

5 株猪 O 型口蹄疫病毒结构蛋白 VP1 基因的克隆与序列分析

马静云, 曹永长, 毕英佐

(华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要: 提取 5 株猪 O 型口蹄疫病毒(FMDV)(L1~L5)的 RNA, 用 1 对通用引物经 RT-PCR 法扩增了 5 株病毒 VP1 基因的 DNA 片段. 克隆后通过测序获得其核苷酸序列, 分析表明, 除 L2 株外, 其余 4 株(L1、L3、L4 和 L5)VP1 基因的核苷酸序列同源性在 96.7%~99.8%, 氨基酸序列同源性在 99.5%~100%; 而 L2 株与 L1、L3、L4 和 L5 株 VP1 基因的核苷酸序列同源性在 82.0%~83.4%, 氨基酸序列同源性在 89.7%~90.1%. L1、L3、L4 和 L5 株病毒 VP1 基因的核苷酸序列与已经发表的 GD/CHA/86、HKN/1/99、HKN/16/96 的同源性较高, 核苷酸序列同源性在 85.0%~99.8%, 属于同一基因型; 而与 L2、F29/CHINA 及国外大多数毒株相比, 属于不同的基因型, 其核苷酸序列同源性仅为 41.0%~82.6%. 5 株毒株中的 L1、L3、L4 和 L5 的主要中和抗原位点 140~160、200~213 位氨基酸序列完全相同, 推测其有相近的中和单抗表位和相同的抗原性.

关键词: 口蹄疫病毒; VP1 基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2003)01-0070-04

口蹄疫(FMD)是由口蹄疫病毒(FMDV)引起的偶蹄动物急性、高度接触性传染病, 被国际兽疫局列为 A 类传染病之首, 严重危害畜牧业的生产, 是世界各国检疫和防疫的重点对象, 多年来, 许多国家为了预防和控制该病, 曾投入了大量人力、物力和财力, 然而, 该病仍在广泛流行^[1]. FMDV 是小 RNA 病毒科 FMDV 病毒属的成员, 其基因组为单股正链 RNA, 约有 8 500 个核苷酸, 其中只有 1 个开放阅读框, 编码病毒的前体聚蛋白. 前体聚蛋白经裂解可形成 4 种结构蛋白(VP1、VP2、VP3、VP4), 其中, VP1 和 VP3 是主要免疫性抗原, VP1 基因位于基因组的 2 977~3 615, 编码 213 个氨基酸. 早期的研究表明, 结构蛋白 VP1 是诱导中和抗体的主要成分^[2], 它暴露在病毒颗粒的表面, 对胰蛋白酶敏感, 经胰蛋白酶处理的病毒粒子失去对敏感细胞的感染性^[3]. 近年来, 随着研究的深入, 已经明确了 VP1 上有 3 个保守的氨基酸序列(RGD), 它具有与细胞受体结合的主要功能, 是病毒感染细胞的关键^[4]. 另外, 序列分析表明, VP1 基因的核苷酸易发生变异^[5], 在分子流行病学调查、疫源的追踪、毒株型与亚型的分析、基因工程疫苗的研制方面具有较重要的学术价值和现实意义. 本研究对 5 株 FMDV 的 VP1 基因进行克隆与序列分析, 将进一步丰富我国 FMDV 毒株 VP1 基因资料库, 为更加科学地防制 FMD 提供分子水平依据.

1 材料与方法

1.1 病毒株

5 株猪 O 型口蹄疫病毒, 分别命名为 L1、L2、L3、L4、L5. 在 BHK21 单层细胞中适应并增殖.

1.2 引物的设计与合成

根据 Gene-Bank 中 O 型 FMDV 的序列及有关文献设计了 1 对引物:

P1 5' GACCACAAAYGTYCAGGGATG 3';

P2 5' AGCTTGTACCAGGCTTTGCC 3'.

送大连宝生物工程公司合成.

1.3 质粒和菌株

质粒 PGEM-T EASY 载体试剂盒为 Promega 公司产品; 菌株 DH5 α 为家禽研究室保存.

