



3A 蛋白 104–115 位氨基酸缺失口蹄疫 A 型标记病毒的构建

李平花^{1*}, 马雪青¹, 袁红¹, 袁子文², 孙普¹, 白兴文¹, 卢曾军¹, 刘在新^{1*}

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, 国家口蹄疫参考实验室, 甘肃 兰州 730046

²甘肃农业大学动物医学院, 甘肃 兰州 730070

摘要:【目的】构建一株含 3A 非结构蛋白 104–115 位氨基酸缺失的口蹄疫 A 型标记病毒, 分析其生物学特性和发展标记疫苗的潜力。【方法】采用融合 PCR 技术, 在当前流行毒株 A/Sea-97/CHA/2014 全长感染性克隆 pQAHN 中引入 3A 104–115 位氨基酸的缺失, 构建全长重组质粒。全长质粒经 *Not* I 线性化后转染表达 T7 RNA 聚合酶的稳定细胞系, 拯救标记病毒。RT-PCR、序列分析、间接免疫荧光和 Western blotting 鉴定标记病毒。噬斑表型和一步生长曲线分析标记病毒的生物学特性, 并用实验室开发的针对 3A 优势表位(AEKNPLE)的阻断 ELISA 方法分析其区分亲本和标记病毒感染的动物。【结果】成功拯救到一株含 3A 104–115 位氨基酸缺失的口蹄疫 A 型标记病毒, 3A 表位的缺失没有影响标记病毒的噬斑表型和一步生长曲线。3A 单抗阻断 ELISA 可以明显区分标记病毒和亲本病毒感染的动物。【结论】本研究构建的 3A 蛋白 104–115 位氨基酸缺失的标记病毒可以作为发展口蹄疫鉴别诊断疫苗的候选毒株, 用于我国未来口蹄疫 A 型的有效防控。

关键词: 3A 蛋白, 104–115 位氨基酸缺失, 口蹄疫 A 型, 标记病毒, 构建

口蹄疫(Foot-and-mouth disease, FMD)是猪、牛和羊等偶蹄动物感染的一种烈性传染病。世界卫生组织将其列为必报疫病之首, 我国规定为一类动物传染病。该病的爆发和流行, 往往对一个国家的畜牧业生产、肉品供应、畜产品、国际贸易及外交政治关系造成重大负面影响, 因此世界各国十分重视对该病的研究和防制。

FMD 的病原为口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus, FMDV), 属于小 RNA 病毒科(Picornaviridae), 口蹄疫病毒属(*Aphthovirus*)。病毒存在 7 个血清型 (A、O、C、AsiaI、SAT I、SAT II 和 SAT III)^[1]和许多的亚型^[2], 型间不交叉保护。

我国是口蹄疫流行较为严重的国家, 特别是近年来 A 型 FMD 在我国广东、青海、新疆、西

基金项目: 牛羊重大动物疫病基因工程疫苗及防控研究(2017YFD0500902)

*通信作者。Tel/Fax: +86-931-8342587; E-mail: 李平花, lipinghua@caas.cn, 刘在新, liuzaixin@caas.cn

收稿日期: 2018-08-08; 修回日期: 2018-11-15; 网络出版日期: 2018-11-29

藏、云南、江苏、安徽、湖北等省份大范围暴发, 给我 国养殖业造成巨大的经济损失。灭活疫苗的强制免疫是预防和控制 FMD 的关键措施, 但是目前广泛使用的 FMDV 灭活疫苗因抗原纯化不完全, 多次免疫动物后仍能在体内产生相应的非结构蛋白抗体^[3-4], 这严重影响了以检测 FMDV 非结构蛋白抗体为金标准的鉴别诊断结果, 从而干扰了疫病的血清学监控和流行病学调查。因此亟待开发一种既能有效免疫预防, 又能精准区分自然感染和疫苗免疫动物的 FMD A 型鉴别诊断疫苗, 为口蹄疫的有效预防、控制乃至消灭提供新的技术支持。

鉴于此, 本研究以近年来我国流行的 A 型 FMDV A/Sea-97/CHA/2014 株全长感染性克隆为骨架, 通过融合 PCR 技术构建含 FMDV 3A 非结构蛋白免疫优势表位(AEKNPLE)缺失的全长克隆, 体内转染拯救重组病毒, 研究其生物学特性和发展标记疫苗的潜力, 从而为未来 FMD A 型标记疫苗的发展提供前期材料。

