

酵母 $PHO8$ 与 $PHO13$ 双基因缺失酵母菌株构建

崔晓静^{1,2}, 杨晓迪^{1,2}, 袁 頔³, 王俊芳⁴, 崔红晶^{1,4*} (广东医科大学 1. 医学分子诊断重点实验室衰老研究所; 2. 医学技术学院; 3. 第二临床医学; 4. 基础医学院, 广东东莞 523808)

摘 要: 目的 构建碱性磷酸酶 $PHO8$ 与 $PHO13$ 双基因缺失酵母菌株。方法 依据基因同源重组原理, 采用一步基因置换法构建编码Pho8蛋白N端60个氨基酸残基(包括跨膜结构域)缺失的 $PHO8$ 基因缺失酵母($pho8\Delta60$)菌株; 线性化载体pRS303- $pho13$ -ko转化 $pho8\Delta60$ 菌株, 进一步缺失 $PHO13$ 基因, 构建 $pho8\Delta60$ 和 $PHO13$ 双基因缺失($pho8\Delta60pho13\Delta$)菌株; 通过缺陷型培养基筛选方法, PCR鉴定阳性克隆基因组DNA。结果 $pho8\Delta60$ 菌株电泳条带为1 151 bp和180 bp, $pho8\Delta60pho13\Delta$ 菌株电泳条带分别为1 872 bp和174 bp。结论 成功构建 $pho8\Delta60pho13\Delta$ 酵母菌株。

关键词: 酿酒酵母; 碱性磷酸酶; 自噬; 衰老

中图分类号: Q 255

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610 (2023) 01-0007-05

Construction of yeast strains with double-gene deletion of $PHO8$ and $PHO13$

CUI Xiao-jing^{1,2}, YANG Xiao-di^{1,2}, YUAN Di³, WANG Jun-fang⁴, CUI Hong-jing^{1,4*} (1.The Key Laboratory of Medical Molecular Diagnostics, Institute of Aging Research; 2.College of Medical Technology; 3.The Second School of Clinical Medicine; 4.School of Basic Medicine, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China)

Abstract: Objective To construct a yeast strain with double-gene deletion of alkaline phosphatase $PHO8$ and $PHO13$. Methods According to the principle of gene homologous recombination, the encoding sequences of the N-terminal 60 amino acid residues (including the transmembrane domain) of Pho8 protein was deleted by one-step gene disruption, resulting that $PHO8$ deletion ($pho8\Delta60$) strain was established. The double-gene deletion ($pho8\Delta60pho13\Delta$) strain was established from the linear vector pRS303- $pho13$ -ko transforming into the $pho8\Delta60$ strain, resulting that the $PHO13$ gene was further deleted in the $pho8\Delta60$ strain. PCR was used to identify the genomic DNA of the positive clones from the defective medium. Results The 1 151 bp and 180 bp bands were detected by agarose gel electrophoresis from the PCR products of the genomic DNA in the $pho8$ strain, and 1 872 bp and 174 bp bands were detected in the $pho8\Delta60pho13\Delta$ strain. Conclusion The yeast strain with double gene deletion of $PHO8$ and $PHO13$ $pho8\Delta60pho13\Delta$ was successfully constructed.

Key words: saccharomyces cerevisiae; alkaline phosphatase; autophagy; aging

自噬作为细胞内的“清道夫”, 是一种高度保守的细胞内的细胞自身分解代谢过程, 降解衰老或损伤的细胞器、蛋白质等细胞成分, 以维持细胞内物质和能量的稳态, 促进细胞器的更新。自噬在肿瘤、癌症、炎症性疾病和某些类型的神经退行性疾病的发生和发展中具有重要作用^[1]。此外, 自噬在细胞衰老和寿命调节过程中的作用也日益受到关注^[2]。单细胞真核生物酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)成为研究自噬机制的首选模型系统^[3], 在发现自噬相关基因作为自噬的中

