

# Asia1 型口蹄疫病毒分离株结构蛋白基因的克隆与表达<sup>\*</sup>

独军政, 常惠芸<sup>\*\*</sup>, 丛国正, 林彤, 邵军军, 付生芳, 刘在新, 谢庆阁<sup>\*\*</sup>

(中国农业科学院兰州兽医研究所国家口蹄疫参考实验室, 甘肃兰州 730046)

## Molecular Characteristics and Expression of Structural Protein Gene of Foot-and-Mouth Disease Virus Type Asia1

DU Jun-zheng, CHANG Hui-yun<sup>\*\*</sup>, CONG Guo-zheng, LIN Tong, SHAO Jun-jun, FU Sheng-fang, LIU Zai-xin, XIE Qing-ge<sup>\*\*</sup>

(National Foot-and-Mouth Disease Reference Laboratory, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Science, Lanzhou 730046, China)

**Abstract:** Variations in the amino acid sequence of *Foot-and-mouth disease virus* (FMDV) structural proteins are the molecular basis for the antigen diversity of the virus. Majority of antigenic sites for the virus neutralization are present on VP1, the major immunogenic protein. However, a few conformational epitopes are present on the structural proteins VP2 and VP3. The nucleotide sequence encoding all four structural proteins (P1 region) of FMDV type Asia1 YNBS/58 was determined. The P1 region of type Asia1 YNBS/58 is 2199 bp in length and codes for a polypeptide of 733 amino acids. The structural protein of *vp4*, *vp2*, *vp3* and *vp1* gene consists of 255, 657, 654, 633 bp respectively. The nucleotide sequence identity of *p1* gene between YNBS/58 and Ind63/72, Pka3/54, Israel, China/99, C1/Germany, A22, ZIM7/83/2 strains is 88.4%, 86.0%, 89.3%, 68.6%, 67.6%, 66.8% and 50.3%, and the amino acid identity is 94.1%, 93.2%, 95.1%, 79.9%, 77.0%, 76.5%, 58.1%. The variations are unequally distributed among the four structural proteins of YNBS/58 and Ind63/72, Pka3/54, Israel. The results showed that the variation in the derived amino acid sequence is the highest in VP1 followed by VP2, VP3 and VP4. The recombinant P1 protein was expressed in *E. coli* and was approximately 88 kDa in size, which accounted for 16% of total protein. The target protein was purified.

**Key words:** *Foot-and-Mouth disease virus*; Serotype Asia1; Structural protein gene; Molecular characteristics; Expression

**摘要:** 口蹄疫病毒结构蛋白氨基酸的变化是病毒抗原性变异的分子基础, 大部分抗原表位位于主要的免疫原蛋白 VP1 上, 部分非线性抗原表位位于 VP2 和 VP3 上。本研究首次成功测定了 Asia1 型口蹄疫病毒 (YNBS/58) 四种结构蛋白基因 (*p1* 区) 的核苷酸序列, 全长 2199 个碱基, 编码 733 个氨基酸, 该基因与 Ind63/72、Pka3/54、Israel、China/99、C1/Germany、A22、ZIM7/83/2 毒株的 *p1* 基因核苷酸序列同源性分别为 88.4%、86.0%、89.3%、68.6%、67.6%、66.8%、50.3%, 推导的氨基酸序列同源性分别为 94.1%、93.2%、95.1%、79.9%、77.0%、76.5%、58.1%。将 YNBS/58 株与 Ind63/72、Pka3/54、Israel 株的 *vp1*、*vp2*、*vp3*、*vp4* 基因和编码蛋白分别进行同源性比较, 发现 VP1 的序列变异最大, VP2、VP3、VP4 次之, 且 VP1 的氨基酸变异主要集中在 42-50 位和 137-156 位。实现了 YNBS/58 株结构蛋白基因在大肠杆菌中的高效表达, 其表达的融合蛋白以包涵体形式存在, 分子量约为 88kDa, 占菌体总蛋白的 16% 左右, 并利用镍柱对目的蛋白进行了纯化, 纯度达 90% 以上, 本实验为进一步研究 Asia1 型口蹄疫病毒的分子流行病学、*p1* 基因及其编码蛋白的生物学功能奠定了基础。