1 材料和方法

1.1 质粒和细胞

FMDV A/Sea-97/CHA/2014 株全长感染性克隆 pQAHN^[5]和含该病毒基因 5340–8200 nt 的质粒 pSK-A4^[5]以及该全长质粒拯救的亲本病毒 r-A/Sea-97/CHA/2014 (本文中命名为 r-A/Sea97)为兰州兽医研究所宿主抗感染与免疫生物学团队构建保存。表达 T7 RNA 聚合酶的 BSR/T7 稳定细胞系由德国 Karl-Klaus Conzelmann 教授惠赠。

1.2 主要试剂和动物

JM109 感受态细胞、DNA 片段回收试剂盒、

DNA Gel Extraction Kit、T4 连接酶、反转录酶 AMV、内切酶、LA *Taq* 扩增酶、质粒提取试剂盒、DNA marker 购自大连 TaKaRa 公司, 胰酶、胎牛血清(FBS)、细胞基础培养基购自 Gibco 公司; RNeasy mini Kit 试剂盒购自 Qiagen 公司; FITC-山羊抗小鼠 IgG 购自 BOSTER 公司; FMDV 特异的抗 3A 单抗 3A24 和抗 3B 的单抗 3B4B1 由本课题组制备保存; 60 日龄健康易感的猪购自定西散养农户。

1.3 引物

根据已构建的 A/Sea-97/CHA/2014 株全长序列, 设计 PCR 引物(表 1), 由上海桑尼生物技术有 限公司合成。

1.4 3A 蛋白 104–115 位氨基酸缺失 FMDV 全长 cDNA 克隆的构建

研究表明 FMDV 3A 蛋白的 109–115 位氨基酸 (AEKNPLE)为免疫优势的 B 细胞表位, 故本研究选取包含该区段的氨基酸 104–115 作为缺失的靶点。以已构建保存的 pSK-A4 为模板, 分别用 A/HN5321(+)/A/HN₁₀₄₋₁₁₅(-)和 A/HN₁₀₄₋₁₁₅(+)/A/HN6767(-)引物分别扩增得到 C 片段和 D 片段。纯化回收的 C 和 D 片段等量混合作为模板, 以 OZ5321(+)/OZ6767(-)为引物扩增 CD 片段。CD 片段用 *Hind* III/*Bgl* II 酶消化后回收约 1450 bp 的片段, pSK-A4 质粒用 *Not* I/*Hind* III 酶消化后回

表 1. PCR 所用引物

Table 1. Primers used for PCR

Names	Sequences (5'→3')
A/HN104-115(+)	CAAACATCACCACAGATGACACTACC GGTGCCAGCACCGT
A/HN104-115(-)	ACGGTGCTGGCACC GG TAGTGTCATC TGTGGTGTATGTTG
A/HN5321(+)	GTTCAGGAGGTGATTGATCG
A/HN6767(-)	AACACGCCGTGTGCCACCGT

收约 1500 bp 的片段, pSK-A1234 用 *Not* I/*Bgl* II 消化后回收约 8400 bp 的片段。然后三片段连接、转化、提质粒, 电泳和酶切鉴定得到重组质粒 pQAHN/3A₁₀₄₋₁₁₅。将酶切鉴定正确的重组质粒送西安擎科生物有限公司进行序列测定, 验证构建重组质粒的正确性。3A 蛋白 104–115 位氨基酸缺失 FMDV 基因组示意图见图 1。

1.5 病毒的拯救

用 QIAGEN Plasmid Midi Kits 制备质粒 pQAHN/3A₁₀₄₋₁₁₅, *Not* I 线性化后用 Lipofectamine™ 2000 介导转染生长至 70%–90% 满的 BSR/T7 细胞。转染后 5 h 加入 1 mL GMEM 完全培养基, 置 CO₂ 培养箱 37 °C 继续培养, 72 h 后收获病毒, 反复冻融 3 次后在 BHK-21 上连续传代, 冻存备用。拯救的基因工程病毒命名为 r-A/Sea97/3A₁₀₄₋₁₁₅。

1.6 标记病毒的鉴定

1.6.1 RT-PCR 和序列的测定: 取转染的细胞上清 350 μL, 用 RNAasy Mini Kit 提取细胞总 RNA。然后用 OZ5321(+)/OZ6767(-) 引物对一步法扩增含 3A 基因的特定片段, 纯化回收后送西安擎科生物有限公司进行序列测定。

1.6.2 间接免疫荧光: BHK-21 单层细胞(6 孔培养板)生长至 70% 满时分别接种转染的上清和亲本病毒。8 h 后吸弃培养液, 用 PBS 漂洗 3 次, 吸完残液, 3.7% 多聚甲醛室温固定 30 min; PBS 洗涤

