



VP3 G–H 环中氨基酸突变对 O 型口蹄疫病毒生物学特性的影响

陈冬冬^{1#}, 白兴文^{1#}, 官晓华¹, 包慧芳¹, 李平花¹, 李冬¹, 付元芳¹, 白启峰², 袁红¹, 孙普¹, 马雪青¹, 曹轶梅¹, 陈应理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, OIE/国家口蹄疫参考实验室, 甘肃 兰州 730046

²兰州大学基础医学院, 甘肃省新药临床前研究重点实验室, 甘肃 兰州 730000

摘要:【目的】为了研究 O 型口蹄疫病毒 VP3 G–H 环中氨基酸突变对其生物学特性的影响。【方法】借助口蹄疫病毒反向遗传操作技术平台拯救出 2 株定点突变体 rHN^{V3174Y} 和 rHN^{D3173N+V3174E+N3179C}。进行蚀斑形成试验、一步生长曲线的绘制、TCID₅₀ 和 LD₅₀ 的测定、间接免疫荧光与激光共聚焦显微镜检测。【结果】结果显示, 与骨架病毒 rHN 相比, 虽然 rHN^{V3174Y} 和 rHN^{D3173N+V3174E+N3179C} 对 BHK-21 细胞的感染性及其蚀斑表型和复制动力学无显著性差异; 但 rHN^{V3174Y} 和 rHN^{D3173N+V3174E+N3179C} 对乳鼠的致病力明显减弱, 且均获得了小窝蛋白介导侵染 CHO-K1 细胞的能力。【结论】VP3 上第 3174 位特征性氨基酸突变影响 O 型口蹄疫病毒感染宿主细胞的毒力及其内吞作用路径, 这有助于我们认知 VP3 G–H 环在口蹄疫病毒粒子立体空间构象中潜在的作用。

关键词: 口蹄疫病毒, VP3, G–H 环, 定点突变体, 生物学特性, 内吞作用

口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV) 是家畜重大动物疫病口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)的病原, 属于小 RNA 病毒科(Picornaviridae)口蹄疫病毒属(Aphthovirus), 有 7 个血清型, 基因组为单股正链

RNA, 长度约 8500 nts (nucleotides, 核苷酸)^[1]。完整的病毒粒子为正二十面体对称结构, 由 VP1–4 四种结构蛋白各 60 个拷贝组成, RNA 分子被包裹在内^[2]。VP1–4 各一分子组成“原粒”(protomer), 5 个“原粒”组成一个五聚体

基金项目: 甘肃省青年科技基金(1606RJYA256); 甘肃省自然科学基金(18JR3RA400); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(1610312016018)

#并列第一作者。

*通信作者。卢曾军, Tel/Fax: +86-931-8343390, E-mail: luzengjun@caas.cn; 刘在新, Tel/Fax: +86-931-8342587, E-mail: liuzaixin@caas.cn

收稿日期: 2018-08-31; 修回日期: 2018-11-30; 网络出版日期: 2019-03-12

(pentamer), 12 个五聚体组成病毒衣壳(capsid)^[3]。外部衣壳蛋白 VP1-3 分别编码 213、218、220 aa (amino acid, 氨基酸), 三者的空间构象相似, 都是由 8 个链状 β 折叠桶相连构成, 以 VP1 围绕五重轴和 VP2、VP3 围绕三重轴交替的形式存在于病毒粒子表面^[4]。其中, VP1 的 G-H 环是 FMDV 最主要的中和性抗原位点^[5]。位于 VP1 G-H 环中的 RGD (Arg-Gly-Asp, 1145-1147 aa)三肽基序是 FMDV 识别整联蛋白(integrin, Ins; 包括 $\alpha\beta1$ 、 $\alpha\beta3$ 、 $\alpha\beta6$ 、 $\alpha\beta8$)受体的分子基础^[6]。

研究表明, FMDV 田间分离株依赖整联蛋白-网格蛋白介导的内吞作用侵染易感细胞^[7]。某些野生型 FMDV 在体外适应细胞的过程中还能够获得利用硫酸乙酰肝素(heparan sulfate, HS)作为受体的能力^[8], 并由小窝蛋白(caveola)介导其完成在细胞中的内在化(internalization)过程^[9]。利用 HS 受体的 FMDV 细胞适应株在宿主细胞上可能会表现出致弱的毒力表型^[10]和趋小的蚀斑形态^[11]。

Baranowski 等^[12]将 FMDV C-S8c1 在 BHK-21 细胞上连续传至第 100 代时, 该毒株(C-S8c1p100)获得了对肝素的高亲和力且能够利用非 RGD 依赖型受体感染 CHO 系列细胞系, 推测这与 VP3 G-H 中 E3173K (O 型为第 3174 位)所带正负电荷的改变有关。该位点在 O 型 FMDV 中高度易变, 且该区段中的第 3173 和 3179 位氨基酸残基在 O 型和 C 型 FMDV 之间存在特征性差异^[13]。鉴于此, 本研究成功拯救了两株定点突变体, 评判 VP3 G-H 环中特定氨基酸突变对 O 型 FMDV 毒力及其入胞的内吞作用路径等生物学特性的影响, 以期探索 FMDV 与宿主(细胞)适应性共进化的分子感染机制提供材料支持。

