

口蹄疫病毒 OT 株的全基因组序列测定及比较分析

吕占禄, 王光祥, 尚佑军*, 刘湘涛*

(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
农业部畜禽病毒病重点开放实验室 国家口蹄疫参考实验室, 兰州 730046)

摘要: 参考 GenBank 上已发表的口蹄疫病毒(FMDV)全长基因组序列, 设计了覆盖基因组全长的数对引物, 通过 RT-PCR 方法对口蹄疫病毒 OT 株进行分段克隆及序列测定。结果表明不含 poly(C)序列的 OT 株基因组全长 8 142 nt, 开放读码框(ORF)长 6 969 nt, 编码 2 322 aa, 5'UTR 长 1 004 nt, 3'UTR 长 93 nt, 3'UTR 之后为 23 nt 的 poly(A)尾巴。应用分子生物学软件将 OT 株与 FMDV 其它参考毒株进行序列比对, 并对其基因特征进行分析。结果显示, OT 株的假结节(Pseudoknots)从第 415—499 位连续缺失 85 nt, 但是其 3A 基因却未发生碱基的缺失。其 VP1 基因的核苷酸同源性与 O/Akesu58、OMⅢ 两株最高, 但 OT 株在进化时间上要比 O/Akesu58、OMⅢ 早很多, 其毒株起源和遗传衍化关系还需要进一步的关注。

关键词: 口蹄疫病毒; 全基因组; 编码区; 分子生物学特性; 序列比对

中图分类号: S852. 659. 6

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)01-0090-08

Comparison and Analysis of the Complete Nucleotide Sequence of Foot-and-Mouth Disease Viruses OT Strain

LV Zhan-lu, WANG Guang-xiang, SHANG You-jun*, LIU Xiang-tao*

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

Abstract: Several pairs of primers were designed to amplify the complete genome of foot-and-mouth disease virus (FMDV) OT strain by RT-PCR and the complete genome was sequenced. Then all regions of OT strain genome were compared with those of the reference strains which sequences were obtained from GenBank, and their genetic characteristic were analyzed by molecular biological software. As a result, the genome of FMDV OT strain was 8 142 nt without poly(C) and, and was composed of 5' untranslated region (UTR), open-reading frame (ORF) and 3' UTR, their nucleotide is 1 004 nt, 6 969 nt and 93 nt respectively. The pseudoknots area of OT strains loss 85 nt at 415-499 region, but its 3A gene were not loss. And the OT strain shared closest homology with O/Akesu58 and OMⅢ, but OT strain derived earlier than O/Akesu58 and OMⅢ strains for many years. The origin and genetic derivation relationship of OT strain still need further attention.

Key words: foot-and-mouth disease virus; genome; coding region; sequence alignment; molecular characterization

收稿日期: 2011-05-18

作者简介: 吕占禄(1985-), 男, 土族, 青海格尔木人, 硕士生, 主要从事病毒流行病学研究, E-mail: lvzhanlu1015@163.com

* 通讯作者: 尚佑军, Tel: 0931-8343385, E-mail: yjshang71@hotmail.com; 刘湘涛, E-mail: hnxiangtao@sina.com

口蹄疫(Foot-and-Mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(Foot-and-Mouth disease virus, FMDV)引起偶蹄动物的一种急性、热性、高度接触性传染病,主要感染牛、羊、猪等家畜和野生动物,并且在动物及动物产品贸易中造成严重的经济损失。世界动物卫生组织(OIE)一直将其列为必须报告疫病,我国将其列为一类传染病。根据动物交叉保护和血清学试验, FMDV 可分为 O、A、C、SAT1、SAT2、SAT3 和 Asia 1 型共 7 种血清型,并且型间无交叉反应性,这 7 个血清型的口蹄疫病毒在长期感染动物的过程中,产生了许多变异毒株,目前已有 65 个亚型^[1]。而根据 VP1 核苷酸序列同源性,国际上又将 O 型 FMDV 分为欧洲-南美洲型(Euro-SA)、中东-南亚型(ME-SA)或泛亚型(PanAsia)、东南亚型(SEA)、古典中国型(Cathay)、西非型(WA)、东非型(EA)、印度尼西亚 1 型(ISA-1)和印度尼西亚 2 型(ISA-2)共 8 种拓扑型^[2]。

