

# 口蹄疫病毒 Asia1/JS/China/2005 株基因组 全长感染性克隆的构建

李平花<sup>1</sup>, 白兴文<sup>1</sup>, 卢曾军<sup>1</sup>, 孙 普<sup>1</sup>, 郭建宏<sup>1</sup>, 曹伟军<sup>2</sup>,  
刘湘涛<sup>1</sup>, 殷 宏<sup>1\*</sup>, 刘在新<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实验室, 国家口蹄疫参考实验室,  
兰州 730046; 2. 甘肃农业大学, 兰州 730070)

**摘 要:** 利用长距离 RT-PCR 技术扩增病毒基因组 3' 端覆盖口蹄疫病毒 Asia1/JS/China/2005 株近全长的 3 个片段(共约 7.5 kb), 并利用单一酶切位点将其分别克隆到 pBluescriptSK+ 载体上。利用融合 PCR 扩增到基因组 5' 端含有 15 个 C 碱基的基因片段(约 700 bp), 并将其连接至 pGEM-T 载体。最后将这 4 个片段的阳性克隆装配至剔除 T7 启动子的低拷贝载体 pcDNA3.1/Zeo(+), 中构建该病毒株的全长 cDNA 克隆。以构建的 FMDV Asia1/JS/China/2005 株全长 cDNA 为模板, 使用 T7RNA 聚合酶在体外转录得到病毒 RNA, 通过脂质体将其导入 BHK 细胞获得拯救病毒。对收获的病毒分别用 RT-PCR、间接免疫荧光、电子显微镜观察和乳鼠致病性分析结果证实, 通过体外转录获得了具有感染性的口蹄疫病毒。该株感染性克隆的构建为深入研究口蹄疫病毒的致病机制及研制新型疫苗等奠定了基础。

**关键词:** 口蹄疫病毒; Asia1/JS/China/2005 株; 全长 cDNA; 转录物 RNA; 病毒拯救

**中图分类号:** S852.659.6; Q78

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0366-6964(2009)05-0706-06

## Construction of an Infectious Full-length cDNA Clone of Foot-and-mouth Disease Virus Asia1/JS/China/2005 Strain

LI Ping-hua<sup>1</sup>, BAI Xing-wen<sup>1</sup>, LU Zeng-jun<sup>1</sup>, SUN Pu<sup>1</sup>, GUO Jian-hong<sup>1</sup>,  
CAO Wei-jun<sup>2</sup>, LIU Xiang-tao<sup>1</sup>, YIN Hong<sup>1\*</sup>, LIU Zai-xin<sup>1\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Key Laboratory of Animal  
Virology of Ministry of Agriculture, National Foot-and-Mouth Disease Reference  
Laboratory, Lanzhou Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural  
Sciences, Lanzhou 730046, China; 2. Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** Three overlapping cDNA fragments covering the approximate FMDV full genome (7.5kb) of the 3' end viral genome were amplified using long RT-PCR and were cloned into pBluescriptSK+ vector with unique restriction sites, respectively. A fragment (about 0.7 kb) including 15 C of the 5' end viral genome was amplified by over-lap PCR and was cloned into pGEM-T vector. All positive clones were assembled into a low copy number vector pcDNA3.1/Zeo(+), which was removed T7 promoter in the vector sequence and constructed FMDV Asia1/JS/China/2005 full-length cDNA clone. RNA was synthesized *in vitro* using T7 polymerase, the

收稿日期: 2008-07-27

基金项目: 国家“973”项目(2005CB523201)

作者简介: 李平花(1973-), 女, 甘肃武威人, 博士生, 助理研究员, 主要从事口蹄疫病毒反向遗传学研究, Tel: 0935-8342667, E-mail: xiaoxiaoye-zhi510@sohu.com

\* 通讯作者: 刘在新, 研究员, 博士生导师, 主要从事动物病毒免疫学和分子生物学研究, E-mail: liukey@public.lz.gs.cn; 殷 宏, 研究员, 博士生导师, 主要从事家畜寄生虫病的病原特性和流行病学的研究, E-mail: yinhong@public.lz.gs.cn

infective virus was obtained by transfecting the RNA into BHK-21 cells. The rescued virus was identified by the RT-PCR, indirect immunofluorescence, electron microscope and sulk mice pathogenicity, the results showed infectious FMDV was rescued successfully. The full-length infectious cDNA clone will lays the basis for elucidating the mechanism of pathogenesis of FMDV and developing novel vaccines against FMD.

