

牛 Asia 1 型口蹄疫病毒感染性克隆的构建

李爽¹, 张润祥¹, 宋鸽¹, 高明春¹, 刘湘涛², 王君伟¹

1 东北农业大学动物医学学院, 哈尔滨 150030
2 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 Asia 1 型口蹄疫病毒(FMDV)As01 株全基因组测序的基础上, 采用融合 PCR 扩增得到含有 15 个 C 碱基的 5'端片段(约 1800 bp), 并利用长片段 PCR 扩增得到基因组 3'端片段(约 6700 bp)。再利用单一的酶切位点将 2 个片段克隆到 pBluescript SK 载体中, 从而获得携带 As01 株基因组全长 cDNA 的重组质粒 pBSAs。将该质粒线性化后作为模板体外转录并转染 BHK-21 细胞, 可观察到典型的细胞病变。对收获的病毒采用 RT-PCR、间接免疫荧光和电镜观察等检测及鉴定, 结果表明, 拯救出了具有感染性的 Asia1 型 FMDV。拯救毒与亲本毒对乳鼠的致病力(LD₅₀)差异不显著, 具有相似的生物学特征。该感染性克隆的构建, 为深入研究 FMDV 的致病机理及开发新型疫苗提供了有效的反向遗传操作平台。

关键词: 口蹄疫病毒, 全长 cDNA, 感染性克隆, 反向遗传, 病毒拯救, 体外转录

Rescue of bovine Asia 1 serotype foot-and-mouth disease virus from a full-length cDNA clone

Shuang Li¹, Runxiang Zhang¹, Ge Song¹, Mingchun Gao¹, Xiangtao Liu², and Junwei Wang¹

1 College of Veterinary Medicine, Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China
2 Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China

Abstract: After sequencing the Asia 1 foot-and-mouth disease virus (FMDV) (As01 strain), we amplified the two fragments covering the whole genome by overlapping PCR and long PCR. The 5' fragment was 1.8 kb in length including 15Cs, and the 3' fragment was 6.7 kb in length. The two fragments were cloned into the pBluescript SK vector to construct recombinant plasmid pBSAs carrying the full-length cDNA of FMDV As01 strain. The RNA transcript was synthesized *in vitro* using T7 polymerase and transfected into BHK-21 cells. We observed the typical CPE caused by rescued FMDV. The harvested virus was confirmed to be Asia 1 FMDV by RT-PCR, indirect immunofluorescence assay (IFA) and electron microscope observation. The rescued virus showed a similar pathogenicity in suckling mouse (LD₅₀) compared to its wild-type virus. The infectious cDNA clone of the FMDV As01 strain laid a new ground for further investigation of FMDV virulence determinants and development of novel vaccines against FMD.

Keywords: foot-and-mouth disease virus (FMDV), full-length cDNA, infectious clones, reverse genetics, virus rescue, *in vitro* transcription

Received: July 23, 2009; **Accepted:** September 22, 2009

Supported by: Key Projects in the National Science and Technology Pillar Program(No. 2006BAD06A17-08), Science and Technology Program of Heilongjiang Province(No. GA06B202), Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research System(No. nycytx-0303).

Corresponding author: Junwei Wang. Tel: +86-451-55191672; E-mail: jwwang@neau.edu.cn

国家科技支撑计划(No. 2006BAD06A17-08), 黑龙江省科技计划 (No. GA06B202), 现代农业产业技术体系建设专项资金(No. nycytx-0303)资助。

口蹄疫(Foot-and-mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus, FMDV)引起的偶蹄动物的一种高致病性接触性传染病,以传播速度快、发病率高而著称,世界动物卫生组织(OIE)将其列为必须申报的传染病。FMDV 属于小 RNA 病毒科、口蹄疫病毒属,有 7 种血清型(A、O、C、Asia1、SAT1、SAT2 和 SAT3),型间无交叉保护性。FMDV 基因组为单股正链 RNA,全长约 8500 个核苷酸,由 5'非编码区(5'-UTR)、一个开放阅读框(ORF)、3'-UTR 和 poly(A)尾组成^[1-2]。目前,人们对 FMD 的致病机理、病毒的变异机制以及分子间相互作用等方面尚待进一步的了解及研究。自 1990 年 Zibert 等首次成功拯救 O 型 FMDV 以来,反向遗传学开始成为研究 FMDV 的另一有效技术手段^[3],极大地促进了 FMD 研究的发展。至今,国内外已成功拯救了包括 O、A 和 SAT2 等血清型在内的多株 FMDV 感染性克隆^[4-6]。2005 年我国江苏、河北、青海和北京等多个省市发生 Asia1 型口蹄疫疫情,其主要为江苏谱系(Asia1/JS/CHA/05, GenBank Accession No. EF149009)^[7],根据我国的流行特点,深入开展牛源 Asia1 型 FMDV 反向遗传学的研究具有重要意义。

