

陈思敏,王琳萱,张印红,等. O 型口蹄疫病毒基因组测序与分析[J]. 江苏农业科学,2013,41(12):28-32.

# O 型口蹄疫病毒基因组测序与分析

陈思敏<sup>1</sup>, 王琳萱<sup>1</sup>, 张印红<sup>1</sup>, 刁贺军<sup>2</sup>, 梁淑兰<sup>2</sup>, 任丽杰<sup>3</sup>, 张秀萍<sup>3</sup>

(1. 兰州大学公共卫生学院, 甘肃兰州 730000; 2. 辽宁省朝阳市动物疫病预防控制中心, 辽宁朝阳 122000;

3. 辽宁省朝阳市龙城区动物疫病预防控制中心, 辽宁朝阳 122000)

**摘要:**为了 O 型口蹄疫病毒基因组的结构特征及其变异与结构、功能的关系, 以及系统发生关系, 利用 DNA Star 程序进行了 O 型口蹄疫病毒基因组序列同源性分析、多重排比。结果表明, O 型口蹄疫毒株(O/CHA/99)基因组 ORF 大小为 6 999 nt, 编码 2 332 个氨基酸(aa)的多聚蛋白; 口蹄疫病毒 RNA 的保守性、变异性及其遗传变异, 对理解 O 型口蹄疫病毒的感染、宿主范围和传播有重要作用。

**关键词:**口蹄疫病毒; O 型; 变异分析; 基因组; 测序

**中图分类号:** S855.3      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2013)12-0028-04

口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)是口蹄疫病毒(foot-and-mouth-disease virus, FMDV)在偶蹄类动物身上引起的一种急性、高度传染性疾病, 其病原属于小 RNA 病毒科口蹄疫病毒属。交叉保护和血清学试验确证口蹄疫病毒有 7 个血清型: A、O、C(欧洲型)、Asia1(亚洲 1 型)、SAT1、SAT2、SAT3(南非型)。FMDV 基因组为正向、单链 RNA, 由 8000 个核苷酸(nucleotides, nt)构成, 包括 5'非编码区(5' untranslated region, 5'UTR)、3'非编码区(3' untranslated region, 3'UTR)和 1 个大的开放阅读框(open reading frame, ORF)<sup>[1-2]</sup>。5'UTR 由 1 个短的 S 片段、1 个多 C 碱基片段(90%)和 1 个长的 L 片段构成, L 片段包含 3~4 个重复的假结(pseudoknot, PKs)、复制顺式作用元件(cis-acting replication element, CRE)、内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)<sup>[2]</sup>、5'UTR 与启动多聚蛋白的翻译和病毒的复制有重要作用<sup>[3]</sup>; 3'UTR 长约 90 nt, 它含有与负链 RNA 合成有关的顺式作用元件<sup>[4]</sup>; ORF 编码的一个多聚蛋白裂解成 4 个结构蛋白(VP1~VP4), 形成病毒衣壳和 10 个非结构蛋白, 由于 VP1 蛋白参与病毒感染、免疫保护性和血清特异性功能而被广泛研究, 尤其是 VP1 的 140~160 和 200~213 氨基酸残基<sup>[1-2]</sup>。

根据 FMD 病毒基因和暴发的地域不同, 把 O 型口蹄疫病毒分为 8 个谱系<sup>[5]</sup>, 分别命名为中国型、中东-南亚型(ME-SA)、东南亚型(SEA)、欧洲-南美洲型(Euro-SA)、印尼-1 型(ISA-1)、印尼-2 型(ISA-2)、东非型(EA)和西非型, 其中, ISA-1 和 ISA-2 目前已灭绝。据报道, 东南亚型、中国型和泛亚型病毒近年来主要在亚洲地区广泛传播和流行<sup>[6-7]</sup>。1997—2002 年, O 型口蹄疫在东亚和远东地区暴发<sup>[7]</sup>。O/YUN/TAW/97 是中国血清型的 1 种, 其 3A 编码

区的 93~102 密码子缺失造成口蹄疫在台湾灾难性暴发<sup>[8-9]</sup>。O/AS/SKR/2002 是泛亚血清型的 1 种, 包含 1 个完整的 3A 编码区, 使其对猪具有高致病性, 但对牛无致病性<sup>[10]</sup>。此外, 猪感染另 1 种 FDMV 泛亚株(O/JPN/2000)后表现出典型的口蹄疫临床症状, 但在日本黑牛身上的症状是非典型的, 荷斯坦牛、绵羊和山羊不易被感染<sup>[11]</sup>。对 O/JPN/2000 毒株的 2 个不同表型结构蛋白的氨基酸序列进行比较, 发现存在 2 个突变位点: VP2 的 133 位点和 VP3 的 56 位点<sup>[12-13]</sup>, 这些替换位点可能影响肝素结合。

