

# 猪源口蹄疫病毒 China99/S 株基因组全长 cDNA 的构建及其感染性鉴定

常艳燕<sup>1</sup>, 郑海学<sup>1,2</sup>, 靳野<sup>1</sup>, 王光祥<sup>1</sup>, 尚佑军<sup>1</sup>, 刘湘涛<sup>1\*</sup>

(1. 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开放实验室, 国家口蹄疫参考实验室, 兰州 730046; 2. 广东省农业科学院兽医研究所, 广州 510640)

**摘要:** 提取猪源 FMDV China99/S 组织样品总 RNA, 利用设计的引物对, 分段进行扩增, 获得覆盖全基因组的 4 个重叠片段(A、B、C 和 E), 然后用 *BsmB* I / *Xma* I、*Xma* I / *BamH* I、*BamH* I / *Not* I、*Hpa* I / *Kpn* I 分别双酶切 A、B、E、C, 并纯化回收, 依次定向克隆到带有聚合酶 I 的 pP<sub>1</sub> cDNA3.1(+ ) 转录载体内, 最终得到重组质粒 pP<sub>1</sub>-FMDVcDNA3.1(+ ); 然后对该质粒进行序列测定。结果表明, China99/S 株基因组全基因组序列长 8 116 nt(含 Poly(C) 和 Poly(A) 片段), 其中 5'NCR 长 1 064 nt, 蛋白编码区核苷酸序列为 6 318 nt, 编码 1 个由 2 106 个氨基酸组成的聚合蛋白, 3'NCR 长 93 nt, 其后是含有 38 个 A 碱基的 Poly(A) 尾。其中 5'NCR 引入含 41 个 C 的 Poly(C) 片段。将 pP<sub>1</sub>-FMDVcDNA3.1(+ ) 用脂质体转染法导入 BHK-21 细胞, 传代培养, 可以观察到典型的 FMDV 致细胞病变效应。利用 CPE、电镜、动物试验、RT-PCR 和序列测定进行检测, 结果表明, 从该系统中成功拯救出具有感染性的猪源 FMDV China99/S 株重组病毒。

**关键词:** 口蹄疫病毒; 全长 cDNA 克隆; Poly(C); 反向遗传学

中图分类号: S852.659; Q78

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)02-0213-08

## Construction and Identification of the Full-length Genomic cDNA Clone of FMDV China99/S Isolated from Swine

CHANG Yan-yan<sup>1</sup>, ZHENG Hai-xue<sup>1,2</sup>, JIN Ye<sup>1</sup>, WANG Guang-xiang<sup>1</sup>,  
SHANG You-jun<sup>1</sup>, LIU Xiang-tao<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, National Foot-and-Mouth Disease Reference Laboratory of China, State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China; 2. Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Total RNA was extracted from tissue samples of FMDV China99/S strain and four overlapping fragments (A, B, C and E) were amplified. The pP<sub>1</sub> cDNA3.1(+ ) vector with RNA polymerase I and A, B, C, E fragments were digested respectively by restriction endonucleases (A(*BsmB* I / *Xma* I), B(*Xma* I / *BamH* I), C(*Hpa* I / *Kpn* I), E(*BamH* I / *Not* I)), and then ligated to produce recombinant plasmid of pP<sub>1</sub>-FMDVcDNA3.1(+ ). The analysis of nucleotide sequences showed that the genome of swine FMDV China99/S strain is 8 116 nucleotides in length(including Poly(C) and Poly(A) tracts), and the open reading frame (ORF, 6 318 nucleo-

收稿日期: 2008-02-29

基金项目: 国家科技支撑计划课题(2006BAD06A03); 国家高技术研究发展计划(2006AA10A204)

作者简介: 常艳燕(1982-), 女, 河南襄城人, 硕士生, 主要从事病毒分子生物学与致病机理研究, E-mail: cyanyan\_820116@163.com

\* 通讯作者: 刘湘涛, Tel: 0931-8342710, E-mail: hnxiangtao@hotmail.com

tides which encode 2 106 amino acids) is flanked by a 5' non-coding region (5'-NCR) of 1 064 nucleotides (including 41 C residues Poly(C) tract) and a 3'-NCR of 131 nucleotides (including the Poly(A) tail at least 38 A residues). Recombinant plasmid of pP<sub>1</sub> FMDVcDNA3.1(+) was transferred into BHK-21 cells with liposome and typical FMDV pathological changes were observed in subculture. The electron microscope, CPE, animal test, RT-PCR and sequencing analysis verified that FMDV China99/S was rescued.

