

口蹄疫病毒 G-01 株基因组编码区的序列分析

索青利, 赵明秋, 陈金顶, 陈立军, 黄忠强

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:参考 GenBank 中注册的 O 型口蹄疫病毒(FMDV)全基因序列,分段设计了 9 对引物,应用 RT-PCR 方法对 G-01 株的基因组编码区序列进行了克隆和序列测定,获得了该毒株基因组编码区的核苷酸序列(6 966 bp)并推导出其编码的氨基酸序列(2 322 aa)。将获得的 G-01 株基因组编码区的核苷酸序列与参考的 14 株 FMDV 基因序列进行比较,结果表明,本毒株的 3A 蛋白的 92~101 位缺失 10 aa,VP1 基因的 133~160 位的关键位点没有变化,该毒株与以 HKN/2002 株为代表的 7 株 O 型毒株的同源性较高,与 HKN/2002 株遗传关系最近,而与另外 7 株 O 型毒株同源性较低,其遗传关系也较远。由此推断 G-01 与 HKN/2002 株属于遗传关系较近的毒株,这 2 株病毒有着相同的进化起源。

关键词:口蹄疫病毒;基因组编码区;序列分析

中图分类号:S852.65

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2007)04-0095-05

Sequence Analysis of Genomic Coding Region of Foot-and-Mouth Disease Virus G-01

SUO Qing-li, ZHAO Ming-qiu, CHEN Jin-ding, CHEN Li-jun, HUANG Zhong-qiang

(College of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The nucleotide sequence of the coding region of foot-and-mouth-disease virus (FMDV) strain G-01 was determined via RT-PCR amplification, using 9 pairs of specific primers, which were designed according to the full-length genomic sequence of FMDV serotype O registered in the GenBank. Comparison of the nucleotide sequence and its deduced amino acid sequence with those of other 14 isolates revealed that G-01 was most closely related to 7 serotype O strains, and especially showed significant similarity with HKN/2002 found in Hong Kong. In contrast, the similarity of the comparable region in the other 7 strains was much lower, suggesting that they share less identity. Since G-01 appears to be most closely related to HKN/2002, it is proposed that these two strains share a common ancestor.

Key words: foot-and-mouth disease virus(FMDV); genetic coding region; sequence analysis

口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)引起的一种急性、热性、高度接触性传染病,偶蹄动物是其易感动物。该病以皮肤和粘膜形成水疱和烂斑为其病变特征,呈世界性分布,具有流行快、传播广、发病

率高、死亡率低,难以控制和消灭等特点。FMD 的危害之大是举世瞩目的,它不仅表现在因病畜死亡、生产力下降及控制疫情等所耗费用而造成的直接经济损失,更大的危害在于被感染动物的经济价值完全丧失,畜产品贸易完全断绝,未发生疫情的国家坚

收稿日期:2007-01-21

作者简介:索青利(1974—),女,硕士;通讯作者:赵明秋(1965—),女,助理研究员,E-mail:zmingqiu@21cn.com

基金项目:广东省自然科学基金(020995;06025827);广东省科技计划项目(2005B20201006);广东省自然科学基金创新团队项目(5200638)

决禁止从发病国进口畜产品,从而导致发病国的畜牧业经济发展蒙受重大损失. 世界动物卫生组织(OIE)根据 FMD 的危害及重大影响,以往将其列为 A 类传染病之首,现作为国际贸易必查和 OIE 成员国必报的疫病. FMDV 可分为 7 个血清型(A、O、C 型、SAT1、SAT2、SAT3 和 Asia I 型)^[1-3],O 型是 7 个血清型中最主要的一种,广泛分布于世界上许多国家^[4-5],目前我国流行的主要是 O 型和 Asia I 型.

