

冠状病毒相关研究工具进展

郭淑明, 蓝佳明*

(中国科学院上海巴斯德研究所 分子病毒与免疫重点实验室, 上海 200031)



开放科学
(OSID)

摘要:冠状病毒宿主范围广,可跨越动物宿主屏障感染人类,甚至造成人际传播。2019年12月新型冠状病毒(2019 novel coronavirus, 2019-nCoV)在中国武汉引发肺炎疫情,引起全世界的关注。截至2020年2月10日,中国实验室确诊病例40 235例,死亡909例,病死率2.3%;重症6 484例,重症率16.1%;全球已有25个国家和地区有确诊病例。至此,2019-nCoV成为继出现在中国大陆的严重急性呼吸综合征冠状病毒(Severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV)、出现在中东沙特的中东呼吸综合征冠状病毒(Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)之后,第三种可引起人类致死的冠状病毒。对于2019-nCoV的来源、中间宿主、传播方式、致病机制、防控措施等一系列问题,亟待科学家去研究探索。了解新病原的研究工具,借鉴SARS-CoV和MERS-CoV的研究经验,在基因合成技术提升的背景下,仅需新病原基因组序列就可开发基础研究工具,进行减毒疫苗株、筛选药物和致病机制等的研究探讨。因此,本文就目前冠状病毒基础研究工具做一综述。

关键词:基础研究工具;2019新型冠状病毒;严重急性呼吸综合征冠状病毒;中东呼吸综合征冠状病毒

中图分类号:R373.9 R373.1 **文献标识码:**A

冠状病毒(Coronavirus, CoV)宿主范围广,可从动物跨越物种感染人类,甚至出现人际传播,由于传染性强、病死率高,每次出现新的冠状病毒感染人类时,极易造成人群恐慌、社会秩序混乱。在2002年严重急性呼吸综合征冠状病毒(Severe acute respiratory syndrome-CoV, SARS-CoV)爆发之前,已知的人类CoV仅会引起轻度上呼吸道感染,常为自限性疾病。然而,2002年11月SARS-CoV出现在中国大陆,随后扩散到世界29个国家和地区,截至2003年7月共有实验室确诊病例8 096例,死亡774例,病死率9.6%,其中中国大陆死亡349例,中国香港地区死亡299例,这是人类第一次意识到冠状病毒的威胁^[1]。SARS-CoV暴发流行不到一年后,销声匿迹,十年后当人们逐渐淡忘其威胁时,2012年中东呼吸综合征冠状病毒(Middle East respiratory syndrome-CoV, MERS-CoV)出现在沙特,然后扩散到27个国家^[2]。迄今为止,全球报告了MERS-CoV实验室确诊病例2 494例,死亡858

例,病死率34.4%。其中大多数(84.3%, 2 102例)病例来自沙特阿拉伯,病例集中于2012~2015年(60.8%, 1 279例),与爆发后消失无踪的SARS-CoV不同的是,MERS-CoV至2019年仍有199病例(2019年11月,世界卫生组织)。

2019年12月8日中国湖北省武汉市暴发了不明原因病毒性肺炎,该疾病与SARS有很多相似之处。例如症状为发热、乏力、呼吸困难和双肺浸润性阴影^[3,4],且重症病例比率较高(武汉市卫生健康委员会2019年12月31日通报27例,其中重症7例);起源于武汉市华南海鲜批发市场,该市场还贩卖野味,可能是由动物传染给人;在年底爆发疫情等。由于这些皆与SARS相似,武汉不明原因肺炎在爆发伊始即被怀疑是冠状病毒感染所致,随即引世界关注。《Science》在疫情公布第二天即进行了报道^[5]。香港地区在2020年1月4日将该疫情应变等级自“戒备”提升至“严重”,且于2020年1月8日颁布修订“2020年预防及控制疾病(修订)条例”率先将“严重新型传染性病原体呼吸系统病”纳入法定呈报传染病,赋予香港公共卫生部门法定权力,以应对武汉不明原因肺炎疑似感染个案的检疫和隔离。

2020年1月9日,科学家在电子显微镜下,观察到引起此次不明原因肺炎的病原体呈现有包膜的、具有类似日冕外形的典型冠状病毒形态。结合基因组测序结果,证实为人类新型冠状病毒(2019 novel coronavirus, 2019-nCoV)^[6,7]。此次2019-nCoV感染,自2019年12月8日至2020年2月10日,中国大

收稿日期:2020-01-20

基金项目:中国科学院台湾青年人才计划(2017TW2SA0003);国家自然科学基金(31801141);中国博士后科学基金会(2019T120359,2017M621537)

