

研究报告

## 嵌合 O/GSLX/CHN/2010 株 S 片段的基因工程 口蹄疫病毒的生物学特性

姜韶东 李平花 孙普 马雪青 白兴文 包慧芳 卢曾军 曹轶梅  
付元芳 李冬 陈应理 刘在新\*

(中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室 OIE/国家口蹄疫参考实验室  
农业部畜禽病毒学重点开放实验室 甘肃 兰州 730046)

**摘要:**【目的】研究嵌合口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus, FMDV) O/GSLX/CHN/2010 株 S 片段的基因工程病毒的生物学特性。【方法】运用反向遗传操作技术, 将 FMDV O/GSLX/CHN/2010 的 S 片段嵌合进 2 株同谱系 FMDV 的感染性克隆骨架, 拯救得到两株基因工程嵌合病毒 rGDexc、rGZexc; 进而从病毒复制和病毒对乳鼠的致病力方面, 对嵌合病毒、亲本基因工程病毒以及 FMDV O/GSLX/CHN/2010 株进行了评价。【结果】FMDV O/GSLX/CHN/2010 株复制较慢, 对乳鼠致病力较差。嵌合病毒和亲本基因工程病毒的复制能力、对乳鼠的致病力明显高于 FMDV O/GSLX/CHN/2010 株。【结论】研究表明 FMDV O/GSLX/CHN/2010 的 S 片段不能独自决定该病毒较差的复制能力和较弱的乳鼠致病力。这一发现为进一步研究 O/GSLX/CHN/2010 的致弱机制以及 S 片段对病毒生物学特性的影响奠定了基础。

**关键词:** 口蹄疫病毒, 感染性克隆, S 片段, 病毒生物学特性

## Characterization of chimeric foot-and-mouth disease viruses bearing the S-fragment of O/GSLX/CHN/2010

JIANG Shao-Dong LI Ping-Hua SUN Pu MA Xue-Qing BAI Xing-Wen BAO Hui-Fang  
LU Zeng-Jun CAO Yi-Mei FU Yuan-Fang LI Dong CHEN Ying-Li LIU Zai-Xin\*

(Lanzhou Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, OIE/China National Foot-and-Mouth Disease Reference Laboratory, Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, Lanzhou, Gansu 730046, China)

**Abstract: [Objective]** We studied the characteristics of chimeric foot-and-mouth disease viruses (FMDVs) bearing the S-fragment of O/GSLX/CHN/2010. **[Methods]** Based on 2 existing full-length infectious cDNA clones with the same lineage to O/GSLX/CHN/2010, 2 chimeric FMDVs bearing the S-fragment of O/GSLX/CHN/2010 were constructed and rescued by reverse genetic

基金项目: 兰州市科技计划项目(No. 2012-2-72); 公益性行业(农业)科研专项项目(No. 201103008)

\*通讯作者: Tel: 86-931-8342587; 信箱: liuzaixin@caas.cn

收稿日期: 2015-02-05; 接受日期: 2015-04-03; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-06-03

manipulation. Virus replication and virulence in suckling mice of the chimeric viruses, parent genetically engineering viruses and FMDV O/GSLX/CHN/2010 were evaluated. **[Results]** FMDV O/GSLX/CHN/2010 replicated slowly and its virulence in suckling mice was weak. Whether in virus replication or virulence in suckling mice, the chimeric viruses and their parent genetically engineering viruses were better than FMDV O/GSLX/CHN/2010 significantly. **[Conclusion]** S-fragment of FMDV O/GSLX/CHN/2010 cannot determine the weak phenotype of O/GSLX/CHN/2010 alone, which lay the foundation for further studies of the attenuation mechanism of O/GSLX/CHN/2010 and the influence of S-fragment on FMDV characteristics.

**Keywords:** Foot-and-mouth disease virus, Infectious cDNA clone, S-fragment, Virus characteristics

口蹄疫(Foot-and-mouth disease, FMD)是危害猪、牛、羊等偶蹄动物的一种急性、热性、高度接触性动物传染病<sup>[1]</sup>。其病原是小 RNA 病毒科(Picornaviridae)口蹄疫病毒属(*Aphthovirus*)的口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus, FMDV)<sup>[2]</sup>。作为一种单股正链 RNA 病毒, FMDV 的基因组全长约 8.5 kb, 依次由 5'-非翻译区(Untranslated region, UTR)、开放阅读框(Open reading frame, ORF)和 3'-UTR 组成。FMDV 包含 O、A、C、Asia1、SAT1、SAT2 和 SAT3 7 个血清型, 每个血清型又可以分为多个拓扑型。

S 片段是位于 FMDV 基因组 5'-UTR 最前端的一个相对独立的单元。它的 5'端可以与尿苷酸化的 VPg 蛋白共价结合, 而它的 3'端通过 Poly(C)片段与基因组其余组分隔开。S 片段模拟的二级结构是一个长的单一茎环<sup>[3-4]</sup>, 该结构被推测是 S 片段行使功能的结构基础。类比小 RNA 病毒科其他病毒上的相关研究, S 片段被认为与 FMDV 基因组 RNA 稳定性、基因组 RNA 复制以及病毒致病力有关<sup>[1,5-6]</sup>, 但至今没有明确的实验证据。

FMDV O/SEA/Mya-98 谱系病毒 S 片段的一般长度为 368 nt, 而 2010 年分离自我国甘肃宁夏回族自治区的 Mya-98 谱系毒株 O/GSLX/CHN/2010 的 S 片段却只有 298 nt<sup>[7]</sup>。与同谱系毒株进行核酸序列比对, 我们发现 O/GSLX/CHN/2010 的 S 片段在核酸序列第 149-218 位存在 70 nt 的缺失。实验室研究发现, 与同谱系毒株相比, O/GSLX/CHN/2010 基因组 RNA 复制较慢, 病毒滴度较低, 对乳鼠的致病力也较差。