1.4 RNA 抽提试剂盒及病毒 RNA 的抽提

TRIzol[®] Reagent RNA 抽提试剂盒为 Gibco 公司产品; 反转录酶 AMV、Ex Taq 聚合酶为大连宝生物工程公司产品. RNA 抽提按试剂盒说明书进行. 所用器皿和试剂经 DEPC(焦碳酸二乙酯)无 RNase 处理.

1.5 RT-PCR

参照《分子克隆实验指南》^[6]操作. PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 40 s, 46 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min.

1.6 目的 DNA 的连接

用胶回收目的 DNA, 按照 PGEM-T EASY 载体试

剂盒的说明书进行连接。

1.7 感受态细胞的制备、转化、阳性克隆菌落挑选和鉴定

按常规方法制备并转化, 以 a 互补的原理挑选白色菌落, 抽提质粒进行 PCR 及酶切鉴定。

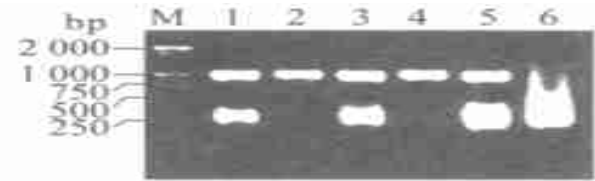
1.8 目的基因的核苷酸序列测定

将鉴定好的阳性菌株送上海博亚公司及上海基康生物技术有限公司测序, 用 DNASTAR 软件分析。

2 结果

2.1 RT-PCR

用设计的 1 对引物进行 RT-PCR, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 获得了约 1 000 bp 左右的产物(图 1), 与预期的扩增片段相符, 且特异性和重复性好。



M: DNA 分子梯度; 1: L1 株; 2: L2 株; 3: L3 株; 4: L4 株; 5: L5 株; 6: 阴性对照
M: DL2000 DNA Marker; 1: L1 strain; 2: L2 strain; 3: L3 strain; 4: L4 strain; 5: L5 strain; 6: negative controls

图 1 RT-PCR 扩增 FMDV 不同毒株 VP1 基因的产物
Fig. 1 Results of VP1 gene of different FMDV strains amplified by RT-PCR

2.2 阳性克隆的鉴定

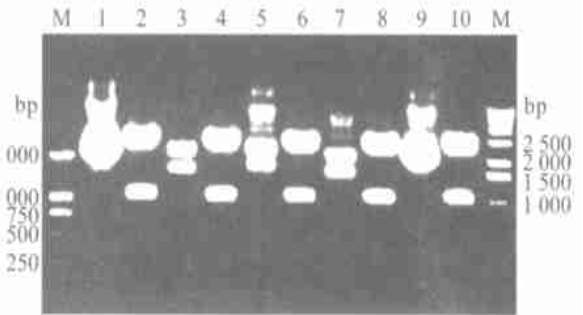
挑选的克隆经 PCR、酶切鉴定, 结果与预期结果一致(图 2、3)。初步确认获得了 5 株病毒的 VP1 基因阳性克隆。



M: DNA 分子梯度; 1: PGEM-VP1/L1; 2: PGEM-VP1/L2; 3: PGEM-VP1/L3; 4: PGEM-VP1/L4; 5: PGEM-VP1/L5
M: DL2000 DNA Marker; 1: PGEM-VP1/L1; 2: PGEM-VP1/L2; 3: PGEM-VP1/L3; 4: PGEM-VP1/L4; 5: PGEM-VP1/L5

图 2 重组质粒的 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid by PCR



M: DNA 分子梯度; 1、3、5、7、9: 重组质粒 PGEM-VP1/L1-L5; 2、4、6、8、10: 重组质粒 PGEM-VP1/L1-L5 双酶切(EcoRI + EcoRI) M: DL2000.1 kb DNA Ladder; 1、3、5、7、9: PGEM-VP1/L1-L5; 2、4、6、8、10: PGEM-VP1/L1-L5 + EcoRI

图 3 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant plasmid by restriction endonuclease digestion

