

口蹄疫病毒 O/QYYs/s/06 株感染性克隆的构建

卢受昇^{1,2}, 赵启祖³, 刘湘涛⁴, 孙彦伟², 任涛¹, 张桂红¹, 亓文宝¹, 查云峰², 孔令辰², 张翰², 樊惠英¹, 廖明¹

- 1 华南农业大学兽医学院, 广州 510642
- 2 广东省动物防疫监督总站, 广州 510230
- 3 中国兽医药品监察所, 北京 100081
- 4 中国农业科学院兰州兽医研究所, 兰州 730046

摘要: 本研究在完成 FMDV O/QYYs/s/06 株全基因组序列测定的基础上, 分 3 段对全基因组进行克隆, 其后将各片段克隆到载体 P43 中, 从而获得携带 O/QYYs/s/06 株基因组全长 cDNA 的重组质粒 P43C。将重组质粒 P43C 与表达 RNA 聚合酶的质粒 T7 共转染 BHK-21 细胞, 48 h 后收获培养液接种 2~3 d 乳鼠, 取经乳鼠传代后的第 4 代病毒液, 经反向间接血凝、中和试验和测序等方法证明拯救的病毒为 O 型 FMDV。以上结果表明, O/QYYs/s/06 株全长 cDNA 分子克隆的构建成功。

关键词: 口蹄疫病毒, O/QYYs/s/06 株, 全长 cDNA

Construction of an infectious cDNA clone derived from foot-and-mouth disease virus O/QYYs/s/06

Shousheng Lu^{1,2}, Qizu Zhao³, Xiangtao Liu⁴, Yanwei Sun², Tao Ren¹, Guihong Zhang¹, Wenbao Qi¹, Yunfeng Zha², Lingchen Kong², Han Zhang², Huiying Fan¹, and Ming Liao¹

- 1 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China
- 2 Guangdong Provincial Veterinary Station of Epidemic Prevention & Supervision, Guangzhou 510230, China
- 3 China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China
- 4 Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China

Abstract: After sequencing, we amplified and cloned foot-and-mouth disease virus (FMDV) O/QYYs/s/06 whole genome by three fragments. These three fragments were cloned into vector P43 one by one to construct recombinant plasmid P43C, which carried the full-length cDNA of FMDV O/QYYs/s/06. Then, plasmid P43C and plasmid T7 expressing T7 RNA polymerase were co-transfected into BHK-21 cells. After 48 h, we harvested the culture broth from transfected BHK-21 cells and inoculated into 2-3 day-old sucking mice. After four generation passage, the virus harvested from sucking mice was confirmed to be type O FMDV by the indirect hemagglutination test, sucking mice's neutralization test and sequencing. The results showed that we have successfully constructed the full-length cDNA clone of FMDV O/QYYs/s/06 strain.

Keywords: foot-and-mouth disease virus (FMDV), O/QYYs/s/06 strain, full-length cDNA

Received: January 4, 2009; **Accepted:** May 22, 2009

Supported by: National Natural Sciences Foundation of China (No. 3080026).

Corresponding author: Ming Liao. Tel: +86-20-85285282; E-mail: mliao@scau.edu.cn

Huiying Fan. Tel: +86-20-85280240; Fax: +86-20-85280242; E-mail: fanhy@scau.edu.cn

国家自然科学基金(No. 30800826)资助。

口蹄疫(Foot-and-mouth disease, FMD), 是由口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus, FMDV)引起的, 主要以感染猪、牛、羊等偶蹄家畜为主的一种烈性传染病。FMDV 为单股正链 RNA 病毒, 基因组全长约 8500 个核苷酸, 由 5'端非编码区(5'UTR)、一个开放阅读框(ORF)、3'UTR 和 Poly(A)尾组成^[1]。目前反向遗传学已广泛用于 FMDV 的研究之中, 为深入研究 FMDV 的分子生物学特性及病毒与宿主相互作用提供了强有力的技术工具^[2]。目前, 国内外已经成功拯救了 O、A、SAT II 等血清型在内的多株 FMDV 感染性克隆^[3-5]。