收稿日期: 2004-08-23, 修回日期: 2004-09-28

<sup>\*</sup> 基金项目: 国家重点基础研究发展规划“973”项目资助 (G1999011904)

作者简介: 独军政 (1976-), 男, 甘肃礼县籍, 研究员, 硕士, 研究方向为分子病毒学。

<sup>\*\*</sup> 通讯作者: Corresponding author. Tel: (0931) 8342052, E-mail: Xieqingkey@public.lz.gs.cn, Changhuiy@hotmail.com

关键词: Asia1 型口蹄疫病毒; 结构蛋白基因; 分子特征; 表达

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2005)01-0065-05

口蹄疫是由口蹄疫病毒(*Foot-and-Mouth disease virus*, FMDV)引起的一种偶蹄动物共患的急性、热性、接触性传染病,被国际兽医局列为 A 类传染病之首。目前已知该病有七个血清型,分别为 O、A、C、Asia1、SA T1、SA T2、SA T3,每种血清型包括多个亚型,各型之间无交叉反应性。口蹄疫病毒是小核糖核酸病毒科(*Picornaviridae*)、口蹄疫病毒属(*Aphthovirus*)的成员,完整的病毒颗粒包括衣壳和 RNA 两部分,其基因组为单股正链 RNA,长约 8.5kb,仅含有一个完整的开放阅读框,编码一个聚合蛋白,它可被蛋白水解酶裂解为 L-PI-2A、2BC、P3 3 种分子量较大的前体,L-PI-2A 又可被裂解为 L、VP1、VP2、VP3、VP4、2A 六种蛋白<sup>[1]</sup>,其中 VP1、VP2、VP3、VP4 各 60 分子构成病毒粒子外壳。研究表明,VP1 暴露在病毒离子的表面,是诱导产生中和抗体的主要成份<sup>[2]</sup>,同时在 VP2、VP3 上也发现了另外的抗原表位,因此 P1 区序列的比较有助于深入分析结构蛋白的抗原表位。A、O、C 型 FMDV 的主要抗原表位已被确定,而 Asia1 型的还未见定论。1954 年,Asia1 型 FMDV 被首次分离于巴基斯坦<sup>[3]</sup>。近年来,Asia 1 型口蹄疫在东南亚和印度半岛呈地方性流行,在中东及东南亚周边地区散发。本研究参考已发表的 Asia1 型口蹄疫病毒基因序列设计引物,首次克隆了 YNBS/58 株的 P1 基因,对其序列进行了分析,实现了其在大肠杆菌中的表达,并利用镍柱对重组的 P1 蛋白进行了有效纯化,现报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

YNBS/58,系多年前采自中缅边境的牛舌皮水泡口蹄疫病毒,经血清学方法鉴定为 Asia1 型,病毒在 BHK-21 细胞中进行了增殖,由国家口蹄疫参考实验室保存;参考毒株及 GenBank 登录号如下:

O 血清型-China/99 株(AF506822),A 型-A22 株(X74812),C 型-C1/Germany 株(M90368),SA T2 型-ZIM7/83/2 株(AF136607),Asia1 血清型-Ind63/72(NC004915),Pka3/54(A Y593795),Israel(U01207)。

大肠杆菌 JM109、BL21 和原核表达载体 pPro-exHTb 由本实验室保存,RNeasy Mini Kit 购自 Qiagen 公司,AMV 反转录酶为 Promega 公司产

品,限制性核酸内切酶、IPTG、X-gal、Taq DNA 聚合酶、连接酶 Solution、核酸 Marker、DNA 片段纯化试剂盒均购自宝生物(大连)公司,BugBuster Ni-NTA 蛋白纯化试剂盒购自 Novagen 公司,Asia1 型口蹄疫病毒牛阳性血清由本室保存,其他试剂均为分析纯。

