

# 口蹄疫病毒泛亚株全衣壳基因克隆和序列结构分析

田纯见, 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:**应用 RT-PCR 和 nPCR 实现了口蹄疫病毒 O/PanAsia/10 株的全衣壳基因的克隆和序列测定. 对核苷酸和氨基酸的序列分析表明, 与经典 O 型毒株比较存在较大变异. 其中 4 种结构蛋白的变异顺序是 VP1 > VP3 > VP2 > VP4. P1 基因 G + C 值约 55%. 全衣壳蛋白相对分子质量约  $8.0 \times 10^4$ . 主要结构蛋白 VP1 呈碱性, 等电点约 9.5.

**关键词:**口蹄疫病毒; 衣壳蛋白; 基因克隆; 基因序列分析

中图分类号: S126

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2004)02-0089-04

## The cloning and sequence analysis of the capsid gene (P1) of foot-and-mouth disease virus O/PanAsia

TIAN Chun-jian, CAO Yong-chang, BI Ying-zuo

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

**Abstract:** A reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and nested PCR (nPCR) is described that amplified the genes encoding the capsid proteins VP1-4 of the foot-and-mouth disease (FMD) virus O/PanAsia/10. The sequences of the antigenically relevant capsid proteins VP1-3 were compared with those of previous field viruses and found to be highly variable by phylogenetic analysis as following: VP1 > VP3 > VP2. The G + C value of P1 gene is about 55% and the size of the whole capsid protein is about  $8.0 \times 10^4$ . The major structural protein VP1 is basic and its isoelectric point is pH 9.5, much higher than those of VP2, VP3 or VP4.

**Key words:** foot-and-mouth disease virus; capsid protein; gene cloning; gene sequence analysis

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类首要传染病<sup>[1]</sup>. FMDV 属小核糖核酸病毒科 Picornaviridae 口蹄疫病毒属 *Aphthovirus*. FMDV 基因组是由约 8 500 个核苷酸构成的正链 RNA, 含 1 个翻译阅读框架, 可产生 P1、P2 和 P3 多肽链. 其中 P1 多肽链经病毒蛋白酶处理可形成 VP4(1A)、VP2(1B)、VP3(1C) 和 VP1(1D) 4 种结构蛋白, 并组装为病毒衣壳, 构成病毒表面的 5 个抗原位点<sup>[2]</sup>. 2000 年英国暴发大规模的灾难性 FMD, 使本病的重要性得到充分证明<sup>[1]</sup>. 英国为此扑杀了 400 万头家畜, 估计引起的全部损失是 300 亿美元. 同时, 西欧其他国家、韩国、日本和中国台湾、西藏、云南、海南及福建省也发生疫情. 在 FMDV 的流行病学调查、疾病诊断

和新型疫苗研究中, 全衣壳基因 (P1) 具有重要意义<sup>[3-5]</sup>. 引起本次 FMD 世界大流行的泛亚株 (PanAsia) FMDV, 其全衣壳基因完整的克隆和序列分析有待深入研究. 本研究应用反转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 和巢式 PCR (nPCR) 方法, 利用 FMDV O/PanAsia/10 株的 BHK21 细胞适应毒, 扩增出 P1 基因, 并克隆到 pGEM-T Easy 载体质粒中, 进行序列测定和分析. 本研究获得 FMDV 大流行毒株的全衣壳基因序列, 旨在探讨 FMDV 的抗原和毒力变异的分子基础, 为 FMD 的防治提供理论依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 毒株

FMDV O/PanAsia/10 株由华南农业大学动物基

因工程实验室分离、鉴定,并按规定在  $-80^{\circ}\text{C}$  保存. 该毒株经豚鼠传 4 代和 BHK21 细胞传 35 代,已适应动物和细胞传代培养.

### 1.2 病毒增殖、分离和提取纯化

按文献[6]方法,病毒以 BHK21 细胞单层培养增殖,用 TRIzol 试剂进行分离纯化,用于 RT-PCR 扩增.

