

型内嵌合口蹄疫病毒全长感染性 cDNA 克隆的构建

李平花, 白兴文, 卢增军, 孙普, 祁国财, 韩成昊, 刘在新*

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

摘要: 【目的】近年来, O 型口蹄疫的不断暴发严重危害了我国畜牧业的发展, 其病原——O 型口蹄疫病毒已演化出 3 种谱系: 中国型猪毒系、泛亚系和缅甸 98 系。其中中国型猪毒系病毒高度嗜猪, 对养猪业危害最大。目前应用的疫苗已不能有效保护中国型猪毒系变异株的流行, 这给我国猪口蹄疫的防控带来了极大的困难。为了进一步发展免疫原性好、抗原谱广的猪 O 型口蹄疫疫苗候选株, 本研究以 O/HN/93 现用疫苗毒株的感染性克隆为骨架, 用流行的新猪毒系病毒的部分 VP3 和 VP1 基因(主要是替换 VP1 蛋白上的 B-C 环和 G-H 环) 替换疫苗毒株的相应部分, 构建了嵌合的 FMDV 全长 cDNA 克隆。【方法】线化的嵌合全长质粒和表达 T7 RNA 聚合酶的真核质粒 pcDNAT7P 共转染 BHK-21 细胞, 体内转录拯救嵌合病毒。【结果】嵌合全长质粒转染 BHK-21 细胞 36h 后, 出现明显的 FMDV 致细胞病变效应。对收获的病毒分别用 RT-PCR、间接免疫荧光、电子显微镜观察结果证实成功拯救到嵌合的 FMDV。拯救的病毒乳鼠致病性试验结果表明该拯救病毒对乳鼠的致病力减弱。该嵌合病毒的成功拯救为研制口蹄疫新型疫苗等奠定了基础。

关键词: 型内嵌合, 口蹄疫病毒, 全长感染性 cDNA 克隆

中图分类号: S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 01-0114-06

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、高度接触传染性的动物疫病。侵染对象是猪、牛、羊等主要畜种及其它家养和野生偶蹄动物, 易感动物多达 70 余种。该病传播迅速、发病率高, 死亡率也高 (幼小动物的发病率可达 100%), 因此世界动物卫生组织将其列为必报疫病, 我国也将其列为一类动物传染病。该病的爆发和流行给畜牧业造成的经济损失惨重, 严重影响畜产品的国际贸易, 所以消灭和控制该病已经成为各

国政府共同关注的问题。我国也是口蹄疫的重灾国, 其中 O 型口蹄疫在我国流行已久, 且危害最为严重。目前, 引发我国畜群发病的 O 型口蹄疫病毒已经演化为 3 个谱系: 中国型猪毒系 (又分为旧猪毒系和新猪毒系)、泛亚系和缅甸 98 系。其中中国型猪毒系病毒高度嗜猪, 对我国养猪业造成巨大的危害和经济损失。目前对于猪口蹄疫的防治主要是免疫接种 O/HN/93 病毒 (属于旧猪毒系) 制作的疫苗, 但该疫苗毒株对新猪毒系病毒不能产生较好的免疫保护效果, 需要开发新的疫苗毒株。

基金项目: 国家“863 计划” (2011AA10A211)