本研究在完成 Asia 1 型 FMDV 江苏谱系 As01 株全序列测定基础上^[8],以其为研究对象,将全长 cDNA 重组质粒 pBSAs 利用 *EcoR* V 进行 5'和 3'末端双侧线性化后,在 T7 RNA 聚合酶作用下体外转录成 RNA,转染 BHK-21 细胞,获得具有与亲本病毒相似感染性的重组病毒。为进一步研究 FMDV 的基因功能、致病机理、毒力变异机制、宿主嗜性和开发新型疫苗等建立了重要的技术平台。

1 材料与方法

1.1 病毒、细胞和质粒

BHK-21 细胞为本实验室保存; Asia1 型 FMDV As01 株与 Asia1/JS/CHA/05 毒株(GenBank Accession No. EF149009)核苷酸序列的同源性为 98.3%;载体 pBluescript SK 由本实验室保存。

1.2 主要试剂及工具酶

PrimeSTARTM HS DNA 聚合酶购自大连宝生物有限公司,体外转录试剂盒 RiboMAXTM Large Scale RNA Production Systems-T7 购自 Promega 公司,

转染试剂 DMRIE-C Reagent 购自 Invitrogen 公司,抗 Asia1 型 FMDV 特异性单克隆抗体 3E11^[9]由中国农科院哈尔滨兽医研究所于力研究员惠赠。

1.3 全长 cDNA 的构建

根据 FMDV As01 株的全基因组测序结果,结合 pBluescript SK 载体的酶切位点,对全基因组分 3 段扩增: A 段(425 bp)、B 段(1474 bp)和 C 段(6670 bp),分段扩增引物见表 1。通过引物设计,在 A 段 3'端引入 15 个 G 碱基,在 B 段的 5'端引入 15 个 C 碱基,通过融合 PCR 的方法将 A 段和 B 段连接成含有 15 个 poly(C)的片段,完成 5'半长的构建及 poly(C)的引入。C 段采用 3'RACE 方法扩增,通过反转录引物(CR)中引入锚定序列及酶切位点,便于后续试验的连接及线性化。长片段(C 段)PCR 反应体系为: 5×PrimeSTARTM Buffer 10 μL, dNTP Mixture(各 2.5 mmol/L)4 μL, 引物 C1(10 μmol/L)1 μL, 引物 C2(10 μmol/L)1 μL, cDNA 3 μL, PrimeSTARTM HS DNA 聚合酶 0.5 μL, 用 ddH₂O 补至 50 μL。反应条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 15 s, 57℃ 15 s, 72℃ 6.5 min, 共 26 个循环; 72℃ 延伸 7 min, 4℃ 保存。先将 AB 段融合后产物通过 *Sal* I 和 *Bam* H I 酶切位点(通过 pMD18-T 载体多克隆位点处引入)插入 pBluescript SK 载体,再将 C 段通过 *Cla* I 和 *Not* I 酶切位点插入上述质粒中,构建 pBSAs 全长重组质粒。另外,在全基因组的 5'端引入 T7 启动子序列,用于体外转录,并且在 5'端和 3'端均引入 *EcoR* V 酶切位点,这样便于使用双酶切的方法可将全长 cDNA 双侧线性化(图 1)。

表 1 构建 FMDV As01 株全长 cDNA 所用的引物

Table 1 Primers used for construction of a full-length cDNA clone of FMDV As01 strain