FMDV 属于小 RNA 科口蹄疫病毒属,为单股正链 RNA 病毒,其基因组由约 8 500 个核苷酸组成,只含有一个全长约为 6 969 bp 的 ORF (Open reading frame). ORF 由结构蛋白基因 (VP1、VP2、VP3 和 VP4) 和非结构蛋白基因 (L、2A、2B、2C、3A、3B1、3B2、3B3、3C 和 3D) 组成^[6]. FMDV 基因组的一级结构是开展后续工作的基础. 目前国内外已经获得了数十个分离株的全基因组序列,从而积累了大量各型 FMDV 基因组的资料^[7-8]. 但这些研究主要集中在部分基因序列分析,特别是 VP1 基因的功能研究,而对全基因组序列研究较少. 本研究对 FMDV G-01 株的基因组编码区序列进行了克隆和序列测定,得到了该毒株基因组编码区全部核苷酸序列并推导出氨基酸序列,并对得到的序列进行了分析,同时建立了核苷酸遗传系统发育树,籍此为 FMD 的分子流行病学研究、病毒各基因的功能研究等奠定基础,为科学地防控 FMD 提供依据.

1 材料与方法

1.1 材料

FMDV G-01 株和仓鼠肾细胞(BHK-21)由华南农业大学兽医微生物学实验室保存.

1.2 方法

1.2.1 病毒 RNA 的提取、RT-PCR、目的基因的克隆与序列测定 病毒 RNA 的提取按 Gibco BRL 公司 TRIzol LS Reagent RNA 提取试剂盒使用说明书进行. 反转录参照 Invitrogen 公司的 SUPERSCRIPTM II 反转录酶使用说明,采用 Random primer 和 Oligo (dT)₁₈ 进行. 将反转录出的 cDNA 链做模板用设计的 9 对引物进行 PCR 扩增,PCR 反应程序如下: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s; 50 °C 45 s; 72 °C 1 min; 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 30 min. PCR 产物用 DNA 回收试剂盒(杭州维特洁生化公司)回收后克隆至 pMD18-T 载体 (TaKaRa),阳性克隆交由上海生物工程公司进行序列测定.

1.2.2 目的基因的核苷酸序列测定和比较 将获得的涵盖 FMDV 基因组编码区的核苷酸序列与 National Center for Biotechnology Information (NCBI website: www.ncbi.nlm.nih.gov) 中注册的相关毒株(表 1)的核苷酸序列进行序列分析和比较. 核苷酸和氨基酸的同源性分析利用 DNASTAR 软件^[9]. 系统发育树的建立利用 DNAMAN Version 5.2.2 软件^[8].

表 1 G-01 毒株及从 GenBank 中选择的参考毒株¹⁾

Tab. 1 G-01 and reference FMDV strains selected from GenBank

编号 serial number	基因序列号 GenBank accession No.	血清型 serotype	毒株名 strain name	分离动物 host	采集时间 year of isolation	采集地点 place of origin
A	—	O	G-01	猪	—	—
B	AY3170981	O	HKN/2002	猪	2002	中国香港
C	AY593835	O	otaiwan97 iso106/112	猪	1997	中国台湾
D	AF154271	O	Tau-YuanTW97	猪	1997	中国台湾
E	AY593833	O	openghu iso108	?	1999	中国台湾
F	AF308157	O	Yunlin	猪	1997	中国台湾
G	AF026168	O	Chu-pei	猪	1997	中国台湾
H	AY686687	O	O/ES/2001	?	2001	?
I	AJ539137	O	TAW/2/99 BOV	牛	1999	中国台湾
J	AJ539138	O	Tibet/CHA/99	牛	1999	中国西藏
K	AJ539136	O	TAW/2/99 TC	牛	1999	中国台湾
L	AJ539141	O	UKG/35/2001	猪	2001	英国
M	AJ633821	O	FRA/1/2001	牛	2001	法国
N	AJ539140	O	SAR/19/2000	牛	2000	南非
O	AJ539139	O	SKR/2000	牛	2000	南朝鲜

