

6 株 O 型口蹄疫病毒结构蛋白 *vp1* 基因的克隆与序列分析*

葛淑敏, 金宁一**, 尹革芬, 郑敏, 王振国, 马鸣潇

(解放军军需大学研究所 解放军基因工程重点实验室, 吉林长春 130062)

Cloning and Sequence Analysis of the *vp1* Gene of Six Strains of Foot-and-mouth Disease Virus Type OGE Shu-min, JIN Ning-yi**, YIN Ge-fen, ZHEN Ming, WHANG Zhen-guo, MA Ming-Xiao
(Institute of Virology, The Quartermaster University of PLA, Changchun 130062, China)

Abstract: The nucleotide sequences of six strains named T1, T2, T3, T4, T5 and T6 of FMDV type O were determined. RNA of the six cell-adapted virus strains were extracted by single-step method of RNA isolation, reverse-transcribed and amplified by PCR, respectively. PCR products were cloned and sequenced. The homology among these T1-T6 strains is 95%~99.8% for nucleotide sequence and 94.8~100% for amino acid sequences. Homology among the T1,T2,T3,T4,T5,T6, O/HKN/14/82, O/TAW/81/97, O/PHI/7/96, O/HKN/1/99 and O/HKN/16/96 strains are 86.1%~95.8%. The relative degree of variation of VP1 140-160 and 200~213 amino acids, the major neutralizing site determined, were same within the T1, T2, T3, T4, T5 and T6 strains, indicating the similarity in epitopes and antigenicity. The nucleotide sequences of six virus strains belong to the same genotype—Cathay topotype.

Key words: Foot-and-mouth disease virus, *vp1* gene, Cloning, Sequence analysis

摘要: 提取 6 株 O 型口蹄疫病毒 (FMDV) (T1-T6) 的 RNA, 用一对通用引物经 RT-PCR 方法将 6 株 FMDV VP1 基因片段扩增出来。克隆测序, 核苷酸序列分析表明, T1-T6 六株 *vp1* 基因的核苷酸序列同源性在 95%~99.8% 之间, 氨基酸序列同源性在 94.8%~100% 之间。T1-T6 六株病毒 *vp1* 基因的核苷酸序列与已经发表的 O/HKN/14/82、O/TAW/81/97、O/PHI/7/96、O/HKN/1/99 和 O/HKN/16/96 的同源性较高, 核苷酸序列同源性在 86.1%~95.8% 之间; 发现 6 株毒株的主要中和抗原表位 140-160、200-213 位的氨基酸序列完全相同, 推测它们有相近的中和抗体表位和抗原性。故推断本试验中的 6 株 FMDV 株属于同一基因型, 即 FMDV O 型中国拓朴型 (Cathay topotype)。

关键词: 口蹄疫病毒, VP1 基因, 克隆, 序列分析

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5152 (2004) 03-0264-04

口蹄疫 (Foot-and-mouth disease, FMD) 是由口蹄疫病毒 (Foot-and-mouth disease virus, FMDV) 引起的偶蹄动物急性、高度接触性传染病, 被国际兽疫局 (OIE) 列为 A 类传染病之首。FMDV 有 7 个血清型。各型之间几乎没有交叉免疫力^[1]。FMDV 属于小 RNA 病毒科、口蹄疫病毒属, 为单股正链 RNA。病毒 RNA 上只含 1 个较大的阅读框架 (ORF) 编码

病毒的前体多聚蛋白, 前体多聚蛋白经裂解可形成 4 种结构蛋白 (*vp1*、*vp2*、*vp3*、*vp4*), 其中与中和抗体以及感染有关的主要是 VP1, 结构蛋白 *vp1* 是诱导中和抗体的主要成分^[2]。另外, 分析 FMDV 结构蛋白的差异时发现 *vp1* 的变异性最高, 特别是其编码病毒抗原的核苷酸序列是一个高度可变区^[3]。2003 年马静云等^[4]已经对 5 株 O 型口蹄疫病毒结构蛋白

收稿日期: 2003-12-02, 修回日期: 2003-02-12

* 基金项目: 国家“863”计划资助项目 (2001AA2130701-4)

