

一株 A 型口蹄疫流行毒株全序列的测定及其全长感染性克隆的构建

袁子文^{1,2} 李平花² 孙普² 白兴文² 袁红² 马雪青² 卢曾军²
刘在新^{2*} 魏彦明^{1*}

(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 家畜疫病病原生物学国家重点实验室 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】测定一株 A 型口蹄疫流行毒株的全基因组序列,并构建其全长感染性克隆。【方法】参照已公布的 A 型口蹄疫病毒序列设计引物,将分离的口蹄疫病毒株 A/Sea-97/CHA/2014 全基因组分为 4 个重叠的片段进行 RT-PCR 扩增,并对其进行序列测定与分析。利用酶切连接法将 4 个基因片段依次克隆至 pBlueScript SKhdv 载体中,构建该流行毒株的全长 cDNA 克隆 pQAHN。pQAHN 经 *Not* I 线性化后转染表达 T7 RNA 聚合酶的 BSR/T7 细胞,拯救病毒。【结果】口蹄疫病毒全基因组序列测定结果表明该毒株基因组全长 8 171 bp [不包括 poly(C)区段和 poly(A)尾巴],开放阅读框为 6 996 bp,编码 2 332 个氨基酸,5'和 3'非编码区分别为 1 091 bp 和 95 bp。VP1 系统发生树分析表明该毒株与 A/GDMM/CHA/2013 毒株亲缘关系最近,相似性为 99.1%。线性全长质粒转染 BSR/T7 细胞 68 h 后可观察到典型的细胞病变。拯救病毒的间接免疫荧光、RT-PCR 和序列测定结果表明成功拯救出了具有感染性的 FMDV。拯救病毒与亲本病毒的噬斑表型及生长曲线试验表明二者具有相似的生长表型和增殖能力。【结论】该研究为我国口蹄疫病原生态分布、分子流行病学调查以及 A 型 FMD 新型疫苗的研究提供了有益的材料。

关键词: A 型口蹄疫病毒,全序列测定,全长感染性克隆

Foundation item: The Central Level Public Welfare Scientific Research Institutes for Basic Scientific Research Special Fund (No. 1610322015021)

*Corresponding authors: E-mail: LIU Zai-Xin: liuzaixin@caas.cn; WEI Yan-Ming: weiyam@gsau.edu.cn

Received: September 30, 2015; Accepted: December 30, 2015; Published online (www.cnki.net): January 04, 2016
基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(No. 1610322015021)

*通讯作者: E-mail: 刘在新: liuzaixin@caas.cn; 魏彦明: weiyam@gsau.edu.cn

收稿日期: 2015-09-30; 接受日期: 2015-12-30; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-01-04

Complete genome sequence analysis and construction full-length infectious cDNA clone of an epidemic Foot-and-mouth disease virus of serotype A

YUAN Zi-Wen^{1,2} LI Ping-Hua² SUN Pu² BAI Xing-Wen² YUAN Hong²
MA Xue-Qing² LU Zeng-Jun² LIU Zai-Xin^{2*} WEI Yan-Ming^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

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

Abstract: [Objective] Sequencing and analysis complete genome of an epidemic foot-and-mouth disease virus of serotype A and construction of its full-length infectious cDNA clone. [Methods] The primers were designed according to the published genome sequence of type A FMDV and a total of four fragments covering the complete genome of A/Sea-97/CHA/2014 were subsequently PCR amplified and sequenced. The four fragments were cloned into pBlueScript SKhdv vector in turn with a single restriction sites to construct a full-length cDNA clone of A/Sea-97/CHA/2014 strain. The full-length plasmid linearized with *Not* I and transfected to BSR/T7 cells expressing T7 RNA polymerase to rescue the recombinant virus. [Results] The result of sequence analysis showed that FMDV A/Sea-97/CHA/2014 strain was 8 171 bp in length [except poly(C) and poly(A)], which contains a 5'-UTR with 1 091 bp, a 3'-UTR with 95 bp and a ORF encoding 2 332 amino acids with 6 996 bp. The phylogenetic tree based on the nucleotide sequences of VP1 gene revealed that the A/Sea-97/CHA/2014 strain had a high sequence identity with A/GDMM/CHA/2013 strain (99.1%). The full-length plasmid transfected to BSR/T7 cells, apparent CPE were observed after 68 h incubation. The harvested virus was verified by IFA, RT-PCR and sequencing. The results indicated that infectious FMDV was successfully rescued in vivo. Plaque phenotype and growth curves tests of rescue virus and parental virus showed they have a similar growth phenotype and capacity of proliferation. [Conclusion] This study provided a useful material for studies of the FMD pathogen ecological distribution, molecular epidemiological as well as novel marker vaccines.

