

张亚青,戚菲菲,鲍琳琳. Beta 属冠状病毒亚基因组检测及应用进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(11): 142-148.
Zhang YQ, Qi FF, Bao LL. Research progress on subgenome of beta-coronavirus [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(11): 142-148.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.11.019

Beta 属冠状病毒亚基因组检测及应用进展

张亚青,戚菲菲,鲍琳琳*

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室,
新发再发传染病动物模型研究北京市重点实验室,北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心,
国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室,北京 100021)

【摘要】 目前已知可以感染人类的冠状病毒(coronavirus)有 7 种,其中 Beta 冠状病毒属(beta coronavirus)有 5 种。人冠状病毒 OC43(human coronavirus OC43,HCoV-OC43)、人冠状病毒 HKU1(human coronavirus HKU1,HCoV-HKU1)感染呈现季节性特征,症状轻微。严重急性呼吸综合征冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus,SARS-CoV)、中东呼吸综合征冠状病毒(middle east respiratory syndrome coronavirus,MERS-CoV)和严重急性呼吸综合征冠状病毒 2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2,SARS-CoV-2)感染后迅速在人与人之间传播,病毒流行对公共卫生安全和国民经济造成严重威胁。核酸检测是鉴别、诊断和排查病毒感染患者的关键检测方法之一,但核酸阳性并不意味着病毒具有传染性,需要探索一种快速反应病毒复制能力的检测方法作为补充。研究证实 Beta 属冠状病毒在细胞复制过程中产生的亚基因组(subgenomic RNA,sgRNA)可以作为判断病毒活性的指标。本文对 Beta 属冠状病毒亚基因组的检测应用等进行综述,旨在建立亚基因组检测方法,优化病毒检测方式,完善实验室动物模型创建及药物疫苗有效性评价体系,助力开展实验研究。

【关键词】 Beta 属冠状病毒;亚基因组;病毒复制;检测方法

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 11-0142-07

Research progress on subgenome of beta-coronavirus

ZHANG Yaqing, QI Feifei, BAO Linlin*

(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) & Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC); NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine; Beijing Key Laboratory for Animal Models of Emerging and Reemerging Infectious; Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Critical Diseases; Key Laboratory of Human Diseases Animal Model, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Five of seven coronaviruses that cause respiratory disease in humans were beta-coronaviruses. HCoV-OC43 and HCoV-HKU1 show seasonal transmission and cause mild symptoms after infection. SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2 spread rapidly from person to person, which posed a serious threat to public health security and national economy. Nucleic acid testing is the key test to identify, diagnose and screen people infected by virus, but the positive of viral loads does not mean the virus is contagious. It is urgently to explore a rapid detecting method for virus replication as a supplement to judge virus activity. Studies have confirmed that the subgenomes produced by beta-coronaviruses during cell

【基金项目】 中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2021-I2M-1-035)。

【作者简介】 张亚青(1997—),女,硕士,研究方向:冠状病毒亚基因组检测方法的建立。E-mail: zhangyq2815@163.com

【通信作者】 鲍琳琳(1979—),女,研究员,博士生导师,研究方向:新发及再发传染病动物模型创制及比较医学的研究。

E-mail: bllmsl@aliyun.com

replication can be used as indicators for judging viral activity. This paper reviews the detection and application of subgenomes of beta-coronavirus, aiming to establish subgenome detection method, optimize virus detection method, perfect experimental animal model creation and drug or vaccine effectiveness evaluation systems and help to carry out experimental research.

【Keywords】 beta coronavirus; subgenome; virus replication; detection method

冠状病毒的传播和流行给人类带来了巨大的威胁,全球仅因 SARS-CoV-2 感染死亡的人数已超过 6000000 人,迅速判断病毒传染性在疫情防控及药物研发中具有重要意义。病毒片段或失活的病毒同样可以通过核酸检测到病毒基因组,因此核酸检测阳性并不意味着病毒具有传染性。病毒培养是目前公认判断病毒的复制能力检测方法,但病毒培养检测耗时长,需要在生物安全三级实验室中进行,对人员操作技术要求高。有研究表明冠状病毒在复制过程中产生的亚基因组可以反应病毒的复制能力。