心调节剂和执行者方面发挥了开创性作用。酵母细胞中碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)由 $PHO8$ 和 $PHO13$ 结构基因编码^[4]。通过测定ALP活性研究非选择性细胞自噬水平是目前相对精确的定量方法^[5]。为进一步研究细胞自噬水平, 本文主要通过DNA同源重组技术构建Pho8蛋白N端60个氨基酸残基(包括跨膜结构域)缺失的 $PHO8$ 基因缺失酵母($pho8\Delta60$)菌株, 然后进一步构建 $PHO8$ 与 $PHO13$ 双基因缺失酵母菌株, 为检测酵母细胞发生自噬后的ALP活性奠定了

收稿日期: 2022-10-21

基金项目: 国家自然科学基金(31701050, 81971329), 广东省自然科学基金(2022A1515010816), 广东省医学科研基金(A2022368), 广东医科大学博士启动项目(B2017014), 国家级大学生创新创业训练计划项目(20201057009)

作者简介: 崔晓静(1997-), 女, 在读硕士研究生, E-mail: xiao20200424@163.com

通信作者: 崔红晶(1979-), 女, 博士, 副研究员, 硕士生导师, E-mail: cjingjing@126.com

基础。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

酿酒酵母 BY4742 (MAT α *his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0*)、感受态大肠杆菌、载体pRS303 和pRS306 为实验室保存, pRS303 和pRS306 均为低拷贝穿梭载体, 在大肠杆菌中具有氨苄青霉素抗性, 分别带有His3 和Ura3 营养筛选标签。

1.2 试剂和引物

Easy Taq DNA 聚合酶(货号: AP111-01) 购自北京全式金生物技术有限公司, T4 DNA 连接酶和限制性内切酶均购自TaKaRa 公司。引物由生工生物工程股份有限公司合成(表 1)。酵母提取物(货号: LP0021)和胰蛋白胨(货号: LP0042)购自广州威佳科技有限公司。SD 培养基(货号: 630411 和 630412)和限制性氨基酸(货号: 630414)均购自Clontech 公司。

1.3 方法

1.3.1 *pho8 Δ 60* 缺失酵母菌株的构建和验证^[6] 依据基因同源重组原理, 采用一步基因置换法构建基因缺失菌株^[7]。利用PCR 技术, 以质粒pRS306 为模板, *pho8 Δ 60-box-F* 和*pho8 Δ 60-box-R* 为引物, 采用TransTaqTM HiFi DNA 聚合酶, 反应体系按照试剂说明书进行, PCR 反应条件为94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 33 个循环; 72 °C 5 min, 扩增产物为破坏元件(含Ura3 编码序列)。PCR 产物回收纯化后, 用醋酸锂方法转化野生型酵母BY4742, 利用Ura3 缺陷型培养平板筛选阳性克隆。以阳性克隆基因组DNA 为模版, *pho8 Δ 60-RT-F* 和*pho8 Δ 60-RT-R* 为引物, 采用Easy Taq DNA 聚合酶, 反应体系按照试剂说明书进行, 反应体系同上, PCR 方法验证*pho8 Δ 60* 基

因缺失酵母菌株。

1.3.2 *PHO13* 基因缺失载体的构建和验证^[8] 以野生型酵母细胞BY4742 基因组DNA 为模板, *PHO13-N-F/R* 和*PHO13-C-F/R* 为引物, 扩增酵母*PHO13* 基因开放阅读框两侧片段, 分别命名为N 片段和C 片段。采用TransTaqTM HiFi DNA 聚合酶, 反应体系按照试剂说明书进行。PCR 反应条件为: 94 °C, 5 min; 94 °C, 30 s、58 °C, 30 s、72 °C, 30 s, 33 个循环; 72 °C, 5 min, 电泳检测扩增情况。PCR 产物回收纯化后, N 片段进行*Mlu I* 和*BamH I* 双酶切, C 片段进行*Mlu I* 和*Xho I* 双酶切, 酶切产物回收纯化。连接反应: 连接体系按照试剂说明书进行, 反应体系中骨架载体pRS303 为100 ng (*BamH I* 和*Xho I* 双酶切), N 片段(*BamH I* 和*Mlu I* 双酶切)和C 片段(*Mlu I* 和*Xho I* 双酶切)各为300 ng。连接反应条件为: 16 °C, 4 h, 4 °C 过夜。取8 μ L 连接产物转化大肠杆菌感受态细胞, 挑取单克隆摇菌, 提质粒, 酶切鉴定。