Primers	Primer sequences (5'-3')
A1(Sense)	TTGGATATCTAATACGACTCACTATA GGGTTGAAAAGGGGCGCTAGGGTCTC
A2(Antisense)	GGGGGGGGGGGGGGGTGAAAGGC GGGCGCTTGGTGAC
B1(Sense)	CCCCCCCCCCCCCCTAAGTTTTA CCGTCACCTCC
B2(Antisense)	GTTGGAGCCTCCGCTGATAG
C1(Sense)	GTGTTTGCTGTGTACACTCC
C2(Antisense)	ATTAGCGGCCGCGATATCT
CR(Reverse)	ATTAGCGGCCGCGATATC TTTTTTTTTTTTTTTTT

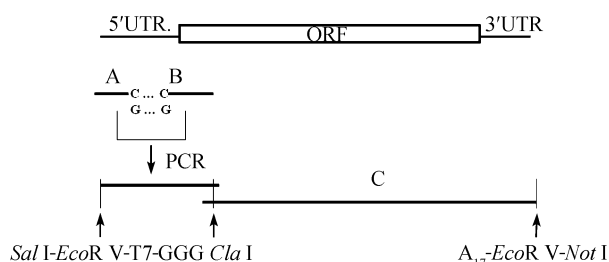


图1 FMDV As01 株基因组全长 cDNA 构建示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the full length cDNA clone of FMDV As01 strain.

1.4 体外转录和转染

采用 RiboMAXTM Large Scale RNA Production Systems-T7 系统进行体外转录, 反应体系: 5×buffer 4 μL, rNTPs(各 25 mmol/L)6 μL, T7 RNA 聚合酶混合液 2 μL, 用 *EcoRV* 酶切的重组质粒 pBSAs 胶回收产物(约 8200 bp)8 μL, 总体积 20 μL, 将反应液充分混匀后, 于 37°C 水浴中温育 3 h。每 1 μg 模板 DNA 加无 RNA 酶的 DNA 核酸酶 RQ1 1 μL, 37°C 温育 15 min, 去除 DNA 模板, 按酚氯仿抽提的方法纯化转录产物, 最后将转录产物溶于 20 μL 无 RNA 酶水中。

在 BHK-21 细胞长至 80% 时, 用 PBS 洗 2 遍细胞, 同时按 1:2(μg:μL)的比例将转录产物 RNA 与转染试剂 DMRIE-C(6 μL)混合, 将混合物加入清洗过的细胞中, 在 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养 4 h, 用含 2% 小牛血清的 DMEM 更换培养基继续培养, 观察细胞病变, 大约 42 h 收获病毒, 反复冻融 3 次后传代接种 BHK-21 细胞, 直到病毒能稳定产生 CPE。

1.5 间接免疫荧光检测拯救病毒

用转染后收获的细胞培养物的上清接种 96 孔板中的 BHK-21 细胞, 约 8 h 后, 用预冷的 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗 3 遍; 按 50 μL/孔加入抗 Asia 1 型 FMDV 特异性单克隆抗体 3E11(1:2000 稀释), 37°C 湿盒温育 1 h, PBS 洗 3 遍; 按 50 μL/孔加入 FITC 标记羊抗小鼠 IgG(1:200), 37°C 湿盒温育 1 h 后, 于荧光显微镜下观察。

1.6 电镜观察病毒粒子

反复冻融收获拯救病毒的 BHK-21 细胞培养液, 6000 r/min、4°C 离心 30 min, 取上清, 于含有 25% 蔗糖的 NTE 缓冲液中 $1.2 \times 10^5 \times g$, 离心 3 h, 沉淀用 PBS 溶解, 加入 1% FMDV 3E11 单克隆抗体, 37°C

温育 2 h, 4°C 过夜, 8000 r/min 离心 30 min, 沉淀用 100 μL PBS 重悬, 做常规负染色, 于 JEM-1200EX 电镜下观察病毒粒子。

1.7 RT-PCR 鉴定拯救的病毒

提取拯救病毒总 RNA, 扩增其部分 DNA 片段 PC15 和 PG, 预期大小分别为 770 bp 和 302 bp。PC15 段含有与亲本病毒相区分的 15 个 C 碱基, PG 中含有与亲本病毒相区分的分子标记 G 碱基(亲病毒为 A), 除此以外的序列均与亲本病毒完全相同。将 PCR 产物 PC15 和 PG 进行测序分析。