作者简介:郭淑明(1979-),女(汉族),访问学者,主要从事流感和新发再发病毒学研究,E-mail: shumingkuo@ips.ac.cn

*通讯作者:蓝佳明(1979-),女(满族),副研究员,主要从事新发再发传染病相关研究,E-mail: jmlan@ips.ac.cn

陆实验室确诊病例 40 235 例,死亡 909 例,病死率 2.3%;重症 6 484 例,重症率 16.1%;全球已有 25 个国家和地区有确诊病例(世界卫生组织 2020 年 2 月 10 日通报),构成国际关注的突发公共卫生事件。经全基因组序列比较,2019-nCoV Wuhan-Hu-1 病毒株(GenBank MN908947)与 2003 年 5 月分离自中国病人的 SARS-CoV BJ01 病毒株(GenBank AY278488)的一致性为 82%;与中国科学家从蝙蝠体内分离到的 SARS-like CoV ZC45 病毒株(2017 年 2 月,GenBank MG772933)全基因组的一致性约 89%^[7,8]。仅比较棘突蛋白(Spike, S)基因序列,2019-nCoV 与 SARS-CoV BJ01 病毒株的一致性约 78%,与 MERS-CoV GD01 病毒株(GenBank KT006149)的一致性较低,却与蝙蝠 SARS-like CoV ZC45 病毒株一致性约 84%。由于人类 2019-nCoV 与蝙蝠 SARS-like CoV 病毒亲缘较近,但与人类 SARS-CoV 稍远,推测由蝙蝠感染到武汉市华南海鲜批发市场可能接触的动物,即经中间宿主适应演化,再感染人类。如果如此,这与同样是蝙蝠来源,分别经果子狸和单峰驼中间宿主,感染至人的 SARS-CoV 和 MERS-CoV 十分相似(图 1)。

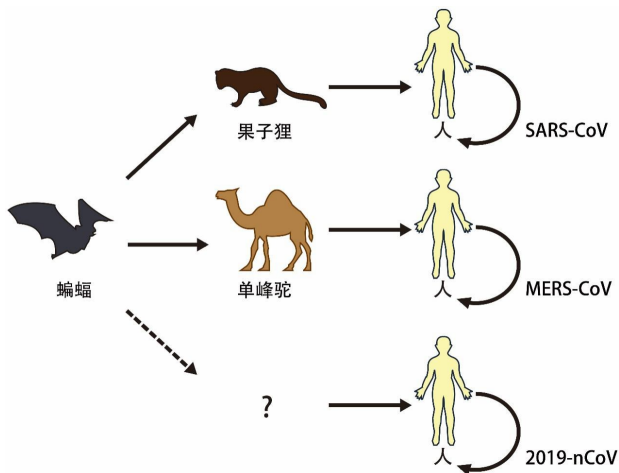


图 1 致人类死亡 3 种冠状病毒的感染途径

Figure 1 Infection routes of three CoVs caused human deaths

应对此次 2019-nCoV 感染,基础研究是治疗策略的理论依据。在基因合成技术提升的背景下,利用基因组序列开发基础研究工具,即可进行减毒疫苗株筛选、动物模型开发、致病机制探讨等相关研究。本文就目前冠状病毒基础研究工具如感染性克隆、假病毒、动物模型开发等做一综述。

1 感染性克隆 (Infectious clone) 的反向遗传学技术

感染性克隆是极具价值的研究工具,可用于修饰病毒基因组,以更好地了解其基本生物学原理,开发减毒活疫苗^[9,10]或新型疫苗候选物^[11,12],并测试抗病毒药物,冠状病毒的感染性克隆目前常用的方法如下^[13,14]。

1.1 体外连接 (*in vitro* ligation)

体外连接使用限制性核酸内切酶切割 CoV 基因组的识别位点,每个片段都分别保留在小质粒中,以便使用传统的分子克隆方法进行有效的遗传修饰,在 ORF1a 中分离特定核苷酸序列有助于解决某些序列对细菌有毒的问题。将 T7 启动子插入基因组的 5' 端,体外转录病毒 RNA,并随后转染到哺乳动物细胞中以产生病毒,已成功拯救数个 CoV 重组病毒(rCoV),例如 rMERS-CoV 重组病毒和表达红色荧光的 rMERS-CoV-RFP 病毒株等^[15];体外连接亦成功拯救 SARS 等 rCoV^[16]。然而,体外连接比较适用于分节基因组或基因组较小的病毒,不分节 CoV 基因组约 30 kb,稍大不易操作,因而发展以下其他方法。

1.2 基于细菌人工染色体 (Bacterial artificial chromosome, BAC) 的反向遗传学系统

BAC 和体外连接相比,由于 BAC 能够将其拷贝数限制为每个细胞 1 或 2 个质粒,因此可以在细菌中稳定扩增全长 CoV cDNA。可以将这些 BAC 的不同限制性片段亚克隆到较小的载体中,以进行有效修饰。被拯救的病毒保留了在整个序列中引入的所有遗传标记,并显示了标准的 mRNA 模式和合成病毒的抗原特性^[17]。全长 CoV 基因组克隆组装至 BAC 质粒中,包含 5' 端 CMV 启动子,以利质粒转染哺乳动物细胞后,能转录病毒基因组;3' 端由包含 25 bp 长的 polyA 尾巴、D 型肝炎病毒(HDV)核酶、牛生长激素(BGH)终止和聚腺苷酸化信号。基于 BAC 的反向遗传学系统成功拯救 rSARS-CoVs 重组病毒^[18];亦成功拯救 rMERS-CoVs 重组病毒,其病毒生长动力学表现与野生型病毒相似^[11,13]。若 CoV BAC 结合 λ 红色重组,能快速有效地可将几乎任何类型的基因修饰(点突变、插入和缺失)引入 CoV 基因组并拯救重组病毒^[14,19]。

