

李琪, 谢增胜, 石庆伟, 等. 广东地区口蹄疫病毒 *VP1* 和 *3A* 基因的序列分析[J]. 华南农业大学学报, 2018, 39(3): 13-18.

广东地区口蹄疫病毒 *VP1* 和 *3A* 基因的序列分析

李 琪¹, 谢增胜^{1,2}, 石庆伟¹, 陈 耀¹, 孙彦阔¹, 冯松林¹, 汪 志¹,
冀池海¹, 刘艺兴¹, 邢秀琳¹, 张桂红¹

(1 华南农业大学 兽医学院/广东省动物源性人兽共患病预防与控制重点实验室, 广东 广州 510642;
2 中山广食农牧发展有限公司, 广东 中山 528451)

摘要:【目的】了解广东地区口蹄疫病毒 (FMDV) 的遗传变异情况, 为我国 FMDV 流行病学的研究及防控提供基础数据。【方法】对 2015—2016 年间收集的广东地区猪的病料进行 FMDV *VP1* 和 *3A* 基因的扩增测序和序列分析。【结果】11 株 O 型 FMDV 均属耿马谱系毒株, 7 株 A 型 FMDV 均属 Asia 型毒株。11 株 O 型 FMDV 的 *VP1* 基因与流行毒株相比, GD-MM-3 株与 O/BY/CHA/2010 株序列相似性最高, 为 95.3%; GD-1 株、GD-MM-1 株和 GD-MM-3 株与 O/MYA/1/98 株序列相似性最高, 为 90.8%。7 株 A 型 FMDV 的 *VP1* 基因与流行毒株相比, A/GDMM/CHA/2013 株与 GD-3 株序列相似性最高, 为 99.8%; A/HuBWH/CHA/2009 株与 GD-3 株序列相似性最高, 为 91.4%。11 株 O 型 FMDV 的 3A 蛋白不存在氨基酸的缺失, 7 株 A 型 FMDV 的 3A 蛋白存在较多氨基酸的缺失。【结论】广东部分地区 FMDV 基因型复杂, 预防控制困难。

关键词: 口蹄疫病毒; *VP1* 基因; *3A* 基因; 序列相似性; 遗传变异
中图分类号: S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-411X(2018)03-0013-06

Sequence analysis of *VP1* and *3A* genes of foot-and-mouth disease virus in Guangdong area

LI Qi¹, XIE Zengsheng^{1,2}, SHI Qingwei¹, CHEN Yao¹, SUN Yankuo¹, FENG Songlin¹, WANG Zhi¹,
JI Chihai¹, LIU Yixing¹, XING Xiulin¹, ZHANG Guihong¹

(1 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University/Key Laboratory of Zoonosis Prevention and Control of Guangdong Province, Guangzhou, 510642, China; 2 Zhongshan Guangshi Agriculture and Animal Husbandry Development Company, Zhongshan 528451, China)

Abstract: 【Objective】To analyze the genetic variation of foot-and-mouth disease virus (FMDV) in Guangdong area, and provide fundamental data for studying FMDV infections as well as prevention and control of foot-and-mouth disease. 【Method】We amplified and sequenced *VP1* and *3A* genes of FMDV from pathological samples of pigs in Guangdong area from 2015 to 2016, and analyzed the gene sequences. 【Result】Eleven strains of type O FMDV strains belonged to the social spectrum type strains. Seven type A FMDV strains belonged to the Asia type strains. Comparing the *VP1* genes of the 11 type O FMDV strains with pandemic strains, GD-MM-3 and O/BY/CHA/2010 strains had the highest sequence similarity being 95.3%, while strain GD-1, GD-MM-1 and GD-MM-3 had the highest sequence similarity of 90.8% compared to strain O/MYA/1/98. Comparing the *VP1* genes of 7 type A FMDV strains with pandemic strains, A/GDMM/2013 and

收稿日期: 2018-01-01 优先出版日期: 2018-04-16
优先出版网址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20180416.1031.016.html>
作者简介: 李 琪 (1993—), 男, 硕士研究生, liqi1202@163.com; 通信作者: 张桂红 (1968—), 女, 教授, 博士, E-mail: guihongzh@scau.edu.cn
基金项目: 国家重点研发计划 (2016YFD0500707)

GD-CH-3 strains had the highest sequence similarity being 99.8%, while A/HuBWH/2009 and GD-3 strains had the highest sequence similarity being 91.4%. Amino acid deletion was not found in 3A proteins of 11 type O FMDV strains. The 3A proteins of 7 type A FMDV strains had multiple amino acid deletions. 【Conclusion】 The genotypes of FMDV in part area of Guangdong are complex, which leads to the difficulties of disease prevention and control.