为了探讨 O/GSLX/CHN/2010 毒株较弱的表型是否是由其特征性的 S 片段决定的, 我们利用现有的 2 株 Mya-98 谱系的感染性克隆<sup>[8]</sup>, 构建了嵌合 O/GSLX/CHN/2010 毒株 S 片段的基因工程嵌合病毒 rGDexc 和 rGZexc。并从病毒基因组 RNA 复制、病毒滴度、对乳鼠致病力等方面, 对嵌合病毒及其亲本病毒进行了评价和比较。本研究将为进一步理解 O/GSLX/CHN/2010 的致弱机制、S 片段中部 70 nt 缺失对病毒的影响等奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、毒株、质粒、试剂和仪器

幼仓鼠肾细胞系 BHK-21 来自美国标准培养物保藏中心(American type culture collection, ATCC), 稳定表达 T7 RNA 聚合酶的 BSR T7/5 细胞系由德国 Max von Pettenkofer 研究所的 Conzelmann 教授惠赠, 这两种细胞都按规定培养和传代<sup>[9]</sup>。

FMDV 毒株 O/GSLX/CHN/2010 (GenBank 登录号: JQ900581)分离自猪, 其基因组在 S 片段缺失 70 nt。FMDV 毒株 O/GD/2/CHN/2010 和 O/GZSB/CHN/2010 分别分离自猪和牛, 它们的 S 片段不存在缺失, 长度均为 368 nt。这 3 株 FMDV 都是在 2010-2011 年东亚暴发的 Mya-98 谱系口蹄疫疫情中分离的, 都属于 O/SEA/Mya-98 谱系, 且亲缘关系较近(两两间全基因组核苷酸一致性均大于 97.8%)。本研究之前, O/GD/2/CHN/2010 和 O/GZSB/CHN/2010 的感染性克隆均已构建、拯救成功, 质粒分别命名为 pGD 和 pGZ, 基因工程病毒分别命名为 rGD 和 rGZ。

实验中用到的胎牛血清、细胞培养液、Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; AMV 逆转录酶、高保真 DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、DNA marker 等, 购自大连宝生物公司; 口蹄疫病毒 3A 单克隆抗体(命名为 3A24)由本实验室制备并保存。山羊抗鼠 IgG(H+L)FITC 荧光标记的二抗、细胞核染料 DAPI, 购自康为世纪公司; 构建用的病毒 RNA 用 Qiagen RNeasymini Kit 试剂盒提取。定量用的病毒 RNA 由 Eppendorf 公司的自动核酸提取仪 epMotion M5073c 统一提取。TaqMan 探针由 ABI 公司设计、合成。实时荧光定量 PCR 的相关试剂购自德国 Roche 公司; 实时荧光定量 PCR 仪(ABI 7500), 美国 ABI 公司; 激光共聚焦显微镜(Leica TCS SP8), 德国 Leica 公司。

### 1.2 全基因组序列分析、S 片段二级结构模拟

为了了解 3 株 FMDV 的基因组序列差异, 利用 MEGA 6.0 软件对这 3 株 FMDV 的全基因组核酸序列进行了比对分析。为了了解 3 株病毒 S 片段二级结构的差异, 运用 mfold 在线程序模拟了这 3 株病毒 S 片段的二级结构。

### 1.3 嵌合病毒的构建、拯救和鉴定

根据 3 株病毒的基因组序列设计引物(表 1)。其中, 引物 LXS-和引物 C-K+横跨 Poly(C)区, 且把 Poly(C)长度固定为 16 个 C。除 Poly(C)外, 引物 LXS-和引物 C-K+还包含 30 nt 的重叠互补序列,

以便于实施融合 PCR。此外, 在引物 LXS+的 5'端引入了 *Sph* I 外源单一酶切位点, 引物 C-K-正好位于保守的内源单一酶切位点 *Kpn* I 处。

首先, 用引物 LXS+和引物 LXS-扩增 O/GSLX/CHN/2010 的 S 片段 LXS; 同时, 用引物 C-K+和引物 C-K-扩增 O/GD/2/CHN/2010 和 O/GZSB/CHN/2010 基因组上 Poly(C)至 *Kpn* I 的序列 C-KGD 和 C-KGZ。然后, 利用引物 LXS+和 C-K-将 LXS 与 C-KGD 或 C-KGZ 融合, 分别得到 PCR 片段 EXCGD、EXCGZ。用 *Sph* I 和 *Kpn* I 分别双酶切 PCR 片段 EXCGD、EXCGZ 以及感染性克隆质粒 pGD、pGZ。将酶切后的 PCR 片段替换进酶切后的感染性克隆质粒, 得到新的全长质粒 pGDexc、pGZexc。

测序鉴定正确后, 利用基因组 3'末端的 *Not* I 酶切位点线性化全长质粒 pGDexc、pGZexc。线性化的全长质粒用 PCR 纯化试剂盒纯化回收后, 利用 Lipofectamine 2000 将线性化质粒转染单层 BSR T7/5 细胞, 并于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 继续培养。72 h 后, 将转染了线性化质粒的 BSR T7/5 细胞反复冻融 3 次, 继续在 BHK-21 细胞上传代, 直至出现明显的细胞病变效应。转染拯救成功的嵌合病毒分别命名为 rGDexc、rGZexc(图 1)。

除观察细胞病变效应外, 我们还利用反转录 PCR 和间接免疫荧光试验对嵌合病毒进行了鉴定。具体操作步骤参照文献[10]。

表 1 构建嵌合质粒的引物序列  
Table 1 The sequence of chimeric plasmid primers

名称 Names	引物序列 Primer sequence (5'→3')	长度(碱基对) Size (bp)
LXS+	GGTGCATGC <sup>a</sup> TAATACGACTCACTATAGGG <sup>b</sup> TTGAAAGGGGGCGCTAGGGTCT	51
LXS-	AGCGACGGTAAACTTGGGGGGGGGGGGGG <sup>c</sup> TGAAAGCGGGCTTCGAGT	51
C-K+	AAGCCCGCTTTCACCCCCCCCCCCCC <sup>c</sup> AAGTTTACCGTCGCTCCCGACGT	54
C-K-	CCTCGGGGTACC <sup>d</sup> TGAAGGGCATCCTT	38

注: <sup>a</sup>: *Sph* I; <sup>b</sup>: T7 RNA 聚合酶的启动子序列; <sup>c</sup>: Poly(C); <sup>d</sup>: *Kpn* I。