1 亚基因组简介

1.1 亚基因组的发现

20 世纪 90 年代,研究者发现植物雀麦草花叶病毒(brome mosaic virus, BMV)可在其负链基因组 RNA 内部特定位点上启动合成一节较短的 mRNA,用于外壳蛋白的表达,这一短 mRNA 被称为亚基因组,随后在烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)感染的叶片中也检测到亚基因组的存在^[1-3]。大部分正链 RNA 病毒进入细胞开始复制时,均需产生亚基因组来作为结构蛋白和辅助蛋白合成的模板。相比于动物病毒,植物病毒基因组小,复制效率高,产生亚基因组的比例也更高,更易研究亚基因组的复制机制^[2],因而对植物病毒亚基因组合成机制的研究更为广泛。但对植物病毒亚基因组的研究通常集中在对病毒结构、转录机制以及进化关系等方向^[4-7],应用比较局限。冠状病毒子代蛋白的产生也通过合成亚基因组的策略来完成,但由于具体机制不清或应用范围较窄,近几年对于冠状病毒亚基因组的研究和应用才逐渐兴起。

1.2 亚基因组的作用

无论是植物病毒还是动物病毒产生的亚基因组,均可在作为翻译模板、调控基因复制、参与病毒重组等几个方面发挥作用。绝大多数亚基因组 RNA 在病毒复制周期中起着类似 mRNA 的翻译模板作用,但在鸡舍病毒(flock house virus, FHV)中发现,亚基因组 RNA3 产生缺陷时, FHV 病毒无法对

病毒基因组中的 RNA2 进行翻译,即亚基因组 RNA 可以调控病毒基因的复制^[8]。对大麦黄矮病毒(barley yellow dwarf virus, BYDV)的研究中也发现,其亚基因组 RNA2 (sgRNA2) 的积累可以抑制病毒 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) 的翻译从而调控 BYDV 的复制^[9]。此外,有研究表明亚基因组 RNA 会参与病毒的基因重组并使其获得新的特性^[10-11]。亚基因组在病毒复制中的作用可能并不限于以上几个方面,需要进一步探索亚基因组的作用从而对病毒的特性有更加全面的掌握。

1.3 亚基因组的产生方式

亚基因组的合成模型有内部起始模型、提前终止模型、前导启动转录模型和不连续转录模型^[1],不同的产生方式使亚基因组具有不同的结构,但其结构都相当于被截短的基因组。

(1) 内部起始模型:在合成病毒 RdRp 之后,以正链的 RNA 为模板合成全长负链 RNA,负链 RNA 用作基因组合成以及亚基因组合成的模板,因此负链 RNA 上包括两种启动子,一种位于 3' 附近,用于合成子代病毒的正链基因组 RNA,另一种位于内部,是亚基因组的启动子(subgenomic promoter, SGP)。SGP 的活性受病毒 RNA 序列和二级结构的影响。合成亚基因组时, RdRp 结合于 SGP 并直接生成正链亚基因组。Miller 等^[5]最早在 BMV 病毒中证实了内部起始模型的成立,随后发现其他植物病毒如 TMV、BYDV、大麦条纹花叶病毒(barley stripe mosaic virus, BSMV)等也通过这种方式完成亚基因组的产生^[12-13],部分正链 RNA 动物病毒如辛德毕斯病毒(sindbis virus, SV)和杯状病毒科(caliciviridae)病毒的亚基因组也通过内部起始的方式合成^[14-15]。

(2) 提前终止模型:在合成 RdRp 后,病毒在 RdRp 作用下合成负链 RNA 的过程中遇到终止信号使合成终止,产生负链亚基因组,再以此为模板合成正链亚基因组,而不将正链基因组转至全长负链。此模型的另一种机制为 RdRp 合成全长负链后,在以负链为模板合成亚基因组的过程中遇到终

止信号使合成终止。研究表明环曲病毒属 (toroviruses)、乙型野田村病毒属 (betanodaviruses) 等病毒采用提前终止的方法合成亚基因组^[16-17]。

(3) 前导启动转录模型: 合成全长负链后, 以负链为模板合成亚基因组, 遇到 5' 前导序列之后的前导转录调控序列 (leader-transcription regulating sequences, TRS-L) 后停止, 跳跃至目的亚基因组上游的体转录调控序列 (body-transcription regulating sequences, TRS-B), 然后沿着 5' -3' 的方向继续合成亚基因组^[1]。

