

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.02.12

小反刍兽疫病毒反向遗传学研究进展

王煜, 孙淼, 陈延飞, 刘伟洁, 薛青红*

(中国兽医药品监察所, 100081)

[收稿日期] 2021-10-12 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 02-0082-06 [中图分类号] S859.79

[摘要] 小反刍兽疫(PPR)是由小反刍兽疫病毒(PPRV)引起的山羊、绵羊等小反刍动物的急性、高度接触性传染病。反向遗传学是在获得生物基因信息的基础上,对基因进行突变、缺失等操作,进而研究基因变化对表型的影响。本文综述了包括 PPRV 在内的单股负链 RNA 病毒反向遗传学的最新研究进展,以期 PPRV 及同科属病毒的反向遗传操作系统的建立提供新的思路。

[关键词] 小反刍兽疫病毒;单股负链 RNA 病毒;反向遗传学

Research Progress on Reverse Genetics of Peste Des Petits Ruminants Virus

WANG Yu, SUN Miao, CHEN Yan-fei, LIU Wei-jie, XUE Qing-hong*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: XUE Qing-hong, E-mail: 732574709@qq.com

Abstract: Peste des petits ruminants (PPR) is an acute and highly contact infectious disease of goats, sheep and other small ruminants caused by the Peste des petits ruminants virus (PPRV). Reverse genetics is based on obtaining biological genetic information, performing operations such as mutations and deletions on genes, and then studying the impact of genetic changes on phenotypes. This article reviews the latest research progress in reverse genetics of single-stranded negative-strand RNA viruses, including PPRV, in order to provide new ideas for the establishment of reverse genetic operating systems for PPRV and viruses of the same family.

Key words: Peste des petits ruminants virus; Single-stranded negative-strand RNA virus; reverse genetics

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)引起山羊、绵羊等小反刍兽的一种急

性、热性、接触性传染病,是 OIE 法定报告的动物传染病,我国规定为 I 类动物疫病^[1]。据 FAO 推测,全球约有 62.5% 的小反刍动物受到小反刍兽疫的

基金项目: 中国兽医药品监察所兽药行业公益性重点专项—小反刍兽疫病毒反向遗传操作系统的构建及可鉴别感染与免疫检测技术的建立(P2021012020)

作者简介: 王煜,硕士研究生,从事微生物与免疫学方向研究。

通讯作者: 薛青红。E-mail:732574709@qq.com

威胁,特别是非洲、亚洲和中东地区。2007 年 7 月我国西藏地区首次发生疫情,2013 年 11 月新疆地区再次发生,随后疫情遍布全国大多数省份。据不完全统计,全球每年因 PPR 导致的经济损失高达约 30 亿美元,目前主要采用疫苗免疫接种对 PPR 进行预防,2015 年 OIE、FAO 联合启动了《全球小反刍兽疫控制与根除策略》,提出了到 2030 年在全球消灭 PPR 的目标^[2]。

1 小反刍兽疫病毒概述及复制特征

小反刍兽疫病毒属于副粘病毒科(Paramyxoviridae)麻疹病毒属(Morbillivirus),同属成员还包括麻疹病毒(Measles virus, MV)、牛瘟病毒(Rinderpest virus, RPV)、犬瘟热病毒(Canine Distemper virus, CDV)、海豹瘟热病毒(Phocine distemper virus, PDV)、鲸麻疹病毒(Cetacean morbillivirus, CMV)、海豚麻疹病毒(Dolphin morbillivirus, DMV)^[3-4]。通过基因序列比对,可将 PPRV 分为四个基因型,但 PPRV 只发现一个血清型,其中基因 I、II、III 型主要流行于非洲,而我国小反刍兽疫流行毒株属于基因 IV 型。PPRV 是单股负链不分节段有囊膜的 RNA 病毒,绝大多数 PPRV 的核苷酸总数为 15948 nt, RNA 链从 3' 至 5' 依次分布着 N-P-M-F-H-L 6 个基因,共编码 6 种结构蛋白,即核衣壳蛋白(Nucleoprotein, N)、磷蛋白(Phosphoprotein, P)、基质蛋白(Matrixprotein, M)、融合蛋白(Fusion protein, F)、血凝素蛋白(Hemagglutinin protein, H)、大蛋白(Large protein, L),此外 PPRV P 基因有两个重叠的开放性阅读框(ORF)可编码病毒结构蛋白 P 和非结构蛋白 C、V 蛋白^[5]。