1.3.3 基因缺失载体的转化与菌株验证^[9-10] 限制性内切酶*Mlu I* 酶切重组载体pRS303-*pho13-ko*, 产物回收纯化后, 采用醋酸锂方法将5 μ g 线性化载体转化酵母*pho8 Δ 60* 菌株。用His 营养缺陷型培养基筛选阳性克隆。PCR 鉴定阳性克隆基因组DNA, 采用Easy Taq DNA 聚合酶, 鉴定引物第1 组为pRS303 内部筛选标签引物Amp-int-F 和*PHO13* 下游300 bp 范围内的引物*PHO13-R*, 第2 组为*PHO13* 基因内部鉴定引物*PHO13-RT-F* 和*PHO13-RT-R*, 反应体系和反应条件参照说明书进行。

2 结果

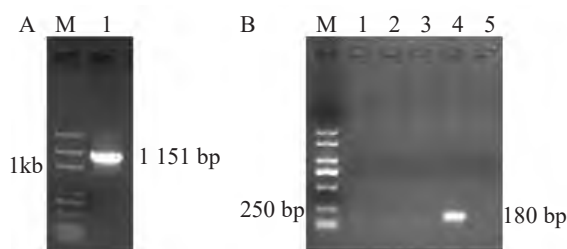
2.1 酵母*pho8 Δ 60* 缺失菌株的验证

通过一步基因置换法构建*pho8 Δ 60* 酵母菌株。

表1 本实验所用引物序列

引物名称	DNA 序列(5'-3')
<i>pho8Δ60-box-F</i>	TATCAGCATACGGACATTATTTGAACGCGCATTAGCAGCAGATTGTACTGAGAGTGCAC
<i>pho8Δ60-box-R</i>	TCACGAAGAATATGACATTCTTCTTCTGTGTGATGCAGACTGTGCGGTATTTCACACCG
<i>pho8Δ60-RT-F</i>	ATGATGACTCACACATTACC
<i>pho8Δ60-RT-R</i>	ACGTAATGCAAACTGCTTG
<i>PHO13-C-F</i>	CTGCTCGAGAGGAGCAATGCAAAATCTAG (<i>Xho I</i>)
<i>PHO13-C-R</i>	CCGACGCGTATCTTACCGAATTAGACAAT (<i>Mlu I</i>)
<i>PHO13-N-F</i>	CAGACGCGTGGTTCCGATTACTTAACCT (<i>Mlu I</i>)
<i>PHO13-N-R</i>	CCGGGATCCTTTCCCGAGTTGTATATTCT (<i>BamH I</i>)
<i>PHO13-R</i>	AGTGGACGATAAAGACGA
Amp-int-F	ACAGGCATCGTGGTGTAC
<i>PHO13-RT-F</i>	AACTCTACCAAGTCCCGT
<i>PHO13-RT-R</i>	ACCAATACCGCTTTCTCC

图 1 A 为含有 URA3 营养缺陷基因的 *PHO8* 基因破坏元件,大小为 1 151 bp,与预期大小相符;图 1 B 为 PCR 方法验证阳性克隆菌株的电泳图。引物 *pho8*Δ60-box-F 和 *pho8*Δ60-box-R 扩增 *PHO8* 基因 N 端 60 个氨基酸编码序列,即 180 bp。BY4742 条带大小为 180 bp, *pho8*Δ60 条带大小为 0 bp,与预期大小相符。实验结果提示 BY4742 *pho8* Δ60::URA3 (*pho8*Δ60) 菌株构建成功。