3 次, 加 0.5% Triton X-100 室温作用 10 min; PBS 洗涤 3 次, 滴加 FMDV 3A 单抗 3A24 或 3B 单抗 3B4B1, 37 °C 孵育 1 h; PBS 漂洗 3 次, 加 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体, 37 °C 孵育 1 h; PBS 漂洗 3 次, 用甘油封片于 Olympus 荧光显微镜下观察并拍照。

1.6.3 Western blotting 分析结果: BHK-21 单层细胞生长至 90% 满时接种亲本病毒和转染上清, 感染 10 h 后弃培养液, 用 PBS (0.01 mol/L, pH 值 7.2) 漂洗 2 次后收集细胞, 用 PBS 重悬, 反复冻融裂解, 离心后上清进行 SDS-PAGE。分离的蛋白分别转印到 NC 膜, 然后用 FMDV 特异的单抗 3A24 和 3B4B1 进行免疫印记, 最后用显影液显影拍照。

1.6.4 拯救病毒的遗传稳定性分析: 将 r-A/Sea97/3A₁₀₄₋₁₁₅ 病毒按 10% 接种量接种 BHK-21 细胞, 连续传代, 观察病毒感染细胞出现典型致细胞病变的时间。收集第 5、15、20 代病毒提取总 RNA 后进行 RT-PCR 和序列测定, 分析拯救病毒 3A 蛋白氨基酸的变化。

1.7 标记病毒的噬斑表型和一步生长曲线

将第 6 代标记病毒和亲本病毒分别作 10 倍系列稀释, 然后将不同稀释度病毒分别接种长满的单层 BHK-21 细胞(200 μL/孔, 6 孔板), 置于 CO₂ 培养箱, 每 10 min 摇动 1 次。1 h 后加入 2 mL 黄芪胶混合液(1 份 2× MEM, 1 份 1.2% 黄芪胶, 1%

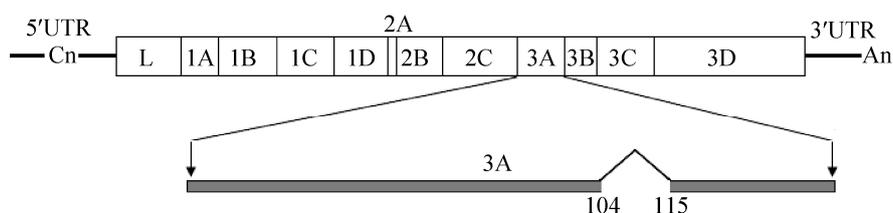


图 1. 3A 蛋白 104–115 位氨基酸缺失 FMDV 基因组示意图

Figure 1. Schematic diagram of the genome of FMDV with deletion of 104–115 amino acids in 3A protein.

血清)静止培养。48 h 后吸弃培养液,用 PBS 洗涤 2 次后加入固定液(50%丙酮+50%甲醇)室温固定 30 min。之后结晶紫染色 1 h,清水冲洗,观察病毒的噬斑表型,并计算每个病毒的噬斑形成单位(PFU)。将第 6 代标记病毒和亲本病毒以 5 个 MOI (Multiplicity of infection, MOI) 的病毒感染量接种长满的单层 BHK-21 细胞(25 mL 培养瓶),吸附 1 h 后弃病毒液,用 MEM 洗 2 次后,加 5 mL MEM 培养基并置于 37 °C CO₂ 培养箱继续培养。接种后 4、8、12、20 h 分别收取样品,反复冻融 3 次后在 BHK-21 单层细胞上(96 孔板)按照常规方法测定病毒的滴度(TCID₅₀)(实验重复 2 次),绘制病毒的一步生长曲线。

1.8 动物实验

选取 60 日龄健康易感的猪 10 头(O 型口蹄疫液相阻断 ELISA 抗体效价 < 1:6, 3ABC 抗体阴性),分为 3 组。第一组 4 头,肌肉注射 2 mL 第 8 代 r-A/Sea97/3A₁₀₄₋₁₁₅ 病毒液(含 10⁷ TCID₅₀),第二组 4 头,肌肉注射 2 mL 第 8 代 r-A/Sea97 病毒液(含 10⁷ TCID₅₀),第三组 2 头,注射 2 mL PBS 作为对照。接种后连续 10 d 观察所有试验动物出现口蹄疫临床症状的情况。收集水泡皮组织研磨后提取细胞总 RNA,RT-PCR 和序列分析,确认动物出现的临床症状是由接种的病毒所引发。动物接种 28 d 后采血,分离血清,检测动物产生的结构蛋白抗体、非结构蛋白抗体和针对 3A 单抗的表位抗体。所有抗体的检测按照试剂盒操作说明进行。

