

# 口蹄疫病毒受体猪源 $\beta 6$ 亚基基因的克隆和分子特征 Molecular Cloning and Characteristics of cDNA Encoding Pig $\beta 6$ Subunit for FMDV Receptor

高闪电, 独军政, 常惠芸\*, 丛国正, 邵军军, 易华山, 周建华, 谢庆阁

GAO Shan-Dian, DU Jun-Zheng, CHANG Hui-Yun\*, CONG Guo-Zheng, SHAO Jun-Jun, YI Hua-Shan, ZHOU Jian-Hua and XIE Qing-Ge

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

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

**摘要** 从 FMDV 试验感染康复猪的舌皮和肺组织中克隆到了整联蛋白  $\beta 6$  亚基的基因并对其核苷酸序列和推导的氨基酸序列以及蛋白结构进行了分析, 该基因已登录到 GenBank 中, 登录号为 EF432729。猪整联蛋白  $\beta 6$  亚基基因的编码区含有 2367 个核苷酸, 编码 788 个氨基酸残基, 含有 9 个潜在的糖基化位点, 3 个氨基葡聚糖结合位点, 一个依赖于 cGMP 的蛋白激酶磷酸化位点, 10 个蛋白激酶 C 磷酸化位点, 2 个表皮生长因子相似结构域和 2 个半胱氨酸丰富区。其信号肽由 26 个氨基酸组成, 胞外域由 681 个氨基酸组成, 跨膜区由 29 个氨基酸组成, 胞浆域由 52 个氨基酸组成。从起始密码子开始, 共有 11 个核苷酸发生了变化, 其中 2 079 位和 2256 位核苷酸的突变是同义突变, 其余 9 位核苷酸的变化为错义突变。猪  $\beta 6$  基因与猕猴、小鼠、挪威大鼠、犬、豚鼠、人、牛和羊的  $\beta 6$  基因的核苷酸序列一致性分别为 79.5%、84.9%、85.4%、85.2%、88.7%、90.1%、91.9% 和 91.9%。推导的氨基酸序列一致性分别为 93.5%、88.2%、88.5%、88.3%、91.0%、92.8%、93.3% 和 93.4%。为进一步深入研究 FMDV 嗜性、与宿主细胞的相互作用、病毒的侵入机制等问题奠定了基础。

**关键词** 口蹄疫病毒, 受体, 猪整联蛋白  $\beta 6$  基因, 分子特征

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)05-0924-06

**Abstract** In order to study the roles of integrin  $\beta 6$  in Foot-and-Mouth Disease Virus infection, pig integrin  $\beta 6$  was firstly molecularly cloned from RNA of the tongue and lung of recovered pig infected experimentally with foot-and-mouth-disease virus (FMDV), and was compared with the  $\beta 6$  gene of other animals available in GenBank at nucleotide and amino acid levels. GeneBank association number of the  $\beta 6$  gene is EF432729. Pig integrin  $\beta 6$  gene (2367bp) encodes a polypeptide of 788 amino acids consisting of 9 potential N-linked glycosylation sites, 3 Glycosaminoglycan attachment sites, a cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site, 10 Protein kinase C phosphorylation sites, 2 EGF-like domains and 2 cysteine-rich regions. Pig integrin  $\beta 6$  subunit has a 26-residue putative signal peptide, a 681-residue ectodomain, a 29-residue transmembrane domain, and a 52-residue cytoplasmic domain. 11 mutant nucleotides were found in  $\beta 6$  gene coding region and 9 amino acids were changed. The nucleotide sequence similarity of integrin  $\beta 6$  gene between rheses monkey, mouse, Norway rat, dog, guinea pig,

Received: January 31, 2007; Accepted: April 24, 2007.

This work was supported by a grant from the National Basic Research (973) Program (No. 2005CB523201).