**Key words:** foot-and-mouth disease virus; full-length cDNA clone; Poly(C); reverse genetics

口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus, FMDV)属小 RNA 病毒科(Picornaviridae),口蹄疫病毒属(Aphthovirus),主要引起偶蹄兽发生口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)。FMD 是一种烈性传染病,国际兽疫组织(OIE)一直将其列在“A 类动物疫病名单”之首,我国将其列为一类传染病。FMDV 具有高度变异性,其基因组的变异往往影响到病毒毒力、宿主嗜性以及抗原性等多方面的变化<sup>[1]</sup>。FMDV 有 7 个血清型、多种亚型以及“准种”,因此造成多种变异株的存在,使 FMD 广泛流行,难以消灭<sup>[1-2]</sup>。其中 O 型“泛亚(PanAsia)系”FMD 于 1990 年在印度暴发,随后迅速席卷了中东和东欧,继续向东扩散,于 1999 年传入中国大陆,并波及到中国台湾省、韩国、日本、蒙古和俄罗斯等,于 2000 年末在南非出现。2001 年传入英国,造成大约 123 亿至 138 亿美元<sup>[3-4]</sup>的损失,这就是著名的 2001 年英国 FMD 暴发事件,它将 FMD 的暴发推向高潮。随后它又传播到欧洲大陆<sup>[5]</sup>。经分析,1997 年中国台湾暴发的 FMD 与 1999 年在中国大陆暴发的 FMD 有明显不同的表型,大陆毒株自然状态仅感染牛羊,而 1997 年台湾毒株对猪表现高致病性<sup>[6-7]</sup>。为了从分子遗传学角度探讨这种宿主变异和毒力变化的分子基础,作者从猪体内分离到 1 株 O 型 FMDV(命名为 China99/S 株),其在遗传地位上与台湾猪源毒在一个进化支,作者拟用它来建立 FMDV 的反向遗传操作系统。构建忠实性全长 cDNA 是 RNA 病毒反向遗传操作的前提,作者借助高效转录系统<sup>[8]</sup>构建该毒株的全长 cDNA 克隆,并对其感染性鉴定,从而为建立 FMDV 反向遗传操作系统、研究 FMDV 致病机理、分子变异机制,以及研制新型基因疫苗奠定物质基础。

## 1 材料与方法

### 1 材料

1.1.1 病毒株、载体和参考序列 猪源 O 型 FM-

DV China99/S 株由国家口蹄疫参考实验室采集并保存。载体 pP<sub>1</sub> cDNA3.1(+)含有聚合酶 I (polymase, pol I)启动子和终止子序列,为本课题组设计构建。

参考序列 AJ539137、AJ539138、AJ539139、DQ404177、DQ404180、AY593832、DQ989306、AY390432、EF149009、EF149010、AF511039、AY359854、AF308157、AY593835、AY593833、AF026168、EF175732、DQ248888,均引自 GenBank。

1.1.2 酶和试剂 工具酶(限制性内切酶、T4 连接酶和 DNA 聚合酶等)和 RNA 提取试剂盒(Rnaeasy mini kit),分别购自大连宝生物工程有限公司和 Qiagen 公司; SMART<sup>TM</sup> cDNA 末端快速扩增(RACE)试剂盒和 Advantage<sup>TM</sup> PCR 扩增试剂盒,均为 Clontech 公司产品。大肠杆菌 JM109 购自 Promega 公司。pMD18-T 载体和大肠杆菌 JM109 为宝生物大连有限公司产品。DMEM 和犊牛血清分别为美国 Gibco 公司和 Hyclone 公司产品;Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 转染试剂盒为 Invitrogen 公司产品。

1.1.3 引物设计与合成 根据口蹄疫参考序列(DQ248888)和 pP<sub>1</sub> cDNA3.1(+)多克隆位点,利用 DNASTar 软件引物设计,组装含有全长 cDNA 的重组质粒。全部引物均由宝生物工程大连有限公司合成。具体引物如表 1 所示。

1.1.4 实验动物 3 日龄乳鼠,由兰州兽医研究所实验动物中心提供。

## 1.2 方法

1.2.1 O 型 FMDV China99/S 株全长构建

1.2.1.1 病毒总 RNA 的提取和 RT:把保存的猪源 O 型 FMDV China99/S 株组织样品磨碎,按 Rnaeasy mini 试剂盒说明书操作步骤提取总 RNA。然后按转录试剂盒说明,分别以 A-low、B-low、C-low 和 T-d(t)进行反转录,RT 体系:总 RNA 10

表 1 扩增和构建 FMDV China99/S strain 株全长 cDNA 所使用的引物

Table 1 Primers used for constructing and sequencing the full-length genome of FMDV China99/S strain

引物 Primer	序列 Nucleotide sequence
A-up	5'-CAATCGTCTCTGGATTGAAAGGGGGCGCTAGGGTCTCATC-3'
A-low	5'-AATGGATCCACCCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGTAA-3'
B-up	5'-CAATCGTCTCTCCCGGGCCCCCCCCCCCCCCCCCAAGTT-3'
B-low	5'-AGCCCCGCGGATCCCTGGTCTTTCCAGG-3'
C-up	5'-TTGAAAGGGGGCGCTAGGGTCTCA-3'
C-low	5'-ACGGCGTGCAAAGGAGAGGATAGCC-3'
E-up	5'-CATTGGATCCTACTGCTCGTGCGTCTCCCGATCGATGC-3'
T-d(t)	5'-GTCGACCTCCGAAGTTGGGGGGG(T)-3'
T-d(T)	5'-TGTTGTCTAGCGCCCGGAGTACTGGTCTCCGAAGTTGGGGG-3'

$\mu\text{L}$ , dNTPs  $4 \mu\text{L}$ ,  $5 \times$  缓冲液  $4 \mu\text{L}$ , A-low 引物  $1 \mu\text{L}$ , AMV 逆转录酶  $1 \mu\text{L}$ ,  $42^\circ\text{C}$  反转录  $1 \text{h}$ , 制备第一链 cDNA。