* 通信作者。Tel: +86-931-8342587; E-mail: liuzaixin3@hotmail.com

作者简介: 李平花 (1973 -), 女, 甘肃武威人, 博士, 研究方向为口蹄疫分子生物学。E-mail: xiaoxiaoyezhi10@sohu.com

收稿日期: 2011-07-11; 修回日期: 2011-11-13

FMDV 是小 RNA 病毒科 (*Picornaviridae*) 口蹄疫病毒属 (*Aphthovirus*) 的成员, 有 A、O、C、Asia1、SAT1、SAT2 和 SAT3 型 7 个血清型。FMDV 粒子含单股正链 RNA 和衣壳两部分。其中病毒衣壳由 60 分子的结构蛋白 VP4 (1A)、VP2 (1B)、VP3 (1C)、和 VP1 (1D) 组成, 其中 VP4 位于衣壳的内部, 其余 3 个位于衣壳的表面。FMDV 结构蛋白上含有不同的抗原位点, 他决定了病毒的抗原特性。口蹄疫病毒的抗原结构十分复杂, 不同的血清型有着不同的抗原位点, 并且存在广泛的抗原变异^[1]。研究表明 O 型 FMDV 表面至少含有 5 个抗原位点^[2-3]。其中结构蛋白 VP1 上含有 3 个抗原位点 (位点 1、3 和 5): 位点 1 由 VP1 的 G-H 环 (133-451 位氨基酸) 和 C 端氨基酸残基 (200-213) 的线性表位构成。其中 G-H 环是诱导机体产生中和抗体的最重要的抗原位点, 也是 FMDV 抗原变异的关键位点。位点 3 位于病毒粒子表面五重轴周围 VP1 的 B-C 环, 位点 5 位于 VP1 的 G-H 环内, 与位点 1 是相互独立的。研究表明抗原位点内关键氨基酸的替换会改变病毒的抗原性^[4,5], 从而导致现用疫苗不能很好的保护流行毒株。鉴于此, 本研究通过分析许多中国型猪毒系的 FMDV 的氨基酸序列, 发现新猪毒和旧猪毒系病毒在抗原位点处的氨基酸变异最大, 尤其是衣壳蛋白 VP1 的 B-C 环和 G-H 环。故本研究旨在以构建的 FMD 疫苗毒株 (O/HN/93) 的全长感染性 cDNA 克隆为骨架, 用新猪毒系病毒的部分 VP3 和 VP1 基因替换疫苗毒株的相应区段 (主要是替换 VP1 的 B-C 环和 G-H 环) 构建了 FMDV 型内嵌合全长 cDNA 克隆。通过体内转录成功拯救了嵌合病毒。该嵌合病毒的成功拯救为发展新的疫苗候选株奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: FMDV O/HN/93 的全长质粒 pOZK-K1234 和含该病毒基因 1-5340 nt 的 pOZK-K123 质粒为兰州兽医研究所基因与分子标识课题组构建保存^[6]。表达 T7 RNA 聚合酶的真核质粒 pcDNAT7P 由英国伦敦大学 Dr. Eagles 惠赠。

大肠杆菌 DH5 α 和 BHK-21 细胞由基因与分子标识课题组保存。RNAeasy Mini kit、Plasmid Mini Kit 购自 Qiagen 公司; PrimeSTARTM HS DNA Polymerase、Reverse Transcriptase XL (AMV)、dNTP、Agarose Gel DNA Purification Kit、*Escherichia coli* (*E. coli*) JM109 感受态细胞、限制性内切酶均购自 TaKaRa 公司。蛋白酶 K、LipofectamineTM2000、胎牛血清、DMEM 购自 Invitrogen 公司。VersaDoc 凝胶成像系统、PCR 热循环仪 iCycler、台式离心机 TGL-16G 均购自 Bio-Rad 公司。

1.1.2 引物: 根据已测定的新猪毒系病毒全长序列设计 1 对引物, 其中在上游引物 5' 端引入 *Bss*H II 位点, 下游引物 5' 端引入 *Xma* I 位点, 引物由上海桑尼生物技术有限公司合成。EBssH (+): AGGCGCGCTACATGGTTGCGTACG; Exma (-): GACCCGGTTCCTTGATGGCACCGTAGT。

1.2 RT-PCR 和嵌合全长质粒的构建

用 RNA 提取试剂盒提取新猪毒系口蹄疫病毒的总 RNA, 用 Exma (-) 反转录合成第一链 cDNA, 然后以合成的第一链 cDNA 为模板, 用引物 EBssH (+) 和 Exma (-) 扩增含该病毒部分 VP3 和 VP1 的基因片段 (约 840 bp)。该片段纯化回收后用 *Bss*H II 和 *Xma* I 消化, 然后将其插入用同样酶消化的 pOZK-Z123 质粒中, 得到阳性重组质粒 pKLZ123。该质粒用 *Spe* I 和 *Bgl* II 酶切并纯化回收约 5400bp 的片段, 然后将其克隆到用同样酶消化的疫苗株 O/HN/93 全长感染性 cDNA 克隆 pOZK-Z1234 质粒中, 得到的阳性质粒 (命名为 pKFLQ) 用 *Apa* I 酶切鉴定。鉴定正确的质粒送上海桑尼公司测序。

1.3 病毒的拯救

嵌合全长质粒 pKFLQ 用 *Not* I 线性化后加入蛋白酶 K (终浓度为 0.25 μ g/ μ L), 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min 后, 纯化回收作为转染模板。分于六孔板的单层 BHK 细胞生长至 70% - 90% 时用于转染。2 μ g 线性化的 pKFLQ 和 pcDNAT7P 质粒由 LipofectamineTM2000 介导转染 BHK-21 细胞, 同时设正常细胞对照。转染后 6 h 加入 1 mL 含 8% 胎牛血清的 DMEM 培养基置 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱继续培养 72h, 观察细胞出现致细胞病变 (cytopathic effects, CPE) 的情况, 约 90% 细胞出现 CPE 时收获