2 结果和分析

2.1 3A 蛋白 104–115 位氨基酸缺失 FMDV 全长 cDNA 克隆的构建

用特定引物分别扩增出与预期大小相符的 C、

D 和 CD 目的片段(图 2)。CD 片段和 pSK-A4 质粒用特定内切酶线性化后回收目标片段,并连入特定酶消化的 pSK-A1234 中,得到阳性质粒 pQAHN/3A₁₀₄₋₁₁₅。该质粒用 *Bgl* II 和 *Not* II 酶切鉴定,结果切出与预期大小相符的目的条带(图 3)。酶切鉴定正确的全长质粒进行测序验证,结果表明我们成功构建了含 3A 蛋白 104–115 位氨基酸缺失的 FMDV 全长 cDNA 克隆。

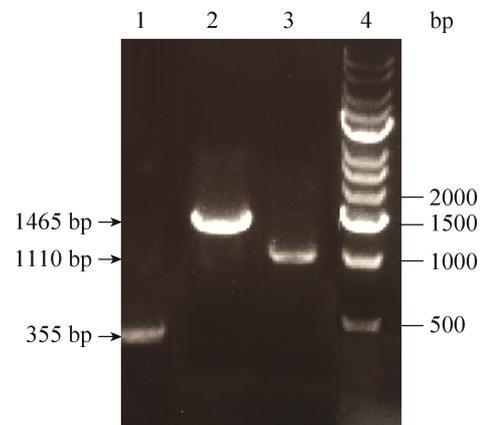


图 2. 融合 PCR 结果

Figure 2. The results of fusion PCR. Line 1: C fragment; Line 2: CD fragment; Line 3: D fragment; Line 4: DNA marker.

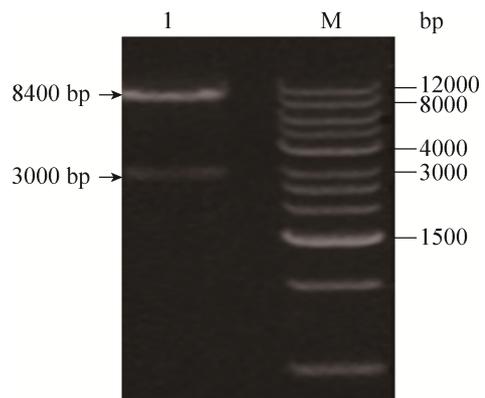


图 3. 质粒的酶切鉴定

Figure 3. Identification of plasmid with restriction enzyme digestion. Lane 1: The plasmids pQAHN/3A₁₀₄₋₁₁₅ digested with *Bgl* II and *Not* I; M: DNA marker.

2.2 病毒的拯救

pQAHN/3A₁₀₄₋₁₁₅质粒转染 BSR/T7 细胞 48 h 后, 部分正常细胞变圆, 变大, 为 FMDV 感染 BHK-21 细胞后明显的致细胞病变效应, 对照细胞生长良好(图 4)。拯救的重组病毒命名为 r-A/Sea97/3A₁₀₄₋₁₁₅。

2.3 拯救病毒的鉴定

2.3.1 RT-PCR: 对转染的上清用特定引物进行 RT-PCR 和序列测定, 结果表明成功构建了含 3A₁₀₄₋₁₁₅ 位氨基酸缺失的重组 FMDV。

2.3.2 间接免疫荧光分析: 转染的上清和亲本病

毒接种 BHK-21 细胞 8 h 后分别对其进行间接免疫荧光检测, 结果显示接种转染上清的 BHK-21 细胞用 3A 单抗作用看不到可见的绿色荧光, 而用 3B 单抗作用能看到明显的可见荧光, 而亲本病毒感染的细胞用 3A 和 3B 单抗作用均可看到可见的绿色荧光(图 5), 表明本研究拯救的标记病毒为正确的构建。

2.3.3 Western blotting 分析: 标记病毒免疫印迹分析结果表明转染上清感染的 BHK-21 细胞能与 3B 单抗反应, 不与 3A 单抗反应, 而亲本病毒感染的 BHK-21 细胞均能与 3A 和 3B 单抗反应。说明拯

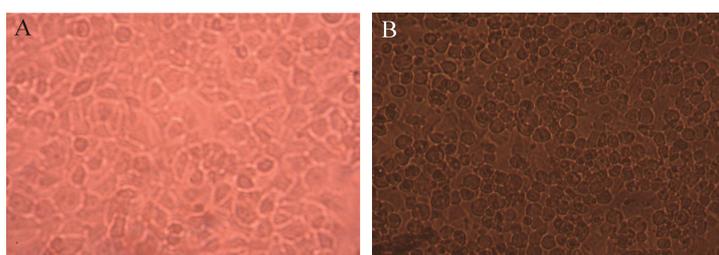


图 4. 质粒转染 BSR/T7 细胞后引起的致细胞病变

Figure 4. The cytopathic effect induced by the plasmid transfection of BSR/T7 cell. A: Normal BSR/T7 cell; B: BSR/T7 cell after transfection of the plasmid.