FMDV 属于小 RNA 病毒科口蹄疫病毒属的成员,其基因组为单股正链 RNA, 约由 8 500 个核苷酸(nt)组成。基因组的 5'端共价连接一种特殊的小蛋白 VPg(3B)^[3]。紧接着是 5'非翻译区(5' untranslated region, 5' UTR),中间部分是一个大的可读框(Open reading fragment, ORF),编码并翻译出 1 个多聚蛋白,经过一系列裂解,产生 4 种结构蛋白(VP1、VP2、VP3 和 VP4)和 10 种非结构蛋白(Lab/Lb、2A、2B、2C、3A、3B1-3、3C 和 3D)^[4]。5' UTR 依次由 S 片段(Small fragment)、聚胞嘧啶区(PolyC)、假结节(Pseudoknots, PKs)、顺式作用元件(The cis-acting replication element, cre)和内部核糖体进入位点(Internal ribosome entry site, IRES)构成,这个区有丰富的二级结构,起着稳定病

毒 RNA 的作用并参与调控病毒蛋白的翻译和 RNA 的复制^[5]。3'端带有 Poly(A)尾巴,其上游是 3'非翻译区(3' untranslated region, 3' UTR),长约 90 个核苷酸,能形成特殊的高级结构,这个区能够促进帽子结构的独立复制或者会影响病毒侵染循环的其他方面^[6-7]。

口蹄疫病毒基因组的基本结构对于研究其组成、功能和毒力的评价等方面是必须的。目前大多数 FMDV 分子序列的研究都基于部分基因片段序列的比较,尤其是 VP1^[8]。本研究采用 RT-PCR 方法对分离的 1 株牛源 O 型口蹄疫病毒 OT 株全基因组进行了分段克隆、测序。并与国内外参考毒株进行了序列比较和遗传进化分析,阐明了本毒株基因结构特点,为研究 FMDV 的致病机理、分子变异发生机制和基因组结构以及功能奠定了物质基础。

1 材料与方法

1.1 毒株

OT 株是从牛体中分离到的 1 株 O 型的口蹄疫病毒,由兰州兽医研究所病毒室保存。

1.2 酶与试剂

RNaeasy Mini kit 购自 QIAGEN 公司;所用的 AMV 反转录酶和 Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity 聚合酶购自 Invitrogen 公司;琼脂糖购自美国 Biowest 公司;Gel Extraction kit 购自 OMEGA 公司。

1.3 毒株参考序列

本研究引用的参考序列均引自 GenBank、EMBL、DDBJ 和 PDB 数据库,其序列号见表 1。

表 1 OT 株及其他参考毒株

Table 1 OT and the other FMDV reference strains

毒株	血清型	来源	传代史	GenBank 序列号
Isolate name	Serotype	Country of isolation	Passage history	GenBank Accession No.
O/Akesu/ 58	O	China	Bovine	AF511039
O/Tibet/ 99	O	China	Bovine	AJ539138
O/HKN/ 2002	O	China	Swine, BHK221 cell	AY317098
O/TW/ 97	O	China	Swine epithelium	AY593835
OM III	O	China	Bovine	AY359854
O/SKR/2002	O	Korea	Swin	AY312589

1.4 引物设计与合成

根据已发表的 O 型 FMDV 毒株序列,设计并合成了 7 对具有相互重叠的特异引物(表 2)。使除了 Poly (C) 区段外每两个相邻片段相互重叠(最少的重叠有 80 bp)(图 1)。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

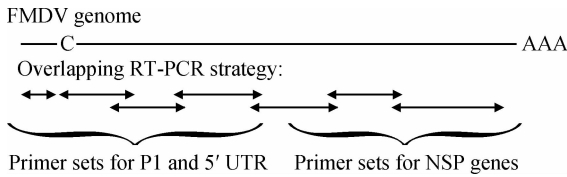


图 1 O 型 FMDV 全基因组 PCR 扩增策略
Fig. 1 PCR strategy used to amplify the full genome of serotype O FMDV

1.5 病毒 RNA 的提取和 RT-PCR

使用 RNaeasy Mini kit 提取病毒 RNA,具体操

作按照说明书进行。并以病毒总 RNA 为模板,oligo(dT)为反转录引物,在 AMV 反转录酶和 Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity 聚合酶作用下进行 RT-PCR 反应。PCR 反应条件为 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 1 min, 35 个循环;72 °C 10 min。PCR 扩增的特异性片段经 1.5 % 琼脂糖凝胶电泳分离纯化。

1.6 cDNA 的克隆、鉴定及测序

将所扩增的 cDNA 片段纯化回收后,分别克隆于 pMD 18-T Easy 载体中,转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞,在 LB 培养基中过夜培养,用碱裂解法提取质粒,以 PCR 法和限制性内切酶酶切分析法筛选阳性重组子,并送宝生物工程(大连)有限公司测序。利用 DNASar、DNASIS 软件包完成序列拼接,并对全部 DNA 序列及由 ORF 所推导的氨基酸序列与参考毒株序列进行分析和同源性比较。