\* Corresponding author. Tel: +86-931-8342052; E-mail: changhuiyun@126.com

国家重点基础研究发展计划 (973) 项目 (No. 2005CB523201) 和国家支撑计划 (No. 2006BAD06A03)。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

human, bovine, sheep is 79.5%, 84.9%, 85.4%, 85.2%, 88.7%, 90.1%, 91.9% and 91.9%, and the amino acid sequence similarity is 93.5%, 88.2%, 88.5%, 88.3%, 91.0%, 92.8%, 93.3% and 93.4% respectively. This study will lay a foundation for understanding the interactions of FMDV with receptors.

**Key words** FMDV, receptor, pig integrin  $\beta 6$  gene, molecular characteristics

口蹄疫( Foot-and-Mouth Disease, FMD)是由口蹄疫病毒( Foot-and-Mouth Disease virus, FMDV)引起的偶蹄动物的一种急性、热性、高度接触传染性动物疫病,世界动物卫生组织(OIE)将其列为A类动物传染病之首。FMDV是微小核糖核酸病毒科(Picornaviridae)口疮病毒属(Aphthovirus)的代表性成员,其衣壳由P1基因编码的VP1、VP2、VP3和VP4 4种结构蛋白各60分子组成,呈五、三、二轴对称的正二十面体立体结构。目前已经发现FMDV P1基因表达产物具有很强的免疫原性<sup>[1]</sup>,尤其是结构蛋白VP1大约140~160位的20个氨基酸残基处形成G-H环突出于表面,该环含有一个高度保守的Arg-Gly-Asp(RGD)基序,不仅是重要的中和位点,而且参与了FMDV与细胞受体的识别,是FMDV受体的共同识别序列<sup>[2]</sup>。

FMDV至少有两类细胞受体:整联蛋白和硫酸乙酰肝素(Heparan Sulfate, HS)<sup>[3]</sup>。硫酸乙酰肝素存在于所有细胞的表面及细胞基质,或是以完整的膜蛋白存在,或是作为细胞外基质的组分。目前还没有田间FMDV利用HS作受体的直接证据,口蹄疫病毒只有在经细胞多次传代后,才可利用HS作受体。整联蛋白被认为是口蹄疫易感动物感染的受体,到目前为止,已报道了4种RGD依赖性的FMDV整联蛋白受体<sup>[4-7]</sup> $\alpha v\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha v\beta 6$ 、 $\alpha v\beta 8$ ,其中 $\alpha v\beta 1$ 整联蛋白在生理状态的钙和镁离子浓度下不能介导FMDV感染, $\alpha v\beta 3$ 虽分布于易感动物的多种器官的上皮细胞,但在FMDV感染动物的初始阶段并不起主要作用。整联蛋白 $\alpha v\beta 6$ 与 $\alpha v\beta 8$ 主要分布于舌和甲状腺上皮细胞,在感染的最初阶段发挥着重要的作用。已有实验证明, $\alpha v\beta 6$ 整联蛋白不仅是决定FMDV嗜性的主要受体,而且在病毒与受体结合随后的脱壳、复制等过程中也发挥着重要作用<sup>[8]</sup>。为进一步研究 $\alpha v\beta 6$ 整联蛋白受体在口蹄疫病毒感染过程中的作用,本实验首次从FMDV感染康复猪的舌皮和肺组织中克隆到了猪整联蛋白 $\beta 6$ 亚基的基因并对其核苷酸序列和推导的氨基酸序列以及蛋白结构进行了分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

FMDV感染康复猪舌皮和肺组织由国家FMD参考实验室P3动物舍提供;RNeasy Mini Kit购自Qiagen公司,AMV反转录酶、pGEM T-easy载体、Oligo(dT)<sub>5</sub>、连接酶为Promega公司产品,限制性核酸内切酶、IPTG、X-gal、Taq DNA聚合酶、DNA Marker、DNA片段纯化试剂盒、感受态细胞JM109均购自宝生物(大连)公司,其他试剂均为国产或进口分析纯。

### 1.2 引物

参考GenBank中不同动物来源的 $\beta 6$ 基因序列,选择保守区设计引物:(P1)5'-CTgAgACCgATggCgATTgATCT-3';(P2)5'-ATgTTCTg TCCTTCggAAA-3',这对引物用于从猪舌皮和肺组织中扩增 $\beta 6$ 亚基基因的编码区,预期大小约为2.4kb。