1.8 拯救病毒的生长曲线

将拯救病毒和亲本病毒按 10^5 TCID₅₀ 分别接种 BHK-21 细胞, 吸附 1 h 后用 PBS 洗去未吸附的病毒, 加入新鲜培养基。不同时间点取样, 用 Reed-Muench 法测定病毒 TCID₅₀, 绘制生长曲线, 并将拯救毒与亲本毒进行比较。

1.9 乳鼠致病力试验

将第 4 代拯救病毒和亲本病毒分别用 PBS 缓冲液做 10 倍系列稀释, 分别取 10^{-3} 至 10^{-8} 稀释的病毒液经皮下接种 3 日龄乳鼠, 每个稀释度接种 4 只, 接种剂量为 0.2 mL/只, 观察 7 d, 空白对照组只接种 PBS 缓冲液。观察乳鼠死亡情况并记录, 用 Reed-Muench 法计算 LD₅₀。

2 结果与分析

2.1 全长 cDNA 克隆的构建

利用融合 PCR 和长距离 RT-PCR 技术, 分别扩增得到 AB 融合段(1800 bp)和 C 段(6670 bp)的 DNA 片段, 连入载体后成功构建了 FMDV As01 株的全长 cDNA 克隆 pBSAs。重组质粒经单双酶切鉴定, 单酶切产物为 11 207 bp, 双酶切切出 8207 bp 和 3000 bp 的条带(图 2), 均与预期结果一致。序列测定结果表明, 病毒基因组由 8207 个核苷酸组成(包括 15 个 C 的 poly(C)区段), T7 启动子置于基因组全长 cDNA 的 5'端, 3'端为 32 个核苷酸的 poly(A)尾和 2 个限制性内切酶位点(*EcoRV* 和 *NotI*)。并且 pBSAs 中具有 A5886G 的遗传标记。

2.2 病毒的拯救

用体外转录的 RNA 转染 BHK-21 细胞后 42 h,

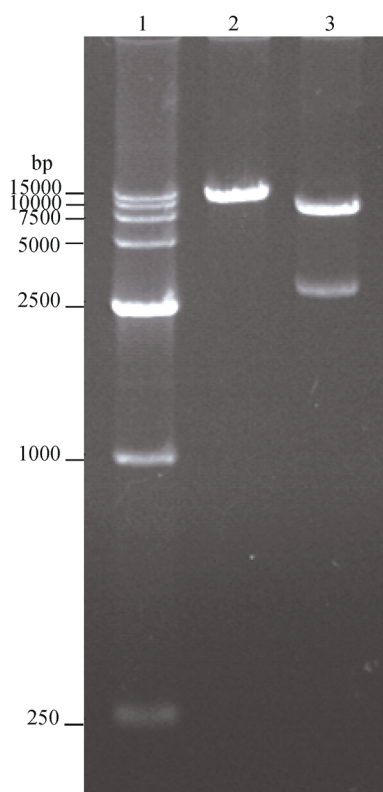


图2 pBSAs 质粒的酶切鉴定结果

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pBSAs with restriction enzyme digestion. 1: DNA marker; 2: pBSAs plasmid digested with *BamH* I; 3: pBSAs plasmid digested with *EcoR* V.

细胞出现细胞病变(CPE), 表现为细胞圆缩、呈葡萄串状分布、细胞崩解成碎片直至脱落(图 3A)。将细胞培养物连续传代, CPE 出现的时间缩短, 病变更加典型, 传至第 3 代细胞可在接种病毒后 7 h 出现明显的 CPE, 培养 11 h 可使 80% 细胞 CPE, 继续培养后最终单层脱落形成空斑, 而对照细胞单层完整, 形态规则(图 3B)。

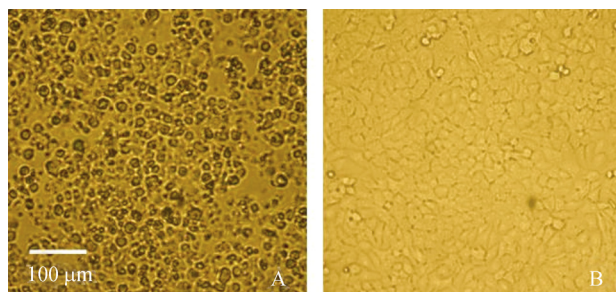


图3 拯救病毒感染 BHK-21 细胞后引起的 CPE

Fig. 3 CPE occurred on BHK-21 cells infected with rescued FMDV. (A) BHK-21 cells infected with rescued FMDV (bar=100 μ m). (B) Normal BHK-21 cells.