**Key words:** foot-and-mouth disease virus ; Asia1/JS/China/2005 strain; full-length cDNA ; transcript RNA; virus rescues

口蹄疫是由口蹄疫病毒(Foot-and-Mouth Disease Virus, FMDV)引起的牛、羊、猪等偶蹄动物的一种急性、热性、高度接触性传染病<sup>[1]</sup>。FMDV 属于小 RNA 病毒科(Picornaviridae)口疮病毒(Aphthotvirus)属。该病毒分为 7 个血清型(A、O、C、Asia1、SAT1、SAT2 和 SAT3 型),在世界范围内广泛流行。我国也是口蹄疫危害较严重的国家,其中 O 和 A 型 FMD 曾对我国畜牧业的发展构成严重的威胁。2005 年,Asia1 型 FMD 在我国一些地区发生并蔓延开来,为我国口蹄疫的防制增加了难度。目前对口蹄疫病毒致病的分子机制等方面的研究仍不十分清楚,在基因水平上研究口蹄疫病毒的分子致病机制等必须借助反向遗传学技术。其具体方法是通过反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)扩增 RNA 病毒全基因组的 cDNA 片段,然后利用其限制性酶切位点,将 cDNA 片段顺次相连并克隆于合适的载体,获得病毒基因组全长 cDNA 克隆。然后将全长 cDNA 或体外转录本 RNA 直接转染敏感细胞,在细胞内转录并包装出感染性病毒粒子。由于这种病毒拯救来自病毒的全长 cDNA 分子,因此可以在 DNA 水平上对病毒基因组进行各种修饰或改造,然后通过拯救病毒的表型变化来判定这些基因操作的效果,从而可对 RNA 病毒的致病机理、致病机理、病毒各蛋白功能、宿主嗜性和 DNA 疫苗等进行深入的研究。为此,作者构建了 FMDV Asia1/JS/China/2005 株的感染性 cDNA,为深入进行口蹄疫病毒的致病、致病机制和蛋白质功能等方面的研究建立了坚实的技术平台,为进一步研究 FMDV,发展新的控制疾病方法提供新的工具。

## 1 材料与方 法

### 1.1 病毒株和细胞株

BHK 细胞由作者实验室保存。FMDV Asia1/JS/China/2005 株 BHK 细胞适应株,由中国农业科

学院兰州兽医研究所国家口蹄疫参考实验室保存并提供。

### 1.2 引物

根据已公布的 Asia1/JS/China/2005 株的全基因组序列,设计扩增 3' 端覆盖近全长(总共约 7.5 kb)的 3 对引物和 5' 端 2 对融合 PCR 的引物(E 系列),同时设计 2 对引入分子标签引物(p 系列),由大连宝生物技术有限公司合成。其中 5' 端起始引物 E1 上游添加了 *Bam*H I 位点和 T7 启动子核心序列,在 3' 非编码区的下游添加 *Not* I 位点(图 1)。具体引物序列见表 1。