本研究针对 O 型口蹄疫病毒 O/CHA/99 的细胞适应毒株进行基因组测序和分析, 并将 O/CHA/99 的全基因组与 O/TW/97 和泛亚谱系 14 个参考株序列进行比较, 发现 VP1、VP2、VP3 中由残基发生替换可能改变的受体-配体相互作用<sup>[14]</sup>。通过对 FMDV 基因组测序, 分析 FMDV(O/CHA/99)各个单元的变异特征及其与系统发生的关系, 以期对 FMDV 基因组的结构特征以及口蹄疫在宿主间传染关系有新的认识, 对新的变异区和保守区及其中重要的基序和位点有新的发现, 为后续口蹄疫病毒研究打好基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞与病毒

口蹄疫病毒 O/CHA/99 毒株由国家口蹄疫重点实验室提供, 在分离保存的 BHK-21 传代细胞中适应并增殖的细胞毒中获得, 相关的细胞及病毒处理均在超净实验台上操作。

### 1.2 引物设计与合成

用生物设计软件 Primer 5.0 设计引物, 表 1 列出了引物的序列及其在序列中的位置; 用 Trizol 试剂盒, 按其说明书从第 4 代 BHK-21 细胞毒中提取 RNA, 然后用 RT-PCR 方法扩增覆盖 FMDV 全基因组的 4 个片段(E1、E2、E3、E4), 并将 PCR 产物纯化后送宝生物工程(大连)有限公司测序。

### 1.3 逆转录 PCR

取以上制备的 RNA 2 μL, 再用以上合成的引物进行 PCR 扩增。扩增程序为: 94℃预变性 4 min; 94℃变性 15 s, 58℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min, 33 个循环; 最后 72℃延伸 5 min。

收稿日期: 2013-05-09

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30671563); 甘肃省科技攻关重点项目(编号: 2GS042-A41-001-09)。

作者简介: 陈思敏(1988—), 女, 甘肃白银人, 硕士研究生, 从事食品营养与卫生研究。E-mail: 578653478@qq.com。

通信作者: 张印红, 教授, 研究生导师, 主要从事食品毒理学研究。

Tel: (0931) 8342771。

表 1 引物的序列

引物名称	碱基序列(5'→3')	碱基数(bp)
E1 +	TTGAAAAGGGGCGCTAGGGTC	21
E1 -	CCGAGCGTGGAGTCAATTACACTA	24
E2 +	CTGGTCTTTCCAGGTCTAGAGG	22
E2 -	TAAGCATAGTCTGCAGCAGAAAGG	24
E3 +	TACCTTTCTGCTGCAGACTATGCT	24
E3 -	CGGAGTTCTCCTTAATGGAGTCG	24
E4 +	CAGCAATTGAATTCCTTGAGGGAATGCTGC	30
T21	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	21

#### 1.4 目的基因克隆

用 Agarose Gel DNA Extraction Kit 回收和纯化目的片段,纯化后的 DNA 与 pMD18-T 载体按照 pMD18-T Vector 载体试剂盒说明书进行连接。按常规方法制备并转化感受态细胞,以氨苄抗生素挑选阳性菌落,对提取的质粒进行酶切鉴定。

#### 1.5 生物学软件分析

通过利用 DNA Star 软件作口蹄疫病毒基因组核苷酸和氨基酸同源性和异源性比较,利用 Clustal W 程序进行口蹄疫病毒基因组序列的多重排比。

#### 1.6 参考序列

在 GenBank 数据库中,查得至今我国已注册的 25 个口蹄疫基因组序列。O 型口蹄疫病毒基因组序列有 20 个,其余 5 个是 Asia1 型口蹄疫病毒基因组,其 GenBank 接受号分别为 AY593835、AF506822、AF511039、AY317098、AJ539138、DQ248888、EF175732、AY359854、HQ412603、HM008917、AY686687、AY333431、DQ478936、DQ478937、DQ164878、GQ292726、AF506822、JQ900581、GU931682、JN998085。