表 2 OT 株各基因区段扩增所用引物

Table 2 Primers used in cloning the full-length OT genome

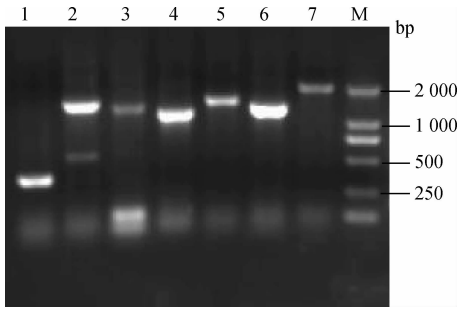
引物 Primers	序列(5'→ 3') Sequence	片段 Location	长度/bp Length
S1	TTG AAA GGG GGC GYT AGG GTY TCA	1-24	372
S1'	GGG TGA AAG GYR GGC TTY G	354-372	
P1	CCC AAG TTT TTA CCG YCT KTC CCG	377-402	1 592
P1'	CGG TTT TCT TGT CGG CGA G	1953-1971	
P2	CAG AAC CAR TCA GGC AAC ACT G	1737-1758	1 394
P2'	GTC AGA CGC GGT GTA CGC	3114-3131	
P3	CAC ACA GTA CAG CGG CAC C	2906-2924	1 206
P3'	TGA TAG CCT TCA CTC CAG TGG C	4091-4112	
N1F	GAG ACG TYG AGT CCA ACC C	3939-3958	1 530
N1R	ACC ATC CCC TCR AAG AAY TC	5449-5469	
N2F	CGR AGG TTY CAC TTT GAC	5098-5116	1 251
N2R	GGG GGT KCC YTT CTT CAT	6377-6395	
N3F	GGA CAG GAC ATG CTC TCA G	6283-6302	1 942
N3R	CAG GAA ACA GCT ATG ACT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTA	8186-8225	

2 结 果

2.1 OT 株基因组全序列 PCR 扩增

使用所设计的 7 对特异性引物,分别扩增出 S1、P1、P2、P3、N1、N2、N3 共 7 个基因片段,其产

物大小分别为 372、1 592、1 394、1 206、1 530、1 251、1 942 bp,结果见图 2。扩增的 7 个目的基因片段在泳道上的位置与预期的扩增片段相符,且特异性和重复性好。



1. S1 片段; 2. P1 片段; 3. P2 片段; 4. P3 片段; 5. N1 片段; 6. N2 片段; 7. N3 片段; M. DNA 相对分子质量标准
1. S1 fragment; 2. P1 fragment; 3. P2 fragment; 4. P3 fragment; 5. N1 fragment; 6. N2 fragment; 7. N3 fragment; M. DNA marker

图 2 FMDV OT 株基因组全序列 PCR

Fig. 2 PCR products of each genome fragments of FMDV OT strain

2.2 序列测定及全长 cDNA 序列组装

根据各基因片段的重复序列,使用 DNASTAR 等分子生物学软件,将各基因片段首尾相连对接成 OT 株基因组全序列(表 3)。序列测定结果表明,其基因组序列长约 8 142 nt,其中 5'UTR 长约 1 004 nt(不包括 Poly(C)区段),前导蛋白(L)编码区长 603 nt,3'末端带有 Poly(A)尾,其上游约 93 nt 是 3'UTR。该毒株结构蛋白与非结构蛋白编码区的核苷酸序列为 6 969 nt,编码 2 323 个氨基酸。

表 3 OT 株基因组的组成

Table 3 The constitutions of the OT strain genome

Genome Segments	5'UTR	L	P1				P2			P3				3'UTR	Poly(A)
			VP4	VP2	VP3	VP1	2A	2B	2C	3A	3B	3C	3D		
Nucleotide	1 004	603	255	654	660	639	48	462	954	459	213	639	1413	93	23
Amino acid		201	85	218	220	213	16	154	318	153	71	213	471		

OT 株的 IRES 长为 453 nt,共分 5 个结构域,其中结构域 2 中包含与嘧啶区域结合蛋白(Poly-pyrimidine Tract-Binding Protein, PTB)结合有关的保守的 CUUUC 基序;在结构域 3 中发现多个 GNRA(N 代表任意核苷酸,R 代表嘌呤碱)和 1 个 CRAAAA 特征性保守基序,并且也包含新的高度保守的 TCGTAGCCAGCA 基序(位于 790—802 位);结构域 4 高度的保守,有 2 个保守的 GAUCUGAG(位于 1 006—1 013 位)和 UUAAAAG(位于 1032—1038 位)基序,或许这 2 个基序在其二级