(4) 不连续转录模型: 与前导启动转录模型的区别在于不连续转录模型不生成全长负链, 而是直接利用正链基因组合成负链亚基因组, 合成过程中遇到目的亚基因组上游的 TRS-B 时暂停, TRS-B 促进负链 RNA 向 5' 端的 TRS-L 移位从而促进负链亚基因组的合成^[11,18], 再以此为模板合成正链亚基因组。

前导启动转录模型和不连续转录模型的关键是病毒基因组中的转录调控序列 (transcription regulating sequences, TRS), 这两种模型最初被提出用于解释套式病毒目 (nidovirales) 下病毒的亚基因组的产生, 但随着研究的不断深入, 研究者普遍认为套式病毒目下病毒通过不连续转录模型完成亚基因组的合成^[11,19]。

上述 4 种被广泛认可的模型大多产生具有相同 3' 末端的亚基因组, 通过产生亚基因组来完成子代病毒复制的策略可能是由于病毒的大小有限, 基因的表达需要与其他基因共享顺式作用元件^[2], 这一策略也实现了病毒基因在数量和时间上的差异表达^[1]。冠状病毒在分类地位中为套式病毒目下成员, 其亚基因组的合成也是通过不连续转录来完成的。

2 Beta 属冠状病毒及其亚基因组

Beta 冠状病毒属与 Alpha 冠状病毒属 (alpha coronavirus)、Gamma 冠状病毒属 (gamma coronavirus) 同属于套式病毒目下冠状病毒科 (coronaviridae) 冠状病毒亚科 (coronavirinae)。已知可以感染人类并引起呼吸道疾病的 7 种冠状病毒中, 有 5 种属于 Beta 冠状病毒属: HCoV-OC43、HCoV-HKU、SARS-CoV、MERS-CoV 和 SARS-CoV-2^[20-21]。HCoV-OC43、HCoV-HKU1 感染主要引起常见的自限性上呼吸道疾病, SARS-CoV、MERS-CoV

和 SARS-CoV-2 的感染可发展为严重的、甚至危及生命的呼吸道疾病和肺部损伤^[22]。Beta 冠状病毒属成员均为单正链 RNA 病毒, 病毒颗粒中的核衣壳蛋白 (nucleocapsid protein, N) 形成的螺旋衣壳与基因组 RNA 组成复合体, 其外包被囊膜, 囊膜上的主要蛋白有纤突蛋白 (spike, S)、膜蛋白 (membrane, M) 和包膜蛋白 (envelope, E)。

冠状病毒是已知的 RNA 病毒中基因组最大的病毒, 病毒 5' 非翻译区 (untranslated region, UTR) 之后的开放阅读区 1ab (open reading frame 1ab, ORF1ab) 占据了基因组将近 2/3 的长度, ORF1ab 下游为结构蛋白、辅助蛋白合成相关的基因组, 基因组的末端为 3' UTR。研究表明所有冠状病毒的基因组都具有 5'-复制酶-S-E-M-N-3' 这样一段固定的结构^[23]。

冠状病毒与宿主细胞膜结合进入细胞后, 以正链基因组 RNA 为模板, 依赖宿主中的酶对 ORF1a 和 ORF1ab 进行翻译, 产生 pp1a 和 pp1ab 这两个大的多肽, 剪切拼接后形成病毒的复制酶蛋白。正链基因组在复制酶的作用下产生全长负链基因组, 并以此作为子代基因组合成的模板。子代病毒的产生还需要结构蛋白和辅助蛋白的作用, 但与复制酶蛋白不同的是, 结构蛋白和辅助蛋白的合成以亚基因组为模板。包括 Beta 冠状病毒属在内的所有套式病毒目下的病毒都采用“不连续转录模型”完成亚基因组的合成^[24]。

冠状病毒正链亚基因组主要由 5' 前导序列、TRS 和目的蛋白基因到 3' polyA 尾的序列三部分组成。研究已经证实冠状病毒 mRNA 的翻译依赖于 5' 端的帽结构^[25], 且 5' 前导序列可以保护亚基因组序列, 有利于病毒亚基因组和相关蛋白的积累^[26-27]。TRS 是亚基因组不连续合成时跳跃的关键位点, 由核心序列、5' 和 3' 的侧翼序列三部分构成^[28], 其中最关键的是核心序列, 核心序列是一段高度保守的序列, SARS-CoV 与 SARS-CoV-2 的核心序列均为 5'-ACGAAC-3'^[29-31], MERS-CoV 的核心序列为 5'-AACGAA-3'^[32], HCoV-OC43 和 HCoV-HKU1 的核心序列为七聚体 5'-UCUAAAC-3'^[21]。除了最小的亚基因组外, 其余的亚基因组都包含多个开放阅读框 (open reading frame, ORF), 但在翻译时只有靠近 5' 端的 ORF 被翻译。因此, 尽管大多数亚基因组在结构上是多顺反子, 但在功能上是单顺反子^[1]。除了作为翻译模板外, 目前并未发现冠