### 1.3 RT-PCR 和 cDNA 克隆构建

用 RNAeasy Mini kit(Qiagen 公司生产)提取病毒 RNA,具体操作方法按照说明书进行。利用 RT-PCR 方法,从传代的细胞毒中扩增出 3' 端 3 个相互重叠的近全基因组 cDNA 片段 E3、E4 和 E5 和 5' 2 个片段 E1(S 片段)和 E2。利用融合 PCR 将 5' 端 E1 和 E2 2 个片段融合并引入 15 个 C 碱基。为了区分拯救病毒和父本病毒,利用融合 PCR 在 E3 片段引入 2 个沉默突变作为分子标签(A 变为 G, T 变为 C,消除了其中 1 个 *Eco*R I 位点)。将引入突变的 E3 片段和 E4、E5 分别克隆到 pBluescriptSK+ 载体,并将 E1 和 E2 的融合 PCR 产物克隆到 pGEM-T 载体。将所有鉴定正确的阳性克隆进行测序,测序正确后装配到剔除 T7 启动子的低拷贝载体 pCDNA3.1/Zeo(+)*Bam*H I 和 *Not* I 位点之间,获得 FMDV 全基因组 cDNA 克隆 pFMDV-A,并对其进行测序。Asia1/JS/China/2005 株全长 cDNA 克隆的构建见图 1。

### 1.4 体外转录和转染 BHK-21 细胞

用 QIAGEN Plasmid Midi Kits 提取测序正确的重组质粒 pFMDV-A,用 *Not* I 线性化后,采用 RiboMAX<sup>TM</sup> Large Scale RNA Production Systems-T7 系统进行体外转录。反应体系: 25 mmol · L<sup>-1</sup>

表 1 构建 FMDV Asia1/JS/China/2005 株全长 cDNA 所使用的引物

Table 1 Sequence of the primers used for construction of a full-length cDNA clone of FMDV Asia1/JS/China/2005

引物 Name	序列(5'→3') Nucleotide sequence(5'→3')	位置/nt Nucleotide position
E1	TT <u>GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGTTGAAAAGGGGCGCTAGG</u>	1—21
E1'	TAAAACTTAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGTGAAG	361—390
E2	TTT <u>CACCCCCCCCCCCCCCCCCCTAAGTTT</u> TAC	362—391
E2'	CC <u>TCTAGA</u> CCTGGAAGACCAGGC	677—700
E3	AGG <u>TCTAGAGGGGTGACATTTT</u> TGT	690—713
E3'	GT <u>CTGCAGCAGAAAGGTAAGGGAT</u>	3 078—3 101
E4	CTG <u>CTGCAGACTATGCTTACACTG</u>	3 090—3 113
E4'	AAA <u>GAATTC</u> AATTGCTGCCTCATG	5 414—5 437
E5	AATT <u>GAATTCTTTGAGGGAATGGTGCAC</u>	5 425—5 452
E5'	TT <u>GCGGCCGCTTT</u> (38)	3'end
P1	TGGTCTTTCCAGG <u>TCTAGAGGGGT</u>	680—703
P1'	TGTGAAGTGTGA <u>GCTCCATC</u>	1 177—1 196
P2	GATGGA <u>GCTCACACTCACA</u>	1 177—1 196
P2'	AAC <u>CATATGTTACGCCAACACTCG</u>	2 034—2 057

引物序列中限制性内切酶识别位点和 T7 启动子序列用下划线标出,突变碱基用双下划线标出

The restriction sites and T7 promoter sequences were highlighted by underline. The mutated nucleotides were shown in double line

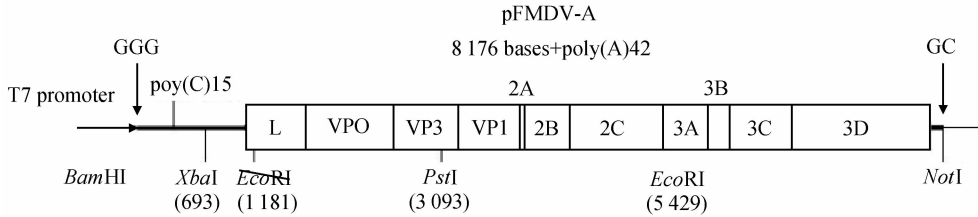


图 1 Asia1/JS/China/2005 株全长 cDNA 克隆的构建示意

Fig. 1 Schematic diagram of the full-length cDNA clone of Asia1/JS/China/2005 strain, pFMDV-A

rNTP 4  $\mu\text{L}$ ,  $5\times$ 缓冲液 5  $\mu\text{L}$ ,  $0.75 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DTT 1  $\mu\text{L}$ , T7 RNA 聚合酶混合液 2.5  $\mu\text{L}$ , 线性化的 pFMDV-A 12.5  $\mu\text{L}$ , 总体积为 25  $\mu\text{L}$ 。37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h 后加入 2  $\mu\text{L}$   $5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  RNase-Free DNase 37  $^{\circ}\text{C}$  温育 30 min 获得转录本 RNA。转录出的 RNA 用 RNAeasy Mini kit 纯化后用含有甲醛的变性琼脂糖凝胶检测 RNA 的完整性与纯度。