### 1.3 引物设计

参照 GenBank 已发表的 FMDV 全衣壳 P1 基因序列,应用 Primer Premier 5.0 等软件,设计引物对 P1-S1/P1-A1. P1-S1 位于 FMDV O/mason 株核苷酸序列 1 596 ~ 1 618 位,序列为: 5' CATGTCCTCCTGCATCTGGTTGA 3'. P1-A1 位于 FMDV O/mason 株的 3 970 ~ 3 992 位,序列为 5' TTTGT(CT)CCGTACGATCAAGAACC 3'. RT-PCR 产物测序后,根据序列设计引物对 P1-S2/P1-A2,5' 端均包括 *Eco*RI 酶切位点(序列 GAATTC). P1-S2 的序列为: 5' GGCAGAAITCACTCAACGCAGAATGGAAAGCAAA 3'. P1-A2 的序列为: CGGGAATTCATGGTCGAAGT-TCAGAAGCTGTTTT 3'.

### 1.4 RT-PCR 和 nPCR

应用 TaKaRa(大连)公司的试剂盒进行,含有 AMV 反转录酶和 LA *Taq* 酶. 进行温度梯度 PCR 筛选最佳退火温度.

### 1.5 基因克隆

nPCR 产物经琼脂凝胶试剂盒回收纯化,加 A 尾后与 pGEM-T Easy 载体质粒连接, T4 DNA 连接酶作用,  $4^{\circ}\text{C}$  过夜. 应用  $\text{CaCl}_2$  法转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  受体菌,然后在筛选培养基(含氨苄青霉素、X-gal 和 IPTG)上培养,  $37^{\circ}\text{C}$  过夜. 挑选白斑进行 PCR 检测、酶切质粒分析和 DNA 序列测定.

### 1.6 序列测定和分析

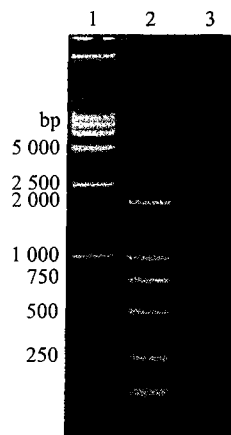
取多个 PCR 阳性菌落进行小规模培养,上述鉴定正确的菌液和质粒送去上海基康生物技术公司,进行 T7 和 SP6 启动子通用引物测序. 测得的核苷酸序列及推导的氨基酸序列在 NCBI 进行 BLAST 检索. 利用 DNA star 软件包进行氨基酸推导和序列同源性分析.

## 2 结果

### 2.1 病毒基因组 ssRNA 的纯化与 RT-PCR、nPCR 产物的检测

FMDV O/PanAsia/10 经 BHK21 细胞传代至第 14 代出现明显 CPE. 按 TRIzol 试剂的说明抽提总 RNA. 获得的 ssRNA 经电泳检测,有明显 RNA 条带. 用引物 P1-A1、AMV 反转录酶进行反转录(RT),  $42^{\circ}\text{C}$  作用 1 h, 获得 cDNA. 产物应用引物对 P1-S1/P1-A1 和 P1-S2/P1-A2 先后进行 PCR 和 nPCR,分别得到 2.7 kb 和 2.2

kb 大小的 DNA 条带,与预期的大小一致(图 1,2).



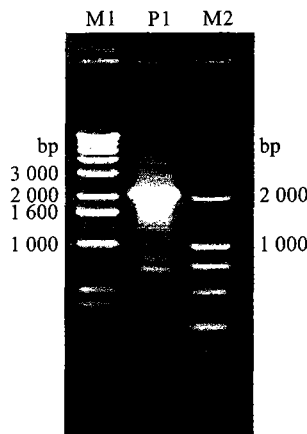
1: 15 000标准分子量;2: 2 000标准分子量;

3: 目的基因 RT-PCR 产物

1: DNA Marker 15 000; 2: DNA Marker 2 000; 3: RT-PCR product of gene

图 1 FMDV O/PanAsia/10 株 P<sub>1</sub> 基因的 RT-产物检测

Fig. 1 Identification of RT-PCR product of FMDV O/PanAsia/10 gene



M1: 15 000标准分子量; P<sub>1</sub>: 目的基因的 nPCR 产物;