Keywords: Serotype A foot-and-mouth disease virus, The complete genome sequence, Full-length infectious clone

口蹄疫(Foot-and-mouth disease, FMD)是猪、牛、羊等主要家畜和野生偶蹄动物感染的一种急性、热性、高度接触性传染病。该病传播迅速、发病率高,因此世界动物卫生组织(OIE)将其列为必报疫病,我国规定为一类动物传染病^[1]。该病的暴发和流行将严重危害家畜的生产力和畜产品质量,影响到一个国家的经济发展、国际贸易、社会稳定和国际声誉,因此世界各国都十分重视对该病的防控。

FMD 的病原为口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus, FMDV),它属于小 RNA 病毒科(Picornaviridae)口蹄疫病毒属(Aphthovirus)。病毒基

因组为单股正链 RNA,长约 8 500 个核苷酸(bp),由 5'非编码区(Untranslated regions, UTR)和一个大的开放阅读框(Open reading frame, ORF)及 3'-UTR 3 部分组成^[2]。开放阅读框编码一多聚蛋白,该蛋白经多次裂解后可形成 4 种结构蛋白(VP4、VP2、VP3 和 VP1)和 10 种非结构蛋白(L、2A、2B、2C、3A、3B₁、3B₂、3B₃、3C 和 3D),结构蛋白组成病毒衣壳,非结构蛋白与病毒复制有关^[3]。FMDV 存在 7 个血清型(A、O、C、Asial、SAT1、SAT2 和 SAT3 型),每个血清型又分为不同的亚型,型间无交叉保护^[4]。另外,FMDV 是 RNA 病毒,具有准种特性,压力选择会导致病毒在毒力和抗原性方面

极易发生变异^[1], 尤其是结构蛋白 VP1 基因^[5]。FMDV 的多型性和易变性给 FMD 的防治带来了极大的困难。

我国是 FMD 的重灾国, O 型 FMD 在我国流行已久, 且危害最为严重。但近几年来, A 型 FMD 在我国呈现出流行暴发。如 2009 年在武汉、上海、江苏、广西、贵州、山东、新疆等地先后暴发 A 型 FMD。2013 年在广州、云南、青海、西藏和新疆 5 个省(自治区)发生 16 起 A 型 FMD 疫情。此外, 2014 年至今已报道有 8 起 A 型 FMD 疫情。分子流行病学分析结果表明, 这些 A 型 FMD 疫情是由来源于东南亚国家的 A/Sea-97 毒株引起, 除 2009 年是由 A/Sea-97 G1 分支毒引起外, 其余主要由 A/Sea-97 G2 分支毒引起^[6]。田间流行情况和实验室感染试验表明 A/Sea-97 毒株主要感染牛, 也可引起猪发病, 尤其是 A/Sea-97 G2 分支毒对猪的致病性更强, 对畜牧业产生的危害更严重。这些 A 型 FMD 的暴发不仅增加了我国 FMD 流行形势的复杂性, 更向我国 FMD 的防控工作提出了新的挑战。疫苗免疫是当前防控口蹄疫最便利、最有效的手段, 但传统灭活疫苗在血清学上无法区分免疫动物与自然感染动物这一弊端, 严重阻碍了我国口蹄疫流行病学调查及疫病净化。口蹄疫病毒反向遗传学的兴起, 对口蹄疫病毒的疫苗研究起了极大的推动作用。利用该技术, 人们在快速获得纯系病原体的同时, 还可按照自己的意愿改造病原体(如通过修饰或缺失病毒复制非必需基因), 不但可发展具有鉴别诊断能力的标记疫苗, 而且可同时修饰抗原表位基因, 改善疫苗免疫力及拓展病毒抗原谱, 从而更好地用于疫病预防^[7]。另外, 面对当前 A 型 FMDV 的变异, 致使现用疫苗与流行毒株的抗原差异拉大, 已不能够对免疫动物提供完全的预防和保护, 从技术层面看, 需筛选与当前流行毒株相匹配的疫苗候选毒株。因此积极建立流行毒株反向遗传操作平台及利用该平台进行具有鉴别诊断新型疫苗的研究对我国口蹄疫的防控乃至净化意义深远。

鉴于此, 本研究对当前流行的一株 A 型 FMDV A/Sea-97/CHA/2014 株进行全序列测定和分析, 并在此基础上构建其全长克隆, 通过体内转录的方法拯救到了重组病毒。该 A 型流行毒株感染性克隆的成功构建为进一步发展具有鉴别诊断的新型标记疫苗奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 病毒、细胞、菌株及参考序列

口蹄疫病毒株 FMDV A/Sea-97/CHA/2014 由本实验室分离保存。BHK-21 细胞、pBlueScript SKhdv 载体由本实验室保存。大肠杆菌 JM 109 感受态细胞购自宝生物(大连)有限公司。A/GDMM/CHA/2013 等参考序列均引自 GenBank。

1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶、Reverse Transcriptase XL (AMV)、Prime STARTM HS DNA Polymerase、dNTPs、Recombinant RNase Inhibitor (RRI)、T4 DNA 连接酶、Triton-100、Agarose Gel DNA Purification Kit 均购自宝生物(大连)有限公司; DL10001 DNA marker 购自 Generay Biotech 公司; MEM、DMEM、胎牛血清、蛋白酶 K、LipofectamineTM 2000 购自 Invitrogen 公司; Easy Pure Plasmid Mini Prep Kit 购自 TransGen Biotech; RNeasy Mini Kit 购自 QIAGEN; FMDV A 型兔阳性血清由本实验室提供; FITC 标记的羊抗兔 IgG 二抗购自康为世纪公司。VersaDoc 凝胶成像系统、PCR 仪购自 Bio-Rad 公司; 荧光显微镜购自德国 Lecia 公司。