### 1.5 病毒拯救

BHK-21 细胞接种于六孔板内,生长至 60%~80%时,用 OPTI-MEMI 培养基清洗细胞,同时按照 1:2.5 的比例将 RNA(4  $\mu\text{g}$ )与 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000(10  $\mu\text{L}$ )转染试剂混合,室温放置 20 min 后将该复合物加至清洗过的细胞中,在含有 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 5 h,用含有 10%胎牛血清的

DMEM 更换转染培养基继续培养,观察细胞病变的出现情况,待 80%左右细胞出现病变时收获病毒,反复冻融 3 次后于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.6 拯救病毒的增殖培养

将体外转录拯救的第 1 代病毒连续传代,接种量为  $1 \text{ mL} \cdot 10 \text{ mL}^{-1}$  的细胞液,显微镜下观察出现典型细胞病变(CPE)的时间,并收获病变的细胞上清液反复冻融 3 次, $-70^{\circ}\text{C}$  冻存待用。同时检测第 3 代和 14 代拯救病毒的分子标签。

### 1.7 拯救病毒的鉴定

1.7.1 RT-PCR 检测分子标签 从转染的第 1 代 BHK 细胞上清中提取总 RNA,以 P1 和 P2'为引物扩增病毒基因的部分片段,扩增产物回收后测序、分析、比较。

1.7.2 间接免疫荧光试验 将转染转录本 RNA 8 h 后的 BHK 细胞用 PBS 缓冲液漂洗 1~2 次,吸弃残液,3.7%多聚甲醛室温固定 10 min, PBS 缓冲液洗涤 2 次后滴加 50mmol·L<sup>-1</sup>氯化铵室温作用 10 min, PBS 缓冲液洗涤 1 次,吸干残液。滴加 FM-DV Asia1 型兔阳性血清,37℃孵育 30 min,再用 PBS 漂洗 3 次,再加 FITC 羊抗兔 IgG,于 37℃湿盒中孵育 30 min,甘油封片,于 Olympus 荧光显微镜下观察并拍照。

1.7.3 电镜观察病毒粒子 将收获的第 4 代病毒反复冻融 3 次,3 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,取其上清 45 000 r·min<sup>-1</sup>离心 3 h,适量 TNE 重悬沉淀,负染后电镜观察。

1.7.4 乳鼠致病性试验 将收集转染的第 1 代病毒液皮下接种 3 日龄乳鼠,0.02 mL·只<sup>-1</sup>,观察小鼠的发病状况。同时设空白对照组(5 只)注射 PBS 缓冲液。

## 2 结果与分析

### 2.1 FMDV Asia1/JS/China/2005 株全基因组序列的扩增

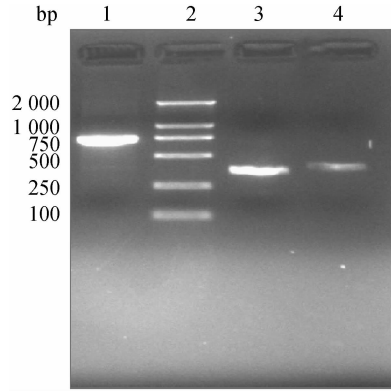
从感染 FMDV 的 BHK 细胞中提取病毒 RNA 后,以 RT-PCR 方法分别扩增出 E1、E2、E3、E4 和 E5 5 个片段,长度分别为 391、340、2 300、2 400 和 2 710 bp,与预期大小一致(见图 2、3)。以 E1、E2 片段为模板,融合到 E12 片段,大小为 700 bp(见图 2),测序表明含有 15 个 C 碱基。

