

口蹄疫病毒外源序列插入位点的研究进展

张岩¹, 胡永浩¹, 杨帆², 郑海学²

1 甘肃农业大学 动物医学院, 甘肃 兰州 730070

2 中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原学国家重点实验室 口蹄疫国家参考实验室, 甘肃 兰州 730046

张岩, 胡永浩, 杨帆, 等. 口蹄疫病毒外源序列插入位点的研究进展. 生物工程学报, 2014, 30(2): 175-181.

Zhang Y, Hu YH, Yang F, et al. Progress in insertion sites for foreign sequence of foot and mouth disease virus. Chin J Biotech, 2014, 30(2): 175-181.

摘要: 伴随着对口蹄疫病毒 (FMDV) 蛋白结构功能的深入研究, 发现 FMDV 能够表达外源基因片段。通过对 FMDV 的基因进行改造和修饰研究, 进而实现了不同应用目的, 如提高病毒滴度、引入标记、提高免疫应答、降低致病性等。文中主要从 FMDV 接受外源基因插入位点角度来介绍现阶段关于 FMDV 表达外源基因相关进展。

关键词: 口蹄疫病毒, 外源基因, 插入位点

Progress in insertion sites for foreign sequence of foot and mouth disease virus

Yan Zhang¹, Yonghao Hu¹, Fan Yang², and Haixue Zheng²

1 College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China

2 National Foot and Mouth Disease Reference Laboratory, State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, Gansu, China

Abstract: With the progress in studying gene structure and function of foot and mouth disease virus (FMDV), FMDV can

Received: May 2, 2013; **Accepted:** July 16, 2013

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2011AA10A211-1), the High-level Technological Talent Program of Gansu Province (No. 1013JHTA008), the International Atomic Energy Agency (No. 16025/R0), China Agriculture Research System (No. CARS-39).

Corresponding author: Yonghao Hu. Tel/Fax: +86-931-7631220; E-mail: yhh0817@126.com

Haixue Zheng. Tel/Fax: +86-931-8342086; E-mail: haixuezheng@163.com

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2011AA10A211-1), 甘肃省高层次人才科技创新创业扶持行动项目 (No. 1013JHTA008), 国际原子能机构项目 (No. 16025/R0), 中国农业产业体系 (No. CARS-39) 资助。

网络出版时间: 2013-08-16

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130816.1711.002.html>

express exogenous genes in different sites. Through transforming and modifying FMDV can achieve different application purposes such as improving virus titer, introducing tag, improving immune responses, and reducing pathogenicity. From the perspective of FMDV receiving inserted exogenous gene, this paper mainly describes the latest relevant developments of FMDV's expression to exogenous gene.

Keywords: foot and mouth disease virus, exogenous gene, insertion site

口蹄疫 (Foot and mouth disease, FMD) 是由口蹄疫病毒 (Foot and mouth disease virus, FMDV) 引起的一种高度传染性疾病, 主要感染偶蹄动物 (主要是牛、猪和羊等)。不仅对畜牧养殖业造成严重的经济损失, 也对畜产品的国际贸易带来巨大的负面影响^[1-2]。

FMDV 属于小 RNA 病毒科口蹄疫病毒属, 有 7 种血清型, 包括 A、O、C、Asia 1 和 SAT 1、2 和 3。FMDV 基因组为单股正链 RNA, 病毒基因组由 8 500 个碱基左右组成, RNA 被衣壳包裹, 其正二十面体衣壳由 4 种结构蛋白 VP1-VP4 各 60 份拷贝构成。FMDV 翻译成 1 个多聚蛋白, 该多聚蛋白被蛋白酶裂解成结构蛋白 (VP1、VP2、VP3 和 VP4) 和非结构蛋白 (L、2A、2B、2C、3A、3B、3C 和 3Dpol)^[2]。目前反向遗传学技术在 FMDV 研究中应用广泛, 国内外很多学者利用反向遗传学在 FMDV 基因组上插入外源基因的方法来研究 FMDV 的复制和感染过程, 并在这一方面取得了较大的进展。

在病毒上引入标记, 然后检测标记来确定病毒不同时期的状态是研究病毒中常用的方法, 同时也有在病毒上引入外源基因将病毒作为载体用于应用研究。因此病毒能够接受外源基因插入的位点是首要解决的问题。接下来我们从现阶段 FMDV 能够表达外源基因的区域来进行详细介绍。