1.3 引物设计

根据已经公布的 A 型 FMDV 全基因组序列 (GenBank : KJ754939.1), 将 A/Sea-97/CHA/2014 株全基因组分为 4 个重叠的片段, 设计合成 4 对寡核苷酸引物, 同时设计一对用于引入分子标签的引物 (E 系列), 由上海桑尼有限公司合成(表 1)。

1.4 A/Sea-97/CHA/2014 株基因组全序列的扩增及序列分析

按 RNeasy Mini Kit (QIAGEN)说明书操作提取

表 1 构建 A/Sea-97/CHA/2014 株全长 cDNA 克隆的引物

Table 1 Oligonucleotide primers used for construction of a full-length cDNA clone of FMDV A/Sea-97/CHA/2014

引物名称 Primers	引物序列 Sequences (5'→3')	长度 Sizes (bp)
A1+	AGATGGCATGCTAATACGACTCACT ATAGGGTTGAAAGGGGGCGCTAG GGT	51
A1-	GGGGGGGGGGGGGGGGTGAAAGG CGGGCT	28
A2+	CCCCCCCCCCCCCAAGTACTAC CGTC	28
A2-	TGTCACCCCTCTAGACCTGG	20
A3+	GAGGACTTGACAAACACGA	20
A3-	CCTCCTTAATGGAGTCGTGT	20
A4+	GTTCAGGAGGTGATTGATCG	20
A4-	ATATGGCGGCCGCTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTT	46
E+	TCAAGCCTGTGGG <u>ACC</u> CACACAT GTCATTG	30
E-	CAATGACATGTGTGGG <u>CCC</u> CACA GGCTTGA	30

注：+：正向引物，-：反向引物。引物中的限制性内切酶位点用下划线标出，T7 启动子序列用斜体标出，突变碱基用双下划线标出。

Note: +: Represents the forward primer, -: Represents the reverse primer. The restriction sites were highlighted by underline. T7 promoter sequence is italicized. The mutated nucleotides were shown in double line.

口蹄疫病毒 A/Sea-97/CHA/2014 株的总 RNA，分别用 A2-，A3-和 A4-作为引物反转录合成 cDNA。以反转录的 cDNA 为模板，用引物 A1+/A1-、A2+/A2-、A3+/A3-和 A4+/A4-分别扩增 4 个相互重叠的 DNA 片段 A1、A2、A3 和 A4。凝胶纯化回

收 A1、A2、A3 和 A4 片段，置 -20 °C 备用。以回收的 A1 和 A2 片段为模板，用引物 A1+/A2-进行融合 PCR，得 A12 片段。凝胶纯化回收 A12 片段，备用。将凝胶回收的 A12、A3、A4 片段送至上海桑尼生物技术有限公司进行测序。利用 DNASTar 软件将测序结果进行拼接并推导其基因组组成。用软件 MegAlign 比较分析 A/Sea-97/CHA/2014 株与其他参考毒株的 VP1 基因序列，采用邻接法 (Neighbour-Joining, NJ) 绘制系统发生树，分析该流行毒株与其他参考毒株的遗传进化关系及遗传位置。

1.5 全长质粒构建及鉴定

将片段 A12、A4 分别用 *Sph* I /*Xba* I、*Bgl* II /*Not* I 双酶切后连入经同样酶切过的 pBlueScript SKhdv 载体，得到重组质粒 pSK-A12 与 pSK-A4。为了与亲本毒区分，利用融合 PCR 对 A3 片段引入 1 个同义突变作为分子标记(将基因组第 3 040 位 C 突变为 A)，将引入突变后的 A3 片段和重组质粒 pSK-A12 分别用 *Xba* I /*Bgl* II 双酶切消化后，纯化回收相应的目的片段，连接、转化和筛选阳性克隆，得到重组质粒 pSK-A123。最后用 *Bgl* II /*Not* I 分别消化重组质粒 pSK-A123 和 pSK-A4，纯化回收相应的目的片段，连接、转化和筛选阳性克隆，得到含 FMDV A/Sea-97/CHA/2014 株全长 cDNA 的克隆 pQAHN。酶切鉴定全长质粒 pQAHN，并将鉴定正确的全长质粒送至上海桑尼有限公司进行测序验证。A/Sea-97/CHA/2014 株基因组全长 cDNA 克隆的构建策略见图 1。

