

口蹄疫病毒基因组的遗传变异剖析

陈豪泰, 张 杰, 孙德惠, 马丽娜, 刘湘涛, 刘永生

(中国农业科学院兰州兽医研究所/家畜疫病病原生物学国家重点实验室/农业部畜禽病毒学重点实验室/农业部草食动物疫病重点开放实验室, 兰州 730046)

摘要: 【目的】明确口蹄疫病毒基因组的结构特征及其变异与结构、功能的关系以及系统发生关系。【方法】利用 DNASTAR 和 Clustalx 程序进行 184 个口蹄疫病毒基因组序列的同源性分析、多重排比。【结果】口蹄疫病毒基因组 ORF 大小有所差异, 范围为 6 963~7 120 nt, 编码 2 320~2 339 aa 的多聚蛋白。核苷酸和氨基酸序列的同源性, 7 个不同血清型间 >77.6% 和 >78.3%, 本研究发现了可能和生物学功能相关的新的保守和变异区域。【结论】口蹄疫病毒 RNA 的变异类型丰富和多样性程度较高, 自然界存在的毒株可能大于血清学和测序发现的 FMDV 的毒株数目。

关键词: 口蹄疫; 遗传变异

Dissection on Genetic Diversity of Foot-and-Mouth Disease Virus Genomes

CHEN Hao-tai, ZHANG Jie, SUN De-hui, MA Li-na, LIU Xiang-tao, LIU Yong-sheng

(Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture/State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology/Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Grazing Animal Diseases of Ministry of Agriculture, Lanzhou 730046)

Abstract: 【Objective】The purpose of this study is to clarify the structural features of foot-and-mouth disease virus (FMDV) genomes, relationships of the sequence variations with its structure-function, and molecular phylogeny among FMDV. 【Method】The identity analysis and multiple alignment of 184 FMDV genome sequences were undertaken, respectively, by using the DNASTAR and Clustalx packages. 【Result】FMDV genome sequences showed the entire ORFs size range from 6 963 to 7 120 nt, which could encode PrPs with 2 320 to 2 339 aa. The homology of these nucleotide and amino acid sequences were greater than or equal to 77.6% and greater than or equal to 78.3% among seven distinct serotypes, respectively. The data reveal novel highly conserved genomic regions, indicating variability as well as novel viral genomic motifs with likely biological relevance. 【Conclusion】These results suggest that more FMDV genome diversity may exist in nature than is currently indicated by serology or sequence analysis.

Key words: FMDV; Genetic diversity

0 引言

【研究意义】口蹄疫是一种由口蹄疫病毒 (foot-and-mouth disease virus, FMDV) 引起的, 主要危害偶蹄兽的急性、热性和高度接触性人畜共患传染病^[1], 其病原属小 RNA 病毒科口蹄疫病毒属。交叉保护试验和血清学试验确证口蹄疫病毒有 7 个血清型, 即 O、A、C (欧洲型) 和 Asia1 (亚洲 1 型) 以及 STA1、STA2、STA3 (南非型)。【前人研究进展】

FMDV 基因组和其它小 RNA 病毒相似, 包括 5'非编码区 (5' untranslated region, 5'UTR)、开放阅读框 (open reading frame, ORF) 和 3'非编码区 (3'untranslated region, 3'UTR)。5'UTR 由 S 片段 (short fragment)、poly (C) 区段 (90% C) 和 L 片段 (long fragment) 的 5'末端组成; L 片段由 3 或 4 个重复的假结节 (pseudoknot, PK)、顺式复制元件 (cis-acting replication element, CRE)、内部核糖体位点 (internal ribosome entry site, IRES)、ORF 和 3'UTR 组成^[2],

收稿日期: 2007-06-26; 接受日期: 2008-04-10

基金项目: 甘肃省科技重大专项计划项目 (0801NKDA034)、兰州市科技计划项目 (07-2-12、和 2008-1-167) 和甘肃省自然科学基金 (0803RJZA050)

作者简介: 陈豪泰 (1977-), 男, 甘肃金昌人, 硕士, 研究方向为兽医微生物学与免疫学。Tel: 13519617375; E-mail: haotaichen@tom.com。通讯作者刘永生 (1973-), 男, 内蒙古兴和人, 博士, 研究方向为兽医微生物学与免疫学。E-mail: liuyongshengvip@sina.com.cn

5'UTR 与启动多聚蛋白的翻译和病毒的复制有重要作用^[3]。3'UTR 含有与负链 RNA 合成有关的顺式作用元件^[4]。口蹄疫病毒粒子由二十面体对称的衣壳和病毒核酸组成, 衣壳由 60 个不对称的亚单位组成, 每个亚单位都含有 1 分子的 VP1 (1D)、VP2 (1B)、VP3 (1C) 和 VP4 (1A)。VP1、VP2 和 VP3 参与组成衣壳表面, 而 VP4 则位于病毒颗粒内部。VP1、VP2 和 VP3 包括口蹄疫主要的抗原表位, 是细胞表面硫酸乙酰肝素 (heparan sulfate, HS) 受体^[5]。非结构蛋白包括 L^{pro}、2A、2B、2C、3A、3B、3C^{pro} 和 3D^{pol}^[6], L^{pro}、3C^{pro} 和 2A 介导多聚蛋白的裂解, L^{pro} 不仅能够进行自我切割释放自己, 还可以介导细胞翻译起始因子 eIF4G 的裂解^[7], 3C^{pro} 是多聚蛋白成熟过程中最为重要的蛋白酶之一, 除参与病毒蛋白的裂解外, 还裂解宿主细胞的蛋白^[8]。2A 可在 C 末端自身裂解^[9,10]。尽管 FMDV 2A 和 2C 的功能还不清楚, 但其定位于内质网外膜囊泡中, 该部位是病毒基因组复制的地方^[11]。3A 是多功能膜蛋白, 其激发前体 3CD 的裂解^[12]。3B 又称 VPg, FMDV 的 3 个 VPg 均由病毒 3B 基因编码, 其与病毒 RNA 合成有关^[13]。3D 基因编码 RNA 依赖的 RNA 聚合酶, 也定位于内质网膜^[14,15]。【本研究切入点】尽管对小 RNA 病毒生物学许多方面已经研究清楚, 但是关于 FMDV 非编码区、衣壳蛋白和非结构蛋白及其前体对毒力、宿主范围、感染方面的功能和作用还不清楚。【拟解决的关键问题】本研究通过比较 184 株 FMDV 的基因组序列, 分析口蹄疫病毒各个单元的变异特征及其与系统发生的关系, 以期对 FMDV 的基因组结构特征、结构与功能的关系以及口蹄疫在宿主间传染关系有新的认识, 同时发现新的变异区和保守区及其重要的基序, 为后续的口蹄疫病毒研究打好基础。