### 1.2 引物

参考已发表 Asia1 型口蹄疫病毒基因序列,选择保守区设计引物。P1:5'-TCAACGGAGAA TG GAAA GCAAA G-3',P2:5'-ACGTCTCCCGCCAA CTTGA GCA G-3';这对引物用于从病毒基因组中扩增 P1 基因。P3:5'-CCGAA TTCTCAA GGG AGCCGGGCAA T-3',P4:5'-CCCAAGCTT CGCT AGCTTGA GCA GGTC-3';P3 和 P4 的 5 端分别引入了酶切位点 *EcoRI* 和 *HindIII*,用于构建含有 P1 基因的原核表达质粒。

### 1.3 病毒 RNA 的提取

参考 RNeasy Mimi Kit 操作说明提取病毒 RNA,所有器皿和试剂均经 DEPC(焦碳酸二乙酯)去 RNase 处理。

### 1.4 RT-PCR

参照 AMV 反转录试剂盒说明的方法进行。

### 1.5 p1 基因的克隆

将 PCR 产物和 PMD18-T 进行连接反应,转化感受态细胞 JM109,挑取白色单个菌落。以碱裂解法小剂量制备质粒,并进行酶切和 PCR 鉴定,将初步鉴定为阳性的重组质粒命名为 pMD-P1,委托上海生工公司测序。

### 1.6 p1 基因的序列分析

借助 DNAstar、DNAsis、DNAMAN 等软件将 YNBS/58 株 P1 基因序列与参考毒株的序列比较分析。

### 1.7 重组表达质粒的构建

以重组质粒 pMD-P1 为模板进行 PCR 扩增,引物为 P3 和 P4。扩增产物用 *EcoRI* 和 *HindIII* 酶切,与经同样酶切处理的 pPro-exHTb 载体连接,转化 BL21 感受态细胞,随机挑取单个菌落,制备质粒,酶切、PCR 鉴定后命名为 pPro-P1,委托宝生物(大连)公司进行确证性测序。

### 1.8 p1 基因的诱导表达和检测

将阳性工程菌于 37℃ 培养,待  $OD_{600}$  值达到 0.3~0.5 时,收取 1mL 菌液作为阴性对照,加入

IPTG进行诱导表达,不同时间收取样品。将菌样裂解后,SDS-PAGE观察结果,然后进行Western blot,一抗用Asia1型口蹄疫病毒牛阳性血清,二抗用辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗牛IgG。

1.9 重组蛋白的可溶性分析

将诱导表达的菌体收集后,于冰浴上进行超声破碎,超声时间10s,间隔时间10s,功率400W,超声次数40次,4 15000r/min离心20min,分别取上清和沉淀用于SDS-PAGE分析。

1.10 重组蛋白的纯化

按蛋白纯化试剂盒说明书方法进行纯化,分步洗脱并收集目的蛋白洗脱液,对纯化的蛋白进行SDS-PAGE鉴定。

2 结果

2.1 p1 基因的克隆和序列分析

提取病毒RNA后,对其反转录得到cDNA,PCR扩增得到约2.3kb的目的条带。将PCR扩增产物与T载体连接,构建重组质粒pMD-P1,测序结果表明:YNBS/58株p1基因由2199个碱基组成,编码733个氨基酸,其中vp4、vp2、vp3、vp1编码基因依次包括255、657、654和633个碱基,分别编码85、219、218、211个氨基酸。YNBS/58株与参考毒株Ind63/72、Pka3/54、Israel、China/99、C1/Germany、A22和ZIM7/83/2的p1基因核苷酸序列同源性分别为88.4%、86.0%、89.3%、68.6%、67.6%、66.8%、50.3%,推导的氨基酸序列同源性分别为94.1%、93.2%、95.1%、79.9%、77.0%、