2.3 目的基因的核苷酸序列测定

将上述筛选出的 5 个阳性克隆送到上海博亚公司及上海基康生物技术有限公司测序, 获得了 5 株毒株 VP1 基因的核苷酸序列, 推导其相应的氨基酸序列, 结果如图 4、5。

2.4 目的基因的核苷酸序列及推导的氨基酸序列比较

5 株毒株中, 除了 L2 株, 其他 4 株毒株 VP1 基因的核苷酸序列同源性都在 96.0% 以上, L1 与 L5 只有 1 个碱基不同, L1 与 L3 只有 3 个碱基不同, 其同源性分别高达 99.8% 和 99.5%, 这样 L3 与 L5 的同源性也达到了 99.4%; 5 株毒株中, L2 株 VP1 基因的核苷酸序列变异较大, 与其他 4 株毒株 VP1 基因核苷酸序列的同源性分别只有 82.0%、82.0%、83.4% 和 82.0%; 与核苷酸序列相对应, 5 株毒株 VP1 基因推导氨基酸序列中, L2 株变异较大, 与其他 4 株毒株的同源性分别为 90.1%、89.7%、90.1%、90.1%; 而 L1、L4、L5 株 VP1 基因的氨基酸序列则完全相同, L3 株与这 3 株毒株的同源性为 95.0%。

2.5 FMDV 国内外毒株 VP1 基因的核苷酸序列比较

通过在线软件 CLUSTAL W(18)对国内外已发表的部分 FMDV VP1 基因的核苷酸序列进行分析, 其核苷酸序列同源性见表 1。

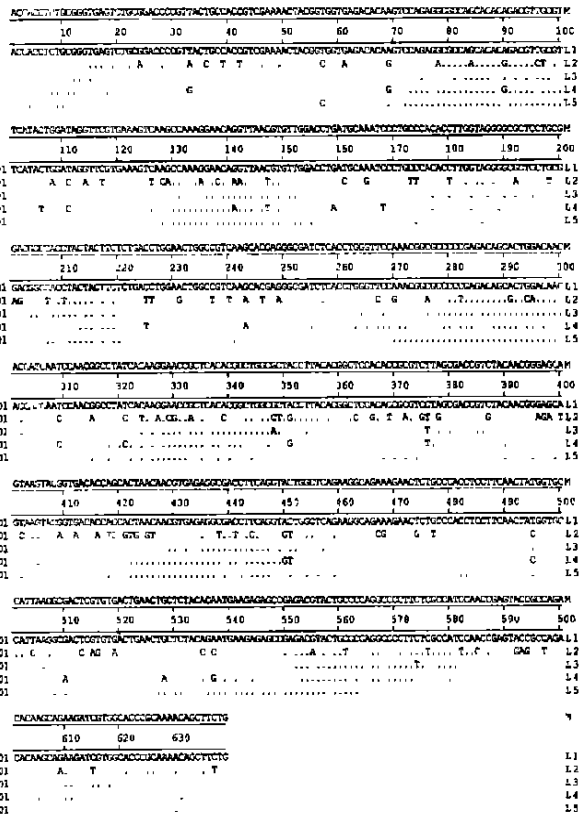


图4 FMDV L1、L2、L3、L4、和 L5 株 VP1 基因的核苷酸序列

Fig. 4 The nucleotide sequence of foot-and-mouth disease virus VP1 gene L1-L5 strains

