

用于罗湖病毒 (TiLV) 的基于质粒的反向遗传学系统



健康与保健

生物医学与基因工程/化工产品

机会

罗湖病毒 (TiLV) 是一种新出现的高致病性病毒，对全球重要的食用鱼——罗非鱼造成严重疾病，特别是在中低收入国家。自2014年首次发现以来，TiLV已传播至亚洲、非洲和美洲，感染种群死亡率高达90%。目前尚无针对TiLV感染的治疗方法、有效药物或商业化疫苗，这对全球罗非鱼水产养殖和粮食安全构成严重威胁。科学界对TiLV的了解极为有限，在其复制机制、致病机理以及病毒基因和蛋白功能方面存在重大知识空白。推进此项研究的一个主要障碍是缺乏TiLV的反向遗传学系统 (RGS)。RGS是一种可以从克隆的cDNA生成感染性病毒的基础工具，对于病毒学、详细研究病毒生物学、宿主-病原体相互作用以及疫苗开发至关重要。缺乏针对TiLV的此类系统严重阻碍了理解该病毒和开发应对措施的努力。为TiLV创建RGS的具体挑战包括：使用标准方法在易感鱼细胞中回收感染性病毒的困难；对某些系统所需的鱼类RNA聚合酶I启动子完全缺乏了解；大多数TiLV蛋白功能未知；以及操作其十分段RNA基因组的技术复杂性。本专利解决了实验室中生成和操作TiLV的可靠方法这一关键未满足需求，这是开发诊断方法、治疗药物和疫苗以控制这种毁灭性疾病必不可少的第一步。

技术

本发明首次公开了用于罗湖病毒 (TiLV) 的基于质粒的反向遗传学系统 (RGS)。核心创新是一种完全从克隆cDNA拯救重组TiLV的方法，克服了此前与这种十分段RNA病毒相关的难以逾越的挑战。该技术涉及构建一套十个双向表达质粒。每个质粒包含一个TiLV基因组片段的cDNA，该cDNA插入特定的启动子序列之间：巨细胞病毒 (CMV) 启动子 (用于RNA聚合酶II驱动的mRNA合成) 和人类RNA聚合酶I启动子 (用于病毒基因组RNA合成)。这种双向设计允许在同一转染细胞内同时产生病毒mRNA (用于蛋白质翻译) 和病毒基因组RNA。一个关键的技术突破是确定了合适的细胞培养系统。发明人发现，将哺乳动物Vero E6细胞与鱼类来源的E11细胞 (来自线纹鲮) 共培养，创造了一个既有利于质粒转染效率又支持后续TiLV复制的环境。该方法需要用全套十个质粒转染这种共培养物，然后在约28°C下孵育细胞，从而产生感染性重组TiLV颗粒。此外，本发明扩展了该系统以工程化报告基因标记的TiLV。通过将一个小报告标签序列 (如HiBit、GFP) 整合到病毒片段的开放阅读框中，同时保留关键的末端包装信号，该系统可以生成易于在体外和体内追踪和定量的病毒。该RGS还能够通过混合来自不同TiLV毒株的质粒来创建重配病毒，从而促进病毒进化和片段功能的研究。该系统的开发是通过解决具体问题来指导的：使用Vero E6细胞解决了缺乏鱼类Pol I启动子数据的问题；双向质粒设计通过提供所有病毒成分规避了TiLV蛋白功能未知的问题；而共培养/转染优化则管理了十分段基因组的复杂性。

优势

- 提供了首个用于罗湖病毒 (TiLV) 的反向遗传学平台，能够从克隆DNA生成感染性病毒。

备注

IDF: 1610

IP状态

专利已授权



技术成熟度等级 (TRL) ?

4

发明人

Prof. Nikolaus OSTERRIEDER

王星星博士

查询: kto@cityu.edu.hk

Follow-on
FundingProof
Concept

Build Value

- 克服了包括未知病毒蛋白功能和缺乏已识别的鱼类特异性聚合酶启动子在内的重大技术障碍。
- 能够对TiLV进行精确的基因操作，允许创建重组、重配和报告基因标记的病毒。
- 报告基因标记的病毒（如HiBiT标记）为实时监测细胞培养和动物模型中的病毒感染提供了强大、可量化的工具。
- 该系统通用且稳健，已通过成功拯救多种病毒毒株和稳定传代的报告病毒得到证实。
- 提供了在分子水平上研究TiLV基因功能、复制机制和致病机理的直接方法。
- 为高通量筛选抗病毒化合物和评估候选疫苗奠定了关键基础。

应用

- 基础病毒学研究：阐明TiLV的复制周期、致病机理和宿主-病毒相互作用。
- 疫苗开发：作为平台，用于生成针对TiLV的减毒活疫苗、灭活疫苗或亚单位疫苗候选物。
- 抗病毒药物发现：能够使用报告病毒进行高通量筛选文库，以识别TiLV复制抑制剂。
- 诊断工具开发：提供特征明确的病毒储备和特定工具（如报告病毒），用于改进和验证诊断检测方法。
- 病毒进化研究：通过受控生成重配病毒，促进病毒遗传学、重配潜力和新毒株出现的研究。
- 致病性研究：允许创建具有特定突变的病毒，以研究毒力决定因素和组织嗜性。

