# 5 株猪 O 型口蹄疫病毒结构蛋白 VP1 基因的 克 降 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 0 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; VPI 基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: S852 65

文献标识码: A

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8500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<sup>[2]</sup>, 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<sup>[4]</sup>. 另外, 序列分析表明, VP1 基因的核苷酸易发生变异[3],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.

文章编号: 1001-411X (2003) 01-0070-04

# 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' AGCTTGTACCAGGGTTTGGC 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 Promege 公司产品: 菌株  $DH5\alpha$  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 GiBcol 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》<sup>[6]</sup> 操作. PCR 扩增程序为: 94  $^{\circ}$ C40 s, 46  $^{\circ}$ C40 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.

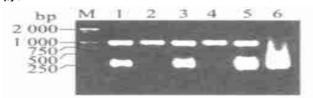
#### 1.8 目的基因的核苷酸序列测定

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 VPI 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

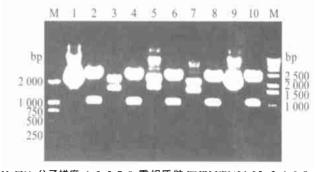
挑选的克隆经 PCR、酶切鉴定, 结果与预期结果一致(图 2、3). 初步确认获得了 5 株病毒的 VPI 基因阳性克隆.



- 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( *Eco*R I+ *Eco*R I) M; DL2000. 1 kb DNA Ladder, 1、3、5、7、9; PGEM-VP1/ L1-L5; 2、4、6、8、10; PGEM-VP1/ L1-L5+ *Eco*R I

#### 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 I2 株,其他 4 株毒株 VPI 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 的同源性分别高达 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.

(%)