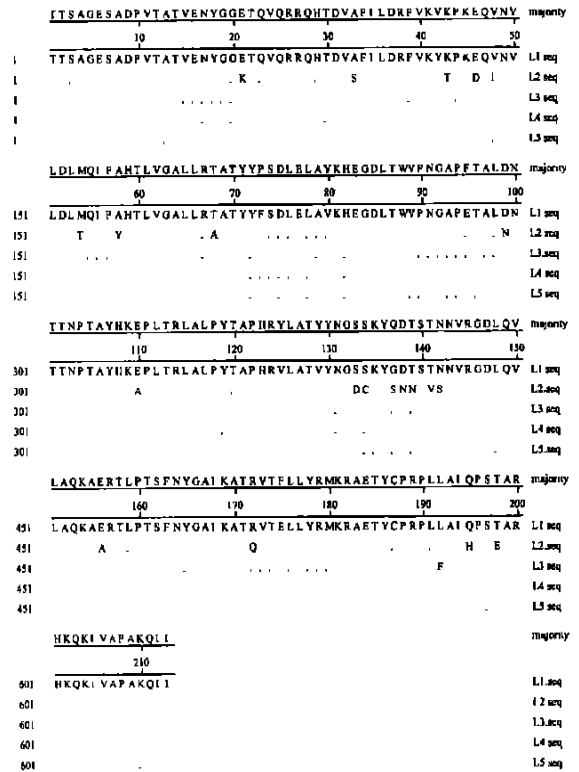


图5 FMDV L1、L2、L3、L4、和 L5 株 VP1 基因推导的氨基酸序列

Fig. 5 The deduced amino acid sequence of foot-and-mouth disease virus VP1 gene L1-L5 strains

表1 不同 FMDV 毒株 VP1 基因编码的核苷酸序列同源性比较

Tab. 1 The homology nucleotide sequence of VP1 gene from different FMDV strains (%)

毒株 strains	L1	L2	L3	L4	L5
HKN/ 1/ 99	95. 8	83. 1	95. 6	96. 9	95. 6
HKN/ 16/ 96	95. 9	82. 3	95. 8	96. 4	95. 8
GD/ CHA/ 86	85. 1	84. 7	85. 1	86. 0	85. 0
HAINAN/ CHA/ 4/ 99	80. 6	82. 5	81. 1	81. 7	80. 4
F29/ CHINA	41. 0	44. 0	41. 3	42. 6	45. 2
O/ CHA/ 3	80. 4	82. 9	80. 9	82. 2	80. 3
O1K	75. 4	80. 1	75. 4	77. 0	75. 3
O/ LAO/ 2/ 2000	80. 3	82. 6	80. 0	81. 7	80. 1
O/ JPN/ 2000	80. 4	82. 6	80. 9	80. 3	80. 4
O/ CAM/ 4/ 2000	79. 2	81. 8	79. 7	80. 6	79. 3
O/ UKG/ 12/ 2001	76. 5	79. 2	77. 0	78. 2	76. 4
O/ SKR/ 2000	80. 9	83. 1	81. 4	82. 3	80. 8
O/ IRQ/ 26/ 2000	79. 8	82. 2	80. 3	81. 5	79. 7

3 讨论

按照 Rico-Heasse 对小 RNA 病毒科脊髓灰质炎病毒的研究理论, 毒株间核苷酸序列同源性差异小于 5% 为亲缘关系密切, 小于 15% 则定为同一基因型的理论, 笔者认为 L1、L3、L4、L5 株、GD/CHA/86、HKN/1/99 和 HKN/16/96 等属于同一基因型, 核苷酸序列同源性为 85. 0% ~ 99. 8%; 而与 L2 株、F29/CHINA 及国外毒株如 O1K、O/LAO/2/2000、O/JPN/2000、O/UKG/12/2001、O/SKR/2000 等相比, 属于不同的基因型, 其核苷酸序列同源性仅为 41. 0% ~ 82. 3%。其推导的氨基酸序列, 除 L2 株外, 本试验中的其余 4 株毒株 VP1 基因的氨基酸序列同源性非常高, 尤其是 L1、L4 及 L5 株, 其 VP1 基因的氨基酸序列完全相同, L3 与它们的同源性为 95. 0%。

VP1 的 140 ~ 160 位和 200 ~ 213 位氨基酸集中了 O 型 FMDV 重要表位, 是病毒抗原变异的关键所在, 144、148、154 和 208 位氨基酸是关键氨基酸, 这些氨基酸的改变会程度不同地影响抗原位点与相应单克隆抗体的反应性。从测得的结果看, 5 株毒株的 VP1 基因序列 144(V)、148(L)、154(K) 和 208(P) 位等关键氨基酸均未发生变化。另外, 5 毒株的 44 位关键氨基酸(P) 也未发生变化。据报道, O1K 株的 VP1 基因的 134 位氨基酸是半胱氨酸(C), 其与 VP2 基因的 130 位半胱氨酸以二硫键相连, 体现在抗原表位上是立体构象依赖性的, 在液相 ELISA 中单抗与之最大限