PPRV 复制过程中其病毒粒子中单链核糖核苷酸(ssRNA)不能直接用作转录和复制的模板,只有当基因组 ssRNA 与核蛋白结合形成核衣壳复合物(RNPs)以后,才能被 RNA 依赖的 RNA 聚合酶识别并作为转录的模板转录成正链 RNA,以此作为 mRNA 翻译 PPRV 复制所需蛋白,与此同时,以正链 RNA 为模板生成负链的病毒基因

组 RNA。

与麻疹病毒属其它成员一样,PPRV 基因组也遵循“六碱基原则”,即病毒基因组长度为 6 的倍数。但有研究表明,在微突变的 PPRV 微型基因组中插入或敲除一到两个核苷酸,PPRV 也能正常复制^[6],PPRV 的这一独特特征有别于其它严格遵守“六碱基原则”的麻疹病毒。

2 反向遗传学概述及研究进展

广义的反向遗传学指从生物基因组及所含生物信息出发,在获得生物基因信息的基础上,通过对基因的操作,如定点突变、插入、缺失、置换等,进行生物基因结构和功能的研究。目前,反向遗传技术已经成为推动植物学、动物学、微生物学研究发展的最前沿科学之一。

狭隘的反向遗传学是指对微生物的反向遗传操作和研究,目前已有许多病毒的反向遗传操作系统被建立起来,用以研究病毒的生命周期,了解病毒复制过程中的机制,创新了新型疫苗的研究手段,开创了病毒学研究的新局面。

由于基因组结构相对简单,反向遗传学在 RNA 病毒的研究中应用最为广泛,其核心是建立病毒的感染性克隆,即病毒的人工构建。了解病毒的基因组结构特点和表达调控模式是开展 RNA 病毒反向遗传学研究的基础^[7]。随着分子生物学的发展,这项技术随后也应用于 DNA 病毒的研究,病毒 DNA 可以直接进入细胞合成感染性病毒粒子。1976 年研究人员通过在体外转染突变过的猴空泡病毒 40 (Simian vacuolating virus 40 or Simian virus 40, SV40) DNA 实现了“体外拯救”^[8]。1978 年,科学家们将 QB 噬菌体全长 cDNA 克隆到载体上并转染大肠杆菌,成功拯救出具有感染性的子代噬菌体^[9]。这一突破性进展为其他 RNA 病毒的反向遗传学研究奠定了基础。1981 年,脊髓灰质炎病毒(Poliovirus, PV)感染性克隆的成功构建拉开了动物 RNA 病毒反向遗传学研究的序幕^[10]。

相对于 DNA 病毒和正链 RNA 病毒,负链 RNA

病毒的反向遗传学研究比较滞后。由于其基因组 RNA 不是复制、转录和翻译的模板,必须与核衣壳蛋白、RNA 依赖性 RNA 聚合酶等形成核糖核蛋白复合物(RNPs),才能进行正常的复制,完成病毒粒子的包装,而这在体外是难以实现的。除此之外,构建负链 RNA 病毒的全长 cDNA 必须明确基因组末端序列。综上所述,体外拯救具有感染性的负链 RNA 病毒存在一定难度^[11-12]。直到 1989 年, Luytjes W 等成功拯救出一种嵌合的流感病毒,打开了负链 RNA 病毒反向遗传学研究的大门^[13]。

3 PPRV 反向遗传学研究进展

关于 MV、RPA、CDV 的反向遗传操作系统的研究早已见诸报道^[14-16],而 PPRV 反向遗传操作系统的建立则相对较晚。2007 年 Bailey D 等人^[17]构建了小反刍兽疫病毒微型基因组系统,这一体系证实了 PPRV 反向遗传操作系统的可行性,并且证明了 PPRV 不像其他副粘病毒一样严格遵守“六碱基原则”。微型基因组一般保留病毒的顺式作用元件和调控区(一般为病毒基因组两端非编码区),多使用 GFP、CAT、X-gal 等报告基因代替中间编码区,而且都是将报告基因反向连入启动子下游,以避免非特异性表达。PPRV 体外拯救基本元件包括反基因组转录全长 cDNA 载体以及三个反式作用辅助病毒蛋白:核衣壳 N,磷蛋白 P 和大蛋白 L。Yununs 等人建立了 PPRV 体外转录系统,该系统可以在体外持续地转录出病毒所有蛋白的 mRNA,并表现出梯度转录特性,与病毒自然感染细胞的情况相似^[18]。翟军军^[19]构建了 PPRV 全长 cDNA 克隆,进行了 PPRV DNA 疫苗的研发和免疫学研究。直到 2012 年,Hu 等人^[20]通过 RNA 聚合酶 II 启动子驱动病毒全长基因组转录的方式,第一次成功地从 PPRV 全长 cDNA 克隆中拯救出了能稳定表达绿色荧光蛋白(GFP)的重组病毒,其体外复制能力与亲本病毒相当。2015 年 Muniraju M 等人^[21]也成功拯救出 PPRV,该拯救系统采用人工合成的质粒,包含全长 PPRV 反基因组序列和增强型绿色荧光蛋白

