

动物及兽医生物技术

## Asia 1 型口蹄疫病毒抗原表位突变株的构建及其生物学特性分析

张岩<sup>1</sup>, 胡永浩<sup>1</sup>, 杨帆<sup>2</sup>, 杨波<sup>2</sup>, 王松豪<sup>2</sup>, 朱紫祥<sup>2</sup>, 郑海学<sup>2</sup>

1 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃 兰州 730070

2 中国农业科学院兰州兽医研究所 口蹄疫国家参考实验室 家畜疫病病原学国家重点实验室, 甘肃 兰州 730046

张岩, 胡永浩, 杨帆, 等. Asia 1 型口蹄疫病毒抗原表位突变株的构建及其生物学特性分析. 生物工程学报, 2015, 31(1): 96-104.

Zhang Y, Hu YH, Yang F, et al. Construction and characterization of an epitope-mutated Asia 1 type foot-and-mouth disease virus. Chin J Biotech, 2015, 31(1): 96-104.

**摘要:** 为了研制口蹄疫抗原表位突变标记疫苗, 本研究以含有 Asia 1 型口蹄疫病毒 (FMDV) cDNA 全长的感染性克隆 pAsia 1-FMDV 作为骨架, 将 3D 蛋白中第 27 位氨基酸的 H 和 31 位的氨基酸 N 分别突变成 Y 和 R, 从而突变 3D 蛋白的一个抗原表位, 将构建的带有突变表位的重组质粒转染 BHK-21 细胞, 成功拯救出一株突变 FMDV。经比较后发现, 重组病毒的生物学特性与亲本毒株相似。病毒中和试验结果显示, 抗重组病毒的血清与亲本病毒有良好的反应性。Western blotting 结果表明重组病毒诱导的抗体能与突变的表位合成肽反应而不与野生型病毒的表位合成肽发生反应, 从而区分重组病毒与亲本病毒。综上所述, 这株抗原表位突变 FMDV 有望作为口蹄疫标记疫苗候株进一步评估。

**关键词:** 口蹄疫病毒, 感染性 cDNA 克隆, 负标记, 表位突变

**Received:** March 28, 2014; **Accepted:** June 19, 2014

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Programs) (No. 2011AA10A211-1), National Natural Science Foundation of China (No. 31302118), Major Project of Science and Technology of Gansu Province (No. 1302NKDA027).

**Corresponding author:** Yonghao Hu. Tel: +86-931-7631220; Fax: +86-931-7631220; E-mail: yhh0817@126.com

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2011AA10A211-1), 国家自然科学基金 (No. 31302118), 甘肃省科技重大专项 (No. 1302NKDA027) 资助。

# Construction and characterization of an epitope-mutated Asia 1 type foot-and-mouth disease virus

Yan Zhang<sup>1</sup>, Yonghao Hu<sup>1</sup>, Fan Yang<sup>2</sup>, Bo Yang<sup>2</sup>, Songhao Wang<sup>2</sup>, Zixiang Zhu<sup>2</sup>,  
and Haixue Zheng<sup>2</sup>

<sup>1</sup> College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China

<sup>2</sup> National Foot and Mouth Disease Reference Laboratory, State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, Gansu, China

**Abstract:** To generate an epitope-mutated foot-and-mouth disease virus (FMDV) as a marker vaccine, the infectious clone pAsia 1-FMDV containing the complete genomic cDNA of Asia 1 type FMDV was used as backbone, the residues at positions 27 and 31 in the 3D gene were mutated (H27Y and N31R). The resulting plasmid pAsia 1-FMDV-3DM encoding a mutated epitope was transfected into BHK-21 cells and the recombinant virus rAsia 1-3DM was rescued. The recombinant virus showed similar biological characteristics comparable with the parental virus. In serological neutralization test the antisera against recombinant virus have a good reactivity with parental virus. The antisera against the mutant virus were shown to be reactive with the mutated epitope but not the wild-type one. The results indicated that the two virus strains could be distinguished by western blotting using synthetic peptides. This epitope-mutated FMDV strain will be evaluated as a potential marker vaccine against FMDV infections.

