

反向基因技術在腸病毒研究與疫苗之發展

劉家齊

財團法人國家衛生研究院 感染症與疫苗研究所

前 言

許多微生物對人類會造成疾病，嚴重時導致死亡。綜觀人類的歷史上，相對比其他醫療的措施，疫苗接種有助於挽救更多生命。疫苗以非致病性的方式觸發人體的免疫反應，以減輕當病毒或細菌等病原體感染人體後所造成的影響[1]。在所有病原體中，其中以 RNA 病毒在複製繁殖過程中易產生許多變異株，因此容易出現突破性感染。如流感病毒 (influenza)、新型冠狀病毒 (SARS-CoV-2) 等的大流行，RNA 病毒持續產生變異株，而每次以不同的變異株持續造成大眾的感染產生疾病，如此大大地增加醫療負荷與社會防疫的成本。造成疾病的病毒株可以用來發展診斷工具、開發和評估抗病毒藥物和疫苗，並建立適當的攻毒動物模型，但在新興疫情爆發的早期階段，衛生

機關和科學界是無法迅速獲得致病之病毒株。因此為研究新興 RNA 病毒與儘快發展抗病毒藥物與疫苗，研究人員藉由生物資訊資料庫與反向基因技術，從化學合成的 DNA 中去產生 RNA 病毒，便可展開相關研究，並進一步進行基因修飾和探討相關機制。以近期新型冠狀病毒的發展為例，其他國家研究人員在取得武漢株序列後，便利用反向基因技術在短時間內合成出新冠病毒株，迅速展開抗病毒藥物與疫苗之研發工作[2]。

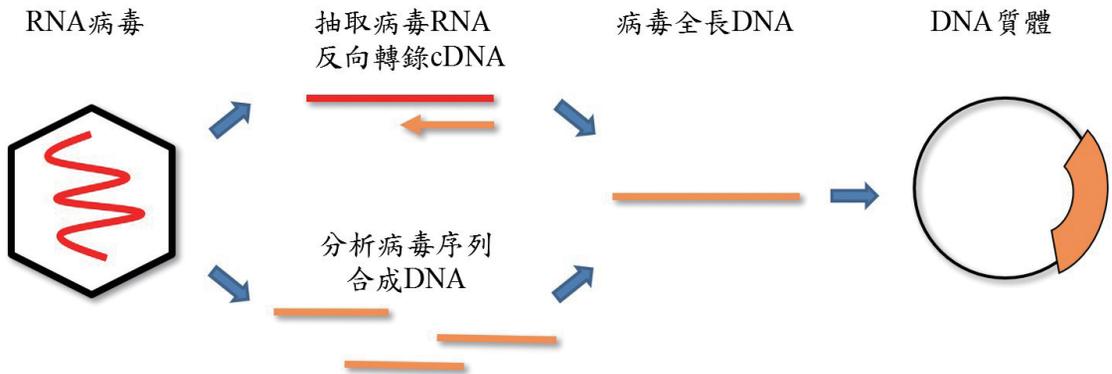
反向基因技術之原理

反向基因技術 (Reverse genetics technology) 是一種重要的分子生物學研究技術，研究人員能夠以基因工程編輯與操作特定核酸序列後送入細胞或生物體，使其造成的表型變化研究基因功能[2-9]。RNA 複製不像 DNA