## 2 结果与分析

#### 2.1 口蹄疫病毒基因组结构与各组分的大小

O/CHA/99 经测序得到:FMDV 核苷酸全长共 8 173 nt,由 5'UTR(1081 nt)、ORF(6999 nt)、3'UTR(93 nt)和 Poly(A)尾组成,其中,ORF 由 L 基因、P1 结构蛋白基因、P2 和 P3 非结构蛋白基因以及起始密码子和终止密码子组成,它们共同编码 2332 个氨基酸(aa)的多聚蛋白,该多聚蛋白随后被逐级降解为病毒复制所需要的各个组分:L(201 aa)、P1[1A(85 aa)、1B(218 aa)、1C(220 aa)和 1D(211 aa)]、P2[2A(18 aa)、2B(154 aa)、2C(318 aa)]、P3[3A(153 aa)、3B(47 aa)、3C(237 aa)、3D(470 aa)]。此外,二级结构的 S 片段和 IRES 分别为 380、557 nt。

#### 2.2 口蹄疫病毒基因组的变异性保守性

2.2.1 非编码区 将测得的基因碱基序列进行同源性比较分析,得到 O/CHA/99 口蹄疫病毒 5'UTR 和 3'UTR 同源性分别为 88%~98% 和 90%~99%,其二级结构包括 PK、CRE 和 IRSE,另外,3'UTR 也可形成保守的二级结构,S 片段和 IRES 的同源性高达 95% 以上。

2.2.2 5'UTR Poly(C) 区段前 12 nt 和 S 片段末端序列高度保守,同时发现 5'末端前 27 nt 在所有口蹄疫病毒 RNA 中高度保守,PK 区 403~600 nt 较保守,5'UTR 的后 15 nt 为高变区,高突变位点有 513、538、620、684 和 1144,假结节区 403~596 比较保守。保守区和基序定位于假结节区和 IRES,包括 AGAAATGGGACGT(位于 556~568)、GCG-

CACGAAACGCGC(571~585)和 ACAAAC(607~612)。IRES 区域 640~1151 的同源性为 70%~100%,47% 的核苷酸不变;区域 2 的基序 TTTC 和 GGTCTAGAG 以及区域 3 的新保守基序 GYRA 和 CRAAA(Oakesu/58 除外)较为突出。多数口蹄疫病毒基因组中存在区域 3 的茎环 D 基序 ACCC,但是茎环 3C 基序 ACAC 不保守,基序 CTGGTGACAGGCTAAG-GATGCCCT(位于 920~943)形成茎环的突起。区域 4 非常保守,其中 2 个新基序 GATCTGAG(1039~1046)和 TTA-AAAGC(1080~1087)可能形成茎环的突起二级结构。区域 5 的 21 个核苷酸中 19 个保守。通过分析发现,FMDV 5'UTR 区域较保守,变异程度较低。

2.2.3 3'UTR 该区上游的 20 个核苷酸具有 95% 的同源性,变异主要位于基因组的 3'端中部。

2.2.4 多聚蛋白区 所有口蹄疫病毒 ORF 比较发现,至少 88% 的核苷酸没有变化,核苷酸变异程度明显大于氨基酸,参考毒株间的核苷酸同源性为 73%。口蹄疫病毒衣壳蛋白和结构蛋白之间的切割位点比较保守,L/1A、1A/1B、B/1C、1C/1D、1D/2A、2A/2B、2B/2C 和 2C/3A 的酶切位点分别为 K/R/G、A/D、E/G/Q、Q/T、Q/L、G/P、Q/L 和 Q/I,而 3A/3B1、3B1/3B2、3B2/3B3、3B3/3C 和 3C/3D 则都是 E/G,尤其 1A/1B、2A/2B、2B/2C、2C/3A、3B/3C 的切割位点非常保守,没有发生变化。

2.2.5 结构蛋白 通过氨基酸分段对比同源性分析(表 2),结构蛋白的变异顺序为 VP1 > VP2 > VP3 > VP4,1A 是最保守的结构蛋白,约有 95% 的氨基酸未发生改变,包括 N 末端十四烷基化位点和猪牛 T-细胞表位 20~35。1D 的变异位点相对较多,主要集中在末端。

表 2 口蹄疫病毒衣壳蛋白及其基因序列同源性

编码区	同源性(%)		异源性(%)	
	nt	aa	nt	aa
1A	83~99	92~99	1~17	1~8
1B	72~99	82~99	1~28	1~18
1C	74~99	81~99	1~26	1~19
1D	65~99	68~98	1~35	2~32

1B 的 N 末端变化小,变化主要在 C 末端。T 细胞表位 1B 48~68、1B 114~132 和 1B 179~187 比较保守,O/CHA/99 型毒株的保守基序是 DKKTEETTLLEDRLITTRNGHTTST-TQSSVG。