(EGFP)基因序列。该研究通过插入 EGFP 基因获得了阳性标记的重组病毒,通过突变 H 基因上 C77 位点获得了阴性标记的重组病毒,为 PPRV 鉴别感染和免疫(DIVA)标记疫苗的研发提供了新的思路和方法。在上述两个成功拯救 PPRV 的系统中,亲本毒均为 PPRV Nigeria 75/1 疫苗株,被拯救的重组 PPRV 病毒与亲本毒在 Vero 细胞上的生长曲线没有明显差别且产生相同的细胞病变(CPE)。Hu 等人重组 rPPRV-GFP 病毒通过病毒中和试验(VNT)可以更快速、更高通量地检测 PPRV 中和抗体效价。Muniraju M 等用重组病毒候选疫苗(rPPRV-C77)与亲本毒疫苗同时免疫山羊,都对致死剂量的 PPRV 攻击提供了完全保护。2019 年 Liu F 等人^[22]也建立了 PPRV 反向遗传系统,拯救的 PPRV 能在体外高效表达 EGFP。研究通过检测表达 EGFP 的细胞比例,比较了 BHK21、F81、MDBK、RK13、MDCK、PK15、Vero 和 GT 等 8 个哺乳动物细胞系对拯救病毒的易感性,最终确定 Vero 最易感,PK15 最不易感。

研究者根据副粘病毒基因组遗传稳定的特点,常利用反向遗传技术制备重组副粘病毒载体疫苗和 DIVA 疫苗,已成为当今疫苗研发的重要方向。胡倩倩等人^[23]构建了能够表达蓝舌病毒 VP5 和 VP7 蛋白的重组 PPRV,接种山羊可诱导产生针对 BTV 和 PPRV 的抗体。Yin C 等人^[24]构建了能够表达口蹄疫病毒 VP1 蛋白的重组 PPRV(rPPRV/VP1),rPPRV/VP1 接种山羊后对口蹄疫病毒的攻击产生明显的保护,结果表明 rPPRV/VP1 可作为 PPRV 和 FMDV 活载体疫苗的候选株。虽然已有成功建立的 PPRV 反向遗传系统,但至今未有公开报道拯救出的 PPRV 应用在 PPR 的防控和疫病的根除。

4 PPRV 拯救策略

4.1 副粘病毒反向遗传操作系统的分类 目前,副粘病毒反向遗传操作系统主要分为两种:一种是基于 T7 RNA 聚合酶建立的反向遗传操作系统,另

一种是基于 RNA 聚合酶 II 建立的反向遗传操作系统。两个操作系统的建立都必须以转录出精确的全长序列为基础。研究表明,负链 RNA 病毒在体外进行拯救的过程中,病毒基因组前导序列和尾部序列的突变会影响 RNA 的转录和复制,两端的非编码区在病毒的转录和复制中起着关键性作用。研究人员构建副粘病毒基因组全长 cDNA 克隆时,为避免外来核苷酸在体外转录过程中插入 RNA 模板的 5' 端和 3' 端,会在两端引入具有自我剪切功能的核酶序列。比如在病毒序列 5' 端和 3' 端分别引入丁肝核酶(HDVRZ)和锤头状核酶(HHRZ),两种核酶转录完成后,可分别在 5' 首端碱基之前和 3' 末端碱基之后发生特异性剪切,从而得到完整且准确的基因组末端序列^[25-26],此方法在拯救负链 RNA 病毒中应用较为广泛。