**Keywords:** foot-and-mouth disease virus, infectious cDNA clone, negative marker, epitope mutation

口蹄疫 (Foot-and-mouth disease, FMD) 是由口蹄疫病毒 (Foot-and-mouth disease virus, FMDV) 引起的一种烈性的动物传染病, 中国农业部规定为一类动物疫病<sup>[1]</sup>。FMDV 属于小 RNA 病毒科口蹄疫病毒属, 有 7 种血清型, 包括 A、O、C、Asia 1 和 SAT 1、2 和 3, 其中血清型之间没有交叉保护现象<sup>[2]</sup>。FMDV 基因组为单股正链 RNA, 病毒基因组由约 8 500 个碱基组成, RNA 被衣壳蛋白包裹, 其正二十面体衣壳由 4 种结构蛋白 VP1-VP4 各 60 份拷贝构成。FMDV 翻译成 1 个多聚蛋白, 该多聚蛋白被蛋白酶裂解成结构蛋白 (VP1、VP2、VP3 和 VP4) 和非结构蛋白 (L、2A、2B、2C、3A、3B、3C 和 3D)<sup>[3-5]</sup>。

口蹄疫疫苗免疫是口蹄疫防控与净化的核心技术手段。在口蹄疫疫苗生产中, 口蹄疫灭

活疫苗主要是纯化 FMDV 的 140S<sup>[6]</sup>。FMDV 经纯化后, 病毒的非结构蛋白 3A、3B 和 3C 会被除去。因此, 现在主要采用 3ABC-ELISA 来鉴别口蹄疫的感染与免疫。但无论是转瓶培养还是悬浮培养工艺制备的抗原都无法百分之百除去非结构蛋白, 由于许多国家存在全国性的大规模免疫, 加上有些动物存在多次免疫的现象, 因此影响 3ABC-ELISA 的检测结果, 所以开发新的口蹄疫标记疫苗及其检测方法是现在国内外都迫切需要的<sup>[7-8]</sup>。

FMDV 的 3D 蛋白是病毒感染相关蛋白, 在疫苗生产中会被部分保留<sup>[9-10]</sup>。3D 蛋白表面存在 B 细胞表位, 能诱导 B 细胞产生免疫应答<sup>[11-12]</sup>。Hohlich 等<sup>[13]</sup>已经对 FMDV 中的线性 B 细胞表位进行了鉴定, 在这个基础上 Yang 等<sup>[14]</sup>依照 3D 的蛋白序列分段合成了多条表位肽, 利用中

和抗体与合成肽反应对 3D 蛋白上的抗原抗体结合位点进行定位, 结果表明 3D 蛋白上第 20 位氨基酸到第 40 位氨基酸区域是 3D 蛋白抗原与抗体的结合位点, 又利用合成肽制备的单抗与表达 3D 蛋白进行 Western blotting 实验, 结果显示二者反应良好, 从而又进一步验证了其结论。Uddowla 等在 3D 蛋白中第 27 位氨基酸和 31 位氨基酸发生突变后会将抗原表位消除, 产生的新抗原表位完整地保留了原始表位的特性<sup>[15]</sup>。

我们在疫苗种毒株上进行改造, 突变表位, 使改造的疫苗株能诱导新的抗体, 再通过检验抗体的差异性达到与野毒株区分的目的<sup>[16]</sup>。通过突变 FMDV 3D 蛋白中第 27 位和第 31 位氨基酸, 改变原有的抗原表位, 将突变后的抗原表位作为负标记, 构建抗原表位标记重组病毒, 拯救病毒并对其生物学特性进行分析, 最后利用相应的合成肽对引入负标记的效果进行验证。本研究旨在构建一株 FMDV 表位突变病毒株作为候选标记疫苗株。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 载体和细胞

FMDV Asia 1 型感染性克隆 pAsia 1-FMDV, 该感染性克隆含有 Asia 1/HN/2006 株的结构蛋白基因<sup>[17]</sup>, 其 3D 区域上下游分别带有酶切位点

*Cal I* 和 *Sbf I*<sup>[18]</sup>。转染用 BHK-21 细胞为本实验室保存。

#### 1.1.2 试剂

限制性内切酶 *Cal I* 和 *Sbf I* 购自 NEB 公司。Primer START HS DNA 聚合酶、pMD<sub>20</sub>-T 载体、DNA marker 等购自 TaKaRa 公司。Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System 购自 Promega 公司。AxyPrep Plasmid Miniprep Kit 购自 AxyGEN 公司。培养细胞的 MEM 细胞培养基与胎牛血清购自 Hyclone 公司。细胞转染所用的 Lipofectamine™2 000, Opti-MEM I Medium 购自 Invitrogen 公司。Western blotting 和间接免疫荧光试验中所用的一抗均由本实验室制备。亲本毒株感染牛获得的血清命名为 Anti-Asia 1-pAb, 重组毒株感染牛获得的血清命名为 Anti-rAsia 1-3DM-pAb。二抗为购自 SANTA 公司的山羊抗牛 IgG-HRP。3D 原始表位合成肽 3D-P 与 3D 突变表位合成肽 3D-M 由中农威特生物公司合成。