76.5%、58.1%,并绘制遗传进化树(图1);将YNBS/58株与Ind63/72、Pka3/54、Israel株的vp1、vp2、vp3、vp4基因进行核苷酸和编码氨基酸同源性比较,发现其中VP1的氨基酸序列变异最大,VP2、VP3、VP4次之(表1),且VP1的氨基酸变异主要集中在其42-50位和137-156位(图1)。该基因序列在GeneBank中的登录号为AY390432。

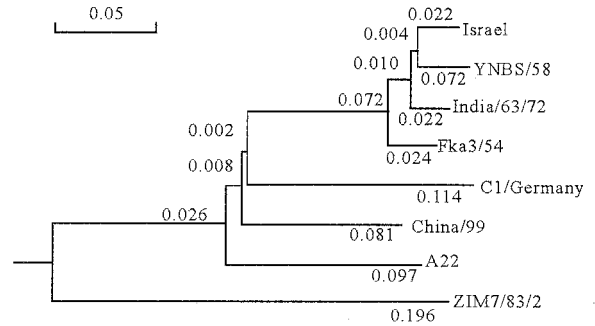


图1 五种血清型FMDV的p1基因进化树

Fig.1 UPGMA Tree of p1 nucleotide sequences

表1 FMDV不同毒标的结构蛋白基因及编码蛋白的同源性比较(%)

Table 1 Comparison of P1 sequences of FMDV type Asia1 strains (%)

Virus	YNBS/58	Ind63/72	Pka3/54	Israel	Average
VP1	633nt	85.6	80.0	87.7	84.2
	211aa	91.0	86.2	92.9	90.0
VP2	657nt	89.5	88.7	90.6	89.6
	219aa	94.1	95.4	95.0	94.8
VP3	654nt	89.8	87.2	89.3	88.8
	218aa	95.9	96.8	97.2	96.6
VP4	255nt	89.4	91.0	89.8	90.0
	85aa	97.6	96.3	95.3	97.0

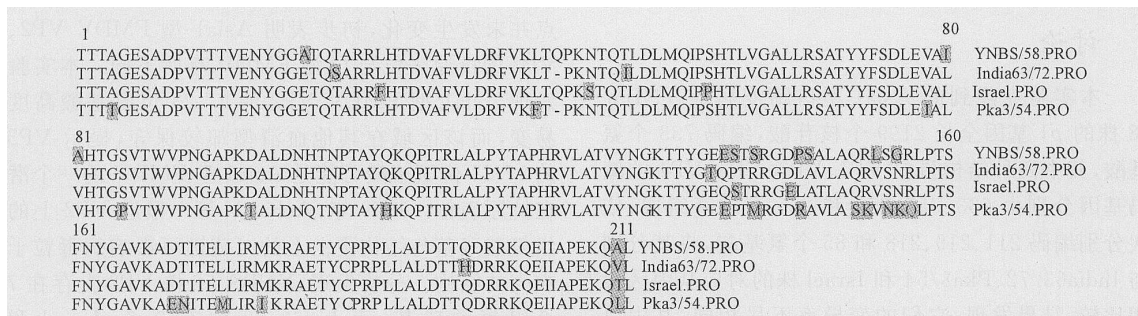


图2 四株Asia1型FMDV VP1的氨基酸序列比较

Fig.2 Amino acid alignment of VP1 of four serotype Asia1 FMDV

2.2 重组表达质粒的构建

以重组质粒pMD-P1为模板,P3和P4为引物,扩增得到了约2.2kb的目的基因,经EcoR / Hind酶切反应后与同样酶切处理的载体pProexHTb连接,得到重组质粒pPro-P1,重组表达质粒测序结果显示读码框正确。

2.3 表达产物的鉴定和纯化

对重组菌裂解产物进行SDS-PAGE,结果可见88kDa的目的蛋白条带,与预期大小一致。薄层扫描显示分子量为88kDa的重组蛋白占菌体总蛋白的16%左右,诱导后5h表达量最大;用镍离子亲和树脂对其纯化后,目的蛋白的含量达90%以上,浓度