Note: <sup>a</sup>: *Sph* I; <sup>b</sup>: Promoter sequence of T7 RNA polymerase; <sup>c</sup>: Poly(C); <sup>d</sup>: *Kpn* I。

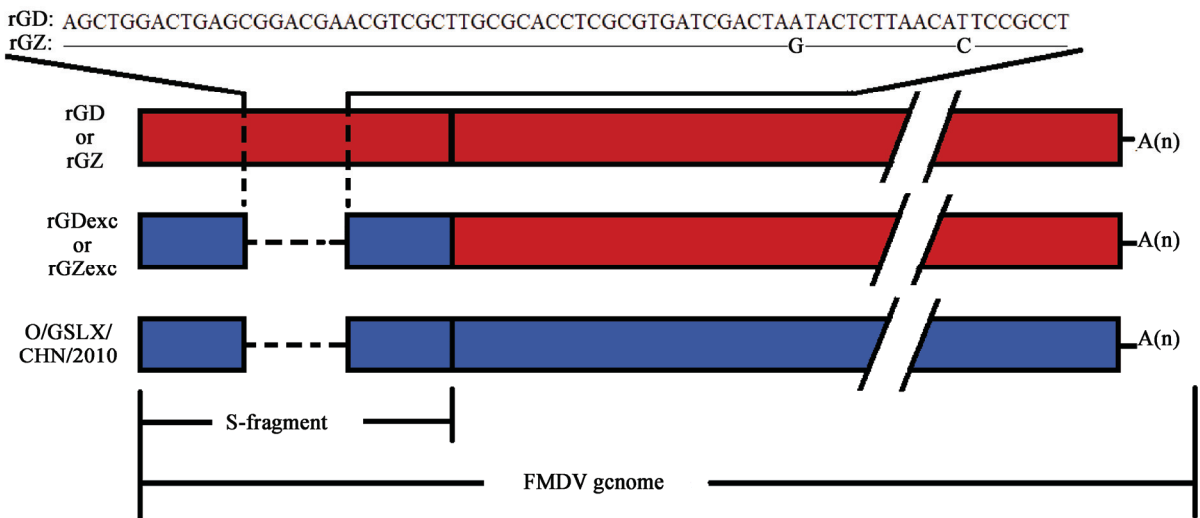


图 1 所用到的 FMDV 的全基因组示意图  
Figure 1 Diagram of the whole-genome of used FMDVs

#### 1.4 反转录-实时荧光定量聚合酶链式反应

将等量(MOI=0.1)的基因工程病毒 rGD、rGDexc、rGZ、rGZexc 以及蚀斑纯化的 O/GSLX/CHN/2010 接种 BHK-21 细胞, 分别在感染后 0、4、8、12 h 收取病毒。收取的病毒反复冻融 3 次后, 利用自动核酸提取仪统一提取病毒 RNA, 并用 cDNA 合成试剂盒进行反转录。借助事先定量的 DNA 标准品, 进行实时荧光定量 PCR, 对合成的病毒 cDNA 进行绝对定量。所用的引物和探针与张萌等<sup>[10]</sup>一致, 条件和体系等参照实时荧光定量 PCR 探针法试剂盒 FastStart Universal Probe Master (ROX)的说明书。

#### 1.5 病毒滴度的测定

将等量(MOI=0.1)的基因工程病毒 rGD、rGDexc、rGZ、rGZexc 以及蚀斑纯化的 O/GSLX/CHN/2010 接种 BHK-21 细胞, 分别在感染后 0、4、8、24 h 收取病毒。收取的病毒反复冻融 3 次后, 用在 96 孔板中培养的 BHK-21 细胞单层滴定病毒, 并按照 Reed-Muench 法计算  $TCID_{50}$ 。

#### 1.6 病毒对乳鼠致病力的测定

测定了基因工程病毒 rGD、rGDexc、rGZ、rGZexc 以及蚀斑纯化<sup>[8]</sup>的 O/GSLX/CHN/2010 的

$TCID_{50}$ , 将这些病毒分别稀释成  $10 TCID_{50}/100 \mu L$ 、 $1 TCID_{50}/100 \mu L$ 、 $0.1 TCID_{50}/100 \mu L$ 、 $0.01 TCID_{50}/100 \mu L$ , 并分别颈背部皮下接种 9–12 只 3 日龄的 BALB/c 乳鼠。接种后每隔 12 h 观察并记录一次乳鼠死亡情况, 连续观察 7 d。病毒对乳鼠的致病力通过存活率曲线来表示<sup>[11]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 全基因组序列及 S 片段模拟二级结构的分析

虽然 O/GSLX/CHN/2010 与另 2 株病毒的全基因组核酸序列一致性分别为 97.8%、98.7%, 亲缘进化关系非常近; 但是, 通过序列比对, 在 O/GSLX/CHN/2010 上发现了许多特征性的变异位点(表 2)。这些变异位点分别位于与基因组复制相关的 S 片段、3'-UTR 以及 2C、3A 和 3B 的编码区, 与病毒侵入细胞相关的组成衣壳的 VP2、VP3 和 VP1 的编码区以及蛋白酶  $L^{pro}$  和  $3C^{pro}$  的编码区。

用 mfold 模拟的这 3 株病毒的 S 片段都能形成单一的长茎环结构(图 2)。而且, 这 3 个模拟的茎环结构中细节上的二级结构(膨泡、内环、发卡等)的位置和比例也基本一致。但是 O/GSLX/CHN/2010 的 S 片段在相对另两株病毒 S 片段中部的 149–218 位缺失了 70 nt, 使得其模拟的二级结构的茎矮了约 1/5。

表 2 O/GSLX/CHN/2010 的特征性变异位点  
Table 2 Variation sites of O/GSLX/CHN/2010 compared to the other two isolates