M2: 2 000标准分子量

M1: DNA Marker 15 000; P<sub>1</sub>: nPCR product of gene;

M2: DNA Marker 2000

图 2 FMDV O/Pan Asia/10 株 P<sub>1</sub> 基因的 nPCR 产物检测

Fig. 2 Identification of nPCR product of FMDV O/PanAsia/10 gene

### 2.2 nPCR 产物的克隆和鉴定

将 nPCR 产物加 A 尾后,与 pGEM-T Easy 质粒在  $4^{\circ}\text{C}$  连接过夜,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  受体菌,经蓝白斑筛选获得多个 PCR 阳性菌落. 从小规模培养的菌液中抽得质粒,经 *Eco*RI 酶切得到约 3 kb 的质粒片段和 1.6 kb、0.6 kb 两个目的片段,与预计的大小一致.

### 2.3 FMDV O/PanAsia/10 株 P<sub>1</sub> 基因的核苷酸序列和氨基酸序列

上述克隆经 T7 和 SP6 通用引物测序得到核苷酸序列(图 3). 经 BLAST 检索、比较,其推导的氨基酸序列的一级结构特点见表 1.

GGCGCCGGGC AATCCAGCCC GACCACCGGG TCACAAAACC AATCTGGTAA CACCGGTAGC ATCATTAACA  
ATTACTACAT GCAGCAGTAC CAGAACTCTA TGGACACCCA ACTTGGCGAC AACGCCATTA GTGGAGGATC  
CAACGAGGGC TCCACGGACA CTACTTCCAC TCACACCAAC AACACCCAGA ACAACGATTG GTTCTCAAAA  
CTGGCCAAACA CTGCTTTTCAG CGGCCCTTTC GGTGCTCTTC TTGCCGACAA AAAGACGGAA GAAACCACCC  
TCCTCGAAGA CCGCATCCTC ACGACCCGCA ACGGGCACAC GACCTCGACA ACCCAGTCAA GTGTCGGGGT  
GACGTACGGG TATGCAACGG CTGAGGACTT TGTGAGCGGG CCAACACCT CTGGTCTTGA GACCAGAGTC  
GTCCAGGCCG AACGGTCTT CAAAACCCAC CTGTTCTGACT GGGTCACCGG TGACTCGTTT GGGCGGTGTC  
ACTTGTGGGA GCTACCGACT GACCACAAAG GTGTCTACGG CAGCCTGACT GACTCGTACG CATACATGAG  
GAACGGTTGG GACGTTGAAG TCACCGCAGT GGGGAACCAAG TTCAACGGAG GTTGCTTGTT AGTGCGGATG  
GTGCCGAAC TTTGTCCCAT CACCAAGAGA GAGCTATACC AACTCACACT TTTCCCCCAG CAGTTCATCA  
ACCCACGGAC GAACATGACG GCACACATCA CCGTGCCCTA TCTCGGTGTC AACAGGTACG ACCAGTACAA  
GGTACACAAA CCCTGGACTC TCGTGGTCAT GGTGTGGGCC CCCTTGACGG TCAATAACGA GGGCGCCCCA  