1 材料和方法

1.1 病毒、质粒和细胞

骨架病毒 rHN 为利用 FMDV 反向遗传操作技术平台拯救的 O/HN/CHA/93 (经典疫苗株)基因工程毒, 其基因组全长 cDNA 质粒 pOFS (以 pSK 为载体)由李平花等构建并提供^[14]。含 rHN VP3 基因定点突变序列的 pUC57-VP3^{V3174Y} 和 pUC57-VP3^{D3173N+V3174E+N3179C} 质粒由苏州金唯智生物科技有限公司合成。稳定表达 T7 RNA 聚合酶的 BSR/T7-5 细胞系由德国 Karl-Klaus Conzelmann 教授惠赠。BHK-21 细胞(Ins+, HS+)和 CHO-K1 细胞(Ins-, HS+)分别引自中国典型培养物保藏中心和美国标准生物品收藏中心。

1.2 主要试剂

限制性内切酶、T4 连接酶、DNA 分子质量标准、凝胶回收和 DNA 纯化试剂盒、质粒抽提试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司。*E. coli* JM109 感受态细胞购自 Transgene 公司。Opti-MEM I、LipofectamineTM 2000、GMEM、DMEM、2×MEM 均购自 Invitrogen 公司。胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 Hyclone 公司。磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS; pH 7.4)购自 Biological Industries 公司。RNeasy Mini Kit 购自 Qiagen 公司。黄耆胶购自 MP Biomedicals 公司。O 型 FMD 豚鼠抗血清、FMDV 非结构蛋白(non-structural protein, NSP) 3A 单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb)由中国农业科学院兰州兽医研究所提供。Clathrin 重链 McAb 和兔源 caveolin 多克隆抗体(polyclonal antibody, PcAb)购自 ThermoFisher 公司。山羊抗豚鼠 IgG H&L (Alexa Fluor® 647)购自 Abcam 公司。FITC 标记的

山羊抗鼠 IgG(H+L)和山羊抗兔 IgG(H+L)购自北京康为世纪生物科技有限公司。DAPI 购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 实验动物

1-3 日龄乳鼠(昆明系), 由中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物中心提供。

1.4 VP3 定点突变的 FMDV 基因组全长 cDNA 克隆构建

首先, 利用 *Spe* I/*Not* I 分别消化 pOFS、pUC-VP3^{V3174Y} 和 pUC57-VP3^{D3173N+V3174E+N3179C}, 构建 pSK-VP3^{V3174Y} 和 pSK-VP3^{D3173N+V3174E+N3179C} 质粒。然后, 顺次利用 *Spe* I/*Eco*R I、*Nhe* I(*Spe* I)/*Not* I、*Spe* I/*Bam*H I 和 *Bgl* II/*Not* I 完成 pOFS^{V3174Y} 和 pOFS^{D3173N+V3174E+N3179C} 质粒的构建(图 1)。最终, 将两种经 *Spe* I/*Not* I 双酶切鉴定结果正确的 VP3 定点突变的 FMDV 基因组全长 cDNA 克隆送寄北京六合华大基因科技股份有限公司进行序列测定。

1.5 FMDV 定点突变体的拯救与鉴定

将测序结果正确的 pOFS^{V3174Y} 和 pOFS^{D3173N+V3174E+N3179C} 质粒用 *Not* I 酶切、回收。按 Lipofectamine™ 2000 操作说明书, 将 2.5 μg 线

性化的质粒分别转染 BSR/T7-5 细胞, 72 h 内收获转染的细胞及悬液。反复冻融 3 次, 在 BHK-21 细胞上连续传代, 直至 90%以上细胞出现典型致细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)的时间趋于稳定。

选择第 10 代基因工程毒(下同), 按 RNeasy mini Kit 说明书操作, 提取总 RNA。RT-PCR 扩增 P1 基因(上游引物 204: 5'-ACCTCCGACGGGTGG TACGC-3', 下游引物 NK61: 5'-GACATGTCCTCC TGCATCTG-3')^[15], 琼脂糖凝胶电泳、回收目的片段后, 送寄北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

1.6 蚀斑形成试验

将 rHN 及其两株 FMDV 定点突变体进行 10 倍系列稀释, 分别接种于 6 孔板中培养的单层 BHK-21 或 CHO-K1 细胞(200 μL/孔), 37 °C、1 h, 期间间隔 10-15 min 轻轻晃动 1 次, 使细胞表面保持浸润。随后, 吸弃接种液, 每孔覆盖 2 mL MEM 培养基(1 mL 含 2% FBS 的 2×MEM+1 mL 1.2% 的黄蓍胶水溶液)继续培养至 48 h (BHK-21)^[16] 或 72 h (CHO-K1)^[17]。最后, 吸弃培养基, 固定(50% 甲醇+50%丙酮)、0.2%结晶紫染色, 观察并计算蚀斑形成单位(plaque forming unit, PFU)。

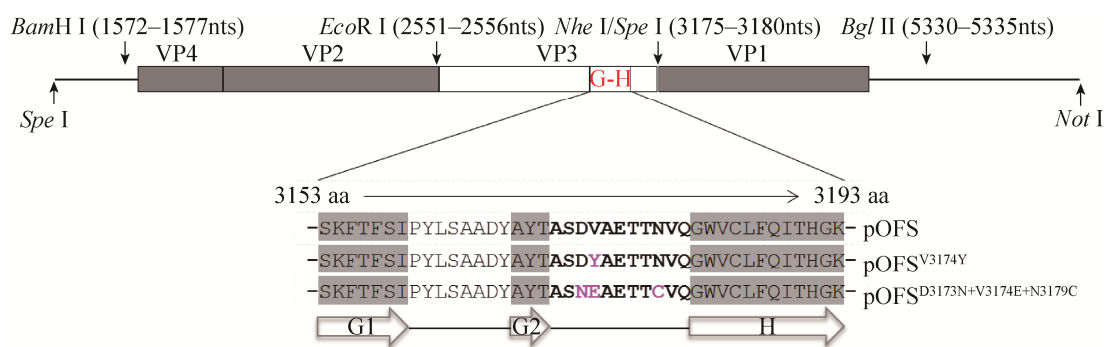


图 1. VP3 定点突变的 FMDV 基因组全长 cDNA 克隆构建示意图

Figure 1. The schematic diagram for the construction of genomic full-length cDNA clones of FMDV that contain site-directed mutation(s) in the VP3 coding region.