### 2.2 全长 cDNA 克隆的构建

将 PCR 扩增、酶切鉴定和测序正确的 4 个克隆利用单一酶切位点顺次连接到剔除 T7 启动子的低拷贝载体 pCDNA3.1/Zeo(+),构建该病毒株的全基因组 cDNA 克隆 pFMDV-A。阳性重组质粒 pFMDV-A 测序结果表明在 5' 端上游带有 T7 启动子便于体外转录,5' 端非编码区含有 15 个胞嘧啶碱基,3' 末端含有 1 个长约 42 个多聚腺苷酸尾巴和单一限制性内切酶 *Not* I 识别位点,而且在全长基因组除了引入的分子标签外,无其它任何突变。

### 2.3 体外转录结果

采用 RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems-T7 系统进行体外转录,转录产物纯化后,用含有甲醛的变性琼脂糖凝胶进行电泳分析。结果可见约 8.2 kb 的条带,其相对分子质量与预期大小一致,表明转录物 RNA 是完整的(图 4)。

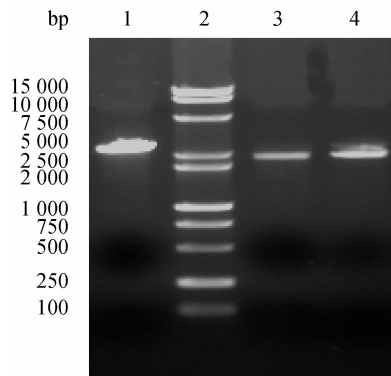


1. E1 和 E2 PCR 融合片段;2. DL2000 DNA 相对分子质量标准;3. E2 PCR 片段;4. E1 PCR 片段

1. E1 and E2 over-lap PCR fragment; 2. DL2000 DNA marker; 3. E2 PCR fragment; 4. E1 PCR fragment

图 2 FMDV Asia1/JS/China/2005 株 5' 基因组 PCR 产物

Fig. 2 PCR products of the 5' end genome of FMDV Asia1/JS/China/2005 strain



1. E5 片段;2. DNA 相对分子质量标准(2000+15000);3. E3 片段;4. E4 片段

1. E5 PCR fragment; 2. Wide range DNA marker (2000+15000); 3. E3 PCR fragment; 4. E4 PCR fragment

图 3 FMDV Asia1/JS/China/2005 株 3' 基因组 PCR 产物

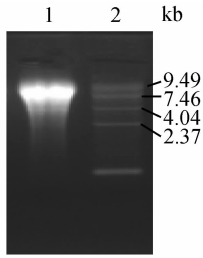
Fig. 3 PCR products of the 3' end genome of FMDV Asia1/JS/China/2005 strain

### 2.4 病毒的拯救

用体外转录物 RNA 转染 BHK 细胞 12 h 后细胞出现明显的 CPE,细胞变圆,成葡萄串状分布,对照组细胞生长良好,形态规则(图略)。

### 2.5 拯救病毒的增殖培养

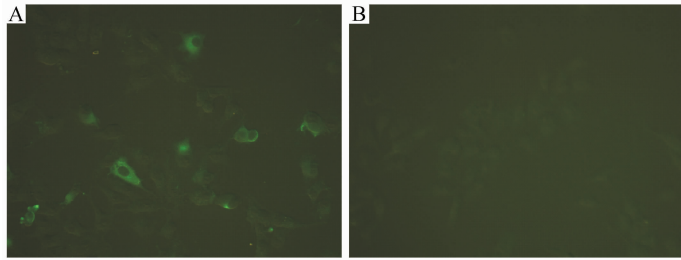
将体外转录拯救的病毒连续传代,出现明显 CPE 的时间越来越短。PCR 扩增第 3 代和 14 代带