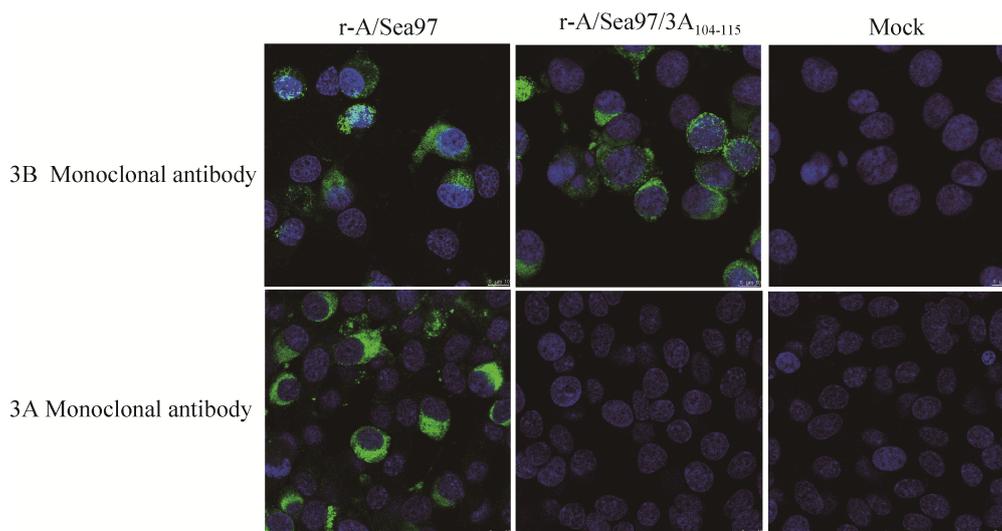


图 5. 标记病毒的间接免疫荧光鉴定

Figure 5. Identification of the marker FMDVs by IFA.

救的病毒为正确的构建, 3A 蛋白 104–115 位氨基酸的缺失取消了重组 FMDV 与 3A 单抗的反应能力, 适合作标记疫苗候选毒株, 结果见图 6。

2.3.4 拯救病毒遗传稳定性分析: 将拯救的重组病毒在 BHK-21 上连续传代, 细胞病变时间逐渐缩短, 病变更加典型, 传至第 5 代, 病变时间逐渐稳定, 95% 以上细胞病变时间为 10–12 h。对第 5、15 和 20 代细胞毒 RT-PCR 和测序分析, 结果表明引入的缺失稳定存在, 适合作病毒的遗传标记。

2.4 标记病毒的噬斑表型和一步生长曲线

亲本病毒和标记病毒的噬斑实验结果表明, 标记病毒和亲本病毒均可在 BHK-21 细胞上形成噬斑, 且噬斑形态相似。病毒的一步生长曲线也表明重组病毒和亲本病毒具有相似的生长特性, 3A 蛋白氨基酸的缺失没有明显影响标记病毒的复制能力(图 7)。

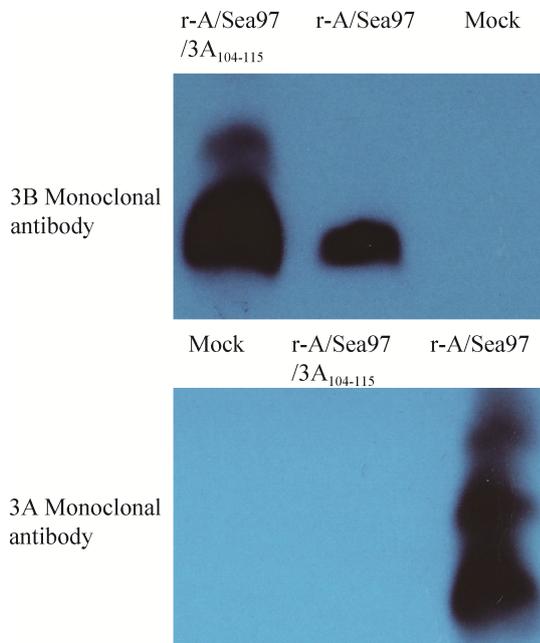


图 6. Western blotting 分析重组病毒和亲本病毒
Figure 6. Western blotting analyze the recombinant virus and parental virus.

