	GUC for Val and AGA for Arg	GUA for Val, <u>UCG</u> for Ser, <u>ACG</u> for Thr, <u>GCG</u> for Ala, <u>CGC</u> , <u>CGA</u> and <u>CGG</u> for Arg

表 2.5 PPRV N 基因中同义密码子使用模式

Table 2.5 RSCU values for N gene of PPRV

	^a I 组	^b II 组	^c III 组	^d IV 组	^e V 组	^f VI 组
UUU(F)	0.93	1.18	1.15	1.16	1.18	1.18
UUC(F)	1.08	0.82	0.86	0.84	0.82	0.82
UUA(L)	0.57	0.35	0.41	0.44	0.35	0.57
UUG(L)	0.90	1.27	1.27	1.27	1.27	1.25
CUU(L)	0.54	0.81	0.81	0.83	0.81	0.91
CUC(L)	1.78	1.73	1.68	1.67	1.73	1.58
CUA(L)	0.48	0.69	0.69	0.65	0.69	0.57
CUG(L)	1.75	1.15	1.15	1.13	1.15	1.13
AUU(I)	0.49	0.97	0.92	0.95	0.97	0.95
AUC(I)	1.47	1.30	1.34	1.36	1.30	1.50
AUA(I)	1.05	0.73	0.75	0.68	0.73	0.56
GUU(V)	0.94	1.20	1.15	1.14	1.23	1.14
GUC(V)	0.80	1.60	1.70	1.71	1.65	1.69
GUA(V)	0.93	0.53	0.54	0.55	0.55	0.59
GUG(V)	1.34	0.67	0.61	0.59	0.58	0.57
UCU(S)	0.46	0.57	0.64	0.67	0.57	0.58

UCC(S)	0.72	1.43	1.36	1.34	1.43	1.42
UCA(S)	2.02	1.57	1.64	1.66	1.57	1.71
U <u>CG</u> (S)	1.81	1.14	1.07	1.00	1.14	0.87
AGU(S)	0.53	0.71	0.71	0.76	0.71	0.85
AGC(S)	0.46	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57
CCU(P)	0.98	0.87	0.87	0.87	0.87	0.91
CCC(P)	1.06	1.39	1.39	1.32	1.39	1.10
CCA(P)	1.16	1.22	1.22	1.24	1.22	1.44
C <u>CG</u> (P)	0.81	0.52	0.52	0.57	0.52	0.55
ACU(T)	1.11	1.22	1.28	1.24	1.22	1.22
ACC(T)	1.20	1.39	1.36	1.38	1.39	1.39
ACA(T)	1.19	0.87	0.85	0.89	0.87	1.03
A <u>CG</u> (T)	0.51	0.52	0.51	0.49	0.52	0.36
GCU(A)	0.89	0.89	0.93	0.88	0.88	0.85
GCC(A)	1.38	0.98	0.97	1.02	0.97	1.02
GCA(A)	1.25	1.60	1.59	1.56	1.58	1.53
G <u>CG</u> (A)	0.49	0.53	0.53	0.55	0.59	0.60
UAU(Y)	1.39	1.45	1.45	1.45	1.49	1.45
UAC(Y)	0.61	0.55	0.55	0.55	0.51	0.55
<u>CAU</u> (H)	<u>0.34</u>	<u>0.00</u>	<u>0.00</u>	<u>0.00</u>	<u>0.00</u>	<u>0.00</u>
CAC(H)	1.67	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
CAA(Q)	0.86	0.92	0.92	0.90	0.92	0.92
CAG(Q)	1.14	1.08	1.08	1.10	1.08	1.08
AAU(N)	1.15	0.30	0.31	0.31	0.30	0.32
AAC(N)	0.85	1.70	1.69	1.69	1.70	1.68
AAA(K)	0.58	0.95	0.95	0.93	0.95	0.86
AAG(K)	1.43	1.05	1.05	1.07	1.05	1.14
GAU(D)	1.10	0.76	0.74	0.72	0.78	0.67
GAC(D)	0.91	1.24	1.27	1.28	1.22	1.33
GAA(E)	0.42	0.84	0.84	0.81	0.84	0.76
GAG(E)	1.58	1.16	1.17	1.20	1.16	1.24
<u>UGU</u> (C)	<u>1.00</u>	<u>0.00</u>	<u>0.00</u>	<u>0.00</u>	<u>0.00</u>	<u>0.00</u>
UGC(C)	1.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
<u>CGU</u> (R)	0.53	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60
<u>CGC</u> (R)	0.30	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60
<u>CGA</u> (R)	0.53	0.60	0.53	0.50	0.60	0.45
<u>CGG</u> (R)	0.38	0.30	0.38	0.40	0.30	0.45
AGA(R)	1.90	1.95	2.03	2.03	1.95	2.10

AGG(R)	2.36	1.95	1.88	1.88	1.95	1.80
GGU(G)	0.60	0.53	0.53	0.51	0.53	0.57
GGC(G)	0.98	0.62	0.62	0.62	0.62	0.53
GGA(G)	1.05	1.42	1.45	1.46	1.42	1.51
GGG(G)	1.38	1.42	1.41	1.40	1.42	1.38

- a RSCU 值是由 PPRV 谱系 I 病毒株的 N 基因计算得出。
- b RSCU 值是由 PPRV 谱系 II 病毒株的 N 基因计算得出。
- c RSCU 值是由 PPRV 谱系 III 病毒的 N 基因计算得出。
- d RSCU 值是由流行于国外的 PPRV 谱系 IV 病毒的 N 基因计算得出。
- e RSCU 值是由暴发于中国（2007-2008）的 PPRV 谱系 IV 病毒的 N 基因计算得出。
- fRSCU 值是由流行于中国（2013-2015）的 PPRV 谱系 IV 病毒的 N 基因计算得出。

2.3.4 PPRV N 蛋白高级结构的分析

根据 SWISS-MODEL 蛋白程序对 PPRV N 蛋白的高级结构进行模拟后发现（图 2.4），PPRV N 蛋白是一个富含 α -螺旋折叠构象的病毒蛋白，这些 α -螺旋折叠构象分布在 (AA₄₆-AA₅₉, AA₆₆-AA₇₆, AA₈₄-AA₉₁, AA₁₂₄-AA₁₃₀, AA₁₆₀-AA₁₈₂, AA₁₉₀-AA₂₀₀, AA₂₁₃-AA₂₂₃, AA₂₂₇-AA₂₄₂, AA₂₄₉-AA₂₄₆, AA₂₆₈-AA₂₇₈, AA₂₉₁-AA₃₀₅, AA₃₁₉-AA₃₂₄, AA₃₃₀-AA₃₄₄, AA₃₆₀-AA₃₈₃, AA₃₈₈-AA₄₀₃)。而富含 α -螺旋折叠构象有利于 PPRV 基因组与核衣壳蛋白的结合，从而顺利实现病毒的复制。

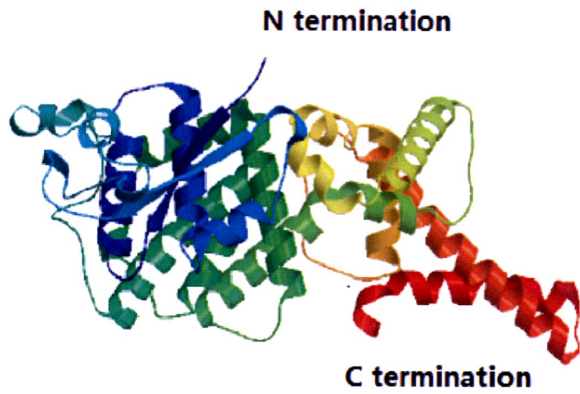


图 2.4 利用 SWISS-MODEL 程序进行 PPRV N 蛋白的 3D 结构分析

Fig. 2.4 The profile of 3D structure of PPRV N protein made by SWISS-MODEL program.

2.3.5 密码子使用对于 PPRV N 蛋白折叠构象的影响

根据密码子 *P* 值在 PPRV N 蛋白 3 种折叠构象中的高低，这 3 种折叠构象在同义密码子的选择方面存在着明显的偏嗜性（表 2.6）。具体来说，在 α -螺旋折叠构象中，同义密码

子 AUU (Ile)、GUC (Val)、UCU / AGC (Ser)、UAU (Tyr)、UGU / UGC (Cys)、CGG (Arg)、AUG (Met)和 UGG (Trp)明显倾向于被使用,而同义密码子 CCU、CCA / CCG (Pro)、ACA / ACG (Thr)、GAU (Asp)、CGC (Arg) 以及 GGC (Gly)被利用来进行表达的程度很低;在 β -折叠构象中,同义密码子 CUU (Leu)、AUU / AUA (Ile)、GUU / GUC / GUA (Val)、AGU (Ser)、CCC / CCG (Pro)、ACC (Thr)、AAU (Asn)、CGC (Arg)、GGG (Gly)以及 UGG (Trp)利用程度高,而 UUC (Phe)、CUC / CUA (Leu)、GUG (Val)、UCU / UCC / UCA / UCG / AGC (Ser)、CCU / CCA (Pro)、ACU / ACA / ACG (Thr)、GCU / GCC / GCG (Ala)、UAU / UAC (Tyr)、CAU / CAC (His)、CAG (Gln)、GAU (Asp)、GAG (Glu)、UGU / UGC (Cys)以及 CGU / CGA / CGG / AGG (Arg)被利用的程度很低;在无规卷曲中,同义密码子 CCU / CCA (Pro)、ACA / ACG (Thr)、CAU / CAC (His)、GAU (Asp)、GGC (Gly)被利用的程度高,而 CUU (Leu)、AUU (Ile)、GUA / GUC (Val)、UGU / UGC (Cys)、CGC (Arg)以及 UGG (Trp)被使用的程度低。通过比较这些在不同折叠构象中被使用的同义密码子的种类,虽然 AUU (Ile)、GUC (Val)以及 UGG (Trp)在 α -折叠构象以及 β -折叠构象中都是倾向于被利用的同义密码子,但是没有任何一种密码子在 3 种不同构象中同时倾向于被使用。这些遗传特点表明密码子使用模式在 PPRV N 蛋白二级结构形成中具有潜在的调节作用。

2.3.6 翻译速率在两种不同折叠构象连接处的变化

根据图 2.4 所展示出来 PPRV N 蛋白的二级结构信息,对四种类型折叠构象连接部位 tRNA 丰度的变化趋势进行了分析(图 2.5)。同无规卷曲与 α -螺旋连接处 tRNA 丰富变化的趋势相比(图 2.5 c, d),无规卷曲与 β -折叠连接处的 tRNA 丰度变化导致的翻译速率在这两种折叠构象的形成过程中的作用明显(图 2.5 a, b)。这些分析结果暗示了同义密码子在使用过程中是受到宿主 tRNA 丰富的影响,不同密码子对应的 tRNA 丰度导致翻译速度的变化,从而在一定程度上调节无规卷曲与 β -折叠的形成。

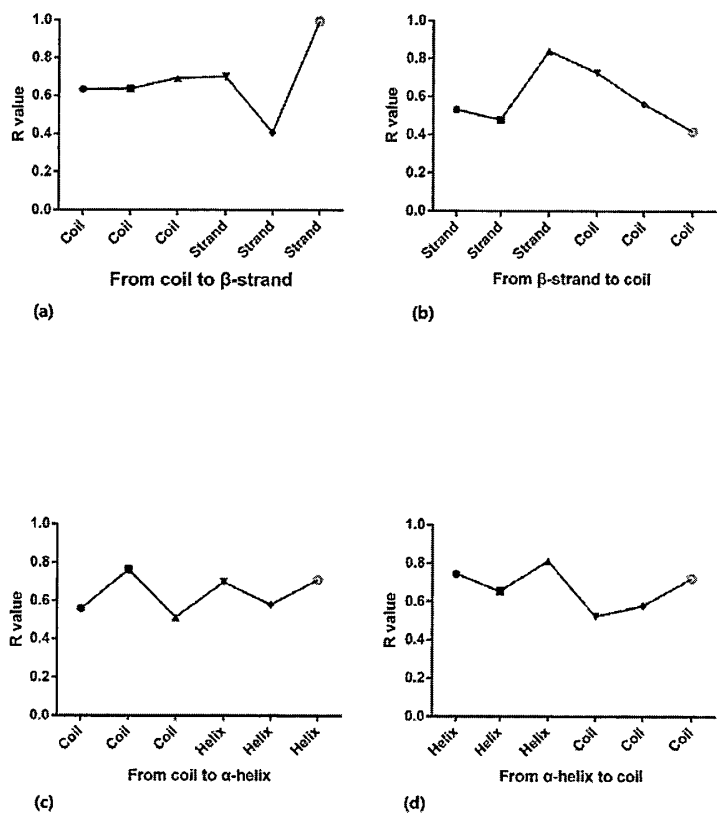


图 2.5 PPRV N 蛋白不同折叠构象连接处 R 值的变化

Fig.2.5 The changes of R value from one type of folding unit to another in PPRV N protein.

(a)无规卷曲向 β -折叠过渡的6个密码子位点，X轴代表无规卷曲C端的最后3个密码子位点以及 β -折叠N端的前3个密码子位点；(b) β -折叠向无规卷曲过渡的6个密码子位点，X轴代表 β -折叠C端的最后3个密码子位点以及无规卷曲N端的前3个密码子位点；(c)无规卷曲向 α -螺旋过渡的6个密码子位点，X轴代表无规卷曲C端的最后3个密码子位点以及 α -螺旋N端的前3个密码子位点；(d) α -螺旋向无规卷曲过渡的6个密码子位点，X轴代表 α -螺旋C端的最后3个密码子位点以及无规卷曲N端的前3个密码子位点

(a) transition boundary from coil to β -strand, x-axis showing the three positions at the C-termination of coil and the three positions at the N-termination of β -strand, (b) transition boundary from β -strand to coil, x-axis showing the three positions at the C-termination of β -strand and the three positions at the N-termination of coil, (c) transition boundary from coil to α -helix, x-axis showing the three positions at the C-termination of coil and the three positions at the N-termination of α -helix, (d) transition boundary from α -helix to coil, x-axis showing the three positions at the C-termination of α -helix and the three positions at the N-termination of coil.

2.4 讨论

我国西藏地区在 2007-2008 年首次发现 PPRV 疫情 (Wang et al., 2009), 由于及时采取了有效的防疫措施 (紧急免疫和扑杀), 从而有效控制了 PPR 在我国的大面积地流行。但是 2013 年年底, 新疆地区暴发 PPR 疫情, 并且随着动物运输等途径迅速传播到多个其他省份 (Wang et al., 2009; Wu et al., 2016a)。PPRV 基因组核苷酸的高突变率是此种病毒广泛扩散的主要原因 (Nambulli et al., 2016)。PPRV 不同基因中核苷酸使用模式所呈现出来的复杂性不能简单利用 AU 核苷酸高含量或者 GC 核苷酸高含量来进行衡量。PPRV 不同基因核苷酸所表现出来的差异、密码子第 1 和第 2 位点核苷酸使用模式的稳定性以及密码子第 3 位核苷酸使用模式的高变都反映出突变压力与自然选择这两种主流遗传进化压力共同推动 PPRV 基因的遗传进化方向。已有研究表明, PPRV 核酸变异所表现的是 PPRV 基因组的可塑性 (genome plasticity), 这也是 PPRV 不断扩大易感宿主范围以及流行区域的重要遗传动力 (Muniraju et al., 2014; Wu et al., 2016b)。对于一些微生物来说, 基因组中高丰度 AU 核酸含量或者 GC 含量都与其同义密码子使用模式的偏嗜性显著相关, 也就是说如果基因组中 AT 含量是占多数的, 那么同义密码子的高频使用就是多以 A/U 结尾, 反之, 如果基因组中 GC 含量是占多数的, 那么同义密码子的高频使用就是多以 G/C 结尾 (Nasrullah et al., 2015; Roychoudhury and Mukherjee, 2010; Wong et al., 2010; Zhou et al., 2014; Zhou et al., 2013a)。有趣的是, PPRV 基因核酸使用模式并不是简单的 GC 高丰度或者 AU 高丰度, 而是呈现出一种复杂性。RNA 病毒基因组核酸的高突变率最终决定了病毒基因编码出来蛋白产物的生物学功能, 但是很多核酸突变都是在密码子第 3 位上的同义突变, 这就说明同义密码子在核酸突变后的变化在调节病毒蛋白翻译表达方面也发挥着潜在的作用 (Bera et al., 2017; Chen et al., 2017; He et al., 2017; Roy et al., 2017)。对于 RNA 病毒来说, 基因组中 CpG 二核苷酸含量的高低直接影响病毒复制能力和毒力, 进而影响病毒在宿主体内的适应性 (Atkinson et al., 2014; Burns et al., 2009; Tulloch et al., 2014)。CpG 基序或者合成的 CpG 寡核苷酸链可以作为良好的疫苗佐剂 (Antoniali et al., 2017; Ingelsson et al., 2018; Jenberie et al., 2018; Ma et al., 2018)。虽然 CAI 分析显示 PPRV 不同基因 (尤其是 N 基因) 在密码子使用模式方面具有很强的宿主适应性, 但是 PPRV 基因对于含有 CpG 二核苷酸的同义密码子的选择程度很低, 这也在某种程度上影响了 PPRV 刺激机体产生良好的免疫反应。同义密码子作为核苷酸与氨基酸之间的纽带, 对其分析研究将有助于为研究者提供一些病毒与宿主之间共进化的遗传信息。自然选择压力与病毒序列自身突变压力之间的稳态共同推动病毒对其宿主的适应性 (Butt et al. 2016; Nasrullah et al. 2015)。黄病毒科 (*Flaviviridae*) 成员在世界范围内有着广泛的流行和易感宿主, 其病毒科成员在密码子使用模式方面表现出很高的宿主适应性, 从而实现其自身病毒产物的高效表达 (Butt et al., 2016; Lobo et al., 2009)。一些小 RNA 病毒科 (*Picornaviridae*) 成员的密码子使用模式也是明显受到了易感宿主的影响 (Aragones et al., 2010; Zhou et al., 2013a)。在 PPRV 在宿主细胞中复制机制的研究中, 研究人员发现无论 PPRV 基因组核酸使用模式如何改变, 都可以顺利地 N 蛋白缠绕结合, 从而实现病毒自身顺利复制。这一结果也说明 N 蛋白的正确构象对于 PPRV 基因组与 N 蛋白组成蛋白核酸复合物起到了关键作用。利用 CAI 计算 PPRV 基因与宿主密码子相似性的显著优点在于: CAI 值

越高,说明翻译选择在同义密码子使用模式上的影响力越强 (Carbone et al., 2003; Puigbo et al., 2008b)。本研究发现,PPRV N 基因在密码子使用模式上与宿主细胞密码子使用模式高度相似,这也为 N 蛋白的高效翻译表达提供了物质基础。因为外源基因密码子与宿主的高度相似将有助于外源基因的高效表达 (Hickey et al., 1995),而 PPRV N 蛋白结构中不同折叠构象在密码子使用偏嗜性上也存在着明显差异,更进一步说明翻译压力在对 PPRV N 基因密码子使用模式的形成过程中发挥着重要作用。有研究学者指出,在病毒 mRNA 翻译的过程中,同义密码子可以在调节基因的过程中发挥精微调控的作用 (Aragones et al., 2008; Aragonés et al., 2010)。这也就进一步说明 PPRV 基因的密码子使用模式并不是单纯由自身突变压力来无序形成的,而是在翻译选择压力的协同作用下共同调节形成的。本研究所分析出来的结果与之前所报道的结果是一致的 (Gupta et al., 2000; Gu et al., 2003; Ma et al., 2013; Xie and Ding, 1998; Zhou et al., 2013b)。此外,细胞中 tRNA 丰度的变化在影响 PPRV N 蛋白不同构象之间的过渡转变也是发挥着一定的作用。这是因为, tRNA 丰度的变化所产生的翻译动力学 (translation kinetics) 通过翻译加速或者翻译延迟在一定程度上调节折叠构象的形成 (Komar, 2009; Kramer et al., 2009)。这也从侧面说明,单纯优化外源基因的密码子来适应宿主细胞密码子的使用模式,虽然可以明显提高外源基因在宿主细胞中的高效表达,但是可能会在一定程度上影响蛋白产物的正确构象的形成,从而影响蛋白的生物学功能。总之,同义密码子使用模式以及翻译速率在病毒适应宿主细胞的进化过程中起到了不可忽视的作用 (Tsai et al., 2008; Zhang and Ignatova, 2009)。这些研究结果可以为今后研究人员设计开发 PPRV 相关的基因工程疫苗提供一些具有参考价值的理论依据。