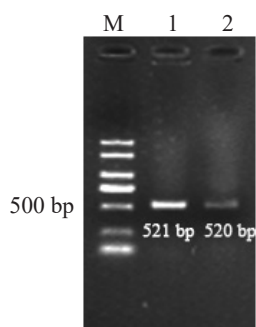


A 为 *PHO8* 基因破坏元件扩增结果, M: DNA marker; 1: 破坏元件。B 为验证 *pho8*Δ60 菌株和野生型菌株的电泳图, M: DNA marker; 泳道 1、2、3: PCR 扩增 3 个阳性克隆 *PHO8* 基因 N 末端 60 个氨基酸编码序列,模板来自 *pho8*Δ60 菌株基因组 DNA; 泳道 4: PCR 扩增 *PHO8* 基因 N 末端 60 个氨基酸编码序列,模板来自野生型酵母基因组 DNA; 泳道 5: 水为阴性对照

图 1 酵母 *pho8*Δ60 缺失菌株的验证

2.2 *PHO13* 基因开放阅读框外侧片段扩增结果

以 *PHO13*-N-F 和 *PHO13*-N-R 为引物,扩增酵母 *PHO13* 基因开放阅读框外侧 N 端片段,命名为 N 片段 (520 bp); 以 *PHO13*-C-F 和 *PHO13*-C-R 为引物,扩增酵母 *PHO13* 基因开放阅读框外侧 C 端片段,命名为 C 片段 (521 bp); PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,与预期大小一致(图 2)。



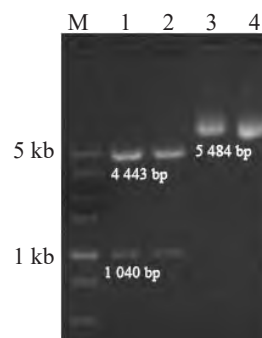
M: DNA marker; 泳道 1: C 片段; 泳道 2: N 片段

图 2 *PHO13* 基因开放阅读框外侧片段扩增结果

2.3 *PHO13* 基因缺失载体的鉴定

经氨苄青霉素抗性平板筛选后,挑取阳性克隆进行质粒扩增、抽提。BamHI 和 XhoI 双酶切 pRS303-*pho13*-ko 载体,酶切产物经过 1% 琼脂糖凝胶电泳,阳性克隆酶切后大小分别为 1 040 bp 和 4 443 bp,未被酶切的载体大小为 5 484 bp,目的条带与预期大小

一致(图 3),实验结果提示 pRS303-*pho13*-ko 载体构建成功。



M: DNA marker; 泳道 1 和 2: BamHI 和 XhoI 双酶切 pRS303-*pho13*-ko 载体片段; 泳道 3 和 4: 泳道 1 和 2 相对应的 pRS303-*pho13*-ko 重组载体