2.3 OT 株全基因组序列分析及其基因特征

2.3.1 5'UTR 的序列分析 OT 株基因组 5'末端非编码区(除了 Poly(C)外)共 1 004 nt。包括完整的 S 区、假结区(Pseudo knots, PKs)、顺式作用复制元件(The cis-acting replication element, cre)以及内部核糖体进入位点(Internal ribosome entry site, IRES)。S 片段长 371 nt,能够折叠形成一个长的茎-环结构,且富含 GC,平均为 60%。经与参考序列比对发现,在第 36—76 位、第 125—138 位、第 300—317 位存在几个高度保守的富含多个连续的鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C)组成的小重复序列单元,而且发现碱基的突变都是(C/T)之间的置换。Poly(C)序列下游是 PKs,序列比对显示 OT 株该区域从第 415—499 位连续缺失 85 nt,与起源于我国疫苗株 O/Akesu/58 的 OM III 毒株的缺失区完全一致;并与 O/Akesu58 株从第 432—473 位缺失 42 nt,Cathay 型的 O/HKN2002 和 O/TW97 株从第 435—461 位缺失 27 nt,第 467—482 位缺失 16 nt 的区域都有重叠。Cre 长为 54 nt 形成 1 个典型的茎-环结构,其中有保守的 AAACA 特征性基序,加上其两侧的序列共同构成了 ACTTGTACAAA-CACG(第 623—637 位)保守区,它是小 RNA 病毒基因组复制所必需的^[9]。

结构中形成一个显著的凸起。

2.3.2 前导蛋白(L)的序列分析 OT 株前导蛋白(L)编码区长 603 nt,编码 201 aa,无缺失或插入。共有 4 个蛋氨酸,分别位于第 1 位、第 29 位、第 126 位和第 132 位,其中第 1 个是 Lab 蛋白的起始氨基酸,第 2 个是 Lb 蛋白的起始氨基酸,两者相隔 81 nt,Lab 和 Lb 的蛋白酶活性和特异性没有差异^[10]。通过与参考毒株序列比对的结果显示,OT 株与 OM III 株的同源性最高,其核酸序列和氨基酸序列的相似性分别为 99.7%和 100%,与 O/HNK/

2002株的同源性最低,其核酸序列和氨基酸序列的相似性分别为82.8%和89.6%(表4)。与其他分离株一样,OT株L蛋白酶的第51、148和164位分

别是Cys、His和Asp,这3个氨基酸残基是L蛋白酶的活性中心,其丝氨酸蛋白酶活性能在L/P1连接处进行自我切割和释放^[11]。

表4 OT株与其他O型FMDV毒株核苷酸序列以及氨基酸序列比较结果

序列 Segment	O/Akeus/58	OMIII	O/Tibet/99	O/SKR/2002	O/TW/97	O/HKN/2002	%
5'UTR	83.2	96.6	81.8	81.2	82.6	83.0	
L	84.4/91.5	99.7/100	87.9/93.5	87.7/93.0	83.9/89.6	82.8/89.6	
VP4	90.0/100	99.2/100	94.1/100	94.5/100	83.5/95.3	82.7/95.3	
VP2	89.1/92.8	88.7/96.8	88.8/97.2	89.0/97.7	86.2/97.2	85.9/95.0	
VP3	88.9/95.5	89.2/96.4	90.2/98.2	89.5/98.2	85.3/95.5	85.2/94.5	
VP1	95.8/95.8	93.3/96.2	88.9/97.7	88.6/98.1	80.0/88.3	79.3/87.8	
2A	83.3/100	83.3/100	91.7/100	91.7/100	93.8/100	91.7/100	
2B	91.1/98.1	90.9/98.1	94.2/100	93.7/98.7	89.2/95.5	88.5/95.5	
2C	90.6/96.2	90.4/96.5	93.7/96.9	92.7/96.5	86.5/95.6	88.6/96.5	
3A	90.8/95.4	89.9/94.2	93.5/97.4	92.2/95.4	74.8/76.9	75.8/76.9	
3B	94.8/98.6	94.8/98.6	93.0/95.8	92.5/95.8	90.6/95.8	91.1/97.2	
3C	90.6/99.1	90.1/98.1	91.9/99.1	91.2/98.6	89.1/97.2	87.6/96.7	
3D	90.6/96.2	90.7/96.8	91.7/97.0	91.2/96.6	88.3/97.4	88.2/97.0	
3'UTR	90.5	92.5	95.7	94.6	81.2	80.2	