1. 体外转录 RNA; 2. RNA 相对分子质量标准  
1. *in vitro* transcripts RNA; 2. RNA marker

图 4 FMDV Asia1/JS/China/2005 株全长 cDNA 的体外转录 RNA

Fig. 4 *in vitro* transcripts RNA of FMDV Asia1/JS/China/2005 strain full-length cDNA



A. 体外转录本转染的 BHK 细胞; B. 正常 BHK 细胞  
A. BHK cells transfected with transcripts RNA; B. Normal BHK cells

图 5 拯救病毒的免疫荧光检测 200×

Fig. 5 Detection the rescued FMDV on BHK with indirect Immunofluorescence 200×

空白细胞中没有特异荧光(图 5B),表明细胞中有 FMDV 蛋白的表达。

2.6.3 电镜观察 纯化病毒负染后在电镜下可以观察到直径约为 25 nm、球形的 FMDV 病毒粒子,这与 FMDV 特有的形态结构一致(图略)。

2.6.4 乳鼠致病性试验 将收集转染的第 1 代病毒原液皮下接种 3 日龄乳鼠,结果在接种 14 h 后,乳鼠表现典型的呼吸困难、后肢麻痹等症状,接种 18 h 后发现第 1 只乳鼠死亡,空白对照组无发病。

### 3 讨论

RNA 病毒的感染性克隆(即反向遗传学研究)为 RNA 病毒的研究提供了新思路,目前的研究已涵括几乎所有的 RNA 病毒,为病毒蛋白结构与功能、致病性和新型病毒载体和疫苗的研究提供了新手段。口蹄疫病毒为正链 RNA 病毒,反向遗传操作技术较易掌握和进行,已对多株口蹄疫病毒进行了感染性克隆的研究,包括 A、O 和 SAT 型口蹄疫

有分子标签的基因片段,测序结果表明拯救病毒是稳定的,经 14 次传代仍能检测到分子标签的存在。

### 2.6 拯救病毒的鉴定

2.6.1 RT-PCR 鉴定拯救的病毒 拯救病毒第 1 代总 RNA 以 P1 和 P2'为引物,RT-PCR 扩增出 Asia1/JS/China/2005 株的部分基因组序列,扩增产物大小分别为 1 462 bp(部分 E3 序列),与预期大小一致(图略)。对扩增产物进行序列测定比较,结果表明除分子标签外,其余序列与母本毒株的序列一致。

2.6.2 间接免疫荧光检测病毒抗原 将转录本 RNA 转染 8 h 后的细胞用免疫荧光染色后,在荧光显微镜下可见绿色特异性荧光(图 5A),而未转染的

病毒<sup>[2-5]</sup>。Asia1 型口蹄疫病毒的感染性克隆为首次构建,为进一步深入研究我国 Asia1 口蹄疫病毒的病毒致病的分子机制以及新型疫苗的研制等提供了材料。

本研究以 FMDV Asia1/JS/China/2005 细胞适应毒为母本,在已获得 cDNA 克隆及全序列测定基础上,构建该株全长基因组的感染性克隆。在构建过程中为了避免 T7 启动子和基因组 5'端之间外源核苷酸的插入,选用了剔除 T7 启动子的载体 pCDNA3.1/Zeo(+),然后在基因组 5'端通过引物引入限制性酶切位点和 T7 启动子的核心序列,使病毒基因组正确置于 T7 启动子之下,这样所构建的全长 cDNA 分子就只含有 1 个 T7 启动子。为了提高体外转录效率,在 T7 启动子核心序列与 5'端序列之间加上了 3 个 G<sup>[6]</sup>。为了病毒全长 cDNA 在体外转录过程中能正确终止,在构建全长 cDNA 的 3'末端加上了 1 个单一的 Not I 限制性内切酶位点来解决这一问题。