病毒。拯救的病毒命名为和 rQOZK。反复冻融 3 次后连续在 BHK-21 上传代。

1.4 拯救病毒的鉴定

1.4.1 拯救病毒的增殖培养和遗传稳定性分析: 将收集的出出现病变的细胞上清连续传代, 接种量为 1/10 (体积比), 显微镜下观察出现 CPE 的时间, 收获出现病变的细胞上清连续传至 13 代。检测第 8 代和 13 代拯救病毒插入基因的稳定性。

1.4.2 间接免疫荧光检测抗原: 将载有转染细胞的载玻片, 用 PBS 缓冲液漂洗 3 次, 吸完残液, 3.7% 多聚甲醛室温固定 20 min, PBS 缓冲液洗涤 3 次后滴加 50 mmol/L 氯化铵室温作用 10 min, PBS 缓冲液洗涤 3 次, 吸干残液。滴加 FMDV O 型兔阳性血清, 37°C 中孵育 30 min, 再用 PBS 漂洗 3 次, 然后加 FITC 标记的羊抗兔 IgG, 于 37°C 湿盒中孵育 30 min, 用 PBS 漂洗 3 次后甘油封片, Olympus 荧光显微镜下观察并拍照。

1.4.3 电镜观察病毒粒子: 收获的第 6 代 rQOZK 病毒反复冻融 3 次后, 11000 × g 离心 10 min, 然后取其上清, 135000 × g 离心 3 h, 适量 TNE 重悬沉淀, 负染后电镜观察。

1.4.4 乳鼠致病性试验: 将疫苗毒株 O/HN/93 和 rQOZK 细胞毒分别用 PBS 缓冲液 10 倍系列稀释后, 分别取 10^{-4} - 10^{-8} 的稀释液皮下接种 3 日龄乳鼠, 每个稀释度接种 4 只, 每只乳鼠接种剂量为 0.2 mL。空白对照组 4 只乳鼠接种 PBS 缓冲液, 观察乳鼠死亡情况并记录, 用 Read-Muench 法统计并计算 LD₅₀。

2 结果和分析

2.1 RT-PCR

从新猪毒系 FMDV 的细胞液提取病毒 RNA, 用 EBssH (+) 和 Exma (-) 引物扩增出约 840bp 左右的片段, 与预期大小一致 (图略)。

2.2 嵌合全长质粒的构建

将扩增的的片段用相应的酶消化后插入 pOZK-Z123 质粒中, 得到阳性重组质粒 pKLZ123, 该质粒用 Spe I 和 Bgl II 酶切鉴定, 结果切出与预期大小相符的目的带 (图略)。鉴定正确的质粒用 Spe I 和 Bgl II 酶切后回收约 5400 bp 的大片段, 然后将其插入用相同酶消化的 pOZK-Z1234 质粒中, 得到的阳

性质粒 (命名为 pKFLQ) 用 Apa I 酶切鉴定, 结果切出与预期大小相符的目的带 (图略)。鉴定正确的全长质粒进行序列的测定, 结果表明插入了预期的目的基因。

2.3 病毒的拯救

线化的嵌合全长质粒转染 BHK-21 细胞 36 h 后, 细胞出现明显致细胞病变效应, 细胞变圆, 成葡萄状分布, 48h 细胞 90% 变圆 (图 1-A), 对照细胞单层完整, 形态规则, 轮廓清晰 (图 1-B)。72 h 后收集出现病变的细胞连续传代, 细胞病变出现的时间缩短, 病变更加典型。

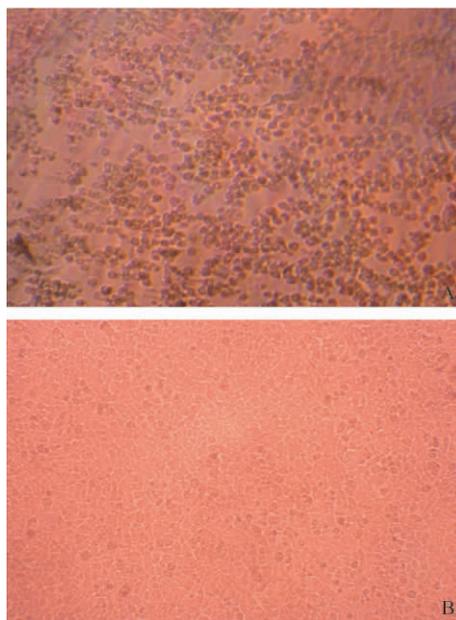


图 1 拯救病毒在 BHK-21 上引起的 CPE (10 ×)

Fig. 1 CPE occurred on BHK-21 cell infected with rescued virus. A: BHK-21 cell occurred CPE; B: Normal BHK-21 cell (10 ×).