1 前导蛋白 L 区引入外源基因片段

FMDV 的前导蛋白 L 蛋白具有木瓜样蛋白酶特性。FMDV 可以识别两种密码子, 因而具有两种编码产物 Lab 和 Lb。两种形式的蛋白酶均能够降解宿主细胞的翻译起始因子 eIF4G, 从而抑制宿主“帽子”依赖性的 mRNA 翻译, 导致宿主表达干扰素的水平降低, 进而抑制宿主免疫应答^[3]。由于 L 蛋白在 FMDV 逃避宿主免疫方面的特性, L 蛋白对于 FMDV 的重要性不言而喻。1995 年 Piccone 等^[4]发现 FMDV L 蛋白的基因在病毒复制过程中并不是完全必需的, 当保留了编码 L 蛋白序列 Lab 和 Lb 的 AUG 之间的 84 nt 碱基就能保持病毒的活性。在 1996 年 Brown 等^[5]在研究 L 蛋白缺失 FMDV 毒力时, 通过感染牛发现 L 蛋白缺失的病毒致病性相比原毒有所下降。Piccone 等^[6]在 2010 年成功拯救出 3 株含有外源片段的 L 蛋白缺失重组 FMDV, 后续的动物实验证实了 L 蛋白在参与感染过程的重要性。2011 年 Piccone 等^[7]在 L 蛋白的 Lab 和 Lb 之间引入了一个含有酶切位点的氨基酸序列, 然后在位点依次引入流感病毒血凝素 (Hemagglutinin, HA)、Flag 和 TC 标签, 构建了 3 株重组病毒 (图 1)。在成功拯救出病毒后, 在细胞水平检测到了重组病毒中外源片段的表达。这证明了编码 L 的蛋白区域具有携带和表达外源片段的能力。对 L 区进行反向遗传操作也是降

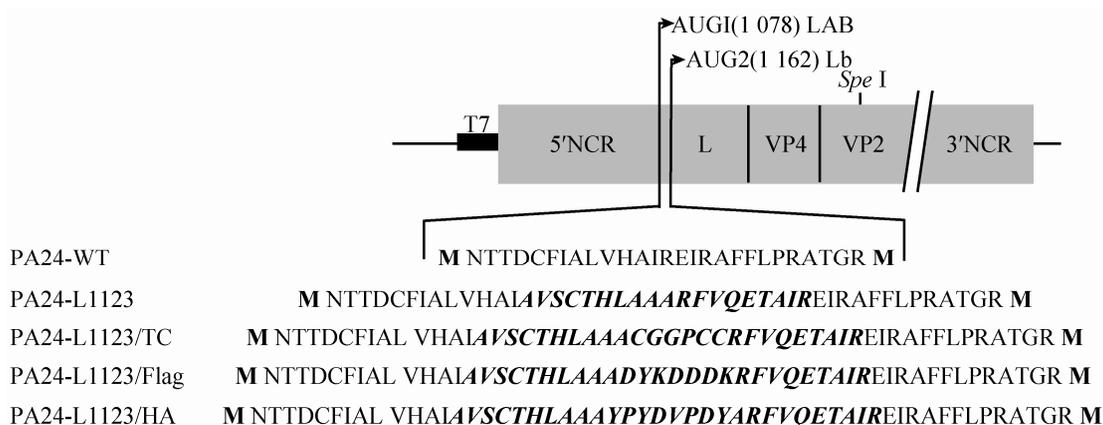


图 1 FMDV 全基因及构建质粒简图^[7]

Fig. 1 Schematic diagram of the FMDV genome and plasmids used in this study^[7].

低致病性提高生物安全性的重要途径，作者研究团队利用突变 L 基因抑制天然免疫的功能性位点，获得了对宿主动物无致病性、不排毒以及免疫应答快的重组 FMDV。

2 VP1 区引入外源基因

FMDV 的 VP1 表面存在一个被高度保守的 Arg-Gly-Asp (RGD) 修饰的环状结构，经研究发现这个特殊的环状结构能够被细胞表面的 α v 整合蛋白的家族受体 (α v β 1、 α v β 3、 α v β 6 和 α v β 8) 所识别^[8-11]。研究表明多种血清型的 FMDV VP1 的 G-H 环结构同时也是一个抗原位点^[9,12-13]。VP1 的 G-H 环状结构可以利用胰蛋白酶水解的方法除去，在除去 VP1 的 G-H 环结构后导致 FMDV 的毒力下降了许多^[13-14]。