1C 氨基酸替换集中在 1C 55~84(LHFDGDPYVTTK-TDSRVLQAQFDLSLAAK)、1C 123~145(IAYAPPGMEPPKT-PEAAAHCIHA)、1C 176~186(ETTNVQGWVCL)和 1C 196~208(GDALVVLASAGKD),插入或缺失集中在前 2 个区域。

1D 的插入或缺失发生于 1D 140~150(PVTNVRG-DLQV)和 1D 166~170(GAIKA),26% 的残基不变。

其他重要的保守位点和基序有以下:1B 的 H145、P144 和 L83;1C 的 G39、F41 和 A50,这些位点在保守基序 GPNTS-GLET(45~53)之中。与 1AB 切割相关的位点有 1D 的 K204,在基序 RMKRAETYCPR(195~205)中;1B 的 V32、T33 和 Y36,其包含于 TTSTTQSSVGVTFGY(22~36)。1B 的 36~47 段在同一血清型内变异比较保守,为 YATAEDFVSGPN(O 型血清),而基序 GPNTSGLETRVVQAERFFK(45~63)在所有

的 FMDV 中都保守。1B 的 H21、H145、H157 和 H174 很保守。另外,1C 包括 5 个保守的 H 残基,分别位于 86、109、146、149 和 198 氨基酸位点。

2.2.6 非结构蛋白 由表 3 可见,口蹄疫病毒的非结构蛋白氨基酸序列比较保守,2B 和 3C 的编码区较少发生变异,其氨基酸的保守性分别达到 94% 和 95%;L、3A 和 3B 呈现较高的变异,变异程度分别为 19%、19% 和 11%。重要的保守位点包括 L19 (K)、L30 (M)、L40 (K)、L52 (C)、L81 (L)、1D30 (T)、1D51 (L)、1D146 (G)、1D147 (D)、1D160 (P)、3A44 (Q)、3A58 (Q)、3A59 (R)、3A60 (L)、3A18 (Q)、3A78 (V)、3A119(L)和 3A131 (E);另外,3B 12 (P)、3B13 (L) 和 3B 19 (L) 也比较保守。

大部分参考毒株L氨基酸片段插入或缺失较少。起始密码  
表 3 口蹄疫病毒非结构蛋白及其基因序列同源性

编码区	同源性(%)		异源性(%)	
	nt	aa	nt	aa
L	81 ~ 99	81 ~ 99	1 ~ 19	1 ~ 19
2A	75 ~ 99	89 ~ 99	1 ~ 25	1 ~ 11
2B	88 ~ 99	94 ~ 99	1 ~ 12	1 ~ 6
2C	85 ~ 97	95 ~ 97	3 ~ 15	3 ~ 5
3A	76 ~ 99	81 ~ 99	1 ~ 24	1 ~ 19
3B	79 ~ 99	89 ~ 99	1 ~ 21	1 ~ 11
3C	87 ~ 99	95 ~ 99	1 ~ 13	1 ~ 5
3D	87 ~ 99	96 ~ 99	1 ~ 12	1 ~ 4

密码子高度保守,同时发现 2 个密码子间只有 1 个氨基酸残基 C6 没有变化;L 氨基酸替换主要集中于末端,其余 71% 残基未发生改变;突出的位点如 L 52 (W)、149 (A)、165 (E)、77 (N)、110 (L) 和 139 (A) 保守。2A 氨基酸同源性约为 75%;2B 片段中 131 个残基没有变化,尤其在跨膜区域 (PVFSF-GAPILLAGLVKVASSF) 更加保守;2C 也比较保守,84% 的氨基酸未发生变化,保守基序分别为 GKSGQGK、DDLGL 和 NKLD;3A 的插入或缺失经常发生于 3A 的 80 ~ 110 和 130 ~ 153,氨基酸比较证实 3A 是 FMDV 易变的蛋白之一,51% 残基没有变化;3B 片段相对比较保守,变异主要发生于 C 末端;3D 的变异率为 14%,主要集中在序列 GVFNPEFGPAAL-SNKD、跨膜区 CRCAADYASRLHSVLGT 和 HGVFNPEFG-PAALSNDKP;其他重要的保守位点有 245D、295G、307N、337G、338D、339D 以及保守基序 KDEIR、PSG、YGDD、FLKR 和抗原表位 GLIVDTRDVEER、EDKALLFRR。