第三章 宿主细胞抗 PPRV 感染的天然免疫应答

病毒入侵宿主后会激活宿主的天然免疫应答反应从而发挥抗病毒作用。而宿主所产生的的干扰素是最主要也是最早产生的抗病毒因子。本研究结果显示, PPRV 感染 HEK293T 细胞后, 主要诱导产生的是 III 型 IFNs (IFN- λ 3)以及 I 型 IFNs (IFN- β)。此外, 外源加入的 IFN 可以抑制 PPRV 在 HEK293T 细胞中的增殖。本研究中发现 PPRV 感染 HEK293T 细胞后, 细胞内的 ISG56、ISG15、CXCL10 等部分 ISG 也被诱导产生。同时, 当 JAK-STAT 通路被抑制后, IFN 的抗 PPRV 效应被显著抑制, 且 ISG 也相应被抑制。

细胞自噬(Autophagy), 又称为 II 型细胞死亡, 是细胞在自噬相关基因(autophagy-related gene, Atg)的调控下利用溶酶体降解自身受损的细胞器和大分子物质的过程。细胞自噬与细胞凋亡、细胞衰老一样, 是十分重要的生物学现象, 参与生物的发育、生长等多种过程自噬的发生依赖于自噬相关基因(autophagy-related gene, Atg)编码的自噬相关蛋白, 现阶段已发现的 8 个 Atg 及 5 个自噬相关因子组成了 5 个功能复合体, 它们是真核生物自噬过程的核心成员, 贯穿自噬的整个过程。然而, 随着研究的深入, 研究者发现, Atg 蛋白除了参与自噬过程外, 还参与了细胞其他重要的生理过程, 如基因修复、蛋白逆转运、细胞凋亡以及免疫应答等, 而这些过程往往与自噬过程无关。本实验将 PPRV 感染细胞后, 细胞内 Atg13 的转录水平显著提高。在 HEK293T 细胞中过表达 Atg13 基因后, PPRV 的复制被明显抑制。此外, IFN- β 及下游基因 ISG56mRNA 相对表达量均下降。这样, PPRV 感染所诱导产生的 Atg13 反过来抑制 PPRV 的复制, 形成了牵涉着天然免疫和自噬在内的完整环路, 预示着细胞内存在某种抑制 PPRV 感染的可能性, 对其加以放大或许可开发为控制 PPRV 感染的新手段。本研究为进一步阐明 PPRV 与宿主相互作用提供线索。

3.1 实验耗材、试剂及其配制方法

3.1.1 细胞、病毒、质粒和引物

HEK293T 细胞; PPRV 弱毒苗-PPRV/Nigeria 75/1 (实验室保存); E.coli DH5 α 、pEGX 4T-1、pCMV-HA、pMD-18-T (实验室保存)。此外, 扩增和检测相关基因的引物参见表 3.1。

3.1.2 主要溶液的配制

试剂

DMEM 培养基、M199 培养基 (民海生物); 胰酶、小牛血清 (民海生物); DMSO (Sigma-Aldrich); TRIzol、RNA 酶抑制剂、M-MLV 反转录酶、荧光定量试剂盒 (Promega 公司)、CCK8 试剂盒(北京博奥龙生物科技有限公司); 人 I 型干扰素 IFN α 2b

表 3.1 引物信息
Table 3.1 Information on primers

序号	引物名称	Sequence(5'-3')
1	H-Sense	CTGAATACCAACATTGAG
2	H-Anti-Sense	GAGGAACTTAATCTTATCG
3	ISG15-UP	AGGACAGGGTCCCCCTTGCC
4	ISG15-DOWN	CCTCCAGCCCGCTCACTTGC
5	ISG56-UP	GCGCTGGGTATGCGATCTC
6	ISG56-DOWN	CAGCCTGCCTTAGGGGAAG
7	CXCL10-UP	GTGGCATTCAAGGAGTACCTC
8	CXCL10-DOWN	TGATGGCCTTCGATTCTGGATT
9	MX1-UP	GTTTCCGAAGTGACATCGCA
10	MX1-DOWN	CTGCACAGGTTGTTCTCAGC
11	RANTES-UP	GGCAGCCCTCGCTGTCATCC
12	RANTES-DOWN	GCAGCAGGGTGTGGTGTCCG
13	OASL-UP	CTGATGCAGGAACTGTATAGCAC
14	OASL-DOWN	CACAGCGTCTAGCACCTCTT
15	H-IFN alpha-2b-S	GCTTGGGATGAGACCCTCCTA
16	H-IFN alpha-2b-A	CCCACCCCTGTATCACAC
17	H-IFN-beta-S	ATGACCAACAAGTGTCTCCTCC
18	H-IFN-beta-A	GGAATCCAAGCAAGTTGTAGCTC
19	H-IFN-g-s	TCGGTAACTGACTTGAATGTCCA
20	H-IFN-g-a	TCGCTTCCCTGTTTTAGCTGC
21	H-IFN-L1-S	CACATTGGCAGGTTCAAATCTCT
22	H-IFN-L1-A	CCAGCGGACTCCTTTTTGG
23	H-IFN-L2-S	GAGACCTGAATTGTGTTG
24	H-IFN-L2-A	AATTAAGACAAGTGGCTAAT
25	H-IFN-L3-S	ACATAGCCCAGTTCAAGT
26	H-IFN-L3-A	CGACTCTTCTAAGGCATCT

(Sigma-Aldrich)；人 III 型干扰素 IL28B (IFNλ3; Abnova)；Jak 抑制剂 Jak inhibitor I (Santa Cruz Biotech, CA)；primer STAR DNA polymerase (Takara)；限制性内切酶如 BamHI、XhoI、EcoRI、T4-DNA ligase 等酶、dNTP、2Kb DNA Marker、5Kb DNA Marker 均购自大连 Takara 生物科技有限公司；质粒提取试剂盒、DNA 纯化试剂盒、无内毒素质粒提取试剂盒均购自北京索莱宝生物科技有限公司；脂质体 2000、TRIzol (Invitrogen)；poly(I:C) (Sigma-Aldrich)；鼠源抗 HA、鼠源抗 flag、辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠 IgG 等抗体均购自 Sigma 公司；兔源抗 IRF3 单克隆抗体、兔源抗 IRF3-P 单抗；辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 等抗体均购自 Santa Cruz 公司；蛋白预染或非预染 Marker (Fermentas 公司)；Western-blot 化

学发光 HRP 底物 ECL 发光液 (Millopore); 6 孔板、24 孔板、96 孔板、25cm² 及 75cm² 细胞瓶购自 (Coring 公司)。

主要溶液的配制

细胞冻存液: 10% DMSO 与 90% FBS 混合, 现配现用。

LB 液体培养基配制: 称取 10 g 胰蛋白胨、5 g NaCl、5 g 酵母提取物溶于蒸馏水, 调节 pH 至 7.0, 定容至 1000 ml, 121℃ 高压灭菌 20 min。

Amp 或 Kan 抗性 LB 固体培养基配制: 称取 10 g 胰蛋白胨, 5 g NaCl、5 g 酵母提取物、15 g 琼脂粉溶于蒸馏水, 调节 pH 至 7.0, 定容至 1000 ml, 121℃ 高压灭菌 20 min, 待室温冷却至 55-60℃, 加入相应的 Amp 或 Kan 终浓度 (10 µg/ml) 在超净台内倒平板。

Annealing Buffer: 50mM HEPES、100mM NaCl 调 PH 至 7.4。

500 mmol/L Tris-HCl (pH8.0): 100 mmol/L Reduced Glutathione, 还原性谷胱甘肽的工作液浓度为 10 mmol/L, 4℃ 保存。

2×SDS-PAGE 上样缓冲液: 100 mmol/L Tris-HCl(pH6.8), 4% SDS, 0.2% 溴酚蓝, 20% 甘油, 2% β-巯基乙醇, 4℃ 保存; 5×Tris 甘氨酸缓冲液: 15.1g Tris 碱, 94g 甘氨酸, 5g SDS 溶解于 800ml 双蒸水中, 定容至 1000ml, 使用前稀释为 1×工作液, 室温保存;

转膜缓冲液: 3.02g Tris 碱, 14.4g 甘氨酸, 溶解于 500ml 双蒸水中, 加入 200ml 甲醇, 定容至 1000ml, 常温保存。PBST 洗膜缓冲液: 8.0g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na₂HPO₄ 和 0.24g KH₂PO₄ 加入 800ml 双蒸水中, 溶解后定容至 1L, 121℃, 高压灭菌 30min, 室温保存。使用时加入 0.5% Tween-20, 完全混匀使用。蛋白封闭液: PBST 中加入 5% 的脱脂奶粉 (Invitrogen), 即用即配。

1.5M Tris.HCl (pH8.8): 181.7g Tris 碱, 加入到 800ml 双蒸水中, 用浓盐酸调节 pH 至 8.8, 定容至 1000ml, 4℃ 保存。

1.0M Tris.HCl (pH=6.8): 121.1g Tris 碱, 加入到 800ml 双蒸水中, 用浓盐酸调节 pH 至 6.8, 定容于 1000ml, 4℃ 保存。

10% SDS: 10g SDS 溶解于 100 ml 双蒸水中, 室温保存 (沉淀可以加热后溶解)。

10% (W/V, g/ml) 过硫酸铵 (APs): 称取 1g 过硫酸铵, 加入 10 ml 的去离子水, 将固体粉末彻底溶解进行分装保存。4℃ 可以储存两周左右, -20℃ 可以长期保存。TEMED, 4℃ 保存。

蛋白电泳的配制方法:

10%分离胶的配制: 在 10ml 的烧杯内加入 2ml 去离子水, 1.7ml 30% 聚丙烯酰胺溶液, 1.3ml 1.5M Tris-HCl (PH8.8) 溶液, 50µl 10% SDS, 50µl 10% 过硫酸铵, 2µl TEMED, 混匀所有试剂后, 加入制胶板中, 在分离胶上层加入 1ml 无水乙醇, 使得胶面保持水平, 室温静置 15-20min。

5%浓缩胶的配制: 在 10ml 的烧杯内加入 0.68ml 去离子水, 0.17ml 30% 聚丙烯酰胺溶液, 0.13ml 1M Tris-HCl (PH6.8) 溶液, 10µl 10% SDS, 10µl 10% 过硫酸铵, 1µl TEMED, 混匀所有试剂后, 加入制胶板中, 然后轻轻插入梳子, 室温静置 15-20min。

考马斯亮蓝染色液的配制: 称取 1.0g 考马斯亮蓝于 1L 的烧杯中, 向其中加入 250ml 异丙醇, 再加入 100ml 冰醋酸充分混匀后加入去离子水至 1L。

考马斯亮蓝脱色液的配制：将 100ml 甲醇、700ml 去离子水和 200ml 冰醋酸充分混匀。
5 mg/mL Jak inhibitor I 储存液配制：取 0.5mg Jak inhibitor I 干粉加入 0.1/mL DMSO 中，分装至 1.5mLEP 管中，-20 保存。

IFN λ 3 储存液配制：取 10mg IFN λ 3 干粉加入 0.1/mL DMSO 中，分装至 1.5mLEP 管中，-20 保存。

3.1.3 实验设备

倒置显微镜(Olympas); 荧光定量 PCR 扩增仪(美国 Bio-RAD 公司); 超净工作台(安泰空气技术(苏州)有限公司); 台式高速冷冻离心机(湖南湘仪); 高压灭菌器(上海申安); 超低温冰箱(海尔); 核酸蛋白测定仪(德国 Eppendorf 公司); 电子天平(梅特勒); pH 计(梅特勒); 磁力搅拌器(上海梅颖浦); 核酸电泳仪(美国 Bio-RAD 公司); 蛋白电泳仪(美国 Bio-RAD 公司); 涡旋振荡器(上海梅颖浦); 恒温摇床(上海智成); CK40-32PH 普通光学显微镜(日本 Olympus 公司)、IX71 荧光倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司); 3111 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo-Fisher 公司); Haier 超低温冰箱(海尔股份(青岛)有限公司); MSC-Advantage 生物安全柜(美国 Thermo-Fisher 公司) WD-9413C 凝胶成像分析仪(北京天驰仪诚)、化学发光仪(北京六一仪器厂); 台式高压灭菌锅(山东新华医疗器械股份有限公司); DHG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); 湿转印仪(美国 Bio-RAD 公司)。

3.2 实验方法

3.2.1 PPRV 在 HEK293T 细胞中的增殖

- (1) HEK293T 细胞加入 6 孔板中，置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 12h。
- (2) 用 1 MOI PPRV 病毒感染 HEK293T 细胞，同时设立不接病毒对照，再次置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养，每天观察细胞病变情况并分别在培养 24h、36h、48h 后取出培养物，弃掉培养物上清，提取 RNA，反转录及荧光定量 PCR 检测病毒基因的转录水平。

3.2.2 PPRV 感染 HEK293T 细胞后激活 IFN 及 ISG

- (1) HEK293T 细胞加入 6 孔板中，置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 12h。
- (2) 用 1 MOI PPRV/Nigeria 75/1 病毒感染 HEK293T 细胞，同时设立不接病毒对照，再次置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养。并且在培养 48h 后取出培养物，弃掉培养物上清，并提 RNA，反转录及荧光定量 PCR 检测病毒基因、I 型 IFN、II 型 IFN、III 型 IFN 及下游 ISG 的转录水平。

3.2.3 外源 IFN 的抗病毒作用

3.2.3.1 IFN α 2b 的抗病毒作用

- (1) HEK293T 细胞加入 6 孔板中, 培养基中加入 IFN α 2b, 浓度分别为 0 IU/ml、1 IU/ml、10 IU/ml、100 IU/ml、1000 IU/ml, 并置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 12h。
- (2) 用 1 MOI PPRV/Nigeria 75/1 病毒感染 HEK293T 细胞, 同时设立不接病毒对照, 再次置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养并且在培养后 72h 取出培养物, 弃掉培养物上清, 每孔加入 1 ml TRIzol 并提取 RNA, 反转录及荧光定量 RCR 检测病毒基因的转录水平。
- (3) 经上一步确定了 IFN α -2b 的最佳作用浓度为 1000 IU/ml, HEK293T 细胞加入 6 孔板中, 培养基中加入 IFN α -2b, 浓度为 1000 IU/ml, 并置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 24h。
- (4) 用 1MOI PPRV/Nigeria 75/1 病毒感染 HEK293T 细胞, 同时设立不接病毒对照, 再次置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养并且在培养后 0h、12h、36h、48h 取出培养物, 弃掉培养物上清, 并提取 RNA, 反转录及荧光定量 PCR 检测病毒基因及下游 ISG 的转录水平。

3.2.3.2 IFN λ 3 的抗病毒作用

- (1) HEK293T 细胞加入 6 孔板中, 培养基中加入 IFN λ 3, 浓度分别为 100 ng/ml 及 1000 ng/ml 并置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 12h。
- (2) 用 1MOI PPRV/Nigeria 75/1 病毒感染 HEK293T 细胞, 同时设立不接病毒对照, 再次置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养并且在培养后 72h 取出培养物, 弃掉培养物上清, 每孔加入 1ml TRIzol 并提取 RNA, 反转录及荧光定量 PCR 检测病毒基因的转录水平。

3.2.4 Jak inhibitor 抑制 IFN 通路

3.2.4.1 Jak inhibitor 抑制内源性的 IFN 通路

- (1) HEK293T 细胞加入 6 孔板中, 并置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 12h。
- (2) 用 1MOI PPRV/Nigeria 75/1 病毒感染 HEK293T 细胞, 并在培养基中加入 Jak inhibitor, 终浓度分别为 0 μ mol/ml, 1 μ mol/ml, 10 μ mol/ml, 再次置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养并且在培养后 48h 取出培养物, 弃掉培养物上清, 每孔的培养物加入 0.5ml TRIzol 并提取 RNA, 反转录及荧光定量 PCR 检测病毒基因的转录水平。

3.2.4.2 Jak inhibitor 抑制外源性的 IFN 通路

- (1) HEK293T 细胞加入 6 孔板中, 并置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 12h, 并在培养基中加入 IFN α -2b, 终浓度 1000IU/ml, 同时在培养基中加入 Jak inhibitor, 终浓度分别为 0 μ mol/ml, 1 μ mol/ml, 10 μ mol/ml, 设立不加 IFN α -2b 及 Jak inhibitor 的对照组, 置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 12h。

(2) 用 1 MOI PPRV/Nigeria 75/1 病毒感染 HEK293T 细胞, 再次置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养并且在培养后 48h 取出培养物, 弃掉培养物上清, 每孔的培养物加入 0.5ml TRIzol 并提取 RNA, 反转录及荧光定量 PCR 检测病毒基因的转录水平。

3.2.5 PPRV 激活 Atg13 基因的转录

(1) 参照 Genebank 中公布的人 Atg13 基因的 mRNA 序列, 利用 Primer 软件设计扩增 Atg13 基因的引物及检测 Atg13 基因及本章中用到的 IFN-β 及下游基因 (IFN-β、ISG56、OASL、CXCL-10) 的荧光定量 PCR 引物 (参照附表)。

(2) HEK293T 细胞加入 6 孔板中, 置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 12h。

(3) 1 MOI PPRV/Nigeria 75/1 病毒感染每孔细胞, 同时设立不接病毒对照, 再次置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 0h、12h、24h、36h、48h、72h 后分别收获细胞, 弃掉培养物上清, 提取细胞总 RNA, 并通过反转录及荧光定量 PCR 方法检测 Atg13 基因的转录水平。

3.2.6 Atg13 蛋白对 PPRV 复制的调控作用

3.2.6.1 过表达 Atg13 基因对 PPRV 复制的影响作用

(1) 提取 HEK293T 细胞总 RNA、反转录并扩增 Atg13 基因, 构建重组真核表达质粒 pCMV-HA- Atg13 并送北京金维智生物公司进行测序验证。

(2) 将重组表达质粒 pCMV-HA- Atg13 转化至大肠杆菌感受态细胞 DH5α 中进行扩大培养, 并参照无内毒素质粒提取试剂盒操作说明提取 pCMV-HA- Atg13, 测定其浓度并于 -20℃ 保存。

(3) HEK293T 细胞加入 6 孔板中, 置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 12h。形成单层细胞, 细胞密度达到 70%-80%为宜。

(4) 转染实验前, 先分别将提取无内毒素的重组质粒 pCMV-HA- Atg13, 加入 Opti-MEM 中混匀, 并将 Lipofectamine 2000 与质粒按 2:1 的比例混匀于 Opti-MEM (参照 Invitrogen Lipofectamine 操作说明, 注意: 为防止破坏脂质体结构, 此步骤需要非常轻柔) 中, 静置 5min。

(5) 将分别混匀的质粒和脂质体轻柔混匀, 静置 30min。

(6) 弃去原来的细胞培养液, 使用 Opti-MEM (Invitrogen) 清洗一遍细胞, 再次加入新鲜的 Opti-MEM, 并将混匀的液体逐滴加入到含有 Opti-MEM 的细胞培养板中, 37℃ 细胞培养箱培养。5-6h 后细胞板的 Opti-MEM 用 DMEM 细胞完全培养液替换, 继续置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养。

(7) 上一步转染的细胞培养 24h 后用 1 MOI PPRV/Nigeria 75/1 病毒感染每孔细胞, 同时设立不接病毒对照, 再次置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 0h、12h、24h、36h、48h、72h 后分别收获细胞, 后一组收细胞提取 RNA, 反转录并通过荧光定量 PCR 方法检测 PPRV H 基因、IFN-β 及部分 ISG mRNA 相对表达量, 另一组收获细胞并通过 Western-blotting 方法检测 Atg13 蛋白的表达。