状病毒亚基因组在其他调控病毒基因复制等方面的作用。

冠状病毒在包装成子代颗粒时选择性的包装 RNA 分子,对于基因组 RNA 的选择是通过一种指定选择性包装的 RNA 元件来实现的,但在亚基因组 RNA 中没有发现这种元件,因此亚基因组 RNA 不会被整合到成熟的病毒颗粒中^[24]。

3 Beta 冠状病毒亚基因组的检测

此前关于动物病毒亚基因组的研究主要针对黄病毒属 (flavivirus)、丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 和戊型肝炎病毒 (hepatitis E virus, HEV) 等,且大部分的研究集中在亚基因组相关的分子机制^[33-34]、药物对亚基因组的作用^[35]等方面,很少应用于复制能力检测。SARS-CoV-2 爆发后,核酸检测无法准确反应病毒活性,而病毒培养需要在高等级生物安全实验室进行且等待结果时间长,对于亚基因组的检测可以快速、灵敏分析病毒活性,逐渐成为研究热点。

研究者已通过测序等手段证实了 SARS-CoV-2 亚基因组的存在。Kim 等^[36]通过边合成边测序技术 (sequencing by synthesis, SBS) 和基于纳米孔的直接 RNA 测序 (nanopore-based direct RNA sequencing, DRS) 两种互补的方法测定了 SARS-CoV-2 的基因组和亚基因组,证实了 SARS-CoV-2 使用 TRS 介导的模板转换机制进行不连续转录来产生亚基因组。结果显示, SARS-CoV-2 可以产生 9 种不同的亚基因组,其中 N 亚基因组是表达最丰富的转录本,其次是 S、ORF 7a、ORF 3a、ORF 8、M、E、ORF 6 和 ORF 7b。Doddapaneni 等^[37]研究表明,通过捕获富集的方法,无需进行培养就可以从患者样本中获得全长基因组和亚基因组读数。

亚基因组的检测与病毒培养之间的相关性已经得到证实。Kim 等^[38]对 20 个 COVID-19 患者的 189 个样本进行病毒载量以及亚基因组检测,并进行细胞培养。结果显示病毒培养阳性和亚基因组检测阳性的平均持续时间分别为出现症状后 (11.39±10.34) d 和 (13.75±11.22) d ($P<0.437$),而病毒载量阳性平均持续时间为出现症状后 (22.85±11.83) d ($P<0.001$),与病毒培养结果之间有显著统计学差异,从而提示病毒亚基因组检测特异性强于病毒载量的检测。Perera 等^[39]收集了新冠感染患者感染后 70 d 内的上呼吸道样本进行检

测,结果显示样本亚基因组的检测阳性和病毒培养结果阳性持续时间一致,表明亚基因组结果与病毒培养具有高度的相关性,可以通过检测亚基因组快速判断病毒活性。Dagotto 等^[40]对感染 SARS-CoV-2 的恒河猴的病毒载量以及亚基因组进行连续监测,结果显示,对病毒载量的检测无法区分输入的病毒和体内新复制合成的病毒,而对于亚基因组的检测更适合测定体内活跃复制的病毒。

亚基因组的常规检测可以通过微滴式数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR) 进行。Oranger 等^[41]建立了通过 ddPCR 测定 SARS-CoV-2 N、S 亚基因组的方法。ddPCR 是第三代 PCR 技术,灵敏度高、特异性强,不依赖于标准曲线和内参基因就可以对目的片段进行绝对定量,但检测成本较高,不适用于快速大批量的检测。实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 技术成熟稳定、结果可靠、灵敏度和特异性也较高,通过 RT-qPCR 检测亚基因组是目前大多数研究中使用的方法。Wölfel 等^[29]最先建立了 RT-qPCR 检测 SARS-CoV-2 亚基因组的方法,研究者收集了新冠感染初期患者痰液、唾液和粪便标本对标本中亚基因组复制情况进行检测,结果显示痰液标本中亚基因组复制明显,从而推测在感染初期病毒主要在上呼吸道进行复制。