2.3 口蹄疫病毒基因组的进化关系

通过邻接法、最大简约法和最小进化法,比较 20 个 O 型口蹄疫病毒和 5 个 Asia1 型口蹄疫病毒多聚蛋白氨基酸序列,构建口蹄疫病毒株间分子系统进化树(图 1)。结果表明,每个血清型的口蹄疫病毒都集中为 1 族,系统树总体分为 2 个子分支,1 个分支是 O 型口蹄疫病毒,而另外 1 个分支是 Asia 1 型口蹄疫病毒;口蹄疫 O/CHA/99 株与 O NY00 株的亲缘关系最为密切。

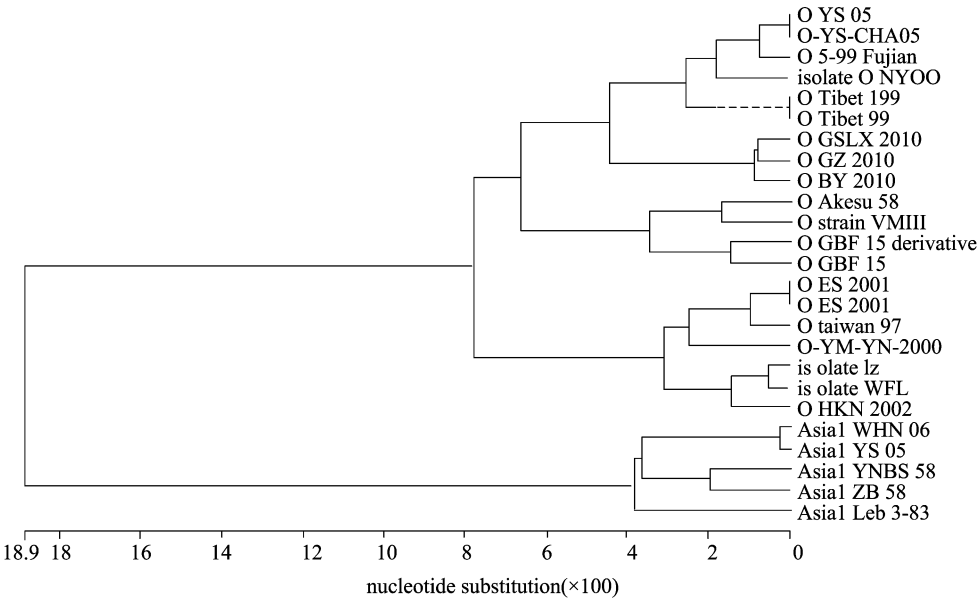


图1 O型口蹄疫病毒基因组进化树

3 小结与讨论

从 1982 年开始,印度暴发 O 型病毒株口蹄疫,该病毒是最近几年的主要流行毒株,分布在世界 24 个国家和地区<sup>[2]</sup>。在 1994 年,O 型口蹄疫病毒曾向西传播到沙特阿拉伯,并在中东和东南亚中部地区流行,在 1996 年传播至欧洲,在土耳其、希腊和保加利亚相继暴发<sup>[15-17]</sup>,2000 年该毒株入侵南非<sup>[18]</sup>,2001 年该病毒在英国造成灾难性暴发<sup>[16,19]</sup>,随后蔓延到爱尔兰、法国和荷兰。病毒向东传至尼泊尔、孟加拉国、不丹、中国、日本、韩国,远东地区的蒙古和俄罗斯<sup>[3,8,20]</sup>。

FMDV 泛亚毒株在易感动物间传播的过程中,会发生不同程度的遗传变异,使其在培养细胞和宿主中的表型发生改变,O/CHA/99 口蹄疫病毒种群中核苷酸/氨基酸的突变不断变化并逐步积累。遗传进化将有可能影响 FMDV 中 5' - UTR 和 3' - UTR 的结构和功能。位于 FMDV 基因组的 5' 末端的 S - 片段起翻译、转换、复制的作用<sup>[21]</sup>。PKs 的多样性可用于分析 FMDV 的基因族谱树。AAACA 突变和 CRE 元件发生的基因突变可以减少 FMDV 基因的复制<sup>[22]</sup>,这表明位于 O/CHA/99 内循环的 2 个替换点(第 30 和 33 氨基酸位点),引起 RNA 在体内的复制减少。突变替换可能导致 IRES 二级