1 材料与方法

1.1 口蹄疫基因组序列

在 GenBank 数据库中, 查获至今已注册的 184 个口蹄疫基因组的 RNA 序列。(1) A 型口蹄疫病毒基因组序列有 48 个, 其 GenBank 接受号分别为: AY593751-593794、AY593801-593803、AF136371 和 NC_011450; (2) C 型口蹄疫病毒基因组序列有 23 个, 其 GenBank 接受号分别为: AF274010、DQ409183-409191、NC_002554、AM409325、AY593804-593810、AJ133357-133359 和 AJ007572; (3) O 型口蹄疫病毒基因组序列有 76 个, 其 GenBank

接受号分别为: NC_004004、EF175732、DQ404158-404180、DQ478937、DQ478936、DQ119643、DQ248888、AB079061、AJ539136-539141、AJ320488、AJ633821、AY686687、AY312589、AY312587、AY333431、AY359854、AY593811-593837、AF511039、AF506822、AF377945、AF026168、AF189157 和 AF308157; (4) Asia1 型口蹄疫病毒基因组序列有 14 个, 其 GenBank 接受号分别为: DQ533483、NC_004915、EF149010、EF149009、AY593795-AY593800、AY390432-687334 和 AY304994; (5) STA2 型口蹄疫病毒基因组序列有 6 个, 其 GenBank 接受号分别为: NC_003992、AF540910、AY593847-593849 和 AJ251473; (6) STA1 型口蹄疫病毒基因组序列有 10 个, 其 GenBank 接受号分别为: AY593843-593846、AY593838-593842 和 NC_011451; (7) STA3 型口蹄疫病毒基因组序列有 5 个, 其 GenBank 接受号分别为: NC_011452 和 AY593850-593853。其中以中国农业科学院兰州兽医研究所克隆的口蹄疫病毒基因组序列 Asia1 (EF149009) 和 YNBS/58 (AY390432) 为参考对照。

1.2 口蹄疫基因组序列比较

1.2.1 口蹄疫基因组的同源性分析 利用 DNAsrar 软件比较口蹄疫病毒基因组核苷酸和氨基酸差异性和相似性, 并分段进行的保守性分析。

1.2.2 口蹄疫病毒基因组序列的多重排比和进化关系分析 利用 Clustalx 程序进行口蹄疫病毒基因组序列的多重排比^[16]。

1.2.3 口蹄疫病毒基因组非编码区二级结构预测 利用 RNADRAW 软件对 S 片段、PK、CRE 和 IRES 以及 3'UTR 进行二级结构预测。

2 结果与分析

2.1 口蹄疫病毒基因组结构与各组分的大小

FMDV 的全长为 8 046~8 215 个核苷酸 (nt), 由 5'UTR (1 300 nt)、ORF (6 963~7 120 nt)、3'UTR (90 nt) 和 Poly (A) 尾组成。ORF 由 L 基因、P1 结构蛋白基因、P2 和 P3 非结构蛋白基因以及起始密码子和终止密码子组成, 共同编码 2 320~2 339 个氨基酸 (aa) 的多聚蛋白, 该多聚蛋白随后被逐级降解为病毒复制所需要的各个组分: Lab/Lb (201-219 aa)、P1[1A (85 aa)、1B (217-219 aa)、1C (219-222 aa) 和 1D (213-221 aa)]、P2[2A (18 aa)、2B (154-183 aa) 和 2C (285-318 aa)]、P3[3A (143-153 aa)、3B1

(23 aa)、3B2 (24 aa)、3B3 (24 aa)、3C (213 aa) 和 3D (469 aa)]。此外, S 片段和 IRES 分别为 322~380 nt 和 500~557 nt (图 1)。

2.2 口蹄疫病毒基因组的变异性保守性

2.2.1 非编码区 口蹄疫病毒 5'UTR 和 3'UTR 同源性分别为 68.9%~97.8%和 65%~99%, 而 S 片段和

IRES 的同源性高达 85%以上。二级结构预测发现 S 片段可折叠形成长茎环结构, Poly (C) 后面是长约 700 nt 的 RNA 片段, 也能够形成高度保守的结构, 该二级结构包括假结节、CRE 和 IRSE, 此外, 3'UTR 也可以形成保守的二级结构 (图 2)。