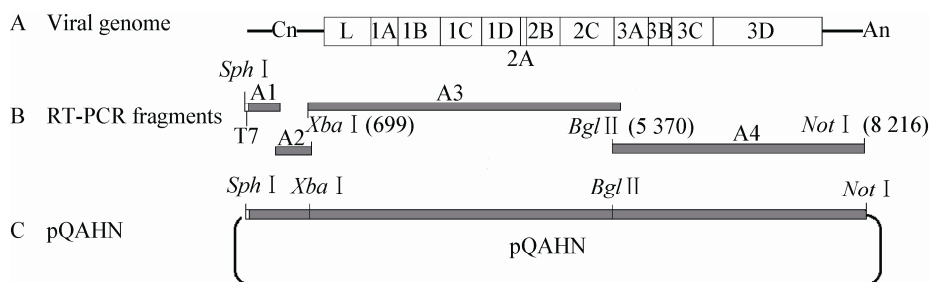


图 1 FMDV A/Sea-97/CHA/2014 株全长 cDNA 克隆的构建策略

Figure 1 Schematic diagram of the strategy for construction of FMDV A/Sea-97/CHA/2014 full-length cDNA clone

1.6 病毒拯救

按 EasyPure Plasmid Mini Prep Kit 试剂盒说明书操作, 提取全长质粒 pQAHN, 用限制性内切酶 *Not* I 将其线性化后加入蛋白酶 K (终浓度为 0.25 g/L) 37 °C 温育 30 min 后纯化回收, 用紫外分光光度计定量后作为转染样备用。当单层 BHK-21 细胞生长铺满至 70%–90% 时, 取 2 µg 转染样在 20 µL Lipofectamine™ 2000 的介导下进行转染, 同时用等量脂质体设空白对照。转染后 6 h 弃去细胞上清液, 加入 2 mL 含 8% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 放置 5% CO₂ 培养箱 37 °C 继续培养 72 h 后收获病毒。反复冻融 3 次后继续在 BHK-21 细胞上传代, 直到病毒能够稳定产生致细胞病变效应 (Cytopathic effects, CPE)。将拯救出的病毒命名为 r-A/Sea-97/CHA/2014。

1.7 拯救病毒的鉴定

1.7.1 拯救病毒的遗传稳定性分析: 将拯救的病毒在 BHK-21 细胞上连续传代, 期间观察 CPE 并记录病变的时间, 待病毒能够稳定传代后分别提取第 4、8 代病毒总 RNA, 采用 RT-PCR 方法扩增病毒含分子标记的基因片段 (A3 片段) 并测序, 验证拯救病毒的遗传稳定性。

1.7.2 间接免疫荧光检测抗原: 利用间接免疫荧光检测感染的 BHK-21 细胞是否有 FMDV 蛋白的表达, 在生长有 BHK-21 单层细胞的六孔板中分别接种第 4 代的重组病毒和亲本病毒, 同时设正常 BHK-21 细胞作为空白对照。5 h 后用 PBS 缓冲液漂洗 3 次, 吸干残液后用 4% 多聚甲醛固定, 30 min 后用 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min。吸干后加入含 0.2% Triton-100 的 PBS 通透 10 min, 用 PBS 漂洗 3 次吸干残液后滴加 FMDV A 型兔阳性血清, 置 37 °C 恒温箱中孵育 1 h 后再用 PBS 漂洗 4 次, 吸干后加 FITC 标记的羊抗兔 IgG, 置 37 °C 恒温箱中孵育 1 h。用 PBS 漂洗 4 次后滴加甘油封片, 用荧光显微镜观察并拍照。

1.8 蚀斑表型

取等体积的第 4 代拯救病毒及亲本病毒做

10 倍梯度稀释, 取 10⁻¹–10⁻⁶ 稀释度的病毒备用。用 PBS 洗涤预先在六孔板中培养的单层 BHK-21 细胞, 吸取不同稀释度的病毒接种于细胞上, 每孔 200 µL, 将接种好病毒的六孔板置于 37 °C 5% CO₂ 的培养箱中培养, 每隔 10 min 摇动一次六孔板, 1 h 后加入 2 mL Overlay 培养液 (2×MEM 和 1.2% 黄芪胶溶液等体积混匀后加入胎牛血清使其终浓度为 10 mL/L) 于 5% CO₂ 的培养箱中 37 °C 静置培养 48 h 后弃去培养液, 用 PBS 洗涤 2–3 次, 加入预冷的固定液 (50% 甲醛+50% 丙酮) 于 -20 °C 固定 10–30 min, 用结晶紫 (2 g/L) 染色 30 min, 用水冲洗后观察蚀斑表型并拍照。

1.9 拯救病毒的一步生长曲线

取 10⁶ 个蚀斑形成单位 (Plaque forming unit, PFU) 的第 4 代拯救病毒及亲本病毒接种 BHK-21 单层细胞, 将其置于 37 °C 5% CO₂ 的培养箱中吸附 1 h 后用 PBS 漂洗 3 次, 等量加入含 2% 胎牛血清的维持液培养, 分别在 4、8、12、16、20、24 h 后收获病毒, 用 Karber 法计算每瓶的半数组织培养感染量 (50% Tissue culture infective dose, TCID₅₀), 每个时间点做 3 个重复, 绘制病毒的一步生长曲线, 以比较重组病毒与亲本病毒之间的动态生长特性。

2 结果

2.1 A/Sea-97/CHA/2014 株基因组全序列的扩增

提取 A/Sea-97/CHA/2014 株的总 RNA, 分别用 A2-, A3- 和 A4- 作为引物, 反转录合成 cDNA 并以之为模板, 用引物 A1+/A1-, A2+/A2-, A3+/A3- 和 A4+/A4- 分别扩增出了预期大小的 A1、A2、A3 和 A4 片段, 以 A1、A2 片段为模板, 用引物 A1+/A2- 融合扩增出了 A12 片段 (图 2)。