### 1.2 引物设计及多肽的合成

根据已构建的 pAsia 1-FMDV 全长序列, 引物由南京金斯瑞生物技术公司合成引物 (表 1)。亲本毒株 3D 原始表位多肽 3D-P:N-MRKTCLA PTVAHGVEFNPEFGC-C。重组病毒 3D 突变表位多肽 3D-M:N-MRKTCLAPTVAYGVEFRPEFGC-C。两条合成肽由中农威特生物公司合成。

表 1 克隆和突变使用的引物

Table 1 Primers used for cloning and mutations

Names	Primer sequences (5'-3')	Sizes (bp)
3DMF	ACCGTTGCGTACGGTGTGTTCCGTCCTGAGTTCGGG	3 600
3DMR	CCCGAACTCAGGACGGAACACACCGTACGCAACGGT	
3DF	TTGACATCGATGTGAGTGCCAGGACGG	3 600
3DR	TTTGACCCTGCAGGTTTTTTTTTTTTTTTT	

Restriction sites were underlined.

### 1.3 重组质粒 prAsia 1-3DM 的构建

#### 1.3.1 PCR 对 3D 进行突变

以载体 pAsia 1-FMDV 为模板, 使用引物 3DF 和 3DR 扩增 3D 的片段, 将此片段连接到 pMD<sub>20</sub>-T 载体中, 得到 p3D-T。

以 p3D-T 为模板, 通过引物 3DMF 和 3DMR 对目的片段进行突变, 将 3D 区域的第 27 位氨基酸由 H 突变成 Y 以及第 31 位的 N 突变成 R。PCR 反应体系: Primer START HS DNA 聚合酶 25  $\mu$ L, 模板质粒 2  $\mu$ L, 上下游引物各 1  $\mu$ L, 用水补足至 50  $\mu$ L。PCR 条件: 94  $^{\circ}$ C 变性 3 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 57  $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 继续延伸 8 min。PCR 产物转化, 测序鉴定, 引入突变的重组质粒标记为 p3DM-T。

#### 1.3.2 重组质粒 prAsia 1-3DM 的构建

用 *Cal* I 和 *Sbf* I 酶切并回收带有 3D 抗原表位突变的质粒 p3DM-T, 用其替换 pAsia 1-FMDV 中相应的片段, 得到 prAsia 1-3DM, 并通过酶切和测序验证。

### 1.4 重组病毒的拯救

将构建的重组质粒 prAsia 1-3DM 在 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 介导下转染生长至 70%–80% 单层 BHK-21 细胞, 在 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 4 h 后, 将转染培养基 Opti-MEM 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基替换, 继续培养 72 h, 此期间观察细胞病变出现的情况, 待细胞病变达 90% 时, 收获病毒反复冻融 3 次, 继续接种 BHK-21 细胞, 直至得到能够稳定传代的重组病毒, 将其命名为 rAsia 1-3DM。

### 1.5 重组病毒的鉴定

#### 1.5.1 重组病毒 RT-PCR 的检测

收集转染 prAsia 1-3DM 后发生病变的细胞

上清用于传代, 收集前 5 代的病毒使用 RNeasy Mini Kit 试剂盒提取各代次的 RNA, 然后利用 RT-PCR 扩增含有 3D 蛋白区域的基因, 并将 PCR 纯化的产物回收后送南京金斯瑞生物技术公司测序, 并对序列进行对比分析。

#### 1.5.2 间接免疫荧光检测病毒抗原

将收获的细胞毒接种至生长 80% 的 BHK-21 细胞的载玻片, 病毒与细胞作用 6 h, 用 PBS 充分洗涤, 用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 用 PBS 充分洗涤, 滴加 Anti-rAsia 1-3DM-pAb, 37  $^{\circ}$ C 湿盒孵育 30 min, PBS 漂洗后加入 FITC 标记的山羊抗牛 IgG, 置于湿盒内 37  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, 在 Olympus 倒置显微镜下观察, 同时设正常 BHK-21 细胞为阴性对照。