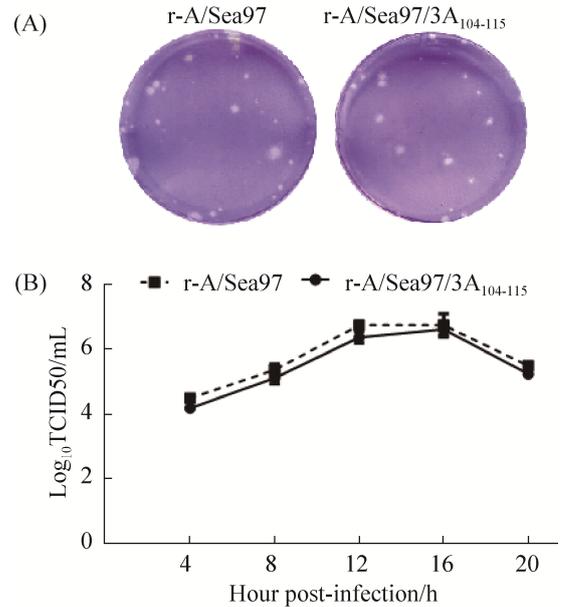


图 7. FMDV 的噬斑形态和一步生长曲线

Figure 7. The plaque phenotype and one-step growth curves of the recombinant viruses. A: the plaque phenotype of FMDV; B: one-step growth curves of FMDVs.

2.5 动物实验和抗体检测

标记病毒和亲本病毒接种猪 2 d 后, 所有接种病毒的动物均表现体温升高, 食欲减退, 精神萎靡。到接种第 5 天, 所有动物均在 2 蹄部和/或舌面出现水泡性症状, 而对照动物在整个实验过程中未出现发烧和水泡性症状。收集发病动物的水泡并对其进行 RT-PCR 和序列的测定, 结果表明动物水泡皮内均含与预期接种病毒一样的序列, 说明动物出现水泡性症状是由接种的 FMDV 引起的, 而且标记病毒和亲本病毒均对猪有很强的致病性。另外标记病毒和亲本病毒感染 28 d 的猪后均产生了结构蛋白抗体(LPBE)和非结构蛋白抗体(3ABC), 表明接种的病毒在动物体内进行了有效的复制。但只有接种亲本病毒的动物均产生了针对 3A 表位的抗体, 而接种标记病

毒的动物均未产生针对 3A 表位的抗体,说明可以通过缺失 FMDV 3A 蛋白 104–115 位氨基酸来发展 FMD A 型标记疫苗,用于我国口蹄疫的有效防控(表 2)。

3 讨论

标记疫苗(Marker vaccine)也称 DIVA (Differentiating infected from vaccinated animals)疫苗,它免疫动物后产生的抗体能通过与之相配套的血清学检测方法与自然感染的动物相区分,是近年来动物疫病研究的热点,尤其是随着 RNA 病毒反向遗传操作技术的不断发展,各类重大动物疫病基因缺失标记灭活疫苗的开发。到目前为止,研究者利用反向遗传操作技术已经成功发展了猪瘟病毒^[6]、新城疫病毒^[7]、呼吸与繁殖障碍综合征^[8]和马动脉炎病毒^[9]等的基因缺失标记疫苗。利用该技术发展 FMDV 基因缺失标记疫苗始于 2010 年, Fowler 等通过删除 FMDV 结构蛋白 G-H 环发展了标记病毒灭活疫苗。研究也表明该标记疫苗既能完全保护牛对强病毒的攻击,又能

够区分自然感染和疫苗免疫的动物^[10]。但是 FMDV 的结构蛋白(包括 G-H 环)是病毒诱导机体产生中和抗体的关键基因,因此,后期标记疫苗的开发主要是通过缺失病毒非结构蛋白免疫优势的表位而设计^[11]。如 2012 年, Uddowla 等通过缺失 FMDV 3B 或 3D 蛋白优势表位发展了致弱的标记疫苗^[12],它们免疫动物后能够用配套的诊断方法与自然感染的动物相区分。但弱毒疫苗容易发生毒力返祖,目前 FMD 疫苗市场已经不再使用。2014 年,本实验室通过缺失 O 型 FMDV 3A 蛋白 93–143 位氨基酸(包含免疫优势的 AEKNPLE 表位)在国内首次开发了能够区分感染和疫苗免疫动物的 O 型 FMD 标记疫苗^[13],其中 3A 蛋白 93–143 位氨基酸的缺失未显著影响标记病毒的复制。2015 年和 2018 年,研究者通过同时缺失不同长度的 3AB,研究其开发 FMD 标记疫苗的潜力^[14–15],但多表位或者大片段基因的缺失会严重影响病毒的复制,不适合疫苗的生产。