2.2 A/Sea-97/CHA/2014 株的基因结构及系统进化树分析结果

测序结果显示 A/Sea-97/CHA/2014 株基因组全长 8 171 bp [不包括 poly(C) 序列及 Poly(A) 尾巴], 编码一个 2 332 个氨基酸组成的多聚蛋白, 其基因组组成见表 2。

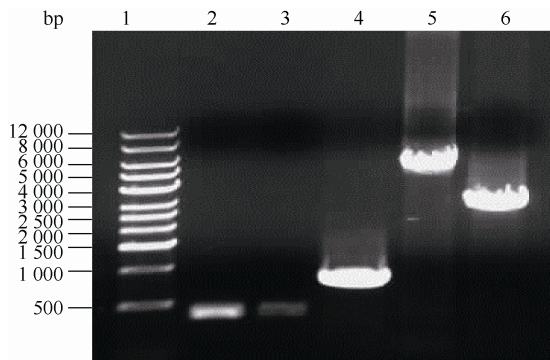


图2 RT-PCR 扩增 A1、A2、A3、A4 片段及 A12 片段的融合 PCR

Figure 2 RT-PCR amplification of A1, A2, A3, A4 fragments and Fusion PCR amplification A12 fragments

注: 1: DL10001 DNA marker; 2: A1 的 RT-PCR 产物; 3: A2 的 RT-PCR 产物; 4: A12 的融合 PCR 产物; 5: A3 的 RT-PCR 产物; 6: A4 的 RT-PCR 产物。

Note: 1: DL10001 DNA marker; 2: RT-PCR product of A1; 3: RT-PCR product of A2; 4: Fusion PCR products of A12; 5: RT-PCR product of A3; 6: RT-PCR product of A4.

利用分子生物学软件 MegAlign 对比分析 A/Sea-97/CHA/2014 株与其他 A 型 FMDV 参考毒株的 VP1 基因序列, 并采用邻接法(Neighbour-Joining, NJ)绘制系统进化树(图 3)。分析结果表明, 该流行毒株属于亚洲拓扑型(Asia toptype)东南亚 97 毒株(Sea-97 strain), 其与 A/GDMM/CHA/2013 处于同一分支。核苷酸序列对比结果表明该流行毒株与 A/HUBWH/CHA/2009、A/LAO/1/2006、A/LAO/6/2006 和 A/LAO/36/2003 毒株相似性在 90.6%–92.5%, 与我国历史毒株 AF/72 相似性为 78.3%, 与 2013 年流行毒株 A/GDMM/CHA/2013 相似性最高, 高达 99.1%。

2.3 全长质粒 pQAHN 的构建及鉴定

将 A/Sea-97/CHA/2014 株全基因分 4 个相互重叠的片段进行 RT-PCR 扩增, 然后将 4 个片段依次连接到 pBlueScript SKhdv 载体上, 得到含 A/Sea-97/

表 2 FMDV A/Sea-97/CHA/2014 基因组结构

Table 2 The genome organization of FMDV A/Sea-97/CHA/2014

基因组 Genome	5'-UTR	L	VP4	VP2	VP3	VP1	2A	2B	2C	3A	3B	3C	3D	3'-UTR
核苷酸 Nucleotide	1 091	603	255	654	663	636	48	447	969	459	213	639	1 410	95
氨基酸 Amino acid		201	85	218	221	212	16	149	323	153	71	213	470	