	No. <sup>a</sup>	O/GSLX/CHN/2010	O/GZSB/CHN/2010	O/GD/2/CHN/2010
S-fragment	149–218	–	<sup>b</sup>	<sup>b</sup>
	198	–	G	A
	210	–	C	T
	219	C	C	T
	279	C	T	T
	284	C	C	T
	285	C	C	T
	290	G	A	A
	293	G	A	A
	345	T	C	C
L-5'UTR	399	G	T	T
	553	C	T	T
	560	T	C	C
L <sup>pro</sup> c	4	T	A	A
	10	V	–	–
	13	H	Y	Y
	20	T	A	A
	24	P	S	S
VP2	56	I	V	V
VP3	13	S	G	G
	105	I	V	V
VP1	133	D	N	N
	142	T	L	P
2C	80	N	S	S
	248	I	N	T
3A	93	H	Y	Y
3B	39	R	K	K
3C	28	I	V	V
3'-UTR	3	C	T	T
	40	C	A	A

注：<sup>a</sup>：非翻译区编号指的是核苷酸，编码区编号指的是氨基酸；<sup>b</sup>：具体序列见图 1；<sup>c</sup>：按照 O/GSLX/CHN/2010 的序列编号。

Note: <sup>a</sup>: The number in the untranslated regions indicates site of nucleotide, and the number in the coding region indicates site of amino acid;

<sup>b</sup>: The sequences are shown in Figure 1; <sup>c</sup>: The number is based on the sequence of O/GSLX/CHN/2010.

## 2.2 嵌合病毒的鉴定

嵌合病毒 rGDexc、rGZexc 转染后在 BHK-21 细胞上传到第 3 代，就可以看到比较明显的细胞病变效应。将两株嵌合病毒在 BHK-21 细胞上传到第 4 代，也可以通过间接免疫荧光实验检测到 FMDV 的 3A 蛋白(图 3)。提取两嵌合病毒在 BHK-21 上传

到第 3 代和第 10 代时的 RNA，进行反转录 PCR 并测序，发现病毒序列与构建时预期一致且无变异。这些都说明嵌合病毒 rGDexc 和 rGZexc 拯救成功，并能在 10 代以内保持序列稳定。

## 2.3 嵌合病毒 RNA 复制能力、病毒滴度的检测

对实时荧光定量 PCR 和病毒滴度的检测数据

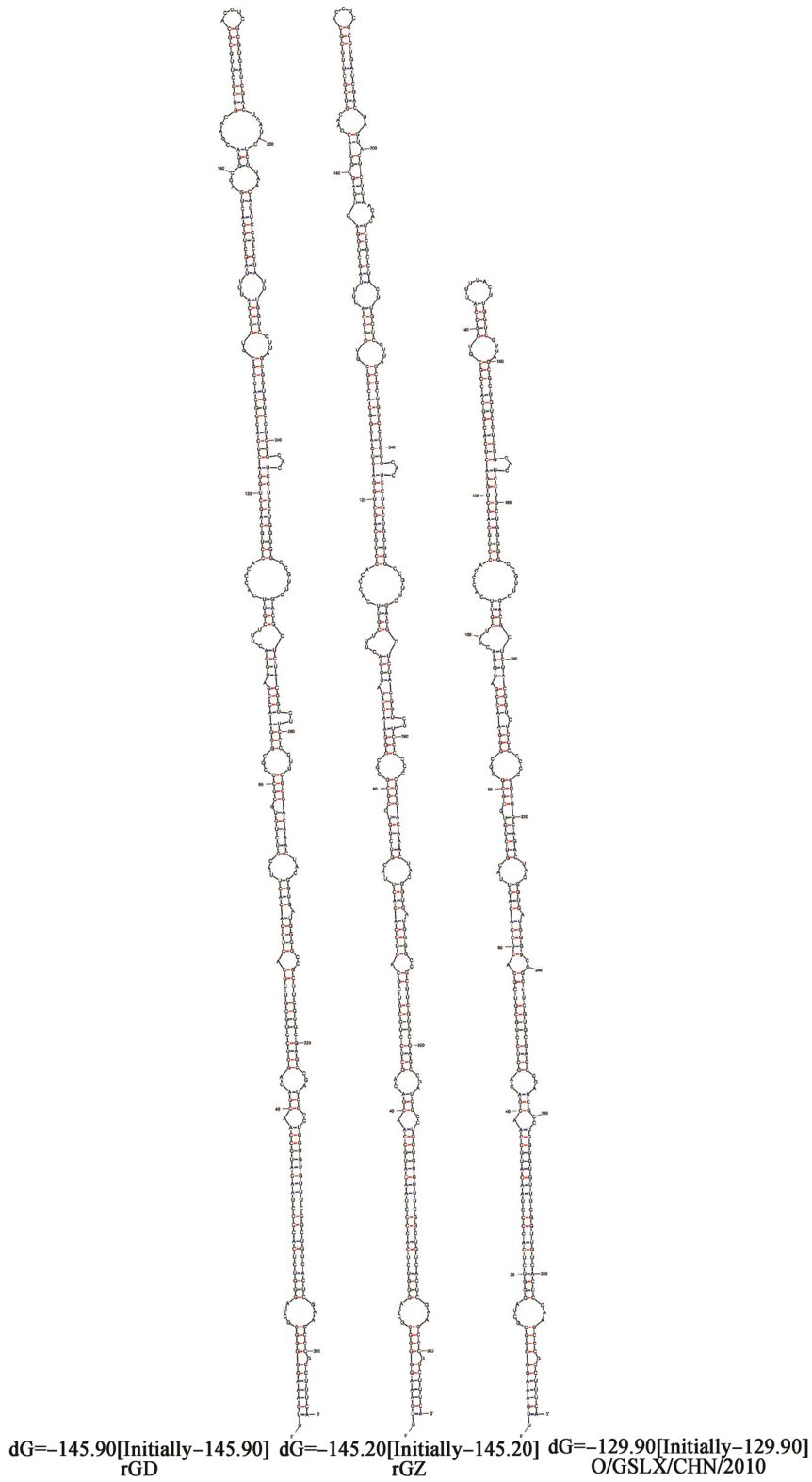


图 2 3 株 Mya-98 谱系 FMDV S 片段的二级结构  
Figure 2 Predicted secondary structures of S-fragment of three FMDVs in O/SEA/Mya-98 lineage