作者简介: 葛淑敏 (1976-), 女, 吉林舒兰籍, 硕士研究生, 分子病毒学。

** 通讯作者: Corresponding author. Tel: 0431-6986755; E-mail: ningyj@yahoo.com

的 *vp1* 基因进行了克隆与序列分析, 本研究在国内相关研究基础上对 6 株 FMDV *vp1* 基因进行了克隆与序列分析, 丰富了我国 FMDV 毒株 *vp1* 基因资料库, 另外对于分子流行病学调查、疫病的防制及正确使用疫苗等方面具有较重要的学术价值和指导意义。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

试验所用的 6 株 O 型 FMDV 均由本室保存(由 ELASA 和 PCR 方法鉴定)。分别命名为 T1、T2、T3、T4、T5 和 T6; dNTPs、DNA Marker DL2000, 购自美国 Promega 公司, 反转录酶 M-MLV、Ex^{Taq} 聚合酶为大连宝生物工程公司产品; 本试验所用的质粒 PMD 18-T Vector 载体试剂盒为 TaKaRa 公司产品; 菌株 DH₅α 为本室保存。

1.2 病毒的复壮

将组织病料研磨后进行 3~4 日龄乳鼠攻毒试验, 被接种乳鼠一般在接种 15 h 出现典型的口蹄疫症状, 将发病的仔鼠胴体研磨后以 1:10 的比例用 PBS (pH 7.4) 进行稀释, 4℃ 浸毒 12 h, -20℃ 冻存备用, -70℃ 长期保存。

1.3 引物的设计与合成

参照 GeneBank 中有关序列及相关文献, 设计了一对能够特异性扩增 O 型 FMDV *vp1* 序列的特异性引物: Y₁ 5'-GAAGGGCCCAGGGTTGGACTC-3'; Y₂ 5'-GAGTCCAACCCTGGGCCCTTC-3' 送大连宝生物工程公司合成。

1.4 病毒 RNA 的提取

病毒 RNA 的提取依照 Invitrogen 公司产品 TRIZOL LS Reagent 使用说明书提供方法进行。

1.5 RT-PCR

反转录过程依照反转录酶 M-MLV 使用说明书提供方法进行。PCR 反应体系为 20 μL: 10×Ex^{Taq} Buffer (Mg²⁺ Free) 2 μL、dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 1.25 μL、MgCl₂ (25 mmol/L) 1.2 μL、上游引物 Y₁ (10 μmol/L) 0.5 μL、下游引物 Y₂ (10 μmol/L) 0.5 μL、反转录产物 2 μL、Ex^{Taq} (5 U/μL) 0.25 μL、H₂O 12.3 μL。PCR 扩增程序为: 95℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 57℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。循环结束后取 PCR 产物 5~10 μL 用 1.2% 琼脂糖凝胶进行电泳, 观察扩增结果。

1.6 目的 DNA 的连接

用 VITAGENE DNA gel extraction Kit 回收和存

化目的片段, 回收目的 DNA 与 PMD 18-T 载体按照 PMD 18-T Vector 载体试剂盒的说明书进行连接。

1.7 阳性克隆菌落挑选和鉴定

按常规方法制备并转化感受态细胞, 以 α 互补原理挑选白色菌落, 对抽提的质粒进行酶切鉴定。

1.8 目的基因的核苷酸序列测定

将鉴定好的阳性菌株送大连宝生物工程有限公 司测序。用 DNASTAR 软件分析。

2 结果与讨论

2.1 RT-PCR

用设计的一对引物进行 RT-PCR, 获得 916bp 特异性目的片段, 与预期的扩增片段 916bp 相符。

2.2 阳性克隆的鉴定

筛选出的阳性重组质粒用 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切, 切出约 2635bp 与 973 左右大小的目产片段, 与预期结果一致 (图 1)。初步确认获得了 6 株病毒的 *vp1* 基因阳性克隆。获得了 6 株毒株 *vp1* 基因的核苷酸序列, 推导其相应的氨基酸序列, 结果如图 2、图 3。

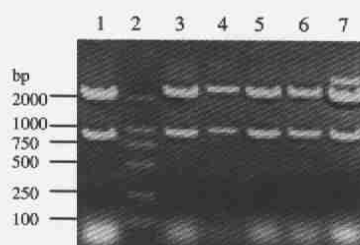


图 1 重组质粒 PMD 18-T-VP1/T1-T6 的酶切鉴定

Fig 1 Identification of recombinant plasmid PMD 18-T-VP1/T1-T6

1, PMD18-T-VP1/T1 *EcoR* I+*Hind* III; 2, DL2000 DNA Marker; 3, PMD 18-T-VP1/T2 *EcoR* I + *Hind* III; 4, PMD18-T-VP1/T3 *EcoR* I + *Hind* III; 5, PMD18-T-VP1/T4 *EcoR* I+*Hind* III; 6, PMD18-T-VP1/T5 *EcoR* I + *Hind* III; 7, PMD18-T-VP1/T6 *EcoR* I+*Hind* III.