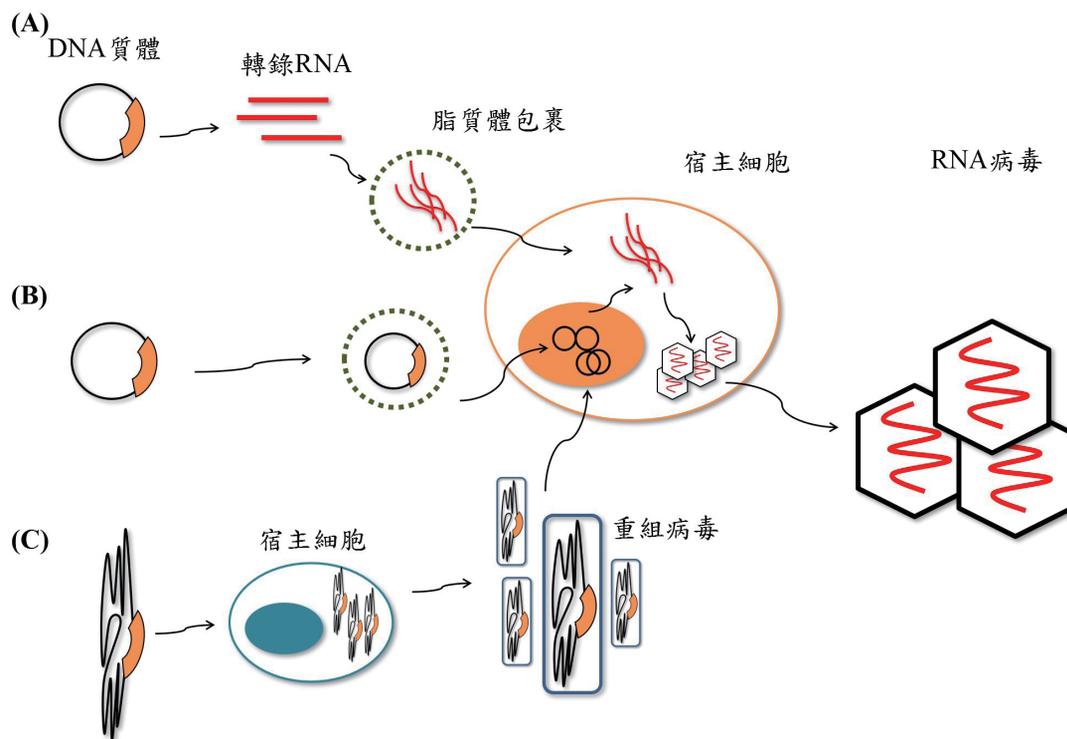
複製那樣具有校正能力，所以在複製過程中所產生的任何突變，只要對 RNA 病毒的生存沒有影響，便會被保留下來產生變異株。反轉基因技術在研究具感染威脅性之 RNA 病毒上，是將具傳染性 RNA 病毒的全長基因序列，先以反轉錄酶合成 cDNA 或是化學合成 DNA 組合後，構築在可複製的 DNA 質體上 (圖一)。研究人員在 DNA 質體上便可編輯操作病毒基因。當需要重組病毒時，再藉由 DNA 轉錄出 RNA 後或由 DNA 質體利用脂質體 (liposome) 包裹後再次送入細胞以重新產生病毒 (圖二)。大多數的研究都是先將 DNA 轉錄成 RNA，RNA 再經純化後送入宿主細胞重新生成病毒 (圖二A)。在這個方法中，全長病毒 DNA 位於噬菌體 T7 或 SP6 啟動子的下游，藉由 T7 或 SP6 RNA 聚合酶的轉錄，合成整個病毒 RNA 後送入宿主細胞。因此 RNA 聚合酶的酶活性轉錄效率、RNA 的穩定性與脂質體轉染效率是影響病毒

生成的可能因素。少數的研究則設計直接將 DNA 質體送入細胞重新生成病毒，減少中間的處理 RNA 步驟與風險 (圖二B)。在這個方法中，全長病毒 DNA 位於巨細胞病毒 (CMV) 或人類 RNA 聚合酶 I (human RNA polymerase I) 啟動子的下游，由宿主細胞自行轉錄病毒 RNA 後產生病毒。脂質體轉染效率將會是影響病毒生成的可能因素。最近已有研究人員利用昆蟲桿狀病毒載體，裝入欲研究的病毒全長重組桿狀病毒，先去感染哺乳動物細胞，再重新生成欲研究的目標病毒 (圖二C)。在這個方法中，利用桿狀病毒載體產出重組桿狀病毒作為遞送系統，不使用脂質體包裹而是由重組桿狀病毒將目標病毒 DNA 送入細胞。這比前述其他方法，多出了製作重組桿狀病毒的過程。