2.3.3 P1区的序列分析 OT株P1区核苷酸序列与同型的FMDV相比,既无缺失也无插入,共长2208 nt,编码736 aa。含有4个小结构蛋白(VP4、VP2、VP3和VP1)编码区,其推导的氨基酸序列则分别为85、218、220、213 aa。各结构蛋白之间的连接氨基酸分别为Ala/Asp(VP4/VP2),Glu/Gly(VP2/VP3),Gln/Thr(VP3/VP1)与Ryan等的报道一致^[12]。VP4是最为保守的,其核苷酸序列和氨基酸序列分别与PanAsia型的O/Tibet/99等参考毒株相比,其相似性分别能达到90%以上和100%,而与Cathay型的O/HKN/2002和O/TW/97株则有4个位点不同,分别是8位(A/T)、60位(T/N)、73位(S/N)和74位(S/T),具有明显的亚型特征。VP3跟VP2一样,无论其核苷酸序列还是氨基酸序列都没有明显的亚型差异,与所有参考株序列的相似性分别在85.2%~90.2%和92.8%~98.2%。

FMDV VP1蛋白包含重要的抗原决定簇,表5为OT株与其他O型FMDV毒株的5个主要抗原

位点氨基酸比较结果。抗原位点1由VP1 β -H环上第133—157位氨基酸和位于VP1的C端第200—213位氨基酸的线性表位形成,并呈现出一定的拓扑型特异性。如以O/HNK/2002、O/TW/97等为代表的Cathay拓扑型的氨基酸序列为SSKYGDTSTN, O/SKR/2000为代表的PanAsia株此处的氨基酸序列为NCKYGESPVT,而OT株与我国疫苗毒株O/Akesu/58一样,为NCKYGVGPVT,提示这些不同拓扑型毒株之间可能存在抗原性差异。另外以O/TW/97等为代表的Cathay拓扑型毒株在抗原位点3的VP1 β -C环(第43—45位)上氨基酸也有一定的拓扑型特异性。决定抗原性的关键氨基酸为144(V)、148(L)、154(K)、208、43(T)和44(P)、149(Q)^[13-14],除了O/TW/97和O/HNK/2002株在抗原位点3的第43位关键氨基酸变异(T/K),其余毒株的所有抗原位点的关键氨基酸均未发生变异(表5)。另外在第145—148位存在着高度保守的RGDL基序,RGD是一种细胞受体分

子识别基序^[15-16],而且 RGD 基序侧翼序列+1 位和 +4 位都是亮氨酸。

表 5 OT 株与其他 O 型 FMDV 毒株主要抗原位点氨基酸比较结果

Table 5 Comparison of amino acid sequences at neutralising antigenic sites between OT and other FMDV type O strains

参考毒株 Strains	氨基酸序列比对 Amino acid sequence alignment		
	42-60 位氨基酸	135-158 位氨基酸	200-210 位氨基酸
OT	VTPKDQINVLDLDMQTPAHT	NCKYGVGPVTNVRGDLQVLAQKAARS	RHKQKIVAPEK
Akesu/58I.....K.....G..
OMIIII.....G..
HKN/2002	..K..QE..V.....I.....	SS.....DTSTN.....E...AA...A...
TW/97	..K...E..V.....I.....	SS.....DTSTN.....E...TR.....A...
SKR/2002E.....TV...
Tibet/CHA/99ES.....TV...

2.3.4 P2 区的序列分析 OT 株 P2 区核苷酸序列长 1 464 nt,编码 488 aa。P2 区潜在的裂解位点分别为 Leu/Asn(VP1/2A)、Gly/Pro(2A/2B)、Gln/Leu(2B/2C)、Glu/Ile(2C/3A),与其他各型相同。经过裂解后形成成熟的 2A、2B 和 2C 蛋白,其推导的氨基酸序列分别为 16、154、318 aa。OT 株与其他参考序列的 P2 区比较结果显示该区是比较保守的区域,其核苷酸序列相似性都在 87%以上,氨基酸序列相似性都在 95%以上,其中与 O/Tibet/99 的相似性最高。尤其是 2A 编码区最为显著,与参考毒株氨基酸序列的相似性都是 100%。小 RNA 病毒的 2B 和 2C 蛋白能诱导细胞产生病变,其中 2B 蛋白能提高膜的通透性和阻断蛋白的分泌^[17]。2B 中第 9 位 Ser/Ala、第 18 位 Ile/Val、第 45 位 Thr/Ala 和第 121 位 Arg/Gln 的改变具有 Cathay 型的特征。另外,在 2C 蛋白第 109—120 位存在一段相当保守的氨基酸序列 RGKSGQGKSFLA,有人推测该区域存在核苷三磷酸(NTP)结合蛋白的特征性基序,参与和 NTP 磷酸基结合^[17]。