1.2.1.2 FMDV 5' 端基因的扩增: 以 A-low 引物反转录出的产物为模板, 以 A-low 和 A-up 为上、下游引物进行双循环 PCR<sup>[9]</sup>, PCR 程序:  $94^\circ\text{C}$  预变性  $2 \text{min}$ ;  $94^\circ\text{C}$  变性  $1 \text{min}$ ,  $56^\circ\text{C}$  退火  $1 \text{min}$ ,  $72^\circ\text{C}$  延伸  $1 \text{min}$ , 循环  $10$  次;  $94^\circ\text{C}$  变性  $1 \text{min}$ ,  $57^\circ\text{C}$  退火  $1 \text{min}$ ,  $72^\circ\text{C}$  延伸  $1 \text{min}$ , 循环  $20$  次; 最后  $72^\circ\text{C}$  延伸  $10 \text{min}$ 。体系为  $50 \mu\text{L}$ 。将扩增产物命名为 A。而后以 B-up 和 B-low 为上、下游引物进行扩增, PCR 程序为  $94^\circ\text{C}$  预变性  $2 \text{min}$ ;  $94^\circ\text{C}$  变性  $40 \text{s}$ ,  $50^\circ\text{C}$  退火  $40 \text{s}$ ,  $72^\circ\text{C}$  延伸  $3 \text{min}$ ,  $35$  个循环; 最后  $72^\circ\text{C}$  延伸  $2 \text{min}$ 。扩增产物命名为 B。

1.2.1.3 FMDV 3' 端基因的扩增: 以 T-d(t) 引物反转录产物为模板, 以 C-up 和 C-low 为上、下游引物扩增, PCR 程序为  $94^\circ\text{C}$  预变性  $2 \text{min}$ ,  $94^\circ\text{C}$  变性  $1 \text{min}$ ,  $56^\circ\text{C}$  退火  $1 \text{min}$ ,  $72^\circ\text{C}$  延伸  $2 \text{min}$ , 进行  $35$  个循环; 最后  $72^\circ\text{C}$  延伸  $10 \text{min}$ 。扩增产物命名为 C。FMDV 的 3' 末端采用 3'RACE 原理进行扩增, 以 E-up 和 T-d(t) 为引物, 以该扩增产物的回收产物为模板, 用 E-up 和 T-d(T) 为引物, 进行二次扩增。扩增采用退火温度降落的双循环 PCR<sup>[9]</sup>, PCR 程序:  $94^\circ\text{C}$  预变性  $2 \text{min}$ ;  $94^\circ\text{C}$  变性  $1 \text{min}$ ,  $58^\circ\text{C}$  退火  $1 \text{min}$ ,  $72^\circ\text{C}$  延伸  $2 \text{min}$ , 循环  $10$  次; 然后  $94^\circ\text{C}$  变性  $1 \text{min}$ ,  $57^\circ\text{C}$  退火  $1 \text{min}$ ,  $72^\circ\text{C}$  延伸  $1 \text{min}$ , 循环  $20$  次; 最后  $72^\circ\text{C}$  延伸  $10 \text{min}$ 。将扩增产物命名为 E。

1.2.1.4 FMDV 5' 端基因的克隆: 分别将 A、B 进行纯化回收, 用 *BsmB* I 和 *Xma* I 酶切 A 和载体 pP<sub>1</sub> cDNA3.1(+), 然后定向克隆, 得到的重组质粒命名为 pP<sub>1</sub> AcDNA3.1(+); 用 *Bam*H I 和 *Xma* I

酶切 B 和质粒 pP<sub>1</sub> AcDNA3.1(+), 定向克隆得到重组质粒, 命名为 pP<sub>1</sub> ABcDNA3.1(+). 然后对其进行 PCR、酶切鉴定和序列测定。

1.2.1.5 FMDV 3' 端基因的克隆: 用 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切 pP<sub>1</sub> ABcDNA3.1(+), 纯化回收并进行定向克隆, 得到的阳性重组质粒命名为 pP<sub>1</sub> ABcDNA3.1(+); 用 *Hpa* I 和 *Kpn* I 双酶切 C 和 pP<sub>1</sub> ABcDNA3.1(+), 纯化回收后连接, 得到含有 FMDV China99/S 全长 cDNA 的质粒, 命名为 pP<sub>1</sub> FMDVcDNA3.1(+), 全长 cDNA 分子构建的技术路线见图 1。

1.2.2 FMDV China99/S 株系统发生树分析 以 pP<sub>1</sub> FMDVcDNA3.1(+), 对 FMDV China99/S 进行全基因组测序。将测序结果与参考序列进行遗传进化分析, 绘制系统发生树, 分析 China99/S 株与其他毒株的遗传进化关系及遗传位置。

1.2.3 pP<sub>1</sub> FMDVcDNA3.1(+), 转染 BHK-21 细胞 在 BHK-21 细胞生长至  $70\% \sim 90\%$  单层时, 用 OPTI-MEMI 培养基清洗细胞, 在脂质体 Lipfection 2000 的介导下将  $4 \mu\text{g}$  pPFMDVcDNA3.1(+), 转染 BHK-21,  $37^\circ\text{C}$  孵育  $4 \text{h}$  后用含有  $10\%$  胎牛血清的 DMEM 更换转染培养基。继续培养, 观察细胞病变出现情况, 待细胞出现  $90\%$  左右病变时收获病毒。冻融  $3$  次后再次接种 BHK-21 细胞, 直到病毒能稳定产生细胞病变效应 (CPE), 得到的病毒命名为 pFMDV。