Key words: foot-and-mouth disease virus; *VP1* gene; *3A* gene; sequence similarity; genetic variation

口蹄疫 *Aphtae epizooticae* 是由口蹄疫病毒 *Aphthovirus*(Foot-and-mouth disease virus, FMDV) 引起的一种热性、急性、人畜共患传染病^[1]。该病具有传播速度快、病原变异快、血清型种类多等特点, 加上该病发病率较高, 对我国的畜牧贸易造成了巨大的经济损失。因此, 做好该病的防控具有重要的意义。

FMDV *VP1* 基因的变异程度最大, 编码的 VP1 蛋白是参与形成抗原位点的最主要的机构蛋白。在 FMDV 分型中, 可以通过分析 *VP1* 基因的核苷酸序列差异建立遗传进化树来进行分型。*3A* 基因是一种膜相关蛋白, 其 C 段易突变, 在病毒 RNA 的复制中起重要作用^[2]。*3A* 蛋白的氨基酸变化与 FMDV 的宿主嗜性及毒力相关。分析 *3A* 蛋白的遗传变异趋势, 有可能预测病毒在宿主范围和毒力方面的变化^[3]。本研究通过对广东部分地区 FMDV 进行抗体检测和对 *VP1* 和 *3A* 基因进行序列分析, 旨在丰富广东地区 FMDV 流行病学资料, 为临床上不同疫苗毒株的选择提供参考信息。

1 材料与方法

1.1 病料来源

18 份临床样品采集自广东省 2015—2016 年临床症状疑似 FMDV 感染的猪蹄部水泡液。

1.2 主要试剂

Ex *Taq* DNA 聚合酶、AMV 反转录酶、DL2000 Marker、pMD18-T 载体均购自宝生物工程(大连)有限公司; TRIzol 试剂盒购自 Invitrogen 公司; DNA 凝胶回收试剂盒购自 Omega 公司; DH-5 α 感受态细胞均购自北京全式金生物技术有限公司。

1.3 引物设计

根据 GenBank 中发表的 FMDV 基因组序列, 设计扩增 FMDV *VP1*(835 bp) 和 *3A* 基因(830 bp) 的引物, 包括 VP1-F: 5'-GTGCGGCAARCACTTTGA-3'; VP1-R: 5'-CACATGTTCTCTTGCATCTG-3'; 3A-F: 5'-ACGACGTCYCARTACGTT-3'; 3A-R: 5'-ACCTTCAAAGTGACAGGYT-3'。引物由英潍捷

基(上海)贸易有限公司合成。

1.4 基因扩增和克隆

将采集的病料浸出液, 按照 TRIzol Reagent RNA 提取试剂盒的使用说明书操作, 提取病毒总 RNA^[4]。以其为模板, 采用 MLV 反转录酶进行反转录制备 cDNA。以 cDNA 为模板, VP1-F/R 与 3A-F/R 为引物, 合成 *VP1* 基因与 *3A* 基因。参数为: 95 $^{\circ}$ C 4 min, 1 个循环; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 54 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物进行回收纯化^[5]。克隆于 pMD18-T 载体中, 阳性重组质粒送英潍捷基(上海)贸易有限公司测序。