### 1.3 RNA的提取、反转录

RNA提取所用器皿和试剂均经0.1%的DEPC(焦碳酸二乙酯)水溶液去RNase处理。从液氮中取出约0.2g重的舌皮和肺组织,分别于研钵中研磨至无肉眼可见颗粒,然后参考RNeasy Mini Kit操作说明提取组织总RNA,并进行反转录。反转录体系为:总RNA 1 $\mu$ g, dNTP 2 $\mu$ L, Oligo(dT)<sub>5</sub> 0.5 $\mu$ L, 5 $\times$  RT buffer 4 $\mu$ L, 反转录酶 0.5 $\mu$ L, RNA酶抑制剂 0.5 $\mu$ L, 加双蒸水至20 $\mu$ L体系。混匀后置于42 $^{\circ}$ C水浴2.5h, 99 $^{\circ}$ C水浴5min,冰浴冷却备用。

### 1.4 PCR

PCR反应体系为:10 $\times$  PCR buffer 5 $\mu$ L, dNTP 4 $\mu$ L, 上下游引物各1 $\mu$ L, cDNA 5 $\mu$ L, Taq酶 0.5 $\mu$ L, 加双蒸水至50 $\mu$ L体系;反应程序如下:94 $^{\circ}$ C 2min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 54 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 3min, 30个循环后,72 $^{\circ}$ C终延伸10min;1%琼脂糖电泳观察结果。

### 1.5 $\beta 6$ 基因的克隆

将纯化的PCR产物和pGEM T-easy载体于16 $^{\circ}$ C水浴进行连接反应,转化感受态细胞JM109,均匀涂布于含有IPTG、X-gal和Amp的LB琼脂平板上,37 $^{\circ}$ C温育12h后,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取 4 个(分别由猪舌和肺克隆到的  $\beta_6$  基因重组质粒各 2 个)送上海生工生物工程公司测序。

### 1.6 $\beta_6$ 基因序列及亚基结构分析

重组质粒序列测定后,借助 DNASTar、BioEdit、Mega3.1 等生物学软件对所测序列与参考序列比较分析,并用 Protean、Prosite 等软件对  $\beta_6$  亚基的结构进行了分析。参考基因及 GeneBank 登录号为: bovine  $\beta_6$  (AF468060)、rheses monkey  $\beta_6$  (XM001094252)、human  $\beta_6$  (NM000888)、norway rat  $\beta_6$  (BC079069)、guinea pig  $\beta_6$  (M35197)、sheep  $\beta_6$  (AJ439062)、dog  $\beta_6$  (XM852224)、mouse  $\beta_6$  (NM021359)。

## 2 结果

### 2.1 $\beta_6$ 基因的 RT-PCR 扩增和克隆

提取组织总 RNA 后,反转录得到 cDNA,PCR 扩增得到约 2.4kb 的目的条带(见图 1)。将凝胶纯化的 PCR 扩增产物与 pGEM T-easy 载体 16℃连接 12h 后,转化 JM109,挑取白色单个菌落制备质粒,经 PCR、酶切鉴定片段大小与预期结果相符(图略)。

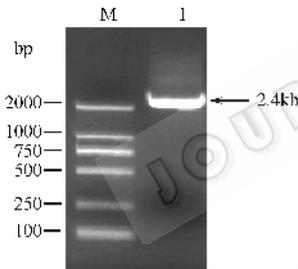


图 1 猪  $\beta_6$  亚基基因的 RT-PCR 结果

Fig. 1 RT-PCR results of pig  $\beta_6$  cDNA

M: DL-2000 marker; 1: PCR product.