2.2.2 5' UTR Poly (C) 区段前 12 nt 和 S 片段末端

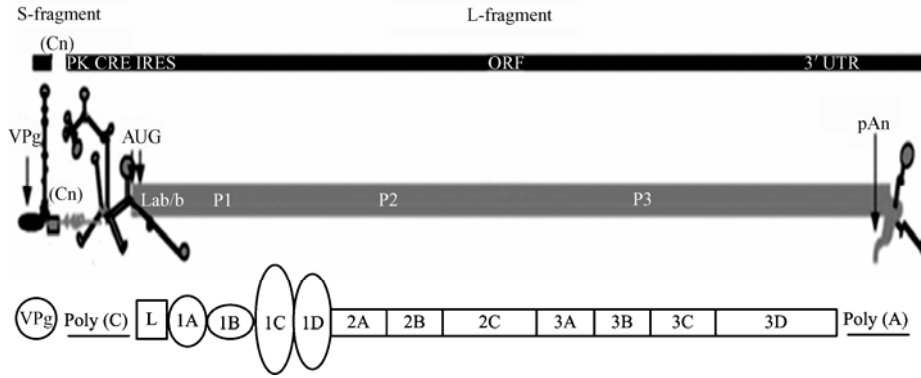
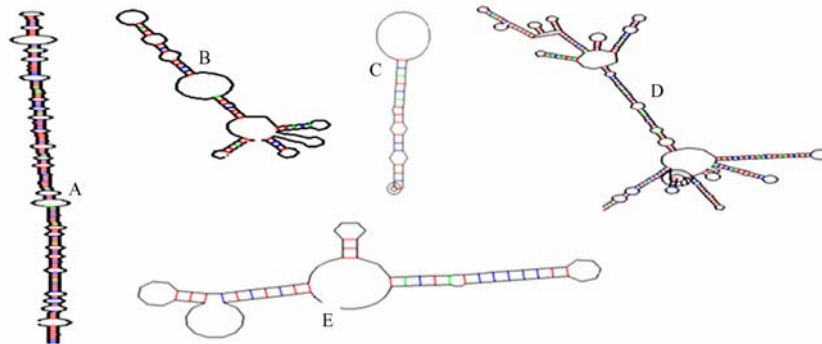


图 1 口蹄疫病毒基因组结构
Fig. 1 Structure of FMDV genomes



A: S 片段; B: 假结节; C: 顺式复制元件; D: 核糖体进入位点; E: 3'非编码区
A: S fragment; B: PK; C: CRE; D: IRES; E: 3'UTR

图 2 二级结构
Fig. 2 Secondary structures

序列高度保守, 分别位于 S 片段 92 和 302 的 2 个 AUG 也非常保守, 同时发现 5'末端前 27 nt 在所有口蹄疫病毒 RNA 中高度保守, 其后为 15 nt 的高变区, 高突变位点有 513、558、615、684、696 和 1 144。SAT 发生 1~3 个核苷酸的插入或缺失, 其主要发生的区域为 120~160 和 200~300; 位点有 38、39、67、95、250、350、366 和 375。而 A、O 和 C 型则为 1~5 个碱基

的插入或缺失 (但是毒株 C Waldman strain 149、A Canefa 1/61 和 A25 Argentina/59 缺了区域 153~228 的 76 个核苷酸), 主要分布在位点 86、123、124、144、145、155~157、174、181~191、197~219、240、256、277、292~294、300、306 和 324。毒株 SAT1/7 Isrl 4/62 和 SAT2-3 Kenya 11/60 有一个相对完整的 S 片段, 没有 SAT 和 A、O 和 C 型 FMDV 的特异性缺失, 插入

或缺失只限于位点 142、143、239、290、291 和 307, 这是其它毒株所没有的。虽然各毒株 S 片段的突变效率低, 但是 STA 和欧洲株 S 片段的核苷酸同源性只有 50%, 而 C 和 A 型口蹄疫病毒的 S 片段的同源性却高达 98%。在毒株 A5 Westerwald/51 的 poly (C) 区下游 28 nt 处发现了 18 nt 残基的插入。假结节区 403~600 比较保守。保守区和基序定位于假结节区和 IRES, 包括 AGAAWYGGGACGU (位于 617~629)、GCRCACGWAACGCGC (632~646) 和 ACAAAC (668~673)。IRES 的区域 640~1151 的同源性为 70%~100%, 47% 的核苷酸不变; 有许多保守基序, 包括区域 2 的基序 UUUC 和 GGUCUWGAG 以及区域 3 的保守基序 GYRA (相当于小 RNA 病毒的基序 GNRA) 和 CRAAA (O1Argentina/65 和 Oakesu/58 除外)。多数 FMDV 存在区域 3 的茎环 D 基序 ACCC, 但是茎环 3C 基序 ACAC 不保守。区域 3 也发现一些新的保守基序, 例如基序 UCGUMGCGGAGCA (位于 823~835) 和 GRUACUGGUA 或 GRGACUGGUA (965~974) 分别特异性地存在于 STA 和欧洲型毒株中, 基序 CUGGWGRCAGGCUAAGGAUGCCCU (位于 983~1 006) 形成茎环的突起。区域 4 非常保守, 其中的 2 个新基序 GAUCUGAG (1 039~1 046) 和 UUAAAAG (1 080~1 087 可能形成茎环突起的二级结构。区域 5 的 21 个核苷酸的 19 个保守。总之, FMDV 5'UTR 比较保守, 特别是 IRES 更加保守。

2.2.3 3' UTR 3'非编码区的高变区为 85~101。Poly (A) 上游的 20 个核苷酸具有 75% 的同源性, 变异主要位于基因组的 3'端中部。

2.2.4 多聚蛋白区 所有口蹄疫病毒 ORF 比较发现至少为 46% 的核苷酸 (52% 的氨基酸) 没有变化, 同时也发现核苷酸变异程度明显大于氨基酸的变异程度, 毒株间的核苷酸同源性为 73%。口蹄疫病毒衣壳蛋白和结构蛋白之间的切割位点比较保守, L/1A、1A/1B、B/1C、1C/1D、1D/2A、2A/2B、2B/2C 和 2C/3A 的酶切位点分别为 K/R|G、A|D、E/Q|G、Q/E|T、Q/L/T/M、G|P、Q|L 和 Q|I, 而 3A/3B1、3B1/3B2、3B2/3B3、3B3/3C 和 3C/3D 则都是 E|G, 欧洲型毒株的蛋白切割位点保守程度高于 SAT 型, 尤其 1A/1B、2A/2B、2B/2C、2C/3A、3B/3C 的切割位点非常保守。