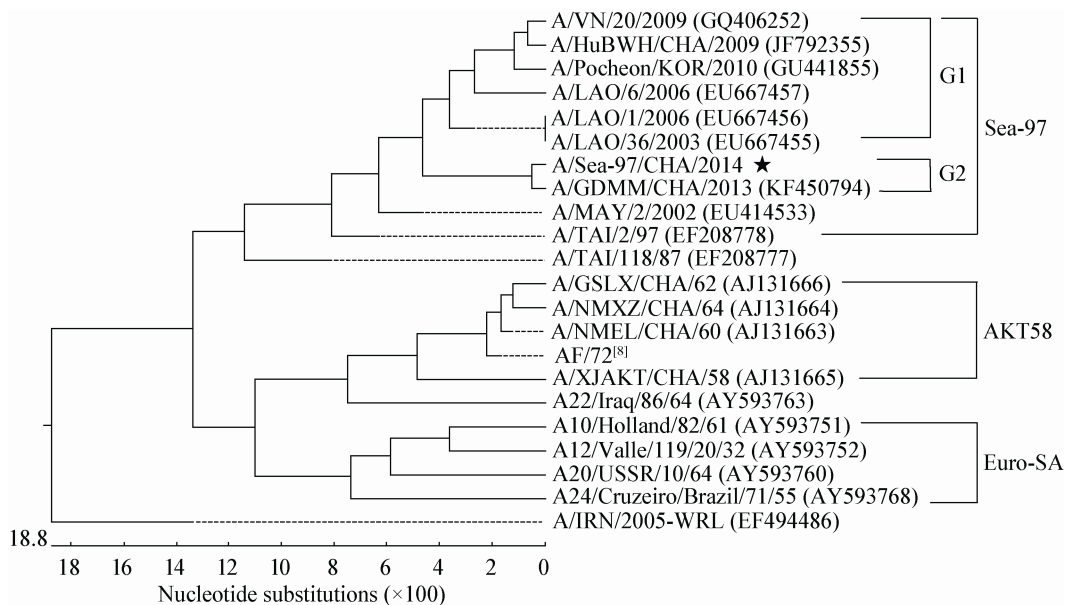


图3 FMDV A/Sea-97/CHA/2014 及参考毒株 VP1 基因系统发生树

Figure 3 FMDV A/Sea-97/CHA/2014 VP1 genomic phylogenetic tree

注: 括号内的数字为 GenBank 序列号; 标尺代表序列差异。

Note: Numbers in parenthese represent the sequences' accession number in GenBank; The scale bar represents sequence divergence.

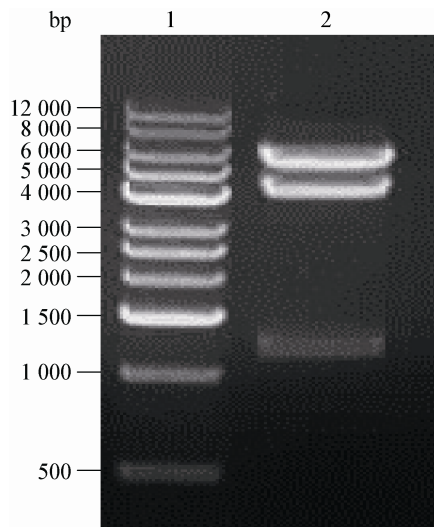


图 4 重组质粒 pQAHN 的酶切鉴定

Figure 4 Restriction endonuclease digestion of recombinant plasmid of pQAHN

注: 1: DL10001 DNA marker; 2: *Sph* I/*Eco*R I 双酶切鉴定 pQAHN.

Note: 1: DL10001 DNA marker; 2: *Sph* I/*Eco*R I double digestion of pQAHN.

CHA/2014 株基因组全长 cDNA 的克隆 pQAHN。该质粒用 *Sph* I 和 *Eco*R I 酶切鉴定, 结果得到与预期大小相符的目的条带(图 4)。对酶切鉴定正确的全长质粒 pQAHN 进行测序验证, 测序结果显示在 pBlueScript SKhdv 质粒载体的 *Sph* I/*Not* I 位点间成功插入了 A/Sea-97/CHA/2014 株的全基因组序列。

2.4 病毒的拯救

将经 *Not* I 线性化的全长质粒 pQAHN 转染 BSR/T7 单层细胞 68 h 后可出现明显的致细胞病变: 病变的细胞变圆, 呈葡萄串样。对照组细胞生长良好, 呈梭形, 形态完整, 轮廓清晰(图 5)。

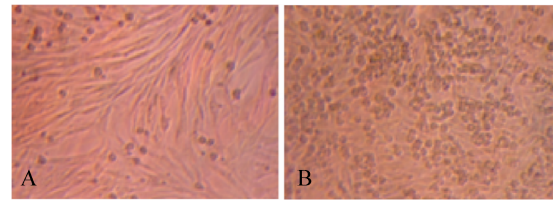


图 5 FMDV 拯救病毒感染 BHK-21 细胞的致细胞病变效应

Figure 5 Cytopathogenic effects of the recombinant viruses

注: A: 正常的 BHK-21 细胞; B: 拯救病毒感染 BHK-21 细胞的 CPE.

Note: A: Normal BHK-21 cells; B: The CPE of recombinant virus.

2.5 拯救病毒遗传稳定性分析

将拯救病毒在 BHK-21 上连续传代, 细胞病变时间逐渐缩短, 病变更加典型, 传至第 8 代时病变时间逐渐稳定, 90% 以上细胞病变时间为 12 h。分别提取第 4、8 代细胞毒, RT-PCR 扩增含有分子标记的 A3 片段, 测序分析表明分子标记稳定存在(图略), 表明拯救到的病毒来自构建的感染性克隆, 且能够稳定遗传。

2.6 间接免疫荧光检测抗原

取第 4 代重组病毒和亲本病毒接种 BHK-21 细胞, 以正常 BHK-21 细胞作为空白对照, 分别对其进行间接免疫荧光染色, 以检测病毒蛋白的表达。荧光显微镜下观察结果表明在接种亲本病毒及拯救病毒的 BHK-21 细胞中有绿色荧光产生(图 6A、B), 而作为空白对照的正常 BHK-21 细胞中无特异荧光产生(图 6C)。表明重组病毒感染的 BHK-21 细胞中有 FMDV 蛋白的表达, 同时也表明拯救出了具有感染性的口蹄疫病毒。