#### 1.5.3 乳鼠致病性试验

将收获的第 4 代 rAsia 1-3DM 细胞适应毒皮下接种 3 日龄乳鼠 8 只, 接种剂量为每只 0.2 mL, 对照组 3 只接种 PBS 缓冲液, 观察小鼠的发病及死亡状况。

### 1.6 重组病毒的生物学特性检测

#### 1.6.1 对 BHK-21 细胞的适应性及毒力 TCID<sub>50</sub> 测定

将适应稳定重组病毒 rAsia 1-3DM 及其亲本株 Asia 1 分别用 MEM 进行 10 倍系列稀释 (10<sup>-3.0</sup>–10<sup>-8.0</sup>)。将稀释后病毒液分别加入铺有单层 BHK-21 细胞的 2 mL 培养瓶中, 每个稀释度 4 瓶, 200  $\mu$ L/瓶, 同时设立空白对照一组, 每瓶加 200  $\mu$ L MEM。放入 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中进行培养, 观察 3 d, 用 Reed-Muench 氏法计算 TCID<sub>50</sub><sup>[19]</sup>。

#### 1.6.2 对乳鼠的毒力及 LD<sub>50</sub> 测定

将适应稳定的重组病毒 rAsia 1-3DM 及其

亲本株分别用 MEM 进行 10 倍系列稀释 ( $10^{-3.0}$ – $10^{-8.0}$ ), 每个稀释度接种 10 只 2–3 日龄的乳鼠, 10 只乳鼠随机分为两组, 每组 5 只, 每只颈部皮下接种 200  $\mu$ L 稀释好的病毒, 同时设立空白对照组, 仅注射 MEM, 观察 3 d, 用 Reed-Muench 氏法计算  $LD_{50}$ <sup>[19]</sup>。

### 1.6.3 病毒中和试验

将 Anti-rAsia 1-3DM-pAb 和 Anti-Asia 1-pAb 用生理盐水按 1 : 1 稀释, 置 56  $^{\circ}$ C 水浴锅中灭活 30 min。在 96 孔板中, 将已灭活处理的血清用无血清细胞培养液进行倍比稀释 (1 : 16–1 : 2 048), 每个稀释度选取 4 个孔, 每孔加入 50  $\mu$ L 稀释好的血清。每孔分别加入 50  $\mu$ L 浓度为 100 TCID<sub>50</sub>/50  $\mu$ L 的亲本病毒与重组病毒, 同时设立阳性对照与阴性对照。将细胞板置于 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 温箱中, 使病毒与血清反应 1 h。血清病毒反应 1 h 后取出, 每孔加入 50  $\mu$ L 细胞悬液, 在 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 温箱中培养 48 h 后, 在显微镜下观察细胞病变状况, 并详细记录各孔细胞生长情况, 计算 Anti-rAsia 1-3DM-pAb 与 Anti-Asia 1-pAb 的中和效价。

### 1.7 重组病毒的鉴别诊断

利用亲本病毒与重组病毒 3D 突变区域的表位合成肽进行 Western blotting 实验, 用于鉴别两个毒株。配制用于分离 1 kDa 的小分子蛋白的 Tricine-SDS-PAGE 胶<sup>[20]</sup>, 每孔分别加 30  $\mu$ L 处理好的合成肽样品 3D-P 和 3D-M, 电泳结束后, 恒压 15 V 转膜 15 min, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 2 h, TBST 清洗 3 次, 每次 10 min, 然后加入 1 : 1 000 倍稀释的一抗, 在 4  $^{\circ}$ C 条件下孵育 2 h, 用 TBST 清洗 3 次, 每次 10 min, 之后加入 1 : 2 000 稀释的二抗在室温孵育 2 h, TBST 清洗 3 次, 每次 10 min, 压片, 曝光。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒 prAsia 1-3DM 的鉴定