1.3 基于重组痘苗病毒的反向遗传学系统

基于痘苗病毒的 CoV 反向遗传学系统,是使用痘苗病毒作为克隆载体的全长 CoV cDNA 的生成、克隆和修饰,体外转录 CoV 感染性 RNA 转录本,再转

染到细胞中拯救感染性 CoV 病毒。最初,基于重组痘苗病毒建立的人冠状病毒 229E 的反向遗传系统,再应用于其他 CoV,成功拯救了重组感染性 SARS-CoV^[20,21],近年来该系统逐渐被 BAC 系统取代。

2 假病毒

假病毒即嵌合型病毒颗粒,在一种复制缺陷型病毒载体的表面上表达目的病毒的重组糖蛋白,从而产生单个的嵌合型病毒颗粒^[22]。基于假病毒平台,可开展病毒的细胞嗜性分析和中和抗体检测,亦可用于病毒进入抑制剂筛选研究,为高致病性病毒发病机理和防治措施研究的强大工具。最常见的复制缺陷型病毒载体有慢病毒载体和水泡性口炎病毒载体。其中前者应用更为广泛,此复制缺陷型载体的优势在于能高容量(最大 9 kb)表达其他病毒基因;可感染分裂期和非分裂期细胞,且不诱导或仅轻轻地诱导免疫反应^[23]。尤其适用于野生型病毒需要在三级或四级生物安全实验室操作的高致病性病毒,其假病毒能降低生物安全等级至二级生物安全实验室操作^[24]。例如已成功利用慢病毒载体表达 MERS-CoV 或 SARS-CoV 全长 S 糖蛋白,产生 MERS-CoV 假病毒(MERS-Spp)或 SARS-CoV 假病毒(SARS-Spp)以评估人和动物血清中的中和抗体^[24-31]。

3 有表型的 CoV 动物感染模型

鉴于 CoV 具有快速适应新宿主的能力,为探讨 CoV 究竟如何跨越物种限制,通过中间动物从蝙蝠感染人类,建立多种动物 CoV 感染模型十分必要。动物感染模型的开发,有助于研发抗病毒策略、评价疫苗免疫保护效果以及研究病毒致病机制等。然而,CoV 自然感染多种动物都没有明显表型,科学家尝试多种办法,成功开发出一些有表型的动物感染模型用于 CoV 的研究。

3.1 小鼠

SARS-CoV 在年长人群中导致较高的病死率,这在小鼠感染模型中得到同样验证。研究发现,SARS-CoV 感染 4~6 周龄小鼠不出现任何症状和体征,但感染 12~14 月龄小鼠后,出现弓背、卷毛、体重下降等感染症状,肺部表现为多灶性、间质性炎性阴影,病理表现为淋巴细胞浸润,周围蛋白沉积,肺泡内水肿等^[32]。这些和 SARS-CoV 在人体内的感染表征十分相似,是 SARS-CoV 感染研究的有效动物模型。I 型干扰素在控制 SARS-CoV 感染中起重要作用,STAT1^{-/-}小鼠感染 SARS-CoV 后可由

体重下降、支气管肺炎进展到间质性肺炎和纵隔炎等^[33]。但和前者相比,显然这不是 SARS-CoV 感染的理想动物模型。一种表达人 ACE2 的转基因小鼠 AC70 被开发为 SARS-CoV 感染的动物模型,该小鼠经鼻腔感染病毒 1d 后,肺脏和脑组织中均检测到高滴度病毒,病毒感染后 8d 小鼠全部死亡。但病理检查表明,尽管存在病毒性肺炎,转基因小鼠的中枢神经系统广泛炎症可能与小鼠的死亡有关。另一种人 ACE2 转基因小鼠 AC63,感染 SARS-CoV 后病毒复制主要局限于肺,而不是大脑,小鼠虽然体重下降,但最后全部小鼠感染康复,没有任何死亡^[34]。2019-nCoV 同样通过人 ACE2 受体进入细胞^[7],SARS-CoV ACE2 转基因小鼠的开发,也为 2019-nCoV 动物模型的开发提供参考和借鉴。

MERS-CoV 无法在小鼠、仓鼠和雪貂的呼吸道中复制,阻碍了小动物模型的开发。鼠类自然感染模型失败的原因是因其小鼠二肽基肽酶 4(mouse dipeptidyl peptidase 4, mDPP4)蛋白不是 MERS-CoV 的功能性受体,因此小鼠可天然抵抗 MERS-CoV 感染。用人类 DPP4 基因(hDPP4)的外显子取代 mDPP4 基因座上的外显子,从而生成了 hDPP4 敲入(hDPP4 KI)小鼠模型;突变 mDPP4 上两个氨基酸 A288L 和 T330R,获得转基因小鼠(288/330^{+/+});或者通过修饰 mDPP4 上的 A288L 和 T330R 两个氨基酸获得鼠肺适应株等策略,皆可使小鼠对 MERS-CoV 敏感。MERS-CoV 感染这类 DPP4 转基因小鼠后,肺中可检测到高滴度病毒,并导致弥漫性肺损伤和致死性呼吸道感染^[29,35-38]。此外,亦可通过腺病毒载体转导 hDPP4(Ad5-hDPP4)^[39,40],使其在小鼠体内表达后,获得小鼠对 MERS-CoV 的易感性。但如上模型均不是 MERS-CoV 自然感染小鼠的结果,均存在一定的应用缺陷,hDPP4 基因的插入常可导致一些非特异性感染结果,如小鼠表现出的脑组织感染;腺病毒载体转导 hDPP4 的小鼠模型常受转导剂量、转染途径的影响,且预存抗体的存在,导致了该模型不能用于腺病毒载体疫苗免疫保护效果的评价。