1.7 一步生长曲线的绘制

按 1.0 MOI (multiplicity of infection, 感染复数)^[18]将 rHN 及其两株 FMDV 定点突变体分别接种至 BHK-21 细胞, 4 °C 吸附 1 h 后, 吸弃接种液, 再重新加入不含 FBS 的 DMEM 培养基, 37 °C 孵育至第 2、4、6、8、9、10、12、16、20、24 h 时分别收获病毒。反复冻融 3 次后, 依照 1.6 项测定 PFU, 绘制一步生长曲线。

1.8 TCID₅₀ 的测定

将 BHK-21 细胞制成 2×10^6 /mL 的悬液, 与 10 倍系列稀释的 rHN 和两株 FMDV 定点突变体各取 50 μ L 加入 96 孔板中(8 孔/稀释度), 置 37 °C、CO₂ 培养箱培养至 72 h。吸弃培养基, 用 10% 福尔马林固定 30 min、0.05% 亚甲基蓝溶液染色 30 min 后冲洗, 待自然干燥后, 统计病变孔数, 按照 Kärber 法计算 TCID₅₀^[19]。

1.9 LD₅₀ 的测定

各取 10^{-4} – 10^{-8} 稀释的 rHN 和两株 FMDV 定点突变体皮下接种 1–3 日龄乳鼠(200 μ L/只, 5 只/稀释度), 观察乳鼠的发病情况, 至第 7 天, 统计乳鼠的死亡数, 按照 Reed-Muech 法计算 LD₅₀^[20]。

1.10 间接免疫荧光试验^[17]

将 rHN 及其两株 FMDV 定点突变体分别接种到 BHK-21 或 CHO-K1 细胞上, 置 37 °C、CO₂ 培养箱中。4–8 h 后, 吸弃接种液, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 0.2% Triton X-100 通透 15 min, 5% BSA 封闭 1 h, 加入 FMDV 3A McAb (3A24, 1 : 400)、37 °C 温育 1 h, 再加入 FITC 标记的山羊抗鼠 IgG (1 : 50) 反应 1 h。加入 DAPI (1 : 10000) 染核 5 min。每一步骤完成后均用 PBS 洗涤 3–5 次。最后, 置荧光倒置显微镜(EVOS FL)下观察。

1.11 激光共聚焦显微镜检测^[7,9]

按 100 MOI 将 rHN 及其两株 FMDV 定点突变体分别接种于 BHK-21 或 CHO-K1 细胞。37 °C 孵育 15 min 后, 吸弃接种液, PBS 洗涤 3 次。依次加入 O 型 FMD 豚鼠抗血清(1 : 500)、Clathrin 重链 McAb (1 : 500) 或兔源 caveolin PcAb (1 : 200), Alexa Fluor® 647 标记的山羊抗豚鼠 IgG H&L (1 : 400)、FITC 标记的山羊抗鼠或抗兔 IgG (1 : 50), 37 °C 条件下各作用 1 h。DAPI 染核 5 min、PBS 洗涤 5–8 次、50% 甘油封片后, 置激光共聚焦显微镜(TCS SP8)下观察。

2 结果和分析

2.1 VP3 定点突变的 FMDV 基因组全长 cDNA 克隆酶切鉴定与测序结果

以 pOFS 作为阳性对照, 对构建的 pOFS^{V3174Y} 和 pOFS^{D3173N+V3174E+N3179C} 质粒分别进行 *Spe I/Not I* 双酶切鉴定, 结果均获得了与预期大小相符的两条目的条带(图 2-A)。测序结果充分证实, 两种 VP3 定点突变的 FMDV 基因组全长 cDNA 克隆构建成功(图略)。

2.2 FMDV 定点突变体的拯救与传代结果

pOFS^{V3174Y} 和 pOFS^{D3173N+V3174E+N3179C} 质粒分别经 *Not I* 线性化、转染 BSR/T7-5 细胞后, 48 h 内均观察到了明显的 CPE (图略)。将收获的转染样品在 BHK-21 细胞上连续传代, 两者自第 4 代开始导致 90% 以上细胞出现 CPE 的时间趋于稳定(约 8–10 h 左右)。选择接种 BHK-21 细胞的第 10 代基因工程毒, 进行 RT-PCR 鉴定, 结果均获得了约 2474 bp (base pairs, 碱基对) 的目的条带, 凝胶回收产物的测序结果与原始质粒序列一致(图 2-B、图 2-C)。两株 FMDV 定点突变体分别命名为 rHN^{V3174Y} 和 rHN^{D3173N+V3174E+N3179C}。