1.2.4 拯救病毒的鉴定

1.2.4.1 BHK-21 细胞病变效应 (CPE): 转染后  $48 \text{h}$  收集细胞, 冻融  $3$  次后离心取上清, 按  $10\%$  的比例接种至  $80\% \sim 90\%$  的正常 BHK 单层细胞, 观察其

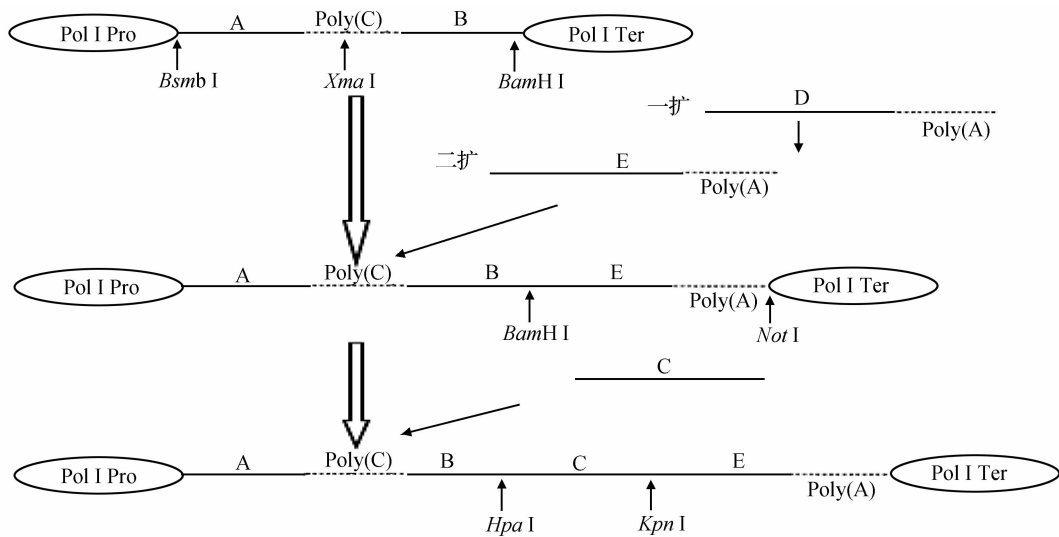


图 1 全长 cDNA 构建示意

Fig. 1 Construction process of the full length cDNA

细胞病变效应, 如果第 2 代无 CPE, 继续传代, 直到出现典型的 CPE。

1.2.4.2 动物试验: 收集第 5 代的病变细胞液, 冻融 3 次, 使病毒粒子充分释放,  $4^{\circ}\text{C}$   $5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10~15 min, 除去细胞碎片后, 取上清皮下接种 3 日龄乳鼠 ( $0.2\text{ mL}\cdot\text{只}^{-1}$ ), 同时设一组空白对照 (接种细胞培养液), 观察乳鼠的发病情况。

1.2.4.3 RT-PCR 法检测病毒基因组以及对遗传标记的测定: 收集出现细胞病变的培养液上清, 反复冻融 3 次, 用 Rneasy mini Kit 提取病毒 RNA, 用 T-d(t) 引物反转录出 cDNA 第一链, 然后用 T-d(T) 和 E-up 引物进行 PCR, 用来扩增 FMDV 的全基因组 3' 端序列, 并对扩增产物进行序列测定。

1.2.4.4 电镜观察病毒粒子: 收集 200 mL 病毒液, 反复冻融 3 次, 然后在病毒液中加入 1% Triton X-100 室温震荡 30 min;  $4^{\circ}\text{C}$   $6\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 40 min; 取上清液加入 8% (w/v) PEG-6000 和 4% (w/v) NaCl, 充分搅拌 6 h;  $4^{\circ}\text{C}$  过夜;  $4^{\circ}\text{C}$   $7\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 50 min; 弃上清, 沉淀用 pH 7.6 的 NET 缓冲液 ( $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl,  $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA,  $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl) 悬浮至原体积 1/50, 充分匀浆后加 2 倍体积的三氯乙烯于密闭容器中强烈震荡 5 min 使其乳化, 然后  $4^{\circ}\text{C}$   $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 20 min; 取上清, 于  $4^{\circ}\text{C}$   $45\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  超速离心 3 h; 弃上清, 沉淀用 NET 缓冲液悬浮, 做常规负染色, 置 H-7100FA 电子显微镜下观察病毒粒子。