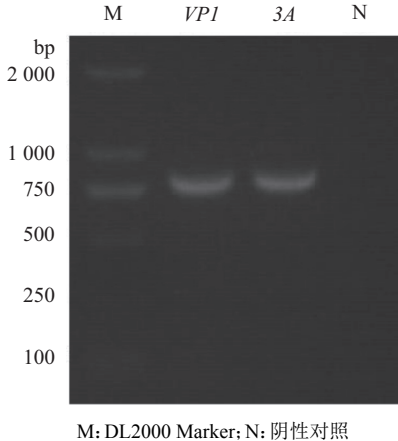
1.5 序列分析

参考 GenBank 登录的国内外 FMDV 参考病毒株序列^[6]和 NCBI Blast 结果, 利用 DNASTar、ClustalX、MEGA5.1、MegAlign 软件对不同病毒株的 *VP1* 和 *3A* 基因序列进行比较分析, 绘制基于 *VP1* 和 *3A* 基因的 FMDV 遗传进化树^[7]。

2 结果与分析

2.1 *VP1* 和 *3A* 基因片段的扩增

用针对 *VP1* 和 *3A* 基因特异性的引物对临床采集的具有水泡症状的样品(水泡液及水泡皮)进行 RT-PCR 验证, 所扩增的 *VP1* 和 *3A* 基因与预期长度一致^[8](图 1)。



M: DL2000 Marker; N: 阴性对照

图 1 *VP1* 和 *3A* 基因的 RT-PCR 扩增产物
Fig. 1 The RT-PCR amplification products of *VP1* and *3A* genes

2.2 VP1 基因的联机检索

将 VP1 基因序列用 NCBI Blast 进行联机检索,结果显示 7 个分离株属于 A 型毒株,包括 GD-MC-1、GD-MC-2、GD-ZS-1、GD-ZS-2、GD-CH-1、GD-3 和 GD-4; 11 个分离株属于 O 型毒株^[9],包括 GD-MM-1、GD-MM-2、GD-MM-3、GD-MM-4、GD-MM-5、GD-MM-6、GD-QY-1、GD-JM-1、GD-1、GD-2 和 GD-KPYC。

2.3 O 型 FMDV VP1 和 3A 基因的序列分析

2.3.1 基于 VP1 基因的 O 型 FMDV 遗传进化分析

基于 VP1 基因序列,用 MEGA 6.0 软件对 2015—2016 年 11 株 O 型 FMDV 与其他 11 株 FMDV 的参考株进行了遗传进化分析(图 2),结果表明 11 株 O 型 FMDV 均在 ESA 分支上,均属耿马谱系毒株。GD-1 株和 GD-2 株与 O/GZ/CHA/2010 株遗传进化关系较近。