2.4 拯救病毒的鉴定

2.4.1 拯救病毒的增殖培养和遗传稳定性分析: 将拯救的嵌合病毒连续传代, 出现明显 CPE 的时间越来越短, 并在传到第 8 代时趋于稳定, 90% 以上细胞病变时间为 10h。RT-PCR 扩增第 8 代和 13 代病毒的插入片段, 并对其序列的测定, 结果表明拯救病毒是稳定的。

2.4.2 免疫荧光检测结果: 将 pKFLQ 转染的细胞及未经转染的 BHK-21 细胞用免疫荧光染色, 在免疫荧光显微镜下可见用 pKFLQ 转染的 BHK-21 细胞中有特异荧光产生 (图 3-A), 而未转染的空白细胞中没有特异荧光出现 (图 3-B)。

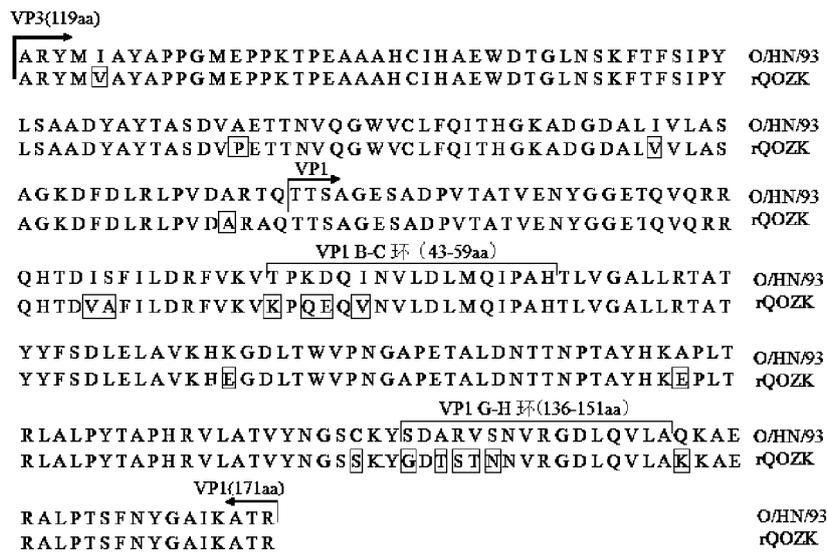


图 2 rQOZK 和 O/HN/93 病毒部分氨基酸序列的比对

Fig. 2 Comparison of the partial amino acid sequences of rQOZK and O/HN/93. The different amino acid were boxed.

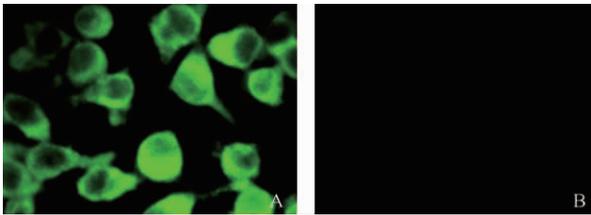


图 3 拯救病毒的免疫荧光检测 (200 ×)

Fig. 3 Detection the rescued virus on BHK with indirect immunofluorescence (200 ×). A: BHK cell transfected with pKFLQ plasmid; B: Nomal BHK cell.

2.4.3 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 4)。

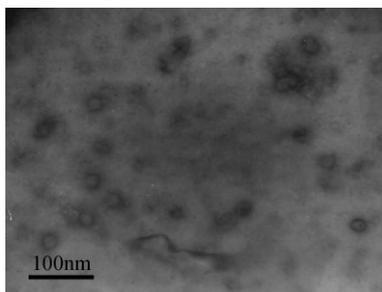


图 4 拯救病毒粒子的电镜观察

Fig. 4 Electron micrographs of negatively stained FMDV particles (bar = 100 nm).