## 2 结果

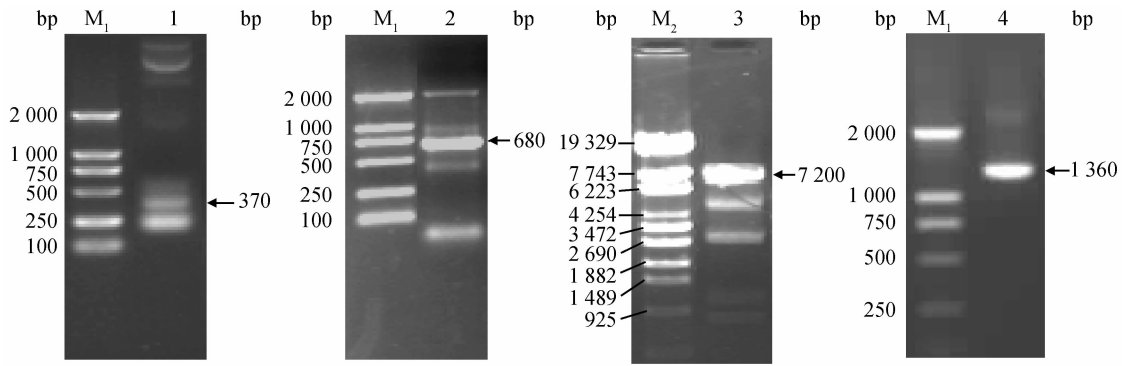
### 2.1 O 型 FMDV China99/S 株全长构建

2.1.1 目的基因的扩增 应用所设计的 4 对特异性引物, 扩增出 A、B、C、E 预期基因片段, 大小分别约为 370、680、7 200、1 360 bp (图 2), 与预期相符。测序结果表明, 所得到的序列为 FMDV China99/S 株基因。

2.1.2 全长 cDNA 的拼接及初步鉴定 以重组质粒 pP<sub>I</sub> FMDVcDNA3.1 (+) 为模板, 分别用引物对 (A-up 和 A-low) 和 (B-up 和 T-d(t)) 进行 PCR, 分别得到 370 和 7 800 bp 的片段; 同时用 BamHI 对 pP<sub>I</sub> FMDVcDNA3.1 (+) 进行单酶切鉴定, 用 BsmBI/NotI 对 pP<sub>I</sub> FMDVcDNA3.1 (+) 进行双酶切鉴定, 也得到了约 8 200 bp 的片段 (图 3); 对全长 cDNA 分子进行测序, 结果表明, 所得序列没有致死性突变, 读码框正确, 符合深入研究的要求。

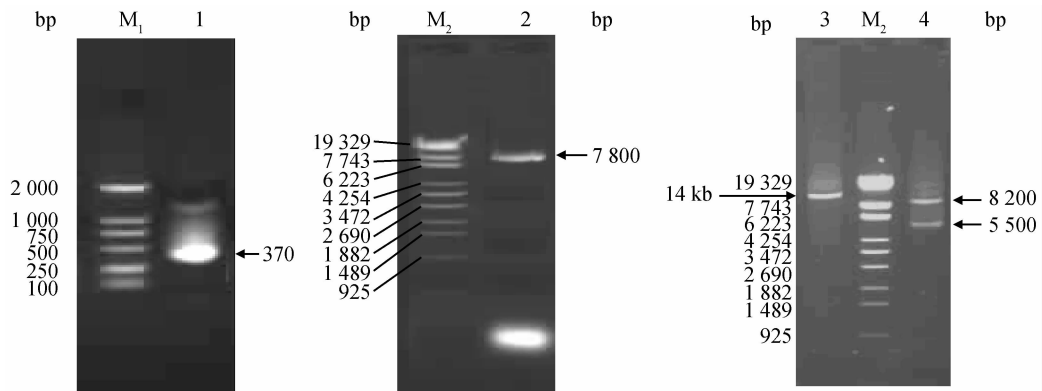
### 2.2 FMDV China99/S 株的基因结构和系统进化树分析结果

测序结果显示, 序列含有各个基因结构, 并且各个基因的大小与已知相符 (表 2)。China99/S 株全基因组序列 8 116 nt, 5' NCR 1 064 nt, 毒株蛋白编码区核苷酸序列 6 318 nt, 编码 1 个 2 106 个氨基酸的聚合蛋白, 3' NCR 93 nt, 其后是含有 38 个 A 碱基的 Poly(A) 尾。其中在 5' 端 373 处引入了 41 个 C 的 Poly(C) 序列。全序列分析, 没有终止突变, 开



M<sub>1</sub>. DL2000 marker; 1. A 片段; 2. B 片段; 3. C 片段; 4. E 片段; M<sub>2</sub>. λ-EcoT14 I digest  
 M<sub>1</sub>. DL2000 marker; 1. A fragment; 2. B fragment; 3. C fragment; 4. E fragment; M<sub>2</sub>. λ-EcoT14 I digest  
**图 2 PCR 扩增结果**

**Fig. 2 The result of PCR amplification**



M<sub>1</sub>. DL2000 marker; 1. A-up, A-low 鉴定 PCR; M<sub>2</sub>. λ-EcoT14 I digest; 2. B-up, T-d(t) 鉴定 PCR; 3. BamH I 对全长质粒单酶切鉴定结果; 4. BsmB I 和 Not I 对全长质粒双酶切鉴定结果  
 M<sub>1</sub>. DL2000 marker; 1. A-up, A-low identified PCR; M<sub>2</sub>. λ-EcoT14 I digest; 2. B-up, T-d(t) identified PCR; 3. Single digestion in full-length plasmid by BamH I; 4. Double digestion in full-length plasmid by BsmB I and Not I

**图 3 pP<sub>1</sub> FMDVcDNA3. 1(+ ) 的 PCR 和酶切鉴定**

**Fig. 3 Restrictive enzyme and PCR analysis of recombinant plasmid of pP<sub>1</sub> FMDVcDNA3. 1(+ )**

**表 2 FMDV China99/S 基因组结构**

**Table 2 The genome organization of FMDV China99/S strain**

基因组 Genome	5'NCR	L	VP4	VP2	VP3	VP1	2A	2B	2C	3A	3B	3C	3D	3'NCR
核苷酸 Nucleotide	1 064	603	639	660	654	207	48	462	954	429	213	639	1 413	131
氨基酸 Amino acid		201	213	220	218	69	16	154	318	143	71	213	471	