至目前為止，已有許多對人類影響重大的病毒都已藉反向基因技術構築起可合成出病毒的 DNA 質體，



圖一 RNA 病毒的全長基因序列以反轉錄酶合成 cDNA 或分析病毒序列合成 DNA 構築 DNA 質體以利基因工程操作



圖二 具病毒的全長基因序列的 DNA 質體，藉由 (A) 從 DNA 轉錄出 RNA 後；或 (B) 由 DNA 質體利用脂質體包裹後；或 (C) 產生重組桿狀病毒再次送入細胞以重新產生病毒。

如：小兒麻痺病毒、登革熱病毒、麻疹、輪狀病毒、流感病毒、冠狀病毒等[2-9]。這些使用反向基因技術所合成之重組病毒，促進病毒研究與疫苗之發展。

反向基因技術產生重組腸病毒之研究

腸病毒屬於小 RNA 病毒科 (Picornaviridae) 為一群病毒的總稱，如：小兒麻痺病毒 (Poliovirus)、克

沙奇病毒 (Coxsackievirus) 含 A 型與 B 型、伊科病毒 (Echovirus) 及腸病毒 (Enterovirus) (68 型~) 等[10]。近年來依據基因序列重新歸類，分為人類腸病毒 A、B、C、D (Enterovirus A、B、C、D) 型。腸病毒屬病毒之遺傳物質為一條單鏈正股核糖核酸 (RNA)，基因大小約為 7,500 個鹼基對。由 VP1 至 VP4 四種病毒蛋白組成的外殼 (Capsid) 包覆遺傳物質，病毒型態以正二十面體組成[10]。當病毒進入細胞後，病毒的 RNA 被轉譯

出一條多蛋白分子，而 RNA 之前後未被轉譯的區域稱為 5'端與 3'端非轉譯區 (5'-UTR and 3'-UTR)。病毒多蛋白分子經特定病毒蛋白切割後，形成組成外殼的結構蛋白 VP0、VP1、VP3，以及非結構蛋白 2A、2B、2C、3A、3B、3C、3D。非結構蛋白對病毒複製過程中，進行多蛋白分子切割與遺傳物質複製…等重要功能。當包裹新合成的病毒遺傳物質形成病毒後，結構蛋白 VP0 將進一步被切割成 VP2 與 VP4。由於 RNA 病毒具高突變特性，每種腸病毒都有多種基因亞型[10,11]。

在小兒麻痺病毒疫苗大量施打後接近根除的現代，近年來最讓人耳熟能詳的腸病毒是腸病毒 A71 型 (EV-A71)，幼童被感染後會出現手足口症的症狀，嚴重時造成重症或導致死亡[11]。自從台灣 1998 年的大流行造成重大傷害後，針對 EV-A71 的抗病毒藥物與疫苗便積極發展，而反向基因技術則對研究 EV-A71 有著重要的幫助。多年來以反向基因技術產生許多重組 EV-A71，使得 EV-A71 每個基因組片段的功能逐漸被揭露出來，其研究方向整理於表一。這些研究對於改進病毒生長、抗病毒藥物之篩選、建構載體技術與發展疫苗提供重要的資訊[9]。大部分實驗室先將 DNA 轉錄成 RNA 後送入細胞去生成病毒，少數實驗室則設計直接將 DNA 送入細胞去生成病毒，最新是設計昆蟲桿狀病毒載體送入細胞去生

成病毒。

現有的 EV-A71 疫苗株的發展，是從許多患者檢體中採集病毒，經動物試驗測試而篩選出來。實驗室以反轉基因技術將 EV-A71 疫苗株建構成 DNA 質體，未來可以不用再從患者檢體中採集病毒，而從 DNA 質體去生成腸病毒疫苗株之種源以避免外源性的污染[27]。也可從已公布之基因序列以合成的方式製造出病毒株，未來可因應新亞型病毒的流行而製備所需的疫苗株，以因應不可預期的疫情，保障民眾的健康與減輕醫療負荷。此外，此項技術已在建構其他血清型之腸病毒，未來可對這些病毒進行研究與解析其基因資訊後，將能加快其疫苗開發[9]。