2.2.5 结构蛋白 核苷酸和氨基酸的分段对比分析可见 (表 2), 结构蛋白的变异顺序为 VP1>VP2>VP3>VP4, 1A 是最保守的结构蛋白, 约 81% 的氨基酸不变, 包括 N-末端十四烷基化位点和猪牛 T-细胞

表位 20~35, 与欧洲毒株相比较, Q73 在所有的 SAT 型毒株中都保守。另外, I76 保守于 SAT2 和 SAT3 中, 而 V80 仅存在于 SAT1 中。

表 1 口蹄疫病毒衣壳蛋白及其基因序列同源性

Table 1 Homology of capsid protein and its gene of FMDV

	同源性 Homology (%)		异源性 Heterology (%)	
	nt	aa	nt	aa
1A	77~99	78~99	1~23	1~22
1B	65~97	66~98	3~35	2~34
1C	61~96	60~97	4~39	3~40
1D	53~95	55~97	5~47	3~45

1B 的 N 末端变化小, 而 C 末端易变。T 细胞表位 1B48~68、1B114~132 和 1B179~187 比较保守, 欧洲型毒株的保守基序是 DKKTEETTLLEDRI LTT RNGTH (T/I) STTQSSVG, 而 SAT 型毒株的保守基序为 DKKTEETT (L/H) LEDRI (L/M/V) TT (S/R) H (G/N) TTTSTTQSSVG。

1C 氨基酸替换集中在 1C55~88、1C130~140、1C176~186 和 1C196~208, 插入或缺失发现于前 2 个区域, 同时还发现欧洲毒株的 1B/1C 的切割位点不变, 而 SAT 则不保守。

1D 的插入或缺失发生于 1D140~150 和 1D166~170, 26% 的残基不变。大多数 FMDV 有保守 RGD 三肽基序, 但是毒株 C Waldman strain 149 和 C4 Tierra del Fuego/66 为 GGDC; Asia1/2 Isrl 3/63 和 A21 Kenya/64 为 RGE; A25 Argentina/59 和 A Canefa 1/61 为 RDD; Asia1 Pak/1/54 和 O/Syria/1/87 是 RGN; O PAK/1/94 和 O/IRQ/26/2000 是 KGD; 其它的毒株还包括 C5 Argentina/69 (TGD)、Asia1/3 Kimrom (HGD)、A27 Colombia/67 (PGD)、A A/IND/110/99 (RSG)、O KEN/5/95 (RGE)、O Akesu/58 (SGD)、O3/Venezuela/51 (IGD)。

其它重要的保守位点和基序包括 1B 的 H145、P144 和 L83; 1C 的 G39、F41 和 A50, 其包含在保守基序 LDVAEACPT (45~53) 之中; 与 1AB 切割相关的位点有 1D 的 P204, 其包含在基序 RMKRAE (T/L) YCPR (195~205); 1B 的 V32 (SAT2 为 I)、T33 和 Y36, 其包含于 TTSTTQSSVG (V/I) T (Y/F) GY (22~36)。1B36~47 在同一血清型内比较保守, 分别为 YSTXEDHXXGPN (A)、YXTXEDFVXGPN (O)、YATXEDXXGPN (C)、YXVXEDAVSXP (O)。

(Asia1)、YAXDXFLPGPN (SAT1)、YADXDSFR XGPN (SAT2) 和 YXSADRFLPGPN (SAT3), 而基序 GPNT (S/N) GLEXRV_xQAER (F/Y) (F/Y) K (45~63) 在所有的 FMDV 中都保守。1B 的 H21 (相当于 SAT 的位点 19)、H145、H157 和 H174 很保守, 突变 H87P 和 H168Y 分别存在于欧洲型毒株中, 另外, 1C 包括 5 个保守的 H 残基, 分别位于 86 (相当于 SAT 的 84 位)、109、146、149 和 198 (相当于 SAT 的 196)。

2.2.6 非结构蛋白 口蹄疫病毒的非结构蛋白比较保守 (表 2), 大多数保守区位于 2B 和 3C 的编码区, 其核苷酸的保守性分别平均达到 61% 和 59%, 氨基酸的保守性为 76%。相对而言, L^{pro}、3A 和 3B 呈现较高的变异, 重要的保守位点包括 L19、L20、L22、L23、L82、1D45、1D48、1D142、1D143、1D144、1D146、3A44、3A132、3A135、3A136、3A144, 位点 4 和 11 (3B1) 以及 17、18 和 19 (3B2) 也比较保守。

表 2 口蹄疫病毒非结构蛋白及其基因序列同源性

Table 2 Homology of nonstructural protein and its gene of FMDV

	同源性 Homology (%)		异源性 Heterology (%)	
	nt	aa	nt	aa
L	74~96	75~99	4~26	1~25
2A	90~98	94~99	2~10	1~6
2B	86~97	88~98	4~13	2~12
2C	84~97	82~97	3~16	3~18
3A	85~96	88~97	4~25	3~22
3B	84~99	85~99	1~26	1~25
3C	87~98	87~98	2~23	2~23
3D	88~99	89~99	1~12	1~11

绝大多数毒株 L^{pro} 没有出现插入或缺失, 但是欧洲株的 L22 和 L23 除外。起始密码子高度保守, 同时发现 2 个密码子间只有 1 个氨基酸残基 C6 没有变化; Lb 仅 44% 残基未变, 氨基酸替换主要集中于 L^{pro} 末端; L^{pro} 的 C52、H149、D165、E77、H110 和 H139 保守, 但是 H110D (SAT)、E77Q (O6 Pirbright/65) 和 E77K (A Phillipines/75) 除外。2A 氨基酸同源性约 89%, 14 个残基没有变化, 其中包括基序 DVEXNPG; 2B 的 117 个残基没有变化, 变化仅局限于 1~2 个残基的替换, 尤其跨膜区 120~140 更加保守; 2C 也比较保守, 72% 核苷酸没有变化, 包括