结构发生变化,调节其内部翻译起始和活性<sup>[5]</sup>。3′-端非编码区的 RNA-RNA 和 RNA-蛋白质的相互作用可能影响 FMDV 的感染性<sup>[5]</sup>,George 等在目前的研究中讨论了 L 蛋白的一些不寻常变异,反映了它在 RNA-RNA 或 RNA-蛋白质相互中增强 IRES 依赖性翻译作用<sup>[21,23]</sup>。

迄今为止,2A、2B、2C、3B 和 3C 保守度较高,这影响了在遗传变异的口蹄疫病毒非结构蛋白氨基酸水平的阳性选择,包括 D3N(O/TW/99)、S13P(O/HK/2002)、2A I18V(O/TW/97 和 O/HK/2002)、2B Q164 H(O/HK/2002)、I241T(O/Fujian/CHA/5/99)、2C(近保守基序 D160DLG163 和 N243KLD246)、3B1 中的 K18E(O/JPN/2000)和 3B2 中的 V17A(O/TW/97 和 O/HK/2002)。3A 包含豚鼠阳性选择的残基<sup>[24]</sup>,3A 中碱基缺失改变了肝病毒、鼻病毒、肠道病毒适应的宿主范围<sup>[24-26]</sup>。在 O/CHA/99 的 3A 区没有发现这种缺失,该病毒的其他泛亚菌株也没有发生 3A 缺失(76%~99%的核苷酸同源性和氨基酸同源性的 87%~99%,分别在 3A 区)。O/TW/97 的 3A 编码区 C-末端产生高度变异(117~143),形成一个短的  $\alpha$ -螺旋。

口蹄疫病毒中 3D 聚合酶在 NTP 结合域的氨基酸置换 D338A(肽基序 Y336GDD339),破坏病毒聚合酶的活性<sup>[27]</sup>,这表明虽然 3D 聚合酶中有许多替换位点,但是三级结构的高度保守性并没有改变。O/CHA/99 病毒在牛身上的致病机理仍然不明确,但这些区域的改变导致蛋白质属性发生改变,并产生动态分布突变<sup>[14]</sup>。因此,应利用反向遗传学研究遗传变异的分子基础,进一步研究 O/CHA/99 的感染性,以了解它的突变如何导致遗传多样性和抗原漂移,如何影响口蹄疫病毒和细胞受体的相互作用和选择性限制的调节效应。

中国黄牛和本地牛感染口蹄疫病毒 O/CHA/99 株后没有表现出相应的临床症状。然而,猪感染 O/CHA/99 后表现出典型的临床症状<sup>[18]</sup>。研究发现,O/CHA/99 口蹄疫病毒株和参考毒株相比,表型和致病性非常不同,不同的生物特性导致病毒基因组复制在生命周期中容易出错;O/CHA/99 的核苷酸和氨基酸突变存在于整个基因组,物理和生物环境因素是导致绝大多数突变产生的原因,在 O/CHA/99 固定的有利病毒基因组突变对口蹄疫病毒在易感动物上的传播起至关重要的作用。

#### 参考文献:

- [1] Grubman M J, Robertson B H, Morgan D O, et al. Biochemical map of polypeptides specified by foot-and-mouth disease virus[J]. *Virology*, 1984, 50(2): 579-586.
- [2] Jackson T, King A M, Stuart D I, et al. Structure and receptor binding[J]. *Virus Research*, 2003, 91(1): 33-46.
- [3] López de Quinto S, Martínez-Salas E. Conserved structural motifs located in distal loops of aphthovirus internal ribosome entry site domain 3 are required for internal initiation of translation[J]. *Journal of Virology*, 1997, 71(5): 4171-4175.
- [4] Agol V I, Paul A V, Wimmer E. Paradoxes of the replication of picornaviral genomes[J]. *Virus Research*, 1999, 62(2): 129-147.
- [5] Samuel A R, Knowles N J. Foot-and-mouth disease virus: cause of the recent crisis for the UK livestock industry[J]. *Trends in Genetics*, 2001, 17(8): 421-424.
- [6] Paton D J, King D P, Knowles N J, et al. Recent spread of foot-