3.2.6.2 敲低 Atg13 基因对 I 型 IFN 信号通路的影响作用

- (1) HEK293T 细胞加入 6 孔板中, 置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 12h。形成单层细胞, 细胞密度达到 70%-80%为宜。
- (2) 将上海生工合成及构建的 Atg13 基因的干扰基因质粒 sh-Atg13 及对照质粒分别加入 Opti-MEM 中混匀, 并将 Lipofectamine 2000 与质粒按 2:1 的比例混匀于 Opti-MEM (注意: 为防止破坏脂质体结构, 此步骤需要非常轻柔) 中, 静置 5min。
- (5) 将分别混匀的质粒和脂质体轻柔混匀, 静置 30min。
- (6) 弃去原来的细胞培养液, 使用 Opti-MEM (Invitrogen) 清洗一遍细胞, 再次加入新鲜的 Opti-MEM, 并将混匀的液体逐滴加入到含有 Opti-MEM 的细胞培养板中, 37℃细胞培养箱培养。5-6h 后, 细胞板的 Opti-MEM 用 DMEN 细胞完全培养液替换, 继续置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 0h、12h、24h、36h、48h、72h 后分别收获细胞, 弃掉培养物上清, 提取细胞总 RNA, 反转录并通过荧光定量 PCR 方法检测 IFN- β 及部分 ISG mRNA 相对表达量。

3.2.7 Atg13 蛋白激活产生的 IFN 抑制 PPRV 的作用

- (1) HEK293T 细胞加入 6 孔板中, 置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 12h, 形成单层细胞, 细胞密度达到 70%-80%为宜。
- (2) HEK293T 细胞转染 Atg13 基因表达质粒 pCMV-HA-Atg13 及对照质粒继续置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养。
- (3) 上一步转染的细胞培养 48h 后收取培养物上清, 并在紫外灯下照射 30min。
- (4) HEK293T 细胞加入 6 孔板中, 置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 12h, 形成单层细胞, 细胞密度达到 70%-80%为宜。
- (5) 1 MOI PPRV/Nigeria 75/1 病毒感染每孔细胞, 并将上述处理过的上清与新鲜培养基按照 1:1 的量加入病毒感染的细胞中, 同时设立不加上清的对照组, 再次置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养, 24h 及 48h 后分别收获细胞, 提取 RNA, 反转录并通过荧光定量 PCR 方法检测 PPRV H 基因 mRNA 相对表达量。

3.2.8 荧光定量 PCR

RNA 提取

- (1) 从-80℃冰箱取出加入 TRIzol 的细胞培养物, 加入 200 μ l 氯仿, 涡旋混匀 15s, 静置 2-3 min, 4℃, 12000 $\times$ g 离心 15min。
- (2) 转移上层水相到新的离心管中(45°倾斜取样)。
- (3) 向上述水相中加入 500 μ l 100%异丙醇混匀, 冰上放置 10min, 随后 2000 $\times$ g 离心 10min, 弃上清。
- (4) 向上述体系中加入 1ml 75%的乙醇, 重悬并 2000 $\times$ g 离心 10min, 静置 10-15min。
- (5) 最后向体系中加入 20-50 μ l ddH₂O, 放置 10-15min, 以 ddH₂O 为参照, 用分光光度计于波长 280 nm 和 260 nm 处测得 RNA 的浓度和纯度, 置于-70℃保存。

反转录

参照以下体系将 RNA 反转录为 cDNA

RNA	6μl	dNTP	1μl	Random primer	1μl	ddH2O	2μl
加热至 65℃，恒温 6min，冰浴 5min 加入以下试剂							
5×Prime Script II Buffer			4μl				
RNase Inhibitor			0.5μl				
Prime Script II RTase			1μl				
RNase free ddH ₂ O			4.5μl				
30℃ 反应 10min，42℃反应 60min，95℃反应 5min							

表 3.2 qPCR 扩增参数
Table3.2 Parameters used to amplifying

组分	体积 (μl)
2×SYBR Green	10
Reaction Mix	
primer1	0.5
primer1	0.5
cDNA	1
补加 ddH ₂ O	8

其反应条件为 95℃预变性 10min；95 ℃变性 10 s，60℃复性 20 s，72 ℃延伸 30 s，30 个循环。

3.2.9 CCK8 检测药物对细胞的毒性实验

检测 IFN alpha-2b 及 Jak inhibitor 对细胞活性的影响是通过 CCK8 试剂盒来测定的。将 HEK293T 细胞加入 96 孔培养板中，置 37℃、5% CO₂ 培养箱培养，24h 后换新鲜培养基(IFN α -2b 终浓度分别为 1IU/mL、10 IU/mL、100 IU/mL 及 Jak inhibitor 浓度为 1μmol/L、10μmol/L)，同时设立未加药物的对照组。细胞继续培养 48h、96h 后分别取出培养板，并每孔加入 10 μL CCK8 溶液，孵育 1-4h 后通过酶标仪读出 450nm 处的光密度值，用公式

$$\% \text{ viability}=\times 100\%.$$

计算出细胞活性。

3.2.10 统计学分析

运用 One Way ANVOA test 分析软件 (GraphPad Prism version 5.01; GraphPad Software) 对所得数据进行分析, 结果用 Mean $\pm$ SD 表示。若两组数据间的 P 值小于 0.05, 则标记为存在差异, 若 $P < 0.01$ 则差异显著; $P < 0.001$ 则极显著。

3.3 实验结果

3.3.1 PPRV 在 HEK293T 细胞中的增殖

PPRV 的敏感细胞为 Vero 细胞, 为了验证 PPRV 是否可感染 HEK293T 细胞, 我们用 PPRV/Nigeria 75/1 感染 HEK293T 细胞, 发现病毒在感染细胞后 36h 增殖效率较高, 且随着时间增长, PPRV 在细胞中的增殖效率提高, 如图 3.1。以上结果表明, PPRV/Nigeria 75/1 可以在 HEK293T 细胞中增殖, HEK293T 细胞可作为研究 PPRV 的敏感细胞。

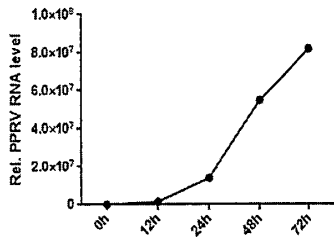


图 3.1 PPRV 在 HEK293T 细胞中增殖
Fig 3 1 PPRV proliferation in HEK293T cells

3.3.2 PPRV 感染 HEK293T 细胞后可激活产生 IFN- β 、IFN- λ 3 及相关 ISG

为了研究 PPRV 是否可以在 HEK293T 细胞中诱导激活三种类型干扰素及下游 ISG 的产生, 用 PPRV/Nigeria 75/1 感染 HEK293T 细胞, 并继续培养 24h 及 48h。我们用荧光定量 PCR 的方法检测了三种类型干扰素 IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、IL29 (IFN- λ 1)、IL28 (IFN- λ 2/IFN- λ 3) 及 ISG15, ISG56, CXCL10 等相关 ISG 的转录水平。结果显示, 相对于对照组, IFN- λ 2 在病毒感染后 36 小时, 转录水平无明显差异, 48 小时后其转录水平显著提高。IFN- β 及 IFN- λ 3 在病毒感染后 36 小时及 48 小时, 基因的转录水平均显著提高, 而 IFN- α 及 IFN- γ 则无明显变化, 基于此结果, 我们在检测 ISG 时, 选取 PPRV 感染细胞后 48 小时的样品检测了部分 ISG mRNA 水平, 结果显示, 只有 ISG15、ISG56、CXCL10、MX1、RANTES 这六种

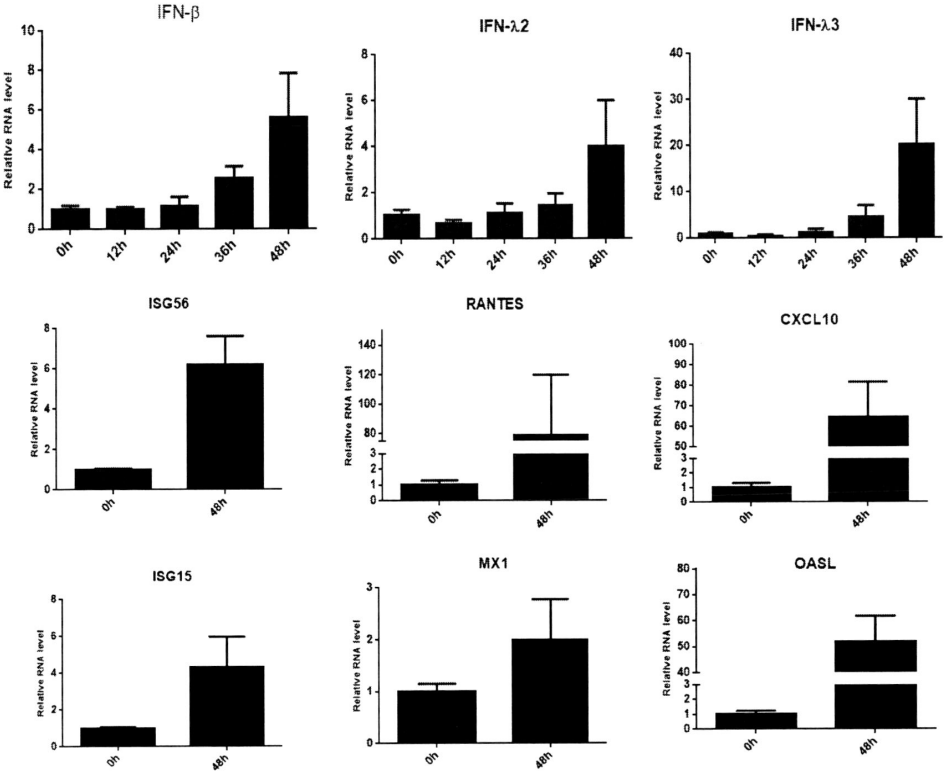


图 3.2 PPRV 感染 HEK293T 细胞后激活的干扰素

Fig 3.2 The IFNs induced by the infection of PPRV on HEK293T cells

3.3.3 外源 IFN 的抗病毒作用

3.3.3.1 IFN- alpha-2b 在 HEK293T 细胞中的抗 PPRV 感染作用

3.3.2 中已经表明 PPRV 激活 HEK293T 细胞所产生的干扰素具有抗病毒功能，我们将进一步验证外源加入的 IFN- alpha-2b 是否对 PPRV 在 HEK293T 细胞中的增殖具有抑制的效应。PPRV 感染后的 HEK293T 细胞分别用 0 IU/ml、1 IU/ml、10 IU/ml、100 IU/ml、1000 IU/ml 的 IFN- alpha-2b 进行处理，72 后 发现 PPRV 的增殖相对于对照组(IFN- alpha-2b=0) 被显著抑制，且随着浓度增大，病毒被抑制的效果越显著，即当 IFN- alpha-2b 浓度为 1000IU/ml 时，其对 PPRV 的抑制作用最显著，如图 3.3。下一步，我们用浓度为 1000IU/ml 的 IFN- alpha-2b 对 HEK293T 细胞进行预处理后感染 PPRV，结果显示，相对于对照组，IFN 相关 ISG，如 ISG15，ISG56，CXCL10 等基因的转录水平在 IFN- alpha-2b 处理后 48 小时与对照组(处理 0

小时)相比显著升高,如图 3.4。说明 IFN- alpha-2b 对 HEK293T 细胞进行预处理后激活了细胞内的 IFN 抗病毒通路。我们还发现,IFN- alpha-2b 预处理 HEK293T 细胞后 IFN- alpha-2b 未处理组相比 ISG mRNA 水平无显著变化,如图 3.5。

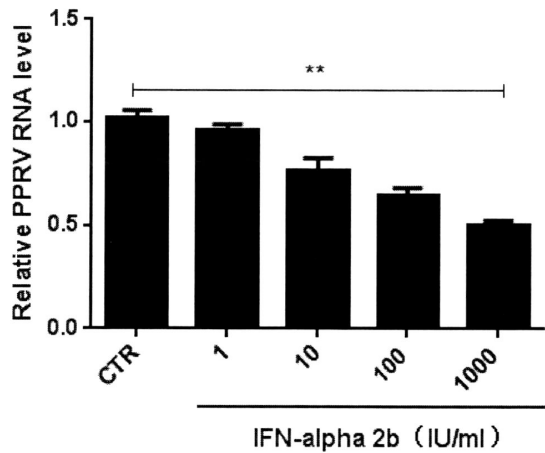


图 3.3 IFN- alpha-2b 的抑制 PPRV 增殖的作用
Fig 3.3 The antiviral activity of IFN- alpha-2b on PPRV

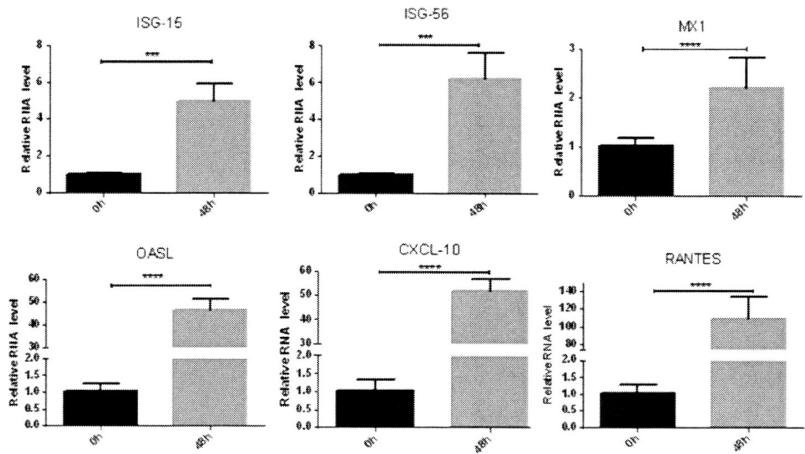


图 3.4 IFN- alpha-2b 预处理 PPRV 接毒的 HEK293T 细胞后激活的 ISG
Fig 3.4The ISGs induced by the treatment of IFN- alpha-2b on HEK293T cells and infected with PPRV

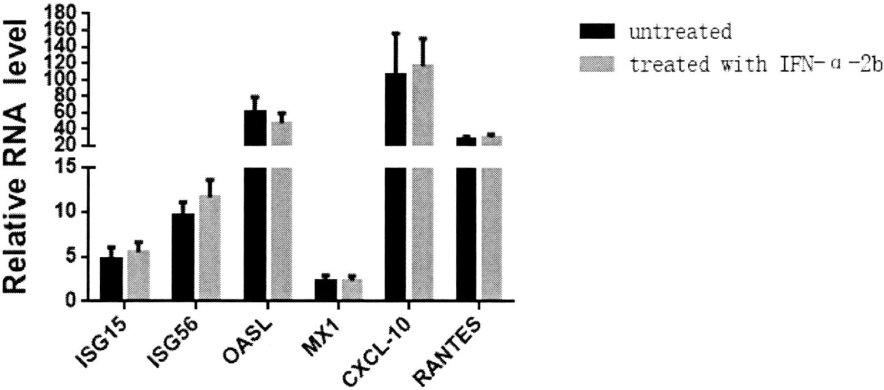


图 3.5. IFN-α-2b 预处理后激活的 ISG

Fig 3.5 The ISGs induced by the treatment of IFN-α-2b

3.3.3.2 IFN-λ3 在 HEK293T 细胞中的抗 PPRV 感染作用

由于在 3.2 中我们已发现 IFN-λ3 也是 PPRV 感染 HEK293T 细胞后能激活产生的主要干扰素，我们将进一步验证外源加入的 IFN-λ3 是否同样具有抗 PPRV 感染作用。HEK293T 细胞用浓度分别为 100 ng/ml，及 1000 ng/ml 的 IFN-λ3 进行预处理，72 后发现 PPRV 的增殖相对于对照组(IFN-λ3=0) 被显著抑制，且随着浓度增大，病毒被抑制的效果越显著，即当 IFN-λ3 浓度为 1000ng/ml 时，其对 PPRV 的抑制作用最显著，如图 3.6。此结果说明 IFN-λ3 对 HEK293T 细胞进行预处理后激活了细胞内的 IFN 抗病毒通路。

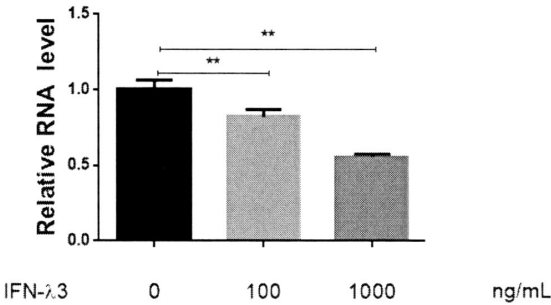


图 3.6 IFN-λ3 的抑制 PPRV 增殖的作用

Fig 3.6 The antiviral activity of IFN-λ3 on PPRV

3.3.4 Jak inhibitor 抑制 IFN 通路

3.3.4.1 Jak inhibitor 抑制内源性的 IFN 通路

为了检测 Jak inhibitor 对细胞内源性的 IFN 通路是否具有抑制作用，本研究中利用 PPRV 感染 HEK293T 细胞，并在培养基中加入终浓度分别为 0 μmol/ml，1 μmol/ml，10 μmol/ml 的 Jak inhibitor，结果显示，与对照组相比(0 μmol/ml 的 Jak inhibitor)，在 1 μmol/ml 及 10 μmol/ml 两种浓度的 Jak inhibitor 作用下，PPRV 的复制过程未受到影响。我们推断，Jak inhibitor 对内源性的 IFN 的通路无抑制作用，如图 3.7。

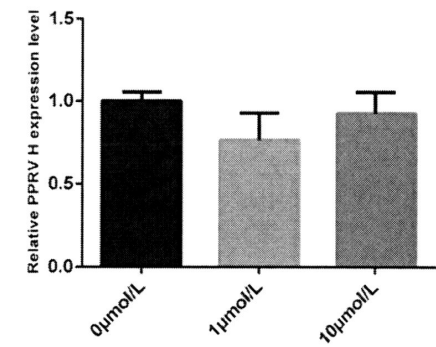


图 3.7 Jak inhibitor 对内源性 IFN 信号通路的作用

Fig 3.7 The inhibition effect of Jak inhibitor on endogenous IFN signaling patgway

3.3.4.2 Jak inhibitor 抑制外源性的 IFN 通路

为了检测 Jak inhibitor 对细胞外源性的 IFN 通路是否具有抑制作用，我们在 HEK293T 细胞培养基中加入终浓度为 1000IU/ml 的 IFN alpha 2b 及终浓度分别为 1 μmol/ml，10 μmol/ml 的 Jak inhibitor，设立不加 IFN alpha 2b 及 Jak inhibitor 的对照组。PPRV 感染 HEK293T 细胞，荧光定量 RCR 检测病毒基因的转录水平结果显示，与对照组(0 μmol/ml Jak inhibitor +1000IU/ml IFNα-2b)相比，1 μmol/ml Jak inhibitor +1000IU/ml IFNα-2b 及 10 μmol/ml Jak inhibitor +1000IU/ml IFNα-2b 两组 PPRV H 基因 mRNA 水平升高，且呈剂量依赖性，如图 3.8。由此，我们推断，Jak inhibitor 对外源性的 IFN 的通路有显著抑制作用。

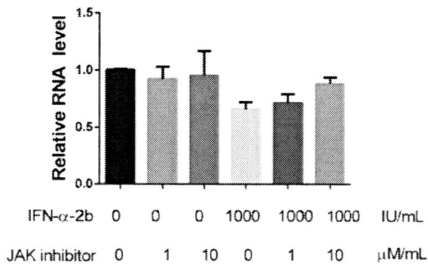


图 3.8 Jak inhibitor 对外源性 IFN 信号通路的作用

Fig 3.8 The inhibition effect of Jak inhibitor on exogenous IFN signaling patgway

3.3.5 细胞毒性实验

为了检测本实验中用到的 IFN α -2b 及 Jak inhibitor 是否对 HEK293T 细胞活性有影响作用, 我们通过 CCK8 法(MTT 替代法)对细胞进行活性检测。结果表明, 本实验中使用的 IFN α -2b 的浓度分别为 1IU/ml 10IU/ml、100IU/ml 及 1000IU/ml, 而 Jak inhibitor 浓度分别为: 1 μ mol/L、10 μ mol/L。结果显示, 与对照组相比, 四种浓度的 IFN α -2b 所产生的细胞毒性对细胞活性影响较小, 不会对其抗病毒的效果产生影响。而与对照组相比, 当细胞培养物中加入浓度为 1 μ mol/L 及 10 μ mol/L 的 Jak inhibitor 时, 细胞活性会有所改变, 说明 Jak inhibitor 可能对 HEK293T 细胞的活性有或多或少的的影响作用, 如图 3.9。