2.3 目的基因的核苷酸序列及推导的氨基酸序列比较

序列结果分析显示, 6 株病毒株核苷酸序列同源性均 95% 以上, 其中 T2 与 T4 核苷酸序列中仅 1 个碱基不同, 同源性高达 99.8%, 相比较而言, T6 碱基序列变异相对较大, 与其它 5 株毒株核苷酸序列同源性分别为: 95.5%、95.6%、95.1%、95.5%、95.0%。氨基酸序列分析结果显示: T2 与 T4 氨基酸序列完全相同, T2 与其他 5 株毒株氨基酸序列同源

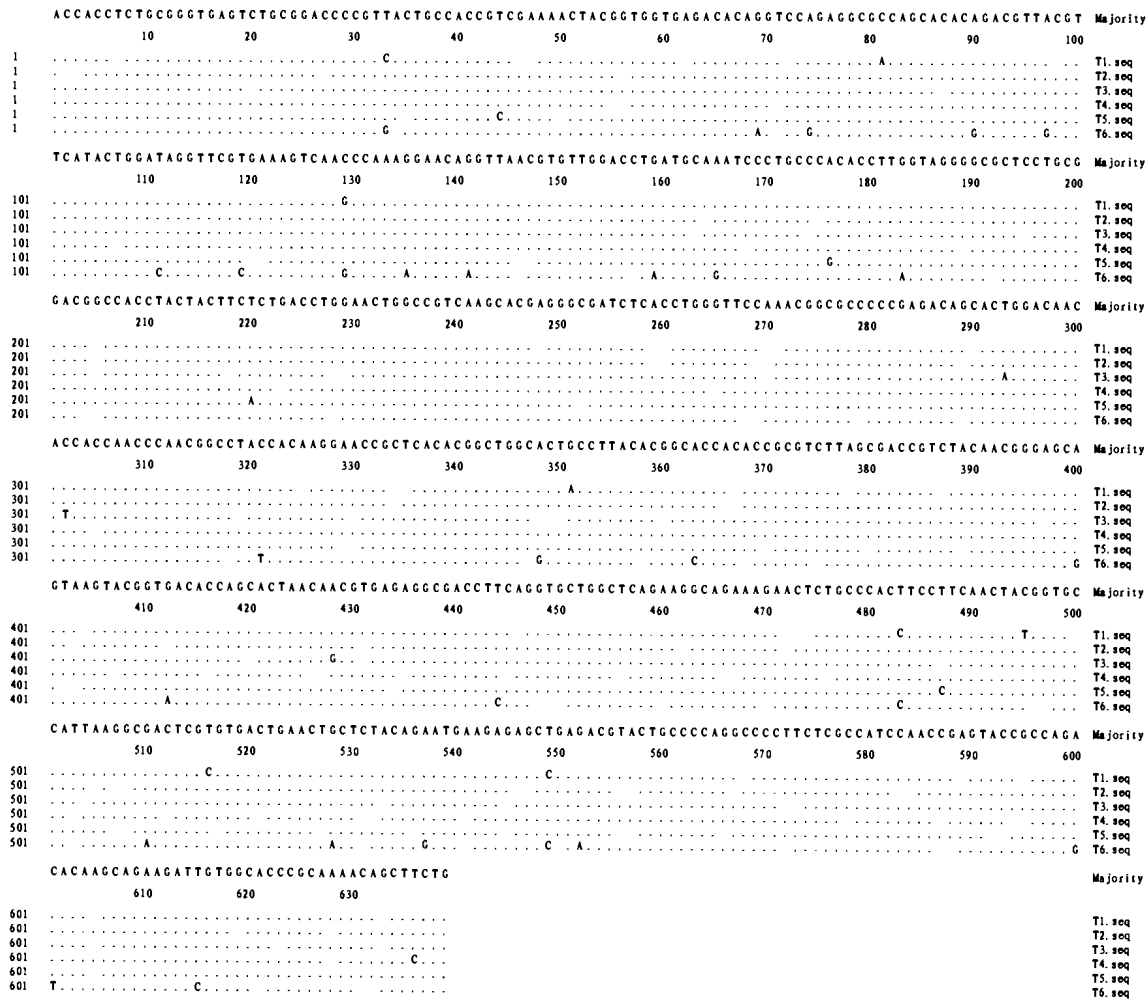


图 2 FMDV T1、T2、T3、T4、T5 和 T6 毒株 *vp1* 基因核苷酸序列
 Fig. 2 The nucleotide sequence of *vp1* gene of FMDV strains T1-T6