### 2.2 $\beta_6$ 基因序列的测定

采用 Sanger's 双脱氧末端终止法对从猪舌皮和

肺组织中 RT-PCR 扩增的阳性克隆各两个进行核苷酸序列测定。结果表明 4 个阳性克隆的序列完全一致,与 GenBank 中的猪  $\beta_6$  基因(其序列由全基因组测序推导而来)核苷酸序列一致性达 99.5%。从起始密码子开始,共有 11 个核苷酸发生了变化,其中 2079 位(C→T)和 2256 位(T→C)核苷酸的突变是同义突变,其余的 467、1787、1837、1841、1984、2123、2302、2350、2357 位的核苷酸分别由原来的 G、A、A、G、T、G、A、C、T 错义突变为 A、G、G、A、C、T、G、T、C,导致 156、596、613、614、662、708、768、784、786 氨基酸分别由原来的 G、D、T、C、F、S、T、L、M 变为 D、G、A、Y、C、I、A、F、T。猪  $\beta_6$  亚基基因的编码区含有 2367 个核苷酸,编码 788 个氨基酸,含有 9 个潜在的糖基化位点,3 个氨基葡聚糖结合位点,1 个依赖于 cGMP 的蛋白激酶磷酸化位点,10 个蛋白激酶 C 磷酸化位点,分别位于 479-490 位和 563-574 位的两个表皮生长因子相似结构域,其中信号肽由 26 个氨基酸组成,胞外域由 681 个氨基酸组成,跨膜区由 29 个氨基酸组成,胞浆域由 52 个氨基酸组成(图 2)。该基因在 GenBank 中登录号为 EF432729。

### 2.3 $\beta_6$ 基因序列及亚基结构分析

猪  $\beta_6$  基因与猕猴、小鼠、挪威大鼠、犬、豚鼠、人、牛和羊的  $\beta_6$  基因的核苷酸序列一致性分别为 79.5%、84.9%、85.4%、85.2%、88.7%、90.1%、91.9% 和 91.9%。推导的氨基酸序列一致性分别为 93.5%、88.2%、88.5%、88.3%、91.0%、92.8%、93.3% 和 93.4%。 $\beta_6$  亚基各功能区段的核苷酸和氨基酸的一致性见表 1,猪  $\beta_6$  亚基在遗传进化树中的位置见图 3。猪  $\beta_6$  亚基分子量为 85 967.31 D,位于 70-140 位的氨基酸之间形成了二硫键桥,半胱氨酸丰富区位于 452-633 位氨基酸之间,以 511-524 位和 591-604 位最高,见图 4。

表 1 猪和几种动物  $\beta_6$  基各功能区段的核苷酸和氨基酸序列一致性比较

Table 1 Nucleotide and amino acid similarities of integr in  $\beta_6$  between pig and other animals