2.3.5 P3 区的序列分析 OT 株 P3 非结构蛋白核苷酸序列长为 2 724 nt,编码 908 aa,由 3A、3B、3C 和 3D 组成,其中 3A 的核苷酸序列长为 459 nt,编码 153 aa;3 个 3B(VPg)分别是 69、72 和 72 nt,氨基酸各为 23、24 和 24 aa;3C 是 639 nt,213 aa;3D 是 1 413 nt,471 aa,在 3D 编码区末端有整个 ORF 的终止密码子 TAA。在本研究分离到的牛毒 OT 株与从牛体内分离到的 O/SKR/2000、O/Akesu/58 株等,在 3A 上都没有发生氨基酸缺失现象,而属于 Cathay 拓扑型的猪源 O/HNK/2002、O/

TW/97 等毒株在第 93—102 位缺失 10 个氨基酸。3B 又称为 VPg,是一小的病毒编码蛋白。脊髓灰质炎病毒的 VPg 第 3 位酪氨酸(Y)和第 17 位精氨酸(R)是关键氨基酸,这 2 个氨基酸任意一个突变都会引起复制终止^[18]。OT 株与所有参考毒株的 3 个 VPg 的第 3 位氨基酸都是酪氨酸(Y)。VPg1 的第 16 位都是精氨酸(R),除了 O/HKN/2002 株和 O/TW/97 株第 16 位是赖氨酸(K);VPg2 和 VPg3 的第 16 位也均是赖氨酸(K)。

FMDV 的 3Cpro 是一种蛋白酶,结构和功能与细胞的丝氨酸蛋白酶相似^[19]。OT 株的 3C 蛋白酶存在第 163 位的 Cys、第 46 位的 His 和第 84 位的 Asp3 个重要的酶催化活性位点,其中第 163 位的 Cys 是重要的催化亲核基团^[11]。总体而言 3C 编码区相对比较保守,无论其核苷酸还是氨基酸序列都没有明显的亚型特征。3D 蛋白是病毒编码的 RNA 聚合酶,有保守的结构区。OT 株的 3D 蛋白在第 336—339 位具有 RNA 聚合酶功能基序 YGDD 基序,而且其位于一个高度保守的以 2 个天冬氨酸残基为中心的氨基酸疏水区。

2.3.6 3'UTR 的序列分析 OT 株基因组 3'UTR 与参考株序列的相似性在 80.2%~95.7%。分析表明,在该区核苷酸变异率较大的区域如下:第 16—31 和 63—75 位核苷酸,在第 1—15 和 77—88 位则非常保守,其共有序列分别为 TCCCTCA-GATGTCAC 和 TTTTCCCGCTTCCT。OT 株与其他参考序列一样(除了 O/HNK/2002 和 O/TW/97),在第 31 位还缺失 1 个 C 碱基,还有在第 89 位也缺失 1 个 T 碱基。

2.4 系统进化树分析

将 OT 株的 VP1 基因与 O/HNK/2002 等参考毒株的 VP1 基因序列进行了比对和分析,并用 MEGA4.1 软件绘制了系统发生树(图 4)。该进化树表明,OT 株与 O/Akesu/58、OM III 的亲缘关系最为密切。

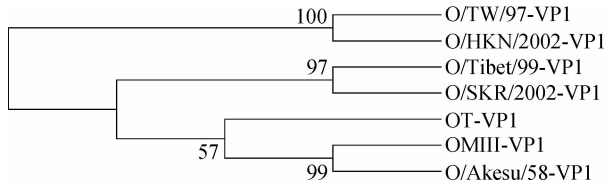


图 4 根据 VP1 基因对 OT 株与参考毒株绘制系统发生树

Fig. 4 Phylogenetic tree obtained from the nucleotide sequence of VP1 gene from OT strain and the reference strains