度地反应^[7], 而 A 型病毒 VP1 基因的 130~160 位氨基酸残基中没有半胱氨酸, 不形成二硫键, 单抗既可在液相又可在固相 ELISA 中与之最大限度地反应。本试验中, 只有 L2 株 VP1 基因的 134 位氨基酸是半胱氨酸(C), 与 O1K 等毒株一致, 而其他 4 株毒株 VP1 基因的 134 位氨基酸发生了改变, 由半胱氨酸(C)→丝氨酸(S), 不同于 O1K 株, 而与其他 A 型 FMDV 一致。

据报道, VP1 的 145~147 位氨基酸由精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)组成, 该区段参与构成病毒的细胞吸附位点, 所有血清型毒株的该区段的氨基酸保守, 以保持病毒对细胞的侵染性。在本试验中, 5 株毒株都符合这一规律, 存在 RGD 组成的病毒受体位点。

通过上面的分析, 笔者认为 L1、L3、L4、L5 4 株病毒具有相同的抗原性。当然, 要得到更加详细的表位特性, 还应组成主要抗原位点表位的单抗定位和分析。

参考文献:

[1] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学[M] . 第 2 版. 北京: 科学出

版社, 1997. 479— 499.

[2] STROHMAIER K, FRANZE R, ADMAN K H . Location and characterization of the antigenic portion of the FMDV immunizing protein[J] . J Gen Virol , 1982 , 59: 295— 360.

[3] MASON P W , RIEDER E , BAXT B . RGD sequence of foot-and-mouth disease virus is essential for infecting cells via the natural receptor but can be bypassed by antibody dependent enhancement pathway[J] . Proc Natl Acad Sci USA , 1994, 91: 1 932— 1 936.

[4] 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 antigenic sites [J] . J Gen Virol , 1987, 68: 163— 167.

[5] BOLWELL C, CLARKE B K, PARRY N R , et al . Epitope mapping of foot-and-mouth disease virus with neutralization monoclonal antibodies[J] . J Gen Virol , 1987, 70: 59— 68.

[6] 萨姆布鲁克 J , 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南[M] . 第 2 版. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 北京: 科学出版社, 1993. 401— 407.

[7] ACHARYA R , FRY E , STUART D , et al . The structure of foot-and-mouth disease virus: implication for its physical and biological properties [J] . Vet Microbio , 1990, 23: 21— 34.

Cloning and Sequence Analysis of the VP1 Gene of Five Strains of Foot-and-Mouth Disease Virus Type O of Pig

MA Jing-yun, CAO Yong-chang, BI Ying-zuo

(College of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The nucleotide sequences of VP1-coding region of five strains of FMDV type O (Named L1, L2, L3, L4 and L5) were determined. RNA of the five cell-adapted virus strains were extracted by single-step RNA isolation , reverse-transcribed and amplified by PCR respectively . PCR products were cloned and sequenced . The results suggested homology among the L1, L3, L4 and L5 strains was 96. 7%-99. 8% for nucleotide sequence and 99. 5%-100% for amino acid sequence , but 82. 0%-83. 4% and 89. 7%-90. 1% to L2 respectively. Homology among the L1, L3, L4 , L5, HKN/1/99,HKN/16/96 and GD/CHA/86 strains was 85. 0%-99. 8% for nucleotide sequence, belong to the same genotype. However, compared with L2, F29/CHINA and the foreign strains , they belonged to a different genotype . Homology between those four strains and L2, F29/CHINA or foreign strains was 41. 0%-82. 6%. The relative degree of variation at VP1 140-160 and 200-213 amino acids, the major neutralizing site determined, was the same for the L1, L3, L4 and L5 strains, suggesting similarity in epitopes and antigenicity .

Key words: foot-and-mouth disease virus ; VP1 gene; cloning; sequence analysis

【责任编辑 柴 焰】