CAAATCAAGG TGTATGCCAA CATCGCCCC ACCAACGTTT ACCTCGCGGG TGAACCTCCT TCCAAAGAGG  
GGATCTTCCC TGTGGCGTGC ACTGACGGTT ACGGTGGCTT GGTAACTACG GACCCGAAGA CGGCAGACCC  
CGTCTACGGG AAAGTGTTC AACCACCCCG CAACCTGCTG CCAGGGCGGT TCACAAATCT CCTTGATGTG  
GCCGAGGCGT GTCCACGTT CCTGCACTTC GATGGTGACG TCCCCTACGT GACCACGAAG ACGGACTCAG  
ACAGCGGTGG GGGCCAGTTC GACTTGTCCC TCGCGGCAAA GCACATGTCG AACACCTTTC TCGCTGTCT  
TGCCCACTAC TACGCACAGT ACAGCGGCAC CATCAACCTG CACTTCATGT TCACGGGGCC CACCGATGCG  
AAGGCACGCT ACATGGTTGC GTACGCCCTT CCTGGTATGG AACCACCGAA AACGCCTGAG GCGGCTGCGC  
ACTGCATCCA CGCCGAGTGG GACACTGGGC TGAATTCAAA GTTCACGTTT TCAATCCCGT ACCTTTCGGC  
AGGTTCTGTA AAGTCAAGCC AATCGACAGT TGCCGAGACT ACAACGTTG AaGGATGGGT CTGTCTGTTC  
CAGATAACAC ACGGGAAGC CGACGGTGAC GCTCTGGTAG TGTTAGCCAG CGCTGGCAAG GACTTTGACT  
TACGCTGCC GGTAGCGCC CGAGGCCAAA CCACCTCTGC GGGTGAGTCT GCGGACCCCG TTAAGTCCAC  
CGTCGAAAAC TACGGCGGTG AGACACAAGT CCAGAGGCGC CAGCACACAG ACGTTGCGTT CATACTGGAT  
AGGTTCTGTA AAGTCAAGCC AAAGGAACAG GTTAACGTGT TGGACCTGAT GCAAAATCCTT GCCCACACT  
TGGTAGGGG GCTCCTGCGG ACGGCCACCT ACTACTTCTC TGACCTGGA CTGGCCGTCA AGCACCAGGG  
CGATCTCACC TGGGTTCCAA ACGGCGCCCC CGAGACAGCA CTGGACAACA CCACCAATCC AACGGCTAT  
CACAAGAAAC CGCTCACAG GCTGGCGCTA CCTTACACGG CTCCACACCG CGTCTAGCG ACCGTCTACA  
ACGGGAGCAG TAAGTACGGT GACACCAGCA CTAACAACGT GAGAGGCGAC CTTCAGGTAC TGGCTCAGAA  
GGCAGAAAGA ACTCTGCCA CCTCCTTCAA CTATGGTGCC ATTAAGGCGA CTCGTGTGAC TGAAGTCTC  
TACAGAATGA AGAGAGCCGA GACGTACTGC CCCAGGCCCC TTCTCGCCAT CCAACCGAGT ACCGCCAGAC  
ACAAGCAGAA GATCGTGGCA CCCGCAAAAC AG