3.2 非人灵长类动物 (Non-human primate, NHP)

恒河猴、非洲绿猴、狨猴等多种 NHP 用于 SARS-CoV 感染模型的研究,结果表明多种 NHP 都可以感染 SARS-CoV,表现为间质性肺炎,但在不同种类 NHP 体内 SARS-CoV 感染症状不同,如在非洲绿猴体内主要表现为高水平的上呼吸道感染,

在狨猴体内主要表现为肝脏病理损伤,但测试的所有种类的NHP均不进展至严重重症感染,不会导致感染动物死亡^[41-43]。

恒河猴可自然感染 MERS-CoV,联合使用滴鼻、气管内接种、口服和眼结膜共感染方式给恒河猴接种 MERS-CoV,可使其出现鼻腔分泌物增多、呼吸频率加快等轻度感染症状,鼻咽拭子、气管等多处可检测到病毒核酸,血清亦可检测到中和抗体,但动物不会出现致死性感染^[44-46]。狨猴自然感染 MERS-CoV 模型的开发,弥补了该缺陷。用同样联合感染的方式接种 MERS-CoV 后,狨猴表现为呼吸频率加快、体温下降、食欲下降、活动能力减弱等感染症状且肺部检查显示中重度间质性肺炎改变,部分感染动物血清可检测到病毒,感染后 4-6 天,动物表现致死性感染。该模型模拟了 MERS-CoV 导致的中重度肺炎,但致死性感染的特异性需要进一步论证,且狨猴来源及高昂的价格限制了其进一步应用^[47]。

3.3 中间宿主模型

3.3.1 果子狸

研究人员尝试使用捕获的果子狸作为 SARS-CoV 感染的动物模型,果子狸可感染 SARS-CoV,感染后出现表情淡漠、攻击性下降,肺泡间隔扩大、巨噬细胞和淋巴细胞浸润等,这些同流行病学调查结果一致。但感染动物不出现重症感染,不会导致死亡^[48,49]。

3.3.2 单峰驼

单峰驼可能为 MERS-CoV 的中间宿主,因此其亦被开发为 MERS-CoV 自然感染的动物模型。结果表明,MERS-CoV 可在感染单峰驼的上呼吸道复制增殖,并由上呼吸道排出体外。应用单峰驼模型检测已进行了 MVA-MERS-CoV 疫苗的免疫保护效果检测。除此之外,作为 MERS-CoV 的另一储存宿主,羊驼亦被开发为 MERS-CoV 感染的动物模型,结果表明感染动物的鼻拭子中检测到 MERS-CoV,感染 2 周后动物血清抗体阳转表明 MERS-CoV 可在羊驼体内复制,并在动物中传播^[50-53](图 2)。

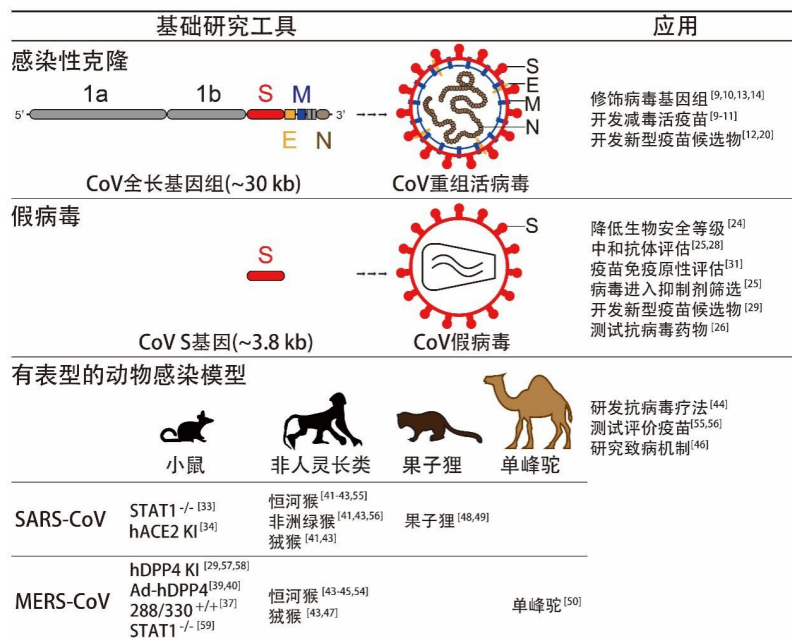


图 2 CoV 的基础研究工具及其应用

Figure 2 The basic research tools and applications of CoVs

此次 2019-nCoV 疫情再次验证了冠状病毒跨越物种限制,造成人类致死性感染的可能。以上述的研究工具为基础,优化或开发 2019-nCoV 的新型研究工具,有助于了解该新发病毒的致病机制,寻找控制疫情的有效手段。例如,可以通过基因合成技