本研究以口蹄疫病毒 O/QYYs/s/06 株为研究对象, 利用体外转录方法, 首先将 FMDV 全基因组置于载体 P43 的 T7 启动子下游构建全长重组质粒 P43C, 通过质粒共转染技术将 P43C 和表达 T7 RNA 聚合酶的真核表达载体 T7 导入 BHK-21 细胞, 借助 T7 RNA 聚合酶的转录活性在细胞内完成 FMDV 基因组全长 cDNA 到 RNA 的过程, 进而获得了重组病毒。这一方法将为深入研究 FMDV 的抗原性、毒力、发病机理, 尤其是 FMDV 的分子致病机制及其准种特性等提供了有力的技术支持。

1 材料与方法

1.1 细胞、毒株和质粒

BHK-21 细胞由武汉大学中国典型培养物保藏中心提供; FMDV O/QYYs/s/06 株由兰州兽医研究所口蹄疫国家参考实验室分离保存; pGEMT-Easy

载体为 Promega 公司产品。载体质粒 P43、T7 为中国兽医药品监察所赵启祖研究员^[6]惠赠。转染试剂 lipofectamine2000 为 Invitrogen 公司产品。A 型、O 型和 Asia I 型 FMDV 反向间接血凝试剂盒, O 型 FMDV 标准阴、阳性血清购自中国农业科学院兰州兽医研究所。

1.2 全长 cDNA 克隆的构建

在完成 O/QYYs/s/06 株全长基因组的测序^[7]的基础上, 根据基因组序列特征, 结合载体 P43 的酶切位点, 对全基因组分 4 段(P0、P717、P556 和 P15t)进行扩增, 分段扩增的引物见表 1。其中 P0 通过引物设计在 3'端加入 12 个 G-C 碱基对, P717 的 5'端加入 12 个 G-C 碱基对, P0 和 P717 通过连接 PCR 方法^[8], 连接成含有 12 个 PolyC 的 P0-717 片段, 完成 PolyC 的引入。最后分 3 段进行全长 cDNA 的构建, 由 5'端至 3'端顺序分别为 P0-717、P556 和 P15t, 通过 *Sma* I、*Xba* I、*Bgl* II 和 *Not* I 四个单一酶切位点逐段连接进穿梭载体 P43 中, 构建 P43C 全长重组质粒(图 1)。

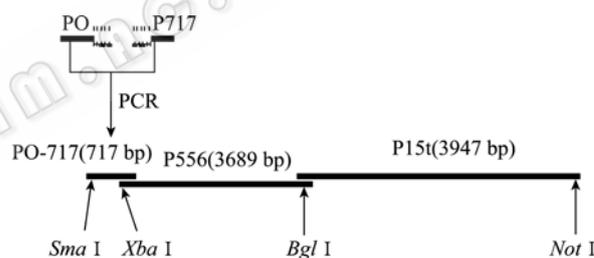


图 1 FMDV O/QYYs/s/06 株基因组全长 cDNA 构建示意图
Fig. 1 Schematic representation of full length cDNA construct of FMD O/QYYs/s/06 strain.

表 1 用于 O/QYYs/s/06 株 FMDV 全长基因组分段扩增的引物序列

Table 1 Primers pairs used to amplify the complete sequences of O/QYYs/s/06 genome

Primer name	Primer sequence (5'-3')	
P0	P0 (F)	GGGCCCGGGTCTTGAAGGGGGCGCTAGGGT
	P356 (R)	GGGGGGGGGGGTGAAAGGTAGGCTTCG
P717	P383 (F)	CCCCCCCCCAAGCAACACC
	P717 (R)	GTGCTGCTACTAACACCCGCCAG
P556	P556 (F)	CCGTCGTTGAGGAAGACTTGATC
	P4219R (R)	GCGAATCGGAGATCTTCTTACCACA
P15t	P4219F (F)	TGTGGTAAAGAAGATCTCCGATTCCG
	P15t (R)	GGCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTTTT

(F): sense primer; (R): antisense primer.