2.3.2 O 型 FMDV VP1 基因序列相似性分析 对 2015—2016 年 11 株 O 型 FMDV 的 VP1 基因,用 DNASTar 软件与其他 11 株 FMDV 的参考株进行了

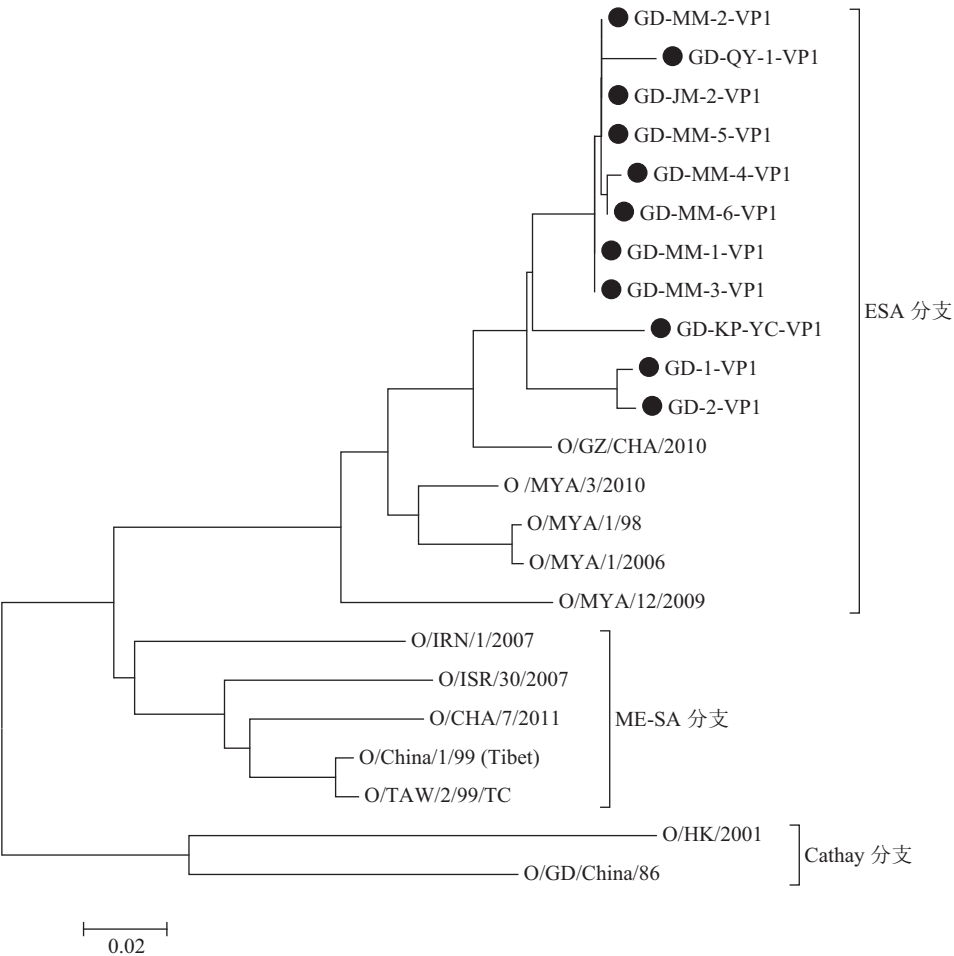
序列比对分析,结果表明 11 株 O 型 FMDV 的 VP1 基因之间的序列相似性为 95.3%~99.8%。O/BY/CHA/2010 株与 GD/MM/3 株序列相似性最高,为 95.3%。O/MYA/1/98 株与 GD/1 株、GD/MM/1 株和 GD/MM/3 株序列相似性最高,为 90.8%。这 11 株 O 型 FMDV 与 O/HK/2001 株序列相似性较低,为 75.4%~78.2%。

2.3.3 O 型 FMDV VP1 蛋白氨基酸位点变异性分析

对 2015—2016 年 11 株 O 型 FMDV 的 VP1 蛋白,用 MegAlign 软件进行氨基酸位点变异性分析,用 O/MYA/1/98 株作为 FMDV 的参考株。结果表明,O 型 FMDV 的 VP1 蛋白的高突变区分布在 47~51、153~156 aa。

2.3.4 基于 3A 基因的 O 型 FMDV 遗传进化分析

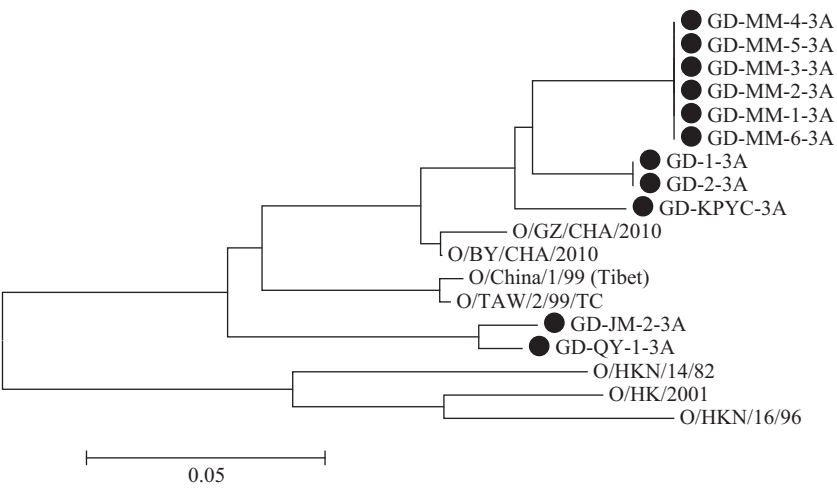
基于 3A 基因序列,用 MEGA 6.0 软件对 2015—2016 年 11 株 O 型 FMDV 与其他 7 株 FMDV 的参考株进行了遗传进化分析(图 3),结果表明 11 株 O 型 FMDV 分为 2 个分支,其中有 9 株与 O/BY/CHA/2010 株在 1 个分支;另外 2 株与 O/TAW/