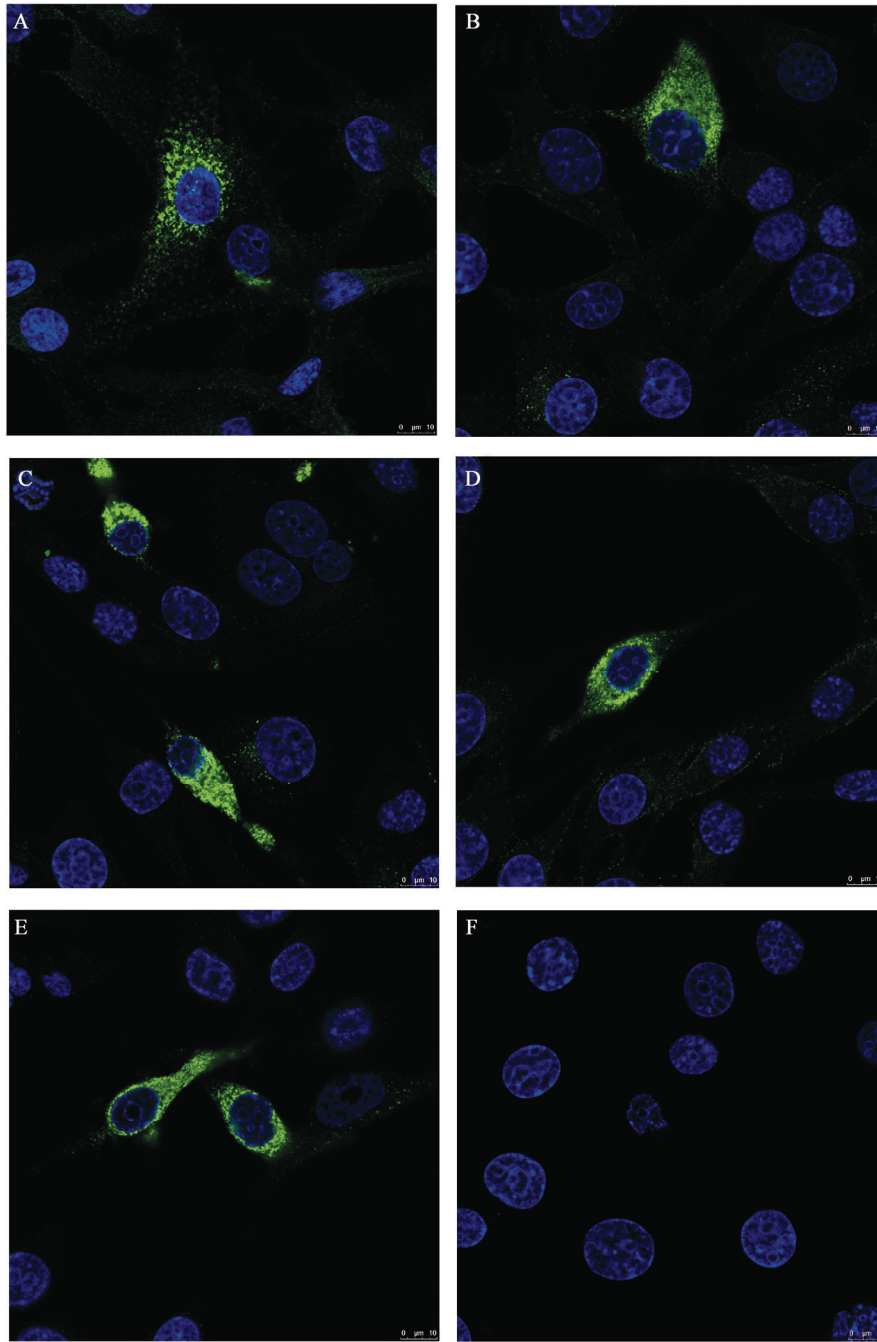


图 3 间接免疫荧光试验检测 FMDV 非结构蛋白 3A 的表达

Figure 3 Indirect immunofluorescence assay for FMDV nonstructural protein 3A expression

Note: A: rGD; B: rGDexc; C: rGZ; D: rGZexc; E: O/GSLX/CHN/2010; F: Mock.

进行 *t* 检验, ns 代表差异不显著(No significant), \*代表差异显著( $P < 0.05$ ), \*\*和\*\*\*代表差异极显著( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )。由结果可知, 嵌合病毒 rGDexc、rGZexc 与亲本基因工程病毒 rGD、rGZ 在病毒 RNA 复制能力、病毒滴度方面没有明显差异。即使嵌合了 O/GSLX/CHN/2010 的 S 片段, 嵌合病毒 RNA 的复制能力和病毒滴度并没有变弱, 仍明显强于 O/GSLX/CHN/2010 (图 4、5)。这表明嵌合病毒核酸复制和病毒粒子产生的速率并没有因为嵌合了 O/GSLX/CHN/2010 的 S 片段而降低。

## 2.4 嵌合病毒对乳鼠致病力的检测

乳鼠对 FMDV 和牛等动物一样敏感, 是常用的测定 FMDV 致病力的实验动物<sup>[12]</sup>。当给乳鼠接种 100  $\mu\text{L}$  的 PBS 或 0.01  $TCID_{50}/100 \mu\text{L}$  的病毒(图 6A)时, 接种后 7 d 内所有接种的乳鼠均存活。当给乳鼠接种 100  $\mu\text{L}$  的 0.1  $TCID_{50}/100 \mu\text{L}$  的病毒(图 6B)时, 接种 O/GSLX/CHN/2010、rGZ 和 rGZexc 的乳鼠接种 7 d 后均存活 100%, 接种 rGD 和 rGDexc 的乳鼠接种 7 d 后均存活 90%。当给乳鼠接种 100  $\mu\text{L}$  的 1  $TCID_{50}/100 \mu\text{L}$  的病毒(图 6C)时, 接种 7 d 后, 接种