- and-mouth disease in the Far East[J]. *The Veterinary Record*, 2010, 166(18): 569-570.
- [7] Sakamoto K, Yoshida K. Recent outbreaks of foot and mouth disease in countries of East Asia[J]. *Revue Scientifique et Technique*, 2002, 21(3): 459-463.
- [8] Dunn C S, Donaldson A I. Natural adaption to pigs of a Taiwanese isolate of foot-and-mouth disease virus[J]. *The Veterinary Record*, 1997, 141(7): 174-175.
- [9] Knowles N J, Samuel A R, Davies P R, et al. Outbreak of foot-and-mouth disease virus serotype O in the UK caused by a pandemic strain[J]. *The Veterinary Record*, 2001, 148(9): 258-259.
- [10] Knowles N J, Samuel A R, Davies P R, et al. Pandemic strain of foot-and-mouth disease virus serotype O[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2005, 11(12): 1887-1893.
- [11] Sakamoto K, Yamakawa M, Kanno T, et al. Susceptibility and pathogenicity of cloven-hoofed animals inoculated with foot-and-mouth disease virus O/JPN/2000 isolate[J]. *Report of the Second OIE Meeting of Foot and Mouth Disease Control in East Asia, Korea: Seoul*, 2001(5): 3-8.
- [12] Kanno T, Yamakawa M, Yoshida K, et al. The complete nucleotide sequence of the PanAsia strain of foot-and-mouth disease virus isolated in Japan[J]. *Virus Genes*, 2002, 25(2): 119-125.
- [13] Morioka K, Fukai K, Ohashi S, et al. Comparison of the characters of the plaque-purified viruses from foot-and-mouth disease virus O/JPN/2000[J]. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2008, 70(7): 653-658.
- [14] Bai X, Bao H, Li P, et al. Genetic characterization of the cell-adapted PanAsia strain of foot-and-mouth disease virus O/Fujian/CHA/5/99 isolated from swine[J]. *Virology Journal*, 2010, 7(1): 208.
- [15] Núñez J I, Baranowski E, Molina N, et al. A single amino acid substitution in nonstructural protein 3A can mediate adaptation of foot-and-mouth disease virus to the Guinea pig[J]. *Virology*, 2001, 75(8): 3977-3983.
- [16] Knowles N J, Samuel A R. Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus[J]. *Virus Research*, 2003, 91(7): 65-80.
- [17] Belsham G J. Translation and replication of foot-and-mouth disease virus RNA[J]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2005, 288: 43-70.
- [18] Knowles N J, Samuel A R, Davies P R, et al. Pandemic strain of foot-and-mouth disease virus serotype O[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2005, 11(12): 1887-1893.
- [19] Gamarnik A V, Andino R. Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus[J]. *Genes & Development*, 1998, 12(15): 2293-2304.
- [20] Mason P W, Bezborodova S V, Henry T M. Identification and characterization of a cis-acting replication element(cre) adjacent to the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus[J]. *Virology*, 2002, 76(19): 9686-9694.
- [21] George M, Venkataraman R, Gurumurthy CB, et al. The non-structural leader protein gene of foot-and-mouth disease virus is highly variable between serotypes[J]. *Virus Genes*, 2001, 22(3): 271-278.
- [22] Sa-Carvalho D, Rieder E, Baxt B, et al. Tissue culture adaptation of foot-and-mouth disease virus selects viruses that bind to heparin and are attenuated in cattle[J]. *Virology*, 1997, 71(7): 5115-5123.

张二芹,张东林,马 强. 狂犬病病毒 *N* 基因植物表达载体的构建[J]. 江苏农业科学,2013,41(12):32-33.

# 狂犬病病毒 *N* 基因植物表达载体的构建

张二芹<sup>1</sup>, 张东林<sup>1</sup>, 马 强<sup>2</sup>

(1. 南阳师范学院生命科学与技术学院,河南南阳 473061; 2. 河南省农业科学院畜牧兽医研究所,河南郑州 450002)

**摘要:**以提取的狂犬病病毒总 RNA 为模板,以 N1 和 N2 为引物,反转录为 cDNA,然后再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,将 PCR 产物克隆至质粒 pMD18-T 中,获得重组质粒 pMD18-T-N,采用 *Hind*Ⅲ 和 *Bam*H I 双酶切法及 PCR 确认真确后,利用 pMD18-T-N 重组质粒为模板,以 N3 和 N4 为引物,成功构建了重组植物表达载体 pBI121-N。

**关键词:**狂犬病病毒;*N* 基因;植物表达载体 pBI121-N

**中图分类号:** S852.65<sup>+</sup>5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)12-0032-02

狂犬病<sup>[1-4]</sup> (Rabies)是由狂犬病病毒(Rabies virus, RV)引起的一种人畜共患的急性中枢神经系统传染病。临床的主要特征为恐水、怕风、咽肌痉挛、流涎、进行性瘫痪,最后因呼吸、循环衰竭而死亡。根据临床表现特点分为狂躁型(脑炎型)和麻痹型(静型)。