T7 RNA 聚合酶是一种依赖 DNA 的 RNA 聚合酶,其对噬菌体 T7 启动子序列具有高特异性,能够特异性地转录位于 T7 启动子下游的 DNA。在副粘病毒的反向遗传学研究中,通常在病毒基因组 cDNA 的 5' 端插入 T7 启动子,这就要求宿主细胞提供 T7 RNA 聚合酶以配合转染质粒在细胞内转录。因此需要筛选出能稳定表达 T7 RNA 聚合酶的特定细胞系,或者利用重组的 T7 RNA 聚合酶痘苗病毒提前感染宿主细胞获得外源性 T7 RNA 聚合酶。以上策略操作复杂且转染细胞易受干扰,尤其对拯救具有严格细胞适应性的病毒而言影响更大。

为了解决上述问题,研究人员开发了一个基于人巨细胞病毒(CMV)启动子的系统,即在病毒基因组 cDNA 的 5' 端插入 CMV 启动子代替 T7 启动子,利用真核细胞自身表达的 RNA 聚合酶 II 直接识别 CMV 启动子。CMV 系统的优点是避免产生由于引入外源性 T7 RNA 聚合酶而引起宿主细胞发生 CPE,或由于增加了共转染质粒的数量而降低系统性能的问题。由于 RNA 聚合酶 II 位于细胞核的核质内,最初认为驱动 CMV 启动子的 RNA 聚合

酶 II 系统用于拯救核复制病毒效果会更好。而后研究表明 CMV 系统也可用于拯救其他非核复制病毒,如 2011 年 Li 等人将 NDV 的 I 系苗 Mukteswar 毒株全长序列分别置于 T7 启动子和 CMV 启动子后,都获得了具有感染性的病毒粒子,并且采用 CMV 启动子拯救系统的拯救效率显著高于前者^[27]。至于采用 T7 启动子还是 CMV 启动子主要取决于实验室现有的条件,目前市场已有成熟稳定表达 T7 RNA 聚合酶的细胞系,在极大提高病毒拯救效率的同时也避免了由于引入外源 T7 RNA 聚合酶辅助拯救病毒而引起的 CPE 的难题。

4.2 参考 NDV 的拯救策略 在传统的副粘病毒反向遗传学研究中,病毒拯救依赖于将含有病毒基因组全长序列的质粒分别与三个含有 N、P 和 L 基因独立克隆的辅助质粒共转染真核细胞。

下面将从副粘病毒科 NDV 反向遗传学最新研究进展中分析可能用于拯救 PPRV 的策略,有望促进 PPRV 反向遗传技术的发展。2008 年 Gao 等人^[28]在基于 RNA 聚合酶 I 系统之上,将 NDV 弱毒株 B1 株三个外部基因和三个内部基因克隆到带有 T7 启动子的转录载体上,然后将两个含有全长序列的转录载体和三个辅助质粒共转染细胞,拯救出的重组 NDV 生长特性与亲本毒一致。副粘病毒基因组大小为 15~16kb,构建全长 cDNA 克隆时容易发生突变,如果能将全长基因组分节段克隆到两个质粒进行转录将提高病毒拯救效率。Gao 等人^[28]的研究为 PPRV 拯救提供了一条新思路。2020 年 Wang N 等人^[29]建立了一种简单可靠的 NDV 反向遗传操作系统,研究构建的一个 NDV 基因组全长质粒采用 T7 启动子驱动,其他三个辅助质粒系统采用 CMV 启动子驱动,同时构建了一个不使用辅助病毒就能够增强表达 T7 RNA 聚合酶的质粒,通过五个质粒共转染成功拯救出重组 NDV 病毒。

2017 年 Liu 等人^[30]开展了双质粒拯救系统的研究,双质粒系统是一种新方法,其创新点在于构建了一个辅助质粒,其中包含了可编码三个病毒复

制所需蛋白(N、P 和 L)的翻译盒,每个翻译盒都有一个合适的启动子(T7 或 CMV)和终止子(T7T 或 Poly - A tail),根据拯救策略的不同,可选择性地使用或不使用外源性 T7 RNA 聚合酶。另外,研究人员还构建了病毒全长反基因组的质粒,将其与辅助质粒共转染到细胞中,拯救出感染性病毒。与传统的四质粒系统相比,双质粒系统具有更高的拯救效率,并且适用于四质粒系统无法拯救的病毒^[30-31]。

除了以上多质粒拯救系统外,还有基于单质粒的拯救系统。单股负链 RNA 病毒的反向遗传操作系统的建立依赖于含有病毒基因组全长 cDNA 的质粒和含有病毒复制相关基因的辅助质粒进行共转染。Peeters B^[32]提出了一种新的拯救策略,即利用单个质粒拯救 NDV,无需使用辅助质粒。这种方法是将 T7 或 CMV 启动子序列插入或替换病毒复制基因的亚基因组 RNA 的非编码区,位置的选择应确保编码病毒复制必要蛋白的亚基因组 RNA 转录,从而形成 RNP 复合物,同时还要避免干扰病毒基因组中增强下游基因表达的基本元件。由于病毒复制策略的相似性,单质粒系统理论上也可适用于大多数非节段负链 RNA 病毒。