2012 年 Wang 等^[15]在研究 VP1 的 G-H 环结构对 FMDV 复制的影响时，在 Asia 1 型 FMDV 上 G-H 环状结构中插入了 O 型 FMDV 的保护性中和表位，获得的重组病毒具有诱导产生两种血清型中和抗体的能力。同年 Lawrence 等^[16]在 VP1

的 G-H 环结构上成功插入了一个 Flag 标签 (DYKDDDDK)。因为 G-H 环是一个柔性的环状结构，为了最小限度地影响 VP1 的空间构型，Lawrence 对插入 Flag 的序列进行了调整，将 DKYDDDDK 替换成 DYKDDDDK。蚀斑实验表明 VP1 插入标签后 FMDV 的毒力下降。通过免疫荧光反应，检测到 Flag 和 VP1 的表达。

Seago 等^[17]在 2012 年研究 VP1 G-H 环结构发生改变对 FMDV 特性影响时，在 RGD 下游即 VP1 的 155-156 位氨基酸中插入了 HA 和 Flag 标签。含有标签的重组病毒可以利用主要的整合蛋白受体，重组病毒的蚀斑与亲本病毒相似，但毒力也存在一定程度的下降。VP1 的 G-H 环状结构的上游和下游均存在插入位点，用于表达外源片段。由于 G-H 环状结构对 FMDV 比较重要，可能影响到病毒抗原性和吸附能力，所以此区域能接受外源片段的大小值得探索。

3 VP1 区与 2A 蛋白区之间引入外源基因

FMDV 的 2A 蛋白具有自我剪切功能。在

FMDV 复制的过程中, 2A 蛋白从 C 端开始将大部分的衣壳蛋白从非结构蛋白上切下, 再由 3C 蛋白酶进一步对多聚蛋白进行水解。鉴于 2A 的特性, 有学者一直尝试利用这种特性在此位置进行反向遗传操作。

2013 年 Seago 等^[18]在 VP1 区末端 2A 蛋白前, 插入了大分子的标记荧光蛋白。其构建了 2 株重组病毒引入 720 nt 的绿色荧光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP) 和 933 nt 的海肾荧光素酶 (Renilla luciferase, RL)。Seago 等实验的最初目的是在此区域表达 GFP 和 RL, 但是重组病毒感染山羊上皮细胞的结果显示, 3 代以后细胞就不再出现病变了, 也无法通过共聚焦观察到 GFP 和 RL 的荧光。为了进一步研究此区域能接受外源基因的大小, Seago 等在原位点处插入了外源片段构建了 6 株重组病毒 (外源片段大小依次为 105 nt、204 nt、303 nt、417 nt、504 nt 和 609 nt)。实验结果显示插入外源片段小于 300 nt 的病毒能够稳定传代并能从中检测到插入基因, 蚀斑实验也显示出了与亲本病毒相近的毒力。这说明在此 VP1 末端和 2A 蛋白区之间, FMDV 能够容纳较大的外源片段, 这对 FMD 研究是一个新的突破。

4 3A 蛋白区引入外源基因

FMDV 与其他小 RNA 病毒不同, 它有更长的 3A 蛋白。研究发现 3A 蛋白是使用物理方法与细胞内膜结合, 但在 FMDV 感染细胞和复制的过程中 3A 非结构蛋白的功能并没有被很好认识^[19-20]。然而在 3A 蛋白发生变化时, 这些变化都会导致宿主的特异性、适应性或毒力发生改变^[21-23]。如 Taiwan97 毒株是因为 3A92-102 位

氨基酸缺失导致对牛的致病性下降。2012 年 Li 等^[24]用 Flag 标签和编码单纯性疱疹病毒 (HSV) D 蛋白的抗原表位 (QPELAPEDPED), 替换了 3A 中第 92~102 位氨基酸, 并且成功拯救出两株重组口蹄疫病毒。实验结果显示重组病毒的毒力和复制动力学与原毒相近。经检测发现在口蹄疫病毒 3A 处替换的 FLAG 与 HSV 抗原表位都能够持续稳定地表达。