带有实心圆形标记的序列为本试验测得的序列,其他序列源于 GenBank^[6]

图 2 基于 VP1 基因的 O 型 FMDV 的遗传进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of the nucleotide sequence of type O FMDV based on VP1 gene



带有实心圆形标记的序列为本试验测得的序列, 其他序列源于 GenBank^[6]

图 3 基于 3A 基因的 O 型 FMDV 的遗传进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of type O FMDV based on 3A gene

2/99/TC 株分布在 1 个分支。11 株 FMDV 的 3A 基因均不存在缺失。

2.3.5 O 型 FMDV 3A 基因序列相似性分析 对 2015—2016 年 11 株 O 型 FMDV 的 3A 基因, 用 DNASTar 软件与其他 7 株 FMDV 的参考株进行了序列比对分析, 结果表明 11 株 O 型 FMDV 的 3A 基因之间的序列相似性为 87.1%~98.0%。O/BY/CHA/2010 株与 GD-1 株和 GD-2 株的序列相似性最高, 为 95.2%。O/GZ/CHA/2010 株与 GD-1 株和 GD-2 株序列相似性最高, 为 93.9%。

2.3.6 O 型 FMDV 3A 蛋白氨基酸位点变异性分析 对 2015—2016 年 11 株 O 型 FMDV 的 3A 蛋白, 用 MegAlign 软件进行氨基酸位点变异性分析, 用 O/BY/CHA/2010 株作为 FMDV 的参考株。结果表明, Cathay 分支上的毒株出现氨基酸的缺失, 因此 FMDV 也可以按是否出现氨基酸缺失分为 2 个组群, 即第 I 组群为新毒株谱系毒株, 第 II 组群为耿马谱系新毒株和泛亚谱系毒株。O 型 FMDV 的 3A 蛋白的高突变区分布在 125~152 aa。

2.4 A 型 FMDV VP1 和 3A 基因的序列分析

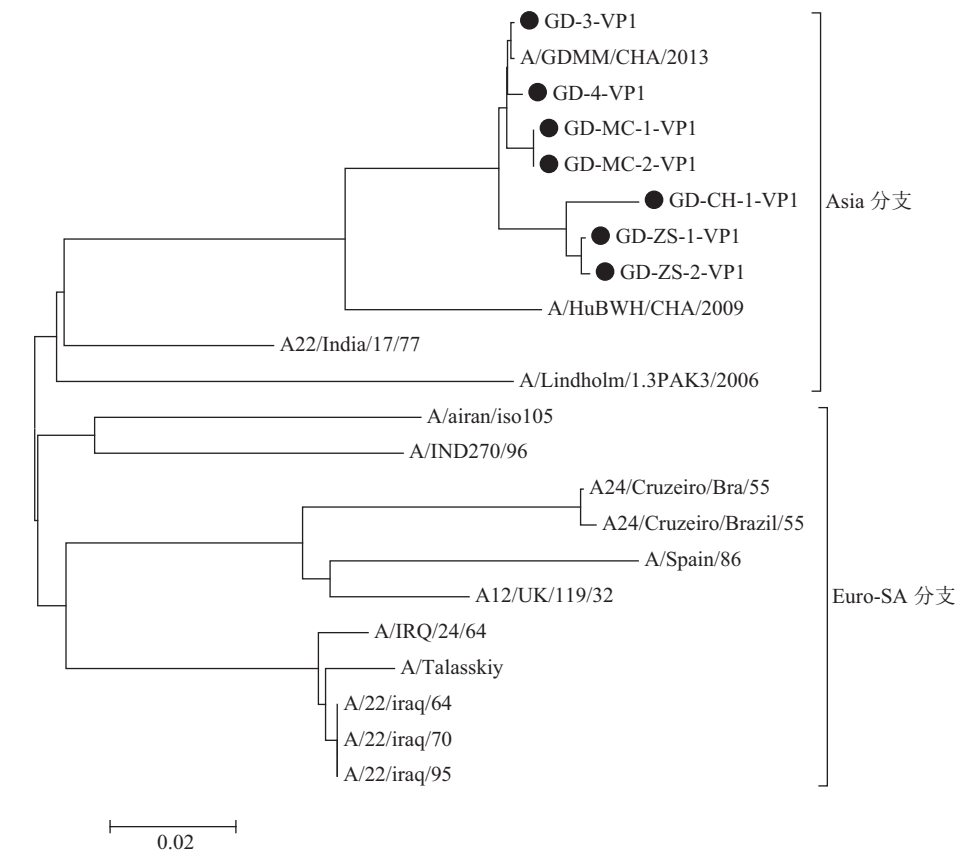
2.4.1 基于 VP1 基因的 A 型 FMDV 遗传进化分析 基于 VP1 基因序列, 用 MEGA 6.0 软件对 2015—2016 年 7 株 A 型 FMDV 与其他 15 株 FMDV 的参考株进行了遗传进化分析 (图 4), 结果表明, 这 7 株 A 型 FMDV 与 A/GDMM/CHA/2013 株、A/HuBWH/CHA/2009 株在同一个大分支上, 均属 Asia 型毒株。这 7 株 A 型 FMDV 中 GD-3 株与 A/GDMM/CHA/2013 株的遗传进化关系最近。A/HuBWH/CHA/2009 株与这 7 株 A 型 FMDV 的遗传进化关系相对较远。