1)“?”表示数据不详;“—”表示本研究毒株

2 结果与分析

2.1 基因组编码区的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

利用 DNASTAR 软件辅助分析,对所测定的序列进行拼接整理,成功获得了该毒株的基因组编码区核苷酸序列,并推导出氨基酸序列(具体序列略),除了终止密码子外,该毒株的 ORF 区核苷酸序列全长 6 966 bp,编码 2 322 aa. 根据 FMDV 基因组编码区结构的常规划分,获取该毒株的 *L*、*VP4*、*VP2*、*VP3*、*VP1*、*2A*、*2B*、*2C*、*3A*、*3B*、*3C* 和 *3D* 基因的核苷酸序列,其大小分别为 603 bp、255 bp、654 bp、660 bp、633 bp、54 bp、462 bp、954 bp、429 bp、213 bp、639 bp 和 1 410 bp;并推导出各片段基因编码的氨基酸序列,其大小分别为 201 aa、85 aa、218 aa、220 aa、211 aa、18 aa、154 aa、318 aa、143 aa、71 aa、213 aa 和 470 aa.

2.2 基因组编码区的序列比较和分析

利用 DNASTAR、DNAMAN Version 5. 2. 2 软件,对 G-01 的核苷酸序列及推导的氨基酸序列与 14 株 O 型参考毒株(见表 1)编码区各基因片段的核苷酸及氨基酸序列进行比较. 结果表明,该毒株 *L*、*VP4*、*VP2*、*VP3*、*VP1*、*2A*、*2B*、*2C*、*3A*、*3B*、*3C* 和 *3D* 基因均

与 HKN/2002 毒株的相似性最高,分别为 96. 0%、96. 1%、94. 5%、95. 9%、95. 4%、100%、97. 2%、96. 4%、96. 7%、98. 1%、96. 6% 和 96. 4%,氨基酸序列相似性虽然略有变化,但同样可得出与上述相似的结论.

比较发现:*VP4*、*VP2*、*VP3*、*2A*、*2B*、*2C*、*3B*、*3C* 和 *3D* 基因较为保守(>90%),但 *L*、*VP1* 和 *3A* 基因同源性较低,尤其是 *VP1* (<80%). *3D* 基因编码 RNA 依赖 RNA 聚合酶,该酶作用的严格性与忠实性决定了 *3D* 的变异情况^[10-11],此外 *3C* 蛋白催化三联体 His-46、Asp-84 和 Cys-163 也未发生变异,与已报道的 *3C* 蛋白酶的活性残基吻合^[12-13]. *L* 基因位于 ORF 的 5'端,它有 2 个启动子,编码着 2 个重叠蛋白 Lab 和 Lb^[14],G-01 株的 *L* 基因有 87 处核苷酸发生了明显的替换,但多为 A-G、A-C 和 T-C 转换;有 22 个氨基酸发生了明显变异,氨基酸的高变区主要集中在 68~89 位,其他的变异散在分布. 变异主要发生在 *3A* 基因,*3A* 基因核苷酸于 276~305 位缺失 30 个核苷酸,氨基酸于 92~101 位缺失 10 aa,*3A* 蛋白的第 76~108 位和第 127~147 位这 2 个区域的氨基酸替换非常频繁(图 1),此外,*3A* 片段其他区域的氨基酸也存在着大量散在的或连续的替换.