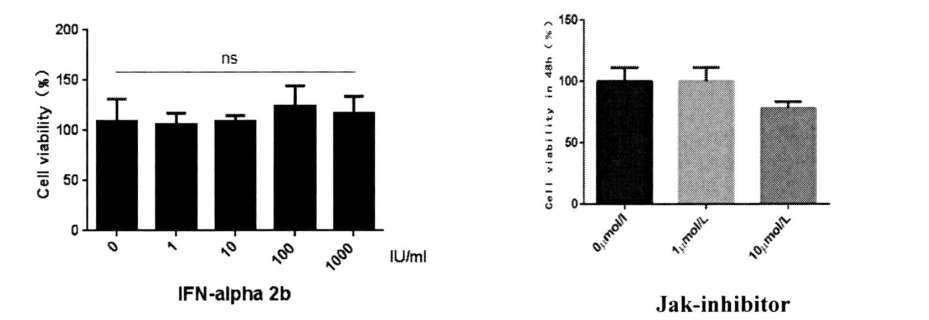


图 3.9 IFN α -2b 及 Jak inhibitor 对 HEK293T 细胞活性的影响作用
Fig 3.9 The effect of IFN α -2b and Jak inhibitor on cell viability of HEK293T cells

3.3.6 PPRV 激活 Atg13 基因的转录

已有研究发现, Atg13 蛋白具有抗多种病毒复制的功能, 为了验证 PPRV 是否具有抗病毒作用及 Atg13 蛋白在宿主抗 PPRV 感染过程中的作用, 我们前期用 PPRV 感染 HEK293T 细胞, 并于感染后的 0h、12h、24h、36h、48h、72 h 后分别收获细胞, 提取 RNA, 检测 Atg13 基因 mRNA 相对表达量。实验结果显示, PPRV 感染 HEK293T 细胞后, 细胞内 Atg13 蛋白表达量显著升高, 且在 PPRV 感染后的 0-36h 内, 病毒 mRNA 水平呈递增状态, 且在 36h 时达到最高值, 36-72h 之间病毒 mRNA 水平呈递减状态, 如图 3.10。此结果表明 PPRV 感染后可激活细胞内 Atg13 蛋白表达。

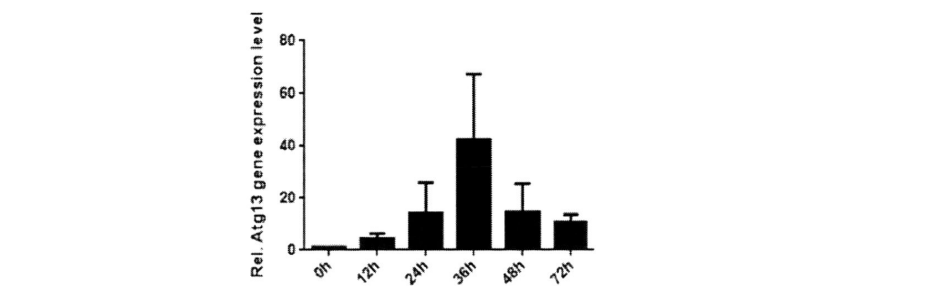


图 3.10 PPRV 感染 HEK293T 细胞后激活 Atg13 基因转录
Fig 3.10 The transcription of Atg13 gene was induced by the infection of PPRV on HEK293T cells

3.3.7 过表达 Atg13 基因对 PPRV 复制的影响作用

为了验证 Atg13 基因对 PPRV 复制的影响作用，我们首先将 Atg13 基因在 HEK293T 细胞中进行了过表达，然后用 PPRV/Nigeria 75/1 病毒感染细胞，并收取 PPRV 感染后 0h、12h、24h、36h、48h、72h 的样品，检测 PPRV H 基因 mRNA 相对表达量及 Atg13 蛋白的表达情况。结果显示，在该系统中，Atg13 蛋白能正确表达，其次，过表达 Atg13 基因后，PPRV H 基因 mRNA 相对表达量显著下降，如图 3.11，该结果说明过表达 Atg13 基因后，PPRV 的复制被显著抑制。此外，根据上述结果，我们猜测 Atg13 是否是通过激活 IFN 信号通路来抑制 PPRV 增殖的，所以，我们检测了当 PPRV 感染过表达 Atg13 的 HEK293T 细胞系统时，细胞内 IFN 及其相关 ISG 的 mRNA 水平，结果显示，Atg13 能够激活 HEK293T 细胞中的 IFN 信号通路，从而发挥抗病毒作用，如图 3.12。

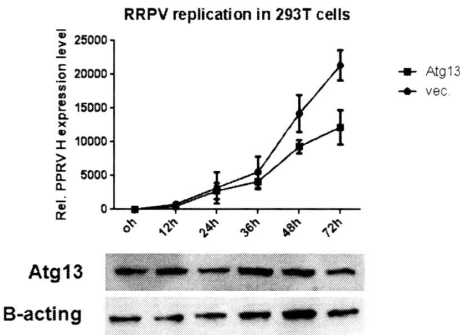


图 3.11 过表达 Atg13 蛋白对 PPRV 在 HEK293T 细胞中增殖的影响作用

Fig 3.11 The effect on PPRV proliferation in HEK293T cell when Atg13 gene was overexpressed

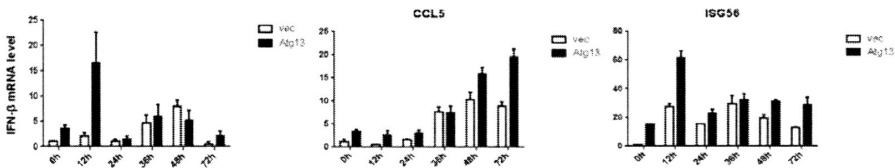


图 3.12 Atg13 蛋白激活 I 型 IFN 信号通路

Fig 3.12 Atg13 protein activate I-IFN signaling pathway

3.3.8 敲低 Atg13 基因对 I 型 IFN 信号通路的影响

为了验证敲低 Atg13 基因对 PPRV 复制的影响作用，我们将 Atg13 基因在 HEK293T 细胞中进行了干扰，然后用 PPRV/Nigeria 75/1 病毒感染细胞，并收取 PPRV 感染后 48h 的样品，检测 PPRV H 基因 mRNA 相对表达量。结果显示，敲低 Atg13 基因后，IFN-β、CCL5、

ISG56 mRNA 相对表达量显著下降，如图 3.13，该结果说明敲低 Atg13 基因后，即使有激活 IFN 的信号，I 型 IFN 信号通路激活作用被抑制。

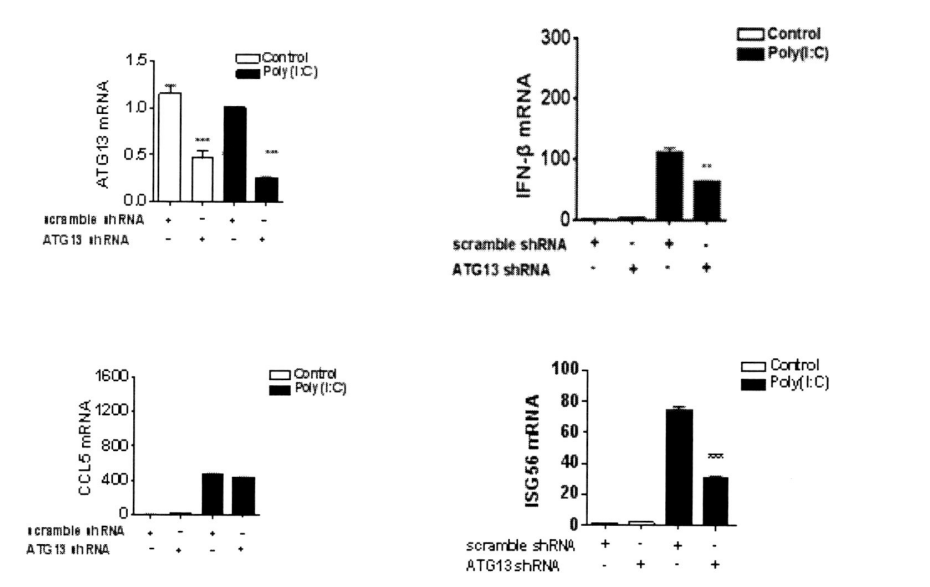


图 3.13 敲低 Atg13 基因后 I 型 IFN 信号通路被抑制
Fig 3.13 I-IFN signaling pathway was blocked by knocking Atg13gene

3.3.9 Atg13 蛋白激活产生的 IFN 对 PPRV 的抑制作用

我们在前期研究中已经发现 Atg13 蛋白具有抑制 PPRV 复制的功能，所以推测 Atg13 蛋白可能是通过激活 IFN 通路产生干扰素及其它抗病毒因子抑制病毒复制的。为了验证 Atg13 蛋白通过激活 IFN 通路产生干扰素及其它抗病毒因子是否具有抗病毒作用，我们将过表达 Atg13 蛋白之后的培养物上清孵育 PPRV 感染的 HEK293T 细胞，进一步用 PPRV 感染该 HEK293T 细胞，培养一定时间检测 PPRV H 基因转录水平，结果显示，与对照组即未加 Atg13 转染后的培养物上清的实验组相比，PPRV H 基因 mRNA 水平显著降低，如图 3.14 所示。该结果表明，Atg13 蛋白可以激活 IFN 通路并产生干扰素及其它抗病毒因子且具有抑制 PPRV 复制的功能。

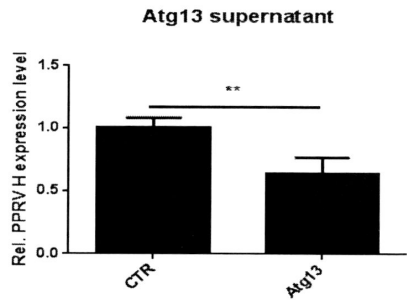


图 3.14 Atg13 蛋白激活产生的 IFN 抑制 PPRV
Fig 3.14 The antiviral activity of Atg13 supernatant

3.4 讨论

天然免疫是机体防御病毒入侵的第一道防线,通过模式识别受体识别病毒的核酸和蛋白质等病原相关分子模式,通过信号传导激活相应的转录因子,诱导 I 型干扰素和炎症因子的表达,进一步诱导多种抗病毒蛋白表达。干扰素(interferon,IFN)是机体抵抗病毒侵染的一道重要免疫屏障。在对 IFN λ 的研究过程中就已经发现病毒侵染机体在诱导 I 型 IFN 产生的同时还可以产生多种免疫因子,包括 III 型 IFN (IFN-λ),也被称为 IL-28a、IL-28b 和 IL-29,它们均具有 I 型 IFN 样的免疫活性,在机体抵御病毒入侵的天然免疫体系中具有重要地位,同时在适应性免疫反应过程中发挥调节作用。近年来,关于宿主细胞的自噬相关蛋白在调控天然免疫、炎症反应、抗病毒等各个方面均发挥重要功能,而这些过程往往不依赖于自噬过程。由于 PPRV/Nigeria 75/1 可以在 HEK293T 细胞中增殖,所以 HEK293T 细胞可作为研究 PPRV 的敏感细胞,这也为 PPRV 激活天然免疫应答的研究提供了依据。本研究通过检测 PPRV 感染后宿主细胞内的 I 型、II 型、III 型干扰素及部分 ISG 的 mRNA 水平发现,PPRV 感染 HEK293T 细胞后,主要激活细胞内的 IFN-β、IFN-λ2、IFN-λ3 三种干扰素,同时也可以激活 ISG15、ISG56、CXCL10 等几种 ISG。此外,外源加入 IFNα-2b 及 IFN-λ3 均具有抑制 PPRV 的作用,我们还检测了干扰素下游信号通路中的抑制剂 Jak inhibitor 对内源性 & 外源性干扰素的抑制作用,结果表明 Jak inhibitor 只对外源性的干扰素具有抑制作用,而对内源性即 PPRV 感染宿主细胞后所产生的的干扰素信号通路无显著抑制作用。然而,本研究中将 PPRV 感染用 IFN- alpha-2b 预处理的 HEK293T 细胞后,检测到 IFN 相关 ISG 相对于对照组无显著变化,推断 IFN 相关 ISG 可能在 IFN 作用的短时间内,如 6 小时已经发挥了作用并降解了,此外,PPRV 本身可以激活 ISG 的表达,所以我们检测不到显著变化。我们的研究还发现,PPRV 感染宿主细胞后,宿主细胞内的自噬相关蛋白 Atg13 蛋白被激活,Atg13 蛋白激活 IFN-β 信号通路及 Atg13 具有抑制 PPRV 复制的功能。这样,PPRV 感染所激活的 Atg13 反过来抑制 PPRV 的复制,形成了牵涉着天然免疫和自噬在内的完整环路,预示着细

胞内存在某种抑制 PPRV 感染的可能性,对其加以放大或许可开发为控制 PPRV 感染的新手段。我们推测, Atg13 是借助 I 型干扰素途径抑制 PPRV 在 HEK293T 细胞中复制的,探索一个自噬相关蛋白选用天然免疫相关路径抑制病毒复制的机制,正是本研究的目的。此外, IFN- λ 3 作为一种近年内新发现的干扰素,具有抗多种病毒感染功能,本研究也证实了其对 PPRV 的抗病毒作用,这也为一些珍贵的反刍动物治疗 PPRV 感染提供了新的思路。

第四章 病毒唑和霉酚酸的抗 PPRV 作用

病毒唑(三氮唑核苷, Ribavirin, TFT) 又称利巴韦林或病毒三唑, 系广谱抗病毒药, 经体内外实验证实对多种 DNA 和 RNA 病毒有明显的抑制作用, 临床使用广泛, 用于防治流感、副流感、甲、乙、丙型肝炎、麻疹、腮腺炎、水痘、单纯疱疹、带状疱疹、病毒性眼角膜炎、疱疹性口腔炎、小儿腺病毒肺炎, 可能还有抗肿瘤作用。病毒唑(Ribavirin) 通过抑制肌苷酸-5-磷酸脱氢酶(inosine-5'-monophosphate dehydrogenase, IMPDH), 阻断肌苷酸转化为鸟苷酸, 从而抑制病毒的 RNA 和 DNA 合成, 对 DNA 病毒和 RNA 病毒均有抑制复制作用。霉酚酸(Mycophenolic acid, MPA)是一种免疫抑制剂, 可逆地抑制 T 和 B 淋巴细胞的增殖以及抗体形成, 也是一种 IMPDH 非竞争性的抑制剂, 通过取代烟酰胺腺嘌呤二核苷酸辅因子的烟酰胺部分和一个催化的水分子, 抑制 IMPDH 活性, (IMPDH 是嘌呤合成过程中一种关键的酶), 所以也被国内外广泛用作一种抗病毒药物。但关于 Ribavirin 和 MPA 体外抗小反刍兽疫病毒的作用还未见报道, 因此本研究采用体外实验法就 Ribavirin 和 MPA 对 PPRV 的作用及作用机制进行了探索。

4.1 实验材料

4.1.1 细胞、病毒

Vero 细胞; PPRV 弱毒苗-PPRV/Nigeria 75/1 (实验室保存)。

4.1.2 实验耗材、试剂及其配制方法

Ribavirin (Sigma-Aldrich); DMEM 培养基、M199 培养基(兰州民海生物工程有限公司); 胰酶、小牛血清(兰州民海生物工程有限公司); Guanosine(Sigma); DMSO(Sigma-Aldrich); TRIzol、反转录试剂盒、荧光定量试剂盒(Promega 公司)、CCK8 试剂盒(北京博奥龙生物科技有限公司)、6 孔板、24 孔板、96 孔板、25cm² 及 75cm² 细胞瓶(Coring 公司); Ribavirin、Guanosine、Mycophenolic (Sigma-Aldrich)。

细胞培养液: 培养基 M199 购买自兰州民海生物工程有限公司, 无血清培养基, 在使用前加入 3% 的小牛血清 4℃ 保存。

细胞冻存液: 10% DMSO 与 90% FBS 混合, 现配现用。

4×10⁻² mol/L Ribavirin 储存液配制: 取 50mg Ribavirin 干粉加入 5118.76μl DMSO 中, 分装至 1.5ml EP 管中, -20 保存。

Guanosine 储存液配制: 用 DMSO 溶解 Mycophenolic 粉末, 终浓度为 10 mmol/L。

Mycophenolic 储存液配制: 用 DMSO 溶解 Mycophenolic 粉末, 终浓度为 0.15mol/L。

pH7.4 的 0.01M PBS 溶液配制: 称取 8.0 g NaCl、0.44 g NaHPO₄、0.2 g KCl、0.24 g KH₂PO₄ 加入 900 ml 蒸馏水, 调节 pH 为 7.4, 用蒸馏水定容至 1000 ml, 121℃ 高压 20 min。

4.1.3 实验设备

倒置显微镜(Olympas); 酶标仪(Thermol 公司); 荧光定量 PCR 扩增仪(美国 Bio-RAD 公司); 超净工作台(安泰空气技术(苏州)有限公司); 台式高速冷冻离心机(湖南湘仪); 高压灭菌器(山东新华医疗器械股份有限公司); DHG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精密实验设备有限公司); 超低温冰箱(海尔); 核酸蛋白测定仪(德国 Eppendorf 公司); CK40-32PH 普通光学显微镜(日本 Olympus 公司)、IX71 荧光倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司); 3111 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo-Fisher 公司)。

4.2 实验方法

4.2.1 药物毒性实验

Ribavirin 药物对细胞毒性的实验是通过 CCK8 试剂盒来测定的。本实验中, 我们将 Vero 细胞加入 96 孔培养板中, 置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养, 24h 后换新鲜培养基(含 Ribavirin 终浓度分别为 0.1μmol/L、1μmol/L、10μmol/L、100μmol/L; 将未加 Ribavirin 的实验组设定为各自的对照组。细胞继续培养 48h、96h 后分别取出培养板, 并每孔加入 10 μL CCK8 溶液, 孵育 1-4h 后通过酶标仪读出 450nm 处的光密度值, 用公式 % viability = $\frac{\text{OD}_{450\text{nm}}}{\text{OD}_{450\text{nm}}(\text{对照})} \times 100\%$ 计算出细胞活性。

4.2.2 Ribavirin 抑制病毒增殖实验

4.2.2.1 Ribavirin 抑制 PPRV 增殖的作用

- (1) Vero 细胞加入 12 孔板中, 置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 12h。
- (2) 1 MOI PPRV/Nigeria 75/1 病毒感染每孔细胞, 同时设立不接病毒对照, 再次置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 24h。
- (3) 弃掉旧的培养基, 换成含有 ribavirin 的新鲜培养基, 终浓度分别为 0μmol/L, 0.1μmol/L, 1μmol/L, 10μmol/L, 100μmol/L, 继续置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养, 并每天观察细胞病变情况。
- (4) 72h 后再次弃掉旧的培养基, 换成新鲜的含上述 ribavirin 浓度的培养基, 置 37℃、5%CO₂ 继续培养 48h。
- (5) 上述细胞培养物弃上清且每孔加入 1ml TRizol 混匀并于 -80℃ 保存。
- (6) Vero 细胞加入 12 孔板中, 置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 12h。
- (7) 1 MOI PPRV/Nigeria 75/1 病毒感染每孔细胞, 同时设立不接病毒对照, 再次置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 24h。
- (8) 弃掉旧的培养基, 换成含有 ribavirin 的新鲜培养基, 终浓度分别为 0μmol/L, 0.1μmol/L, 1μmol/L, 10μmol/L, 100μmol/L, 继续置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养, 并每天观察细胞病变情况。

(9) 72h 后再次弃掉旧的培养基, 换成新鲜的含上述 ribavirin 浓度的培养基, 置 37℃、5%CO₂ 继续培养 48h。

(10) 上述培养物用 PBS 清洗一遍, 加 70%酒精固定观察。

4.2.2.2 Ribavirin 抑制 PPRV 增殖作用的时间-效应关系

(1) Vero 细胞加入 12 孔板中, 置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 12h 。