3 讨论

本研究采取分段克隆的策略,使用高保真 DNA 聚合酶,最大限度地降低了 RT-PCR 过程中核苷酸可能发生的变异,本研究获得的 OT 株 FMDV 的全基因组序列是比较接近其真实序列的。本研究克隆并测定的 FMDV OT 株基因组序列长达 8 142 bp。从 5' 末端到 3' 末端依次排列着 5' UTR、蛋白酶 L 区、结构蛋白 P1 区(包括 VP4、VP2、VP3 和 VP1)、非结构蛋白 P2 区(包括 2A、2B 和 2C)、P3 区(包括 3A、3B、3C 和 3D)以及部分 3' UTR。但本研究中未测到其特有的 Poly(C) 序列。早期研究表明^[20], Poly(C) 与病毒的毒力有密切的关系。关于基因组中究竟至少含有多长的 Poly(C) 才不影响其具有感染性,曾有学者做了相关研究^[21]。FMDV 5' UTR 区有许多与病毒复制和翻译密切相关的调控序列,包括 PKs、cre 和 IRES,而且这些序列进一步能折叠成特殊的二级和三级结构。之前研究表明属于 Cathay 拓扑型的猪源 O/HNK/2002、O/TW/97 等毒株在 93—102 位缺失 10 个氨基酸^[22],与此对应的 PKs 也从第 435—461 位缺失 27 nt,第 467—482 位缺失 16 nt,这 2 个毒株只感染猪而对牛不致病^[23-24]。在乳鼠上连续传代弱化的 OM III 株也不感染牛,因此猜测 PKs 区局部的缺失可能与宿主嗜性有关,正如 3A 基因的缺失一样^[25]。然而 OT 株 PKs 区从第 415—499 位连续缺失 85 nt,与 OM III 株的缺失区完全一致,而 O/Akesu/58 株也从第

432—473 位缺失 42 nt,并且 OT 株和 O/Akesu/58 株均分离于牛体。一个合理的解释就是 OT 株和 O/Akesu/58 株可能都是从牛体到猪体过渡型毒株,但还需要更多的证据来验证这个猜测。

FMDV 非结构蛋白 3A 保守性相对较差,绝大多数有 153 aa。3A 蛋白的氨基酸改变可能影响到 FMDV 的毒力和宿主范围^[26]。据 Burman 等^[14]报道 6 株猪源和牛源的 FMDV 的 3A 蛋白在 134—144 位氨基酸缺失 11 个氨基酸,而且本研究在序列比对时发现了起源于我国疫苗株 O/Akesu/58 的 OM III 毒株在 131—145 位氨基酸缺失了 15 个氨基酸。虽然这些发现表明 3A 蛋白氨基酸缺失与宿主范围改变可能有一定的相关性,但本研究分离到的牛毒 OT 株与从牛体内分离到的 O/SKR/2000 和 O/Akesu/58 等,在 3A 上都没有发生氨基酸缺失现象。而同属于 Cathay 拓扑型的猪源 O/HNK/2002、O/TW/97 等毒株在 93—102 位缺失 10 个氨基酸^[22]。并且 O/SKR/2000 却能引起奶牛和韩国本地牛出现典型症状^[27-28]。亚洲系猪源 FMDV 的 3A 蛋白在 93—102 位缺失 10 个氨基酸,这些氨基酸的缺失,都发生在特定的动物宿主,或许与宿主嗜性有一定的关系,但很难由此就得出 3A 蛋白的缺失改变了其宿主范围的结论,可能还有别的病毒遗传因子的协同作用^[29]。进一步研究 3A 的遗传变异,对解释具有变异致病力的新病毒和变异的宿主范围是如何出现的和对 FMDV 的持续感染问题研究有实际意义。

参考文献:

- [1] 张显升,刘在新,赵启祖,等. 口蹄疫病毒基因组 RNA 结构与功能研究进展[J]. 病毒学报, 2001, 17(4): 375-380.
- [2] SAMUEL A R, KNOWLES N J. Foot-and-mouth disease type O viruses exhibit genetically and geographically distinct evolutionary lineages (topotypes) [J]. *J Gen Virol*, 2001, 82(3): 609-621.
- [3] SANGAR D V, ROWLANDS D J, HARRIS T J R, et al. A protein covalently linked to foot-and-mouth disease virus RNA [J]. *Nature*, 1977, 268: 648-650.
- [4] FRY E E, STUART D I, ROWLANDS D J. The structure of foot-and-mouth disease virus [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2005, 288: 71-101.
- [5] BELSHAM G J, MARTINEA-SALAS E. Genome organization translation and replication of foot-and-