2.3 拯救病毒的间接免疫荧光试验结果

将拯救病毒和亲本病毒分别感染 BHK-21 细胞后用 Asia 1 型 FMDV 特异性单克隆抗体 3E11(该抗体具有血清型特异性)进行间接免疫荧光试验检测, 均可观察到特异性荧光(图 4A、B), 而正常 BHK-21 细胞(图 4C)无荧光产生。这表明, 拯救的病毒为 Asia 1 型 FMDV。

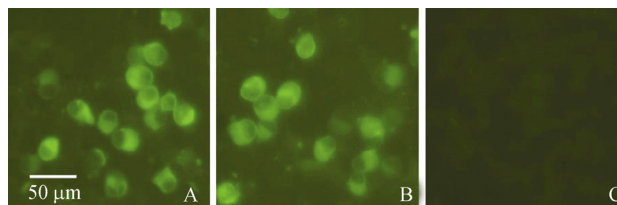


图4 拯救病毒的间接免疫荧光检测

Fig. 4 Detection the rescued FMDV on BHK-21 cells with indirect immunofluorescence. (A) BHK-21 cells infected with rescued virus (bar=50 μ m). (B) BHK-21 cells infected with parental virus. (C) Normal BHK-21 cells.

2.4 病毒粒子形态

纯化的拯救病毒与 FMDV 特异性单克隆抗体作用后形成免疫复合物, 经过负染色, 电子显微镜下观察, 可见呈球形的病毒粒子, 直径约为 25 nm(图 5)。

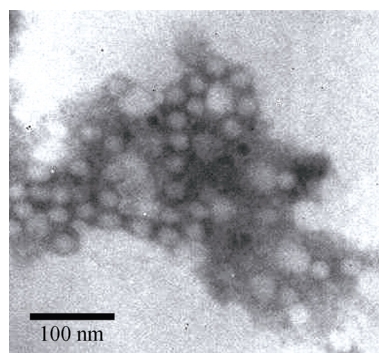


图5 拯救病毒的免疫电镜观察

Fig. 5 Rescued FMDV under electron microscope (bar=100 nm).

2.5 拯救病毒的 RT-PCR 鉴定

对拯救病毒和亲本病毒进行 RT-PCR 扩增基因 PC15 和 PG, 得到了与预期大小一致的 770 bp 和 302 bp 的条带(图 6)。测序结果显示, 拯救病毒 PC15 基因中含有 15 个 C, PG 基因中含有遗传标记 A5886G, 而亲本病毒存在 poly(C)的 PC15 段是 PCR 扩增不到的(未在图中显示)。故拯救毒能够以该两处分子标签与亲本病毒相区别(图 7), 排除了拯救过程中污染亲本毒的可能, 而其他序列与亲本毒一致。

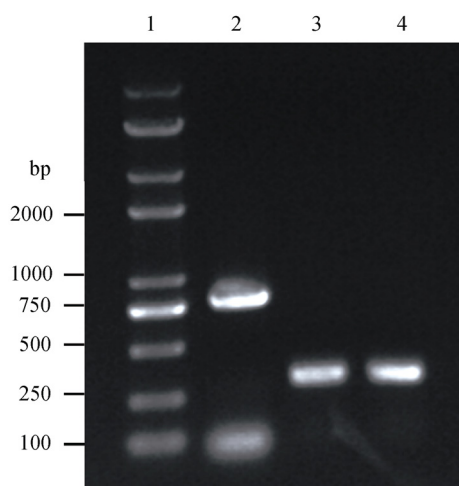


图 6 拯救病毒的 RT-PCR 鉴定

Fig. 6 Identification of rescued virus by RT-PCR. 1: DNA marker; 2: PC15 of rescued virus; 3: PG of rescued virus; 4: PG of parental virus.