(2) 1 MOI PPRV/Nigeria 75/1 病毒感染每孔细胞, 同时设立不接病毒对照, 再次置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 24h。

(3) 弃掉旧的培养基, 换成含有 ribavirin 的新鲜培养基, 终浓度为 100μmol/L, 并设不加 Ribavirin 的对照, 继续置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养, 每天观察细胞病变情况并分别在培养 24h、48h、72h、96h、120h 后取出培养物, 弃培养物上清, 每孔加入 1ml TRizol 并于-80℃保存。

(4) 剩余两孔培养物弃掉旧的培养基, 换成新鲜的含 100μmol/L ribavirin 的新鲜培养基, 置 37℃、5%CO₂ 继续培养 24h 及 48h 后上述两孔细胞培养物弃上清每孔加入 1ml TRizol 混匀并于-80℃保存。

4.2.2.3 Ribavirin 抑制 PPRV 增殖作用的剂量-效应关系

(1) Vero 细胞加入 12 孔板中, 置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 12h 。

(2) 1 MOI PPRV/Nigeria 75/1 病毒感染每孔细胞, 同时设立不接病毒对照, 再次置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 24h。

(3) 弃掉旧的培养基, 换成含有 ribavirin 的新鲜培养基, 终浓度分别为 0μmol/L, 0.1μmol/L, 1μmol/L, 10μmol/L, 100μmol/L, 继续置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养, 并每天观察细胞病变情况。

(4) 72h 后上述细胞培养物弃上清每孔加入 1ml TRizol 混匀并于-80℃保存。

4.2.2.4 确定 Ribavirin 作用 72h 的最佳抗病毒作用浓度

(1) Vero 细胞加入 6 孔板中, 置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 12h 。

(2) 1 MOI PPRV/Nigeria 75/1 病毒感染每孔细胞, 同时设立不接病毒对照, 再次置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 24h。

(3) 弃掉旧的培养基, 换成含有 0μmol/L, 1μmol/L, 10μmol/L, 100μmol/L, ribavirin 的新鲜培养基, 继续置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养, 每天观察细胞病变情况 72h 后将上述细胞培养物弃上清每孔加入 1ml Trizol 混匀并于-80℃保存。

4.2.2.5 Guanosine 抑制 ribavirin 抗 PPRV 增殖作用

(1) Vero 细胞加入 6 孔板中, 置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 12h。

- (2) 1 MOI PPRV 病毒感染每孔细胞, 同时设立不接病毒对照, 再次置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 24h。
- (3) 弃掉旧的培养基, 换成含有 100μmol/L ribavirin 及 Guanosine 的新鲜培养基, Guanosine 终浓度分别为 0μmol/L, 1μmol/L, 10μmol/L, 继续置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养, 并每天观察细胞病变情况。
- (4) 72h 后上述细胞培养物弃上清每孔加入 1ml Trizol 混匀并于-80℃保存。

4.2.3 Mycophenolic 抑制 PPRV 增殖作用

4.2.3.1 Mycophenolic 抑制 PPRV 增殖作用

- (1) Vero 细胞加入 6 孔板中, 置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 12h。
- (2) 用 1 MOI PPRV/Nigeria 75/1 病毒感染每孔细胞, 同时设立不接病毒对照, 再次置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 24h。
- (3) 弃掉旧的培养基, 换成含有 0.1μmol/L, 1μmol/L 及 10μmol/L Mycophenolic 的新鲜培养基, 继续置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 72h, 并每天观察细胞病变情况。
- (4) 72h 后上述细胞培养物弃上清每孔加入 1ml Trizol 混匀并于-80℃保存。

4.2.3.2 Guanosine 抑制 Mycophenolic 抗 PPRV 增殖作用

- (1) Vero 细胞加入 6 孔板中, 置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 12h。
- (2) 用 1 MOI PPRV/Nigeria 75/1 病毒感染每孔细胞, 同时设立不接病毒对照, 再次置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 24h。
- (3) 弃掉旧的培养基, 换成含有 1μmol/L Mycophenolic 及 Guanosine 的新鲜培养基, Guanosine 终浓度分别为 0μmol/L, 1μmol/L, 10μmol/L, 继续置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养, 并每天观察细胞病变情况。
- (4) 72h 后上述细胞培养物弃上清每孔加入 1ml Trizol 混匀并于-80℃保存。

4.2.4 荧光定量 PCR

RNA 提取、反转录、荧光定量 PCR 均参照第三章。

4.2.5 统计学分析

统计学分析参照第三章。

4.3 结果

4.3.1 药物毒性实验

为了检测本实验中用到的抗病毒药物 Ribavirin 是否对 vero 细胞活性有影响作用，我们通过 CCK8 法(MTT 替代法)对细胞进行活性检测。结果表明，本实验中使用的 Ribavirin 的四种浓度：0.1μmol/L、1μmol/L、10μmol/L、100μmol/L 所产生的细胞毒性对细胞活性影响较小，不会对 Ribavirin 抗病毒的效果产生影响。当我们用纯度≥98%的 Ribavirin 孵育细胞时，不同浓度的药物处理的 Vero 细胞活性与对照组细胞活性无明显差异。如图 4.1，当 Vero 细胞用 0.1μmol/L、1μmol/L、10μmol/L、100μmol/L 分别处理 72h 后细胞活性跟对照相比，亦无显著差异，说明 Ribavirin 对细胞活性无显著影响，不会对实验结果造成干扰，如图 4.1。

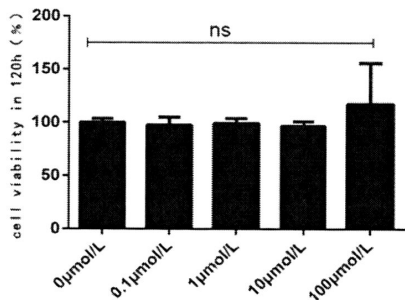


图 4.1 Ribaririn 对 Vero 细胞的毒性实验
Fig. 4.1 Cytotoxicity of Ribaririn on vero cell

4.3.2 Ribavirin 抑制 PPRV 增殖的作用及最佳作用浓度

为了研究 ribavirin 的抗病毒效应，我们分别用含有终浓度分别为 0μmol/L、0.1μmol/L、1 μmol/L、10μmol/L、100μmol/L ribavirin 的培养基孵育接有 PPRV/Nigeria75/1 病毒的 Vero 细胞 120 小时，并检测每组实验中 ribavirin 对 PPRV 病毒复制功能的抑制作用。结果显示，ribavirin 对 PPRV/Nigeria75/1 病毒复制有抑制作用，且 Vero 细胞经 ribavirin 作用 120 小时后发现浓度为 100μmol/L 的 ribavirin 抑制病毒复制的效果最佳，如图 4.2。此外，经过以上 ribavirin 浓度作用的接 PPRV/Nigeria 75/1 病毒的 Vero 细胞，5 天后细胞经染色发现，在浓度为 100μmol/L 的 ribavirin 的作用下，存活细胞数量最多，如图 4.3。再次说明 ribavirin 具有抗 PPRV/Nigeria 75/1 增殖的作用，且 100uml/L 为最佳作用浓度。

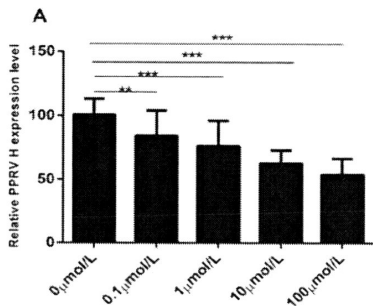


图 4.2 Ribavirin 抑制 PPRV 复制
Fig 4.2 Ribavirin Inhibit PPRV proliferation

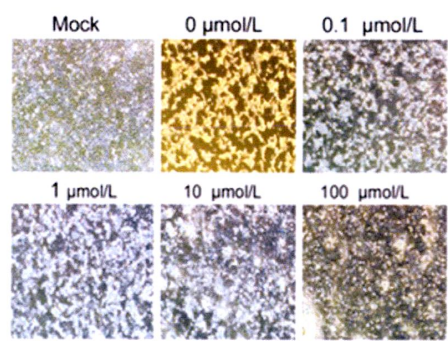
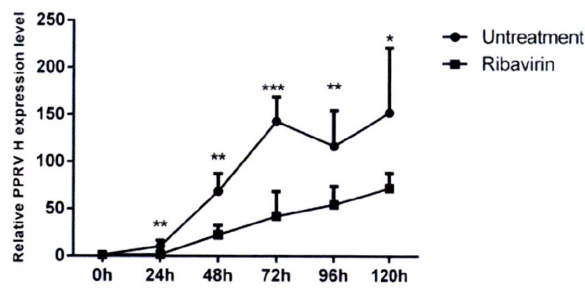


图 4.3 PPRV 阳性 Vero 细胞观察

Fig 4.3 Post-infection cellular morphology

4.3.3 Ribavirin 抑制 PPRV 增殖的时间效应

我们在上一步实验中已经确定 100μmol/L 为 ribavirin 为抑制 PPRV 复制最佳作用浓度，为了进一步验证 ribavirin 作用的最佳浓度，此后实验均设定 100 μmol/L 为 ribavirin 的作用浓度，并在 ribavirin 对接 PPRV/Nigeria 75/1 后的 Vero 细胞作用 24h、48h、72h、96h、120 h 后测定病毒复制情况，结果显示，ribavirin 作用 72h 其抑制病毒增殖的效应最强，如图 4.



4。

图 4.4 Ribavirin 抑制 PPRV 增殖最佳作用时间

Fig.4.4 Inhibitory effect of Ribavirin on PPRV proliferation

4.3.4 确定 Ribavirin 对 PPRV 作用的最佳浓度

前面实验中已经确定 ribavirin 最佳作用时间时间为 72h，且发现 0.1μmol/L ribavirin 无明显抗病毒作用，本次实验我们设定 ribavirin 最作用时间时间为 72h，再次确定不同浓度的 ribavirin 的抗病毒效果，结果如图 4.5，表明 ribavirin 抑制 PPRV/Nigeria 75/1 在 Vero 细胞中增殖过程中，当其浓度为 100 μmol/L，作用时间为 72h 时其抗病毒作用最佳。

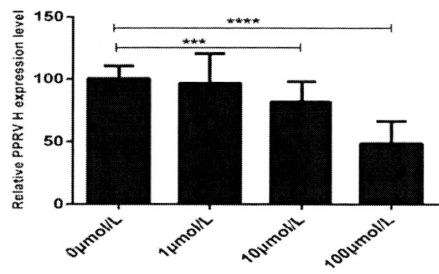


图 4.5 Ribavirin 对 PPRV 作用的最佳浓度
Fig.4.5 Concentration of Ribavirin on PPRV

4.3.5 Ribavirin-Guanosine 抑制病毒增殖实验

我们在上一步实验中已确定 ribavirin 对 PPRV/Nigeria 75/1 复制具有显著抑制作用。且研究发现，ribavirin 可能通过抑制肌苷酸-5-单磷酸脱氢酶(IMPDPH)活性，继而阻断肌苷酸转化为鸟苷酸，使得细胞内 GTP 无法正常供应从而抑制病毒的 RNA 和 DNA 合成。为了进一步确定 ribavirin 是否也通过相同的作用机制来抑制 PPRV/Nigeria 75/1 增殖的，在本实验中除了加入 100 μmol/L ribavirin 外还加入不同浓度的 guanosine 来观察病毒复制的过程是否得到部分恢复。结果表明，当反应体系中加入 100 μmol/L ribavirin+1μg/ml guansine 或者 100 μmol/L ribavirin+10μg/ml guansine，ribavirin 抑制 PPRV/Nigeria 75/1 复制的作用被减弱，PPRV 复制能力得到恢复；单独加入 1μg/ml 或 10μg/ml guansine 对病毒复制过程无影响，见图 4.6。

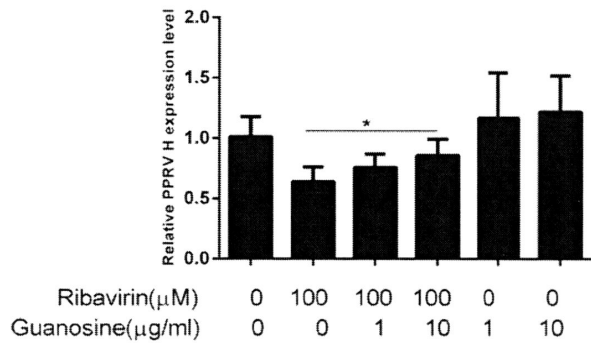


图 4.6 Ribavirin-Guanosine 抑制病毒增殖
Fig4.6 Antiviral activity of Ribavirin-Guanosine

4.3.6 Mycophenolic 抑制 PPRV 增殖作用

为了研究 IMPDH 的非竞争性的抑制剂 Mycophenolic 的抗病毒效应，我们分别用含有终浓度分别为 0 μ mol/L、0.1 μ mol/L、1 μ mol/L、10 μ mol/L 的培养基孵育接有 PPRV 病毒的 Vero 细胞，并检测 Mycophenolic 是否对 PPRV/Nigeria 75/1 病毒复制有抑制作用。结果显示，ribavirin 对 PPRV/Nigeria 75/1 病毒复制有抑制作用，且 Mycophenolic 浓度在 1 μ mol/L，10 μ mol/L 下作用 5 天后对病毒复制抑制效果最佳，如图 4.7。

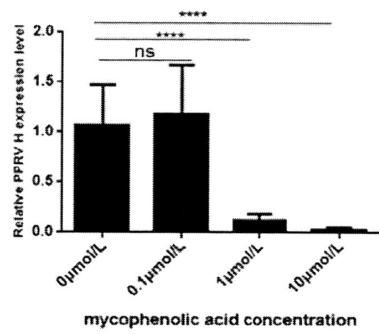


图 4.7 Mycophenolic 抑制病毒增殖
Fig4.7 Antiviral activity of Mycophenolic

4.3.7 Guansine 抑制 Mycophenolic 抗 PPRV/Nigeria 75/1 增殖作用

我们在上一步实验中已确定 Mycophenolic 对 PPRV/Nigeria 75/1 复制具有显著抑制作用。且研究发现，ribavirin 作为肌苷酸-5-单磷酸脱氢酶(IMPDH)的竞争性抑制剂，可以抑制细胞内 GTP 正常供应从而抑制病毒的 RNA 和 DNA 合成。为了进一步确定 Mycophenolic 是否也通过相同的作用机制来抑制 PPRV/Nigeria 75/1 增殖的，我们在本实验中除了加入 1 μ mol/L Mycophenolic 外还加入不同浓度的 guanosine 来观察病毒复制的过程是否得到部分恢复。结果表明，当反应体系中加入 1 μ mol/L Mycophenolic+1 μ g/ml guansine 或者 1 μ mol/L Mycophenolic+10 μ g/ml guansine，Mycophenolic 抑制 PPRV/Nigeria 75/1 复制的作用被减弱，PPRV/Nigeria 75/1 复制能力得到恢复，见图 4.8。

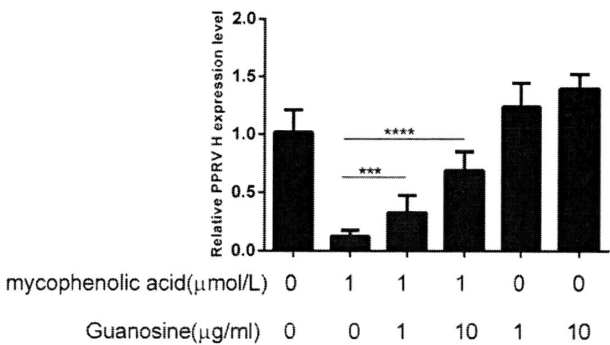


图 4.8 Mycophenolic-Guanosine 抑制病毒增殖
Fig 4.8 Antiviral activity of Mycophenolic-Guanosine

4.4 讨论

小反刍兽疫是由 PPRV 引起的高致病性疫病，死亡率达 50-80%。国内外学者对该病毒进行了大量研究，对 PPRV 分子生物学、细胞生物学特性及流行病毒特征有了新的认识，但其致病机制及免疫学特性是亟需全世界相关研究机构进一步开展深入研究的领域，以期更好的解决该病毒造成的威胁。Ribavirin 作为一种核苷类似物具有广谱的抗病毒的功能，广泛应用于临床治疗多种病毒感染疾病，如用于治疗慢性及急性病毒感染，如丙肝、戊肝、副流感病毒等。由于国际公认 PPRV 敏感细胞为 Vero 细胞，本研究中将 Vero 细胞作为研究 PPRV 的细胞。本实验中 PPRV/Nigeria 75/1 感染的 Vero 细胞用不同浓度的 ribavirin 即 0μmol/L、0.1μmol/L、1μmol/L、10μmol/L、100μmol/L 处理 120h，通过荧光定量 PCR 方法检测 PPRV H 基因 mRNA 水平及显微镜直接观察 PPRV 阳性细胞两种方式，揭示 ribavirin 对 PPRV/Nigeria 75/1 增殖有显著抑制作用且呈剂量依赖，从而我们初步确定 100μmol/L 位最佳作用浓度。进一步用 100μmol/L 的 ribavirin 分别处理接毒的 Vero 细胞 0h、24h、48h、72h、96h、120h 后测得在 ribavirin 作用 72h 时，其抗病毒效果最佳。Ribavirin 可能通过以下几种机制来抑制病毒复制的：①减少细胞内的 GTP；②调控免疫应答；③致死突变；④抑制病毒聚合酶活性；⑤通过阻遏翻译起始因子 4E 从而阻碍病毒基因翻译过程。虽然本研究没有深入探究 Ribavirin 抑制 PPRV 增殖的其它机制，但已证实 Ribavirin 通过抑制 GTP pool 的形成来抑制 PPRV 复制是其重要机制之一。除此之外，本研究中还分析了 IMPDH 的非竞争性的抑制剂-Mycophenolic 的抗病毒作用，结果表明 1 μmol/L 及 10 μmol/L Mycophenolic 对 PPRV/Nigeria 75/1 增殖有显著抑制作用。且 guansine 的加入同样抑制了 Mycophenolic 抗 PPRV/Nigeria 75/1 复制的作用。这一结论与 Mycophenolic 抑制 MPDH 酶活性阻碍 GTP 形成的机制是相吻合的，这也进一步证实了 Ribavirin 抑制 PPRV 复制的机制。然而，Ribavirin 抑制病毒复制还可能通过其它几种机制，如其对天然免疫信号通路的调节作用。研究报道称，Ribavirin 能够提高 Raf、MEK、ERK、Tyk2S 以及 TAT1 等分子的磷酸化水平，活化 ERK 及 STAT 信号通路的活化，ISG56、ISG56、CXCL10 等抗病毒相关因子也相应被诱导产生，

最终达到抗病毒的效果。故在临床中, ribavirin 和 IFN- α 通常会被配合用于 HCV 感染患者的治疗。此外, MPA 在临床上也常被用于治疗肝脏移植后病人的排异反应症状。总之, 这两种药物都是成本低、较安全的, 且在临床上广泛使用的药物, 未来这两种药物可用作治疗 PPRV 感染的家养的或者野生珍稀观赏动物。然而, 由于 ribavirin 及 Mycophenolic 具有免疫抑制效应, 在临床上的应用还需进一步开展动物实验来确定其疗效。

第五章 细胞内黏着斑蛋白对病毒复制的影响

宿主细胞的细胞骨架及其信号通路在病毒吸附及进入细胞过程中发挥不可或缺的作用。黏着斑复合体发挥整合细胞骨架及细胞表面信号的功能。黏着斑蛋白(vinculin)是黏着斑的成员之一,主要介导整合素与细胞骨架的连接,该蛋白具有 8 个 α 螺旋束组成的 5 个结构域。Vinculin 通过与自身结构域与踝蛋白、桩蛋白等其它黏着斑蛋白相互作用,共同参与信号转导从而参与信号转导调节黏着斑及细胞骨架动力学。研究表明,黏着斑蛋白可通过介导黏着斑的形成、解散以及微丝与细胞膜的连接、解聚来促使细胞迁移,也可以通过稳定黏着斑抑制细胞迁移。研究者还发现,在逆转录病毒感染过程中,Vinculin 参与整合素蛋白与肌动蛋白的结合。当过表达 Vinculin 基因时,宿主细胞对艾滋病病毒(HIV)和鼠白血病病毒的敏感性降低。相反,当 Vinculin 基因被瞬时敲低后,HIV 和猴免疫缺陷病毒对宿主细胞的感染性增强,表明 Vinculin 蛋白具有抑制逆转录病毒的功能。