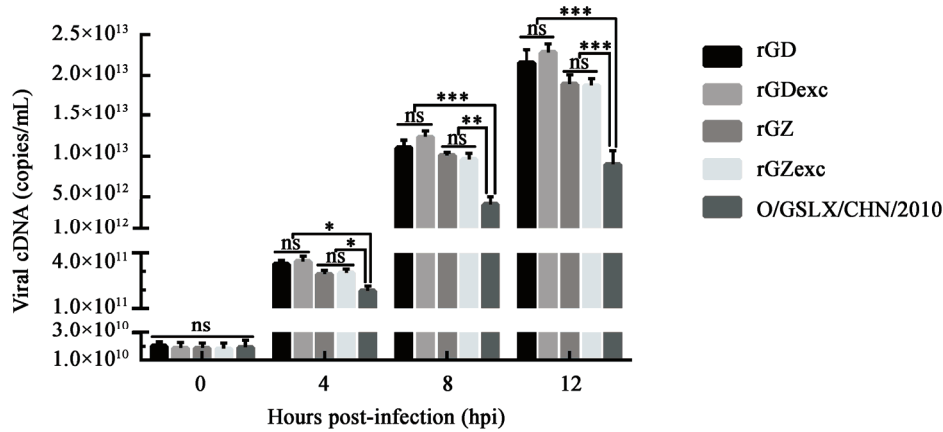


图 4 FMDV RNA 复制能力的检测

Figure 4 Determination of FMDV RNA replication

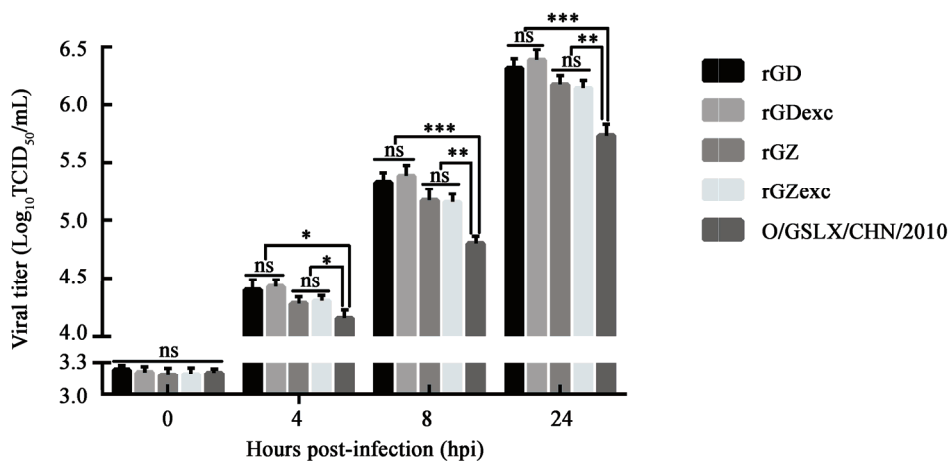


图 5 FMDV 病毒滴度的检测

Figure 5 Determination of FMDV viral titer



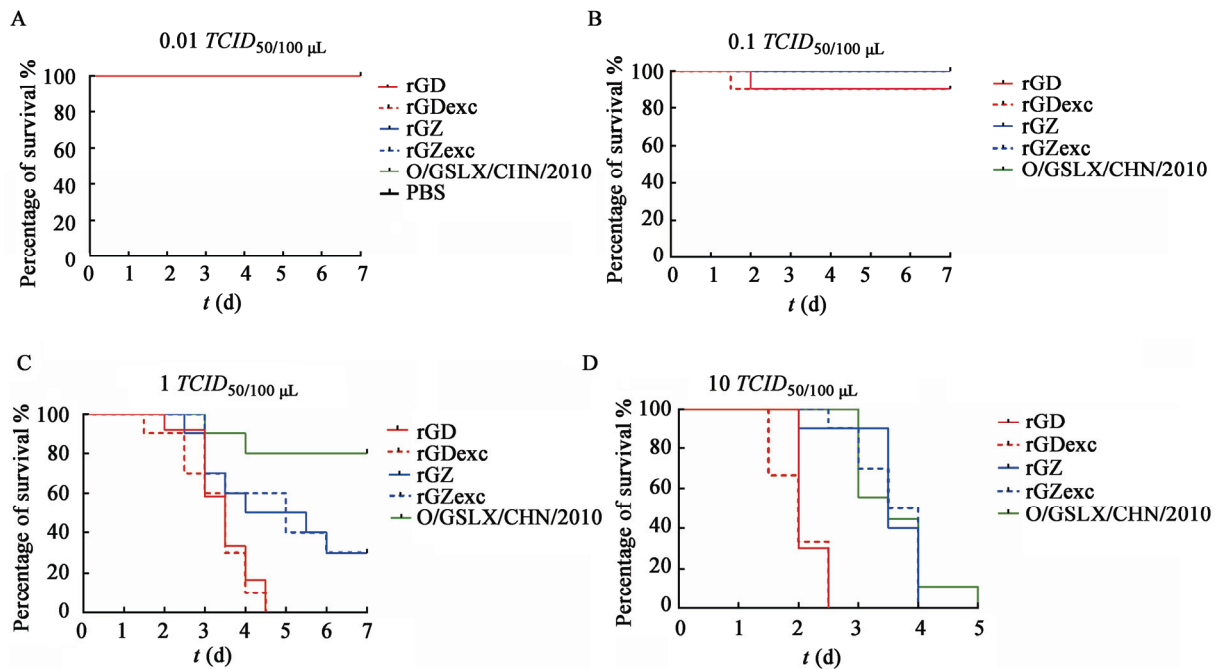


图6 FMDVs对乳鼠致病力的检测  
Figure 6 Virulence of FMDVs in suckling mice

O/GSLX/CHN/2010的乳鼠的存活率最高(80%),接种rGZ和rGZexc的乳鼠均能存活30%。而接种rGD和rGDexc的乳鼠在接种后4.5 d死光。当给乳鼠接种100  $\mu\text{L}$ 的10  $TCID_{50}/100 \mu\text{L}$ 的病毒(图6D)时,接种O/GSLX/CHN/2010的乳鼠在5 d后死光,接种rGZ和rGZexc的乳鼠在4 d后死光,接种rGD和rGDexc的乳鼠只需2.5 d就死光了。这表明,嵌合O/GSLX/CHN/2010的S片段后,嵌合病毒对乳鼠的致病力没有明显改变,仍然比O/GSLX/CHN/2010要强。