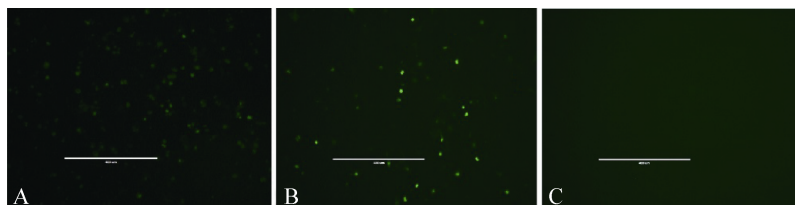


图 6 拯救感染 BHK-21 细胞的免疫荧光检测

Figure 6 Identification of FMDV infected BHK-21 cells by indirect immunofluorescence assay

注: A: 亲本病毒感染的 BHK-21 细胞; B: 拯救病毒感染的 BHK-21 细胞; C: 正常 BHK-21 细胞。

Note: A: BHK-21 cells infected with the parental virus; B: BHK-21 cells infected with the rescued virus; C: Normal BHK-21 cells.

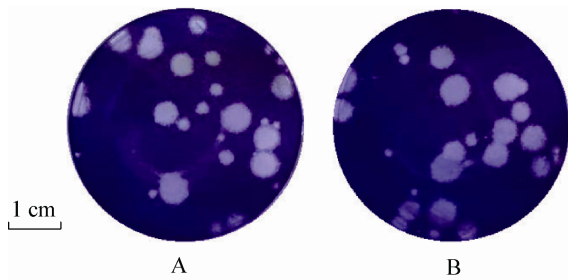


图 7 重组病毒与亲本病毒在 BHK-21 细胞上的蚀斑表型

Figure 7 Plaque phenotype of the recombinant viruses and the parental viruses in BHK-21 cells

Note: A: A/Sea-97/CHA/2014; B: r-A/Sea-97/CHA/2014.

2.7 蚀斑表型分析

为了描述病毒的生长特性和复制能力,分别对重组病毒和亲本病毒进行了蚀斑表型分析。蚀斑实验表明,重组病毒和亲本病毒均可在 BHK-21 细胞上形成蚀斑,且蚀斑形态大小与亲本病毒相似(图 7),表明二者具有相似的复制能力。

2.8 拯救病毒的一步生长曲线

为了进一步了解重组病毒的生长特性,分别取同等剂量(10^6 个 PFU)的第 4 代重组病毒及亲本病毒接种于 BHK-21 单层细胞,做病毒生长曲线分析(图 8)。结果表明,重组病毒与亲本毒株具有相似的复制能力和增殖特性,均在感染后 16 h 达到最高滴度。

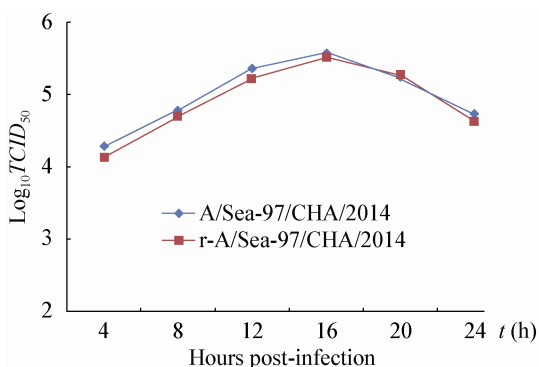


图 8 重组病毒与亲本病毒的生长曲线

Figure 8 Growth curve of the recombinant viruses and the parental viruses

3 讨论

2009–2014 年,我国及周边国家相继发生了多起 A 型 FMD 疫情,引起全球的广泛关注。从口蹄疫病毒的遗传物质入手,明确变异与遗传衍化的关系,才能深入了解 A 型 FMD 的疫情,分析疫源,为我国口蹄疫病原生态分布、分子流行病学等的研究提供材料^[9]。鉴于此,本研究将实验室分离的一株 A 型口蹄疫流行毒株进行分段扩增和序列测定分析。结果表明该毒株基因组全长 8 171 bp [不包括 poly(C)区段和 poly(A)尾巴],其中 5'-UTR 和 3'-UTR 分别为 1 091 bp 和 95 bp,蛋白编码区为 6 996 bp。VP1 序列分析表明,该毒株属于亚洲拓扑型(Asia toptype)东南亚 97 毒株(Sea-97 strain),与 2013 年流行毒株 A/GDMM/CHA/2013 相似性最高,达 99.1%,属于遗传关系高度密切的同一基因亚型。由此推测该毒株由 A/GDMM/CHA/2013 毒株衍化而来。该 A 型流行毒株全基因组序列的测定,为深入分析和研究 FMDV 的起源、分子演化,流行病学追踪等提供了可靠的科学依据,同时也为进一步建立该毒株的反向遗传奠定了基础。