1.3 转染和病毒的拯救

1.3.1 转染质粒的制备

用 Omega 公司的去内毒素的质粒抽提试剂盒 E.Z.N.A.TM Endo-Free Plasmid Mini Kit II 抽提质粒 P43C、T7, 抽提步骤参照说明书。

1.3.2 转染 BHK-21 细胞

单层 BHK-21 细胞生长至 70%~90% 时, 用 OPTI-MEMI 培养基清洗细胞, 同时质粒 P43C 用 *Not* I 线性化后与质粒 T7 按一定的比例混合(总量 4 μ g), 最后与 Lipofectamine2000TM (Invitrogen) 转染试剂混合, 然后将该复合物加至清洗过的细胞中, 在含 5% CO₂ 的培养箱中 37°C 孵育 6 h, 去除转染混合液, 更换含 0.5%~1% 血清的无抗生素培养液培养 48~72 h, 观察细胞病变。

1.3.3 接种乳鼠

收集转染后的第一代细胞和上清, 冻融 2 次, 4°C、5000 r/min 离心 10 min, 上清用孔径为 0.22 μ m 过滤器过滤后, 接种 3 日龄乳鼠(0.2 mL/只), 观察乳鼠的发病情况。

1.3.4 拯救病毒的 RT-PCR 检测

为了鉴定重组病毒的基因组序列, 取经乳鼠传代后的第 4 代的病毒液, 应用荧光 RT-PCR 方法进行检测, 考虑到前几代病毒液可能存在转染质粒的残留问题, 将每份样品分 2 管, 在反应体系中各组分相同的情况下, 一管加入反转录酶, 另一管不加反转录酶, 对比二者 Ct 值的差异, 以了解转染质粒的残留情况。当不加反转录酶管为阴性时, 将扩增的 VP1 和 S 基因送寄 TaKaRa 公司进行测序。

1.3.5 拯救病毒反向间接凝集试验

在 96 孔血凝板上, 取 A 型、O 型和 Asia I 型标准抗原和拯救病毒液各 50 μ L, 用稀释液按 1:6、1:12、1:24、1:48、1:96、1:192、1:384 进行稀释, 第 8 孔作为稀释液的空白对照, 拯救病毒液做 2 个重复, 最后每孔加入 25 μ L 诊断液(1~3 排加 A 型诊断液, 4~6 排加 O 型诊断液, 7~9 排加 Asia I 型诊断液)。置振荡器上振荡 1~2 min, 室温放置 1~2 h, 判定结果。

1.3.6 拯救病毒的乳鼠中和试验

用 PBS 液将病毒液作 1:10 000 稀释, 取 0.5 mL 与相同体积的 O 型 FMDV 标准阴性(1:10 稀释)、阳性血清(1:10 稀释, 原滴度 1:512)混合, 并同时设置稀释后的病毒液对照, PBS 液对照, 于 37°C 孵育 1 h,

各接种 3 天龄乳鼠 4 只(0.2 mL/只), 连续观察 1 周。

2 结果与讨论

2.1 全长 cDNA 克隆的构建及其序列测定

利用连接 PCR 技术和单一限制性内切酶酶切位点, 成功构建了 FMDV O/QYYs/s/06 株的全长 cDNA 克隆 P43C。用 *Sma* I 和 *Bgl* II 对重组质粒进行鉴定, 能从 P43C 中切出长度为 6691 bp 和 4139 bp 的 2 个条带, 结果与预期一致(图 2)。序列测定结果表明, FMDV O/QYYs/s/06 株基因组全长为 8166 nt, 其中 5'-UTR 长 1055 nt, 编码区长 7572 nt, 3'-UTR 长 92 nt。T7 启动子置于基因组全长 cDNA 的 5'端, 3'端为 35 个核苷酸的 poly(A)尾巴。

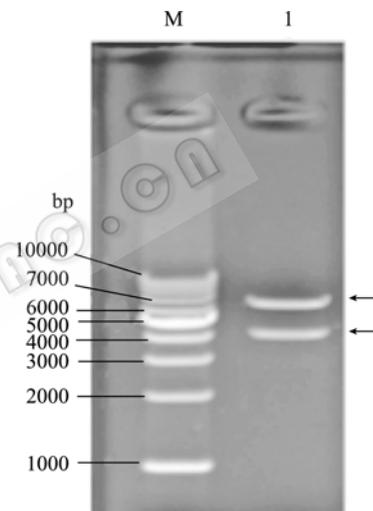


图 2 P43C 质粒的酶切鉴定结果

Fig. 2 Identification of P43C plasmid. M: DNA marker; 1: P43C plasmid of digested by *Sma* I and *Bgl* II.