图 3 载体 pRS303-*pho13*-ko 双酶切鉴定结果

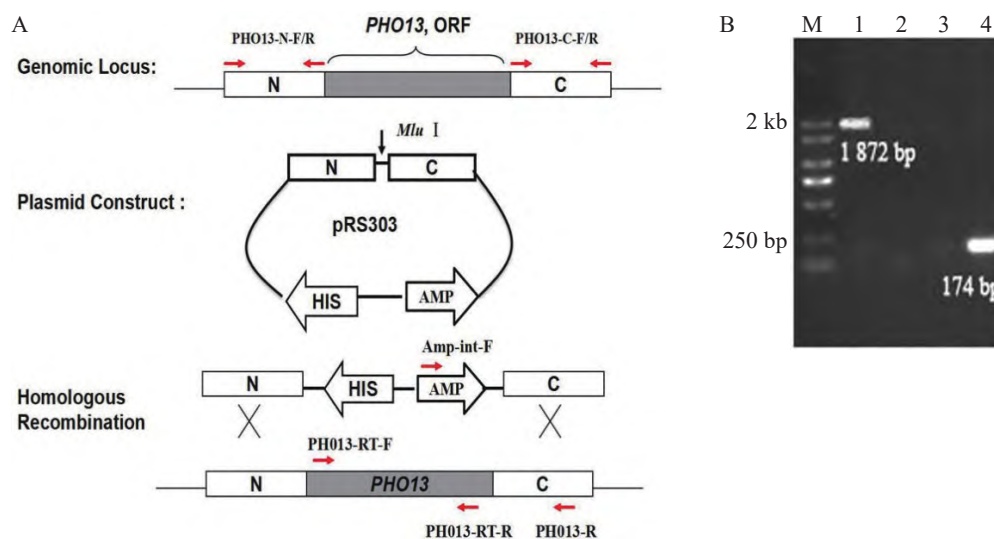
2.4 酵母 *PHO8* 与 *PHO13* 双基因缺失菌株的验证

线性化重组载体 pRS303-*pho13*-ko 转化 *pho8*Δ60 酵母菌株,PCR 鉴定阳性克隆基因组 DNA,引物 Amp-int-F 和 *PHO13*-R 所扩增片段大小为 1 872 bp, *PHO13* 基因内部鉴定引物 *PHO13*-RT-R 和 *PHO13*-RT-R 扩增片段大小为 174 bp。结果如图 4 所示,目的基因 *PHO13* 已被载体 pRS303 骨架替换,结果提示, BY4742 *pho8*Δ60::URA3 *pho13*::HIS3 (*pho8*Δ60 *pho13*Δ) 双基因缺失菌株构建成功。

3 讨论

衰老伴随着分子、细胞、组织和器官的损伤不断积累,最终导致整体功能减退,从而更易受疾病侵害甚至死亡。而自噬则是帮助细胞抵抗恶劣条件的一种细胞质内分解代谢的过程,损坏的细胞成分通过自噬进入溶酶体或液泡,分解成用来合成蛋白质和细胞修复的原料^[11]。近年来的研究表明,可以通过调控自噬延长机体寿命和延缓机体衰老。所以通过各种手段检测自噬活性成为近年来的热点,而 Pho8Δ60 测定法被认为是监测酿酒酵母自噬的最有用的方法之一^[12]。

PHO8 是酵母液泡中碱性磷酸酶 (ALP) 的唯一编码基因,该蛋白以一类 II 型跨膜二聚体蛋白的形式存在^[5]。为了利用 Pho8 来监测自噬,去除 N 末端包括跨膜区在内的 60 个氨基酸残基,形成的 Pho8Δ60 蛋白不再能够进入内质网,而是以非活性酶原的形式分散在整个细胞质中^[13]。而当发生非选择性细胞自噬时,滞留在胞浆内的 Pho8Δ60 蛋白被包进自噬体,从而到达液泡,并被激活为有活性的碱性磷酸酶^[4]。因此,通过检测 ALP 活性可以反映非选择性自噬途径中自噬小体运输到液泡内的量^[14],进而评价细胞发生自噬的水



A 为通过基因缺失重组载体构建基因缺失菌株的策略, 图中箭头所在表示引物位置。B 为双基因缺失菌株PCR 验证电泳图, M: DNA marker; 泳道 1: 引物Amp-int-F 和*PHO13-R* 扩增产物; 泳道 2、3 和 4: 引物*PHO13-RT-F* 分别以*pho8Δ60pho13Δ* 酵母菌株 DNA、超纯水(阴性对照)、野生型基因组DNA(阳性对照)为模板的扩增产物

图4 *PHO8* 与*PHO13* 双基因缺失菌株PCR 验证电泳图

平。另外, *PHO13* 基因编码酵母胞浆中ALP, 此单体蛋白专属于对硝基苯特异性磷酸酶。通过分光光度计分析实验结果发现 *Pho13* 蛋白对底物有很强的选择性, 使对硝基苯磷酸酯显色, 可能会增强*Pho8Δ60* 测定法假阳性结果^[15]。因此为消除胞浆ALP 活性背景对实验结果的影响, 我们在*pho8Δ60* 酵母菌株的基础上进一步缺失*PHO13* 基因, 使*Pho8Δ60* 测定法仅对应细胞液泡中的ALP 活性^[16]。