术,将 2019-nCoV 全基因组分成数个片段合成后,再拼接连接全基因组至适当载体,在相应的生物安全等级的实验室操作,建立感染性克隆反向拯救病毒,进行病毒致病能力、传播能力、感染能力以及致病机理的研究,也可用拯救后的带有筛选标记的病

毒进行抗病毒药物的高通量筛选;人工包装获得的2019-nCoV假病毒亦可以进行病人血清抗体监测、疫苗免疫动物后中和抗体检测、病毒进入细胞机制研究等;动物模型在疫苗评价中的作用更是不可替代,建立2019-nCoV感染动物模型,以评价已有药物或开发新型药物用于治疗本次新型冠状病毒感染。相信借助这些工具能帮助我们了解2019-nCoV究竟通过何种中间宿主感染人类、该病毒通过何种途径感染人类、病毒是否容易在人体内迅速变异、变异后对病毒的致病能力及传播能力有何种影响、病毒跨越宿主限制感染人类的机制、如何快速研发出针对该病毒的药物和疫苗等一系列我们目前迫切需要解决的问题。

参考文献:

- [1] Skowronski D M, Astell C, Brunham R C, Low D E, Petric M, Roper R L, Talbot P J, Tam T, Babiuk L. Severe acute respiratory syndrome (SARS): a year in review [J]. *Annu Rev Med*, 2005, 56: 357-381.
- [2] Fehr A R, Channappanavar R, Perlman S. Middle East respiratory syndrome: emergence of a pathogenic human coronavirus [J]. *Annu Rev Med*, 2017, 68: 387-399.
- [3] Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, Zhang L, Fan G, Xu J, Gu X, Cheng Z, Yu T, Xia J, Wei Y, Wu W, Xie X, Yin W, Li H, Liu M, Xiao Y, Gao H, Guo L, Xie J, Wang G, Jiang R, Gao Z, Jin Q, Wang J, Cao B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China [J/OL]. *Lancet*, 2020. pii: S0140-6736(20)30183-5.
- [4] Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, Qiu Y, Wang J, Liu Y, Wei Y, Xia J, Yu T, Zhang X, Zhang L. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study [J/OL]. *Lancet*, 2020. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7).
- [5] <https://www.sciencemag.org/news/2020/01/novel-human-virus-pneumonia-cases-linked-seafood-market-china-stir-concern>.
- [6] Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, Zhao X, Huang B, Shi W, Lu R, Niu P, Zhan F, Ma X, Wang D, Xu W, Wu G, Gao G F, Tan W. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019 [J/OL]. *N Engl J Med*, 2020. DOI: 10.1056/NEJMoa2001017.
- [7] Zhou P, Yang X L, Wang X G, Hu B, Zhang L, Zhang W, Si H R, Zhu Y, Li B, Huang C L, Chen H D, Chen J, Luo Y, Guo H, Jiang R D, Liu M Q, Chen Y, Shen X R, Wang X, Zheng X S, Zhao K, Chen Q J, Deng F, Liu L L, Yan B, Zhan F X, Wang Y Y, Xiao G F, Shi Z L. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin [J/OL]. *Nature*, 2020. DOI: 10.1038/s41586-020-2012-7.
- [8] Hu D, Zhu C, Ai L, He T, Wang Y, Ye F, Yang L, Ding C, Zhu X, Lv R, Zhu J, Hassan B, Feng Y, Tan W, Wang C. Genomic characterization and infectivity of a novel SARS-like coronavirus in Chinese bats [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2018, 7(1): 154.
- [9] Menachery V D, Gralinski L E, Mitchell H D, Dinnon K H, 3rd, Leist S R, Yount B L, Jr., Graham R L, McAnarney E T, Stratton K G, Cockrell A S, Debbink K, Sims A C, Waters K M, Baric R S. Middle East respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein 16 is necessary for interferon resistance and viral pathogenesis [J/OL]. *mSphere*, 2017, 2(6): e00346-17.
- [10] Menachery V D, Gralinski L E, Mitchell H D, Dinnon K H, 3rd, Leist S R, Yount B L, Jr., McAnarney E T, Graham R L, Waters K M, Baric R S. Combination attenuation offers strategy for live attenuated coronavirus vaccines [J/OL]. *J Virol*, 2018, 92(17): e00710-18.
- [11] Almazan F, Dediego M L, Sola I, Zuniga S, Nieto-Torres J L, Marquez-Jurado S, Andres G, Enjuanes L. Engineering a replication-competent, propagation-defective Middle East respiratory syndrome coronavirus as a vaccine candidate [J/OL]. *mBio*, 2013, 4(5): e00650-13.
- [12] Graham R L, Deming D J, Deming M E, Yount B L, Baric R S. Evaluation of a recombination-resistant coronavirus as a broadly applicable, rapidly implementable vaccine platform [J]. *Commun Biol*, 2018, 1: 179.
- [13] Almazan F, Marquez-Jurado S, Nogales A, Enjuanes L. Engineering infectious cDNAs of coronavirus as bacterial artificial chromosomes [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1282: 135-152.
- [14] Fehr A R. Bacterial artificial chromosome-based lambda red recombination with the I-SceI homing endonuclease for genetic alteration of MERS-CoV [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2099: 53-68.
- [15] Scobey T, Yount B L, Sims A C, Donaldson E F, Agnihothram S S, Menachery V D, Graham R L, Swanstrom J, Bove P F, Kim J D, Grego S, Randell S H, Baric R S. Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of the Middle East respiratory

