



一株 O 型口蹄疫病毒在 C57BL/6 小鼠和原代细胞的传代及其全序的测定和分析

龚婷², 黄书伦¹, 查晶晶¹, 孙普¹, 马雪青¹, 白兴文¹, 袁红¹, 曹轶梅¹, 李坤¹, 张婧¹, 卢曾军¹, 刘在新¹, 李平花^{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 河南牧业经济学院, 河南 郑州 450000

摘要:【目的】旨在成功建立 FMDV C57BL/6 小鼠的实验感染模型。【方法】采用体内和体外循环适应传代的方法, 选取一株对 C57BL/6 小鼠不敏感 FMDV O/HK/CHA/99 MF4, 将其在 C57BL/6 小鼠(体内)和胎猪肾原代细胞 FPK (体外)进行多次循环适应传代。【结果】成功获得一株对 C57BL/6 小鼠敏感的 FMDV O/HK/CHA/99 MF4C5 株。【结论】本研究成功建立了 FMDV 突变株感染 C57BL/6 小鼠的实验动物模型, 为未来 FMD 疫苗效力的评估和致病性相关的研究奠定了基础。

关键词: 口蹄疫病毒, 小鼠, 细胞, 循环传代, 全序的测定与分析

口蹄疫(Foot-and-Mouth Disease, FMD)是由口蹄疫病毒(Foot-and-Mouth Disease virus, FMDV)引起猪、牛、羊等主要家畜和野生偶蹄动物感染的一种急性、热性、高度接触性传染病。该病传播迅速、发病率高, 我国规定为一类动物传染病。该病的暴发和流行严重危害家畜的生产力和畜产品质量, 影响发病地区的经济发展、国际贸易和社会稳定。因此, 100 多年来该病一直是全世界兽医学家关注的焦点。

国际兽医卫生组织规定 FMD 疫苗效力的有效性评估必须在猪和牛等靶动物上进行。但该方法存在非免疫的猪、牛等纯净动物来源困难、试验成本高、难以操作等一系列问题。因此, FMDV 实验动物模型的研究越来越受到人们的关注。20 世纪 30 年代, 研究者发现一些 FMDV 接种豚鼠后能引起和猪、牛感染相似的临床症状, 在趾部、舌面和唇部出现水泡性组织病变, 至此, 人们将豚鼠作为 FMDV 研究的一种模型动物, 用于病毒致病性及疫苗免疫效力的评估^[1-3]。但是, 到目前

基金项目: “十三五”国家重点研发计划(2017YFD0501104)

*通信作者。Tel/Fax: +86-931-8342587; E-mail: lipinghua@caas.cn

收稿日期: 2019-09-23; 修回日期: 2019-12-16; 网络出版日期: 2020-05-26

为止, 豚鼠遗传学和免疫系统等方面还不清楚, 且一些 FMDV 毒株不易在豚鼠体内引起激发性病变而受到应用的限制^[4]。相比豚鼠, 近年来的研究发现, 一些 FMDV(C1 C-S8c1、SAT1、Asia1 Shamir 和 A/Arg/01)对 C57BL/6 小鼠是非常敏感的, 它们均可导致该品系小鼠出现典型的临床症状和死亡^[4-6], 而一些对 C57BL/6 小鼠不敏感的 FMDV, 如 O/Jincheon/SKR/2014、A/Malaysia/97 和 Asia1/MOG/2005, 通过在 C57BL/6 小鼠和原代细胞(新生山羊舌上皮细胞 ZZ-R)的多次适应传代, 也能引起 C57BL/6 小鼠发病和死亡^[7]。自此, C57BL/6 小鼠也逐渐被作为一种实验动物模型, 用于 FMDV 疫苗效力和致病性等的研究^[8-9]。但到目前为止, 有关 FMDV 株感染 C57BL/6 小鼠动物模型的研究仍鲜有报道。因此, 本研究通过 FMDV 在 C57BL/6 小鼠和 FPK 原代细胞的循环传代, 试图建立 FMDV 的实验感染模型, 从而为 FMDV 致病分子机制和新型疫苗的开发奠定基础。

1 材料和方法

1.1 病毒、细胞、动物

不能引起 C57BL/6 小鼠出现临床症状的 FMDV O/HK/CHA/99 第 4 代乳鼠毒(O/HK/CHA/99 MF4)和胎猪肾原代细胞 FPK 由中国农业科学院兰州兽医研究所宿主抗病毒感染与免疫生物学团队分离