Function domains	Sequence	Bovine/%	Rheses monkey/%	Dog/%	Human/%	Mouse/%	Sheep/%	Norway rat/%	Mean/%
Mature subunit	nt	91.8	82.3	80.9	89.7	84.9	91.7	85.3	86.7
	aa	93.3	93.6	88.3	92.5	88.3	93.3	88.7	91.1
Signal peptide	nt	94.9	ND	ND	100	87.2	96.2	83.3	92.3
	aa	92.3	ND	ND	100	84.6	96.2	80.8	90.8
Ectodomain	nt	91.8	80.9	79.2	89.7	84.9	91.8	85.1	86.2
	aa	93.1	92.9	87.2	92.2	87.9	93.2	88.2	90.7
Transmembrane domain	nt	90.8	94.3	94.3	93.1	89.7	90.8	88.5	91.6
	aa	100	100	100	100	100	96.6	100	99.5
Cytoplasmic domain	nt	92.5	91.8	93.1	88.7	83.0	91.8	86.8	89.7
	aa	96.2	98.1	94.2	96.2	92.3	93.4	92.3	94.7

```

ATGGCGATGAAGTGGTTCGCTGCTTTCTCTATTCACGAAGGAAATGACAGCTACACGCTGGCTGTCGCCCTGGAGCTGCAGACACCTCTGAAGACTCTTACTCACTGGACCCGAG 120
M G I E L L C L F L L G R N D V H G C C A G G A E T C E D C L L G P Q
TGTCGCTGCTGCTCAGGAAATTTACTTATCTCTCTGAGCTGGAGAAAGCTGGAGACCCAGCAAACTTTACCTAAGAGCTGACACTAACTCATGCAAAAGCTCTCTCC 240
C A W C S Q E N T Y S G V G E R C D T P A N L A A G C Q L N U I E N P L S
CAAGTGAATACTTACAATAAAGCTCTCTGAGCATAGGAGAGAGAAATAGTTCAGATCGTTCAGATTGACCTCAAGACTTACTCTTAATATGAGACAGGACTGACAGACT 360
Q V E T L T N E 7 L S G R Q E V S S S T V Q I A P Q S L T E L R P G S E Q T
CTGTAAGTCAAGCTTGGCCAGACGAGGAGTACGTCAGTGGACTGTATGATTCATGGACTCTGCGCTCCATCGATGACAGACTCAACAGGATCAAAAGACTGAGTCCCTGCTTCC 480
L Q V Q V R Q Q T D Y V D Y Y M D L S A S M D D D I N I K E L D S L I S
AAGGAGATGCTAATAAAGAGCAAGCTTACAGCTGGCTTTGGGCTTTTGCGAAAACGATCTCCGCAATATGAAAACAGCCGCAAGAAATCGCCAAACCTTGGAGAGTATT 600
K I M S K L T S V F R L G F G S F V E K P I S P P M K T T P L E I A N P C S S I
CGTACTTCTGCTTCCCTACCCTTCATCAAGAGCAATTCGCTTCACAAATGATGCTCAAGATCAATGAAATCTGAGAAACAGAAATTTCTGCTAAATTTGATACCTCCAA 720
P Y F C L P T P C F K I L P L T V D A E P F K D I V K N Q K I S A N I D P P E
CGTCAATTTGATCAATGATGCAAGCCCTCTGCTCAAGCAAAATTTGGCTGGCCAACTACTCCCTCCATCTCCCTCTCTTGTACTGATGGGATTCACAATTTGCAATGCGAGC 840
G G F D A I M Q A A V C K E A I G W R N D S L H L L V L V S D A D S H U C M D S
AAGTGGCGGATGCTGATGCTGATGATGCTGCTGCTGCTGGAGAGAGAAAGAACTACGATGCAAGAGCTGGAGAAATCCAGCAATGGAGAACCTGATGATGATGATGCTA 960
K L A G I V I P V D G L C H L D S A N E Y S M S T V L L Y P T I G Q L I D K L Y
CAAAATAACGCTTACTGATCTTCTGCTGATCACTCAAGAACAACTCACTCTGATGAGAAATATGCAAAACTCATCTCCGAGACTGACTAGCGGACTCTGAGAGAACTGCGAACT 1080
Q K N V L I L T F A V T Q R Q V H L Y E N Y A K L P G A T V G V L Q E D S C N T
CTCGAGCTGATGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 1200
L Q L I I S A Y I E L R S E V E L V L G D T E G L N S F A I C N N G T P P F
CGAGCAAAAAGAAATGCTTCACTCAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG 320
P H Q K K C S H M K V G D T A S F N M T V G I P V C E K R S R H V V K P V G L
CGGAGCCGCTACAAATGCTGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 440
G D A L E I L I S P E C S C D C Q K E V E V V S S R C V H G V G S V Q C C V C A
TGCACCCCTGGCAATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 1560
C N P G H M G P L C E C G E D T L S M D S C R E A P E L S C S G R G D C Y C G
GAGTGCAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 1680
Q C T C H L S P Y G N L Y G P Y C Q C D D L S C V R H A G L L C G D N G D C E C
GGGAGTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 1800
G E F V C R S G W T G E Y C Y F T C S T D Q C V S R D G V L C S G R G G C V C G
AAGTGCATTTGACGAACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 920
K G I C T N P G A S G A Y I R C P T C G T P O N S K R S E U H L S A D G Q
GCTCGAGAGAGCTTTGACAAATGCAAACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 2040
A R E D G V D K C K L A G A I S I E E D L S K D S A Y S C S L Q G E N D C L I
AGATCTTAATAACTACAGATAAAGAGAGAAAGCAATTTATTCAGAGCATCACCGCAAACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 2160
T F L I T T D K V G K I I S I S E E D C P K P P N P V H L G E S L A I L
CTCACTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 2280
L I G Y Y L L C W K L Y S F H D R K E V A R L E A L R S A A K P Q I G T N P
CTGTAGAGGCTTCAACAGCTCTTAAAAATGCAACTACAAACAGAGGAGAAACAAAGGCTGACTTTCAGAGCTGCAATC 2367
L Y R G S T S A L K N V T Y A H R L K M K V D U S T D C *