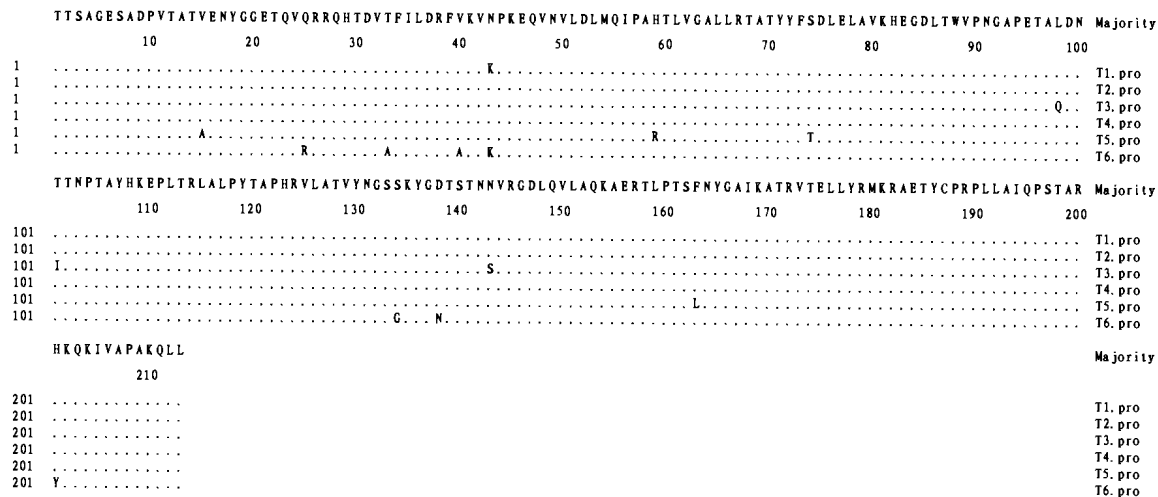


图 3 FMDV T1、T2、T3、T4、T5 和 T6 毒株 *vp1* 基因推导的氨基酸序列
 Fig.3 The deduced amino acid sequence of *vp1* gene of FMDV strains T1-T6

性分别为: 99.5%、98.6%、98.1%和 96.7%。

FMDV *vp1* 内部的 140-160 和 200-213 位氨基酸是最重要的两个免疫原区^[5], 这两个肽段是决定免疫原性的抗原决定簇, 它集中了 O 型 FMDV 重要表位。FMDV *vp1* 第 44 (P)、144 (V)、148 (L)、154 (K) 和 208 (P) 位氨基酸是关键氨基酸, 这些氨基酸的改变会不同程度的影响抗原位点与相应单克隆抗体的反应性。本试验所测序的 6 株 O 型 FMDV VP1 基因序列中这 5 个关键性氨基酸均未发生变化。另外, 结构蛋白 *vp1* 是诱导中和抗体的主要成分, 在已发现的 O 型五个抗原位点中, 有三个位于 *vp1* 上, 其中 140-160 位氨基酸处的 G-H 环是最主要的保护性抗原位点, 其顶部形成了一个高度保守的 Arg-Gly-Asp (RGD) 序列, 是 FMDV 的细胞受体位点^[6]。所有血清型毒株在该区段的氨基酸都比较保守, 以保持病毒对细胞的侵染性。在本实验中, 6 株 O 型 FMDV 序列测定结果均符合这一规律, 存在 RGD 组成的病毒受体位点。通过上述分析, 可以初步推断 T1-T6 6 株 O 型 FMDV 具有相同的抗原性。