保存。8 周龄 C57BL/6 小鼠购自中国农业科学院兰州兽医研究所动物厂。

1.2 FMDV 的传代

FMDV O/HK/CHA/99 MF4 鼠毒 12000 r/min 离心 10 min, 取上清后脚掌皮下接种 8 周龄 C57BL/6 小鼠($n=10$), 0.1 mL/只。接种 48 h 后小鼠眼眶采血、分离血清并过滤。过滤后的所有血清接种单层长满的 FPK 细胞。当约 95%以上 FPK 细胞出现细胞变圆时, 收集病变细胞, 反复冻融 3 次后, 12000 r/min 离心 10 min, 取上清以 1/10 体积的病毒接种量再次接种至单层长满的 FPK 细胞, 约 95%以上 FPK 细胞出现细胞病变后, 如上收集病毒, 再接种 C57BL/6 小鼠进行循环传代。C57BL/6 小鼠和 FPK 细胞的循环传代重复 9 次(传代详情见图 1)。其中将病毒在 FPK 细胞上第 2 次传代收集的病毒标记为循环的代次(C_n), 如第 5 轮循环在 FPK 细胞上第 2 次传代的病毒, 标记为 O/HK/CHA/99 MF4C5。整个循环传代过程中同时设立对照小鼠, 接种 PBS, 0.1 mL/只。为了检测 FMDV 在未出现临床症状小鼠体内的复制情况, 将小鼠体内分离的血液用 RNAasy Mini Kit 提取细胞总 RNA, 用 FMDV 3D 特异的引物(RQ1 CAAACCTGTGATGGCTTCGA, RQ3 CCGGTAC TCGTCA/TGGTCCA)和探针(FAM-CTCTCCTTT GCACGCCGTGGGAC-BHQ) RT-PCR 实时荧光定量检测接种的 FMDV 在小鼠体内 RNA 的拷贝数。

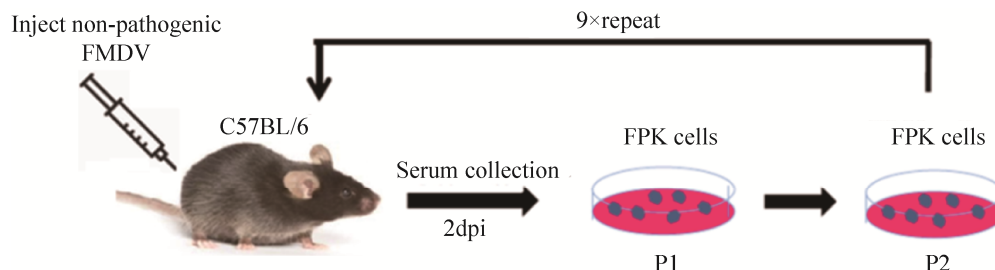


图 1. 获取致 C57BL/6 小鼠发病 FMDV 的策略

Figure 1. Strategy of obtaining lethal FMDV for C57BL/6 adult mice.

1.3 FMDV 蚀斑表型和一步生长曲线

为了比较分析循环传代引发 C57BL/6 小鼠出现临床症状和死亡的 FMDV O/HK/CHA/99 MF4C5 和传代前病毒 O/HK/CHA/99 MF4 的生物学特性, 我们对这 2 个病毒的蚀斑表型和一步生长曲线进行分析。将 O/HK/CHA/99 MF4C5 和 O/HK/CHA/99 MF4 两个 FMDV 分别作 10 倍系列稀释, 然后将不同稀释度病毒按照文献报道的方法做蚀斑表型分析, 并计算每个病毒的噬斑形成单位(PFU)^[10]。将 10^6 PFU/mL 的两病毒分别接种到长满的单层 BHK-21 细胞(25 mL 培养瓶, 约 10^6 个细胞), 吸附 1 h 后弃病毒液, 用 PBS 洗 3 次, 加 5 mL MEM 基础培养基, 并置于 CO₂ 培养箱继续培养。于接种后 4、8、12、16 h 分别收取感染细胞, 反复冻融 2 次后在 BHK-21 单层细胞上按照常规方法测定病毒的滴度(PFU/mL), 并绘制病毒的一步生长曲线。

1.4 FMDV 对乳鼠的致病性

为了检测 FMDV O/HK/CHA/99 MF4 和 O/HK/CHA/99 MF4C5 对乳鼠的致病性, 将两病毒用 PBS 缓冲液(pH=7.6)进行 10 倍系列稀释, 取 10^{-4} – 10^{-8} 稀释度的病毒液皮下接种 2 日龄乳鼠, 0.2 mL/只, 每个稀释度接种 4 只, 设 2 个空白对照。接种后每日观察乳鼠的发病和死亡情况, 连续观察 1 周, 并记录, 用 Reed-munch 法计算病毒对乳鼠的 LD₅₀。