5 3B 蛋白区引入外源基因

FMDV 具有 3 个相似但不完全相同的 3B 蛋白 (3B₁₋₃) 或 VPg (VPg₁₋₃), 长度在 23~24 个氨基酸左右。FMDV 3B 蛋白对病毒感染力影响不大, 但分离的野毒都完整地保留了 3B 结构, 这一结构有可能与 FMDV 进化过程中选择压力有密切关系^[25]。也有实验证明 3B₃ 是 FMDV 3Dpol 最有效的底物^[26]。Falk 和 Pacheco^[27-28]的研究表明, 当 FMDV 存在 3B₃ 时才具有感染性, 若仅有 3B₁ 或 3B₂ 则会导致病毒失活。2010 年 Arias 等^[29]在研究 3B 的缺失与突变与细胞病变关系时, 构建了 4 株仅有单一 3B 拷贝的重组病毒, 其中还包含 2 株由 3B₁ 和 3B₂ 重组的嵌合病毒 (图 2)。结果显示不含 3B₃ 结构以及未保留 3B₃ 末端 9 位氨基酸的 2 株重组病毒无法稳定复制。这个实验精确定位了 3B₃ 结构中对于 FMDV 复制有影响的氨基酸, 从而证明 3B₃ 结构对于 FMDV 复制的重要性。

2010 年 Pacheco 等^[30]在研究 3B 与 FMDV 培养特性和对牛的致病性实验中构建了 5 株重组病毒。其中 3 株是在 3B₁、3B₂ 和 3B₃ 分别随机地插入了 19 个氨基酸的序列, 另外 2 株在保留了 3B₃ 后删除了部分序列。5 株重组病毒均拯救成

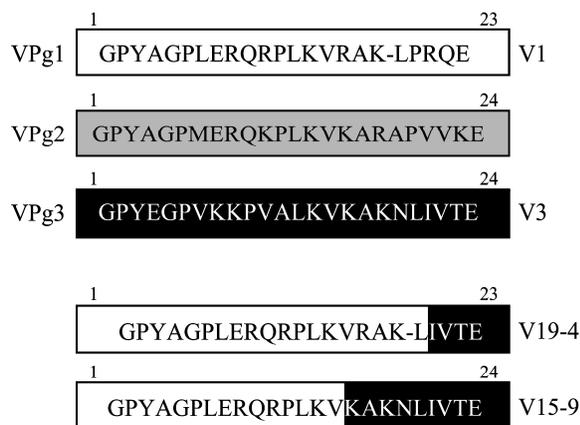


图 2 嵌合 VPg 的构建简图^[27]

Fig. 2 Schematic representation of the constructions with one copy of VPgs^[27].

功,然后对其毒力、复制能力以及各项生物学特性进行了检测,最后与亲本病毒进行比较,发现重组病毒的各项生物指标与亲本病毒基本保持一致。2012年 Uddowla 等^[31]在研究 FMD 负标记疫苗的时候,对 FMDV 全长 cDNA 克隆进行了多点突变和片段的缺失。其中包含在 3B₂ 的部分氨基酸进行缺失后替换,构建了多株重组病毒,并且成功拯救出了构建的 FMDV。动物实验发现构建的重组病毒并没有产生稳定的中和抗体,同时诱导的抗体没有产生预期的交叉保护现象,但不同毒株诱导的抗体可以区分。

鉴于 3B 的特殊结构,这一区域一直是 FMDV 反向遗传操作的区域。该区域作为 FMDV 载体的插入位点是值得深入研究的。作者所在团队正在进行 3B 不同位置插入大片段基因的研究,如果突破将进一步推进 FMDV 表达插入基因大小的问题。

6 展望

FMDV 基因序列上存在多个位点可以稳定

表达插入的外源基因,在利用反向遗传学进行操作时,病毒的可控性很高。FMDV 感染细胞时细胞病变快,复制滴度高,使得 FMDV 能够高效表达外源基因。这两点说明 FMDV 具有病毒载体的潜质。但 FMD 作为病毒载体面临两个问题:第一是毒株的安全性;第二是病毒能够表达外源基因的大小。这两点限制了口蹄疫病毒作为病毒载体的应用。