4 亚基因组检测的应用

亚基因组是病毒进入细胞开始复制时才产生的,且亚基因组检测与病毒培养结果具有高度的相关性,所以亚基因组成为判断活病毒复制能力的检测指标之一。SARS-CoV-2 大流行的情况下,对于新冠病毒亚基因组的检测被广泛开发,目前新冠病毒亚基因组检测已经应用于样本检测、动物模型评价、药物/疫苗有效性评价等多个方面^[42-43]。

4.1 亚基因组检测在临床检测中的应用

Casagrande 等^[44]对新冠死亡患者的角膜进行病毒载量、亚基因组检测以及免疫组化等研究,从而评价角膜移植时 SARS-CoV-2 传染的可能性。Truong 等^[45]研究免疫功能低下的人群感染 SARS-CoV-2 后病毒亚基因组的变化,以判断病毒传染性的变化。亚基因组检测与病毒活性高度相关,临床上可与病毒载量等指标结合判断患者体内病毒复制情况,助力研究者深入分析病毒感染人体后的复制情况,从而帮助改进隔离政策、缓解资源紧张。

4.2 亚基因组检测在动物模型中的应用

已有研究者在动物模型评价中通过亚基因组的检测来判断病毒复制情况。Haddock 等^[46]研究猪对新冠病毒的易感性实验中,发现个别样本中有核酸阳性的情况,但亚基因组的检测均为阴性,说明偶有的核酸阳性为病毒核酸片段残留,结合病理证实了 3 周龄的“约克猪”不是新冠的易感动物。Falach 等^[47]研究肺损伤是否影响 CD-1 小鼠对 SARS-CoV-2 易感性时,检测分析不同组别小鼠肺组织的病毒载量、亚基因组含量等指标,证实了预先造成肺损伤会使 CD-1 小鼠对 SARS-CoV-2 敏感,表现出严重的肺部损伤和高死亡率。另外,Carroll 等^[48]利用仓鼠模型评价 SARS-CoV-2 突变株 B. 1. 427/1. 429 与 B. 1 的致病力差异时,也通过检测咽拭子的亚基因组来评价病毒的复制能力。

动物模型是探索新冠病毒病理学、免疫学、传播途径和发病机制的重要一环,也是疫苗和药物从实验室走向临床中不可或缺的一部分,对于疫情防控有着重要意义。通过亚基因组检测与病毒载量、病理图片等结果综合分析,可以更好的判断病毒在动物体内复制情况,完善实验室动物模型评价体系,助力疫情防控工作。

4.3 亚基因组检测在药物/疫苗有效性评价中的应用

亚基因组的检测也被应用于药物、疫苗有效性评价中。截至 2022 年 3 月 2 日,共 10 种新冠疫苗列入世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 发布的紧急使用清单中^[49],其中 Moderna mRNA-1273 和 ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) 两种疫苗前期对动物保护作用的研究中,研究者通过检测支气管肺泡灌洗液或肺组织样品中病毒亚基因组以评价病毒复制能力^[50-52]。评价 mRNA BNT162b2 疫苗完全接种后对 SARS-CoV-2 感染的保护作用时,采集人员鼻咽拭子和唾液样品并进行病毒基因组和亚基因组病毒 RNA 检测^[53]。此外,样本中亚基因组检测也用于反应抗体 DH1052、瑞德西韦等^[54-55]是否可以抑制新冠病毒的复制。

Sia 等^[56]研究证明了病毒高载量与具备传染性之间没有必然联系,因此仅通过检测病毒载量无法准确判断病毒复制能力,也就无法准确衡量药物或疫苗治疗效果,通过亚基因组检测可以提高活病毒的检出率,从而有助于判断药物疫苗治疗对病毒复制的抑制效果,完善实验室药物、疫苗评价体系,助