目前,对已经拯救出的 PPRV 反向遗传系统进行分析,科研人员均采用四质粒拯救体系,其中 Hu 等人采用 CMV 启动子对病毒进行拯救,直接将质粒转染到 PPRV 易感细胞中,完成病毒组装释放;而 Muniraju M 和 Liu F 等人则采用 T7 启动子对病毒进行拯救,将质粒转染到改造过带有 T7 聚合酶的真核细胞系中,完成病毒的组装。PPRV 反向遗传技术的应用大多集中在将一段外源基因插入 PPRV 基因组中,做成基因联苗。由于 PPRV 反向遗传操作系统尚不成熟,病毒拯救困难。因此,建立稳定可靠的 PPRV 反向遗传操作系统对其致病机制十分重要。

5 展 望

通过反向遗传操作技术,将病毒 RNA 转换为 DNA,在 DNA 分子水平上对病毒基因组进行研究

改造,可应用于 DIVA 疫苗和抗病毒药物的研发,具有广阔的前景。未来基于 PPRV 的反向遗传学平台,一方面可以解析 PPRV 致病机理、免疫逃逸机制、病毒复制机制等病毒学问题;另一方面还可以开发更加安全、有效的新型疫苗,为临床防治该病提供较好的理论基础和技术平台。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国农业农村部. 中华人民共和国海关总署公告第 256 号[Z]. 中华人民共和国农业农村部公报,2020(07): 104 - 110.
Announcement No. 256 of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China and the General Administration of Customs of the People's Republic of China[Z]. Bulletin of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, 2020(07):104 - 110.
- [2] 宋建德,袁丽萍,孙洪涛,等. 2015 - 2016 年全球小反刍兽疫流行状况和防控[J]. 中国兽医杂志,2017,53(12):111 - 113.
Song J D, Yuan L P, Sun H T, et al. 2015 - 2016 Global Epidemic Situation and Prevention and Control of Peste des petits Ruminants[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2017, 53(12):111 - 113.
- [3] 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 Res, 2005, 110: 119 - 24.
- [4] Mahapatra M, Parida S, Baron M D, et al. Matrix protein and glycoproteins F and H of Peste - des - petits - ruminants virus function better as a homologous complex[J]. J Gen Virol, 2006, 87: 2021 - 2029.
- [5] Horikami S M, Hector R E, Smallwood S, et al. The Sendai virus C protein binds the L polymerase protein to inhibit viral RNA synthesis[J]. Virology, 1997, 235: 261 - 70.
- [6] Bailey D, Chard LS, Dash P, et al. Reverse genetics for peste - des - petits - ruminants virus (PPRV): promoter and protein specificities[J]. Virus Res, 2007, 126: 250 - 5.
- [7] 刘光清. 动物病毒反向遗传学[M]. 北京:科学出版社,2014.
Liu G Q. Animal Virus Reverse Genetics[M]. Beijing: Science Press, 2014.
- [8] Goff S P, Berg P. Construction of hybrid viruses containing SV40 and lambda phage DNA segments and their propagation in cultured monkey cells[J]. Cell, 1976, 9: 695 - 705.
- [9] Taniguchi T, Palmieri M, Weissmann C. A Qbeta DNA - contain-