2.2 病毒的拯救

Not I 线性化后的 P43C 与 T7 质粒共转染 BHK-21 细胞后, 未见明显的细胞病变效应(Cytopathic effects, CPE)(图 3), 将此细胞病毒液接种乳鼠, 接种 18 h 后, 乳鼠表现典型的呼吸困难、后肢麻痹等症状, 接种 24 h 后乳鼠死亡(图 4), 而对照组乳鼠存活。将此细胞病毒液在乳鼠中连续传 4 代后, 乳鼠死亡时间稳定在 18 h 左右, 说明所接种的拯救病毒对乳鼠具有致病性。

2.3 RT-PCR 鉴定拯救病毒

收集在乳鼠体内传至第 4 代的病毒液, 制备总 RNA, 经荧光 RT-PCR 方法检测表明, 不加反转录酶管为阴性, 说明质粒的残留已得到消除。加入反转录酶管

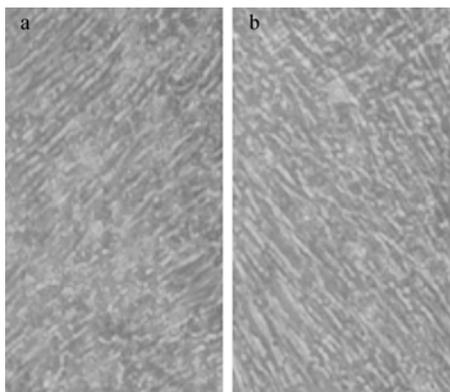


图3 转染 P43C 和 T7 质粒后 48 h 的细胞
Fig. 3 BHK-21 monolayer cell of transfected with P43C and T7 plasmid. (a) Monolayer cell transfected with P43C-7. (b) BHK-21 cell control.

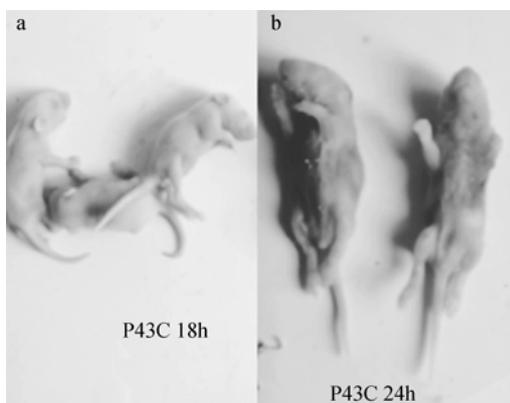


图4 接种 P43C 第一代细胞培养液的乳鼠
Fig. 4 Suckling mice inoculated P43C virus. (a) 18 h (Palsy). (b) 24 h (Dead).

可以扩增到 VP1 和 S 基因特异性片段, 同时对扩增产物进行序列测定, 结果也与母本毒株的序列一致。

2.4 反向间接血凝鉴定

P43C 拯救病毒经反向间接血凝鉴定为 O 型口蹄疫病毒(图 5)。

2.5 中和试验

O 型 FMDV 标准阳性血清中和组和 PBS 液对照组的乳鼠全部存活, 阴性血清中和组和病毒液接种组的乳鼠于 48~72 h 全部死亡, 说明所拯救的病毒为 O 型口蹄疫病毒。

3 讨论

近年来, 在口蹄疫病毒反向遗传操作中, 多采用体外转录的方式, 即利用 RNA 聚合酶在体外将基因组 cDNA 拷贝转录成基因组 RNA, 再用基因组 RNA 转染宿主细胞, 从而产生病毒粒子。但是体