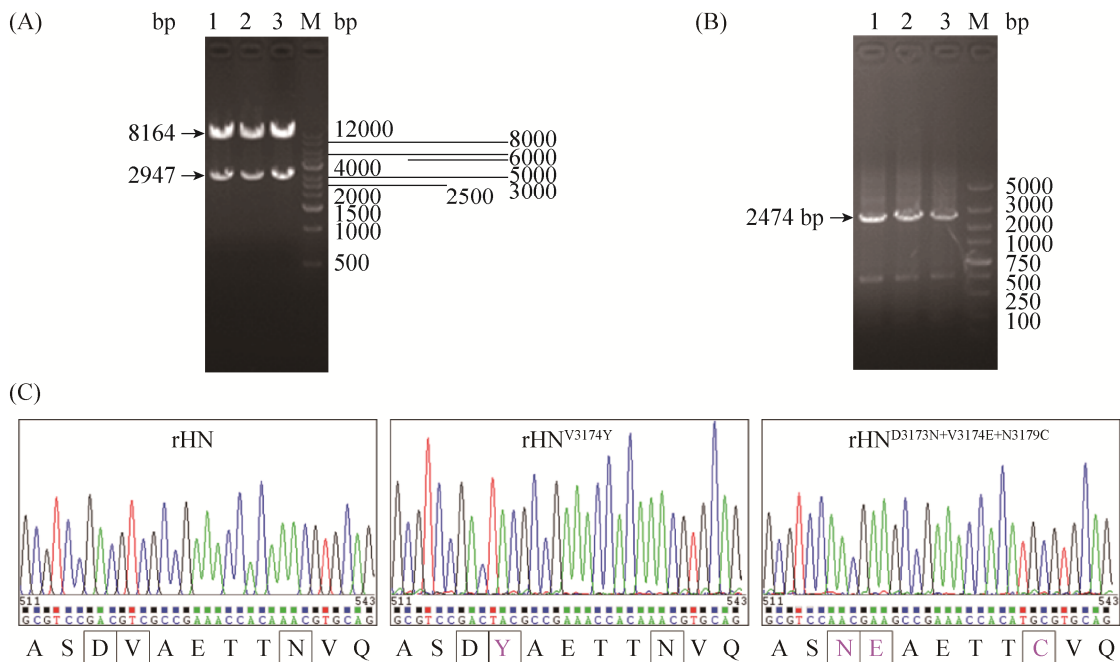


图 2. pOFS^{V3174Y} 和 pOFS^{D3173N+V3174E+N3179C} 及其定点突变体的鉴定结果

Figure 2. The results for identification of pOFS^{V3174Y} and pOFS^{D3173N+V3174E+N3179C} and the corresponding site-directed mutants. A: M: 1 kb DNA marker; lane 1–3: The products of pOFS, pOFS^{V3174Y} and pOFS^{D3173N+V3174E+N3179C} digested with *Spe* I/*Not* I (from left to right). B: M: DL5000 DNA marker; lane 1–3: The RT-PCR products of rHN, rHN^{V3174Y} and rHN^{D3173N+V3174E+N3179C} amplified with 204 and NK61 primer pairs (from left to right). C: The intrinsically or site-directed mutated peaks of 3173–3181 amino acid residues in the VP3 coding region of rHN, rHN^{V3174Y} and rHN^{D3173N+V3174E+N3179C} proved by nucleotide sequencing (from left to right).

2.3 FMDV 定点突变体的蚀斑表型和复制动力学

蚀斑形成试验结果表明, 在 BHK-21 细胞上, 与骨架病毒 rHN 相比, FMDV 定点突变体 rHN^{V3174Y} 的蚀斑形态稍有变大、复制水平略有提高, 而 FMDV 定点突变体 rHN^{D3173N+V3174E+N3179C} 的蚀斑形态趋于变小、复制能力减弱, 但统计学分析差异并不显著(图 3、表 1)。有趣的是, rHN 在 CHO-K1 细胞上不能形成蚀斑, 而 rHN^{V3174Y} 和 rHN^{D3173N+V3174E+N3179C} 在 CHO-K1 细胞上均能够形成蚀斑(图 3、表 1)。一步生长曲线的结果显示, 骨架病毒 rHN 与 FMDV 定点突变体 rHN^{V3174Y} 和 rHN^{D3173N+V3174E+N3179C} 在 BHK-21 细胞上的增殖趋

势相似, 三者的复制动力学并未表现出明显的差异(图 4)。

2.4 FMDV 定点突变体的致病性

TCID₅₀ 的测定结果显示, 骨架病毒 rHN 与 FMDV 定点突变体 rHN^{V3174Y} 和 rHN^{D3173N+V3174E+N3179C} 的 TCID₅₀ 介于 10^{-6.500}–10^{-7.125} 之间, 三者之间的差异并不显著, 这一结果进一步佐证了 O 型 FMDV VP3 G–H 环中特定氨基酸突变确未明显改变其对 BHK-21 细胞的感染性(表 1)。LD₅₀ 的测定结果显示, 与 rHN 相比, rHN^{V3174Y} 和 rHN^{D3173N+V3174E+N3179C} 对乳鼠的致病力明显减弱, 后者尤为明显(下降 10 倍以上, 见表 1)。