- syndrome coronavirus [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(40): 16157-16162.
- [16] Cockrell A S, Beall A, Yount B, Baric R. Efficient reverse genetic systems for rapid genetic manipulation of Emergent and Preemergent Infectious Coronaviruses [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1602: 59-81.
- [17] Almazan F, Gonzalez J M, Penzes Z, Izeta A, Calvo E, Plana-Duran J, Enjuanes L. Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(10): 5516-5521.
- [18] Almazan F, Dediego M L, Galan C, Escors D, Alvarez E, Ortego J, Sola I, Zuniga S, Alonso S, Moreno J L, Nogales A, Capiscol C, Enjuanes L. Construction of a severe acute respiratory syndrome coronavirus infectious cDNA clone and a replicon to study coronavirus RNA synthesis [J]. *J Virol*, 2006, 80(21): 10900-10906.
- [19] Muth D, Meyer B, Niemeyer D, Schroeder S, Osterrieder N, Muller M A, Drosten C. Transgene expression in the genome of Middle East respiratory syndrome coronavirus based on a novel reverse genetics system utilizing Red-mediated recombination cloning [J]. *J Gen Virol*, 2017, 98(10): 2461-2469.
- [20] Eriksson K K, Makia D, Thiel V. Generation of recombinant coronaviruses using vaccinia virus as the cloning vector and stable cell lines containing coronaviral replicon RNAs [J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 454: 237-254.
- [21] Van Den Worm S H, Eriksson K K, Zevenhoven J C, Weber F, Züst R, Kuri T, Dijkman R, Chang G, Siddell S G, Snijder E J, Thiel V, Davidson A D. Reverse genetics of SARS-related coronavirus using vaccinia virus-based recombination [J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e32857.
- [22] Cronin J, Zhang X Y, Reiser J. Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping [J]. *Curr Gene Ther*, 2005, 5(4): 387-398.
- [23] Zufferey R, Dull T, Mandel R J, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, Trono D. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery [J]. *J Virol*, 1998, 72(12): 9873-9880.
- [24] Millet J K, Tang T, Nathan L, Jaimes J A, Hsu H L, Daniel S, Whittaker G R. Production of pseudotyped particles to study highly pathogenic coronaviruses in a biosafety level 2 setting [J/OL]. *J Vis Exp*, 2019 (145): e59010.
- [25] Zhao G, Du L, Ma C, Li Y, Li L, Poon V K, Wang L, Yu F, Zheng B J, Jiang S. A safe and convenient pseudovirus-based inhibition assay to detect neutralizing antibodies and screen for viral entry inhibitors against the novel human coronavirus MERS-CoV [J]. *Virology*, 2013, 10: 266.
- [26] Grehan K, Ferrara F, Temperton N. An optimised method for the production of MERS-CoV spike expressing viral pseudotypes [J]. *MethodsX*, 2015, 2: 379-384.
- [27] Nie Y, Wang P, Shi X, Wang G, Chen J, Zheng A, Wang W, Wang Z, Qu X, Luo M, Tan L, Song X, Yin X, Ding M, Deng H. Highly infectious SARS-CoV pseudotyped virus reveals the cell tropism and its correlation with receptor expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 321(4): 994-1000.
- [28] 闫克夏, 谭文杰, 张相民, 王慧娟, 李岩, 阮力. SARS-CoV 假病毒中和试验技术的建立及评价 [J]. *病毒学报*, 2007, 23(6): 440-446.
- [29] Fan C, Wu X, Liu Q, Li Q, Liu S, Lu J, Yang Y, Cao Y, Huang W, Liang C, Ying T, Jiang S, Wang Y. A human DPP4-Knockin mouse's susceptibility to infection by authentic and pseudotyped MERS-CoV [J/OL]. *Viruses*, 2018, 10(9): E448.
- [30] Wang H, Yang P, Liu K, Guo F, Zhang Y, Zhang G, Jiang S. SARS coronavirus entry into host cells through a novel clathrin- and caveolae-independent endocytic pathway [J]. *Cell Res*, 2008, 18(2): 290-301.
- [31] He Y, Zhu Q, Liu S, Zhou Y, Yang B, Li J, Jiang S. Identification of a critical neutralization determinant of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus: importance for designing SARS vaccines [J]. *Virology*, 2005, 334(1): 74-82.
- [32] Roberts A, Paddock C, Vogel L, Butler E, Zaki S, Subbarao K. Aged BALB/c mice as a model for increased severity of severe acute respiratory syndrome in elderly humans [J]. *J Virol*, 2005, 79(9): 5833-5838.
- [33] Hogan R J, Gao G, Rowe T, Bell P, Flieder D, Paragas J, Kobinger G P, Wivel N A, Crystal R G, Boyer J, Feldmann H, Voss T G, Wilson J M. Resolution of primary severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection requires Stat1 [J]. *J Virol*, 2004, 78(20): 11416-11421.
- [34] Tseng C T, Huang C, Newman P, Wang N, Narayanan K, Watts D M, Makino S, Packard M M, Zaki S R, Chan T S, Peters C J. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of mice transgenic for the human Angiotensin-converting enzyme 2 virus receptor [J]. *J Virol*, 2007, 81(3): 1162-1173.