PCR 扩增含有 3D 蛋白序列的基因片段大小约为 3 500 bp, 1% 的琼脂糖凝胶电泳结果显示目的条带在 3 500 bp 左右, 条带大小与预期相符, 成功地获得了目的片段。将目的片段进行 PCR 突变后, 使用 *Cal* I 和 *Sbf* I 限制性内切酶对目的片段和载体进行酶切, 将突变后的目的片段替换到 pAsia 1-FMDV。将获得的阳性质粒使用 *Cal* I 和 *Sbf* I 双酶切鉴定, 电泳结果显示: 目的大小约为 3 500 bp, 载体约为 8 000 bp, 结果与预期相符。序列分析显示, 3D 蛋白上的第 27 位氨基酸 H 突变成 Y, 第 31 位的氨基酸 N 突变成了 R (图 1), 表明构建的重组质粒 prAsia 1-3DM 符合预期。

### 2.2 重组病毒的拯救

使用脂质体介导重组质粒转染 BHK-21 细胞, 转染后的 BHK-21 细胞在 48 h 后出现了明显的致细胞病变效应 (Cytopathic effects, CPEs)。病变具体表现为细胞变圆, 呈葡萄串状分布。收

Y R  
 CCCACC G TTGCG TACGGTGTGTTCCGTCCCGAG

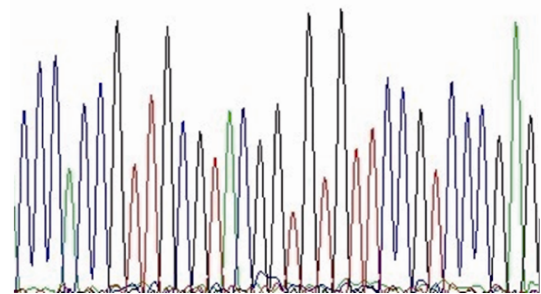


图 1 重组质粒 prAsia 1-3DM 3D 基因突变区域的测序图

Fig. 1 DNA sequence of the mutated region of the 3D gene in prAsia 1-3DM.

取转染细胞上清继续传代，细胞发生病变时间缩短，CPEs 更加典型 (图 2)。

### 2.3 重组病毒的 RT-PCR 鉴定

使用转染的细胞上清进行连续传代，收集第 5 代的细胞适应毒，提取病毒的 RNA 进行 RT-PCR，扩增 3D 基因片段。1%琼脂糖凝胶电泳结果显示，目的基因约 3 500 bp，序列分析结果表明，各代次的突变后的 3D 基因序列没有发生回复突变。

### 2.4 重组病毒的间接免疫荧光鉴定

间接免疫荧光结果显示，重组病毒感染的

细胞有荧光，对照组没有荧光产生。说明病毒开始在细胞内复制，并有病毒蛋白产生 (图 3)。

### 2.5 拯救病毒的生物学特性检测

#### 2.5.1 对 BHK-21 细胞的适应性及 TCID<sub>50</sub> 测定

拯救的重组病毒 rAsia 1-3DM 前 3 代内均可使 BHK-21 细胞产生明显的 CPE，在第 8 代后病变时间均能够稳定在 9-10 h。经计算得出 rAsia 1-3DM 的 TCID<sub>50</sub> 为  $10^{-7.0}/0.2$  mL，亲本毒株的 TCID<sub>50</sub> 为  $10^{-7}/0.2$  mL，二者无明显差异 ( $P>0.05$ )。

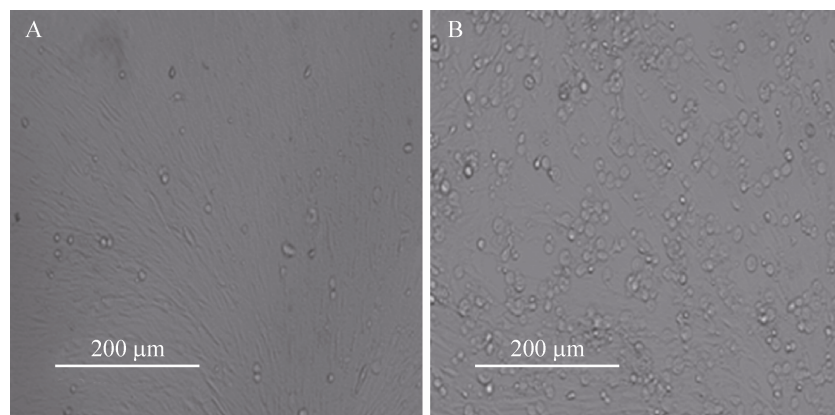


图 2 重组病毒感染细胞后引起的细胞病变效应

Fig. 2 Cytopathic effects in BHK-21 cells infected with rAsia 1-3DM. (A) Before infection. (B) BHK-21 cells 48 h post-infection.