放阅读框能够被正确编码,符合深入做下游工作的要求。

系统进化树分析结果显示, FMDV China99/S 株与 1997 年中国台湾流行的猪源毒株关系较近,形成同一进化分支。而泛亚系毒株形成另一个进化分支(图 4)。这 2 个进化分支的毒株与我国流行的 O 型毒株关系较远(图 4)。

**2.3 拯救病毒的鉴定**

2.3.1 BHK-21 细胞的病变效应(CPE) 将转染后 48 h 收集的细胞上清液连续传代,传至第 3 代时,细胞出现圆缩、核致密化等细胞病变,而平行传代的阴性对照细胞生长良好,说明所构建的全长 cDNA 转录本具有感染性(图 5-A、B)。

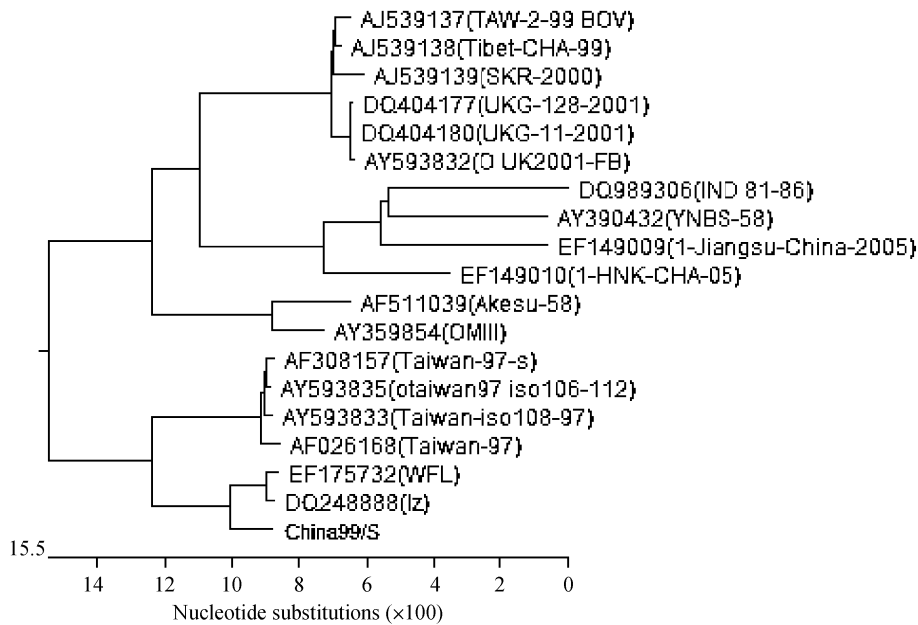
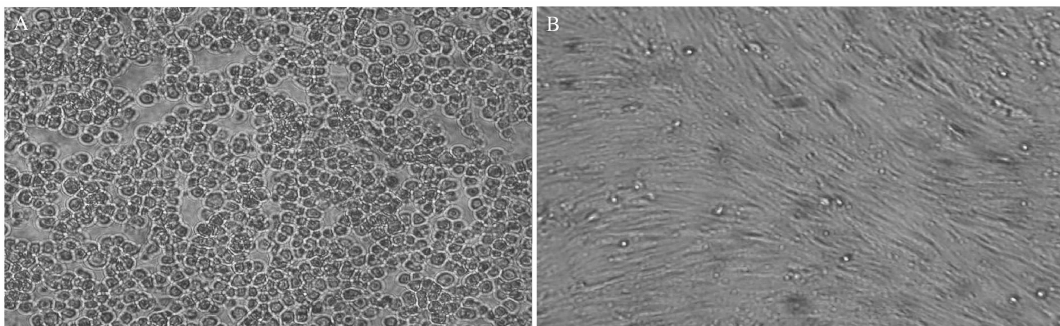


图 4 FMDV China99/S 全基因组系统发生树

Fig. 4 FMDV China99/S full genomic phylogenetic tree



A. 转染后的 BHK-21 细胞; B. 正常的 BHK-21 细胞

A. BHK-21 cells infected by the plasmid; B. Normal BHK-21 cells

图 5 转染 BHK-21 细胞所产生的 CPE 100×

Fig. 5 CPE on infected BHK-21 cells 100×

2.3.2 动物试验 皮下接种乳鼠, 18 h 后开始发病, 症状不典型; 24 h 后, 乳鼠出现神经症状, 表现为运动不灵活, 用镊子夹尾巴和四肢反应迟钝, 叫声嘶哑; 48 h 乳鼠出现四肢僵直、呼吸困难等症状, 72 h 接种的乳鼠全部死亡, 而对照组乳鼠健康, 说明所接种的细胞毒具有致病性。

2.3.3 RT-PCR 法检测病毒基因组以及对遗传标记的测定 从转染后第 1 代、第 2 代、第 3 代的病毒液中提取总 RNA, 用 T-d(t) 反转录出 cDNA 第一链, 然后用 T-d(T) 和 E-up 引物进行 PCR, 扩增产物用琼脂糖凝胶电泳分析。结果表明所扩增的目的产物与预期大小一致, 扩增产物约 1 600 bp, 说明培