2.4.2 A 型 FMDV VP1 基因序列相似性分析 对 2015—2016 年 7 株 A 型 FMDV 的 VP1 基因, 用 DNASTar 软件与其他 7 株 FMDV 的参考株进行了序列比对分析, 结果表明, 7 株 A 型 FMDV 的 VP1 基因之间的序列相似性为 95.6%~99.7%。A/GDMM/CHA/2013 株与 GD-3 株的序列相似性最高, 为 99.8%; A/GDMM/CHA/2013 株与 GD-CH-1 株的序列相似性最低, 为 96.4%。A/HuBWH/CHA/2009 株与 GD-3 株的序列相似性最高, 为 91.4%; A/HuBWH/CHA/2009 株与 GD-CH-1 株的序列相似性最低, 为 88.4%。

2.4.3 A 型 FMDV VP1 蛋白氨基酸位点变异性分析 对 2015—2016 年 7 株 A 型 FMDV 的 VP1 蛋白, 用 MegAlign 软件进行氨基酸位点变异性分析, 用 A/GDMM/CHA/2013 株作为 FMDV 的参考株。结果表明, FMDV VP1 蛋白的高突变区分布在 43~47、138~143、151~156、163~173 aa。

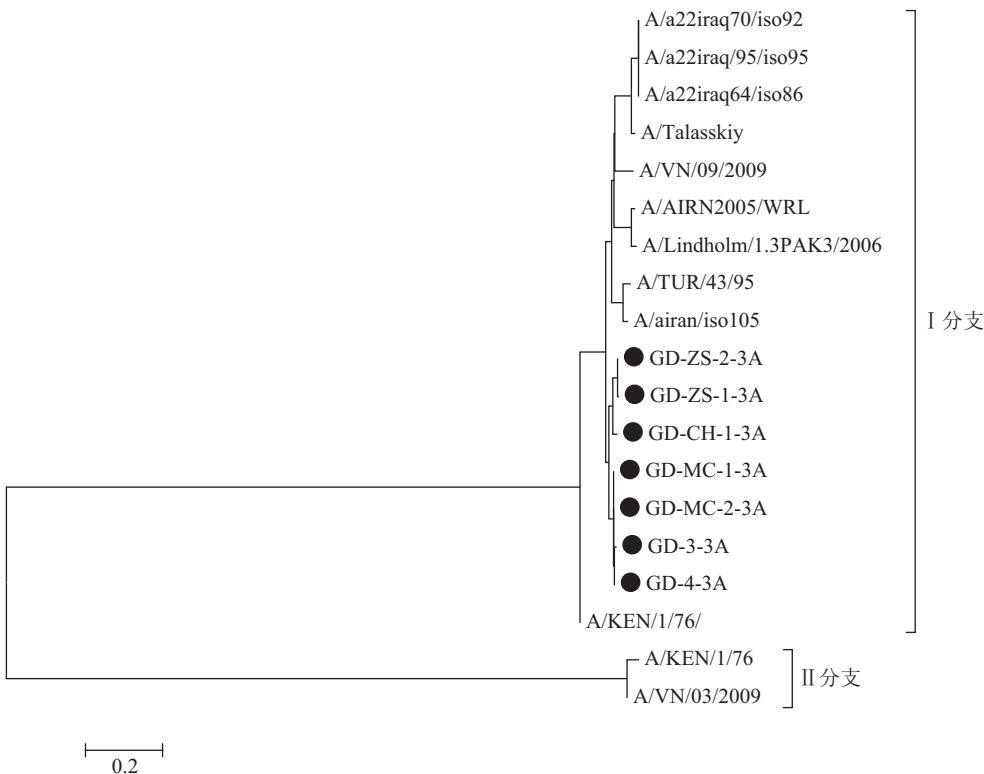
2.4.4 基于 3A 基因的 A 型 FMDV 遗传进化分析 基于 3A 基因序列, 用 MEGA 6.0 软件对 2015—2016 年 7 株 A 型 FMDV 与其他 12 株 FMDV 的参考株进行了遗传进化分析 (图 5), 结果表明, 这 7 株 A 型 FMDV 与参考株分成了 2 个组群, 根据这 7 株 A 型 FMDV 氨基酸位点变异性分析可知, 本次检测的 7 株 A 型 FMDV 均属于 I 型毒株, 即 3A 基因有 22 个碱基缺失, 而 II 型毒株的 3A 基因只有 3 个碱基连续缺失。