图 3 FMDV O/PanAsia/10 株的 P1 基因克隆的核苷酸序列

Fig. 3 Nucleotide sequence of the structural protein-encoding region of foot-and-mouth disease virus O/PanAsia/10

表 1 FMDV O/PanAsia/10 株及参考毒株的全衣壳基因推导的氨基酸序列分析

Tab. 1 Homologies and analyses of amino acid sequence of the structural protein-encoding region of foot-and-mouth disease virus

| 基<br>因 <sup>1)</sup> | 毒株 <sup>2)</sup> | 氨基酸 amino acid |       |        |       |       | 相对分子量                                           |     | (G + C)<br>/% |
|----------------------|------------------|----------------|-------|--------|-------|-------|-------------------------------------------------|-----|---------------|
|                      |                  | 总              | 碱性    | 酸性     | 亲水性   | 极性    | relative molecular<br>mass( × 10 <sup>3</sup> ) | pI  |               |
| genes                |                  | total          | basic | acidic | hydro | polar |                                                 |     |               |
| P1                   | 10               | 734            | 60    | 68     | 243   | 234   | 80.0                                            | 6.5 | 55            |
|                      | M                | 734            | 60    | 71     | 242   | 232   | 80.0                                            | 6.3 | 55            |
|                      | K                | 719            | 60    | 67     | 240   | 227   | 79.0                                            | 6.6 | 55            |
|                      | A                | 735            | 57    | 67     | 248   | 232   | 80.0                                            | 6.4 | 55            |
| VP4                  | 10               | 85             | 1     | 5      | 18    | 46    | 8.9                                             | 3.8 | 53            |
|                      | M                | 84             | 1     | 5      | 17    | 46    | 8.8                                             | 3.8 | 54            |
|                      | K                | 68             | 1     | 5      | 16    | 36    | 7.3                                             | 3.8 | 54            |
|                      | A                | 84             | 1     | 5      | 19    | 45    | 8.8                                             | 3.8 | 54            |
| VP2                  | 10               | 218            | 18    | 22     | 71    | 67    | 24.3                                            | 6.3 | 56            |
|                      | M                | 217            | 19    | 21     | 71    | 67    | 24.2                                            | 6.8 | 56            |
|                      | K                | 217            | 18    | 21     | 72    | 68    | 24.3                                            | 6.5 | 54            |
|                      | A                | 217            | 17    | 21     | 73    | 67    | 24.1                                            | 6.3 | 54            |
| VP3                  | 10               | 220            | 15    | 23     | 83    | 57    | 23.8                                            | 5.0 | 57            |
|                      | M                | 219            | 15    | 23     | 81    | 58    | 23.7                                            | 5.0 | 58            |
|                      | K                | 219            | 16    | 21     | 80    | 59    | 23.6                                            | 5.3 | 58            |
|                      | A                | 219            | 15    | 24     | 81    | 56    | 23.7                                            | 4.9 | 57            |
| VP1                  | 10               | 211            | 26    | 18     | 71    | 64    | 23.4                                            | 9.6 | 54            |
|                      | M                | 210            | 25    | 21     | 72    | 60    | 23.3                                            | 9.1 | 56            |
|                      | K                | 212            | 25    | 18     | 71    | 64    | 23.7                                            | 9.5 | 54            |
|                      | A                | 211            | 23    | 17     | 76    | 61    | 23.2                                            | 9.3 | 55            |

1) P1、VP4、VP2、VP3、VP1 表示基因的名称; 2) 10 表示毒株 O/PanAsia/10, M 代表参考毒株 O/mason(AF308157)(M), K 代表参考毒株 O1K(×00871)(K), A 代表参考毒株 Akesu(AF 511039)(A)

### 3 讨论

#### 3.1 引物设计和巢式 PCR 扩增

在国际上用于 FMDV 诊断的 RT-PCR<sup>[7]</sup>,是针对序列相对保守的 2ABC 或 3ABCD 基因进行的. 结合 nPCR 可提高其敏感性. 本研究设计 2 对特异性引物,利用 PCR 产物测序和 nPCR 扩增,及 T 载体克隆,获得了 FMDV 全衣壳基因克隆. 其中用于 RT-PCR 扩增的引物对是根据 GenBank 上已发表的少数几个 FMDV 全序列,借助引物设计软件得到的. 应用 TRIzol 试剂制备,可得到高质量总 RNA. 经反复摸索得到 PCR 和 nPCR 扩增最佳退火温度(60 ℃). 获得的足够量 PCR 产物直接测序. 该方法可靠,简便易行. 我们应用该方法进行 FMDV O/PanAsia/10 毒株的全衣壳基因克隆,获得成功.

#### 3.2 FMDV 全衣壳基因及其变异研究

FMDV 的衣壳蛋白基因比较容易变异<sup>[8,9]</sup>. 这是因为环境的免疫压力,病毒变异,可突破免疫屏障. 还有小 RNA 病毒复制没有校对机制,形成高度变异的病毒 RNA 类群. 在 FMDV 衣壳的 4 种结构蛋白中,VP1~VP3 突出在病毒粒子表面,参与构成抗原位点. 但在分离状态下,只有 VP1 能诱导中和抗体. 我们对 FMDV O/PanAsia/10 进行测序和比较,4 种衣壳蛋白基因的核苷酸变异顺序是 VP1 > VP3 > VP2 > VP4. 与不同血清型毒株比较,P1 基因的同源率顺序是 O/PanAsia/10→O/PanAsia/mason→O/Akesu→O1K→Asia 63→C3Arg→A10-61→SAT2.