2C110~116、2C160~163 和 2C243~246, 而 SAT 型毒株的特异性替换位点是 28 和 92 位; 3A 插入或缺失经常发生于 3A70~110 和 3A130~150, 氨基酸比较证实 3A 是 FMDV 易变的蛋白之一, 只有 37% 残基没有变化; 3B1、3B2、3B3 都比较保守, 变异主要发生于 C 末端。相比较而言, 3B1 和 3B2 更容易变异; 3D^{pol} 比较保守 (变异率为 26%), 尤其基序 VKGQDMLSDAALMVLH、跨膜区 76~91 和 27~44 更加保守, 其它的保守位点还有 D245、G295、N307、G337、D338、D339 以及保守基序 KDELR、PSG、YGGD、FLKR 和抗原表位 1~12、64~76 和 143~153。

3 讨论

FMDV 的全长为 8 046~8 215 nt, 与已报道资料的结论一致^[17,18]。虽然各毒株 S 片段的突变效率低, 导致二级结构相似, 都是单个的茎环结构^[19,20], 但是 A22 Turkey/65、A24 Argentina 65 和 Asia 1 Leb 83 可能不同, 有待进一步研究。IRES 和第一个 AUG 之间的 22 nt 易变, 导致 FMDV 优先使用第二个起始密码子^[21,22], 但其保守性可能对口蹄疫病毒的转录与翻译非常重要。

3'UTR 的功能比较重要, 其主要包括含有与负链 RNA 合成有关的顺式作用元件^[4]、poly (A) 缺失或替换会降低或消除 FMDV 的感染性^[23]、3'UTR 可能影响病毒基因组的环化和翻译^[24,25], 本研究表明 3'UTR 的变异主要位于基因组的 3'端中部, 其可能是病毒的复制和毒力相关的重要区域。

4 种结构蛋白的氨基酸同源性比较表明, 在口蹄疫的 7 个血清型之间, 甚至同一型的亚型之间的抗原也不完全相同, VP1 的氨基酸序列是一个高度可变区, 而 VP4 几乎不发生变异。因此, 结构蛋白的氨基酸取代、插入或缺失, 尤其是口蹄疫病毒抗原表位的氨基酸差异可能造成口蹄疫病毒的抗原变异。

L^{pro} 编码 2 种蛋白, 第一个 AUG 的翻译产物为 Lab, 而第二个起始密码子编码 Lb, 二个密码子间的间隔区可能形成稳定的发卡结构而参与 IRES 的活化^[22,26]。Lab 和 Lb 的蛋白酶活性和特异性相同, L^{pro} 是 FMDV 的毒力相关因子, 可能参与宿主的干扰调节^[27]。口蹄疫病毒前导蛋白酶的氨基酸同源性比较表明, 绝大多数毒株 L^{pro} 没有出现插入或缺失, 并且起始密码子高度保守, 这可能决定 Lab 和 Lb 在 FMDV 生物学方面有重要作用, 同时发现 2 个密码子间只有 1 个氨基酸残基 C6 没有变化, 和以前的报道^[28,29]相比

较, Lb 仅 44% 残基未变, 氨基酸替换主要集中于 L^{pro} 末端, 可能与其二级结构的稳定性有关。除位点 H110D (SAT)、E77Q (O6 Pirbright/65) 和 E77K (A Phillipines/75) 以外, 所有毒株的位点 C52、E77、H149、H110、H139 和 D165 非常保守, 其与 L^{pro} 活化^[27,30,31] 和 eIF4G 切割^[32] 相关。

FMDV 的衣壳由 1A、1B、1C 和 1D 4 种结构蛋白组成^[5], 1A 是 FMDV 最保守的结构蛋白, 包括 N-末端十四烷基化位点和猪牛 T-细胞表位(位于 20~35)^[33], 1C 包含重要的构象表位, 稳定衣壳蛋白^[34]。氨基酸替换集中在 1C176~186 和 1C196~208, T 细胞表位存在于该区域^[35], 这些基序可能与病毒的感染和免疫有重要关系。1D 与病毒进入宿主细胞、免疫保护和型特异性有关^[5]。FMDV 的宿主识别位点主要由保守 RGD 三肽基序组成^[36,37], 资料表明小 RNA 病毒 N 末端的 10 个氨基酸残基比较保守, 其与病毒进入细胞相关^[38], 而 FMDV 1D 缺失 N-末端基序, 这是 FMDV 与其它小 RNA 的重要区别。小 RNA 病毒 1AB (VP0) 的切割机制还不清楚, 但是这需要病毒的成熟和感染^[39,40]。在病毒进入宿主细胞过程中, 1A 介导病毒 RNA 进入细胞质^[41], 与其有重要关系的位点包括 1B 的 H145、P144 和 L83; 1C 的 G39、F41 和 A50, 其包含在保守基序 LDVAEACPT (45~53) 之中^[42], 这些位点可能与口蹄疫病毒的感染相关。

口蹄疫的非结构蛋白由基因组的 P2 和 P3 区编码, 参与结构蛋白的折叠和装配以及 RNA 的复制。2A 成熟可能是调节细胞翻译机制而导致 2A 释放^[9,10]。保守基序 DVEXNPG 对 2A 活性有重要作用^[43], 2A 高度保守性, 其意义目前还不清楚。2C110-116、2C160-163 和 2C243~246^[44] 也比较保守, 可能与 ATP/GTP 酶活性有关。3A 中氨基酸的缺失与 FMDV 感染性弱化以及宿主嗜性有关, 其特性与其它的小 RNA 病毒相似^[45,46], 缺失现象出现在 O Taiwan/97 分离株中, 导致牛源细胞上不能生长复制, 但是对猪和猪源细胞有很强的毒力^[47], 核苷酸比较显示 3A 由 143~153 aa 构成, 其插入或缺失经常发生于 3A70~110 和 3A130~150。氨基酸比较证实 3A 是 FMDV 易变的蛋白之一, 其中突变位点 Q44、Q44R 与致病性相关^[48], 尽管突变 Q44R 在许多猪适应株中存在, 但是在其它猪适应株和不适应株中都发现有缺失。预测的跨膜区(60~76)的保守位点 L64、L68、A70 和 I72^[47] 在本研究中发现并不保守, 也发生氨基酸的替换, 同时也发现 T 细胞表位 21~35^[33] 依然易变, 这表明 3A