成簇、规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)是许多细菌和古细菌抵御外来噬菌体入侵的一种免疫机制,最早在大肠杆菌基因中发现。CRISPR 通常由前导区(leader)、间隔区(speacer)和重复序列区(repeats)三部分组成。原间隔序列旁侧存在一个保守的短序列,称为 PAM (protospacer-adjacent motif),该序列作为 Cas 蛋白对原间隔序列识别的一个序列信号。在 CRISPR 位点侧旁通常包含一组保守的 CRISPR 相关基因(CRISPR-associated genes, Cas genes),可以编码具有核酸酶和解旋酶活性的 Cas 蛋白。Cas 蛋白与 CRISPR 转录出来的 RNA 共同组成蛋白质核酸复合物,并发挥免疫功能。Cas9 是 Cas 蛋白家族中的一员,与 CRISPR 共同构成 II 型 CRISPR/Cas 系统,行使其核酸内切酶功能,对靶点 DNA 序列进行特异性切割,从而实现对基因组的精确编辑。原核细胞大多缺乏非同源末端连接修复系统,需对切割的基因组 DNA 进行人工同源重组修复,进而实现原核基因组精确的敲除、修饰等。

本研究基于 CRISPR/Cas 基因编辑技术,构建含 vinculin 基因靶向 RNA(sgRNA)和用于同源修复的 Donor 序列的质粒,并在较短的时间内筛选出 vinculin 基因缺失 Vero 细胞,为深入探析 vinculin 基因功能奠定基础,同时也为研究其他重要基因功能及其作用机制提供重要平台。

5.1 实验材料

5.1.1 细胞、病毒及质粒

质粒: cas9, pcDNA3.1 (带 puro 抗性), U6 质粒均由本实验室保藏。

细胞: Vero 细胞由本实验室保藏。

病毒: PPRV 弱毒苗-PPRV/Nigeria 75/1 (实验室保存)。

5.1.2 实验耗材、试剂及其配制方法

琼脂粉、胰蛋白胨、酵母提取物购自英国 OXOID 公司；酚氯仿，无水乙醇，氨苄抗生素，PBS 购自生工生物工程(上海)股份有限公司；buffer D、Opti-MEM 培养基、转染试剂 Lipofectamine3000 购自 Invitrogen 公司；puromycin（抗生素）购自 Sigma 公司；KOD FX 酶、Taq 酶等购自大连宝生物有限公司；HEPES、NaCl、真核细胞蛋白酶抑制剂、30%丙烯酰胺、50×核酸电泳缓冲液（TAE）、6×蛋白上样 buffer 购自索莱宝生物股份有限公司；PVDF 膜、ECL 发光液购自 Milli pore；蛋白 Marker 购自 Thermol scientific。

细胞培养液、细胞冻存液、SDS-PAGE 所需溶液等均参照第四章的配制方法。

5.1.3 实验设备

主要实验设备见 3.1.1 和 4.1.3。

5.2 实验方法

5.2.1 敲除质粒的构建

(1) 在 Ncbi 上查找 vero 细胞 vinculin 的基因序列、mRNA 序列、CDS 序列并比对寻找第一外显子区。进行 vinculin 序列比对和 sgRNA 设计，将设计的 sgRNA 加入酶切位点 BbsI，标记为 sgE1-sgE6，表 3.2 中列出了针对 Vero 细胞 vinculin 的基因序列设计的六对 sgRNA 序列。

表 3.2 构建 Vinculin 敲除质粒引物
Table 3.2 Information of primers used to construction Vinculin knockout plasmids

Vinculin-F	Vinculin-R
ACCGGCGCACGATCGAGAGCATCC	AAACGGATGCTCTCGATCGTGCGC
ACCGCGAGAGCATCCTGGAGCCGG	AAACCCGGCTCCAGGATGCTCTCG
ACCGGGCACAGCAGATCTCCACC	AAACGGTGGGAGATCTGCTGTGCC
ACCGCCACCTGGTGATAATGCACG	AAACCGTGCATTATCACCAGGTGG
ACCGCACGAGGAGGGCGAGGTGGA	AAACTCCACCTCGCCCTCCTCGTG
ACCGATCGTGC GCGTATGAAACAC	AAACGTGTTTCATACGCGCACGAT

此外，设计一对检测引物，其扩增产物长度 400bp-500bp。引物序列为，Vinculin-J-F:AGTCCGTGAGGCTGGTTA；Vinculin-J-R: CGAGGCACTCCACAAATAAT。

(2) 引物退火：

引物用 Annealing Buffer 稀释，终浓度为 100uM，两条引物各加 5μl 互为模板，PCR 程序为：90℃，4 min；70℃，10 min；60℃，10 min；50℃，10 min；37℃，15 min；25℃，10 min；4℃保存。

(3) 退火产物连接并转化

用内切酶 BbsI 酶切环状载体 U6，回收酶切产物，并与退火产物进行连接，反应程序如下：

组分	体积（μl）
PCR 产物	10μl
gRNA 载体 u6	1μl
T4	Buffer
T4 连接酶	1μl
补加 ddH2O 至	20μl

上述反应在 16 度进行 3h 后进行转化实验，待长出菌落后进行阳性克隆的 PCR 验证。反应体系如下：

组分	体积（μl）
Taq	0.2
Taq buffer	2
dNTPs	2
DMSO	1
Primer	0.1/0.1
ddH2O	15

同时设立阴性对照，其反应条件为 95℃预变性 5 min；95 ℃变性 35 s，55℃复性 35 s，72 ℃延伸 2 in，30 个循环；72℃再延伸 10 min，16℃保存。产物大小在 200-300bp，假如与预期结果相符，挑菌落，摇菌进行质粒提取，并进一步进行测序验证。

(4) 质粒提取

- 质粒提取参照质粒小提试剂盒说明书进行，步骤如下：
- (1) 1.5mlEP 管中加满菌液，13,800rpm 离心 5min，用真空泵吸干上清。
 - (2) 加入 200μl 溶液 I，含 RNase，重悬细胞。可用 vortex，也可在平板上刮 10 下。
 - (3) 加入 200μl 溶液 II，轻轻颠倒 EP 管 10 次，静置 2 分钟。
 - (4) 加入 200μl 溶液III，轻轻混匀。
 - (5) 13,800rpm 离心 10min，取中层清液于新的 EP 管，注意 EP 管对应编号。
 - (6) 加入 420μl 异丙醇，颠倒 10 次，13,800rpm 离心 10min。
 - (7) 直接弃去上清，加入 800μl 75%乙醇(从侧壁缓缓加入，稍微摇匀)，13,800rpm 离心 2min。
 - (8) 弃去上清，short 离心，吸干上清，真空烘干 2min。

(9) 加入 20μl MilliQ-H₂O 溶解，冷冻保存。

5.2.2 基因敲除细胞系构建

- (1) Vero 细胞加入 6 孔板中，置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 12h。
- (2) 分别将 1μg 质粒 cas9、质粒 0.5 μg pcDNA3.1（带 puro 抗性）与 2μg sgRNA 的混合物及 3 μl Lipofectamine 3000 用 100 μl Opti-MEM 培养基稀释，二者混匀并室温孵育 5min。
- (3) 细胞换新鲜培养基并将上述混合物加入到细胞中，轻轻混匀，继续置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养。
- (4) 细胞培养

转染的细胞弃掉旧的培养基，换成分别含有浓度为 0μg/ml, 2μg/ml L, 4 μg/ml L, 8μg/ml , 16μg/ml, 20μg/ml puro 的新鲜培养基，继续置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养作用 48h，每 12 小时观察细胞情况，未转染的细胞加药作负对照，待对照全部死亡即可收样。

5.2.3 敲除细胞系的鉴定

加药初步筛得的阳性细胞提取基因组，并通过 PCR 进行进一步验证，反应体系如下：

反应体系：50μl	
KOD FX	0.5
KOD buffer	25
dNTPs	5
DMSO	1
基因组 DNA	1
检测引物	1/1
ddH ₂ O	15.5

35cycle 同时设立阴性对照，其反应条件为 95℃预变性 5 min；95 ℃变性 30s； 55℃复性 35 s；68℃延伸 40s, 32 个循环；68℃再延伸 10 min ；最后反应产物送测序。观察测序结果是否在 sgRNA 插入的位点图谱上出现套峰。

5.2.4 细胞分选

将测序图谱中出现套峰的细胞进行流式细胞仪分选单克隆，并且将单克隆收集到 96 孔培养板中进行培养，随后逐步扩大培养至六孔板及细胞瓶中。待筛选后的单克隆细胞可正常传代后，冻存一部分细胞，并留存一部分继续传代及进行后续实验。

5.2.5 Western-blot 检测

- (1) Vero 细胞加入 6 孔板中，置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 12h。

- (2)细胞转染后 48h 收样,反复冻融三次,使用 PBS 吹打收集,离心,弃去 PBS,加入细胞裂解液,冰上孵育 20min。
- (3) 制备 10%浓度的 SDS-PAGE 胶,蛋白样品与上样 buffer 混合、煮沸 10min 并离心,上样电泳[80V 30min (浓缩胶) 120V 90min (分离胶)]。
- (4) 电泳结束后,恒压 80V 转膜 90min(湿转)。
- (5) 转膜结束后,取膜将水分吸干,切膜放入甲醇再次活化(直到没有白点)。
- (6) PVDF 膜用 TBST 洗涤并在 3%-5% 脱脂奶粉中封闭 30min。
- (7) PVDF 膜用 TBST 洗涤三次(一次 5min)并将其浸泡在含有一抗的 5%的脱脂奶粉中,室温孵育 2h。
- (8) PVDF 膜用 TBST 洗涤三次(一次 5min)并将其浸泡在含有二抗的 5%的脱脂奶粉中,室温孵育 1h。
- (9) 用 TBST 洗涤 PVDF 膜并滴加 ECL 发光液,通过化学发光仪观察。

5.2.6 单克隆细胞的 PCR 及测序鉴定

将 PCR 鉴定合格的单克隆细胞送至上海生工进行测序。

5.2.7 细胞迁移实验

- (1) 先用 marker 笔在 6 孔板背后,用直尺比着,均匀的划横线,大约每隔 0.5~1cm 一道,横穿过孔。每孔至少穿过 5 条线。
- (2) 每孔加入约 5×10^5 个 Vero 细胞, 37°C , 5% CO_2 培养约 12h, 融合率达到 100%。
- (3) 第二天用枪头比着直尺,尽量垂至于背后的横线划痕。
- (4)利用 PBS 洗涤细胞 3 次,去除划下的细胞,加入无血清培养基。
- (5) 培养的 Vero 细胞置 37°C 5% CO_2 培养箱培养,并在培养后 0, 6, 12, 24h 时间点取样,拍照(具体时间依实验需要而定)。
- (6)利用 Image J 软件计算细胞间距离的均值。

5.2.8 PPRV 在 Vero 细胞中的增殖实验

- (1) 将待传代的 wt(野生型)及 ko-v(敲除 V 基因)Vero 细胞加入 6 孔板中,置 37°C 、5% CO_2 培养箱培养 12h。
- (2) 用 1 MOI PPRV/Nigeria 75/1 病毒感染 wt Vero 细胞及 ko Vero 细胞,同时设立不接病毒对照,再次置 37°C 、5% CO_2 培养箱培养并且每天观察细胞病变情况并分别在培养 24h、48h、72h 后取出培养物,弃培养物上清,每孔加入 1ml TRizol 并于 -80°C 保存。

5.2.9 统计学分析

统计学分析见 3.2.10。

5.3 实验结果

5.3.1 vinculin 敲除质粒的构建

将退火形成的双链 sgRNA 定向克隆到 sgRNA-u6 载体中,将构建好的 sgRNA-u6-vinculin sgRNA 经 PCR 验证正确后送检测序,测序正确,可用于下一步实验。

5.3.2 基因敲除细胞系

分别取 1 μ g cas9 质粒、0.5 μ g pcDNA3.1 质粒(带 puro 抗性)、2 μ g sgRNA 共转染到 Vero 中进行 vinculin 基因敲除。培养 24 h 后,培养基中加入含有 0 μ g/ml、2 μ g/ml L、4 μ g/ml L、8 μ g/ml 16 μ g/ml、0 μ g/ml puro 的新鲜培养基,继续置 37℃、5%CO₂ 培养,每 12 小时观察细胞情况,未转染的细胞加药作对照,待对照全部死亡即可收获细胞。同时,以对照组细胞为标准,加药筛选最佳的药物浓度(加药使得细胞在 48 内全部死亡,筛选的 vero 细胞的药物浓度为 20 μ g/ml)。待药物筛选 6-8 代时即可收集剩余的活细胞并进行扩大培养。

5.3.3 敲除细胞系的 PCR 及测序鉴定

初步筛得的阳性细胞提取基因组,并通过 PCR 进行进一步验证,以 Vinculin-J-F 及 Vinculin-J-R 检测引物,对长度为 400bp-500bp 的检测产物进行扩增。观察到测序结果在 sgRNA 插入的位点图谱上出现低矮的套峰,表明基因敲除成功,如图 5.1。

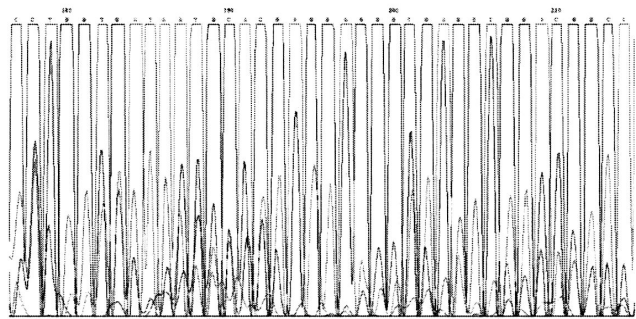


图 5.1 ko-VinculinVero Vinculin 基因测序结果
Fig 5.1 Sequencing of Vinculin gene of ko-VinculinVero cells

5.3.4 Western-blot 检测

对测序图谱中出现套峰的细胞进行流式细胞仪分选单克隆,收集单克隆于 96 孔培养板中,并逐步扩大培养至六孔板中,冻存一部分细胞,留存的一部分 Vinculin 基因敲除细胞进行 Western-blot 检测,结果表明, KO1、KO2、KO3、KO4、KO5 五株为筛选的敲除 Vinculin 基因的 Vero 细胞,其 Vinculin 蛋白表达缺失,CTL 为野生型 Vero 细胞,其 Vinculin 蛋白正常表达,如图 5.2。

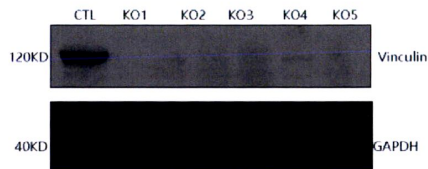


图 5.2 Western-blot 检测 Vinculin 蛋白表达
Fig 5.2 Vinculin protein was tested by Western-blot

5.3.5 细胞迁移实验

黏着斑复合体定位于细胞膜表明，可连接细胞基质和细胞骨架蛋白，而黏着斑蛋白是黏着斑复合体的核心蛋白，其在细胞迁移、信号传递等方面发挥重要作用。本实验中，我们检测了 wt Vero 细胞及 ko-Vinculin Vero 细胞在细胞迁移方面的差异，结果显示，ko-Vinculin Vero 细胞迁移较 wt Vero 慢，说明，Vinculin 蛋白在细胞迁移过程中起重要作用，此外，我们通过 Image J 软件对细胞划痕进行测量，如图 5.3。

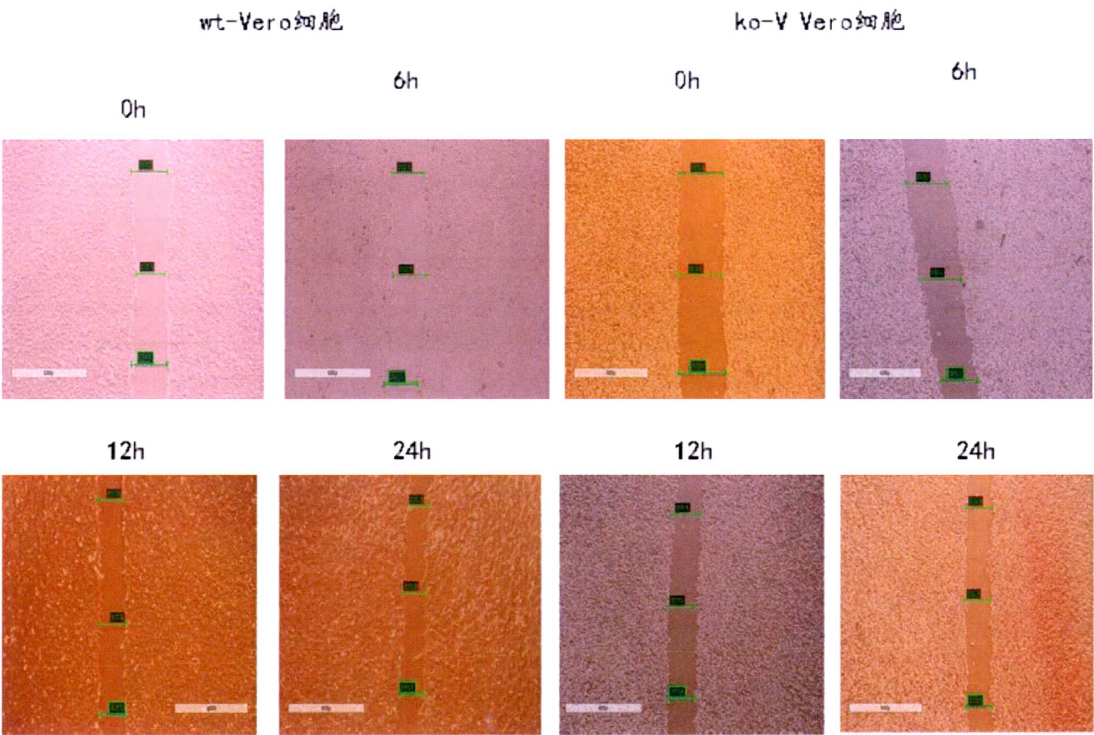


图 5.4 Wt 及 Ko-Vinculin Vero 细胞迁移实验
Fig 5.4 Migration of Wt and Ko-Vinculin Vero cells

5.3.6 PPRV 在 Vero 细胞中的增殖实验

为了检测 Vinculin 基因敲除的 Vero 细胞对 PPRV 感染敏感性是否发生改变，我们用 1 MOI PPRV/Nigeria 75/1 病毒感染 wt Vero 细胞和 ko Vero 细胞，同时设立不接病毒对照，分别在培养 24h、48h、72h 后取样检测 PPRV H 基因 mRNA 转录水平，结果显示，同 wt Vero 细胞实验组相比，ko Vero 细胞实验组 PPRV 的 H 基因 mRNA 转录水平下降，说明在 Vero 细胞中，敲除 Vinculin 基因后会降低 PPRV 复制的水平，从而表明宿主 Vinculin 基因在病毒增殖过程中发挥重要作用，如图 5.4。

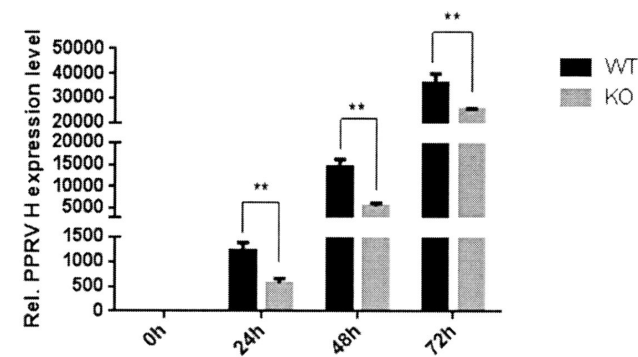


图 5.4 Vinculin 基因敲除后对 PPRV 在 Vero 细胞中增殖的影响作用

Fig 5.4 The effect of PPRV proliferation in Vero cells when vinculin was knocking out