针对前期标记疫苗研究的成功经验和我国近年来 A 型口蹄疫的流行形势以及市场的需求,本研究利用当前流行的 A 型 FMDV 的反向遗传技术平台,成功构建了含 3A 蛋白 104–115 位氨基酸缺失的标记病毒。拯救的病毒与亲本病毒具有相似的生长特性和复制能力,在 BHK-21 细胞上连续传代,非结构蛋白的缺失稳定存在。用 3A 单抗(识别 AEKNPLE 表位)开发的阻断 ELISA 方法能够明显区分标记病毒和亲本病毒感染的动物。

本研究成功构建的标记病毒可以用于开发 FMD A 型标记疫苗,用于我国口蹄疫的有效防控。

表 2. 猪接种病毒 28 d 后的抗体水平

Table 2. Antibody levels of swine inoculated viruses after 28 days

Virus	Pig number	LPBE antibody		3ABC antibody		3A epitope antibody	
		28 d	0 d	28 d	0 d	28 d	0 d
r-A/Sea97	1304	1:720	<1:6	+	-	+	-
	1340	1:512	<1:6	+	-	+	-
	1366	1:256	<1:6	+	-	+	-
	1370	1:256	<1:6	+	-	+	-
r-A/Sea97/3A ₁₀₄₋₁₁₅	1306	1:360	<1:6	+	-	-	-
	1319	1:256	<1:6	+	-	-	-
	1351	1:512	<1:6	+	-	-	-
	1388	1:128	<1:6	+	-	-	-
Control (PBS)	1352	<1:6	<1:6	-	-	-	-
	1367	<1:6	<1:6	-	-	-	-

-: Negative; +: Positive.

参考文献

- [1] Pereira HG. Subtyping of foot-and-mouth disease virus. *Developments in Biological Standardization*, 1976, 35: 167–174.
- [2] Mateu MG, Da Silva JL, Rocha E, de Brum DL, Alonso A, Enjuanes L, Domingo E, Barahona H. Extensive antigenic heterogeneity of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *Virology*, 1988, 167(1): 113–124.
- [3] Robiolo B, Seki C, Fondevilla N, Grigera P, Scodeller E, Periolo O, La Torre J, Mattion N. Analysis of the immune response to FMDV structural and non-structural proteins in cattle in Argentina by the combined use of liquid phase and 3ABC-ELISA tests. *Vaccine*, 2006, 24(7): 997–1008.
- [4] Armstrong RM, Cox SJ, Aggarwal N, Mackay DJ, Davies PR, Hamblin PA, Dani P, Barnett PV, Paton DJ. Detection of antibody to the foot-and-mouth disease virus (FMDV) non-structural polyprotein 3ABC in sheep by ELISA. *Journal of Virological Methods*, 2005, 125(2): 153–163.
- [5] Yuan ZW, Li PH, Sun P, Bai XW, Yuan H, Ma XQ, Lu ZJ, Liu ZX, Wei YM. Complete genome sequence analysis and construction full-length infectious cDNA clone of an epidemic Foot-and-mouth disease virus of serotype A. *Microbiology China*, 2016, 43(9): 2019–2027. (in Chinese) 袁子文, 李平花, 孙普, 白兴文, 袁红, 马雪青, 卢曾军, 刘在新, 魏彦明. 一株 A 型口蹄疫流行毒株全序列的测定及其全长感染性克隆的构建. *微生物学通报*, 2016, 43(9): 2019–2027.
- [6] Widjoatmodjo MN, van Gennip HGP, Bouma A, van Rijn PA, Moormann RJ. Classical swine fever virus E^{ms} deletion mutants: *trans*-complementation and potential use as nontransmissible, modified, live-attenuated marker vaccines. *Journal of Virology*, 2000, 74(7): 2973–2980.
- [7] Mebatsion T, Koolen MJM, de Vaan LT, de Haas N, Braber M, Römer-Oberdörfer A, van den Elzen P, van der Marel P. Newcastle disease virus (NDV) marker vaccine: an immunodominant epitope on the nucleoprotein gene of NDV can be deleted or replaced by a foreign epitope. *Journal of Virology*, 2002, 76(20): 10138–10146.
- [8] Ying F, Christopher-Hennings J, Brown E, Liu HX, Chen ZH, Lawson SR, Breen R, Clement T, Gao XF, Bao JJ, Knudsen D, Daly R, Nelson E. Development of genetic markers in the non-structural protein 2 region of a US type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for future recombinant marker vaccine development. *Journal of General Virology*, 2008, 89: 3086–3096.
- [9] Castillo-Olivares J, Wieringa R, Bakonyi T, de Vries AAF, Davis-Poynter NJ, Rottier PJM. Generation of a candidate live marker vaccine for equine arteritis virus by deletion of the major virus neutralization domain. *Journal of Virology*, 2003, 77(15): 8470–8480.
- [10] Fowler VL, Knowles NJ, Paton DJ, Barnett PV. Marker vaccine potential of a foot-and-mouth disease virus with a partial VP1 G-H loop deletion. *Vaccine*, 2010, 28(19): 3428–3434.
- [11] Rodriguez LL, Gay CG. Development of vaccines toward the global control and eradication of foot-and-mouth disease. *Expert Review of Vaccine*, 2011, 10(3): 377–387.
- [12] Uddowla S, Hollister J, Pacheco JM, Rodriguez LL, Rieder E. A safe foot-and-mouth disease vaccine platform with two negative markers for differentiating infected from vaccinated animals. *Journal of Virology*, 2012, 86(21): 11675–11685.
- [13] Li PH, Lu ZJ, Bai XW, Li D, Sun P, Bao HF, Fu YF, Cao YM, Chen YL, Xie BX, Yin H, Liu ZX. Evaluation of a 3A-truncated foot-and-mouth disease virus in pigs for its potential as a marker vaccine. *Veterinary Research*, 2014, 45: 51.
- [14] Biswal JK, Subramaniam S, Ranjan R, Sharma GK, Misri J, Pattnaik B. Marker vaccine potential of foot-and-mouth disease virus with large deletion in the non-structural proteins 3A and 3B. *Biologicals*, 2015, 43(6): 504–511.
- [15] Bhatt M, Mohapatra JK, Pandey LK, Mohanty NN, Das B, Prusty BR, Pattnaik B. Mutational analysis of foot and mouth disease virus nonstructural polyprotein 3AB-coding region to design a negative marker virus. *Virus Research*, 2018, 243: 36–43.