达 0.25mg/mL (图 3);可溶性分析显示,重组蛋白以不溶性包涵体形式存在于菌体中;Western blot 分析发现该融合蛋白能与 Asia1 型口蹄疫病毒牛源性血清进行反应,具有良好的反应原性,确定了 88kDa 的蛋白为重组的 P1 蛋白(图 4)。

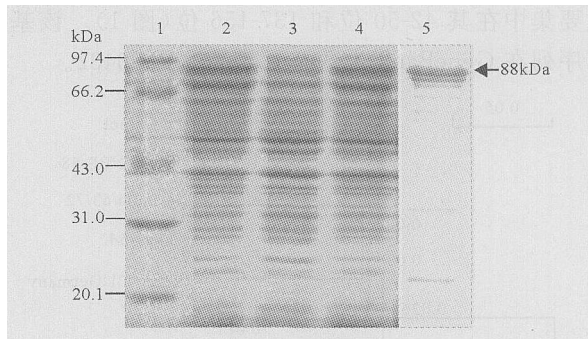


图 3 表达产物的 SDS-PAGE

Fig. 3 SDS-PAGE of recombinant protein

1, Protein Marker; 2/4, Expressed product induced by IPTG for 5h; 3, Control; 5, Purified recombinant protein.

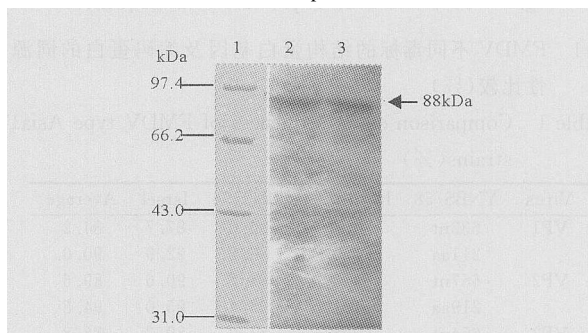


图 4 表达产物的 Western blot

Fig. 4 Western blot of recombinant protein

1, Protein Marker; 2/3, Western blot result.

### 3 讨论

本实验克隆到的 Asia1 型口蹄疫病毒 YNBS/58 株的 *p1* 基因全长 2199 个核苷酸,编码 733 个氨基酸,其中四种结构蛋白 VP1、VP2、VP3、VP4 的编码基因分别由 633、657、654 和 255 个碱基组成,依次分别编码 211、219、218 和 85 个氨基酸,将其分别与 India63/72、Pka3/54 和 Israel 株的对应基因区段相比较,结果发现,它们的变异率不尽相同,其中以 VP1 的变异率最大,VP2、VP3、VP4 则较之相对保守,这说明中和抗原表位主要位于 VP1 上。通过对 YNBS/58 株与 O、A、C、SA T2 等血清型毒株的 *p1* 基因及编码氨基酸的序列比较,发现 Asia1 型与 C 型在遗传衍化上关系相对较近,而与 SA T2 型关系最远。

Krebs 等研究发现,O 型口蹄疫病毒 VP1 的变异主要发生在 140-160 位和 200-211 位两段抗原表

位区<sup>[4]</sup>。通过本实验四株病毒的比较发现,Asia1 型口蹄疫病毒 VP1 的氨基酸变异主要集中在 42-50 位和 137-156 位,而在 200-211 位氨基酸则相对保守,仅 210 位的氨基酸发生了变异。该结果与 Reddy 等<sup>[5]</sup>的结论相符,因此,这两个氨基酸高变区可能是 Asia1 型口蹄疫病毒的主要抗原表位,当然,要验证该推论的正确性,还需对更多 Asia1 型毒株进行序列测定。已经证实,VP1 的抗原表位区 140-160 位构成的“GH”环暴露于病毒离子的表面,环内的 RGD(精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸)序列高度保守,是病毒和宿主细胞结合的特异性位点<sup>[6]</sup>。YNBS/58 株的 RGD 位于 143-145 位,Ind63/72、Pka3/54 株 VP1 在 43 位上缺失了一个氨基酸,其 RGD 位于 142-144 位,值得注意的是,Israel 株的细胞结合位点发生了变异,为 RGE,是否 Israel 株在其他部位存在 RGD 还是存在其他保守氨基酸组成的细胞吸附位点,目前还不太清楚。Mateu 等<sup>[7]</sup>报道 C 型口蹄疫病毒 RGD 基序下游 +1 和 +4 位的亮氨酸及 +2 位的丙氨酸残基高度保守,在促进病毒与细胞的吸附方面具有重要作用,而在 Asia1 型,+1、+2 位氨基酸较易发生变异,仅 +4 位的亮氨酸保守<sup>[8]</sup>,这种变异能否影响病毒与细胞的吸附,有待深入研究。