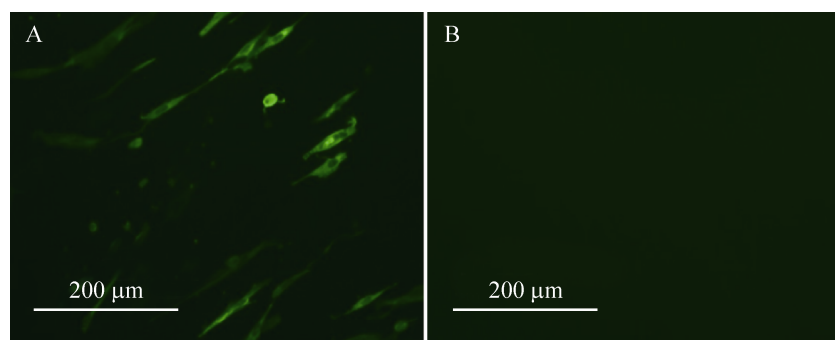


图 3 重组病毒在 BHK-21 细胞中间接免疫荧光检测

Fig. 3 Indirect immunofluorescence analysis of BHK-21 cells infected with rAsia 1-3DM. (A) BHK-21 cells infected with rAsia 1-3DM. (B) Uninfected BHK-21 cells.

### 2.5.2 乳鼠致病力试验及 LD<sub>50</sub> 的测定

将拯救出的重组病毒 rAsia 1-3DM 经皮下接种 3 日龄乳鼠 36 h 后, 乳鼠均表现不同程度的呼吸困难、后肢麻痹等症状, 72 h 后乳鼠全部死亡, 而对照乳鼠正常, 说明了拯救的重组病毒对乳鼠具有致病性。经计算, 重组病毒 rAsia 1-3DM 的 LD<sub>50</sub> 为 10<sup>-7.0</sup>/0.2 mL, 亲本病毒 Asia 1 的 LD<sub>50</sub> 为 10<sup>-7.125</sup>/0.2 mL, 两者无明显差异 ( $P>0.05$ ) (表 2)。

### 2.5.3 重组病毒中和抗体的测定

病毒中和实验结果表明, 抗重组病毒的血清能够与亲本病毒结合从而抑制细胞病变的产生。经过计算, Anti-rAsia 1-3DM-pAb 的中和抗体水平为 1 1 024, Anti-Asia 1-pAb 的中和抗体水平为 1 1 024。实验结果表明, 重组病毒能够诱导动物产生较高水平的中和抗体,

Anti-rAsia 1-3DM-pAb 对亲本毒株有中和效果, 间接地反映出重组病毒有进一步开发成口蹄疫标记疫苗的潜在价值。

### 2.6 重组病毒与亲本病毒的鉴别

合成肽在蛋白电泳中的大小约为 10 kDa, 与理论大小不符, 可能的解释是合成肽在实验过程中发生了聚合反应, 形成了多聚体, 从而分子量变大, 有报道称 FMDV 的 3D 蛋白能够形成聚合物<sup>[20]</sup>。Western blotting 结果显示, Anti-rAsia 1-3DM-pAb 与合成肽 3D-M 有明显的反应, 与合成肽 3D-P 无反应; Anti-Asia 1-pAb 能与合成肽 3D-P 反应, 与 3D-M 不反应, 结果与预期相符合 (图 4)。结果表明, 能够通过重组病毒 rAsia 1-3DM 中引入的负标记与亲本病毒相区别。

表 2 亲本病毒 Asia 1 与重组病毒 rAsia 1-3DM 的半数致死量检测

Table 2 The median lethal dose (LD<sub>50</sub>) test of Asia 1 and rAsia 1-3DM

Virus dilutions	Asia 1		rAsia 1-3DM		MEM
	Group 1 (Death/total)	Group 2 (Death/total)	Group 3 (Death/total)	Group 4 (Death/total)	Negative control (Death/total)
10 <sup>-3</sup>	5/5	5/5	5/5	5/5	
10 <sup>-4</sup>	5/5	5/5	5/5	5/5	
10 <sup>-5</sup>	5/5	5/5	5/5	5/5	
10 <sup>-6</sup>	4/5	5/5	4/5	4/5	0/5
10 <sup>-7</sup>	2/5	3/5	2/5	2/5	
10 <sup>-8</sup>	0/5	1/5	0/5	0/5	