养细胞中有 FMDV。

2.3.4 电镜观察病毒粒子 将处理后的病毒液负染后, 置于电子显微镜下观察, 看到直径为 20~25 nm 的 FMDV 病毒粒子(图 6)。

### 3 讨论

反向遗传学技术是研究 RNA 病毒分子致病机制的有效途径之一。其核心是将已构建好的全长 cDNA 受控于 RNA 聚合酶启动子和终止子之间, 然后通过体内/体外转录过程得到病毒 RNA, 从而导入到哺乳动物细胞或宿主体内, 最终拯救到活病毒。

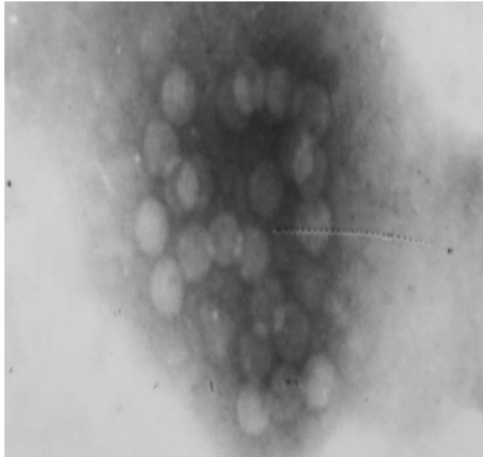


图 6 电镜下 FMDV 病毒粒子 50 000×  
Fig. 6 Electron microscope of FMDV particles structure 50 000×

获得忠实性全长 cDNA 是制备感染性克隆转录本的关键<sup>[10]</sup>。FMDV 5' NCR 具有一段特殊的 Poly(C)序列,其长度从 100 到 420 个核苷酸不等,其含有 90% 以上的 C 碱基,掺有少量的 A 和 U 碱基<sup>[11]</sup>。该结构与病毒的感染性密切相关<sup>[12-13]</sup>,它是 FMDV 具有感染性的重要元件。为了成功构建忠实性 FMDV 全长 cDNA 分子,笔者在利用高保真 DNA 聚合酶的基础上,采用 PCR 扩增融合方法,将 Poly(C)分 2 部分直接在引物中合成,然后利用限制性内切酶消化后连接,最后得到的全长 cDNA 克隆中 Poly(C)序列含有 41 个 C 碱基。这足以满足病毒拯救所要求的 Poly(C)长度。而要保证病毒全长 cDNA 转录本具有感染性,同时需要使其带有一定数目的 Poly(A)尾巴<sup>[14]</sup>。Grubman 等研究了 Poly(A)对感染性的影响<sup>[15]</sup>,初步认为 Poly(A)的长度应该满足一个最低阈值,必须具有 15~60 个 A 尾,多者达 230 个。但是在实验操作中,获得能够满足感染性要求碱基长度的 Poly(A)并不容易。作者通过 DNASTar 软件分析,综合考虑各方面因素<sup>[16]</sup>,先锁定含有 38 个 T 碱基的下游引物,按 3'端 PCR 片段扩增程序,扩增出特异目的带,从而用扩增的方法获得了 38 个 A 的 FMDV Poly(A)尾,很好地满足了病毒感染性对 Poly(A)碱基数的要求。

在获得忠实性病毒全长 cDNA 的基础上,利用不同的转录系统制备病毒基因组 RNA 来达到拯救病毒的目的,需采用相对应的措施。作者采取聚合酶 I 转录系统进行病毒拯救。在该系统的应用中,

需要在病毒基因组 5'端引入聚合酶 I 启动子序列,在 3'端引入聚合酶 I 终止子序列(以上均提前构建于载体中)。RNA 聚合酶 I 系统的建立在拯救 RNA 病毒方面扮演着重要角色。首先, RNA 聚合酶 I 是细胞核内含量丰富的酶,它能转录出精确的 rRNA;其次,该酶能在特定的启动子和终止子序列处启动/终止转录。在 2006 年,郑海学等利用聚合酶 I 系统,首次成功拯救出 SVDV<sup>[17]</sup>。同年,Flatz 等研究表明聚合酶 I 适合拯救细胞质拯救的病毒,并成功拯救出负链 RNA 病毒(以 LCMV 为模型),证明聚合酶 I 能够转录大约 7.6 kb 的基因<sup>[18]</sup>。而 FMDV 的基因组约 8.2 kb,且含有 Poly(C)片段,因此聚合酶 I 对 FMDV 基因的成功转录首次证明聚合酶 I 有转录 8.2 kb 基因(内含 41 个 C 碱基的 Poly(C)片段)的能力。

由于反向遗传学技术使病毒全基因组从 RNA 经历了 DNA 阶段,从而可以达到从 DNA 水平上进行体外操作(突变、缺失、插入和替换等)的目的,有助于研究 RNA 病毒介导的复杂感染过程,成为病毒分子生物学及应用研究极为有价值的工具。将为研究 FMDV 功能基因组学、致病和变异的分子机制提供一个操作平台,为研制嵌合病毒、基因缺失疫苗和标记疫苗奠定坚实的基础。