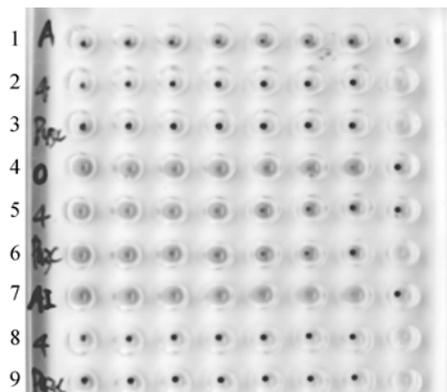


图5 拯救病毒的反向间接血凝的鉴定结果
Fig. 5 RI-HI method identification of rescued virus. 1: standard A type virus antigen, 4: standard O type virus antigen; 7: standard Asia I type virus antigen; 2,3,5,6,8,9: rescued virus P43.

外转录的感染性常常比病毒 RNA 要弱^[9], 并且体外制备 RNA, 试剂较昂贵, 费时费力, 制备的 RNA 容易降解, 致使转染的 RNA 具有多态性和异质性, 在细胞内竞争抑制完整 RNA 感染性的恢复。而体内转录无需对 RNA 进行操作, 减少了对环境、用具、器皿进行去 RNA 酶处理的麻烦, 且能节省大量的时间和节约由于体外转录所需的试剂成本。本研究因此采用体内转录的方式, 即将含有病毒 cDNA 的重组质粒 P43C 与含 RNA 聚合酶基因的真核表达质粒 T7 共转染 BHK-21 细胞, 并在体内进行转录与复制, 生成具有感染性的 RNA, 产生病毒粒子。

FMDV 基因组翻译起始位点上游有 1 个 poly (C) 序列, 几乎全部由胞嘧啶碱基组成。关于此区段的长度与 FMDV 的感染性是否有关仍无定论^[9]。但是, 人们一致认为要获得 FMDV 感染性克隆, poly (C) 区段是必需的^[10]。根据目前的技术手段难以从病毒材料中克隆出这一区段的真实序列。为了构建 FMDV 的全长 cDNA 分子, 本试验采用连接 PCR 技术引入了含有 12 个胞嘧啶碱基的 poly(C) 序列, 并将其插入全长 cDNA 分子中。poly (A) 尾巴结构不仅具有稳定 RNA 基因组结构的功能, 而且对维持其感染性也有一定作用^[11], 所以构建全长 cDNA 时要确保得到合理长度的 poly (A)。本研究采用 3' RACE(cDNA 末端快速扩增)方法, 即利用 FMDV 的 3' 端 poly(A) 结构, 以 oligo(dT) 和一锚定引物反转录 RNA 得到 cDNA 第一链然后用含部分锚引物序列与特异性引物 P4219F 进行扩增, 结果扩增出 35 个 A 长度的 poly(A) 尾, 这为成功构建感染性 cDNA 打下

了基础。在本实验中, 拯救病毒 P43C 对乳鼠有致病性, 与亲本病毒相近, 对乳鼠的致死时间稳定在 18 h。而在细胞培养特性上, 二者有着较大的差异, 亲本病毒可在 24 h 内使 BHK-21 细胞 100% 出现 CPE, 而拯救病毒 P43C 不能使 BHK-21 细胞出现明显的 CPE, 且在细胞上传至第 3 代即失去了繁殖能力。对比二者的基因组结构, 主要在 5'UTR 的 poly(C) 和 3'末端的 poly(A) 两个片段的长度存在差异, P43C 的 poly(C) 长 12nt, poly(A) 长 35nt, 而亲本病毒的 poly(C) 长度无法准确得知, poly(A) 长度至少 58nt。此外只有 4422 位碱基发生了 A→G 的同义突变。以上因素是否是造成二者差异的主要原因, 还需进一步的研究去证实。