- [35] Li K, Mccray P B, Jr. Development of a mouse-adapted MERS coronavirus [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2099: 161-171.
- [36] Leist S R, Cockrell A S. Genetically engineering a susceptible mouse model for MERS-CoV-induced acute respiratory distress syndrome [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2099: 137-159.
- [37] Cockrell A S, Yount B L, Scobey T, Jensen K, Douglas M, Beall A, Tang X C, Marasco W A, Heise M T, Baric R S. A mouse model for MERS coronavirus-induced acute respiratory distress syndrome [J]. *Nat Microbiol*, 2016, 2: 16226.
- [38] Iwata-Yoshikawa N, Okamura T, Shimizu Y, Hasegawa H, Takeda M, Nagata N. TMPRSS2 Contributes to Virus Spread and Immunopathology in the Airways of Murine Models after Coronavirus Infection [J/OL]. *J Virol*, 2019, 93(6): e01815-18.
- [39] Zhao J, Li K, Wohlford-Lenane C, Agnihothram S S, Fett C, Gale M J, Jr., Baric R S, Enjuanes L, Gallagher T, McCray P B, Jr., Perlman S. Rapid generation of a mouse model for Middle East respiratory syndrome [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(13): 4970-4975.
- [40] 姚艳丰, 蓝佳明, 李枫棣, 牛培华, 于品, 卢帅, 鲍琳琳, 谭文杰, 秦川. 不同剂量 DPP4 转导后 MERS-CoV 感染小鼠模型的临床及生物学特征比较 [J]. *病毒学报*, 2015, 31(6): 593-600.
- [41] McAuliffe J, Vogel L, Roberts A, Fahle G, Fischer S, Shieh W J, Butler E, Zaki S, St Claire M, Murphy B, Subbarao K. Replication of SARS coronavirus administered into the respiratory tract of African Green, rhesus and cynomolgus monkeys [J]. *Virology*, 2004, 330(1): 8-15.
- [42] 高虹, 张丽兰, 魏强, 段招军, 涂新明, 喻志爱, 邓巍, 张利萍, 鲍琳琳, 张滨, 佟巍, 侯云德, 张兵林, 黄澜, 秦川. 重组人干扰素 α -2b 鼻腔喷雾剂预防治疗恒河猴感染 SARS-CoV 的试验研究 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2005, 19(3): 207-210.
- [43] Gong S R, Bao L L. The battle against SARS and MERS coronaviruses: reservoirs and animal models [J]. *Animal Model Exp Med*, 2018, 1(2): 125-133.
- [44] Falzarano D, De Wit E, Rasmussen A L, Feldmann F, Okumura A, Scott D P, Brining D, Bushmaker T, Martellaro C, Baseler L, Benecke A G, Katze M G, Munster V J, Feldmann H. Treatment with interferon- α 2b and ribavirin improves outcome in MERS-CoV-infected rhesus macaques [J]. *Nat Med*, 2013, 19(10): 1313-1317.
- [45] Yao Y, Bao L, Deng W, Xu L, Li F, Lv Q, Yu P, Chen T, Xu Y, Zhu H, Yuan J, Gu S, Wei Q, Chen H, Yuen K Y, Qin C. An animal model of MERS produced by infection of rhesus macaques with MERS coronavirus [J]. *J Infect Dis*, 2014, 209(2): 236-242.
- [46] Prescott J, Falzarano D, De Wit E, Hardcastle K, Feldmann F, Haddock E, Scott D, Feldmann H, Munster V J. Pathogenicity and viral shedding of MERS-CoV in immunocompromised Rhesus Macaques [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 205.
- [47] Falzarano D, De Wit E, Feldmann F, Rasmussen A L, Okumura A, Peng X, Thomas M J, van Doremalen N, Haddock E, Nagy L, LaCasse R, Liu T, Zhu J, McLellan J S, Scott D P, Katze M G, Feldmann H, Munster V J. Infection with MERS-CoV causes lethal pneumonia in the common marmoset [J/OL]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(8): e1004250.
- [48] Wu D, Tu C, Xin C, Xuan H, Meng Q, Liu Y, Yu Y, Guan Y, Jiang Y, Yin X, Cramer G, Wang M, Li C, Liu S, Liao M, Feng L, Xiang H, Sun J, Chen J, Sun Y, Gu S, Liu N, Fu D, Eaton B T, Wang L F, Kong X. Civets are equally susceptible to experimental infection by two different severe acute respiratory syndrome coronavirus isolates [J]. *J Virol*, 2005, 79(4): 2620-2625.
- [49] Xiao Y, Meng Q, Yin X, Guan Y, Liu Y, Li C, Wang M, Liu G, Tong T, Wang L F, Kong X, Wu D. Pathological changes in masked palm civets experimentally infected by severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus [J]. *J Comp Pathol*, 2008, 138(4): 171-179.
- [50] Adney D R, Van Doremalen N, Brown V R, Bushmaker T, Scott D, de Wit E, Bowen R A, Munster V J. Replication and shedding of MERS-CoV in upper respiratory tract of inoculated dromedary camels [J]. *Emerg Infect Dis*, 2014, 20(12): 1999-2005.
- [51] Haagmans B L, Van Den Brand J M, Raj V S, Volz A, Wohlsein P, Smits S L, Schipper D, Bestebroer T M, Okba N, Fux R, Bensaid A, Solanes Foz D, Kuiken T, Baumgartner W, Segales J, Sutter G, Osterhaus A D. An orthopoxvirus-based vaccine reduces virus excretion after MERS-CoV infection in dromedary camels [J]. *Science*, 2016, 351(6268): 77-81.
- [52] Adney D R, Bielefeldt-Ohmann H, Hartwig A E, Bowen R A. Infection, replication, and transmission of Middle East respiratory syndrome coronavirus in Alpacas [J]. *Emerg Infect Dis*, 2016, 22(6): 1031-1037.