FMDV 容易变异,这对 FMD 的防控十分不利,所以要将 FMDV 作为载体,稳定的弱毒株是关键。目前许多学者都在尝试将 FMDV 弱化,不仅能够作为载体,如果毒株稳定性强可以直接制成弱毒疫苗。致弱的 FMDV 载体是未来研究的一个热点方向。有研究通过对病毒基因组进行改造在保证其活性的前提下降低其毒力,如 L 蛋白的 SAP 结构突变毒株,发现感染动物后无临床症状也没有排毒带毒现象,并能产生有保护性的抗体^[3,32-33]。目前我们实验室利用反向遗传技术已经成功构建了病毒滴度高、抗原匹配性好、免疫保护力强的疫苗株^[34]。目前现阶段有关 FMDV 表达外源基因的报道大都是小片段标记。Seago 等^[18]的研究为 FMDV 表达大的外源片段方面带来了新的突破,但现阶段关于 FMDV 作为载体插入大片段仍不成熟,尚不能在技术水平达到其他病毒载体的水平(如:如腺病毒、杆状病毒和痘病毒等)。因此 FMDV 基因组承载外源片段的能力也是 FMDV 研究的又一重点。

国内外一直致力于 FMDV 的研究,旨在有效控制 FMD 的流行。通过引入外源基因对 FMDV 进行改造可以解决很多现阶段 FMD 防控的问题。如:我国控制 FMD 的主要手段是通过

免疫灭活疫苗, 由于在实际防控中 FMD 疫苗的多次免疫会造成感染抗体与疫苗免疫抗体难以区分的问题。我们在 FMDV 基因组引入标记, 然后配套相关标记检测试剂, 在理论上是完全可以鉴别野毒感染抗体和免疫抗体。未来可以在 FMDV 中引入一些免疫因子的基因, 如: 树突状刺激因子的基因, 这能改善免疫原性提高免疫效果。还借助 FMDV 的复制滴度高, 在 FMDV 上引入外源基因进行高效表达。在 FMD 疫苗株上导入其他病原的主要抗原基因生产出双价苗, 能达到一苗防两病的效果, 同时简化养殖场的免疫程序。

FMDV 插入外源基因的研究是十分具有潜力的, 无论是应用研究还是基础研究都能使用到相关技术, 这为 FMDV 研究提供了一个新思路。

REFERENCES

- [1] Porter AG. Picornavirus nonstructural proteins: emerging roles in virus replication and inhibition of host cell functions. *J Virol*, 1993, 67(12): 6917-6921.
- [2] Grubman MJ, Baxt B. Foot-and-mouth disease. *Clin Microbiol Rev*, 2004, 17(2): 465-493.
- [3] De los Santos T, Segundo FD, Zhu J, et al. A conserved domain in the leader proteinase of foot-and-mouth disease virus is required for proper subcellular localization and function. *J Virol*, 2009, 83(4): 1800-1810.
- [4] Piccone ME, Rieder E, PETER Mason PW, et al. The foot-and-mouth disease virus leader proteinase gene is not required for viral replication. *J Virol*, 1995, 69(9): 5376-5382.
- [5] Brown CC, Piccone ME, Mason PW, et al. Pathogenesis of wild-type and leaderless foot-and-mouth disease virus in cattle. *J Virol*, 1996, 70(8): 5638-5641.
- [6] Piccone ME, Pacheco JM, Pauszek SJ, et al. The region between the two polyprotein initiation codons of foot-and-mouth disease virus is critical for virulence in cattle. *Virology*, 2010, 396(1): 152-159.
- [7] Piccone ME, Diaz-San Segundo F, Kramer E, et al. Introduction of tag epitopes in the inter-AUG region of foot and mouth disease virus: effect on the L protein. *Virus Res*, 2011, 155(1): 91-97.
- [8] 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. *Virus Genes*, 1990, 4(1): 73-83.
- [9] Brown F, Benkirane N, Limal D, et al. Delineation of a neutralizing subregion within the immunodominant epitope (GH loop) of foot-and-mouth disease virus VP1 which does not contain the RGD motif. *Vaccine*, 1999, 18(1/2): 50-56.
- [10] Burman A, Clark S, Abrescia NG, et al. Specificity of the VP1 GH loop of Foot-and-Mouth Disease virus for alphav integrins. *J Virol*, 2006, 80(19): 9798-9810.
- [11] Fox G, Parry NR, Barnett PV, et al. The cell attachment site on foot-and-mouth disease virus includes the amino acid sequence RGD (arginine-glycine-aspartic acid). *J Gen Virol*, 1989, 70 (Pt 3): 625-637.
- [12] Acharya R, Fry E, Stuart D, et al. The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature*, 1989, 337(6209): 709-716.
- [13] Aggarwal N, Barnett PV. Antigenic sites of foot-and-mouth disease virus (FMDV): an analysis of the specificities of anti-FMDV antibodies after vaccination of naturally susceptible host species. *J Gen Virol*, 2002, 83(Pt 4): 775-782.
- [14] Strohmaier K, Franze R, Adam KH. Location and characterization of the antigenic portion of the FMDV immunizing protein. *J Gen Virol*, 1982, 59(Pt 2): 295-306.
- [15] Wang H, Xue M, Yang D, et al. Insertion of type