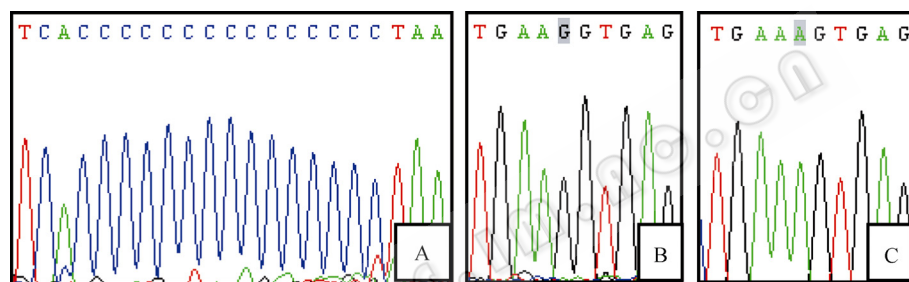


图 7 分子标记序列

Fig. 7 Sequence of genetic tags. (A) PC15 of rescued virus. (B) PG of rescued virus. (C) PG of parental virus.

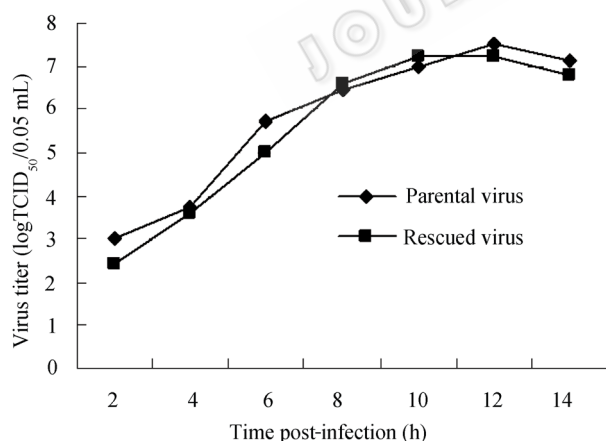


图 8 病毒生长曲线

Fig. 8 Growth curves of rescued virus and paternal virus.

毒的有效途径之一, 运用该技术可以在 DNA 水平上分析和改造病毒基因组, 从基因的改变是否引发病毒相应的生物学性状改变, 来反向验证和研究基因的功能以及病毒的分子致病机制等。虽然我国已有

2.6 病毒生长曲线

为了比较拯救病毒与亲本病毒之间的动态生长特性, 制作病毒生长曲线, 结果见图 8, 拯救病毒与亲本病毒具有相似的复制特点和增殖特性。

2.7 乳鼠致病力试验

接种拯救病毒和亲本病毒的乳鼠在接种后 32 h, 高浓度接种乳鼠表现典型的呼吸困难、后肢麻痹等症状。42 h 后开始出现乳鼠死亡, 对照鼠正常。最后根据统计结果, 计算出拯救病毒和亲本病毒的 LD_{50} 分别为 $10^{-6.44}$ 和 $10^{-6.77}$, 二者在致病力上存在差异, 但差异不显著 ($P < 0.05$)。

3 讨论

应用反向遗传学技术拯救病毒是研究 RNA 病

成功拯救 O 型和 A 型 FMDV 的报道^[10-11], 但近年来我国多处省市发生 Asia 1 型 FMD 疫情(以江苏谱系为代表), 故本研究成功拯救一株 Asia 1 型 FMDV(江苏谱系)为进一步研究该血清型病毒建立了实验技术平台。

感染性克隆构建时序列的忠实性是成功拯救病毒的前提, 错误碱基的引入会严重影响拯救的成功率。实验中尽量使用高保真的反转录酶和 DNA 聚合酶, 并在 PCR 过程中减少循环次数, 可较大幅度地降低碱基错配率。本研究中还应用了长距离 PCR 技术, 简化了操作步骤, 减少了分多段克隆时酶切连接的次数。

FMDV 基因组中的特殊结构之一是, 在其 5'UTR 中有一个长约 100~420 个核苷酸的 poly(C)序列^[12], 该结构与病毒的感染性密切相关。虽然 poly(C)序列的长短阈值与 FMDV 感染性的关系一直没有定