为进一步优化碱性磷酸酶活性的检测, 本文基于基因同源重组的原理, 构建*PHO8* 与*PHO13* 双基因缺失酵母菌株, 为研究细胞自噬活性奠定基础。目前, 酶连接介导的PCR 法与PCR 介导的一步基因置换法是构建基因缺失酵母菌株的两种常用方法^[17]。通常采用PCR 介导的一步基因置换法构建单基因缺失菌株, 而双基因缺失菌株用酶连接介导的PCR 法。两种方法相比较, 酶连接介导的PCR 法可进行基因同源重组的同源序列较长(本实验选择 520 个核苷酸同源臂), 发生同源重组的机会更多。研究证实, 在同源重组的染色体整合中, 同源片段越长, 整合频率越高, 通常情况下只要达到 300 bp 的同源片段的同源重组是完全可以成功的^[18]。这与通过将不同配型的酵母细胞杂交获得 *pho8Δ60 pho13Δ* 酵母菌株的方法不同, 杂交实验方法操作复杂, 假阳性和假阴性均多^[19]。

因此, 本文采用PCR 介导的一步基因置换法构建单基因缺失菌株, 进一步采用酶连接介导的PCR 法构建双基因缺失菌株, 重组发生在染色体水平上, 表型稳定遗传。*pho8Δ60* 和 *pho8Δ60 pho13Δ* 酵母菌株的构

建对检测酵母细胞内非选择性细胞自噬的水平具有重要意义。

致谢

感谢本校特聘教授 Matt Keablerlein 博士(美国华盛顿大学) 和 Brian K Kennedy 博士(美国BUCK 衰老研究所) 赠送的BY4742 菌株和质粒, 及在酵母复制寿命技术方面给予的精心指导。

参考文献:

- [1] NOGUCHI M, HIRATA N, TANAKA T, et al. Autophagy as a modulator of cell death machinery [J]. Cell Death Dis, 2020, 11(7): 517.
- [2] MADEO F, TAVERNARAKIS N, KROEMER G. Can autophagy promote longevity? [J]. Nat Cell Biol, 2010, 12(9): 842-846.
- [3] YAMAMOTO H, FUJIOKA Y, SUZUKI S W, et al. The intrinsically disordered protein Atg13 mediates supramolecular assembly of autophagy initiation complexes [J]. Dev Cell, 2016, 38(1): 86-99.
- [4] KOLITSIDA P, ABELIOVICH H. Methods for studying mitophagy in yeast [J]. Methods Mol Biol, 2019, 1880: 669-678.
- [5] ARAKI Y, KIRA S, NODA T. Quantitative assay of macroautophagy using *Pho8Δ60* assay and GFP-cleavage assay in yeast [J]. Methods Enzymol, 2017, 588: 307-321.
- [6] 袁源, 赵炜, 崔红晶, 等. 酵母CFD1 基因缺失菌株构建及其对复制寿命的影响[J]. 广东医学院学报, 2014, 32(3): 280-281, 286.

(下转第 15 页)