2.5 拯救病毒的致病性

O/HN/93 和 rQOZK 病毒皮下接种 3 日龄乳鼠,

其中 O/HN/93 接种的乳鼠在接种后 32 h 10^{-4} 乳鼠有部分表现典型的呼吸困难、后肢麻痹和声音嘶哑等症状, 48 h 后第一只乳鼠死亡, 对照组正常。而接种 rQOZK 的乳鼠 86 h 后稀释度为 10^{-4} 接种的乳鼠开始发病, 96 h 第一只乳鼠死亡, 而对照组乳鼠正常。最后用 Read-Muench 计算 rQOZK 的 LD_{50} 为 $10^{4.5}/0.2$ mL, 而 O/HN/93 的 LD_{50} 为 $10^7/0.2$ mL。乳鼠试验表明嵌合病毒 rQOZK 对乳鼠的致病力减弱了。

3 讨论

利用反向遗传操作技术构建嵌合病毒发展 RNA 病毒疫苗候选株是目前研究的热点之一。1994 年, Rieder 等^[7] 以 A12 的感染性 cDNA 克隆为骨架, 以 O 型和 C 型的 G-H 环替换 A12 的相应部分构建了两个嵌合病毒, 用这两个嵌合病毒制备的疫苗免疫豚鼠能够诱导豚鼠产生中和 A 型或者 O 型或 C 型 FMDV 的抗体。用 A/C 嵌合病毒灭活疫苗免疫猪能够保护猪免遭 A 型 FMDV 的攻击, 但部分保护 C 型病毒的攻击。2008 年, Fowler^[8] 用上述嵌合病毒免疫牛研究其作为标记疫苗的潜力, 认为他们可以作为标记疫苗在未来区分感染与免疫的动物。2011 年, Blignaut^[9] 等在南非 II 型疫苗株 ZIM/7/83 感染性克隆为骨架, 用南非 I 型 KNP/196/91

的外部衣壳(1B-1D/2A)替换南非 II 型的相应片段,构建了具有高复制滴度的嵌合病毒 vKNP/SAT2,用其制备疫苗免疫猪能够保护同源病毒的攻击。另外 Rensburg 等^[10]和 Botner 等^[11]一些研究者利用反向遗传技术也构建了 FMD 嵌合病毒,但这些嵌合病毒作为疫苗候选株的潜力尚未研究。这些 FMD 嵌合病毒的构建为 FMD 的控制提供了强有力的方法,同时为发展 FMD 标记疫苗奠定了了的基础。

序列分析新猪毒系病毒和疫苗毒株氨基酸的差异,发现新猪毒系病毒在抗原位点处的变异最大,故最开始试验时先设计替换新猪毒系病毒的 5 个抗原位点(不包括抗原位点 1 的 VP1 200-213 位氨基酸),跨越的基因片段包括部分 VP2(46-218 位氨基酸),完整的 VP3 和部分的 VP1(VP1 的 1-471 位氨基酸),结果没有拯救到活的病毒。故本试验是基于前者的失败以及分析 2 个病毒合适的限制性内切酶的基础上设计替换 VP1 两个抗原位点而构建了 FMDV 型内嵌合全长 cDNA 克隆。嵌合全长质粒和表达 T7 RNA 聚合酶的质粒共转染 BHK-21 细胞后拯救到的病毒经 RT-PCR、间接免疫荧光、电子显微镜观察证明拯救到了含新猪毒系病毒特定基因的嵌合病毒。乳鼠致病性试验分析初步断定嵌合病毒对乳鼠的致病力减弱。病毒对乳鼠致病性减弱的原因可能与受体的利用有关。在未来将分析该嵌合病毒做为疫苗候选株对中国型猪毒系病毒的免疫保护效果。