力药物、疫苗开发工作。

5 总结与展望

SARS-CoV-2 已持续流行 2 年,未来一段时间内也将与人类共存。控制 2019 冠状病毒病 (coronavirus disease 2019, COVID-19) 大流行的一种有效策略是开发快速识别和隔离 SARS-CoV-2 感染者的高精度方法。研究者们利用多种技术检测其亚基因组以便于快速判断病毒活性,对于疫情防控有着积极意义。未来可以尝试利用反转录重组聚合酶介导恒温扩增技术 (reverse transcription recombination add amplification, RT-RAA) 快速扩增,并与侧向流试纸条结合 (lateral flow dipstick, LFD) 使结果可视化,开发可行的 SARS-CoV-2 亚基因组快速诊断方法对于节约资源和改进隔离政策将发挥重要作用。

此外,病毒的亚基因组不仅是蛋白合成的模板,还在病毒复制和重组中发挥一定作用,可以作为抗病毒的潜在作用靶点。亚基因组检测的发展需要继续对亚基因组产生的机制进行更为深入的研究,目前对于 Beta 属冠状病毒亚基因组产生过程中涉及到的长距离 RNA-RNA 相互作用的元件、亚基因组的代谢周期及其在病毒感染和发病机制中的各种作用尚有待阐明。亚基因组的检测可以深入探索相关分子机制,有利于制定有效的病毒预防策略,同时可以完善实验室动物模型创建及药物疫苗有效性评价体系,助力研究者快速高效开展实验研究,对于疫情防控有着重要意义。

参考文献:

- [1] Sztuba-Solińska J, Stollar V, Bujarski JJ. Subgenomic messenger RNAs: mastering regulation of (+)-strand RNA virus life cycle [J]. Virology, 2011, 412(2): 245-255.
- [2] Miller WA, Koev G. Synthesis of subgenomic RNAs by positive-strand RNA viruses [J]. Virology, 2000, 273(1): 1-8.
- [3] French R, Ahlquist P. Characterization and engineering of sequences controlling *in vivo* synthesis of brome mosaic virus subgenomic RNA [J]. J Virol, 1988, 62(7): 2411-2420.
- [4] Jackson AO, Dawson JRO, Covey SN, et al. Sequence relations and coding properties of a subgenomic RNA isolated from barley stripe mosaic virus [J]. Virology, 1983, 127(1): 37-44.
- [5] Miller WA, Dreher TW, Hall TC. Synthesis of brome mosaic virus subgenomic RNA *in vitro* by internal initiation on (-)-sense genomic RNA [J]. Nature, 1985, 313(5997): 68-70.
- [6] Kanodia P, Miller WA. Effects of the noncoding subgenomic RNA of red clover necrotic mosaic virus in virus infection [J]. J