研究发现,O 型 FMDV 结构蛋白 VP2、VP3 上存在非线性抗原表位 2 和 4,其中表位 4 包括 VP2 的 B-C 环(70-80aa)和 VP3 的 B-B 结,表位 2 含有 VP2 的 E-F 环(131-134aa)<sup>[2,9]</sup>。而实验中四株 Asia1 型 FMDV 除 VP2 上 B-C 环中的 71、74、79 位及 E-F 环中的 131 位氨基酸发生了变异外,其他位点并未发生变化,初步表明 Asia1 型 FMDV VP2、VP3 的抗原表位与 O 型 FMDV 有所不同。本实验发现 Asia1 型 FMDV VP2 的 17-23 位氨基酸高度易变,而该区域在其他血清型却较保守,提示 VP2 的 17-23 位氨基酸可能是 Asia1 型 FMDV 的一个潜在抗原表位。1989 年,Acharya 等<sup>[1]</sup>报道 VP2 上的组氨酸残基与结构蛋白上的二硫键可影响病毒粒子衣壳的结构。分析发现,YNBS/58 株 VP2 上存在 7 个组氨酸残基,而 Ind63/72 株有 9 个,Israel 和 Pka3/54 株均有 8 个,是否由此可以反应病毒粒子的稳定性还需深入研究。利用带有六个组氨酸标签的原核表达载体对 Asia1 型口蹄疫病毒 *p1* 基因进行了表达,选用镍离子亲和树脂对重组蛋白进行纯化,通过对纯化过程中不同阶段收集的样品进行 SDS-PAGE 分析,发现目的蛋白仅存在于 pH 值为 4.5 的洗脱液中,证明纯化效果较好。本实验为深入研究 Asia1 型口蹄疫病毒 *p1* 基因及其编码蛋白

的功能提供了材料,同时也为建立新的口蹄疫基因工程产品奠定了良好基础。

## 参考文献

- [1] Acharya R, Fry E, Stuart D, *et al.* The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution [J]. *Nature*, 1989, 337:709-716.
- [2] Kitson J D, McCahon 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 antigen sites[J]. *Virology*, 1990, 179:26-34.
- [3] Knowles N J, Samuel A R. Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus[J]. *Virus Res*, 2003, 91:65-81.
- [4] Krebs O, Berger H G, Marquardt O. The capsid protein-coding sequence of foot-and-mouth disease virus O2 Brescia[J]. *Arch Virol*, 1991, 120:135-143.
- [5] Reddy G R, Tratschin J D, Natarajan C, *et al.* Capsid protein-encoding sequence of foot-and-mouth disease virus type Asia1 Ind 63/72[J]. *Virus Gene*, 1999, 18(20):161-168.
- [6] Mateu M G. Antibody recognition of Picornaviruses and escape from neutralization: a structural view[J]. *Virus Res*, 1995, 38:1-24.
- [7] 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, 271:12 814-12 819.
- [8] Gurumurthy C B, Sanyal A, Venkataramanan R, *et al.* Genetic diversity in the VP1 gene of foot-and-mouth disease virus serotype Asia1[J]. *Arch Virol*, 2002, 147:85-102.
- [9] Xie Q G, Mccahan D, Crowther J R, *et al.* Neutralization of foot-and-mouth disease virus can be mediated through any of at least three separate antigen sites[J]. *J Gen Virol*, 1987, 68:1 637-1 647.