- mouth disease virus RNA [M]//DOMINGO E, SOBRINO F. Foot and Mouth Disease. Horizon Scientific Press, 2004:19-53.
- [6] GUTIÉRREZ A, MARTÍNEZ-SALAS E, PINTADO B, et al. Specific inhibition of aphthovirus infection by RNAs transcribed from both the 5' and the 3' non-coding regions[J]. *J Virol*, 1994, 68:7426-7432.
- [7] AGOL V I, PAUL A V, WIMMER E. Paradoxes of the replication of picornaviral genomes [J]. *Virus Res*, 1999, 62:129-147.
- [8] KNOWLES N J, SAMUEL A R. Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus[J]. *Virus Res*, 2003, 91: 65-80.
- [9] 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]. *J Virol*, 2002, 76:9686-9694.
- [10] MOHAPATRA J K, SANYAL A, HEMADRI D, et al. Sequence and phylogenetic analysis of the L and VP1 genes of foot-and-mouth disease virus serotype Asia1[J]. *Virus Res*, 2002, 87, 107-118.
- [11] SKERN T, FITA I, GUARNE A. A structural model of picornavirus leader proteinases based on papain and bleomycin hydrolase [J]. *J Gen Virol*, 1998, 79: 301-307.
- [12] RYAN M D, BELSHAM G J, KING A M. Specificity of enzyme-substrate interactions in foot-and-mouth disease virus polyprotein processing [J]. *Virology*, 1989, 173:34-45.
- [13] CARRILLO C, TULMAN E R, DELHON G, et al. Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus[J]. *J Virol*, 2005, 79:6487-6504.
- [14] BURMAN A, CLARK S, ABRESCIA N G, et al. Specificity of the VP1 GH loop of foot-and-mouth disease virus for integrin [J]. *J Virol*, 2006, 80 (19), 9798-9810.
- [15] SÁIZ M, NÚÑEZ J I, JIMENEZ-CLAVERO M A, et al. Foot and mouth disease virus biology and prospects for disease control[J]. *Microbes Infect*, 2002 (4):1183-1192.
- [16] MATEU M G, VALERO M L, ANDREU D. Systematic replacement of amino acid residues within an Arg-Gly-Asp-containing loop of foot-and-mouth disease virus and effect on cell recognition[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271:12814-128191.
- [17] DOEDENS J R. Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A [J]. *EMBO*, 1995,14:894-907.
- [18] PAUL A V, VAN BOOM J H, FILIPPOV D, et al. Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase[J]. *Nature*, 1998,393:280-284.
- [19] GRUBMAN M J, ZELLNER M. Identification of the active-sites residues of the 3C proteinase of foot-and-mouth disease virus[J]. *Virology*, 1995, 213:581-589.
- [20] HARRIS T J, BROWN F. Biochemical analysis of a virulent and avirulent strain of foot-and-mouth disease virus[J]. *J Gen Virol*, 1977, 34:87-105.
- [21] RIEDER E, BUNCH T, BROWN F, et al. Genetically engineered foot-and-mouth disease viruses with poly(C) tracts of two nucleotides are virulent in mice [J]. *J Virol*, 1993, 67:5139-5145.
- [22] KITSON J D, MCCAHERN D, BELSHAM G J. Sequence analysis of monoclonal antibody resistant mutants of type O foot and mouth disease virus: evidence for the involvement of the three surface exposed capsid proteins in four antigenic sites [J]. *Virology*, 1990,179(1):26-34.
- [23] DUNN C S, DONALDSON A I. Natural adaptation to pigs of a Taiwanese isolate of foot-and-mouth disease virus[J]. *Vet Rec*, 1997,141: 174-175.
- [24] YANG P C, CHU R M, CHUNG W B, et al. Epidemiological characteristics and financial costs of the 1997 foot-and-mouth disease epidemic in Taiwan[J]. *Vet Rec*, 1999, 145: 731-734.
- [25] 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: 780-783.
- [26] 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]. *J Gen Virol*, 1998, 79:1911-1921.
- [27] BEARD C W, MASON P W. Genetic determinant of altered virulence of Taiwanese foot and mouth disease virus[J]. *J Virol*, 2000, 74(2):987-991.
- [28] KWEON C H, KO Y J, KIM W I, et al. Molecular characterization of foot-and-mouth disease virus O/S KR/2000[J]. *Virus Res*, 2002, 90(1-2):15-22.
- [29] OEM J K, LEE K N, CHO I S, et al. Comparison and analysis of the complete nucleotide sequence of foot-and-mouth disease viruses from animals in Korea and other PanAsia strains[J]. *Virus Genes*, 2004, 29(1):63-71.