- O-conserved neutralizing epitope into the foot-and-mouth disease virus type Asia1 VP1 G-H loop: effect on viral replication and neutralization phenotype. *J Gen Virol*, 2012, 93(Pt 7): 1442–1448.
- [16] Lawrence P, Pacheco JM, Uddowla S, et al. Foot-and-mouth disease virus (FMDV) with a stable FLAG epitope in the VP1 G-H loop as a new tool for studying FMDV pathogenesis. *Virology*, 2013, 436(1):150–161.
- [17] Seago J, Jackson T, Doel C, et al. Characterization of epitope-tagged foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol*, 2012, 93(Pt 11): 2371–2381.
- [18] Seago J, Juleff N, Moffat K, et al. An infectious recombinant foot-and-mouth disease virus expressing a fluorescent marker protein. *J Gen Virol*, 2013, 94(Pt 7): 1517–1527.
- [19] Schlegel A, Giddings TH Jr, Ladinsky MS, et al. Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection. *J Virol*, 1996, 70(10): 6576–6588.
- [20] Towner JS, Ho TV, Semler BL. Determinants of membrane association for poliovirus protein 3AB. *J Biol Chem*, 1996, 271(43): 26810–26818.
- [21] Giraudo AT, Beck E, Strebel K, et al. Identification of a nucleotide deletion in parts of polypeptide 3A in two independent attenuated aphthovirus strains. *Virology*, 1990, 177(2): 780–783.
- [22] Beard CW, Mason PW. Genetic determinants of altered virulence of Taiwanese foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 2000, 74(2): 987–991.
- [23] Knowles NJ, Davies PR, Henry T, et al. Emergence in Asia of foot-and-mouth disease viruses with altered host range: characterization of alterations in the 3A protein. *J Virol*, 2001, 75(3): 1551–1556.
- [24] Li P, Bai X, Cao Y, et al. Expression and stability of foreign epitopes introduced into 3A nonstructural protein of foot-and-mouth disease virus. *PLoS ONE*, 2012, 7(7): e41486.
- [25] Carrillo C, Lu Z, Borca MV, et al. Genetic and phenotypic variation of foot-and-mouth disease virus during serial passages in a natural host. *J Virol*, 2007, 81(20): 11341–11351.
- [26] Nayak A, Goodfellow IG, Belsham GJ. Factors required for the Uridylylation of the foot-and-mouth disease virus 3B1, 3B2, and 3B3 peptides by the RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol) *in vitro*. *J Virol*, 2005, 79(12): 7698–7706.
- [27] Falk MM, Sobrino F, Beck E. VPg gene amplification correlates with infective particle formation in foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 1992, 66(4): 2251–2260.
- [28] Pacheco JM, Henry TM, O'Donnell VK, et al. Role of nonstructural proteins 3A and 3B in host range and pathogenicity of foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 2003, 77(24): 13017–13027.
- [29] Arias A, Perales C, Escarmís C, et al. Deletion mutants of VPg reveal new cytopathology determinants in a picornavirus. *PLoS ONE*, 2010, 5(5): e10735.
- [30] Pacheco JM, Piccone ME, Rieder E, et al. Domain disruptions of individual 3B proteins of foot-and-mouth disease virus do not alter growth in cell culture or virulence in cattle. *Virology*, 2010, 405(1): 149–156.
- [31] Uddowla S, Hollister J, Pacheco JM, et al. A safe foot-and-mouth disease vaccine platform with two negative markers for differentiating infected from vaccinated animals. *J Virol*, 2012, 86(21): 11675–11685.
- [32] Aravind L, Koonin EV. SAP-a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization. *Trends Biochem Sci*, 2000, 25(3): 112–114.
- [33] Segundo FD, Weiss M, Pérez-Martín E, et al. Inoculation of swine with foot-and-mouth disease SAP-mutant virus induces early protection against disease. *J Virol*, 2012, 86(3): 1316–1327.
- [34] Zheng H, Guo J, Jin Y, et al. Engineering foot-and-mouth disease viruses with improved growth properties for vaccine development. *PLoS ONE*, 2013, 8(1): e55228.

(本文责编 陈宏宇)