RNA 病毒反向遗传操作技术的不断发展,为 RNA 病毒基因组的结构与功能、RNA 病毒的基因复制与表达调控机理、病毒的分子免疫机制以及新型疫苗等的研究提供了新的思路和方法。近年来,特别是在发展动物 RNA 病毒疫苗候选株上展现出了巨大的潜力,如流感病毒疫苗的研发和应用便是一个很好的例子^[10-12]。我国于 2014 年研发了 O 型 FMDV 3A 蛋白优势表位缺失的标记病毒,该病毒制备的灭活疫苗免疫猪既能够完全保护野生病毒的攻击,又能用配套的诊断方法与野生性病毒感染的动物相区分^[13]。但到目前为止,还没有关于 A 型 FMDV 标记疫苗的相关报道,因此为了给我国 A 型 FMDV 标记疫苗的研发奠定坚实的基础,本研究在完成了流行毒株 A/Sea-97/CHA/2014 全基因组序列测定的基础上,利用其自身单一酶切位点将 PCR 扩增得到的 4 个片段依次克隆至 pBlueScript SKhdv 载体中,构建了其感染性克隆 pQAHN。

实验中为了能快速、准确地完成构建并拯救出 FMDV, 我们采取如下措施: (1) 使用高保真 *Taq* 酶分段扩增病毒全基因组, 以保证序列的真实性; (2) 在病毒基因组 5'端上游引入 T7 启动子核心序列, 并将其克隆入剔除了 T7 启动子的载体, 在病毒基因组 3'末端引入 *Not* I 限制性酶切位点, 以确保全长 cDNA 能准确转录病毒 RNA; (3) 采用表达 T7 RNA 聚合酶的 BSR/T7 细胞系进行体内转录, 更加高效、简便地完成从病毒全长 cDNA 到 FMDV 的拯救。(4) 在构建过程中通过点突变引入了分子标记(基因组第 3 040 位 C 突变为 A)作为区分拯救病毒与亲本病毒的有力证据。

本研究测定了一株 A 型口蹄疫流行毒株的全基因组序列, 并构建了其基因组全长 cDNA 克隆, 通过脂质体转染法将其导入 BSR/T7 细胞进行体内转录, 68 h 后可观察到明显的 CPE。将收获的转染细胞连续传代, 仍可观察到明显的 CPE, 而且出现 CPE 的时间越来越短。对收获的病毒分别用间接免疫荧光、RT-PCR 和序列测定进行分析, 结果证实构建的 FMDV 的全长 cDNA 克隆具有感染性。拯救病毒与亲本病毒的蚀斑表型及生长曲线试验表明二者具有相似的生长表型和增殖能力。该流行毒株感染性克隆的成功构建为未来 A 型 FMDV 标记疫苗的研发奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Xie QG. Food-and-Mouth Disease[M]. Beijing: Chinese Agricultural Press, 2004: 24-58 (in Chinese)
谢庆阁. 口蹄疫[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 24-58
- [2] Grubman MJ, Baxt B. Foot-and-mouth disease[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2004, 17(2): 465-493
- [3] Ryan MD, Belsham GJ, King AMQ. Specificity of enzyme-substrate interactions in foot-and-mouth disease virus polyprotein processing[J]. Virology, 1989, 173(1): 35-45
- [4] de Los Santos T, Segundo FDS, 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]. Journal of Virology, 2009, 83(4): 1800-1810
- [5] Zhou Q, Bao HF, Liu ZX. Advance in persistent infection of foot-and-mouth disease virus[J]. Chinese Veterinary Science, 2012, 42(2): 205-210 (in Chinese)
周强, 包慧芳, 刘在新. 口蹄疫病毒持续感染的研究进展[J]. 中国兽医科学, 2012, 42(2): 205-210
- [6] He JJ, Guo JH, Liu XT. Current situation and prevention suggestion on foot-and-mouth disease in China[J]. Chinese Journal of Animal Health Inspection, 2015, 32(6): 10-14 (in Chinese)
何继军, 郭建宏, 刘湘涛. 我国口蹄疫流行现状与控制策略[J]. 中国动物检疫, 2015, 32(6): 10-14
- [7] Liu ZX. Progress and prospect of the technologies to control foot-and-mouth disease and its pathogen characteristics worldwide[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2015, 48(17): 3547-3564 (in Chinese)
刘在新. 全球口蹄疫防控技术及病原特性研究概观[J]. 中国农业科学, 2015, 48(17): 3547-3564
- [8] Liu XS, Wang YL, Zhang YG, et al. Identification of H-2d restricted t cell epitope of foot-and-mouth disease virus structural protein VP1[J]. Virology Journal, 2011, 8: 426
- [9] Xie Y, Mou YJ, Zhu L, et al. The whole genome sequencing and characteristics analysis of FMDV Serotype A/HeN/1/2009[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2013, 41(2): 640-641,700 (in Chinese)
谢毅, 牟一娇, 朱琳, 等. A 型口蹄疫病毒 A/HeN/1/2009 株全基因组序列的测定及其基因特征分析[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(2): 640-641,700
- [10] Hoffmann E, Krauss S, Perez D, et al. Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines[J]. Vaccine, 2002, 20(25/26): 3165-3170
- [11] Pappas C, Matsuoka Y, Swayne DE, et al. Development and evaluation of an influenza virus subtype H7N2 vaccine candidate for pandemic preparedness[J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2007, 14(11): 1425-1432
- [12] Capua I, Alexander DJ. Avian influenza: recent developments [J]. Avian Pathology, 2004, 33(4): 393-404
- [13] 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: 51