#### 参考文献:

- [1] DOMINGO E, ESCARMIS C, BARANOWSKI E, et al. Evolution of foot-and-mouth disease virus[J]. *Virus Res*, 2003, 91:47-63.
- [2] HAYDON D T, SAMUEL A R, KNOWLES N J. The generation and persistence of genetic variation in foot-and-mouth disease virus [J]. *Prev Vet Med*, 2001, 51:111-124.
- [3] SCUDAMORE J M, HARRIS D M. Control of foot and mouth disease; lessons from the experience of the outbreak in Great Britain in 2001 [J]. *Rev Sci Tech Off Int Epizoot*, 2002, 21:699-710.
- [4] THOMPSON D, MURIEL P, RUSSELL D, et al. Economic costs of the foot-and-mouth disease outbreak in the United Kingdom in 2001 [J]. *Rev Sci Tech Off Int Epizoot*, 2002, 21:675-687.
- [5] 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, 148:258-259.
- [6] DUNN C S, DONALDSON A I. Natural adaption to

- pigs of a Taiwanese isolate of foot-and-mouth disease virus[J]. *Vet Rec*, 1997, 141:174-175.
- [7] YANG P C, CHU R M, CHUNG W B, et al. Epidemiological characteristics and financial costs of the 1997 foot-and-mouth disease epidemic in Taiwan[J]. *Vet Rec*, 1999, 145:731-734.
- [8] 郑海学. 动物 RNA 病毒反向遗传系统的研究和建立 [D]. 兰州: 中国农业科学院兰州兽医研究所, 2007.
- [9] 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.
- [10] BOYER J C, HAENNI A I. Infectious transcript and cDNA clones of RNA viruses [J]. *Virology*, 1994, 198(2): 415-426.
- [11] COSTA GIOMI M P, BERGMANN I E, SCODELLER E A, et al. Heterogeneity of the polyribocytidylic acid tract in aphthovirus: biochemical and biological studies of viruses carrying polyribocytidylic acid tracts of different lengths[J]. *Virology*, 1984, 51: 799-805.
- [12] 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]. *EMBOJ*, 2001, 20:1439-1448.
- [13] HEROLD J, ANDINO R. Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge [J]. *Cell*, 2001, 7:581-591.
- [14] BAXT B, GRUBMAN M J, BACHRACH H L. The relation of poly (A) length to specific infectivity of viral RNA: a comparison of different types of foot-and-mouth disease virus[J]. *Virology*, 1979, 98: 480-483.
- [15] GRUBMAN M J, BAXT B, BACHRACH H L. Foot-and-mouth disease virion RNA: studies on the relation between the length of its 3'-poly(A) segment and infectivity[J]. *Virology*, 1979, 97 (1): 22-31.
- [16] NAM D K, LEE S, ZHOU G, et al. Oligo (dT) primer generates a high frequency of truncated cDNAs through internal poly(A) priming during reverse transcription [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99 (9): 6152-6156.
- [17] 郑海学, 刘湘涛, 尚佑军, 等. 猪水泡病病毒 HK'1/70 株基因组全长 cDNA 的构建及其序列测定[J]. 病毒学报, 2007, 23(1): 51-57.
- [18] FLATZ L, BERGTHALER A, DE LA TORRE J C, et al. Recovery of an arenavirus entirely from RNA polymerase I/II-driven cDNA [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(12): 4663-4668.

## 动物疫情速递

### 尼泊尔发生高致病性禽流感

2009 年 1 月 16 日, 尼泊尔 Mainali Purushottam Prasad 博士向 OIE 通报了高致病性禽流感疫情。疫情始于 2009 年 1 月 8 日, 于 1 月 16 日确诊。此次疫情是临床发病, 病原是 H5N1 高致病性禽流感病毒, 依靠实验室检测作出诊断, VLA Weybridge (OIE 参考实验室) 的 Real-time PCR 和中央疾病调查研究室 (国家实验室) 的 PCR 结果均为阳性。疫区位于梅吉大区 Jhapa 地区的 Nagaar Nagarpalika 村, 易感动物为后院家禽, 共涉及 13 000 只, 其中 14 例病例全部死亡, 未予销毁, 将于 1 月 17 日开始淘汰。感染来源尚不清楚。尼泊尔采取的控制措施有检疫、国内限制移运、区域化和染疫场区消毒, 并禁止免疫, 未对动物进行治疗。即将采取扑杀措施。尼泊尔上一次发生高致病性禽流感是 1996 年 12 月。

### 意大利发生蓝舌病

2009 年 1 月 15 日, 意大利 Romano Marabelli 博士向 OIE 通报了蓝舌病疫情。疫情始于 2008 年 12 月 9 日, 于 2009 年 1 月 8 日确诊。此次疫情不是临床发病, 病原是蓝舌病病毒血清型 8 型, 依靠实验室检测作出诊断, 系在监测活动中检出, 实验动物疾病研究所 (国家实验室) 的血清中和试验和 Real-time PCR 结果均为阳性。疫区位于皮埃蒙特省 CUNEO 地区 BUSCA 的养殖场, 易感动物是牛, 有 145 头易感牛, 病例 13 例, 未出现死亡, 未予销毁。感染来源尚不清楚, 可能来自媒介。意大利目前未采取控制措施, 未禁止免疫, 未对动物进行治疗。意大利上一次发生蓝舌病是 2009 年 9 月。

(摘译自 OIE 网站)