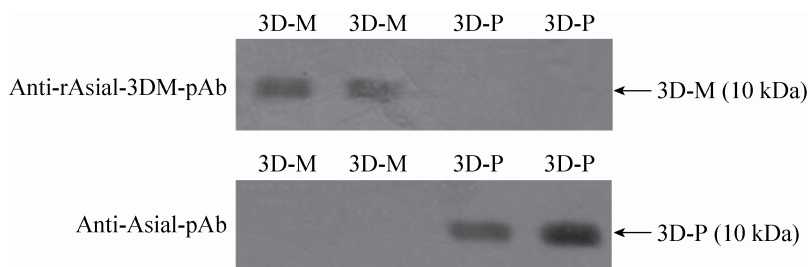


图 4 用 Western blotting 鉴定合成肽 3D-M 和 3D-P 分别与 rAsia 1-3DM 和 Asia 1 抗血清的反应性

Fig. 4 Western blotting analysis of the reactivity of the peptides 3D-M and 3D-P with antisera against rAsia 1-3DM and Asia 1.

### 3 讨论

我国发布了国家中长期疫病的防治规划(2012–2020年),其中口蹄疫是重大动物疫病中的优先防治的国内动物疫病之一。并在2015年到2020年中针对不同型的口蹄疫制定了明确的防治考核标准。由于疫苗生产中非结构蛋白纯化不完全和动物的多次免疫,使得3ABC-ELISA检测无法真实地反映出FMD的流行状况<sup>[21-22]</sup>。所以彻底解决自然感染与人工免疫的鉴别诊断问题,是实施防控和净化口蹄疫政策必要的技术支撑,也是保证畜牧业健康发展的急需技术。

本实验采用反向遗传的方法对FMDV中3D蛋白上的一个抗原表位进行突变,成功地拯救出抗原突变重组病毒rAsia 1-3DM。在病毒拯救的过程中,重组病毒感染BHK-21细胞后,细胞有一个稳定的病变时间,RT-PCR扩增的各代次细胞适应毒的3D区域经测序后,重组病毒没有发生回复突变,证明重组病毒的稳定性良好。反向遗传学操作容易造成病毒毒力下降,如:FMDV中的SAP突变,针对病毒基因组的3个点突变能够导致FMDV对猪不致病,L蛋白部分缺失会导致FMDV毒力下降<sup>[23-25]</sup>。TCID<sub>50</sub>和LD<sub>50</sub>试验数据证明,针对病毒3D蛋白抗原表位的突变,并没有导致重组病毒毒力发生显著的变化。病毒中和实验结果表明,重组病毒能够诱导动物产生较高水平的中和抗体,且与亲本毒株反应性良好。表位合成肽的Western blotting结果表明,在3D蛋白引入抗原表位突变是成功的,突变产生的新表位与原始表位能够区分。

综上所述,本实验获得了一株口蹄疫抗原表位突变的重组病毒,为研发新的口蹄疫标记疫苗候选株提供了技术支持。

### REFERENCES

- [1] Kitching RP. Future research on foot and mouth disease. *Rev Sci Technol*, 2002, 21(3): 885–889.
- [2] Grubman MJ, Baxt B. Foot-and-mouth disease. *Clin Microbiol Rev*, 2004, 17(2): 465–493.
- [3] Porter AG. Picornavirus nonstructural proteins: emerging roles in virus replication and inhibition of host cell functions. *J Virol*, 1993, 67(12): 6917–6921.
- [4] Newman JF, Brown F. Foot-and-mouth disease virus and poliovirus particles contain proteins of the replication complex. *J Virol*, 1997, 71(10): 7657–7662.
- [5] de los Santos T, Segundo FD, Zhu J, et al. A conserved domain in the leader proteinase of foot-and-mouth disease virus is required for proper subcellular localization and function. *J Virol*, 2009, 83(4): 1800–1810.
- [6] Brown F, Hyslop NS, Crick J, et al. The use of acetylethyleneimine in the production of inactivated foot-and-mouth disease vaccines. *J Hyg*, 1963, 61(3): 337–344.
- [7] Mackay DK, Forsyth MA, Davies PR, et al. Differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease using a panel of recombinant, non-structural proteins in ELISA. *Vaccine*, 1998, 16(5): 446–459.
- [8] Shen F, Chen PD, Walfield AM, et al. Differentiation of convalescent animals from those vaccinated against foot-and-mouth disease by a peptide ELISA. *Vaccine*, 1999, 17(23/24): 3039–3049.
- [9] Arias A, Jamie J, Arnold JJ, Sierra M, et al. Determinants of RNA-dependent RNA polymerase (in)fidelity revealed by kinetic analysis of the polymerase encoded by a foot-and-mouth disease virus mutant with reduced sensitivity to ribavirin. *J Virol*, 2008, 82(24): 12346–12355.
- [10] Nayak A, Goodfellow IG, Belsham GJ. Factors required for the uridylylation of the foot-and-mouth disease virus 3B1, 3B2, and 3B3 peptides by the RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol) *in vitro*. *J*