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
100.000	E .	NOT THE OWNER.	ACCOUNTED LO	TOCCACCOTO	1	- 1	ACAMETERS	MANAGEMENTS.	CAC MENTO	777
ALCALA.				CTT					G	
			,							
			G				G		G	
	1.1					C				••••
	MANUAL TOTAL	PETER SACIE	***************************************	CHACKCOMES	MONTH COL	vernék marki	*****	ACACCTTOSTA	10000000	-
TUTTAL				_			-		_	
	116		7	146	7.7	150	7.7	100	190	
		CUTGAAAGT	MCCM	GAACAGGTIA	A GIGITO	CONTRACTOR OF THE PROPERTY OF	WICHTERN	ACACCTTOGE!		
	ACA	τ :		C. NA.		c c	17			=
l L T	r					A				
	-							· ·	. '	
GATE:	ALTERAL PAC	TACTOTISACO	TGGNACTGG	CCGTCANGCA	DCACGGCGA1	CTCACCTOG	TTOCAMOG	reminews.	CAGACTE	ACM.
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	
-					OCROCCOCK!	***************************************	TELEVANIA	IUCIUCAG	M MCCMCTEC	
	T.T.			I T A					GCH	
				•						
1		T						44.414		,
1 .										• • • •
									***	
ACCATU	MATCOLINACO							$\overline{}$		GAG
1 <b>N</b> X1.	310	320 CCTATCACA C T.	330 A.CG. A	340	J50 ELETALL T CT.G	J60 ACAGGCTO	370 MANAGOOTO G. T. A. G	380 ETAGEGACUS	390 CINCANGO	GAGG
1 NX. 17.	310 AATGEAAGGE C A	320 CCTATCACA C T.	330 A.CGA	340 C	J50 GT.G	J60 ACAGGCTO	370 MCMC260070 G, f A, G	3B0 ETAGOGACUS S G T	390 CTACAACGG	GAGC MGA
1 NX. 17.	310 AATGEAAGGE C A	320 CCTATCACA C T.	330 ACG. A	340 C	J50 GT.G	J60 ACAGGCTO	370 MANAGOOTO G. T. A. G	3B0 ETAGOGACUS S G T	390 CTACAACGG	GAGC MGA
1 WX	310 AATOEANOSC C A	320 CCTATCACA G T.	330 ACG. A	340 TACASTORTO C	JSQ GILTALL II CT.G A.	J60 ACATECTO C	370 MANAGEOUTO G. T. A. G	3B0 ETAGOGACUS S G T	390 CTACAACGO G	GAGK AGA
1 WX	310 C A	320 CCTATCACA C T. C	330 A.CG. A	340 C C	J50 GT.GA.	J60 C	370 SCHLOSOTTO G. T. A. G	380 ETAGOGACUA SI G T	390 CTACAACGO G	GAGK AGA
1 ACCUTA	ATCHACES C A C C A	320 CCTATCACA C T. .C	330 ACGA ACTION A.CG R.	340 TALAGUST TO C	JSQ GENERAL IN CT.G A G A	J60 ACACIGCTON C	370 PERCESOTO G. T. A. G GANAGANCTO	380 STEMOCOMOUN S G T T	390 CINCANCES G	GAGA AGA
1 ACCUTA	ATCHACES C A C C ALGORISACIO	320 CCTATCACA C T. .C	330 ACGARCITECI A.CG R A.CG R A.CG R A.CG R	340 C C	JSQ  GENERAL TO CT. G	J60 TEAGRAGE	370 PERCEGOTTO G. T. A. G GANAGANCTO 470 GANAGANCTO	380 TTMOCACOTO T T TSCCCACTO 490	390 CTACAACTAI 490 CTCCAACTAI	GAGK AGA
1 MX. LTI	ATCHACES C A C C ALGORISACIO	320 CCTATCACA C T. .C	330 A.CG R A.CG R A.CG R	340 TALAGGETOL C 449 FORGERECTTC TTC.	350 GENERAL TO GENERAL	J60 TEAGRAGE	370 PERCEGOTTO G. T. A. G GANAGANCTO 470 GANAGANCTO	380 TTMOCACOTO T T TSCCCACTO 490	390 CINCANCES G	GAGK AGA
1 ACCUTA	ATCHACES C A C C ALGORISACIO	320 COTATORIA C TCCCCASCACTAN 420 CASCACTAN TO GTG S	330 A.CG A. A.CG A.	340 C C	350 GALLING REG 457 REMARKS	J60 TEAGRAGE	370 PERCEGOTTO G. T. A. G GANAGANCTO 470 GANAGANCTO	380 TTMOCACOTO T T TSCCCACTO 490	390 CTACAACTAI 490 CTCCAACTAI	GAGA AGA
GMAST	ATCHACES C A C C ALGORISACIO	320 COTATOROA C T. .C CMCCACTAN 420 CMCCACTAN TO GTG S	330 A.CG R. CAACGTGAGA 430 CAACGTGAGA	340 C C SOCACOTO 449 FORGORACTIC TT.C.	350 GENERAL IN GT. G	160 TICAGRAGGE 160	370 PERCEGOTTO G. T. A. G GANAGANCTO 470 GANAGANCTO	380 TTMOCACOTO T T TSCCCACTO 490	390 CITICAACIAI G G CITICAACIAI	GAGA AGA
GIASTI	310 AAATEEAACOC C A C ALGOTISACACA 410 ALGOTISACACA A A J	320 CCTATCACA C TCCCACCACTAA 420 CHOCACTAA T. GTG S	330 ACG. A. CAACGTGAG	340 C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	350  GELETALE III  GT. G.  AGLIPATICA  457  GEOGRAPHICA  457	360 TACASSACCE TCASSACCE 469 STCASSACCE	370 SCHLOSOTTO G. T. A. G GRANGARCTO 470 CG G	380 DITAGOGACUA ST G T T TSCCCD-CCTCC 490 TGCCCA-CCTCC	390 TOTACANCEC G TTCAACTEC 49C	AGA AGA