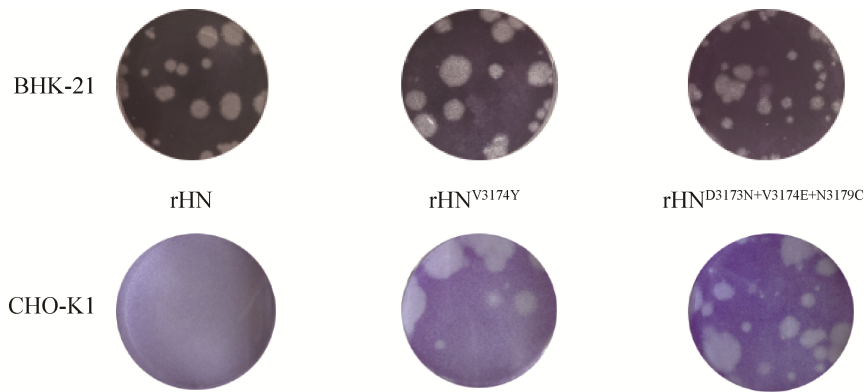


图 3. rHN、rHN^{V3174Y} 和 rHN^{D3173N+V3174E+N3179C} 在 BHK-21 和 CHO-K1 细胞上的蚀斑形态

Figure 3. The plaque morphology of rHN, rHN^{V3174Y} and rHN^{D3173N+V3174E+N3179C} on BHK-21 and CHO-K1 cells.

表 1. rHN、rHN^{V3174Y} 和 rHN^{D3173N+V3174E+N3179C} 的蚀斑表型与致病性比较分析

Table 1. Comparative analysis of plaque phenotypes and pathogenicity of rHN, rHN^{V3174Y} and rHN^{D3173N+V3174E+N3179C}

FMDV	PFU/mL		TCID ₅₀	LD ₅₀
	BHK-21	CHO-K1		
rHN	$(1.15 \pm 0.1) \times 10^7$	No plaques	$10^{-(6.750 \pm 0.250)}$	$10^{-(7.4 \pm 0.55)}$
rHN ^{V3174Y}	$(2.37 \pm 1.0) \times 10^7$	10	$10^{-(6.875 \pm 0.125)}$	$10^{-(6.2 \pm 0.55)}$
rHN ^{D3173N+V3174E+N3179C}	$(8.50 \pm 2.0) \times 10^6$	10^2	$10^{-(7.000 \pm 0.125)}$	$10^{-(5.8 \pm 0.70)}$

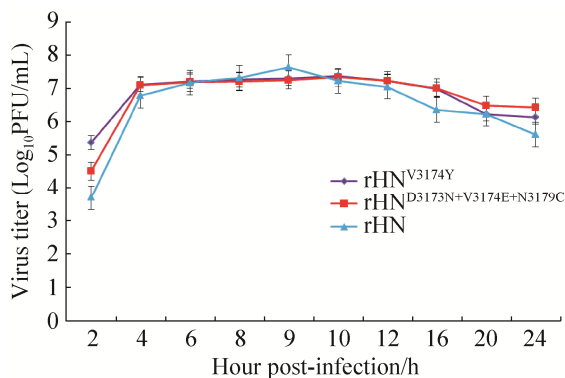


图 4. rHN、rHN^{V3174Y} 和 rHN^{D3173N+V3174E+N3179C} 的一步生长曲线

Figure 4. The one-step growth curves of rHN, rHN^{V3174Y} and rHN^{D3173N+V3174E+N3179C}.

2.5 间接免疫荧光与激光共聚焦显微镜检测结果

间接免疫荧光检测结果显示，骨架病毒与 FMDV 定点突变体接种 BHK-21 细胞 4 h 后，均能观察到因 3A24 (McAb) 识别 FMDV 3A 后与 FITC 标记的宿主特异性 IgG 发生反应而产生的绿色荧

光，表明 rHN、rHN^{V3174Y} 和 rHN^{D3173N+V3174E+N3179C} 在 BHK-21 细胞中均能正常复制、翻译(图 5)。但是，rHN、rHN^{V3174Y} 和 rHN^{D3173N+V3174E+N3179C} 接种 CHO-K1 细胞 4-8 h 后，仅有前者未能检测到 FMDV 3A 蛋白的表达，从而确证了 O 型 FMDV VP3 G-H 环中特定氨基酸突变使其获得了感染 CHO-K1 细胞的能力(图 5)。

激光共聚焦检测结果显示，骨架病毒与 FMDV 定点突变体接种 BHK-21 细胞 15 min 后，均分别能观察到 FMDV 与 clathrin 和 caveolin 共定位，说明 rHN^{D3173N+V3174E+N3179C}、rHN^{V3174Y} 和 rHN 侵染 BHK-21 细胞依赖于网格蛋白和小窝蛋白介导的两种内吞作用路径(图 6)。但在 CHO-K1 细胞上，确实仅有 rHN^{V3174Y} 和 rHN^{D3173N+V3174E+N3179C} 与 caveolin 共定位，说明两株 FMDV 定点突变体侵染 CHO-K1 细胞应是依赖于小窝蛋白介导的内吞作用路径。

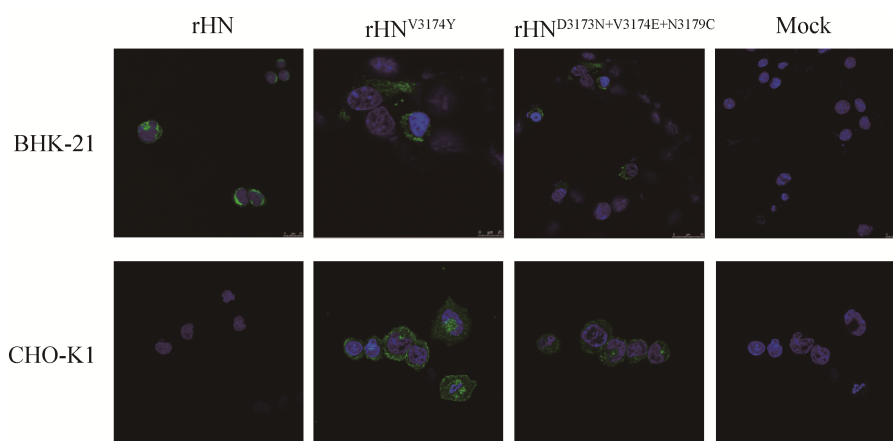


图 5. rHN、rHN^{V3174Y} 和 rHN^{D3173N+V3174E+N3179C} 接种 BHK-21 和 CHO-K1 细胞后有无 NSP 3A 表达的间接免疫荧光检测结果