- [53] Adney D R, Letko M, Ragan I K, Scott D, van Doremalen N, Bowen R A, Munster V J. Bactrian camels shed large quantities of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) after experimental infection [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2019, 8 (1) : 717-723.
- [54] Liu R, Wang J, Shao Y, Wang X, Zhang H, Shuai L, Ge J, Wen Z, Bu Z. A recombinant VSV-vectored MERS-CoV vaccine induces neutralizing antibody and T cell responses in rhesus monkeys after single dose immunization [J]. *Antiviral Res*, 2018, 150: 30-38.
- [55] Gao W, Tamin A, Soloff A, D'Aiuto L, Nwanegbo E, Robbins P D, Bellini W J, Barratt-Boyes S, Gambotto A. Effects of a SARS-associated coronavirus vaccine in monkeys[J]. *Lancet*, 2003, 362(9399): 1895-1896.
- [56] Bukreyev A, Lamirande E W, Buchholz U J, Vogel L N, Elkins W R, St Claire M, Murphy B R, Subbarao K, Collins P L. Mucosal immunisation of African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*) with an attenuated parainfluenza virus expressing the SARS coronavirus spike protein for the prevention of SARS [J]. *Lancet*, 2004, 363(9427): 2122-2127.
- [57] Agrawal A S, Garron T, Tao X, Peng B H, Wakamiya M, Chan T S, Couch R B, Tseng C T. Generation of a transgenic mouse model of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection and disease [J]. *J Virol*, 2015, 89(7): 3659-3670.
- [58] Li K, Wohlford-Lenane C, Perlman S, Zhao J, Jewell A K, Reznikov L R, Gibson-Corley K N, Meyerholz D K, McCray P B, Jr. Middle East respiratory syndrome coronavirus causes multiple organ damage and lethal disease in mice transgenic for human dipeptidyl peptidase 4 [J]. *J Infect Dis*, 2016, 213(5): 712-722.
- [59] Coleman C M, Matthews K L, Goicochea L, et al. Wild-type and innate immune-deficient mice are not susceptible to the Middle East respiratory syndrome coronavirus [J]. *J Gen Virol*, 2014, 95(Pt 2): 408-412.

Progress on Research Tools of Coronaviruses

KUO Shu-Ming, LAN Jiaming*

(CAS Key Laboratory of Molecular Virology and Immunology, Institut Pasteur of Shanghai, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract: Coronavirus (CoV) has a wide range of hosts which infect humans across host barriers and even cause human-to-human transmission. In December 2019, a novel coronavirus (2019 novel coronavirus, 2019-nCoV) emerged the pneumonia outbreak in Wuhan, China, causing worldwide concern. As of 10 February 2020, there were 40,235 lab-confirmed cases in China, 909 deaths with a 2.3% mortality rate; 6,484 severe cases with a 16.1% rate. Meanwhile, lab-confirmed cases were reported in 25 countries/regions worldwide. Up to date, the 2019-nCoV has become the third CoV that can cause fatal disease in humans after the severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) in Mainland China and the Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) in Saudi Arabia, the Middle East. Our scientists are expected to study and explore a series of questions for the 2019-nCoV outbreak including animal source of virus, intermediate hosts, transmission routes, pathogenesis, prevention and control etc. To understand the research tools of the new pathogen and learn from research experience of SARS- and MERS-CoV for developing attenuated vaccine strains, screening drugs and studying pathogenic mechanisms under the background of the improvement of gene synthesis technology. Therefore, this article reviews the current research tools of coronaviruses.

Key words: Basic research tools; 2019-nCoV; SARS-CoV; MERS-CoV

Funding: The present study was supported by Chinese Academy of Sciences Taiwan Young Talent Programme (2017TW2SA0003), National Natural Science Foundation of China (31801141), China Postdoctoral Science Foundation (2019T120359, 2017M621537)

* Corresponding author : LAN Jiaming, E-mail: jmlan@ips.ac.cn