上氨基酸的突变可能是病毒适应到新的宿主, 宿主范围的选择可能由 3A 基因变异决定。

3B 包括 3B1、3B2 和 3B3^[13,49]。氨基酸同源性比较证实 3B1、3B2、3B3 都比较保守, 变异主要发生于 C 末端。保守基序 GPYXGP (但是 Sat 1/20 Rv 11/37 是 GPYXRP) 中的 Y 和病毒基因组 5'端以磷酸二酯键连接^[50]。3B3 的高度保守与 FMDV 潜在的致病性有关^[13,51]。相比较而言, 3B1 和 3B2 更容易变异, 其中 3B1 的 4 和 11 位残基以及 3B2 的 17~19 位氨基酸是关键氨基酸, 3B1 和 3B2 的缺失可能与口蹄疫病毒的致病性和宿主谱有关^[51], 这与 3A 相似, 3B1 和 3B2 变异介导病毒的宿主特异性功能。同时也发现 3B 环中的基序 RAAA 在口蹄疫病毒中非常保守, 这与 3B 功能之间的关系还不清楚, 有待进一步探讨。

3C^{pro} 催化多聚蛋白的次级裂解, 还能裂解宿主的组蛋白 H3 和转录起始因子 eIF4A 与 eIF4G。保守位点 C163、Y136、H46、D84 对 3C^{pro} 是比较重要的^[52], 核苷酸比较也发现存在跨膜区 76~91 和 27~44 与基序 VKGQDMLSDAALMVLH 比较保守, 这些位点和区域可能与 3C 的活性有重要作用, 这需从宿主细胞转录和翻译的关闭机制来揭示。

3D^{pol} 是病毒的 RNA 聚合酶, 尽管以前的资料表明 3D 比较保守 (变异率为 8.6%)^[53], 但是本研究发现 3D 也存在较多的变异 (变异率 26%)。但在本研究的所有 FMDV 分离株中都存在保守位点 D245、N307、G295、G337、D338、D339 及保守基序 KDELRL、PSG、YGGD、FLKR 和抗原表位 1~12、64~76、143~153, 这与相关研究报道^[53-57] 基本一致。

4 结论

本研究通过对 184 株口蹄疫病毒基因组的比较发现, 可以将 FMDV 7 个血清型分为 2 群, O、A、C 和 Asia1 型为一群, 称为欧亚群, 另外一群则称为南非群, 其包括 STA1、STA2 和 STA3 型, 2 群之间的核苷酸和氨基酸同源性分别为 77%~89% 和 79%~90%, 而群内的核苷酸和氨基酸都高达 98%。

本研究通过比较 184 株 FMDV 的核苷酸及其氨基酸序列表明, 口蹄疫病毒基因组存在大量的突变位点和基序, 它们与病毒的遗传和变异息息相关。

References

- [1] Xiao C, Rajput Z I, Hu S. Improvement of a commercial foot-and-mouth disease vaccine by supplement of Quil A. *Vaccine*, 2007,