- Virology, 2022, 96(3): e0181521.
- [7] Campbell AJ, Anderson JR, Wilusz J. A plant-infecting subviral RNA associated with polioviruses produces a subgenomic RNA which resists exonuclease XRN1 *in vitro* [J]. Virology, 2022, 566: 1–8.
 - [8] Eckerle LD, Ball LA. Replication of the RNA segments of a bipartite viral genome is coordinated by a transactivating subgenomic RNA [J]. Virology, 2002, 296(1): 165–176.
 - [9] Shen R, Miller WA. Subgenomic RNA as a riboregulator: negative regulation of RNA replication by Barley yellow dwarf virus subgenomic RNA 2 [J]. Virology, 2004, 327(2): 196–205.
 - [10] Bull RA, Hansman GS, Clancy LE, et al. Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap [J]. Emerg Infect Dis, 2005, 11(7): 1079–1085.
 - [11] Pasternak AO, Van Den Born E, Spaan WJ, et al. Sequence requirements for RNA strand transfer during nidovirus discontinuous subgenomic RNA synthesis [J]. EMBO J, 2001, 20(24): 7220–7228.
 - [12] Koev G, Miller WA. A positive-strand RNA virus with three very different subgenomic RNA promoters [J]. J Virol, 2000, 74(13): 5988–5996.
 - [13] Johnson JA, Bragg JN, Lawrence DM, et al. Sequence elements controlling expression of Barley stripe mosaic virus subgenomic RNAs *in vivo* [J]. Virology, 2003, 313(1): 66–80.
 - [14] Hertz JM, Huang HV. Evolution of the Sindbis virus subgenomic mRNA promoter in cultured cells [J]. J Virol, 1995, 69(12): 7768–7774.
 - [15] Morales M, Bárcena J, Ramírez Ma, et al. Synthesis *in vitro* of Rabbit hemorrhagic disease virus subgenomic RNA by internal initiation on (–) sense genomic RNA [J]. 2004, 279(17): 17013–17018.
 - [16] Van Vliet ALW, Smits SL, Rottier PJM, et al. Discontinuous and non-discontinuous subgenomic RNA transcription in a nidovirus [J]. EMBO J, 2002, 21(23): 6571–6580.
 - [17] Iwamoto T, Mise K, Takeda A, et al. Characterization of Striped jack nervous necrosis virus subgenomic RNA3 and biological activities of its encoded protein B2 [J]. J General Virol, 2005, 86(10): 2807–2816.
 - [18] Zúñiga S, Sola I, Alonso S, et al. Sequence motifs involved in the regulation of discontinuous coronavirus subgenomic RNA synthesis [J]. J Virol, 2004, 78(2): 980–994.
 - [19] Sawicki SG, Sawicki DL. Coronavirus transcription; a perspective [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2005, 287: 31–55.
 - [20] Corman VM, Muth D, Niemeyer D, et al. Hosts and sources of endemic human coronaviruses [J]. Adv Virus Res, 2018, 100: 163–188.
 - [21] Liu DX, Liang JQ, Fung TS. Human coronavirus-229E, -OC43, -NL63, and -HKU1 (Coronaviridae) [J]. Encyclopedia Virol, 2021: 428–440.
 - [22] V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2 [J]. Nat Rev Microbiol, 2021, 19(3): 155–170.
 - [23] De Haan CM, Volders H, Koetzner CA, et al. Coronaviruses maintain viability despite dramatic rearrangements of the strictly conserved genome organization [J]. J Virol, 2002, 76(24): 12491–12502.
 - [24] Masters PS. The molecular biology of coronaviruses [J]. Adv Virus Res, 2006, 66: 193–292.
 - [25] Nakagawa K, Lokugamage KG, Makino S. Viral and cellular mRNA translation in coronavirus-infected cells [J]. Adv Virus Res, 2016, 96: 165–192.
 - [26] Huang C, Lokugamage KG, Rozovics JM, et al. SARS coronavirus nsp1 protein induces template-dependent endonucleolytic cleavage of mRNAs; viral mRNAs are resistant to nsp1-induced RNA cleavage [J]. PLoS Pathog, 2011, 7(12): e1002433.
 - [27] Sola I, Almazán F, Zúñiga S, et al. Continuous and discontinuous RNA synthesis in coronaviruses [J]. Annu Rev Virol, 2015, 2(1): 265–288.
 - [28] Alonso SIA, Sola I, Enjuanes L. Transcription regulatory sequences and mRNA expression levels in the coronavirus transmissible gastroenteritis virus [J]. J Virol, 2002, 76(3): 1293–1308.
 - [29] Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019 [J]. Nature, 2020, 581(7809): 465–469.
 - [30] Hussain S, Pan JA, Chen Y, et al. Identification of novel subgenomic RNAs and noncanonical transcription initiation signals of severe acute respiratory syndrome coronavirus [J]. J Virol, 2005, 79(9): 5288–5295.
 - [31] Brant AC, Tian W, Majerick V, et al. SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication [J]. Cell Biosci, 2021, 11(1): 136.
 - [32] Corman VM, Ithete NL, Richards LR, et al. Rooting the phylogenetic tree of middle East respiratory syndrome coronavirus by characterization of a conspecific virus from an African bat [J]. J Virol, 2014, 88(19): 11297–11303.
 - [33] Ding Q, Nimgaonkar I, Archer NF, et al. Identification of the intragenomic promoter controlling Hepatitis E virus subgenomic RNA transcription [J]. mBio, 2018, 9(3): e00769–00718.
 - [34] Finol E, Ooi EE. Evolution of subgenomic RNA shapes Dengue virus adaptation and epidemiological fitness [J]. iScience, 2019, 16: 94–105.
 - [35] Oo A, Rausalu K, Merits A, et al. Deciphering the potential of baicalin as an antiviral agent for Chikungunya virus infection [J]. Antiviral Res, 2018, 150: 101–111.
 - [36] Kim D, Lee JY, Yang JS, et al. The architecture of SARS-CoV-2 transcriptome [J]. Cell, 2020, 181(4): 914–921.
 - [37] Doddapaneni H, Cregeen SJ, Sugang R, et al. Oligonucleotide capture sequencing of the SARS-CoV-2 genome and subgenomic fragments from COVID-19 individuals [J]. PLoS One, 2021, 16(8): e0244468.