### 3 结论

反向遗传操作是研究表型和基因型之间关系的有力工具,尤其适合研究病毒这种基因组较小的有机体<sup>[13-14]</sup>。相对于一般的Mya-98谱系毒株,分离自2010-2011年Mya-98大流行中的O/GSLX/CHN/2010在其S片段的中部缺失70个碱基。2010年之前分离的3株A型和1株C型FMDV也被提到存在类似缺失,但是文献中并没有描述具有这种特征性S片段的毒株的表型<sup>[15]</sup>。2010-2011年,

Mya-98在东亚的大流行暴发了数百次疫情<sup>[16]</sup>,但是只在两次疫情中分离到了具有这种特征性S片段的毒株。将分离的O/GSLX/CHN/2010进行蚀斑纯纯化后,O/GSLX/CHN/2010与同谱系毒株相比,基因组RNA复制较慢,病毒滴度较低,对乳鼠的致病力也较差。这种较弱的表型可能正是大流行中具有该特征性S片段的毒株传播范围小、分离到的数量少的原因。在本研究中,借助病毒反向遗传操作,分别以两株现存的近缘FMDV感染性克隆为骨架,嵌合上O/GSLX/CHN/2010的S片段,然后通过评价和比较嵌合病毒与亲本毒的生物学特点,来探讨O/GSLX/CHN/2010特征性的S片段与其较弱的表型之间的联系。致细胞病变效应、反转录PCR和间接免疫荧光等结果表明,嵌合病毒rGDexc和rGZexc拯救成功。病毒RNA复制、病毒滴度、病毒对乳鼠致病力实验表明,嵌合病毒rGDexc、rGZexc的生物学表型与各自的亲本毒rGD、rGZ相当,且各项指标显著强于弱毒株O/GSLX/CHN/2010,嵌合O/GSLX/CHN/2010的S片段并没有使病毒致弱。

长期以来, FMDV 的 S 片段被认为与病毒 RNA 的复制、毒力有关。虽然还没有明确的实验证据, 但是许多实验结果佐证了这一推测。一方面, S 片段可以和聚胞嘧啶结合蛋白(PCBP1-PCBP2)<sup>[17]</sup>、RNA 解旋酶 A (RNA Helicase A, RHA)<sup>[18]</sup>、病毒自身的 3'-UTR<sup>[19]</sup>结合并互作, 而 PCBP1-PCBP2、RHA 被认为是病毒复制复合体的组成部分, 3'-UTR 也被认为是调节病毒复制、翻译的开关。而且, S 片段上的点突变可能会因为破坏了其发挥功能的结构基础, 使得在 S 片段仅引入一个碱基的突变就无法拯救到活病毒<sup>[20]</sup>。另一方面, S 片段折叠形成的高级结构被鉴定为一种病原相关分子模式, 可以诱发宿主的先天性免疫反应, 进而使宿主产生抗病毒应答<sup>[21]</sup>。而宿主的抗病毒应答与病毒的毒力其实是从两个角度阐释的同一个问题。

与另 2 株近缘毒株相比, O/GSLX/CHN/2010 的 S 片段除了在第 149-218 位存在 70 个碱基的缺失外, 还在 S 片段存在至少 4 个碱基的差异。这些核酸一级结构上的差异很可能影响到 S 片段的二级结构和高级结构, 进而通过影响与相应蛋白、核酸的相互作用影响病毒的表型。两嵌合病毒都能拯救成功, 说明 rGD、rGZ 的骨架可以容纳 O/GSLX/CHN/2010 的 S 片段。病毒骨架与外来 S 片段匹配时, 外来 S 片段引入的每一项变异都可能对嵌合毒的表型产生影响。而从实验结果看, 嵌合毒 rGDexc、rGZexc 的表型与亲本毒 rGD、rGZ 的表型相当, 说明各项基因型变异叠加作用的结果相互抵消了对病毒表型的改变。

作为一株弱毒, O/GSLX/CHN/2010 和一般 Mya-98 谱系 FMDV 毒株的差异不仅在 S 片段上, 还存在于全基因组的许多元件中。比如, 构成复制复合体的 2C、3A、3B 编码区和 3'-UTR 上的变异很可能会影响病毒的复制, 组成衣壳的 VP2、VP3、VP1 上的变异很可能会影响病毒对细胞的入侵进而影响核酸复制、病毒粒子包装、滴度和毒力。L<sup>pro</sup> 和 3C<sup>pro</sup> 作为蛋白酶可以切割或降解 FMDV 自身翻

译产生的多聚蛋白、宿主的真核翻译起始因子 eIF4G<sup>[22]</sup>、干扰素调节因子 IRF3/7<sup>[23]</sup>、核因子 NF- $\kappa$ B<sup>[24]</sup>、NF- $\kappa$ B 必需调节因子 NEMO<sup>[25]</sup>、定位在细胞核的 RNA 结合蛋白 Sam68<sup>[26]</sup>、内部核糖体进入位点 IRES 的结合蛋白 Gemin5<sup>[27]</sup>、核转运受体蛋白 KPNA1<sup>[28]</sup>等, 从而广泛地参与对病毒复制、翻译、包装、诱导先天性免疫和毒力等方面的调节。L<sup>pro</sup> 和 3C<sup>pro</sup> 上的变异很可能对蛋白酶的切割位点和效率产生影响, 进而影响 FMDV 的 RNA 复制、病毒滴度和毒力。尤其是 L<sup>pro</sup> 在第 9 个氨基酸后多出 1 个缬氨酸, 这一插入突变之前从未报道过, 其对病毒表型的影响很值得研究。综上, O/GSLX/CHN/2010 基因组上诸多变异都可能导致其较弱的表型, 究竟哪种突变起了关键作用, 还有待深入鉴别。

本研究表明 O/GSLX/CHN/2010 特征性的 S 片段不能独自决定其较弱的表型, 这一发现为进一步研究 O/GSLX/CHN/2010 的致弱机制、S 片段 70 nt 的缺失等奠定了基础。构建 O/GSLX/CHN/2010 的感染性克隆并依次替换 O/GSLX/CHN/2010 上的变异, 直接在 rGD 和 rGZ 感染性克隆的 S 片段上删除相应的 70 nt 等将成为我们接下来的实验计划。