5.4 讨论

宿主细胞的细胞骨架及其信号通路在病毒吸附及进入细胞过程中发挥不可或缺的作用。黏着斑复合体发挥整合细胞骨架和细胞表面信号的功能。细胞内的黏着分子，如黏着斑蛋白 (Vinculin)、黏着斑激酶、斑联蛋白、桩蛋白等，能够结合或被招募到黏附结构中整合素的胞内结构上，形成复杂而且巨大的蛋白质复合物，最终与微丝骨架相连。黏着斑蛋白可通过介导黏着斑的形成、解散以及微丝与细胞膜的连接、解聚来促使细胞迁移，也可以通过稳定黏着斑抑制细胞迁移。黏着斑蛋白是黏着斑的成员之一，主要介导整合素与细胞骨架的连接。此外，Vinculin 通过与自身结构域与踝蛋白、桩蛋白等其它黏着斑蛋白相互作用，共同参与

信号转导从而参与信号转导调节黏着斑及细胞骨架动力学。除此之外,在逆转录病毒感染过程中,Vinculin 参与整合素蛋白与肌动蛋白的结合。当过表达 Vinculin 基因时,宿主细胞对艾滋病病毒(HIV)和鼠白血病病毒的敏感性降低。相反,当 Vinculin 基因被瞬时敲低后,HIV 和猴免疫缺损病毒对宿主细胞的感染性增强,表明 Vinculin 蛋白具有抑制逆转录病毒的功能。由于国际公认 PPRV 敏感细胞为 Vero 细胞,本研究中将 Vero 细胞作为研究 PPRV 的细胞。本研究通过 CRISPR-cas9 技术敲除了 Vero 细胞黏着斑蛋白,随后检测了 Ko-Vinculin Vero 细胞增殖、PPRV 增殖效率及细胞迁移率的变化状况,证实宿主的 Vinculin 蛋白在细胞增殖、迁移以及病毒感染性方面发挥重要作用,为开发 PPRV 新的预防及治疗措施提供了新的思路。

第六章 全文结论

1. N 蛋白在 PPRV 复制过程中发挥着重要作用, 其蛋白高级构象的形成与密码子使用模式具有明显的相关性。
2. PPRV 感染宿主细胞可激活细胞内 IFN- β 、IFN- λ 2、IFN- λ 3 三种干扰素, 它们在宿主抗 PPRV 过程中发挥重要作用。
- 3 外源加入 IFN- α 2b、IFN- λ 3 三种干扰素可以有效抑制 PPRV 增殖, Jak inhibitor 只对外源性的干扰素通路的激活具有抑制作用。
4. Atg13 蛋白通过激活 IFN 信号通路来抑制 PPRV 在宿主细胞中的增殖。
5. ribavirin 和 Mycophenolic 两种核苷类似物均可通过抑制 GTP-pool 的机制抑制 PPRV 的复制。
6. Vinculin 蛋白对细胞的迁移和病毒在宿主细胞中的复制效率均有影响。

参考文献

1. 贺洞杰, 韩庆彦, 唐豪, 等. 甘肃省羊小反刍兽疫发生趋势分析. 畜牧兽医杂志, 2014, 33 (6): 102-103.
2. 翟军军, 才学鹏. 麻疹病毒核衣壳蛋白分子生物学及其应用的研究进展. 中国预防兽医学报, 2009, 31 (9): 745-748.
3. 刘斌, 陈晓宇, 牟筱, 等. 小反刍兽疫 N5 蛋白的原核表达及间接 ELISA 检测方法的建立. 甘肃农业大学学报, 2017, 52 (2): 1-6.
4. 张学虎, 马旭升, 付钰广, 等. 小反刍兽疫病毒 China/Tib/07 株 V 蛋白的原核表达及纯化. 中国兽医科学, 2013, 43 (11): 1140-1145.
5. 邓瑞雪, 蒙学莲, 曾巧英, 等. 小反刍兽疫病毒 F 基因缺失体的克隆、表达及鉴定. 生物技术通报, 2016, 32 (4): 234-239.
6. 蒙学莲, 窦永喜, 朱学亮, 等. 小反刍兽疫病毒 H 基因胞外区的表达与分析. 中国兽医科学, 2014, 44 (11): 1134-1139.
7. 翟军军, 窦永喜, 张海瑞, 等. 小反刍兽疫病毒 P 基因的克隆及其结构与功能分析. 中国农业科学, 2010, 43 (11): 2355-2362.
8. 张学虎. 小反刍兽疫病毒 V 蛋白与宿主 STAT1 相互作用的研究. 硕士学位论文. 甘肃: 甘肃农业大学, 2013.
9. 张海瑞, 翟军军, 窦永喜, 等. 小反刍兽疫病毒非结构蛋白 V 基因的克隆及其编码蛋白的结构与功能. 中国兽医科学, 2011, 41 (03): 235-239.
10. 翟军军, 窦永喜, 张海瑞, 等. 小反刍兽疫病毒基因组全长 cDNA 的构建及其序列的测定. 病毒学报, 2010, 26 (4): 315-321.
11. 邓瑞雪. 小反刍兽疫病毒囊膜糖蛋白和受体的相互作用研究. 硕士学位论文. 甘肃: 甘肃农业大学, 2016.
12. 蒙学莲, 窦永喜, 朱学亮, 等. 小反刍兽疫病毒血凝素蛋白与受体蛋白 SLAM 的相互作用. 畜牧兽医学报, 2014, 45 (3): 426-433.
13. 骆学农, 郑亚东, 才学鹏. 小反刍兽疫的研究进展. 中国兽医科学, 2007, 37 (11): 994-999.
14. 李景玉, 高玉竹, 李元果, 等. 小反刍兽疫研究进展. 中国畜牧兽医, 2014, 41 (10): 274-280.
15. 信爱国, 向文彬. 小反刍兽疫研究进展. 中国预防兽医学报, 2003, 25 (2): 152-155.
16. 郭昌明, 张群, 刘亚静, 等. 双抗体夹心 ELISA 检测小反刍兽疫病毒抗原方法的建立及病原流行病学调查. 中国兽医学报, 2017, 37 (05): 799-803.
17. 李翠翠, 孙一瑞, 王子龙, 等. 稳定表达小反刍兽疫病毒 N 蛋白的 CHO 细胞系的建立及表达产物的抗原性鉴定. 中国预防兽医学报, 2016, 38 (04): 262-265.
18. 李天亮, 韩超峰, 曹雪涛. 视黄酸诱导基因 1 样 (RLR) 识别和调控的进展. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32 (4): 549-5528.
19. Alexopoulou L. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3[J]. *Nature*, 2001, 413(6857): 732-738.

20. Adombi CM, Lelenta M, Lamien CE, et al. Monkey CV1 cell line expressing the sheep-goat SLAM protein: a highly sensitive cell line for the isolation of peste des petits ruminants virus from pathological specimens[J]. *Journal of Virological Methods*, 2011, 173(2): 306-313
21. Aragones, L, Guix, S, Ribes, E, Bosch, A, Pinto, R.M, Fine-tuning translation kinetics selection as the driving force of codon usage bias in the hepatitis A virus capsid[J]. *PLoS Pathogen*, 2010, 6, e1000797
22. Aragones, L., Bosch, A., Pinto, R.M., 2008, Hepatitis A virus mutant spectra under the selective pressure of monoclonal antibodies: codon usage constraints limit capsid variability[J]. *Journal of Virology*, 82, 1688-1700
23. Andrejeva J, Young DF, Goodbourn S, et al. Degradation of STAT1 and STAT2 by the V proteins of simian virus 5 and human parainfluenza virus type 2, respectively: consequences for virus replication in the presence of alpha/beta and gamma interferons[J]. *Journal of Virology*, 2002, 76(5): 2159-2167
24. Atmaca HT and Kul O. Examination of epithelial tissue cytokine response to natural peste des petits ruminants virus (PPRV) infection in sheep and goats by immunohistochemistry[J]. *Histology and Histopathology*, 2012, 27(1): 69-78
25. Atherto P, Lausacker F, Harrison A, et al. Low-intensity pulsed ultrasound promotes cell motility through vinculin-controlled Rac 1 GTPase activity[J]. *Journal of Cell Science*, 2017, 130, 2277-2291
26. Bailey D, Banyard A, Dash P, et al. Full genome sequence of peste des petits ruminants virus, a member of the Morbillivirus genus[J]. *Virus Research*, 2005, 110(1-2): 119-124
27. Bao, J.Y., Wang, Q.H., Li, L. Evolutionary dynamics of recent peste des petits ruminants virus epidemic in China during 2013–2014[J]. *Virology*, 2017, 510, 156-169
28. Baron MD, Barrett T. Rinderpest viruses lacking the C and V proteins show specific defects in growth and transcription of viral RNAs[J]. *Journal of Virology*, 2000, 74(6):2603-2611
29. Bartkowiak B, Yan C, Greenleaf AL. Engineering an analog-sensitive CDK12 cell line using CRISPR/Cas[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2015, 1849, 1179-1187
30. Bahir, I, Fromer, M, Prat, Y, Linial, M, 2009, Viral adaptation to host: a proteome-based analysis of codon usage and amino acid preferences[J]. *Molecular Systems Biology*, 5, 311
31. Baron, M.D, Diallo, A, Lancelot, R., Libeau, G, 2016[J]. Peste des Petits Ruminants Virus, *Advances in Virus Research*, 95, 1-42
32. Bankamp B, Horikami SM, Thompson PD, et al. Domains of the measles virus N protein required for binding to P protein and self-assembly[J]. *Virology*, 1996, 216, 272-277
33. Berke IC. MDA5 cooperatively forms dimers and ATP-sensitive filaments upon binding double-stranded RNA[J]. *The EMBO Journal*, 2012, 31(7): 1714-1726
34. Belgnaoui SM, Paz S, Hiscott J. Orchestrating the interferon antiviral response through the mitochondrial antiviral signaling (MAVS) adapter[J]. *Current Opinion in Immunology*, 2011, 23(5): 564-572.

35. Bellini WJ, Englund G, Rozenblatt S. Measles virus P gene codes for two proteins[J]. *Journal of Virology*, 1985, 53(3): 908-919
36. Bestebroer J, Vkovski, Mauthe M, et al. Hidden behind autophagy: the unconventional roles of ATG proteins[J]. *Traffic*, 2013, 207: 181-189
37. Berke IC. MDA5 cooperatively forms dimers and ATP-sensitive filaments upon binding double-stranded RNA[J]. *The EMBO Journal*, 2012, 31(7):1714-1726
38. Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1999, 294(5): 1351-1362
39. Blumberg BM, Crowley JC, Silverman JI, et al. Measles virus L protein evidences elements of ancestral RNA polymerase[J]. *Virology*, 1988, 164(2): 487-497
40. Bodjo SC, Lelenta M, Couacy-Hymann E et al. Mapping the peste des petits ruminants virus nucleoprotein: identification of two domains involved in protein self-association[J]. *Virus Research*, 2008, 131(1): 23-32.
41. Bugno M. Identification of the interleukin-6/oncostatin M response element in the rat tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) promoter[J]. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23(24), 5041-5047
42. Butt, A.M, Nasrullah, I, Qamar, R, Tong, Y. Evolution of codon usage in Zika virus genomes is host and vector specific[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2016, 5, e107
43. Carbone, A, Zinovyev, A, Kepes, F. Codon adaptation index as a measure of dominating codon bias[J]. *Bioinformatics*, 2003, 19, 2005-2015
44. Cebulla CM. Viral inhibition of interferon signal transduction[J]. *Intervirology*, 1999, 42(5-6), 325-330
45. Clemens MJ. The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function[J]. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 1997, 17(9): 503-524
46. Chaney, J.L, Clark, P.L., 2015, Roles for synonymous codon usage in protein biogenesis[J]. *Annual Review of Biophysics*, 44, 143-166
47. Chard, L.S., Bailey, D.S., Dash, P., Banyard, A.C., Barrett, T., 2008, Full genome sequences of two virulent strains of peste-des-petits ruminants virus, the Cote d'Ivoire 1989 and Nigeria 1976 strains[J]. *Virus Research*, 136, 192-197
48. Childs K, Stock N, Ross C, et al. mda-5, but not RIG-I, is a common target for paramyxovirus V proteins[J]. *Virology*, 2007, 359(1):190-200
49. Childs K S, Andrejeva J, Randall R E, et al. Mechanism of mda-5 Inhibition by paramyxovirus V proteins[J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(3): 1465-1473.
50. Chinnakannan S K, Nanda S K, Baron M D. Morbillivirus V proteins exhibit multiple mechanisms to block type 1 and type 2 interferon signalling pathways[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57063
51. Clarke, T.F.t., Clark, P.L., 2008, Rare codons cluster[J]. *PLoS One*, 3, e3412

52. Clemens M J, Elia A. The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function[J]. *Journal of Interferon & Cytokine Research the Official Journal of the International Society for Interferon & Cytokine Research*, 1997, 17(9): 503-524
53. Colamonici O, Yan H, Domanski P, et al. Direct binding to and tyrosine phosphorylation of the alpha subunit of the type I interferon receptor by p135tyk2 tyrosine kinase[J]. *Molecular & Cellular Biology*, 1994, 14(12): 8133-8142
54. Couacy-Hymann E, Bodjo C, Danho T, et al. Evaluation of the virulence of some strains of peste-des-petits-ruminants virus (PPRV) in experimentally infected West African dwarf goats[J]. *Veterinary Journal*, 2007, 173(1): 178-183
55. Couacyhymann E, Bodjo S C, Danho T, et al. Early detection of viral excretion from experimentally infected goats with peste-des-petits ruminants virus[J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 2007, 78(1): 85-88
56. Das S C, Baron M D, Barrett T. Recovery and characterization of a chimeric rinderpest virus with the glycoproteins of peste-des-petits-ruminants virus: homologous F and H proteins are required for virus viability[J]. *Journal of Virology*, 2000, 74(19): 9039-9047
57. Deddouche S, Goubau D, Rehwinkel J, et al. Identification of an LGP2-associated MDA5 agonist in picornavirus-infected cells[J]. *Elife*, 2014, 3(3): e01535
58. Delenda C, Taylor G, Hausmann S, et al. Sendai viruses with altered P, V, and W protein expression[J]. *Virology*, 1998, 242(2): 327-337
59. Devaux P, Messling V V, Songsunthong W, et al. Tyrosine 110 in the measles virus phosphoprotein is required to block STAT1 phosphorylation[J]. *Virology*, 2007, 360(1): 72-83
60. Diallo A, Barrett T, Lefevre P C, et al. Comparison of proteins induced in cells infected with rinderpest and peste des petits ruminants viruses[J]. *Journal of General Virology*, 1987, 68(7): 2033
61. Diallo A, Barrett T, Barbron M, et al. Cloning of the nucleocapsid protein gene of peste-des-petits-ruminants virus: relationship to other morbilliviruses[J]. *Journal of General Virology*, 1994, 75 (Pt 1)(1): 233-237
62. Ding YZ, You YM, Sun DJ, et al. The effects of the context-dependent codon usage bias on the structure of the nsplalpha of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Biomed Research International*, 2014, 765320
63. Didcock L, Young D F, Goodbourn S, et al. The V protein of simian virus 5 inhibits interferon signalling by targeting STAT1 for proteasome-mediated degradation[J]. *Journal of Virology*, 1999, 73(12): 9928
64. Didcock L, Young D F, Goodbourn S, et al. Sendai virus and simian virus 5 block activation of interferon-responsive genes: importance for virus pathogenesis[J]. *Journal of Virology*, 1999, 73(4): 3125-3133

65. Dos Reis M, Wernisch L, Savva R. Unexpected correlations between gene expression and codon usage bias from microarray data for the whole *Escherichia coli* K-12 genome[J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31, 6976-6985
66. Du Y, Duan T, Feng Y, LRRC25 inhibits type I IFN signaling by targeting ISG15-associated RIG-I for autophagic degradation[J]. *The EMBO Journal*, 2018, 37(3): 351-366
67. Ezeibe M C, Okoroafor O N, Ngene A A, et al. Persistent detection of peste de petits ruminants antigen in the faeces of recovered goats[J]. *Tropical Animal Health And Production*, 2008, 40(7): 517-519
68. Fan X, Han Shi-chong, Yan Dan, et al. Foot-and-mouth disease virus infection suppresses autophagy and NF- κ B antiviral responses via degradation of ATG5-ATG12 by 3Cpro[J]. *Cell Death Disease*, 2017. 8(1): 1-11
69. Fearn R, Young D F, Randall R E. Evidence that the paramyxovirus simian virus 5 can establish quiescent infections by remaining inactive in cytoplasmic inclusion bodies[J]. *Journal of General Virology*, 1994, 75(12): 3525-3539
70. Ezeibe MC. Persistent detection of peste de petits ruminants antigen in the faeces of recovered goats[J]. *Tropical Animal Health and Production*, 2008, 40(7): 517-519
71. Franz KM, Neidermyer WJ, Tan YJ, et al. STING-dependent translation inhibition restricts RNA virus replication[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018, 115(9): E2058-E2067
72. Fuji N, Yokosawa N, Shirakawa S. Suppression of interferon response gene expression in cells persistently infected with mumps virus, and restoration from its suppression by treatment with ribavirin[J]. *Virus Research*, 1999, 65(2): 175-185
73. Fujii N, Kimura K, Murakami T, et al. Suppression of interferon-induced oligo-2',5'-adenylate synthetase induction in persistent infection[J]. *Journal of General Virology*, 1990, 71 (Pt 12)(12): 3071
74. Gack M U, Nistal-Villā n E, Inn K S, et al. Phosphorylation-mediated negative regulation of RIG-I antiviral activity[J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(7): 3220-3229
75. Gack M U, Kirchhofer A, Shin Y C, et al. Roles of RIG-I N-terminal tandem CARD and splice variant in TRIM25-mediated antiviral signal transduction[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(43): 16743-16748
76. Gack M U, Shin Y C, Joo C H, et al. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity[J]. *Nature*, 2007, 446(7138): 916-920
77. García-Sastre A. Inhibition of interferon-mediated antiviral responses by influenza A Viruses and other negative-strand RNA viruses[J]. *Virology*, 2001, 279(2): 375-384
78. García J, García-Barreno B, Vivo A, et al. Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus-infected cells: formation of inclusion bodies in transfected cells that coexpress the nucleoprotein, the phosphoprotein, and the 22K protein[J]. *Virology*, 1993, 195(1): 243-247

79. Garakani K, Shams H, Mofrad MRK. Mechanosensitive conformation of vinculin regulates its binding to MAPK1[J]. *Biophysical Journal*, 2017, 112, 1885-1893.
80. Gibbs EP, Taylor WP, Lawman MJ, et al. Classification of peste des petits ruminants virus as the fourth member of the genus Morbillivirus[J]. *Intervirology*, 1979, 11, 268-274.
81. Giraudon P, Jacquier M F, Wild T F. Antigenic analysis of African measles virus field isolates: identification and localisation of one conserved and two variable epitope sites on the NP protein[J]. *Virus Research*, 1988, 10(2-3): 137-152.
82. Gitlin L, Barchet W, Gilfillan S, et al. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(22): 8459-8464.
83. Gotoh B, Komatsu T, Takeuchi K, et al. Paramyxovirus accessory proteins as interferon antagonists[J]. *Microbiology and immunology*, 2001, 45(12): 787-800.
84. Gu W, Zhou T, Ma J, et al. Folding type specific secondary structure propensities of synonymous codons[J]. *IEEE Transaction on Nanobioscience*, 2003, 2, 150-157.
85. Gu W, Zhou T, Ma J, et al. The relationship between synonymous codon usage and protein structure in Escherichia coli and Homo sapiens[J]. *Biosystems*, 2004, 73, 89-97.
86. Gubbay O, Curran J, Kolakofsky D. Sendai virus genome synthesis and assembly are coupled: a possible mechanism to promote viral RNA polymerase processivity[J]. *Journal of General Virology*, 2001, 82(12): 2895-903.
87. Guisez Y, Robbens J, Remaut E, et al. Folding of the MS2 coat protein in Escherichia coli is modulated by translational pauses resulting from mRNA secondary structure and codon usage: a hypothesis[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 1993, 162, 243-252.
88. Gupta SK, Majumdar S, Bhattacharya TK, et al. Studies on the relationships between the synonymous codon usage and protein secondary structural units[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 269, 692-696.
89. Guryanov SG, Liljeroos L, Kasaragod P, et al. Crystal structure of the measles virus nucleoprotein core in complex with an N-Terminal region of phosphoprotein[J]. *Journal of Virology*, 2015, 90, 2849-2857.
90. Gutsche I, Desfosses A, Effantin G, et al. Structural virology. Near-atomic cryo-EM structure of the helical measles virus nucleocapsid[J]. *Science*, 2015, 348, 704-707.
91. Hanson G and Collier J. Codon optimality, bias and usage in translation and mRNA decay[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2017, 6, 346-352.
92. Haig D M. Subversion and piracy: DNA viruses and immune evasion[J]. *Research in Veterinary Science*, 2001, 70(3):205-219.
93. Hasan M K, Kato A, Muranaka M, et al. Versatility of the accessory C proteins of sendai virus: contribution to virus assembly as an additional role[J]. *Journal of Virology*, 2000, 74(12): 5619.