未來展望

反向基因技術具有從已知的病毒基因組序列重新合成 DNA 並快速生成 RNA 病毒的優勢，避免了從臨床檢體取得分離株的困難。此外，構築病毒單一的 DNA 基因序列去生成 RNA 病毒，避免了 RNA 病毒的持續產生變異的類種 (quasispecies) 效應。此項技術對於研究突變點位影響病毒複製、毒力改變、病毒結構、耐藥性篩選、基因特性、疫苗生產、中和表位探討、免疫原性生成和攻毒動物模型建立上，提供許多重要的資訊。目前仍然有許多具威脅性的腸病毒亟待開發疫苗，對這些病毒進行研

表一 利用反向基因技術合成重組腸病毒 A71 型之相關研究

原型病毒株	啟動子	研究方向	參考文獻
BrCr-TR	T7	研究對溫度敏感性的突變株與活性減毒病毒株之研究。	[12]
HEV71-26M	T7	在小鼠模式中的毒力研究。	[13]
4643	T7	於 3D 蛋白 I251T 突變，增加病毒對溫度敏感性。	[14]
MP4			
EV71-6F	T7	探討在細胞培養中，重組病毒株之生長速度差異。	[15]
EV71-26M			
4643	CMV	於 5 端非轉譯區之研究，影響病毒轉譯和毒力。	[16]
237			
26M/AUS/4/99	T7	建構在 3D 蛋白之突變株，用於抗病毒藥物研究。	[17]
HeN09	T7	嵌入 GFP 構築重組病毒用於藥物篩選。	[18]
SHZH98	T7	建構 C4 基因亞型疫苗候選株	[19]
6F/AUS/6/99	T7	開發重疊和長距離 PCR 技術以構築病毒。	[20]
SDLY107	T7	探討鑑定 5 端非轉譯區影響了病毒的複製、致病性和毒力。	[21,22]
G082	T7	鑑定 VP1 中的數個胺基酸影響了病毒的產生。	[23]
5865/SIN/000009	CMV	開發了雙啟動子以增加病毒產量。	[24]
	T7		
G082	T7	建構在 3D 蛋白之突變株，用於抗病毒藥物研究。	[25]
306B	T7	腸病毒 A71 型與克沙奇 A16 型嵌合型二價疫苗之重組病毒	[26]
E59	CMV	建構 B4 基因亞型疫苗株	[27]
UH1	T7	研究在急性感染中，VP1 與 IgM 的交互作用。	[28]
695F C+1	T7	建構非馴化突變株發展乳鼠感染模式	[29]
BrCr	AcMNPV	發展重組桿狀病毒作為遞送系統	[30]
GFP-BrCr	T7		

(Modified from Fang & Liu. Expert Opin Drug Discov. 2022;17(1):27-39.)