Construction of type A foot-and-mouth disease marker virus with deletion of 104–115 amino acids of 3A protein

Pinghua Li^{1*}, Xueqing Ma¹, Hong Yuan¹, Ziwen Yuan², Pu Sun¹, Xingwen Bai¹, Zengjun Lu¹, Zaixin Liu^{1*}

¹ State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, National Foot-and-Mouth Disease Reference Laboratory, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, Gansu Province, China

² College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu Province, China

Abstract: [Objective] To structure a type A foot-and-mouth disease (FMD) marker virus with deletion of 104–115 amino acids of the nonstructural protein 3A, then to analyze its biological characteristics and the potential of developing marker vaccine. **[Methods]** Using overlap extension PCR method, we introduced the deletion of 104–115 amino acids of the nonstructural protein 3A into FMDV A/Sea-97/CHA/2014 full-length infectious clone pQAHN to generate a recombinant full-length plasmid. The marker virus was rescued after transfection linearized recombinant plasmid into BSR/T7 cells expressing T7 RNA polymerase and identified by RT-PCR, sequencing analysis, indirect immunofluorescence and Western blotting. The plaque and one-step growth curves were used to analyze the biological characteristics of the marker virus. A developed block ELISA method targeting to the deleted epitope of 3A was used to analyze the potential of differentiating animals infected with the marker virus and the wild type virus. **[Results]** We rescued a type A FMD marker virus containing deletion of 104–115 amino acids of 3A protein. The deletion did not affect the plaque phenotype and one-step growth curve of the marker virus. A developed block ELISA method targeted to the deleted epitope could clearly differentiate animals infected with the marker virus and the wild type virus. **[Conclusion]** The marker virus containing deletion of the dominant epitope of 3A is suitable as a vaccine candidate strain of differentiating infected from vaccinated animals to effectively prevent and control type A FMD in future.

Keywords: 3A protein, deletion of 104–115 amino acids, type A foot-and-mouth disease, marker virus, construction

(本文责编: 李磊)

Supported by the Study of Genetic Engineering Vaccine and Prevention and Control of Major Animal Diseases of Cattle and Sheep (2017YFD0500902)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-931-8342587; E-mail: Pinghua Li, lipinghua@caas.cn, Zaixin Liu, liuzaixin@caas.cn

Received: 8 August 2018; Revised: 15 November 2018; Published online: 29 November 2018