2.4 6 株毒株 *vp1* 核苷酸序列与国内外毒株 *vp1* 基因的核苷酸序列比较

将 6 株 O 型 FMDV *vp1* 测定核苷酸与网上国内外已经发表的部分 *vp1* 基因的核苷酸序列进行分析, 其核苷酸序列同源性见表 1。

N.J.Knowles 与 A.R.Samuel^[7,8]根据 FMDV 基因以及不同地理区域的遗传进化关系, 将 O 型 FMDV 分为 8 个拓扑型, 分别命名为: 中国型 (Cathay)、中东南亚型 (ME-SA)、东南亚型 (SEA)、欧洲南美型 (Euro-SA)、印度尼西亚-1 型 (ISA-1)、印度尼西亚-2 型 (ISA-2)、东非型 (EA) 和西非型 (WA; Fig2)。O/HKN/14/82、O/TAW/81/97、O/PHI/7/96、O/HKN/1/99 和 O/HKN/16/96 五株 FMDV 株均属于 O 型 Cathay。本试验中的 6 株病毒株核苷酸序列与其相比同源性在 86.1%~95.8% 之间, 按照 Rico-Heasse 对小 RNA 病毒科脊髓灰质炎病毒的研究理论, 毒株间核苷酸序同源性差异小于 5% 为亲缘关系密切, 小于 15% 则定为同一基因型的理论, 又根据 T1-T6 6 株 O 型 FMDV 具有相同的抗原性这一分析, 可以推断 T1、T2、T3、T4、T5、T6、O/HKN/14/82、O/TAW/81/97、O/PHI/7/96、O/HKN/1/99 和 O/HKN/16/96 属于同一基因型即 FMDV O 型 Cathay。2003 年马静云等^[4]对 5 株猪 O 型口蹄疫病毒结构蛋白的 VP1 基因克隆与序列分析, 表明 5 株

FMD 病毒株中 L1、L3、L4、L5 与 O/HKN/1/99 和 O/HKN/16/96 核苷酸序列同源性差异较小, 属于同一基因型, 结合本试验, 可以推断这病毒株 L1、L3、L4、L5 与本文所提到的 6 株 FMD 病毒株应属同一基因型, 即 FMDV O 型 Cathay。当然, 要得到更加详细的表位特性, 还要组成主要抗原位点表位的单抗定位和分析。

表 1 不同 FMDV 毒株 VP1 基因编码的核苷酸序列同源性比较 (%)

Table 1 The homology uclotide sequence of VP1 gene of FMDV (%)

Strains	T1	T2	T3	T4	T5	T6
O/HKN/14/82	86.4	86.7	86.2	86.5	86.1	86.7
O/PHI/7/96	93.0	93.3	92.8	93.1	92.6	92.3
O/IRQ/30/2000	80.0	80.9	80.4	81.1	80.4	80.3
O/SAR/1/2000	80.6	80.8	80.3	80.6	80.3	79.8
O/UKG/12/2000	80.6	80.8	80.3	80.6	80.3	79.8
O/TAW/81/97	93.0	93.1	92.6	93.0	92.5	93.0
O/JPN/2000	80.9	81.1	80.6	80.9	80.6	80.1
O/HKN/1/99	92.6	92.8	92.3	92.6	92.2	92.6
O/HKN/16/96	95.6	95.8	95.3	95.6	95.1	95.6

参考文献

- [1] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第 2 版, 北京: 科学出版社, 1997, 480:481.
- [2] Strohmaier K, Franze R, Adman K H. Location and characterization of the antigenic portion of the FMDV immunizing protein[J]. J Gen Virol, 1982, 59:295-360.
- [3] Bolwell C, Clarke B K, Parry N R, et al. Neutralization of foot-and-mouth disease virus with neutralization monoclonal antibodies[J]. J Gen Virol, 1987, 70:59-68.
- [4] 马静云, 曹永长, 毕英佐. 5 株猪 O 型口蹄疫病毒结构蛋白 VP1 基因的克隆与序列分析[J]. 华南农业大学学报, 2003, 24 (1) 70-73.
- [5] Baxt, B. Becker, Y. The effect of peptides containing the arginine glycine aspartic acid sequence on the adsorption of foot-and-mouth disease virus to tissue culture cells[J]. Virus Genes, 1990, 4:73-83.
- [6] 张显新, 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.
- [7] Knowles N J, Samuel A R. Foot-and-mouth disease type o virus exhibit genetically and geographically distinct evolutionary lineages (topotypes) [J]. J of Gen Virol, 2001, 82, 609-621.
- [8] Knowles N J, Samuel A R. Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus[J]. Virus Research, 2003, 91:65-80.