论, 但人们一致认为要获得 FMDV 感染性克隆, poly(C)区段是必需的。由于 FMDV poly(C)区段形成了非常牢固的二级结构导致无法通过 RT-PCR 获得其真实序列。本研究通过融合 PCR 技术获得了 15 个 C, 发现该长度的 poly(C)对于 FMDV As01 株感染性克隆是足够的。另一方面, 特定个数的 poly(C)也可作为与亲本病毒相鉴别的分子标记之一。FMDV 的另一特征结构为 3'末端的 poly(A)尾, 适当长度的 poly(A)在构建感染性克隆方面是一个必要条件。有报道说 poly(A)的长度越长越好, 也有人提出少于 10 个 A 的与含有 40 个 A 的病毒在感染性上没有区别。本研究采用 3'RACE(cDNA 末端快速扩增)方法, 扩增出 32 个 A 长度的 poly(A)尾, 从结果来看, 该长度的 poly(A)在本研究中是足够的。

全长转录本 5'端和 3'端的改变对感染性有一定的影响。本研究为避免两端存在冗余序列, 在设计的时候将 T7 启动子序列精确置于 5'端。为了增强 T7 启动子的转录效率, 并防止由于 RNA 酶降解 5'末端而影响基因组的完整性和病毒拯救效率, 在病毒基因组 5'末端 T7 启动子序列后引入 3 个碱基 (GGG)。在基因组 3'末端未引入冗余碱基。另外在 T7 启动子之前和 3'末端都引入了 *EcoR* V 酶切位点, 这样在质粒线性化的时候能够切下基因组, 去除了载体基因, 尤其是保证了不会受到载体上 T7 启动子序列的干扰; 另一方面使得转录到 3'端能够正确终止。本研究中的拯救病毒具有与其亲本病毒相似的感染性, 而且感染性稳定, 能够稳定地连续传代。

REFERENCES

- [1] Belsham GJ. Distinctive features of foot-and-mouth disease virus, a member of the picornavirus family; aspects of virus protein synthesis, protein processing and structure. *Prog Biophys Mol Biol*, 1993, **60**: 241-260.
- [2] Grubman MJ, Robertson BH, Morgan DO, *et al.* Biochemical map of polypeptide specified by foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 1984, **50**: 579-586.
- [3] Zibert A, Maass G, Strebel K, *et al.* Infectious foot-and-mouth disease virus derived from a cloned full-length cDNA. *J Virol*, 1990, **64**: 2467-2473.
- [4] 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 Virol*, 1993, **67**: 5139-5145.
- [5] Van Rensburg HG, Henry TM, Mason PW. Studies of genetically defined chimeras of a European type A virus and a South African Territories type 2 virus reveal growth determinants for foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol*, 2004, **85**: 61-68.
- [6] Rieder E, Henry T, Duque H, *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**: 12989-12998.
- [7] Valarcher JF, Knowles NJ, Ferris NP, *et al.* Recent spread of FMD virus serotype Asia 1. *Vet Rec*, 2005, **157**(1): 30-36.
- [8] Li S, Li M, Gao MC, *et al.* Sequence analysis of complete genome of an Asia I serotype foot-and-mouth disease virus. *Chin J Pre Vet Med*, 2008, **30**(3): 205-211.
李爽, 李勐, 高明春, 等. 一株 Asia I 型口蹄疫病毒的全基因组序列测定及比较分析. 中国预防兽医学报, 2008, **30**(3): 205-211.
- [9] Li W. Production of monoclonal antibodies against Asia I FMDV and the development of an antigen capture ELISA for the detection of FMDV. Yangling: Northwest A&F University, 2007: 20-21.
李万. 抗 Asia I 型 FMDV 单克隆抗体的研制及抗原捕获 ELISA 方法的初步建立. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007: 20-21.
- [10] Fang XZ. Complete genomic sequencing and construction of an infectious cDNA clone of a cell passaged FMDV OH/99 strain isolated from infected swine. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 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. 兰州: 甘肃农业大学, 2004: 11-13.
- [11] 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.
- [12] Chumakov KM, Agol VI. Poly(C) sequences is located near the 5'-end of encephalomyocarditis virus RNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 1976, **71**(2): 551-557.