- 25(25): 4795-4800.
- [2] Mason P W, Grubman M J, Baxt B. Molecular basis of pathogenesis of FMDV. *Virus Research*, 2003, 91: 9-32.
- [3] Lopez de Quinto S, Martinez-Salas E. Conserved structural motifs located in distal loops of aphthovirus internal ribosome entry site domain 3 are required for internal initiation of translation. *Journal of Virology*, 1997, 71: 4171-4175.
- [4] Agol V I, Paul A V, Wimmer E. Paradoxes of the replication of picornaviral genomes. *Virus Research*, 1999, 62: 129-147.
- [5] Jackson T, King A M Q, Stuart D I, Fry E. Structure and receptor binding. *Virus Research*, 2003, 9:33-46.
- [6] Porter A G. Picornavirus nonstructural proteins: emerging roles in virus replication and inhibition of host cell functions. *Journal of Virology*, 1993, 67: 6917-6921.
- [7] Foeger N, Kuehnel E, Cencic R, Skern T. The binding of foot-and-mouth disease virus leader proteinase to eIF4GI involves conserved ionic interactions. *FEBS Journal*, 2005, 272(10): 2602-2611.
- [8] Vakharia V N, Devaney M A, Moore D M, Dunn J J, Grubman M J. Proteolytic processing of foot-and-mouth disease virus polyproteins expressed in a cell-free system from clone-derived transcripts. *Journal of Virology*, 1987, 61: 3199-3207.
- [9] Donnelly M, Hughes L, Luke G, Mendoza H, ten Dam E, Gani D, Ryan M. The "cleavage" activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring "2A-like" sequences. *Journal of General Virology*, 2001, 82: 1027-1041.
- [10] Donnelly M, Luke G, Mehrotra A, Li X, Hughes L, Gani D, Ryan M. Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein "cleavage" mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal "skip." *Journal of General Virology*, 2001, 82: 1013-1025.
- [11] Tesar M, Marquardt O. Serological probes for some foot-and-mouth disease virus nonstructural proteins. *Virus Genes*, 1989, 3: 29-44.
- [12] Polatnick J. Isolation of foot-and-mouth-disease polyuridylic acid polymerase and its inhibition by antibody. *Journal of Virology*, 1980, 33: 774-779.
- [13] Nayak A, Goodfellow I G, Belsham G J. Factors required for the Uridylation of the foot-and-mouth disease virus 3B1, 3B2, and 3B3 peptides by the RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol) *in vitro*. *Journal of Virology*, 2005, 79(12): 7698-7706.
- [14] O'Donnell V K, Pacheco J M, Henry T M, Mason P W. Subcellular distribution of the foot-and-mouth disease virus 3A protein in cells infected with viruses encoding wild-type and bovine-attenuated forms of 3A. *Virology*, 2001, 287: 151-162.
- [15] Polatnick J, Wool S H. Association of foot-and-mouth disease virus induced RNA polymerase with host cell organelles. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 1983, 6: 265-272.
- [16] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins D G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [17] Pereda A J, Konig G A, Chimeno Zoth S A, Borca M, Palma E L, Piccone M E. Full length nucleotide sequence of foot-and-mouth disease virus strain O1 Campos/Bra/58. *Archives of Virology*, 2002, 147: 2225-2230.
- [18] Toja M, Escarmis C, Domingo E. Genomic nucleotide sequence of a foot-and-mouth disease virus clone and its persistent derivatives. Implications for the evolution of viral quasispecies during a persistent infection. *Virus Research*, 1999, 64: 161-171.
- [19] Clarke B E, Brown A L, Currey K M, Newton S E, Rowlands D J, A R Carroll. Potential secondary and tertiary structure in the genomic RNA of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic Acids Research*, 1987, 15: 7067-7079.
- [20] Escarmis C, Toja M, Medina M, Domingo E. Modification of the 5' untranslated region of foot-and-mouth disease virus after prolonged persistence in cell culture. *Virus Research*, 1992, 26: 113-125.
- [21] Belsham G J. Dual initiation sites of protein synthesis on foot-and-mouth disease virus RNA are selected following internal site and scanning of ribosomes *in vivo*. *The EMBO Journal*, 1992, 11(3): 1105-1110.
- [22] Lopez de Quinto S, Martinez-Salas E. Involvement of the aphthovirus RNA region located between the two functional AUGs in start codon selection. *Virology*, 1999, 255: 324-336.
- [23] Saiz M, Gomez S, Martinez-Salas E, Sobrino F. Deletion or substitution of the aphthovirus 3' NCR abrogates infectivity and virus replication. *Journal of General Virology*, 2001, 82: 93-101.
- [24] Lopez de Quinto S, Saiz M, de la Morena D, Sobrino F, Martinez-Salas E. IRES-driven translation is stimulated separately by the FMDV 3'-NCR and poly(A) sequences. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30: 4398-4405.
- [25] Herold J, Andino R. Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Molecular Cell*, 2001, 7: 581-591.
- [26] Hinton T M, Li F, Crabb B S. Internal ribosomal entry site-mediated translation initiation in equine rhinitis A virus: similarities to and differences from that of foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virology*, 2000, 74: 11708-11716.

- [27] Piccone M E, Rieder E, Mason P W, Grubman M J. The foot-and-mouth disease virus leader proteinase gene is not required for viral replication. *Journal of Virology*, 1995, 69: 5376-5382.
- [28] George M, Venkataramanan R, Gurumurthy C B, Hemadri D. The non-structural leader protein gene of foot-and-mouth disease virus is highly variable between serotypes. *Virus Genes*, 2001, 22: 271-278.
- [29] van Rensburg H, Haydon D, Joubert F, Bastos A, Heath L, Nel L. Genetic heterogeneity in the foot-and-mouth disease virus leader and 3C proteinases. *Gene*, 2002, 289: 19-29.
- [30] Gorbalenya A E, Koonin E V, Lai M M. Putative papain-related thiol proteases of positive strand RNA viruses. Identification of rubi- and aphthovirus proteases and delineation of a novel conserved domain associated with proteases of rubi-, alpha-, and coronaviruses. *FEBS Letters*, 1991, 288: 201-205.
- [31] Kronovetr J, Skern T. Foot-and-mouth disease virus leader proteinase: a papain-like enzyme requiring an acidic environment in the active site. *FEBS Letters*, 2002, 528: 58-62.
- [32] Piccone M E, M Zellner, Kumosinski T F, Mason P W, Grubman M J. Identification of the active-site residues of the L proteinase of foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virology*, 1995, 69: 4950-4956.
- [33] Blanco E, Garcia-Briones M, Sanz-Parra A, Gomes P, De Oliveira E, Valero M L, Andreu D, Ley V, Sobrino F. Identification of T-cell epitopes in nonstructural proteins of foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virology*, 2001, 75: 3164-3174.
- [34] Logan D, Abu-Ghazaleh R, Blakemore W, Curry S, Jackson T, King A, Lea S, Lewis R, Newman J, Parry N. Structure of a major immunogenic site on foot-and-mouth disease virus. *Nature*, 1993, 362: 566-568.
- [35] Perez Filgueira M, Wigdorovitz A, Romera A, Zamorano P, Borca M V, Sadir A M. Detection and characterization of functional T-cell epitopes on the structural proteins VP2, VP3, and VP4 of foot and mouth disease virus O1 Campos. *Virology*, 2000, 271: 234-239.
- [36] 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 an antibody-dependent enhancement pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994, 91: 1932-1936.
- [37] McKenna T S, Lubroth J, Rieder E, Baxt B, Mason P W. Receptor-binding site-deleted foot-and-mouth disease (FMD) virus protects cattle from FMD. *Journal of Virology*, 1995, 69: 5787-5790.
- [38] Curry S, M Chow, J M Hogle. The poliovirus 135S particle is infectious. *Journal of Virology*, 1996, 70: 7125-7131.
- [39] Ansardi D C, D C Porter, Morrow C D. Myristylation of poliovirus capsid precursor P1 is required for assembly of subviral particles. *Journal of Virology*, 1992, 66: 4556-4563.
- [40] Moscufo N, Simons J, Chow M. Myristoylation is important at multiple stages in poliovirus assembly. *Journal of Virology*, 1991, 65: 2372-2380.
- [41] Hogle J M. Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways. *Annual Reviews Microbiology*, 2002, 56: 677-702.
- [42] Basavappa R, Syed R, Flore O, J P Icenogle, Filman D J. Role and mechanism of the maturation cleavage of VP0 in poliovirus assembly: structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9A resolution. *Protein Science*, 1994, 3: 1651-1669.
- [43] Donnelly M L, Gani D, Flint M, Monaghan S, Ryan M D. The cleavage activities of aphthovirus and cardiovirus 2A proteins. *Journal of General Virology*, 1997, 78: 13-21.
- [44] Dever T E, Glynias M J, Merrick W C. GTP-binding domain: three consensus sequence elements with distinct spacing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1987, 84: 1814-1818.
- [45] Graff J, Kasang C, Normann A, Pfisterer-Hunt M, Feinstone S M, Flehmig B. Mutational events in consecutive passages of hepatitis A virus strain GBM during cell culture adaptation. *Virology*, 1994, 204: 60-68.
- [46] Lama, J, Sanz M A, Carrasco L. Genetic analysis of poliovirus protein 3A: characterization of a non- cytopathic mutant virus defective in killing Vero cells. *Journal of General Virology*, 1998, 79: 1911-1921.
- [47] Knowles N J, Davies P R, Henry T, O'Donnell L V, Pacheco J M, Mason P W. Emergence in Asia of foot- and-mouth disease viruses with altered host range: characterization of alterations in the 3A protein. *Journal of Virology*, 2001, 75: 1551-1556.
- [48] Nunez J I, Baranowski E, Molina N, Ruiz-Jarabo C M, Sanchez C, Domingo E, Sobrino F. A single amino acid substitution in nonstructural protein 3A can mediate adaptation of foot-and-mouth disease virus to the guinea pig. *Journal of Virology*, 2001, 75: 3977-3983.
- [49] Paul A V, Yin J, Mugavero J, Rieder E, Liu Y, Wimmer E. A "slide back" mechanism for the initiation of protein-primed RNA synthesis by the RNA polymerase of poliovirus. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278: 43951-43960.
- [50] Ambros V, Baltimore D. Protein is linked to the 5' end of poliovirus RNA by a phosphodiester linkage to tyrosine. *Journal of Biological Chemistry*, 1978, 253: 5263-5266.
- [51] Pacheco J M, Henry T M, O'Donnell V K, Gregory J B, Mason P W. Role of nonstructural proteins 3A and 3B in host range and