- 104350-104354.
- [7] NIU J F, WANG S P, WANG B L, et al. Structure and anti-tumor activity of a polysaccharide from *Bletilla ochracea* Schltr[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 154: 1548-1555.
- [8] 陈思思, 吴蓓, 谭婷, 等. 白及多糖BSP-1的分离纯化、结构表征及抗肿瘤活性研究[J]. *中草药*, 2019, 50(8): 1921-1926.
- [9] QU Y, LI C X, ZHANG C, et al. Structural characterization and antioxidant activities of *Bletilla striata* polysaccharide extracted by different methods[J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 266: 118149-118161.
- [10] CHEN Z Y, ZHAO Y, ZHANG M K, et al. Structural characterization and antioxidant activity of a new polysaccharide from *Bletilla striata* fibrous roots[J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 227: 115362-115369.
- [11] 张永刚, 张竞. 白及粉治疗消化性溃疡两例例析[J]. *实用中医内科杂志*, 2003, 17(1): 52.
- [12] 杨志勇, 李书芹, 杜雪菲, 等. 复方白及粉治疗急性放射性食管炎的疗效分析[J]. *辽宁中医杂志*, 2016, 43(9): 1915-1916.
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [14] 刘金梅, 安兰兰, 刘刚, 等. 白及化学成分和药理作用研究进展与质量标志物预测分析[J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(6): 28-37.
- [15] 孔伟华, 徐建波, 崔琦, 等. 白及化学成分、药理作用和白及多糖提取工艺的研究进展[J]. *中医药信息*, 2021, 38(9): 69-78.
- [16] 赵宁, 李伟泽, 张倩, 等. 白及多糖提取工艺优化[J]. *应用化工*, 2015, 44(12): 2212-2215.
- [17] 张雪娇, 刘春叶. 苯酚-硫酸比色法测定白芨胶中的多糖含量[J]. *化学研究与应用*, 2014, 26(5): 757-760.

~~~~~  
(上接第10页)

- [7] 马凯, 胡红霞, 于婧, 等. 双酶切和同源重组方法构建pMIR-reporter载体的比较[J]. *中国病原生物学杂志*, 2015, 10(6): 495-499.
- [8] 崔红晶, 周涛, 宋浩昌, 等. 酶连接介导PCR法构建酵母PMT3基因缺失菌株[J]. *牡丹江医学院学报*, 2018, 39(1): 1-3, 23.
- [9] 熊兵, 杨益, 蒋伶活. 酿酒酵母中SSK2基因与其他镉耐受相关基因之间的双基因缺失菌株构建[J]. *微生物学杂志*, 2016, 36(1): 49-56.
- [10] ZHAO W, FANG B X, NIU Y J, et al. Nar1 deficiency results in shortened lifespan and sensitivity to paraquat that is rescued by increased expression of mitochondrial superoxide dismutase [J]. *Mech Ageing Dev*, 2014, 138: 53-58.
- [11] 郭东豪, 钟远, 苗雅. 自噬与衰老的研究进展[J]. *老年医学与保健*, 2017, 23(6): 585-587.
- [12] KLIONSKY D J, ABDELMOHSEN K, ABE A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition) [J]. *Autophagy*, 2016, 12(1): 1-222.
- [13] KAINZ K, TADIC J, ZIMMERMANN A, et al. Methods to assess autophagy and chronological aging in yeast[J]. *Methods Enzymol*, 2017, 588: 367-394.
- [14] 崔晓静, 崔红晶, 刘新光. 酵母细胞自噬检测方法的研究进展[J]. *国际老年医学杂志*, 2022, 43(5): 612-615.
- [15] KLIONSKY D J. Monitoring autophagy in yeast: The Pho8Delta60 assay[J]. *Methods Mol Biol*, 2007, 390: 363-371.
- [16] NODA T, KLIONSKY D J. The quantitative Pho8Delta60 assay of nonspecific autophagy [J]. *Methods Enzymol*, 2008, 451: 33-42.
- [17] LI P, GE J, GAO Y, et al. A seamless gene deletion method and its application for regulation of higher alcohols and ester in *Baijiu Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 6723849.
- [18] COLLOPY P D, COLOT H V, PARK G, et al. High-throughput construction of gene deletion cassettes for generation of *Neurospora crassa* knockout strains[J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 638: 33-40.
- [19] MORAIS A, TERZIAN A C, DUARTE D V, et al. The eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L protein interacts with Flavivirus NS5 and may modulate yellow fever virus replication [J]. *Virology*, 2013, 10: 205.