2.4.5 A 型 FMDV 3A 基因序列相似性分析 对 2015—2016 年 7 株 A 型 FMDV 的 3A 基因, 用 DNASTar 软件与其他 12 株 FMDV 的参考株进行了序列比对分析, 结果表明, 7 株 A 型 FMDV 的



带有实心圆形标记的序列为本试验测得的序列, 其他序列来源于 GenBank^[6]

图 4 基于 *VP1* 基因的 A 型 FMDV 的遗传进化树
Fig. 4 Phylogenetic tree of type A FMDV based on *VP1* gene



带有实心圆形标记的序列为本试验测得的序列, 其他序列来源于 GenBank^[6]

图 5 基于 *3A* 基因的 A 型 FMDV 的遗传进化树
Fig. 5 Phylogenetic tree of type A FMDV based on *3A* gene

3A 基因之间的序列相似性为 96.1%~99.8%。A/airan/iso105 株与 GD-MC-1 株和 GD-MC-2 株的序列相似性最高, 为 92.8%; A/airan/iso105 株与 GD-ZS-1 株和 GD-MC-2 株的序列相似性最低, 为 90.4%。这 7 株 A 型 FMDV 的 3A 基因与 A/VN/03/2009 株和 A/VN/03/2009 的序列相似性较低, 为 41.7%~42.8%。

2.4.6 A 型 FMDV 3A 蛋白氨基酸位点变异性分析
对 2015—2016 年 7 株 A 型 FMDV 的 3A 蛋白, 用 MegAlign 软件进行氨基酸位点变异性分析, 用 A/TUR/43/95 株作为 FMDV 的参考株。结果同样表明, 7 株 A 型 FMDV 均属 I 型毒株, 其 3A 蛋白氨基酸存在较多缺失。II 型毒株的 3A 蛋白只有 1 个氨基酸的缺失。

3 讨论与结论

2015—2016 年间检测到的 11 株 O 型 FMDV 属于耿马谱系, 与历年流行毒株相似性均低于 95%。氨基酸突变位点集中于 138~139, 153~156 aa, 位于 RGD 两侧决定病毒感染细胞特性的关键区域^[10]。O 型 FMDV 的 3A 基因未发现氨基酸缺失。7 株 A 型 FMDV 同属于 Asia 型, 变异程度相对较低, 为 96.4%~99.8%, 氨基酸变异同样包括了 RGD 两侧的 138~139, 153~156 aa 区域^[11]。7 株 A 型口蹄疫 3A 基因均出现了不同程度的缺失。