Figure 5. The results of indirect immunofluorescence assays for the detection of non-structural protein 3A expression of rHN, rHN^{V3174Y} and rHN^{D3173N+V3174E+N3179C} in BHK-21 and CHO-K1 cell lines.

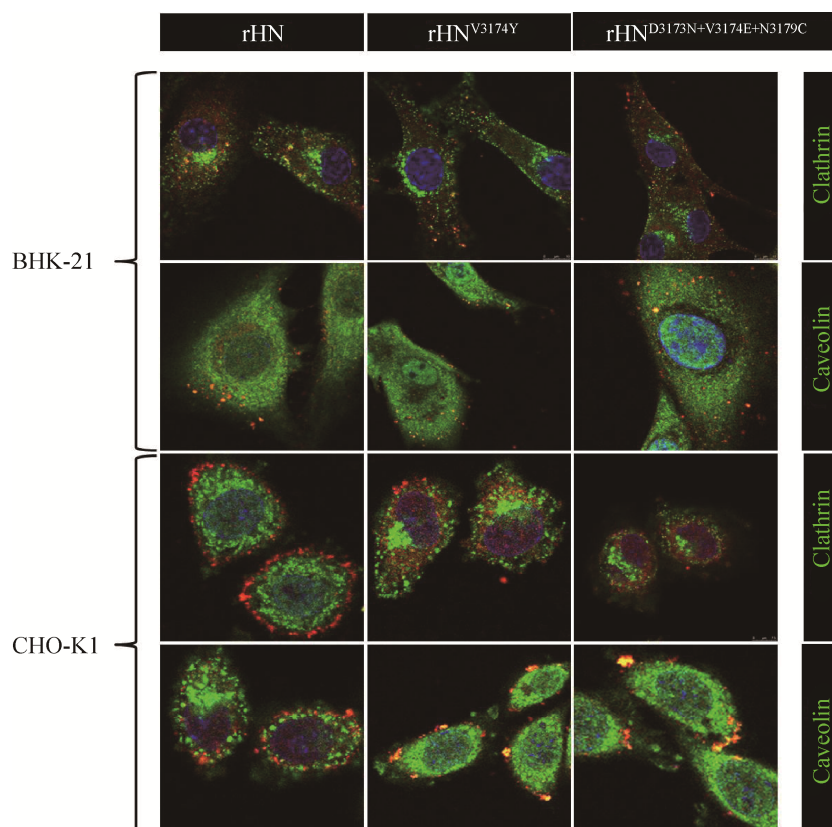


图 6. rHN、rHN^{V3174Y} 和 rHN^{D3173N+V3174E+N3179C} 侵染 BHK-21 和 CHO-K1 细胞的激光共聚焦显微镜检测结果

Figure 6. The results of laser confocal microscopies for endocytosis of rHN, rHN^{V3174Y} and rHN^{D3173N+V3174E+N3179C} in BHK-21 and CHO-K1 cell lines.

3 讨论

晶体结构模拟分析显示, FMDV 三种外部衣壳蛋白 VP1-3 的 G-H 环(1130-1165 aa, 2172-2176 aa 和 3171-3181 aa)在空间上相互靠近^[21-22]。FMDV C-S8c1p100 中, 3173K 与 R1141 (RGD 基序)互作^[12]。而 O 型 FMDV 中, VP3 上的第 3174 位氨基酸残基与 VP1 上的第 1135 位氨基酸残基距离最短(图略); 我们前期研究发现, 将第 3174 位的非极性氨基酸(Val)突变为极性脂肪类氨基酸(Ala, Ser, Thr)并未使其获得感染 CHO-K1 细胞的能力^[13]。已知 CHO-K1 细胞表面缺乏可供 FMDV 有效利用的整联蛋白受体, 且有许多参与病毒入胞的重要基因转录却不表达, 如 $\beta 4$ GlcNAc (*N*-乙酰葡萄糖胺)、ST6Gal (β -半乳糖苷 $\alpha 2,6$ -唾液酸转移酶)、HS3ST (HS 葡萄糖胺 3-O-磺基转移酶)等等^[23]。本研究中, 两株 FMDV 定点突变体 rHN^{V3174Y} 和 rHN^{D3173N+V3174E+N3179C} 均能感染 CHO-K1 细胞, 而且第 3173 或 3179 位氨基酸发生假回复突变(N3173S, C3179S; 结果未发表)也不影响后者在 CHO-K1 细胞中的正常复制、翻译, 暗示 V3174Y 和 V3174E 分别因空间位阻效应(芳香族氨基酸)和正负电荷作用(酸性氨基酸), 限制了 VP1 G-H 环的空间灵活性, 导致 FMDV 利用受体类型的转换。