94. Haspel R L, Darnell J E. A nuclear protein tyrosine phosphatase is required for the inactivation of Stat1[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(18): 10188-10193
95. Haspel R L, Salditt-Georgieff M, Jr D J. The rapid inactivation of nuclear tyrosine phosphorylated STAT-1 depends upon protein tyrosine phosphatase[J]. *The EMBO Journal*, 1996, 15(22): 6262-6268
96. He B, Paterson R G, Stock N, et al. Recovery of paramyxovirus simian virus 5 with a V protein lacking the conserved cysteine-rich domain: the multifunctional V protein blocks both interferon- β induction and interferon signaling[J]. *Virology*, 2002, 303(1): 15-32
97. Herberman R B. Effect of alpha-interferons on immune function[J]. *Seminars in Oncology*, 1997, 24(9): 9-80
98. Hickey PL, Angus PW, McLean AJ, et al. Oxygen supplementation restores theophylline clearance to normal in cirrhotic rats[J]. *Gastroenterology*, 1995, 108, 1504-1509
99. Horikami S M, Moyer S A. Structure, transcription, and replication of measles virus[J]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 1995, 191(6): 35-50
100. Horikami S M, Smallwood S, Bankamp B, et al. An amino-proximal domain of the L protein binds to the P protein in the measles virus RNA polymerase complex[J]. *Virology*, 1994, 205(2): 540
101. Huang C, Zhang Q, Guo X K, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 4 antagonizes beta interferon expression by targeting the NF- κ B essential modulator[J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(18): 10934-10945
102. Huang DL, Bax NA, Buckley CD, et al. Vinculin forms a directionally asymmetric catch bond with F-actin[J]. *Science*, 2017, 18, 703-706
103. Huang J, Wang Y, Zhao J. CRISPR editing in biological and biomedical investigation[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2018, 233, 3875-3891
104. Huber M, Cattaneo R, Spielhofer P, et al. Measles virus phosphoprotein retains the nucleocapsid protein in the cytoplasm[J]. *Virology*, 1991, 185(1): 299-308
105. Ikegame S, Takeda M, Ohno S, et al. Both RIG-I and MDA5 RNA helicases contribute to the induction of alpha/beta interferon in measles virus-infected human cells[J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(1): 372-379
106. Ismail TM, Yamanaka MK, Saliki JT, et al. Cloning and expression of the nucleoprotein of peste des petits ruminants virus in baculovirus for use in serological diagnosis[J]. *Virology*, 1995, 208, 776-778
107. Jacobs JL. Mechanisms of MAVS regulation at the mitochondrial membrane[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2013, 425(24), 5009-5019
108. Jiang X. Ubiquitin-induced oligomerization of the RNA sensors RIG-I and MDA5 activates antiviral innate immune response[J]. *Immunity*, 2012, 36(6): 959-973

109. Karlin D. Substitution of two residues in the measles virus nucleoprotein results in an impaired self-association[J]. *Virology*, 2002, 302(2): 420-432
110. Kanduc D. Rare human codons and HCMV translational regulation[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2017, 27, 213-216
111. Kolakofsky D. Viral DNA polymerase scanning and the gymnastics of Sendai virus RNA synthesis[J]. *Virology*, 2004, 318(2), 463-473
112. Komar AA. A pause for thought along the co-translational folding pathway[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2009, 34, 16-24
113. Komuro A. RNA- and virus-independent inhibition of antiviral signaling by RNA helicase LGP2[J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(24), 12332-12342
114. Kramer G, Boehringer D, Ban N, et al. The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2009, 16, 589-597
115. Jia H, Zhang L, Wang T, et al. Development of a CRISPR/Cas9-mediated gene-editing tool in *Streptomyces rimosus*[J]. *Microbiology*, 2017, 163, 1148-1155
116. Kaizuka T, Mizushima N. Atg13 is essential for autophagy and cardiac development in mice[J]. *Molecular & Cellular Biology*, 2015, 36(4): 585-595
117. Kemp V, Dautzenberg IJC, Limpens RW, et al. Oncolytic reovirus infection is facilitated by the autophagic machinery[J]. *Viruses*, 2017. 9(10), pii E226
118. Kennedy EM, Kornepati AVR, Mefferd AL, et al. Optimization of a multiplex CRISPR/Cas system for use as an antiviral therapeutic[J]. *Methods*, 2015, 91, 82-86
119. Kumar N, Maherchandani S, Kashyap SK, et al. Peste des petits ruminants virus infection of small ruminants: a comprehensive review[J]. *Virology*, 2014, 6, 2287-2327
120. Lee JK. Reversible inhibition of the fusion activity of measles virus F protein by an engineered intersubunit disulfide bridge[J]. *Journal of Virology*, 2007, 81(16): 8821-8826
121. Libeau G. A competitive ELISA using anti-N monoclonal antibodies for specific detection of rinderpest antibodies in cattle and small ruminants[J]. *Veterinary Microbiology*, 1992, 31(2-3): 147-160
122. Li X. Functional subdomains of STAT2 required for preassociation with the alpha interferon receptor and for signaling[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1997, 17(4), 2048-2056
123. Lindqvist LM, Frank D, McArthur K, et al. Autophagy induced during apoptosis degrades mitochondria and inhibits type I interferon secretion[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2017, doi: 10.1038/s41418-017-0017-z
124. Liu F, Wu X, Zhao Y, et al. Budding of peste des petits ruminants virus-like particles from insect cell membrane based on intracellular co-expression of peste des petits ruminants virus M, H and N proteins by recombinant baculoviruses[J]. *Journal of Virological Methods*, 2014, 207, 78-85
125. Loo YM. Immune signaling by RIG-I-like receptors[J]. *Immunity*, 2011, 34(5): 680-692

126. Luo Z, Xu W, Ma S, et al. Moderate autophagy inhibits vascular smooth muscle cell senescence to stabilize progressed atherosclerotic plaque via the mTORC1/ULK1/ATG13 signal pathway[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 30, 181-190
127. Mathur A, Hayward JA, Man SM. Molecular mechanisms of inflammasome signaling[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2018, 103(2), 233-257
128. Mauthe M, Langereis M, Jung J, et al. An siRNA screen for ATG protein depletion reveals the extent of the unconventional functions of the autophagy proteome in virus replication[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2016, 214, 619-635
129. Ma XX, Chang QY, Ma P, et al. Analyses of nucleotide, codon and amino acids usages between peste des petits ruminants virus and rinderpest virus[J]. *Gene*, 2017, 637, 115-123
130. Ma XX, Feng YP, Liu JL, et al. The effects of the codon usage and translation speed on protein folding of 3D(pol) of foot-and-mouth disease virus[J]. *Veterinary Research Communications*, 2013, 37, 243-250
131. Ma X, XingY, Nian X.F, et al. Identification of amino-acid residues in the V protein of peste des petits ruminants essential for interference and suppression of STAT-mediated interferon signaling[J]. *Virology*, 2015, 483, 54-63
132. Mefferd AL, Kornepati AV, Bogerd HP, et al. Expression of CRISPR/Cas single guide RNAs using small tRNA promoters[J]. *RNA*, 2015, 21, 1683-1689
133. Marin M. Folding at the rhythm of the rare codon bea t[J]. *Biotechnology*, 2008, 3, 1047-1057
134. Mitra-Kaushik S, Nayak R, Shaila MS. Identification of a cytotoxic T-cell epitope on the recombinant nucleocapsid proteins of rinderpest and peste des petits ruminants viruses presented as assembled nucleocapsids[J]. *Virology*, 2001, 279, 210-220
135. Moll M. Importance of the cytoplasmic tails of the measles virus glycoproteins for fusogenic activity and the generation of recombinant measles viruses[J]. *Journal of Virology*, 2002, 76(14), 7174-7186
136. Nakamura Y, Gojobori T, Ikemura T. Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000[J]. *Nucleic Acids Researchs*, 2000, 28, 292
137. Nagasato AI, Yamashita H, Matsuo M, et al. The distribution of vinculin to lipid rafts plays an important role in shnsing stiffuess of extracellular matrix[J]. *Biosciences Biotechnology and Biochemistry*, 2017, 81, 1136-1147
138. Niu Q, Zhao W, Wang J, et al. LicA induces autophagy through ULK1/Atg13 and ROS pathway in human hepatocellular carcinoma cells[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2018, 41(5), 2601-2608
139. Novick D. The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning[J]. *Cell*, 1994, 77(3),391-400
140. Oshiumi H. The ubiquitin ligase Riplet is essential for RIG-I-dependent innate immune responses to RNA virus infection[J]. *Cell host & Microbe*, 2010,8(6), 496-509

141. Parida S, Muniraju M, Mahapatra M, et al. Peste des petits ruminants[J]. *Veterinary Microbiology*, 2015, 181, 90-106
142. Parisien JP. A shared interface mediates paramyxovirus interference with antiviral RNA helicases MDA5 and LGP2[J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(14): 7252-7260
143. Peisley A. Cooperative assembly and dynamic disassembly of MDA5 filaments for viral dsRNA recognition[J]. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 2011, 108(52), 21010-21015
144. Pfeffermann, K, Dorr,M, Zirkel,F, et al. Morbillivirus pathogenesis and virus-host interactions[J]. *Advances in Virus Research*, 2018, 100, 75-98
145. Popelka H, Klionsky DJ. The molecular mechanism of Atg13 function in autophagy induction: What is hidden behind the data?[J]. *Autophagy*, 2017, 13(3): 449-451
146. Puigbo P, Bravo IG, Garcia-Vallve S. CAIcal: a combined set of tools to assess codon usage adaptation[J]. *Biology Direct*, 2008, 3, 38
147. Puigbo P, Bravo IG, Garcia-Vallve S. E-CAI: a novel server to estimate an expected value of Codon Adaptation Index (eCAI)[J]. *BMC Bioinformatics*, 2008, 9, 65
148. Rafels-Ybern A, Torres AG, Grau-Bove X, et al. Codon adaptation to tRNAs with inosine modification at position 34 is widespread among eukaryotes and present in two bacterial phyla[J]. *RNA Biology*, 2017, 1-8
149. Rodriguez JJ. Hendra virus V protein inhibits interferon signaling by preventing STAT1 and STAT2 nuclear accumulation[J]. *Journal of Virology*, 2003, 77(21), 11842-11845
150. Runge S. In vivo ligands of MDA5 and RIG-I in measles virus-infected cells[J]. *PLoS Pathogens*, 2014, 10(4): e1004081
151. Samie M, Lim J, Verschueren E, et al. Selective autophagy of the adaptor TRIF regulates innate inflammatory signaling[J]. *Nature Immunology*, 2018, 19(3): 246-254
152. Sharp PM and Li WH. Codon usage in regulatory genes in Escherichia coli does not reflect selection for 'rare' codons[J]. *Nucleic Acids Research*, 1986, 14, 7737-7749
153. Sharp PM and Li WH. The codon adaptation index—a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications[J]. *Nucleic Acids Research*, 1987, 15, 1281-1295
154. Strahle L., et al. Activation of the beta interferon promoter by unnatural sendai virus infection requires RIG-I and is inhibited by viral C proteins[J]. *Journal of Virology*, 2007, 81(22), 12227-12237.
155. Straube R. Analysis of network motifs in cellular regulation: Structural similarities, input-output relations and signal integration[J]. *Biosystems*, 2017, 162, 215-232
156. Sweetman DA. Rinderpest virus C and V proteins interact with the major (L) component of the viral polymerase. *Virology*, 2001, 281: 193-204
157. Subramani, S, Malhotra V. Non-autophagic roles of autophagy-related proteins[J]. *The EMBO Journal*, 2013, 14: 143-149

158. Tatsuo H., et al. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus[J]. *Nature*, 2000, 406(6798), 893-897
159. Ulane CM. Paramyxoviruses SV5 and HPIV2 assemble STAT protein ubiquitin ligase complexes from cellular components[J]. *Virology*, 2002, 304(2): 160-166
160. Vongpunsawad S. Selectively receptor-blind measles viruses: Identification of residues necessary for SLAM- or CD46-induced fusion and their localization on a new hemagglutinin structural model[J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(1): 302-313
161. Wang J. NF-kappa B RelA subunit is crucial for early IFN-beta expression and resistance to RNA virus replication[J]. *Journal of Immunology*, 2010, 185(3): 1720-1729
162. Wang YN, Ji WH, Li XR, et al. Unique features of nucleotide and codon usage patterns in mycoplasmas revealed by information entropy[J]. *Biosystems*, 2018, 165, 1-7
163. Wansley EK. Naturally occurring substitutions in the P/V gene convert the noncytopathic paramyxovirus simian virus 5 into a virus that induces alpha/beta interferon synthesis and cell death[J]. *Journal of Virology*, 2002, 76(20): 10109-10121
164. Wani S. A, Sahu A.R, Saxena S, et al. Expression kinetics of ISG15, IRF3, IFN γ , IL10, IL2 and IL4 genes vis-à-vis virus shedding, tissue tropism and antibody dynamics in PPRV vaccinated, challenged, infected sheep and goats[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2018, 117, 206-218
165. Wright F. The 'effective number of codons' used in a gene[J]. *Gene*, 1990, 87, 23-29
166. Wallot-Hieke N, Verma N, Schlötermann D, et al. Systematic analysis of ATG13 domain requirements for autophagy induction[J]. *Autophagy*, 2017, 1-58.
167. Wu B. Structural basis for dsRNA recognition, filament formation, and antiviral signal activation by MDA5[J]. *Cell*, 2013, 152(1-2): 276-289
168. Xu LG. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling[J]. *Molecular Cell*, 2005, 19(6), 727-740
169. Zhou Y, Huang N, Wu J, et al. Silencing of NRE1 induces autophagy via AMPK/ULK1/Atg13 signaling pathway in NSCLC cells[J]. *Tumour Biology*, 2017. 39(6)
170. Sehgal P, Kong X, Wu J, et al. Epidermal growth factor receptor and integrins control force-dependent vinculin recruitment to cadherin junctions[J]. *Journal of Cell Science*, 2018, 20, 131-136
171. Yin L, Jao LE, Chen W. Generation of targeted mutations in Zebrafish using the CRISPR/Cas system. *Methods in Molecular Biology*, 2015, 1332, 205-217
172. Young DF. Paramyxoviridae use distinct virus-specific mechanisms to circumvent the interferon response[J]. *Virology*, 2000, 269(2): 383-390
173. Yoneyama M. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses[J]. *Nature Immunology*, 2004, 5(7): 730-737

174. Zhao C. Interferon-induced ISG15 pathway: an ongoing virus-host battle Zhao C, et al. Interferon-induced ISG15 pathway: an ongoing virus-host battle[J]. Trends in microbiology 2013, 21(4):181-186. Trends in Microbiology ,2013,21(4):181-186
175. Zhang X. Identification and characterization of a regulatory domain on the carboxyl terminus of the measles virus nucleocapsid protein[J]. Journal of Virology, 2002,76(17):8737-8746
176. Zhou JH, Gao ZL, Zhang J, et al. The analysis of codon bias of foot-and-mouth disease virus and the adaptation of this virus to the hosts[J]. Infect Genet Evol, 2013, 14, 105-110
177. Zhou JH, You YN, Chen HT, et al. The effects of the synonymous codon usage and tRNA abundance on protein folding of the 3C protease of foot-and-mouth disease virus[J]. Infect Genet Evol, 2013, 16, 270-274
178. Zhong Z. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6[J]. Science, 1994,264(5155):95

致谢

本论文是在我的导师才学鹏研究员的亲切关怀和悉心指导下完成的。他严谨的科学态度,精益求精的工作作风,诲人不倦的高尚师德,严以律己、宽以待人的崇高风范,朴实无华、平易近人的人格魅力深深地感染和激励着我。他在学术上的涉猎广度和深度,以及在学术上的许多非常新鲜的想法和创新探索的宝贵经验也为我提供了学习的榜样。从课题的选择到项目的最终完成,老师都始终给予我细心的指导和不懈的支持,恩师身上有太多我要学习的品德,感谢您的教诲和帮助,成为您的学生,让我感到自豪。在此谨向恩师致以诚挚的谢意和崇高的敬意,也祝福恩师事业顺利,身体健康。

感谢马忠仁老师和冯玉萍老师在工作上给予我的无私的帮助,是你们的支持与厚爱让我顺利走到了今天,谢谢你们。

感谢荷兰鹿特丹大学伊拉斯姆斯医学中心潘秋卫教授、南开大学王金忠教授、北京大学陈建国教授在我博士论文课题设计上给予的帮助,是你们在我迷茫的时候为我指点迷津。

感谢苏君鸿博士、窦勇喜博士、骆学农研究员、王帅博士、马旭升博士、张少华博士、李辉老师、侯俊林博士、李兆才博士、曹小安博士、周建华老师、李潇萍老师、贾怀杰老师、马炳老师给予的帮助。

感谢我的同学毕研丽、杨洋、王金磊、王泽祥、赵帅阳、成温玉同学以及我的师弟邓瑞雪给我的帮助。

感谢我的学生常秋燕、马鹏、周小凯、李林杰、郭富城、王悦蒙、李凌浩、刘萍、杜江龙、冶炫清给予的帮助。

感谢我的同事曹欣教授、张德荣主任、柏家林教授、令世鑫主任、刘振斌博士、李明生老师、冯若飞博士、乔自林老师、刘俊林教授、李倬教授、张浩博士、赵永清博士、王家敏老师、张海霞老师、李向茸老师、丁功涛博士给予我工作及生活上的帮助。特别感谢我的家人在攻读博士学位期间给予的理解、支持和鼓励。

本论文在家畜疫病病原生物学国家重点实验室的资助下完成的。由 Agro-scientific Research in the Public Interest (No.201303059), the National High Technology Research and Development Program (863 program) of China (No. 2011AA10A211)基金支持完成,在此感谢。

作者简历

马晓霞，女，回族，甘肃兰州人，生于 1982 年 3 月 2 日。2006 年本科毕业于新疆大学生物技术专业。2006 年考取兰州大学生物化学与分子生物学硕士研究生，师从于北京生物制品研究所沈心亮研究员，并且在兰州兽医研究所刘在新研究员课题组从事口蹄疫结构蛋白表达与纯化方面的研究，2009 年 7 月获得理学硕士学位。2011 年 6 月入职于西北民族大学生命科学学院。2014 年考取中国农业科学院预防兽医学博士研究生，师从中国农业科学院兰州兽医研究所才学鹏研究员，从事小反刍兽疫病毒与宿主互作关系方面的研究。博士期间，以第一作者发表 SCI 论文 1 篇（接收，待发表），2 篇 SCI 论文已经投稿，等在外审意见。近期发表的 SCI 论文如下：

Ma X-x., Wang Y-n., Cao X-a., Li X-r., Liu Y-s., Zhou J-h., Cai X-p*, 2018. The effects of codon usage on the formation of secondary structures of nucleocapsid protein of peste des petits ruminants virus. *Genes & Genomics* (accepted).