#### 3.3 FMDV 衣壳蛋白氨基酸一级结构分析

FMDV 的一级结构的氨基酸构成是有差异的<sup>[10-12]</sup>. O/PanAsia/10 株形成的全衣壳大小约  $8.0 \times 10^4$ . 其中 VP1、VP2 和 VP3 的大小相似,约  $2.3 \times 10^4 \sim 2.4 \times 10^4$ . VP1 与 VP2~VP4 不同,它突出在病毒粒子表面,其碱性氨基酸比例较高,形成的等电点有变化约 9.5. 而 VP4 位于病毒粒子内部,其等电点恒定为 3.8. FMDV 衣壳蛋白氨基酸一级结构的差异,会影响病毒的毒力和抗原特性<sup>[13]</sup>.

#### 参考文献:

- [1] KNOWLES N J, SAMUEL A R, DAVIES P R, et al. Outbreak of foot-and-mouth disease virus serotype O in the UK caused by a pandemic strain[J]. Vet Rec, 2001, 148(9): 258-259.
- [2] LOGAN D, ABU-GHAZALEH R, BLAKEMORE W, et al. Structure of a major immunogenic site on foot-and-mouth disease virus[J]. Nature, 1993, 362(6 420): 566-568.
- [3] 张洪勇, 韦 婷, 郑 敏, 等. 口蹄疫病毒衣壳蛋白前体 P1 基因和蛋白酶 3C 基因的克隆及序列分析[J]. 中国生物制品学杂志, 2002, 15(3): 134-137.
- [4] STRAM Y, LAOR O, MOLAD T, et al. Nucleotide sequence of the P1 region of serotype Asia1 foot-and-mouth disease virus[J]. Virus Genes, 1994, 8(3): 275-278.
- [5] REDDY G R, TRATSCHIN J D, NATARAJAN C, et al. Capsid protein-encoding (P1) sequence of foot and mouth disease virus type Asia 1 ind 63/72[J]. Virus Genes, 1999, 18(2): 161-168.
- [6] PATTNAIK B, VENKATARAMANAN R, TOSH C, et al. Genetic heterogeneity of Indian field isolates of foot-and-mouth disease virus serotype O as revealed by partial sequencing of 1D gene[J]. Virus Res, 1998, 55(2): 115-127.
- [7] REID S M, FERRIS N P, HUTCHINGS G H, et al. Detection of all seven serotypes of foot-and-mouth disease virus by real-time, fluorogenic reverse transcription polymerase chain reaction assay[J]. J Virol Methods, 2002, 105(1): 67-80.
- [8] MARTINEZ M A, HERNANDEZ J, PICCONE M E, et al. Two mechanisms of antigenic diversification of foot-and-mouth disease virus[J]. Virology, 1991, 184(2): 695-706.
- [9] MATEU M G, MARTINEZ M A, ROCHA E, et al. Implications of a quasispecies genome structure: effect of frequent, naturally occurring amino acid substitutions on the antigenicity of foot-and-mouth disease virus[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989, 86(15): 5 883-5 887.
- [10] PARRY N, FOX G, ROWLANDS D, et al. Structural and serological evidence for a novel mechanism of antigenic variation in foot-and-mouth disease virus[J]. Nature, 1990, 347(6 293): 569-572.
- [11] ROBERTSON B H, MOORE D M, GRUBMAN M J, et al. Identification of an exposed region of the immunogenic capsid polypeptide VP1 on foot-and-mouth disease virus[J]. J Virol, 1983, 46(1): 311-316.
- [12] TAMI C, KAPLAN G, PICCONE M E, et al. Nucleotide sequence of the P1 region of foot-and-mouth disease virus strain O1 Caseros[J]. Virus Genes, 1997, 14(3): 255-259.
- [13] VERDAGUER N, MATEU M G, ANDREU D, et al. Structure of the major antigenic loop of foot-and-mouth disease virus complexed with a neutralizing antibody: direct involvement of the Arg-Gly-Asp motif in the interaction[J]. EMBO J, 1995, 14(8): 1 690-1 696.

【责任编辑 柴 焰】