查新资料可知, FMDV 在 BHK-21 细胞上的蚀斑形态与其利用受体的类型并无绝对相关性^[17]。FMDV VP3 C-段(3111-3220 aa)在启动宿主细胞中的 β 干扰素信号通路时发挥负调节作用^[24]。而 BHK-21 细胞为 I 型干扰素缺陷型细胞系^[25]。这就解释了为何 VP3 G-H 环中特定氨基酸突变并未显著性改变 rHN^{V3174Y} 和 rHN^{D3173N+V3174E+N3179C} 在 BHK-21 细胞上的生物学特性, 但两者对乳鼠的毒

力明显致弱这一现象。

尽管 rHN 在 CHO-K1 细胞上不能形成蚀斑, 它仍可特异性吸附到 CHO-K1 细胞表面, 这或与 VP1 上的关键性氨基酸变异(如 L2080M、E1083K 和 D1138G 等)有关; rHN^{V3174Y} 和 rHN^{D3173N+V3174E+N3179C} 依赖小窝蛋白介导的内吞作用路径侵染 CHO-K1 细胞, 与此同时, 它们也能够在本糖基转移酶缺陷型的 pgsA745、*N*-乙酰葡萄糖胺和葡萄糖醛酸转移酶缺陷型的 pgsD677 两种 CHO 系列细胞系上形成蚀斑; 但是, 我们的试验数据并不支持 FMDV 利用除整联蛋白和 HS 以外的所谓第三类受体 JMJD6 (Jumonji C-domain-containing protein 6, JmjC 结构域家族蛋白 6)以网格蛋白介导的内吞作用路径侵染 CHO 系列细胞系^[26-27]。况且, 骨架病毒 rHN 与两株 FMDV 定点突变体 rHN^{V3174Y} 和 rHN^{D3173N+V3174E+N3179C} 都具有对肝素(HS 类似物)的高亲和力。

由此看来, 未来可利用 rHN、rHN^{V3174Y} 和 rHN^{D3173N+V3174E+N3179C} 为材料, 深入开展 FMDV 与细胞表面受体分子的吸附与侵入, 拮抗宿主先天性免疫应答的分子机制甚至 VP3 G-H 环中特定氨基酸突变对 FMDV 抗原性的影响等研究。

参考文献

- [1] Knowles NJ, Hovi T, Hyypiä T, King AMQ, Lindberg AM, Pallansch MA, Palmenberg AC, Simmonds P, Skern T, Stanway G, Yamashita T, Zell R. *Picornaviridae*//King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier, 2012.
- [2] Vasquez C, Denoya CD, La Torre J, Palma EL. Structure of foot-and-mouth disease virus capsid. *Virology*, 1979, 97(1): 195-200.
- [3] Acharya R, Fry E, Stuart D, Fox G, Rowlands D, Brown F. The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease

- virus at 2.9 Å resolution. *Nature*, 1989, 337(6209): 709–716.
- [4] Han SC, Guo HC, Sun SQ. Three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus and its biological functions. *Archives of Virology*, 2015, 160(1): 1–16.
- [5] 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.
- [6] Mateu MG, Valero ML, Andreu D, Domingo E. Systematic replacement of amino acid residues within an Arg-Gly-Asp-containing loop of foot-and-mouth disease virus and effect on cell recognition. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(22): 12814–12819.
- [7] O'Donnell V, LaRocco M, Duque H, Baxt B. Analysis of foot-and-mouth disease virus internalization events in cultured cells. *Journal of Virology*, 2005, 79(13): 8506–8518.
- [8] Jackson T, Ellard FM, Ghazaleh RA, Brookes SM, Blakemore WE, Corteyn AH, Stuart DI, Newman JW, King AMO. Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *Journal of Virology*, 1996, 70(8): 5282–5287.
- [9] O'Donnell V, LaRocco M, Baxt B. Heparan sulfate-binding foot-and-mouth disease virus enters cells via caveola-mediated endocytosis. *Journal of Virology*, 2008, 82(18): 9075–9085.
- [10] Sa-Carvalho D, Rieder E, Baxt B, Rodarte R, Tanuri A, Mason PW. Tissue culture adaptation of foot-and-mouth disease virus selects viruses that bind to heparin and are attenuated in cattle. *Journal of Virology*, 1997, 71(7): 5115–5123.
- [11] Escarmís C, Carrillo EC, Ferrer M, Arriaza JFC, Lopez N, Tami C, Verdaguer N, Domingo E, Franze-Fernández MT. Rapid selection in modified BHK-21 cells of a foot-and-mouth disease virus variant showing alterations in cell tropism. *Journal of Virology*, 1998, 72(12): 10171–10179.
- [12] Baranowski E, Sevilla N, Verdaguer N, Ruiz-Jarabo CM, Beck E, Domingo E. Multiple virulence determinants of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Journal of Virology*, 1998, 72(8): 6362–6372.
- [13] 白兴文. 我国 O 型泛亚 1 系口蹄疫病毒表型差异的分子基础. 中国农业科学院博士学位论文, 2012.
- [14] Li PH, Bai XW, Sun P, Li D, Lu ZJ, Cao YM, Fu YF, Bao HF, Chen YL, Xie BX, Liu ZX. Evaluation of a genetically modified foot-and-mouth disease virus vaccine candidate generated by reverse genetics. *BMC Veterinary Research*, 2012, 8: 57.
- [15] Zhang XS, Liu ZX, Zhao QZ, Chang HY, Xie QG. Sequencing and analysis for the full-length genome RNA of foot-and-mouth disease virus China/99. *Science in China Series C: Life Sciences*, 2004, 47(1): 74–81.
- [16] Bai XW, Bao HF, Li PH, Sun P, Kuang WD, Cao YM, Lu ZJ, Liu ZX, Liu XT. Genetic characterization of the cell-adapted PanAsia strain of foot-and-mouth disease virus O/Fujian/CHA/5/99 isolated from swine. *Virology Journal*, 2010, 7: 208.
- [17] Bai XW, Bao HF, Li PH, Wei W, Zhang M, Sun P, Cao YM, Lu ZJ, Fu YF, Xie BX, Chen YL, Li D, Luo JX, Liu ZX. Effects of two amino acid substitutions in the capsid proteins on the interaction of two cell-adapted PanAsia-1 strains of foot-and-mouth disease virus serotype O with heparan sulfate receptor. *Virology Journal*, 2014, 11: 132.
- [18] Li PH, Bai XW, Cao YM, Han CH, Lu ZJ, Sun P, Yin H, Liu ZX. Expression and stability of foreign epitopes introduced into 3A nonstructural protein of foot-and-mouth disease virus. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41486.
- [19] Kärber G. A contribution to the collective treatment of a pharmacological experimental series. *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 1931, 162(4): 480–483. (in German)
- [20] Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene*, 1938, 27(3): 493–497.
- [21] Mateu MG. Antibody recognition of picornaviruses and escape from neutralization: a structural view. *Virus Research*, 1995, 38(1): 1–24.
- [22] 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.
- [23] Xu X, Nagarajan H, Lewis NE, Pan SK, Cai ZM, Liu X, Chen WB, Xie M, Wang WL, Hammond S, Andersen MR, Neff N, Passarelli B, Koh W, Fan HC, Wang JB, Gui YT, Lee KH, Betenbaugh MJ, Quake SR, Famili I, Palsson BO, Wang J. The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(8): 735–741.
- [24] Li D, Yang WP, Yang F, Liu HN, Zhu ZX, Lian KQ, Lei CQ, Li S, Liu XT, Zheng HX, Shu HB. The VP3 structural protein of foot-and-mouth disease virus inhibits the IFN-β signaling pathway. *The FASEB Journal*, 2016, 30(5): 1757–1766.
- [25] Habjan M, Penski N, Spiegel M, Weber F. T7 RNA polymerase-dependent and -independent systems for cDNA-based rescue of Rift Valley fever virus. *Journal of General Virology*, 2008, 89: 2157–2166.
- [26] Lawrence P, Rai D, Conderino JS, Uddowla S, Rieder E. Role of Jumonji C-domain containing protein 6 (JMJD6) in infectivity of foot-and-mouth disease virus. *Virology*, 2016, 492: 38–52.
- [27] Lawrence P, Pacheco J, Stenfeldt C, Arzt J, Rai DK, Rieder E. Pathogenesis and micro-anatomic characterization of a cell-adapted mutant foot-and-mouth disease virus in cattle: impact of the Jumonji C-domain containing protein 6 (JMJD6) and route of inoculation. *Virology*, 2016, 492: 108–117.