```

图 2 猪  $\beta 6$  亚基的核苷酸及其推导的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence and predicted amino acid of pig  $\beta 6$

The putative signal peptide is marked with the dotted line; the putative transmembrane domain is indicated by the shading and curve line; potential N-glycosylation sites are underlined; glycosaminoglycan attachment sites are double underlined; the cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site is marked with curve line; protein kinase C phosphorylation sites are indicated by the shading; the asterisk indicates the terminal codon.

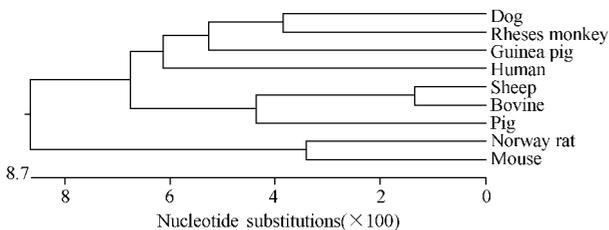


图 3 猪和几种哺乳动物  $\beta 6$  的遗传进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of pig and other mammalian  $\beta 6$

### 3 讨论

口蹄疫病毒感染细胞的过程主要包括病毒与细胞的吸附、进入细胞、脱壳、病毒 RNA 的翻译、复制

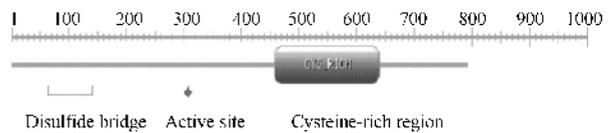


图 4 猪整联蛋白  $\beta 6$  亚基的功能区预测图

Fig. 4 Putative functional regions of pig  $\beta 6$  subunit

以及病毒粒子的组装、成熟释放。口蹄疫病毒主要经上呼吸道感染动物,在口咽或相关淋巴组织的上皮细胞起始复制后迅速扩散到口部和蹄部的上皮细胞<sup>[9]</sup>。特异性受体是 FMDV 识别、结合宿主细胞的分子基础,决定了口蹄疫病毒宿主特异性和组织特异性。目前已经证实口蹄疫病毒可利用整联蛋白和硫

酸乙酰肝素这两类受体来吸附并感染细胞。硫酸乙酰肝素是一种广泛存在于真核细胞表面或细胞外基质的蛋白多糖,可形成多种形态结构,不仅可结合多种内源生长因子、细胞因子、趋化因子、黏附分子、酶,还可作为多种病原的受体<sup>[10]</sup>。HS与FMDV的吸附较弱,这样可避免将病毒固定在某处而阻止病毒到达细胞表面并进入细胞,它作为FMDV进入细胞的增强子或共受体介导病毒吸附在细胞特定的部位,促进病毒与整联蛋白的吸附,且HS可能通过增强FMDV的持续性感染从而利于FMDV在易感动物体内生存<sup>[11]</sup>。整联蛋白是完整的膜受体家族,由至少20种不同的 $\alpha$ 亚基及8种 $\beta$ 亚基形成的20多种 $\alpha\beta$ 结合物,具有广泛的生理作用,还可作为多种病毒的细胞受体或共受体<sup>[12]</sup>。目前发现 $\alpha\beta 1$ 、 $\alpha\beta 3$ 、 $\alpha\beta 6$ 、 $\alpha\beta 8$ 、 $\alpha\beta 5$ 、 $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha 8\beta 1$ 、 $\alpha II\beta 3$  8种整联蛋白能够识别RGD序列而与其配体相互作用<sup>[13]</sup>。其中前四种是口蹄疫病毒的受体,且 $\alpha\beta 1$ 、 $\alpha\beta 6$ 与A型FMDV具有较高亲和力, $\alpha\beta 3$ 与O型FMDV具有较高亲和力<sup>[14]</sup>。Jackson等2000年发现整联蛋白 $\beta 6$ 亚基基因转染的FMDV非允许细胞SW480对FMDV的感染变得敏感,并且病毒的吸附可被针对 $\alpha\beta 6$ 整联蛋白的单克隆抗体特异性地抑制,从而证实 $\alpha\beta 6$ 整联蛋白是FMDV的细胞受体<sup>[5]</sup>。进一步研究发现 $\alpha\beta 6$ 整联蛋白不仅在感染的最初阶段发挥着重要的作用,决定了FMDV具有上皮细胞嗜性,而且还可依赖网格蛋白将病毒转运到内体<sup>[8]</sup>。