病毒编号

virus number

A	61	I VALCLTLLANIVIMLRQARKRRQSVDDPLDG.....DITLGDAEKNPLETSGAS	110
B	61	-----SP-S-----G-----	110
C	61	V-----Y-----V-----	110
D	61	V-----y-----v-----	110
E	61	V-----y-----v-----Q-----	110
F	61	V-----y-----v-----	110
G	61	V-----y-----VA-----A--	110
H	61	-----S-----E-----GV-----E-----	110
I	61	-----I-ET--Q-M---AVNEYIEKASITTD-K--DE-----T	120
J	61	-----I-ET--Q-M---AVNEYIEKANITTD-K--DE-----A	120
K	61	-----I-ET--Q-M---AVNEYIEKASITTD-K--DE-----T	120
L	61	-----I-ET--Q-M---AVNEYIEKANITTD-K--DE-----T	120
M	61	-----I-ET--Q-M---AVNEYIEKANITTD-K--DE-----T	120
N	61	-----I-ET--Q-M---AVNEYIEKANITTD-K--DE-----T	120
O	61	V-----I-ET--Q-M---AVNEYIEKANITTD-K--DE-----T	120
A		AVGFRERSPTQETCEDANAEPVVLGREQPRAE	143
B		-----p-----F-----	143
C		-----G-R-----F-----	143
D		-----G-R-----F-----	143
E		-----G-R-----F-----	143
F		-----G-R-----F-----	143
G		-----G-R-----F-----	143
H		-----A--G-R-----G	143
I		T----KTLPGHKASD-V-S--AKPVE---Q--	153
J		T----KTLPGHKASD-V-S--AKPVE---Q--	153
K		T----KTLPGHKASD-V-S--AKPVE---Q--	153
L		T----KTLPGHKASD-V-S--AKPVE---Q--	153
M		T----KTLPGHKAGD-V-S--AKPVE---Q--	153
N		T----KTLPGHKAGD-V-S--TKPVE---Q--	153
O		T----KTLPGHKASD-V-S--AKPAE---Q--	153

图 1 O 型 FMDV 不同毒株 3A 基因氨基酸序列(61~153)比较

Fig. 1 Comparison of 3A amino acids sequence among FMDV strains serotype O

在 FMDV 中 VP1 是最重要的结构蛋白^[3],它不仅具有结合细胞受体的功能,而且还是 FMDV 的抗原/血清型的决定因子^[14]. 抗原位点研究证明:O 型 FMDV 有 5 个抗原位点,其中有 3 个位于 VP1 上,1 个位于 VP2,1 个位于 VP3^[15]. VP1 的 141~160 和 200~213 位氨基酸残基组成 FMDV 的主要抗原区,能诱导动物产生中和抗体^[15]. 由 VP1 第 140~182 位的约 10 个氨基酸残基组成的 G-H 环突出于病毒衣壳的表面,其顶部形成了一个高度保守的 arginine-glycine-aspartate (RGD)^[13]基列(图 2), RGD 是病毒同细胞受体相结合的主要位点,为病毒感染细胞的关键,也是中和抗体主要结合的位点^[15]. RGD 序列

两侧的序列则高度可变,抗原位点 1 的 1D GH 环 133~158 和 200~211 氨基酸变异明显,但是就 O 型 FMDV 来说,其抗原位点 1 的关键氨基酸 144(V)、147(D)、148(L)、154(K)和 208(P),抗原位点 3 的关键氨基酸 43(P)、44(T)和抗原位点 5 的关键氨基酸 149(Q)均未改变. VP1 的结构与功能研究证明,由于 VP1 突出于病毒粒子的表面,承受的选择压力最大,使得 VP1 基因最容易发生变异,其变异常可导致毒株抗原性的变化,给 FMD 的防治造成困难. 因此 VP1 最能代表 FMDV 在免疫原性和遗传性方面的特点,在口蹄疫研究中倍受关注.

病毒编号 virus number	血清型 serotype	133	RGD and G-H loop	160
A	O	CSKYGDTSTNNV*	RGD* L* QVLAQK*	AERTLP
B	O	S-----	RGD -	---A--
C	O	S-----	RGD -	-----
D	O	S-----	RGD -	-----
E	O	S-----	RGD -	-----
F	O	S-----	RGD -	-----
G	O	S-----	RGD -	-----
H	O	S-----	RGD -	-----
I	O	NC---ESPVT--	RGD -	-----
J	O	NC---ESPVT--	RGD -	-----
K	O	NC---ESPVT--	RGD -	-----
L	O	NC---ESPVT--	RGD -	-----
M	O	NC---ESPVT--	RGD -	-----
N	O	NC---ESPVT--	RGD -	-----
O	O	NC---EGPVT--	RGD -	-----