华南地区在 2010 年以前, 口蹄疫流行毒株均为新毒株谱系或泛亚谱系, 2010 年后耿马谱系毒株在广东猪群大规模流行^[12]。石庆伟等^[13]于 2014 年检出 2 株 O 型耿马系 FMDV 和本研究检出的 11 株 O 型耿马系 FMDV 突变程度大, 说明了广东地区耿马系毒株开始大规模流行。A 型口蹄疫近年来被官方报道流行于新疆、西藏和云南等地^[14]。石庆伟等^[13]于 2014 年检出 3 株 A 型口蹄疫, 2015—2016 年检测到 7 株 A 型 FMDV, A 型毒株在广东地区同样呈现流行趋势。广东部分地区口蹄疫病毒基因型复杂基因变异情况复杂, 原有基因型 FMDV 未得到有效控制, 新发基因型相继流行, 由此导致广东地区 FMDV 预防控制困难^[15]。

本研究通过对 FMDV 遗传进化分析为我国 FMDV 流行病学的研究提供了基础数据, 同时为临床上不同型疫苗的选择提供依据。

参考文献:

[1] 陈豪泰, 张杰, 孙德惠, 等. 口蹄疫病毒基因组的遗传变异剖析[J]. 中国农业科学, 2008, 41(9): 2826-2834.
[2] 董志强, 张志, 李晓成, 等. 口蹄疫检测技术研究进展[J]. 中国动物检疫, 2007, 24(3): 48-50.
[3] 雷连成, 陈伟, 韩文瑜, 等. 家畜口蹄疫研究进展[J]. 中国预防兽医学报, 2001, 23(4): 77-80.
[4] 李光金, 严维耀, 徐泉兴, 等. 以猪 IgG 重链恒定区为抗原载体的抗口蹄疫病毒 DNA 疫苗的研制[J]. 生物工程学报, 2001, 17(3): 322-324.
[5] 卢永干. 用口蹄疫非结构蛋白鉴别康复动物与注射疫苗动物的研究及应用[J]. 中国兽医科技, 2000, 30(10): 18-20.
[6] ANDINO R, RIECKHOF G E, BALTIMORE D. A functional ribonucleoprotein complex forms around the 5' end of poliovirus RNA[J]. Cell, 1990, 63(2): 369-380.
[7] 马鸣潇, 金宁一, 刘慧娟, 等. 口蹄疫病毒复合多表位 DNA 疫苗的设计及构建[J]. 中国生物制品学杂志, 2007, 20(3): 190-194.
[8] 马鸣潇, 金宁一, 沈国顺, 等. O 型口蹄疫病毒 O/LZ 株拯救[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(3): 333-336.
[9] 王建东, 郭建宏, 杨春生, 等. 基因芯片技术及口蹄疫病毒基因芯片研究进展[J]. 动物医学进展, 2007, 28(z1): 37-40.
[10] BAHNEMANN H G. Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production[J]. Arch Virol, 1975, 47(1): 47-56.
[11] BARANOWSKI E, RUIZ-JARABO C M, SEVILLA N, et al. Cell recognition by foot-and-mouth disease virus that lacks the RGD integrin-binding motif: Flexibility in aphthovirus receptor usage[J]. J Virol, 2000, 74(4): 1641-1647.
[12] SUMMERFIELD A, GUZYLACK-PIRIOU L, HARWOOD L, et al. Innate immune responses against foot-and-mouth disease virus: Current understanding and future directions[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2009, 128(1/2/3): 205-210.
[13] 石庆伟, 冯嘉萍, 陈耀, 等. 5 株口蹄疫病毒 VP1 和 3A 基因的序列分析[J]. 中国预防兽医学报, 2016, 38(8): 609-613.
[14] BARTON D J, FLANEGAN J B. Synchronous replication of poliovirus RNA: Initiation of negative-strand RNA synthesis requires the guanidine-inhibited activity of protein 2C[J]. J Virol, 1997, 71(11): 8482-8489.
[15] BARTON D J, O'DONNELL B J, FLANEGAN J B. 5' cloverleaf in poliovirus RNA is a cis-acting replication element required for negative-strand synthesis[J]. EMBO J, 2001, 20(6): 1439-1448.

【责任编辑 庄 延】