Effect of amino acid mutation(s) in the G–H loop of VP3 on biological characteristics of foot-and-mouth disease virus serotype O

Dongdong Chen^{1#}, Xingwen Bai^{1#}, Xiaohua Gong¹, Huifang Bao¹, Pinghua Li¹, Dong Li¹, Yuanfang Fu¹, Qifeng Bai², Hong Yuan¹, Pu Sun¹, Xueqing Ma¹, Yimei Cao¹, Yingli Chen¹, Zengjun Lu^{1*}, Zaixin Liu^{1*}

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

² Key Laboratory of Preclinical Study for New Drugs of Gansu Province, School of Basic Medical Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Abstract: [Objective] To study the effect of amino acid mutation(s) in the G–H loop of VP3 of foot-and-mouth disease virus (FMDV) serotype O on its biological characteristics. **[Methods]** Two site-directed mutants, rHN^{V3174Y} and rHN^{D3173N+V3174E+N3179C}, were generated by using reverse genetic technique platform of FMDV. The phenotypic properties of the resulting viruses were characterized by plaque forming assays, one-step growth curves, determination of TCID₅₀ and LD₅₀, indirect immunofluorescence assays and laser confocal microscopies. **[Results]** There were no significant differences in the infectivity, plaque phenotype, and replication kinetics between rHN, rHN^{V3174Y} and rHN^{D3173N+V3174E+N3179C} for BHK-21 cells. Compared to the backbone virus rHN, however, the pathogenicity of rHN^{V3174Y} and rHN^{D3173N+V3174E+N3179C} was obvious decreased in suckling mice, and these two rescued viruses gained the ability to infect CHO-K1 cells via caveola-mediated endocytosis. **[Conclusion]** Individual amino acid mutations at position 3174 in VP3 have an influence on the virulence and endocytic pathway of FMDV serotype O in the infection of host cells, which may help us understand the potentially important functional roles of the G–H loop of VP3 in the 3D spatial conformation of FMDV virion.

Keywords: foot-and-mouth disease virus, VP3, G–H loop, site-directed mutant, biological characteristics, endocytosis

(本文责编: 李磊)

Supported by the Gansu Provincial Science and Technology Development Foundation for Youths (1606RJYA256), by the Natural Science Foundation of Gansu Province (18JR3RA400) and by the Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund (1610312016018)

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. Zengjun Lu, Tel/Fax: +86-931-8343390, E-mail: luzengjun@caas.cn; Zaixin Liu, Tel/Fax: +86-931-8342587, E-mail: liuzaixin@caas.cn

Received: 31 August 2018; Revised: 30 November 2018; Published online: 12 March 2019