狂犬病病毒属弹状病毒科(Rhabdoviridae),狂犬病病毒属(*Lyssavirus*)。狂犬病病毒是 RNA 病毒,病毒颗粒由脂质双层外膜、基因组 RNA 和核蛋白(N)、磷蛋白(P)、基质蛋白(M)、G 蛋白(G)和大转录蛋白(L)组成。人和动物感染后,一旦发病,死亡率几乎 100%,严重威胁着人类和动物的生命安全。目前国内主要采用灭活苗和活疫苗等预防为主,但这些预防方法都具有不同免疫劣势。转基因植物疫苗具有生产成本低、易保存及使用方便等特点<sup>[5-10]</sup>。狂犬病病毒颗粒核蛋白是一种保护性抗原。因此本试验将核蛋白基因与植物表达载体连接,转化到农杆菌中,为今后制备转基因植物疫苗奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

大肠杆菌(*E. coli*)DH5 $\alpha$ 、农杆菌 EHA105, pBI121 植物表达载体由本实验室保存。pMD18-T 克隆载体购于 TaKaRa 生物工程公司。

### 1.2 PCR 引物

用于核蛋白抗原基因(*N*)cDNA PCR 扩增的引物为 N1: 5'-ATGGATGCCGACAAGATTG-3'和 N2: 5'-TTATGAGT-CATTCGAATACG-3'。

用于核蛋白抗原基因(*N*)植物表达载体构建的引物为 N3: 5'-CCGGATCCACCATGGATGGATGCCGACAAGATTG-3', 含 *Bam*H I 酶切位点和 Kozak 序列; N4: 5'-CCGAGCTCT-CATAGCTCATCTTTCTCAGATTATGATCATTCGAATACG-3', 含 *Sac* I 酶切位点和 SEKDEL 序列。

### 1.3 酶和试剂

*Hind*Ⅲ、*Bam*H、*Sac*、T<sub>4</sub> DNA ligase 购自 TaKaRa 生物工程公司。PCR Master 系统为 TaKaRa 公司产品。其他试剂均为国产分析纯或试剂纯。

### 1.4 核蛋白抗原基因(*N*)cDNA 的 PCR 扩增

以 N1 和 N2 为引物,Trizol 方法提取总 RNA,以总 RNA 为模板反转录为 cDNA,然后再以 cDNA 为模板进行 RT-PCR 扩增。反应条件:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 1 min, 52℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 80 s,30 个循环,72℃ 延伸 10 min。

### 1.5 核蛋白抗原基因(*N*)cDNA 的 PCR 产物的连接转化

由于 PCR 产物的 3'端多了一个不依赖于模板组成的脱氧核苷酸 A,所以利用 T-A 互补原理将 PCR 产物与 pMD18-T 载体连接,将 PCR 产物用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒回收,然后用 T4 DNA 连接酶连接,最后将连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。

### 1.6 pMD18-T-N 重组质粒的筛选与鉴定

挑取若干个转化子,分别于 6 mL LB 液体培养基中培养 12~16 h,碱裂解法抽提质粒后经 1% 凝胶电泳,根据 DNA 分子量的大小,初步筛选阳性质粒,然后取初步筛选的阳性质粒

收稿日期:2013-04-15

基金项目:南阳师范学院校级科研项目(编号:nytc2006k52)。

作者简介:张二芹(1976—),女,河南焦作人,博士,副教授,主要从事动物分子病毒学及疫苗的研究。E-mail:zhangerqin76@163.com。

[23] Jackson T, Ellard F M, Ghazaleh R A, et al. Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate[J]. Virology, 1996, 70(8): 5282-5287.

[24] Heinz B A, Vance L M. Sequence determinants of 3A-mediated resistance to enviroxime in rhinoviruses and enteroviruses[J]. Virology, 1996, 70(7): 4854-4857.

[25] Lama J, Sanz M A, Carrasco L. Genetic analysis of poliovirus protein 3A: characterization of a non-cytopathic mutant virus defective in

killing Vero cells[J]. The Journal of General Virology, 1998, 79(8): 1911-1921.

[26] Giraudo A T, Beck E, Strebel K, et al. Identification of a nucleotide deletion in parts of polypeptide 3A in two Independent attenuated aphthovirus strains[J]. Virology, 1990, 177(2): 780-783.

[27] Hemadri D, Tosh C, Sanyal A, et al. Emergence of a new strain of type O foot-and-mouth disease virus: its phylogenetic and evolutionary relationship with the PanAsia pandemic strain[J]. Virus Genes, 2002, 25(1): 23-34.