究與解析其基因信息後，利用反向基因技術能加快疫苗開發。在疫苗的設計與製造上，也進入全球分工合作的模式，分別在不同國家進行測試、生

產、驗證與智慧學習的循環，以因應不可預期的全球疫情大流行，保障民眾的健康與減輕醫療負荷。

參考文獻

- Flemming A, Sadanand S, Barranco C, et al (2020): Nature Milestones in Vaccine. Nature portfolio. Available <https://www.nature.com/collections/hcajdajjj>
- Cockrell AS, Beall A, Yount B, et al: Efficient Reverse Genetic Systems for Rapid Genetic Manipulation of Emergent and Preemergent Infectious Coronaviruses. *Methods Mol Biol* 2017;1602:59-81.
- Thi Nhu Thao T, Labroussaa F, Ebert N, et al: Thiel V. Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform. *Nature* 2020;582:561-65.
- Racaniello VR, Baltimore D: Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science* 1981;214:916-9.
- Pekosz A, He B, Lamb RA: Reverse genetics of negative-strand RNA viruses: closing the circle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8804-6.
- Pugachev KV, Guirakhoo F, Trent DW, et al: Traditional and novel approaches to flavivirus vaccines. *Int J Parasitol* 2003;33:567-82.
- Webby RJ, Perez DR, Coleman JS, et al: Responsiveness to a pandemic alert: use of reverse genetics for rapid development of influenza vaccines. *Lancet* 2004;363:1099-103.
- Papa G, Burrone OR: Rotavirus reverse genetics: A tool for understanding virus biology. *Virus Res* 2021;305:198576.
- Fang CY, Liu CC: Novel strategies for the development of hand, foot, and mouth disease vaccines and antiviral therapies. *Expert Opin Drug Discov* 2022;17:27-39.
- Solomon T, Lewthwaite P, Perera D, et al: Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *Lancet Infect Dis* 2010;10:778-90.
- Fang CY, Liu CC: Recent development of enterovirus A vaccine candidates for the prevention of hand, foot, and mouth disease. *Expert Rev Vaccines* 2018;17:819-31.
- Arita M, Shimizu H, Nagata N, et al: Temperature-sensitive mutants of enterovirus 71 show attenuation in cynomolgus monkeys. *J Gen Virol* 2005;86:1391-401.
- Chua BH, Phuoktes P, Sanders SA, et al: The molecular basis of mouse adaptation by human enterovirus 71. *J Gen Virol* 2008;89:1622-32.
- Kung YH, Huang SW, Kuo PH, et al: Introduction of a strong temperature-sensitive phenotype into enterovirus 71 by altering an amino acid of virus 3D polymerase. *Virology* 2010;396:1-9.
- Phuoktes P, Chua BH, Sanders S, et al: Mapping genetic determinants of the cell-culture growth phenotype of enterovirus 71. *J Gen Virol* 2011;92:1380-90.
- Yeh MT, Wang SW, Yu CK, et al: A single nucleotide in stem loop II of 5'-untranslated region contributes to virulence of enterovirus 71 in mice. *PLoS One* 2011;6:e27082.
- Sadeghipour S, Bek EJ, McMinn PC: Ribavirin-resistant mutants of human enterovirus 71 express a high replication fidelity phenotype during growth in cell culture. *J Virol* 2013;87:1759-69.
- Shang B, Deng C, Ye H, et al: Development and characterization of a stable eGFP enterovirus 71 for antiviral screening. *Antiviral Res* 2013;97:198-205.
- Zhang YX, Wei T, Li XY, et al: Construction and characterization of an infectious cDNA clone of enterovirus type 71 subgenotype C4. *Virus Genes* 2013;47:235-43.
- Lazouskaya NV, Palombo EA, Poh CL, et al: Construction of an infectious cDNA clone of Enterovirus 71: insights into the factors ensuring experimental success. *J Virol Methods* 2014;197:67-76.
- Ma YW, Hao SB, Sun LL, et al: Construction and characterization of infectious cDNA clones of enterovirus 71 (EV71). *Virol Sin* 2015;30:305-8.
- Dong Z, Liu ZW, Chen R, et al: The untranslated regions of EV-A71 contribute to its pathogenicity and virulence. *Virus Res* 2019;263:55-63.
- Yuan S, Li G, Wang Y, et al: Identification of Positively Charged Residues in Enterovirus 71 Capsid Protein VP1 Essential for Production of Infectious Particles. *J Virol* 2015;90:741-52.
- Tan CW, Tee HK, Lee MH, et al: Enterovirus A71 DNA-Launched Infectious Clone as a Robust Reverse Genetic Tool. *PLoS One* 2016;11:e0162771.
- Wang Y, Li G, Yuan S, et al: In Vitro Assessment

- of Combinations of Enterovirus Inhibitors against Enterovirus 71. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60:5357-67.
26. Yang L, Liu Y, Li S, et al: A novel inactivated enterovirus 71 vaccine can elicit cross-protective immunity against coxsackievirus A16 in mice. *Vaccine* 2016;34:5938-45.
27. Yang YT, Chow YH, Hsiao KN, et al: Development of a full-length cDNA-derived enterovirus A71 vaccine candidate using reverse genetics technology. *Antiviral Res* 2016;132:225-32.
28. NikNadia N, Tan CW, Ong KC, et al: Identification and characterization of neutralization epitopes at VP2 and VP1 of enterovirus A71. *J Med Virol* 2018;90:1164-67.
29. Zhang H, Song Z, Zou J, et al: An infectious clone of enterovirus 71 (EV71) that is capable of infecting neonatal immune competent mice without adaptive mutations. *Emerg Microbes Infect* 2020;9:427-38.
30. Lu B, Tang Q, Wang Q, et al: Recovery Infectious Enterovirus 71 by Bac-to-Bac Expression System in vitro and in vivo. *Front Microbiol* 2022;13:825111.