GIASTI	ALGORISACION A A A A	32D CCTATCACA C TCCCACACACTAAA 42D CMCCACTAAA TC GTG S	330 AGGAMITECI A.GG., A A.GG.,	340 CCATGMACAC	350  GELETALE TO CO.  G	360 TOASSACCO  969 TOASSACCO	370 SEMAGNOTO  G. T. A. G  G.	380  TT  TS  GS  TS  TS  TS  TS  TS  TS  TS	390 G G G G G G G G G G G G G G G G G G G	AGA AGA
GTAGT	AATCHACOGO A COMMISSION A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	320 CCTATCACA C TCCCACCACTACA CACCACTACA 420 CENCRITANA T GTG S	330 ACGARTECTA A.CG. A	340 TACASSETTIC C C C C C C C C C C C C C C C C C C	350  GELETALE TO  GET  AGETYMETERS  457  MAGETYMETERS  GET  AGETYMETERS  550	360 TACAGRAGGETO 460 TACAGRAGGETO 460 TACAGRAGGETO 560	370  MANAGAMENT G. T. A. G  170  CG. G. G.  AGAMAGAMENT  578	380 227MOCACOS 27 T 2 T 27 280 280 280 280 280 280 280 280 280 280	390  TOTAL ACTAL  490  TOTAL ACTAL  CONTROL OF THE ACTAL  CONTROL OF THE ACTAL  SOURCE OF THE	GOT
GINASTI  GINASTI  CATIDAL  CATIDAL	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	320 CCTATCACA C TCCCCCCCCC	330 ACGARCITATI A.CG. A 430 CAACGIGAGS T 530 CINCTICACO	340 TACASSETTIC C C C C C C C C C C C C C C C C C C	ACCOMPANIAN  ACCOM	360 THE ASSESSMENT OF THE ASSE	370  HOMODOTTO G. T. A. G  G. T. A. G  GOVERNMENT  TO  GOVERNM	380 220000000000000000000000000000000000	390 ICINCANDRI G  490 ITICANCIRI  490 ITICANCIRI  590 ICINGINGINGINI	GOTTO
GIASTI  GIASTI  CATTAG	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	320 CCTATCACA C TCCCCCCCCC	330 ACGARCITATI A.CG. A 430 CAACGIGAGS T 530 CINCTICACO	340 TACASSETTIC C C C C C C C C C C C C C C C C C C	STATE OF THE STATE	160 TROAGRAGGOTA  660 STOAGRAGGOTA  560 STOAGRAGGOTA  560	370 SCHARGARCTE 470 SCHARGARCTE 578 SCHOOL TRAIN	380 SEMMOGRACION SE G T T T TGOCCACTOX 490 TGOCCACTOX TGOCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX	390 ICINCANDRI G  490 ITICANCIRI  490 ITICANCIRI  590 ICINGINGINGINI	GOTTO
GTAAST	ALGORIACION SILO CONTRACTOR SI	320 CCTATCACA C TCCCCCCCCC	330 ACGARTIST A.CG. A 430 EARCSTORG T 530 ETGCTCTAC	GANTONAGAC  CAATONAGAC  CAATON	STATE OF THE STATE	160 TROAGRAGGOTA  660 STOAGRAGGOTA  560 STOAGRAGGOTA  560	370  HOMODOTTO  G. T. A. G  GAMAGAMOTT  GOOGLOGATION  578	380 SEMMOGRACION SE G T T T TGOCCACTOX 490 TGOCCACTOX TGOCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX	390 ICINCANDRI G  490 ITICANCIRI  490 ITICANCIRI  590 ICINGINGINGINI	GOTTO
GENACTI  GENACTI  GENACTI  CATTAN  CATTAN  CATTAN  1 CATTAN	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	320 CCTATCACA C TCCCCCCCCC	330 ACGARCITATO A.CG. A. 430 CANCATANAS T 530 CTGCTCTNO	GODGACTTU 449 FANTGARGETTO TTC. CANTGARGAC 540 GRANTGARGAC C G	350  GENERALE TO GENERAL TO GE	160 TROAGRAGGOTA  660 STOAGRAGGOTA  560 STOAGRAGGOTA  560	370 SCHARGARCTE 470 SCHARGARCTE 578 SCHOOL TRAIN	380 SEMMOGRACION SE G T T T TGOCCACTOX 490 TGOCCACTOX TGOCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX	390 ICINCANDRI G  490 ITICANCIRI  490 ITICANCIRI  590 ICINGINGINGINI	GOTTO
GTAAST	ALGORIACION SILO CONTRACTOR SI	320 CCTATCACA C TCCCCCCCCC	330 ACGARCITATO A.CG. A. 430 CANCATANAS T 530 CTGCTCTNO	GANTONAGAC  CAATONAGAC  CAATON	350  GENERALE TO GENERAL TO GE	160 TROAGRAGGOTA  660 STOAGRAGGOTA  560 STOAGRAGGOTA  560	370 SCHARGARCTE 470 SCHARGARCTE 578 SCHOOL TRAIN	380 SEMMOGRACION SE G T T T TGOCCACTOX 490 TGOCCACTOX TGOCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX	390 ICINCANDRI G  490 ITICANCIRI  490 ITICANCIRI  590 ICINGINGINGINI	GOTTO