FMDV 基因组有 2 个特殊结构,一是在病毒基

因组 5' 端具有长度为 100~420 个几乎全部由胞嘧啶碱基组成的 poly(C) 结构<sup>[7]</sup>, 该结构与病毒的感染性密切相关<sup>[8]</sup>, 另一是 poly(A) 尾巴<sup>[9]</sup>。poly(C) 序列的长度与病毒感染性的关系目前没有一致结论, Zibert 等<sup>[4]</sup> 研究认为 O 型 FMDV 的感染性 cDNA 至少需 35 个胞嘧啶碱基。Rieder 等<sup>[2]</sup> 的研究则显示, 含有 2 个胞嘧啶碱基的 A 型 FMDV 也能满足构建感染性 cDNA 的需要。本研究应用融合 PCR 构建了含有 15 个 C 碱基的全长 cDNA, 结果表明构建的全长 cDNA 具有感染性。

全基因组中分子标签的引入是区别拯救病毒和亲本病毒的有力证据。本研究在构建该病毒全长的过程中利用融合 PCR 技术引入 2 个沉默突变(A→G, T→C), 在其它碱基不变的情况下成功取消了 L 蛋白编码区的 1 个 *EcoR* I 位点(该毒株全序列有 2 个 *EcoR* I)。选该位点进行碱基突变有两个理由, 其一作为将来拯救病毒的分子标签; 其二是人为制造单一限制性酶切位点便于全长基因的克隆。对拯救病毒进行了 RT-PCR 和序列测定、比较分析发现拯救病毒在特定位置具有与原始毒种不同的核苷酸点突变, 该位点突变与作者构建的全基因克隆中的点突变位点完全一致, 说明获得的重组病毒来自构建的全长克隆, 并非亲本病毒的污染。

本研究以全长基因组 cDNA 为模板体外转录成 RNA, 通过脂质体转染法将其导入 BHK 细胞 12 h 后观察到明显的口蹄疫病毒特异的致细胞病变效应(CPE)。将收获的转染细胞连续传代, 仍可观察到明显的 CPE, 而且出现 CPE 的时间越来越短。对收获的病毒分别用 RT-PCR、间接免疫荧光、电子显微镜观察和乳鼠致病性分析, 结果证实构建的 FMDV 的全长 cDNA 克隆具有感染性。该反向遗传系统的构建为在分子生物学水平上深入研究口蹄疫病毒基因组的结构与功能、口蹄疫病毒的致病机制及研制新型疫苗等奠定了基础。

#### 参考文献:

[1] RYAN M D, BELSHAM G J, KING A M. Specific-

ity of enzyme-substrate interactions in foot and mouth disease virus polyprotein processing [J]. *Virology*, 1989, 173(1):35-45.

[2] RIEDER E, BUNCH T, BROWN F, et al. Genetically engineered foot-and-mouth disease viruses with poly(C) tracts of two nucleotide are virulent in mice [J]. *J Virol*, 1993, 67(9): 5139-5145.

[3] LIU G Q, LIU Z X, XIE, Q G, et al. Generation of an Infectious Clone of an FMDV strain isolated from swine [J]. *Virus Res*, 2004, 104(2):157-164.

[4] ZIBERT A, MAASS G, STREBEL K, et al. Infectious foot-and-mouth disease viruses derived from a cloned full-length cDNA [J]. *J Virol*, 1990, 64(6): 2467-2473.

[5] VAN RENSBURG, HENRY T M, AND MASON P W. Studies of genetically defined chimeras of a European type A virus and a South African territories type 2 virus reveal growth determinants for foot-and-mouth disease virus [J]. *J Gen Virol*, 2004, 85(1): 61-68.

[6] VAN DER WERF S, BRODLEY J, WIMMER E, et al. Synthesis of infectious poliovirus RNA by purified T7 polymerase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83(8):2330-2334.

[7] CHUMAKOV K M, AGOL V I. Poly(C) sequences is located near the 5'-end of encephalomyocarditis virus RNA [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1976, 71(2):551-557.

[8] HARRIS T J R, BROWN F. Biochemical annlysis of a virulent and an avirulent foot-and-mouth disease virus [J]. *J Gen Virol*, 1977, 34:87-105.

[9] BARRY B, MARVIN J G, HOWARD L B. The relation of poly (A) length to specific of viral RNA: A comparison of different types of foot-and-mouth disease virus [J]. *Virol*, 1979, 98(2):480-483.