图 2 VP1 的主要抗原位点 133~160 位的氨基酸序列比较 (*表示关键的氨基酸位点)

Fig. 2 Comparison of amino acids sequence of major antigenic sites in VP1 (*:represents the key amino acid sites)

2.3 FMDV 基因组编码区系统发育树的建立

将本研究测序毒株的基因组编码区核苷酸序列与 GenBank 中注册毒株(见表 1)的基因组编码区的核苷酸序列进行比较,建立系统发育树. 由系统发育树可以看出:15 株 O 型 FMDV,明显地分成 2 枝(图 3). G-01 株与以 HKN/2002 株为代表的香港和台湾的 7 个毒株(Group-B)同在一枝(同源性在 91% 以上),与香港 HKN/2002 株遗传关系最近(其同源性在 98.5% 以上). 与另外一个亚枝 7 个毒株(Group-A)的遗传关系相对较远(同源性不到 85%).

3 讨论

口蹄疫病毒是一种危害严重的病原. 国内外相继开展了不同地区和血清型 FMDV 基因组研究. 本研究完成了 G-01 毒株基因编码区 9 个 cDNA 片段的序列测定. 各片段序列拼接后,组成了 ORF 区基因组核酸序列,并推导了氨基酸序列. 除了终止密码子外,ORF 区核苷酸序列全长 6 966 bp,编码 2 322 aa. 本研究对所测 G-01 株的核苷酸和氨基酸序列进行了分析,并建立了基因组编码区的系统发育树,结果显示,G-01 的核苷酸和氨基酸序列与 HKN/2002 都有较高的相似性,进化分析也表明 G-01 与 HKN/2002 株属于遗传关系较近的毒株.

研究发现 3A 蛋白与病毒的毒力和宿主嗜性有关^[9,13],由于 3A 的氨基酸替换和缺失几乎全部发生在后半段(76~151 位),而前半段高度保守,因此有报道推测 3A 蛋白的前半段维持着病毒的基础毒力,而后半段决定毒株的宿主嗜性,其中第 76、78、83、85、107、108、120、121 和 151 位点氨基酸的替换也与毒株宿主嗜性改变有关. 不过有报道指出 3A 蛋白的第 44 位氨基酸也可以介导病毒对宿主嗜性^[16].

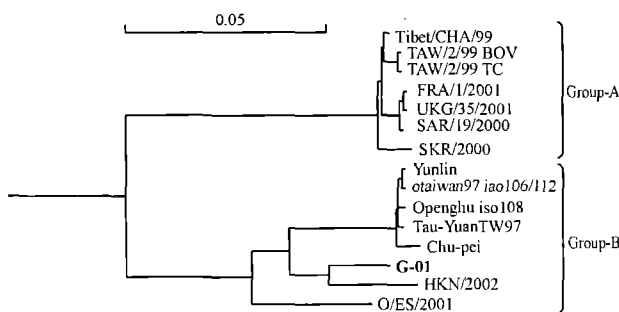


图 3 FMDV 基因组编码区系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on genetic coding region of FMDV

3A 的 2 个氨基酸频繁替换区域是病毒 3A 发生缺失前的量变积累过程. 类似的缺失现象也出现在 O/TAW/97 分离株中^[17-18], 这是一株只感染猪而不感染牛的病毒. O/TAW/97 株的 3A 蛋白发生了 10 aa 的缺失, 用反向遗传学技术证明这种缺失与病毒对牛的致病力减弱有一定关系, 3A 蛋白上一个或极少的几个位点氨基酸发生病毒准种突变范畴内的替换, 就有可能使病毒适应到新的宿主上^[13,19]. 另外本研究发现属于 Group-B 的 8 个毒株均来源于猪, 属于 Group-A 的 6 株病毒来源于牛 (TAW/2/99 BOV 来源于猪), 这也证实 3A 基因的 10 aa 的缺失, 很可能改变了病毒的宿主嗜性, 病毒宿主环境的改变导致 3A 基因的变异, 从而使毒株的宿主范围发生了改变.