GRASTI	ALGORIACION SILO CONTRACTOR SI	320 CONTRICACA C TCCCCCCCCC	330 NOCAMOTICAL A.CG., R. A.CG., R. 430 CANCOTONICA 430 CANCOTONICA 530 CANCOTONICA 630	340 CONCACUTO 449 EXAMENTE T. T. G. CANTENAGAGE GG G G	350  GENERALE TO GENERAL TO GE	160 TROAGRAGGOTA  660 STOAGRAGGOTA  560 STOAGRAGGOTA  560	370 SCHARGARCTE 470 SCHARGARCTE 578 SCHOOL TRAIN	380 SEMMOGRACION SE G T T T TGOCCACTOX 490 TGOCCACTOX TGOCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX	390 ICINCANDRI G  490 ITICANCIRI  490 ITICANCIRI  590 ICINGINGINGINI	GOTTO
GRASTI	310  AATOCHAOM  C A  410  AAA  AAA  STEANACHTOST  STEANACHTOST  COMMITTEE  COMMITTEE  COMMITTEE  COMMITTEE  CAMMITTEE  AAA  AAA  CAMMITTEE  CAM	320 COTATIONAL C TCCCCCCCCC	330 ACGARCISCO ACGARCISCO 430 COMMISSIONES 530 COMMISSIONES	340 CONCACUTO 449 EXAMENTE T. T. G. CANTENAGAGE GG G G	350  GENERALE TO GENERAL TO GE	160 TROAGRAGGOTA  660 STOAGRAGGOTA  560 STOAGRAGGOTA  560	370 SCHARGARCTE 470 SCHARGARCTE 578 SCHOOL TRAIN	380 SEMMOGRACION SE G T T T TGOCCACTOX 490 TGOCCACTOX TGOCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX	390 ICINCANDRI G  490 ITICANCIRI  490 ITICANCIRI  590 ICINGINGINGINI	GOTTO
GENERAL CATTERNS I CAT	310  ANTOCHACIA  C A  G  ALGORIGANIA  A A A  CONCENTRATION  STREET C A  A  C A  C A  C A  C A  C A  C A	320 COTATIONA C TCC	A.G. A.  A.G. A.  430  CAACSTORE  530  CHUTCHAO  630	GOLGACITA  449  GAATGAAGAC  CAATGAAGAC  S 40  GAATGAAGAC  GAATGAAGAC  G	350  GENERALE TO GENERAL TO GE	160 TROAGRAGGOTA  660 STOAGRAGGOTA  560 STOAGRAGGOTA  560	370 SCHARGARCTE 470 SCHARGARCTE 578 SCHOOL TRAIN	380 SEMMOGRACION SE G T T T TGOCCACTOX 490 TGOCCACTOX TGOCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX	390 ICINCANDRI G  490 ITICANCIRI  490 ITICANCIRI  590 ICINGINGINGINI	GOTTO
GRANTIA	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	320 COTATORA C T. C. T. COMPATTAN 420 COMPATTAN 420 COMPATTAN 570 GTGACTGAN A TOCACCCC 620 GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	A.G. A.  A.  CHARACTORUS  C.  A.  CHARACTORUS  C.  A.  CHARACTORUS  C.  C.  C.  C.  C.  C.  C.  C.  C.  C	349  CANTONION  CANTONION  CANTONION  CANTONION  CANTONION  CANTONION  CONTINUE  CONTI	350  GENERALE TO GENERAL TO GE	160 TROAGRAGGOTA  660 STOAGRAGGOTA  560 STOAGRAGGOTA  560	370 SCHARGARCTE 470 SCHARGARCTE 578 SCHOOL TRAIN	380 SEMMOGRACION SE G T T T TGOCCACTOX 490 TGOCCACTOX TGOCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX	390 ICINCANDRI G  490 ITICANCIRI  490 ITICANCIRI  590 ICINGINGINGINI	GOTTO
GENERAL CATTERNS I CAT	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	320 COTATORA C T. C. T. COMPATTAN 420 COMPATTAN 420 COMPATTAN 570 GTGACTGAN A TOCACCCC 620 GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	A.G. A.  A.G. A.  430  CAACSTORE  530  CHUTCHAO  630	349  CANTONION  CANTONION  CANTONION  CANTONION  CANTONION  CANTONION  CONTINUE  CONTI	350  GENERALE TO GENERAL TO GE	160 TROAGRAGGOTA  660 STOAGRAGGOTA  560 STOAGRAGGOTA  560	370 SCHARGARCTE 470 SCHARGARCTE 578 SCHOOL TRAIN	380 SEMMOGRACION SE G T T T TGOCCACTOX 490 TGOCCACTOX TGOCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX TCCCCACTOX	390 ICINCANDRI G  490 ITICANCIRI  490 ITICANCIRI  590 ICINGINGINGINI	GOTTO