此外, 在对拯救病毒进行鉴定时, 培养液或细胞内存在全基因组 cDNA 或 RNA 残留的问题。本研究中发现全长 cDNA 质粒的残留, 经接种乳鼠 3 代后才能消除。对于低代次的细胞培养液或乳鼠, 若用 RT-PCR 方法进行鉴定, 很可能出现假阳性。而对转染后的初代细胞培养液用检测病毒蛋白的免疫学方法进行检测, 则可能病毒含量低, 因检测方法敏感性不足, 而出现假阴性, 故一般需多传几代进行鉴定才能得到准确的结果。本研究应用建立的荧光 RT-PCR 方法, 通过在反应体系中加入反转录酶的 Ct 值与不加反转录酶 Ct 值的比较, 实现对各代次培养液中病毒的相对含量, 及残存质粒含量的评估, 克服了全长 cDNA 质粒残留对鉴定结果的影响。

REFERENCES

- [1] Xie QG. Foot-and-mouth Disease. Beijing: Chinese Agriculture Press, 2004: 1–156.
谢庆阁主编. 口蹄疫. 北京: 中国农业出版社, 2004: 1–156.
- [2] Liu GQ, Liu ZX, Xie QG. Reverse genetic technique and its application in FMDV research. *Biotechnol Bull*, 2003, **3**: 1–11.
刘光清, 刘在新, 谢庆阁. 反向遗传技术及其在 FMDV 研究中的应用. *生物技术通报*, 2003, **3**: 1–11.
- [3] Liu GQ, Liu ZX, Xie QG, *et al.* Generation of an infectious cDNA clone of an FMDV strain isolated from swine. *Virus Res*, 2004, **104**: 157–164.
- [4] Elizabeth R, Tina H, Hernando D, *et al.* Analysis of a foot-and-mouth disease virus type A₂₄ isolate containing an SGD receptor recognition site *in vitro* and its pathogenesis in cattle. *J Virol*, 2005, **79**(20): 12989–12998.
- [5] Storey P, Theron J, Maree FF, *et al.* A second RGD motif in the 1D capsid protein of a SAT1 type foot-and-mouth disease virus field isolate is not essential for attachment to target cells. *Virus Res*, 2007, **124**: 184–192.
- [6] Zhao QZ, Pacheco JM, Mason PW. Evaluation of genetically engineered derivatives of a chinese strain of foot-and-mouth disease virus reveals a novel cell-binding site which functions in cell culture and in animals. *J Virol*, 2003, **77**(5): 3269–3280.
- [7] Lu SS, Liao M, Sun YW, *et al.* The genome sequencing and analysis of foot-and-mouth disease virus QYYS strain. *Vet Sci China*, 2007, **37**: 38–40.
卢受昇, 廖明, 孙彦伟, 等. 口蹄疫病毒 QYYS 株全基因组序列测定及分析. *中国兽医科学*, 2007 (增刊), **37**: 38–40.
- [8] Fang XZ. Complete genomic sequencing and construction of an infectious cDNA clone of a cell passaged FMDV OH/99 strain isolated from infected swine. The Full Text Database of Chinese Excellent Master's Thesis, 2004: 11–13.
方先珍. 口蹄疫病毒 OH/99 株细胞传代毒全基因组序列测定及其感染性克隆的构建. *中国优秀硕士学位论文全文数据库*, 2004: 11–13.
- [9] Bai XW, Li PH, Cao YM, *et al.* Engineering infectious foot-and-mouth disease virus *in vivo* from a full-length genomic cDNA clone of the A/AKT/58 strain. *Sci China*, 2008, **38**(11): 1028–1035.
白兴文, 李平花, 曹轶梅, 等. 口蹄疫病毒 A/AKT/58 株基因组全长感染性 cDNA 克隆的体内拯救. *中国科学*, 2008, **38**(11): 1028–1035.
- [10] Deng G, Wu R. An improved procedure for utilizing terminal transferase to add homopolymers to the 3' termini of DNA. *Nucleic Acids Res*, 1981, **9**: 4173–4188.
- [11] Grubman MJ, Baxt B, Bachrach HL. Foot-and-mouth disease virion RNA: Studies on the relation between the length of its 3'-poly(A) segment and infectivity. *Virology*, 1979, **97**: 22–31.