## 参 考 文 献

- [1] Grubman MJ, Baxt B. Foot-and-mouth disease[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2004, 17(2): 465-493
- [2] Domingo E, Baranowski E, Escarmis C, et al. Foot-and-mouth disease virus[J]. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Disease*, 2002, 25(5/6): 297-308
- [3] Clarke BE, Brown AL, Currey KM, et al. Potential secondary and tertiary structure in the genomic RNA of foot and mouth disease virus[J]. *Nucleic Acids Research*, 1987, 15(17): 7067-7079
- [4] Newton SE, Carroll AR, Campbell RO, et al. The sequence of foot-and-mouth disease virus RNA to the 5' side of the poly(C) tract[J]. *Gene*, 1985, 40(2/3): 331-336
- [5] Mason PW, Grubman MJ, Baxt B. Molecular basis of pathogenesis of FMDV[J]. *Virus Research*, 2003, 91(1): 9-32
- [6] Belsham GJ. Translation and replication of FMDV RNA[J]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2005, 288: 43-70
- [7] Valdazo-González B, Timina A, Scherbakov A, et al. Multiple introductions of serotype O foot-and-mouth disease viruses into East Asia in 2010-2011[J]. *Veterinary Research*, 2013, 44: 76
- [8] Ma XQ, Li PH, Bai XW, et al. Sequences outside that of residues 93-102 of 3A protein can contribute to the ability of foot-and-mouth disease virus (FMDV) to replicate in bovine-derived cells[J]. *Virus Research*, 2014, 191: 161-171

- [9] Li PH, Lu ZJ, Bai XW, et al. Evaluation of a 3A-truncated foot-and-mouth disease virus in pigs for its potential as a marker vaccine[J]. *Veterinary Research*, 2014, 45(1): 263
- [10] Zhang M, Bai XW, Li PH, et al. Foot-and-mouth disease virus O/CHN/Mya98/33-P strains leading protein effects on the virus infection[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(10): 2052-2060 (in Chinese)  
张萌, 白兴文, 李平花, 等. 口蹄疫病毒 O/CHN/Mya98/33-P 株前导蛋白对病毒感染性的影响[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(10): 2052-2060
- [11] Zeng JX, Wang HW, Xie XC, et al. Ribavirin-resistant variants of foot-and-mouth disease virus: the effect of restricted quasispecies diversity on viral virulence[J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(8): 4008-4020
- [12] Habiela M, Seago J, Perez-Martin E, et al. Laboratory animal models to study foot-and-mouth disease: a review with emphasis on natural and vaccine-induced immunity[J]. *Journal of General Virology*, 2014, 95(Pt11): 2329-2345
- [13] Boyer JC, Haenni AL. Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses[J]. *Virology*, 1994, 198(2): 415-426
- [14] Evans DJ. Reverse genetics of picornaviruses[J]. *Advances in Virus Research*, 1999, 53: 209-228
- [15] Carrillo C, Tulman ER, Delhon G, et al. Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus[J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(10): 6487-6504
- [16] Knowles NJ, He JJ, Shang YJ, et al. Southeast Asian foot-and-mouth disease viruses in Eastern Asia[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2012, 18(3): 499-501
- [17] Rodríguez-Pulido M, Serrano P, Sáiz M, et al. Foot-and-mouth disease virus infection induces proteolytic cleavage of PTB, eIF3a,b, and PABP RNA-binding proteins[J]. *Virology*, 2007, 364(2): 466-474
- [18] Lawrence P, Rieder E. Identification of RNA Helicase A as a new host factor in the replication cycle of foot-and-mouth disease virus[J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(21): 11356-11366
- [19] Serrano P, Pulido MR, Sáiz M, et al. The 3' end of the foot-and-mouth disease virus genome establishes two distinct long-range RNA-RNA interactions with the 5' end region[J]. *Journal of General Virology*, 2006, 87(10): 3013-3022
- [20] Mohapatra JK, Pandey LK, Pattnaik B. RNA structure disrupting G<sub>320</sub>-T transversion within the short fragment of the 5' untranslated region prevents rescue of infectious foot-and-mouth disease virus[J]. *Journal of Virological Methods*, 2014, 196: 100-103
- [21] Rodríguez-Pulido M, Borrego B, Sobrino F, et al. RNA structural domains in noncoding regions of the foot-and-mouth disease virus genome trigger innate immunity in porcine cells and mice[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(13): 6492-6501
- [22] Roberts PJ, Belsham GJ. Identification of critical amino acids within the foot-and-mouth disease virus leader protein, a cysteine protease[J]. *Virology*, 1995, 213(1): 140-146
- [23] Wang D, Fang LR, Luo R, et al. Foot-and-mouth disease virus leader proteinase inhibits dsRNA-induced type I interferon transcription by decreasing interferon regulatory factor 3/7 in protein levels[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 399(1): 72-78
- [24] de Los Santos T, Diaz-San Segundo F, Grubman MJ. Degradation of nuclear factor kappa B during foot-and-mouth disease virus infection[J]. *Journal of Virology*, 2007, 81(23): 12803-12815
- [25] Wang D, Fang LR, Li K, et al. Foot-and-mouth disease virus 3C protease cleaves NEMO to impair innate immune signaling[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(17): 9311-9322
- [26] Lawrence P, Schafer EA, Rieder E. The nuclear protein Sam68 is cleaved by the FMDV 3C protease redistributing Sam68 to the cytoplasm during FMDV infection of host cells[J]. *Virology*, 2012, 425(1): 40-52
- [27] Piñeiro D, Ramajo J, Bradrick SS, et al. Gemin5 proteolysis reveals a novel motif to identify L protease targets[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(11): 4942-4953
- [28] Du YJ, Bi JS, Liu JY, et al. 3C<sup>pro</sup> of foot-and-mouth disease virus antagonizes the interferon signaling pathway by blocking STAT1/STAT2 nuclear translocation[J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(9): 4908-4920