- pathogenicity of foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virology*, 2003, 77: 13017-13027.
- [52] Grubman M J, Zellner M, Bablanian G, Mason P W, Piccone M E. Identification of the active-site residues of the 3C proteinase of foot-and-mouth disease virus. *Virology*, 1995, 213: 581-589.
- [53] Krebs O, Marquardt O. Identification and characterization of foot-and-mouth disease virus O1 Burgwedel/ 1987 as an intertypic recombinant. *Journal of General Virology*, 1992, 73: 613-619.
- [54] George M, Venkataramanan R, Pattnaik B, Sanyal A, Gurumurthy C B, Hemadri D, Tosh C. Sequence analysis of the RNA polymerase gene of foot-and-mouth disease virus serotype Asia1. *Virus Genes*, 2001, 22: 21-26.
- [55] Xiang W, Cuconati A, Hope D, Kirkegaard K, Wimmer E. Complete protein linkage map of poliovirus P3 proteins: interaction of polymerase 3Dpol with VPg and with genetic variants of 3AB. *Journal of Virology*, 1998, 72: 6732-6741.
- [56] Doherty M, Todd D, McFerran N, Hoey E M. Sequence analysis of a porcine enterovirus serotype 1 isolate: relationships with other picornaviruses. *Journal of General Virology*, 1999, 80: 1929-1941.
- [57] Kaku Y, Yamada S, Murakami Y. Sequence determination and phylogenetic analysis of RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) of the porcine enterovirus 1 (PEV-1) Talfan strain. *Archives of Virology*, 1999, 144: 1845-1852.

(责任编辑 林鉴非)

欢迎订阅 2009 年《中国土壤与肥料》(原《土壤肥料》)

《中国土壤与肥料》杂志 1964 年创刊,是农业部主管、中国农科院农业资源与农业区划研究所和中国植物营养与肥料学会主办的全国性专业技术期刊,中国科技核心期刊,全国中文核心期刊,中国农业核心期刊。本刊以促进土肥科技发展、加快成果转化为宗旨,主要刊登土壤资源与利用、植物营养与施肥、农业微生物、水资源利用、分析测试、环境保护、生态农业等方面的新理论、新技术、新产品的试验研究成果与动态。本刊办刊时间长、发行量大、信息丰富、实用性强,在广大读者中有广泛影响,被国内外多家数据库和科技文摘期刊收录。读者对象为农业科研、教学、推广人员,环保与肥料生产、经营部门的科技、管理人员及农民技术员。

本刊国内外公开发行,国内标准刊号: CN11-5498/S, 国际标准刊号: ISSN1673-6257。双月刊,大 16 开,80 页,彩色四封,彩色和黑白广告插页。每期定价 5.00 元,全年 30.00 元,全国各地邮局订阅,邮发代号 2-559。漏订者可与本刊编辑部联系。欢迎刊登各种有关土壤肥料的产品、加工机械和分析仪器方面的广告。

地址:北京市海淀区中关村南大街 12 号中国农科院农业资源与农业区划研究所《中国土壤与肥料》编辑部(邮编:100081)
电话:010-82108656; 传真:010-82106225; E-mail: TRFL@caas.ac.cn