- [38] Kim JY, Bae JY, Bae S, et al. Diagnostic usefulness of subgenomic RNA detection of viable SARS-CoV-2 in patients with COVID-19 [J]. Clin Microbiol Infect, 2022, 28(1): 101–106.
- [39] Perera Ra PM, Tso E, Tsang OTY, et al. SARS-CoV-2 virus culture and subgenomic RNA for respiratory specimens from patients with mild coronavirus disease [J]. Emerg Infect Dis, 2020, 26(11): 2701–2704.
- [40] Dagotto G, Mercado NB, Martinez DR, et al. Comparison of subgenomic and total RNA in SARS-CoV-2 challenged rhesus macaques [J]. J Virol, 2021, 95(8): e02370–02320.
- [41] Oranger A, Manzari C, Chiara M, et al. Accurate detection and quantification of SARS-CoV-2 genomic and subgenomic mRNAs by ddPCR and meta-transcriptomics analysis [J]. Commun Biol, 2021, 4(1): 1215.
- [42] Yang J, Wang W, Chen Z, et al. A vaccine targeting the RBD of the S protein of SARS-CoV-2 induces protective immunity [J]. Nature, 2020, 586(7830): 572–577.
- [43] Yu J, Tostanoski LH, Peter L, et al. DNA vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques [J]. Science, 2020, 369(6505): 806–811.
- [44] Casagrande M, Fitzek A, Spitzer MS, et al. Presence of SARS-CoV-2 RNA in the cornea of viremic patients With COVID-19 [J]. JAMA Ophthalmol, 2021, 139(4): 383–388.
- [45] Truong TT, Ryutov A, Pandey U, et al. Increased viral variants in children and young adults with impaired humoral immunity and persistent SARS-CoV-2 infection: a consecutive case series [J]. EBioMedicine, 2021, 67: 103355.
- [46] Haddock E, Callison J, Seifert SN, et al. Three-week old pigs are not susceptible to productive infection with SARS-COV-2 [J]. Microorganisms, 2022, 10(2): 407.
- [47] Falach R, Bar-On L, Lazar S, et al. Mice with induced pulmonary morbidities display severe lung inflammation and mortality following exposure to SARS-CoV-2 [J]. JCI Insight, 2021, 6(12): e145916.
- [48] Carroll T, Fox D, Van Doremalen N, et al. The B. 1. 427/1. 429 (epsilon) SARS-CoV-2 variants are more virulent than ancestral B. 1 (614G) in Syrian hamsters [J]. PLoS Pathog, 2022, 18(2): e1009914.
- [49] Status of COVID-19 vaccines within WHO EUL/PQ evaluation process [EB/OL]. [2022-04-02]. https://extranet.who.int/pqweb/sites/default/files/documents/Status_COVID_VAX_02April2022.pdf.
- [50] Fischer RJ, Van Doremalen N, Adney DR, et al. ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) protects Syrian hamsters against SARS-CoV-2 B. 1. 351 and B. 1. 1. 7 [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 5868.
- [51] Van Doremalen N, Lambe T, Spencer A, et al. ChAdOx1 nCoV-19 vaccine prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques [J]. Nature, 2020, 586(7830): 578–582.
- [52] Corbett KS, Werner AP, Connell SO, et al. mRNA-1273 protects against SARS-CoV-2 beta infection in nonhuman primates [J]. Nat Immunol, 2021, 22(10): 1306–1315.
- [53] Deiana M, Mori A, Piubelli C, et al. Impact of full vaccination with mRNA BNT162b2 on SARS-CoV-2 infection: genomic and subgenomic viral RNAs detection in nasopharyngeal swab and saliva of health care workers [J]. Microorganisms, 2021, 9(8): 1738.
- [54] Li D, Edwards RJ, Manne K, et al. In vitro and in vivo functions of SARS-CoV-2 infection-enhancing and neutralizing antibodies [J]. Cell, 2021, 184(16): 4203–4219.
- [55] Boshier FT, Pang J, Penner J, et al. Evolution of viral variants in remdesivir-treated and untreated SARS-CoV-2-infected pediatrics patients [J]. J Med Virol, 2022, 94(1): 161–172.
- [56] Sia SF, Yan LM, Chin AWH, et al. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters [J]. Nature, 2020, 583(7818): 834–838.

[收稿日期]2022-04-20