参考文献:

- [1] FRED B. The history of research in foot-and-mouth disease virus[J]. *Virus Research*, 2003, 91: 3-7.
- [2] DOMINGO E, ESCARMIS C, BARONOWSKI E, et al. Evolution of foot-and-mouth disease virus[J]. *Virus Research*, 2003, 91: 47-63.
- [3] JAJATI K M, ANIKET S, DIVAKAR H, et al. Sequence and phylogenetic analysis of the L and VP1 genes of foot-and-mouth disease virus serotype Asia1 [J]. *Virus Research*, 2002(87): 107-118.
- [4] SAMUEL A R, KNOWLES N J, MACKAY D K. Genetic analysis of type O viruses responsible for epidemic of foot-and-mouth disease in North Africa [J]. *Epidemiol Infect*, 1999 (122): 529-538.
- [5] KNOWLES N J, SAMUEL A R. Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus [J]. *Virus Research*, 2003, 91: 65-80.
- [6] GRUBMAN M J, ROBERTSON B H, MORGAN D O, et al. Biochemical map of polypeptides specified by foot-and-mouth disease virus [J]. *J Virol*, 1984(50): 579-586.
- [7] 张显升, 刘在新, 赵启祖, 等. 口蹄疫病毒 China/99 基因组 RNA 序列测定及比较分析 [J]. *中国科学*, 2003, 33 (5): 462-467.
- [8] FENG Qian, CHEN Xi, MA Ou, et al. Serotype and VP1 gene sequence of a foot-and-mouth disease virus from Hong Kong (2002) [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003(302): 715-721.
- [9] BISWAS S, SANYAL A, HEMADRI D, et al. Sequence analysis of the non-structural 3A and 3C protein-coding regions of foot-and-mouth disease virus serotype Asia1 field isolates from an endemic country [J]. *Veterinary Microbiology*, 2006, 116: 187-193.
- [10] CHEN Xi, FENG Qian, WU Zhi-yin, et al. RNA-dependent RNA polymerase gene sequence from foot-and-mouth disease virus in Hong Kong [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003(308): 899-905.
- [11] HESTER V R, DANIEL H, FOURIE J, et al. Genetic heterogeneity in the foot-and-mouth disease virus Leader and 3C protease [J]. *Gene*, 2002(289): 19-29.
- [12] 刘在新, 赵启祖, 张显升, 等. 口蹄疫病毒非结构蛋白 P3 区的基因序列及分析 [J]. *中国病毒学*, 2002, 17 (2): 153-157.
- [13] MARGARITA S, JOSE I N, MIGEUL A, et al. Foot-and-mouth disease virus: biology and prospects for disease control [J]. *Microbes and Infection*, 2002(4): 1183-1192.
- [14] FENG Qian, YU Huan, LIU Ying-ying, et al. Genome comparison of a novel foot-and-mouth disease virus with other FMDV strains [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004(323): 254-263.
- [15] TSAI Ching-ping, PAN Chu-hsiang, LIU Min-yun, et al. Molecular epidemiological studies on foot-and-mouth disease type O Taiwan viruses from the 1997 epidemic [J]. *Veterinary Microbiology*, 2000(74): 207-216.
- [16] ISABELLE N, MICHELLE R, CLAUDE K, et al. The nucleotide sequence of foot-and-mouth disease virus O/FRA/1/2001 and comparison with its British parental strain O/UKG/35/2001 [J]. *Virus Research*, 2005 (108): 225-229.
- [17] BEARD C W, MASON P W. Genetic determinants of altered virulence of Taiwanese foot-and-mouth disease virus [J]. *J Virol*, 2000(74): 987-991.
- [18] CHANG H K, YOUNG J K, WONIL K, et al. Molecular characterization of foot-and-mouth disease virus O/SKR/2000 [J]. *Virus Research*, 2002(90): 15-22.
- [19] KNOWLES N J, DAVIES P R, 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]. *J Virol*, 2001(75): 1551-1556.

【责任编辑 柴 焰】