本研究对嵌合病毒的成功拯救为在分子生物学水平上研究病毒的基因功能、致病机理提供了材料,同时也为探讨其作为疫苗候选株的研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 曹伟军,李平花,白兴文,卢曾军,孙普,刘在新. 口蹄疫病毒 O/HN/93 疫苗株的拯救及病毒活性鉴定. 华北农学报(*Acta Agriculturae Boreali-Sinica*), 2010, 25(3):1-6.
- [2] Domingo E, Escarmís C, Baranowski E, Ruiz-Jarabo CM, Carrillo E, Núñez JI, Sobrino F. Evolution of foot-and-mouth disease virus. *Virus Research*, 2003, 91(1): 47-63.
- [3] Aggarwal N, Barnett PV. Antigenic sites of foot-and-mouth disease virus (FMDV): an analysis of the specificities of anti-FMDV antibodies after vaccination of naturally susceptible host species. *Journal of General Virology*, 2002, 83(Pt4):775-782.
- [4] Logan D, Abu-Ghazaleh R, Blakemore W, Curry S, Jackson T, King A, Lea S, Lewis R, Newman J, Parry N, Rowlands D, Stuart D, Fry E. Structure of a major immunogenic site on foot-and-mouth disease virus. *Nature*, 1993, 362(6420): 566-568.
- [5] Hernández J, Martínez MA, Rocha E, Domingo E, Mateu MG. Generation of a subtype-specific neutralization epitope in foot-and-mouth disease virus of a different subtype. *Journal of General Virology*, 1992, 73:213-216.
- [6] Mateu, MG, Martinez MA, Capucci L, Andreu D, Giralt E, Sobrino F, Brocchi E, Domingo E. A single amino acid substitution affects multiple overlapping epitopes in the major antigenic site of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *Journal of General Virology*, 1990, 71:629-637.
- [7] Rieder E, Baxt B, Lubroth J, Mason PW. Vaccines Prepared from Chimeras of Foot-and-Mouth Disease Virus (FMDV) Induce Neutralizing Antibodies and Protective Immunity to Multiple Serotypes of FMDV. *Journal of Virology* 1994, 68(11):7092-7098.
- [8] Fowler VL, Paton DJ, Rieder E, Barnetta PV. Chimeric foot-and-mouth disease viruses: Evaluation of their efficacy as potential marker vaccines in cattle. *Vaccine*, 2008, 26(16):1982-1989.
- [9] Blynnat B, Visser N, Theron J, Rieder E, Maree FF. Custom-engineered chimeric foot-and-mouth disease vaccine elicits protective immune responses in pigs. *Journal of General Virology*, 2011, 92(4):849-859.
- [10] Van Rensburg HG, Henry TM, Mason PW. 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. *Journal of General Virology*, 2004, 85(1): 61-68.
- [11] Botner A, Kakker NK, Barbezange C, Berryman S, Jackson T, Belsham GJ. Capsid proteins from field strains of foot-and mouth disease virus confer a pathogenic phenotype in cattle on an attenuated, cell-culture-adapted virus. *Journal of General Virology*, 2011, 92(Pt5): 1141-1151.

Construction of a full-length infectious cDNA clone of inter-genotypic chimeric foot-and-mouth disease virus

Pinghua Li, Xingwen Bai, Zengjun Lu, Pu Sun, Guocai Qi, Chenghao Han, Zaixin Liu *

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 Agriculture Sciences, Lanzhou 730046, China

Abstract: [Objective] A series of type O foot-and-mouth disease (FMD) outbreaks occurred in China seriously affect development of Chinese husbandry. Its causative agent—type O foot-and-mouth disease virus (FMDV) has been evolved three topotypes: Cathay, Middle East-South Asia and Southeast Asia, specifically, the viruses of Cathay topotype are highly adapted to pig, representing the biggest threat on Chinese pig industry. The available FMD vaccine in China provides insufficient protection against some arising viruses of Chathay topotype, which exert important obstacle to control porciphilic FMD epidemics in China. To develop vaccine candidate with characteristics of good immunogenicity and broad spectrotype, a full-length infectious cDNA clone of inter-genotypic chimeric FMDV was constructed, which replaced part VP3 and VP1 gene of O/HN/93 strain with the corresponding to the variants of Cathay topotype (mainly replaced the B-C and G-H loop of structure protein VP1). [Methods] Linearized recombinant plasmid and plasmid expressing T7 RNA polymerase were cotransfected into BHK-21 cells to rescue the chimeric virus *in vivo*. [Result] The transfected cells showed apparent cytopathic effects (CPE) after 36 h post-transfection. The rescued virus was checked by RT-PCR, indirect immunofluorescence, electron microscope. Results show that chimeric FMDV was successfully rescued *in vivo*. The study of sulk mice pathogenicity show chimeric FMDV has attenuated pathogenicity for suckling mice compared with its parental virus. [Conclusion] The construction of inter-genotypic chimeric FMDV will lay the basis for developing novel vaccine against FMD.

Keywords: inter-genotypic chimeric; FMDV; full-length infectious cDNA clone

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2011AA10A211)

* Corresponding author. Tel: +86-931-8342587; Fax: +86-931-8342052; E-mail: liuzaxin3@hotmail.com

Received: 11 July 2011/Revised: 13 November 2011