整联蛋白胞浆域可与细胞骨架接触,在与配体结合后其胞浆域会形成粘着斑,以便与第二信使、接头蛋白以及激酶、磷酸化酶或其他信号分子作用。整联蛋白与病原结合后会激发细胞特定的信号传导,下调宿主的免疫机能,为病原提供相对稳定的环境,从而避免被抗体或补体灭活,从而促进病原进入细胞,并改变细胞的生理特性,对宿主产生致病作用<sup>[15]</sup>。整联蛋白 $\beta$ 亚基N端在二硫键的作用下而紧密折叠,形成配体结合域,在胞外邻近跨膜区处都有半胱氨酸丰富区,与整联蛋白激活、配体结合特异性以及 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基的解离有关<sup>[16]</sup>。Neff等发现牛 $\beta 3$ 亚基比人的少1个半胱氨酸,因而与FMDV具有较高的结合效率<sup>[17]</sup>。另外,整联蛋白 $\beta$ 亚基胞浆域具有2或3个保守的基序NPXY(分别称为C<sub>cyto1</sub>, C<sub>cyto2</sub>, C<sub>cyto3</sub>, X代表任意氨基酸),在调节整联蛋白形成粘着斑的过程中起到了重要作用。研究发现整联蛋白 $\alpha\beta 6$ 依赖其胞浆域来介导FMDV吸附并进入细胞, Jackson等用 $\beta 8$ 亚基胞浆域替代 $\beta 6$ 亚基相

应区域后, $\alpha\beta 6$ 则不能介导FMDV吸附和感染<sup>[7]</sup>。Miller等将人源 $\beta 6$ 亚基胞浆域C端80%或包含NPLY的核心区去掉后, $\alpha\beta 6$ 也不能介导病毒感染<sup>[18]</sup>。在本试验也发现猪 $\beta 6$ 亚基位于70-140位之间的氨基酸形成了二硫键桥,在511-524位以及591-604位为半胱氨酸丰富区,第659-662位为NPLY,对其在猪整联蛋白 $\alpha\beta 6$ 介导FMDV吸附感染细胞中的作用还需进一步探讨。