- ning hybrid plasmid giving rise to Qbeta phage formation in the bacterial host [proceedings] [J]. *Ann Microbiol (Paris)*. 1978 Nov - Dec;129 B(4):535 - 6.
- [10] Racaniello V R, Baltimore D. Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells[J]. *Science*. 1981 Nov 20;214(4523):916 - 9.
- [11] Pekosz A, He B, Lamb R A. Reverse genetics of negative - strand RNA viruses: closing the circle[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Aug 3;96(16):8804 - 6.
- [12] Walpita P, Flick R. Reverse genetics of negative - stranded RNA viruses: a global perspective[J]. *FEMS Microbiol Lett*. 2005 Mar 1;244(1):9 - 18.
- [13] Luytjes W, Krystal M, Enami M, *et al*. Amplification, expression, and packaging of foreign gene by influenza virus[J]. *Cell*. 1989 Dec 22;59(6):1107 - 13.
- [14] Radecke F, Spielhofer P, Schneider H, *et al*. Rescue of measles viruses from cloned DNA[J]. *EMBO J*. 1995 Dec 1;14(23):5773 - 84.
- [15] Baron MD, Barrett T. Rescue of rinderpest virus from cloned cDNA[J]. *J Virol*. 1997 Feb;71(2):1265 - 71.
- [16] Gassen U, Collins F M, Duprex W P, *et al*. Establishment of a rescue system for canine distemper virus[J]. *J Virol*. 2000 Nov;74(22):10737 - 44.
- [17] Bailey D, Chard L S, Dash P, *et al*. Reverse genetics for peste - des - petits - ruminants virus (PPRV): promoter and protein specificities[J]. *Virus Res*. 2007 Jun;126(1 - 2):250 - 5.
- [18] Yunus M, Shaila M S. Establishment of an *in vitro* transcription system for Peste des petits ruminant virus[J]. *Virol J*. 2012 Dec 5;9:302.
- [19] 翟军军. 小反刍兽疫病毒全长 cDNA 的构建及 DNA 疫苗的免疫学研究[D]. 中国农业科学院, 2012.
- Zhai Junjun. Construction of the full - length cDNA of Peste des ruminants virus and immunological study of DNA vaccine [D]. Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2012.
- [20] Hu Q, Chen W, Bu Z, *et al*. Rescue of recombinant peste des petits ruminants virus: creation of a GFP - expressing virus and application in rapid virus neutralization test[J]. *Vet Res*. 2012 Jun 2;43(1):48.
- [21] Muniraju M, Mahapatra M, Buczkowski H, *et al*. Rescue of a vaccine strain of peste des petits ruminants virus: In vivo evaluation and comparison with standard vaccine[J]. *Vaccine*. 2015 Jan 9;33(3):465 - 71.
- [22] Liu F, Zhang Y, Li L, *et al*. Rescue of eGFP - expressing small ruminant morbillivirus for identifying susceptibilities of eight mammalian cell lines to its infection[J]. *Virus Res*. 2019 Feb;261:60 - 64.
- [23] 胡倩倩. 表达 GFP 或 BTV 结构蛋白的小反刍兽疫疫苗株的构建及生物学特性研究[D]. 南京农业大学, 2012.
- Hu Qianqian. Construction and biological characteristics of a small animal disease vaccine strain expressing GFP or BTV structural protein [D]. Nanjing Agricultural University, 2012.
- [24] Yin C, Chen W, Hu Q, Wen Z, Wang X, Ge J, Yin Q, Zhi H, Xia C, Bu Z. [J]2014 Jun 4;45(1):62.
- [25] Meyer M, Masquida B. cis - Acting 5' hammerhead ribozyme optimization for *in vitro* transcription of highly structured RNAs[J]. *Methods Mol Biol*. 2014;1086:21 - 40.
- [26] Cardenas - Garcia S, Afonso C L. Reverse genetics of Newcastle Disease Virus[J]. *Methods Mol Biol*. 2017;1602:141 - 158.
- [27] Li BY, Li XR, Lan X, *et al*. Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA using an RNA polymerase II promoter[J]. *Arch Virol*. 2011 Jun;156(6):979 - 86.
- [28] Gao Q, Park M S, Palese P. Expression of transgenes from newcastle disease virus with a segmented genome. *J Virol*[J]. 2008 Mar;82(6):2692 - 8.
- [29] Wang N, Huang M, Fung T S, *et al*. Rapid development of an effective Newcastle Disease Virus vaccine candidate by attenuation of a Genotype VII velogenic isolate using a simple infectious cloning system[J]. *Front Vet Sci*. 2020 Sep 17;7:648.
- [30] Liu H, Albina E, Gil P, *et al*. Two - plasmid system to increase the rescue efficiency of paramyxoviruses by reverse genetics: The example of rescuing Newcastle Disease Virus[J]. *Virology*. 2017 Sep;509:42 - 51.
- [31] Liu H, de Almeida R S, Gil P, *et al*. Comparison of the efficiency of different newcastle disease virus reverse genetics systems. *J Virol Methods*[J]. 2017 Nov;249:111 - 116.
- [32] Peeters B, de Leeuw O. A single - plasmid reverse genetics system for the rescue of non - segmented negative - strand RNA viruses from cloned full - length cDNA[J]. *J Virol Methods*[J]. 2017 Oct;248:187 - 190.