图 4 FMDV L1、12、13、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

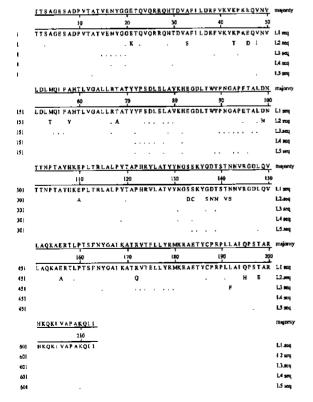


图 5 FMDV L1、L2、L3、L4、和 L5 株 VP1 基因推导的氨基酸序列

Fig. 5 The deduced amino acid sequence of foot and mouth disease

21994-2016 ene L1— L5 strains 21994-2016 enina Academic Journal Electronic Publi

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 12 L3 14 1.5 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 82. 5 HAINAN/CHA/4/99 80.6 81 1 81 7 80.4F29/ CHINA 41.0 44.0 41.3 42.6 45. 2 O/CHA/380.4 82.9 80. 9 82.2 80.3 O1K 75.4 80. 1 75. 4 77.075. 3 O/LAO/2/2000 80.3 82. 6 80. 0 81.7 80.1 O/JPN/ 2000 80.4 82.6 80.3 80, 9 80, 4 O/CAM/4/2000 79.2 81.8 79. 7 80.6 79.3 79 2 O/UKG/12/2001 76.5 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 0 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,01K 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<sup>[1]</sup>,而 A 型病毒 VP1 基因的  $130 \sim 160$  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 01K 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 01K 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 PW, RIEDER E, BAXT B. RGD sequence of footand-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 BK, PARRY NR, 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-transcripted 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】