- Viol, 2005, 79(12): 7698–7706.
- [11] Cowan KM, Graves JH, A third antigenic component associated with foot-and-mouth disease infection. *Virology*, 1966, 30(3): 528–540.
- [12] McVicar JW, Suttmoller P. Foot-and-mouth disease: the agar gel diffusion precipitin test for antibody to virus-infection-associated (via) antigen as a tool for epizootologic surveys. *Am J Epidemiol*, 1970, 92(4): 273–278.
- [13] Hohlich BJ, Wiesmuller KH, Schlapp T, et al. Identification of foot-and-mouth disease virus-specific linear B-cell epitopes to differentiate between infected and vaccinated cattle. *J Virol*, 2003, 77(16): 8633–8639.
- [14] Yang M, Clavijo A, Li M, et al. Identification of a major antibody binding epitope in the non-structural protein 3D of foot-and-mouth disease virus in cattle and the development of a monoclonal antibody with diagnostic applications. *J Immunol Methods*, 2007, 321(1/2): 174–181.
- [15] Uddowla S, Hollister J, Pacheco JM, et al. A safe foot-and-mouth disease vaccine platform with two negative markers for differentiating infected from vaccinated animals. *J Virol*, 2012, 86(21): 11675–11685
- [16] Sorensen KJ, Madsen KG, Madsen ES, et al. Differentiation of infection from vaccination in foot-and-mouth disease by the detection of antibodies to the non-structural proteins 3D, 3AB and 3ABC in ELISA using antigens expressed in baculovirus. *Arch Virol*, 1998, 143(8): 1461–1476.
- [17] Zheng HX, Yang F, Jing Y, et al. the preparation method and application of Asia1 type foot-and-mouth disease recombinant virus: CN, 201310175323X. 2013-05-14 (in Chinese). 郑海学, 杨帆, 靳野, 等. Asia1 型口蹄疫重组病毒及其制备方法和应用: 中国, 201310175323X. 2013-05-14.
- [18] Zheng H, Guo J, Jin Y, et al. Engineering foot-and-mouth disease viruses with improved growth properties for vaccine development. *PLoS ONE*, 2013, 8(1): e55228.
- [19] Zamoiskii EA. Evaluation of Reed-Muench method in determination of activity of biological preparations. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, 1956, 27(1): 77–83.
- [20] Schagger H, Gebhard von Jagow. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, 1987, 166(2): 368–379.
- [21] Bentham M, Holmes K, Forrest S, et al. Formation of higher-order foot-and-mouth disease virus 3Dpol complexes is dependent on elongation activity. *J Virol*, 2012, 86(4): 2371–2374.
- [22] Sorensen KJ, Madsen KG, Madsen ES, et al. Differentiation of infection from vaccination in foot-and-mouth disease by the detection of antibodies to the non-structural proteins 3D, 3AB and 3ABC in ELISA using antigens expressed in baculovirus. *Arch Virol*, 1998, 143(8): 1461–1476.
- [23] Clavijo A, Zhou EM, Hole K, et al. Development and use of a biotinylated 3ABC recombinant protein in a solid-phase competitive ELISA for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. *J Virol Methods*, 2004, 120(2): 217–227.
- [24] Aravind L, Koonin EV. SAP-a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization. *Trends Biochem Sci*, 2000, 25(3): 112–114.
- [25] Segundo FD, Weiss M, Pérez-Martín E, et al. Inoculation of swine with foot-and-mouth disease SAP-mutant virus induces early protection against disease. *J Virol*, 2012, 86(3): 1316–1327.

(本文责编 陈宏宇)