GenBank中猪 $\beta 6$ 基因是全基因组测序推导而得出的,目前还没有从猪的组织中成功扩增 $\beta 6$ 基因的报道。 $\alpha\beta 6$ 整联蛋白在舌上皮细胞和唾液腺中表达量高,在肺上皮细胞很少表达,本实验首次从FMDV感染康复猪的舌皮和肺组织中分别克隆到了整联蛋白 $\beta 6$ 亚基的基因,其核苷酸一致性与GenBank中推导的猪 $\beta 6$ 基因核苷酸一致性达99.5%,与其他FMDV易感动物中牛、羊的核苷酸、蛋白序列一致性相对较高,达91.9%,而与人和其他动物相对较低。我们推测FMDV的感染会提高 $\beta 6$ 亚基mRNA的表达,且整联蛋白 $\beta 6$ 在偶蹄动物比较保守,决定了FMDV的宿主特异性。本实验所得猪 $\beta 6$ 基因有11个核苷酸发生了突变,但并非其活性位点的突变,这为进一步深入研究FMDV嗜性、与宿主细胞的相互作用、病毒的侵入机制等问题奠定了基础。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Yu XI(余晓岚), Xiao SB(肖少波), Chen HC(陈焕春), et al. High expression structural protein of the foot-and-mouth disease's P1 in *Escherichia coli* and analysis of its biology activity. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2005, 21(1):163-166.
- [2] Logan D, Abu GR, Blakemore W, et al. Structure of a major immunogenic site on foot-and-mouth disease virus. *Nature*, 1993, 362:566-568.
- [3] Jackson T, King AM, Stuart DI, et al. Structure and receptor binding. *Virus Res*, 2003, 91:33-46.
- [4] Berinstein A, Roivainen M, Hovi T, et al. Antibodies to the vitronectin receptor(integrin  $\alpha\beta 3$ ) inhibit binding and infection of foot-and-mouth disease virus to cultured cells. *J Virol*, 1995, 69:2664-2666.
- [5] Jackson T, Sheppard D, Denyer M, et al. The epithelial integrin  $\alpha\beta 6$  is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 2000, 74:4949-4956.
- [6] Jackson T, Mould AP, Sheppard D, et al. Integrin  $\alpha\beta 1$  is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 2006, 76(3):

- [ 7 ] Jackson T , Clark S , Berryman S , *et al.* Integrin  $\alpha\beta 8$  functions as a receptor for foot-and-mouth disease virus : role of the  $\beta$ -Chain cytodomain in integrin-mediated infection. *J Virol* , 2004 , **78** ( 9 ) : 4533 - 4540.
- [ 8 ] Berryman S , Clark S , Monaghan P , *et al.* Early events in integrin  $\alpha\beta 6$ -mediated cell entry of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* , 2005 , **79** : 8519 - 8534.
- [ 9 ] Alexandersen S , Zhang Z , Donaldson AI , *et al.* The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease. *J Comp Pathol* , 2003 , **129** : 1 - 36.
- [ 10 ] Spillmann D. Heperan sulfate : anchor for viral infection ? *Biochimie* , 2001 , **83** : 811 - 817.
- [ 11 ] Fry E , Lea SM , Jackson T , The structure and function of a foot-and-mouth disease virus-oligosaccharide receptor complex. *EMBO* , 1999 , **18** : 543 - 554.
- [ 12 ] Hynes RO. Integrins : bidirectional , allosteric signaling machines. *Cell* , 2002 , **110** : 673 - 687.
- [ 13 ] Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for Integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* , 1996 , **12** : 697 - 715.
- [ 14 ] Duque H , Larocco M , Golde WT , *et al.* Interactions of foot-and-mouth disease virus with soluble bovine  $\alpha\beta 3$  and  $\alpha\beta 6$  integrin. *J Virol* 2004 , **78** : 9773 - 9781.
- [ 15 ] Wickham TJ , Mathias P , Cheresch DA , *et al.* Integrin  $\alpha 3\beta 1$  ( CD 49c/29 ) is a cellular receptor for Kaposi 's sarcoma-associated herpesvirus ( KSHV/HHV-8 ) entry into the target cells. *Cell* , 2002 , **108** : 407 - 419.
- [ 16 ] van der FA , Sonnenberg A. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* , 2001 , **305** : 285 - 298.
- [ 17 ] Neff S , Mason PW , Baxt B. High-efficiency utilization of the bovine integrin  $\alpha\beta 3$  as a receptor for foot-and-mouth disease virus is dependent on the bovine  $\beta 3$  subunit. *J Virol* , 2000 , **74** : 7298 - 7306.
- [ 18 ] Miller LC , Blackemore W , Sheppard D , *et al.* Role of the cytoplasmic domain of the  $\beta$ -subunit of integrin  $\alpha\beta 6$  in infection by foot-and-mouth disease virus. *J Viro* 2001 , **75** : 4158 - 4164.