1.5 FMDV 对 C57BL/6 小鼠的致病性

为了检测传代病毒 O/HK/CHA/99 MF4C5 和 O/HK/CHA/99 MF4C9 对 C57BL/6 小鼠的致病性, 我们将两病毒用 PBS 缓冲液(pH=7.6)进行 10 倍系列稀释, 取 10^{-1} – 10^{-5} 稀释度分别脚后掌皮下接种 8 周龄 C57BL/6 小鼠, 每个稀释度接种 5 只,

0.1 mL/只, 对照小鼠接种 PBS。连续观察 7 d, 根据小鼠的发病情况, 用 Reed-Munch 法计算两 FMDV 对 C57BL/6 小鼠的 LD₅₀。

1.6 FMDV 基因组全序列的测定和编码氨基酸的比对分析

为了比较分析循环传代过程中 FMDV 编码氨基酸的差异, 收集不能引起 C57BL/6 小鼠出现临床症状的突变株(O/HK/CHA/99 MF4 和 O/HK/CHA/99 MF4C3)以及致 C57BL/6 小鼠出现临床症状和死亡的 FMDV(O/HK/CHA/99 MF4C5 和 O/HK/CHA/99 MF4C9), 用 RNeasy Mini Kit (QIAGEN)提取细胞总 RNA, 然后用合成的引物(表 1)对其进行 RT-PCR, 扩增每个病毒 5 个重叠的 DNA 片段。扩增片段经凝胶纯化回收后送西安奥科生物技术有限公司进行序列测定。测定的病毒全基因序列用软件 MegAlign 比较分析。

2 结果和分析

2.1 FMDV 的传代

FMDV O/HK/CHA/99 MF4 前 3 轮循环传代接种的 C57BL/6 小鼠, 在 48 h 内看不到任何明显的精神沉郁、行动迟缓、毛发直立、运动失调的临床

表 1. RT-PCR 所用引物

Table 1. Primers used for RT-PCR

Primer	Primer sequence (5'→3')	Fragment
HK1F	TTGAAAGGGGGCGCTAGGGT	HK1
HK1R	GGGGGGGGGGGGTGAAGGCGGGCTTC	
HK2F	TCGACGATAAAGGGCTGTGACC	HK2
HK2R	GGTCAGCCGTCTTTGGGTCAGT	
HK3F	ACCGCTACGACCAGTACAAGGTAC	HK3
HK3R	TGGCGAATATGTCATTGATGTCAC	
HK4F	ATCATGCTGGCTGACACCGGTCTT	HK4
HK4R	CTGTCTTCCCGTCGAGTATGAGCT	
HK5F	AGAGACCTCTGAAAGTGAGAGCCA	HK5
HK5R	T18GAATAGAGGAAACGGGAAAAGC	

床症状和死亡,但实时荧光定量的结果表明接种的 FMDV 在小鼠体内进行了有效地复制。循环传代至第 4 轮时,在 48 h 内有 3 只小鼠出现精神沉郁、行动迟缓、毛发直立、运动失调等症状,传至第 5 轮时,在 48 h 内,1/2 以上的小鼠出现不同程度的临床症状,且有 1 只小鼠死亡。继续循环传代至第 9 轮,48 h 内全部接种小鼠均出现典型的临床症状,并有 2 只小鼠发生死亡,且第 1 只

小鼠出现死亡的时间比第 5 轮循环中出现死亡的时间缩短了 10 h (表 2)。而所有接种 PBS 的小鼠在整个实验过程中未出现任何 FMDV 的临床症状和死亡。这些结果表明对 C57BL/6 小鼠不敏感的 FMDV,可以通过在体内和体外的多次循环传代引起小鼠出现典型 FMD 临床症状和死亡,而且随着传代次数的增加,FMDV 对小鼠的致病力也逐渐增强。

表 2. FMDV O/HK/CHA/99 MF4 在 C57BL/6 小鼠和 FPK 细胞中传代结果

Table 2. The results of passage of FMDV O/HK/CHA/99 MF4 in C57BL/6 mice and FPK cell

Passage number	Clinical symptoms	Viremia	Mice with clinical symptoms	Dead mice	Time of the first mice died/h
Cycle 1	—	Y	0	0	
Cycle 2	—	Y	0	0	
Cycle 3	—	Y	0	0	
Cycle 4	+	Y	3	0	
Cycle 5	+	Y	5	1	46
Cycle 6	++	Y	7	1	46
Cycle 7	+++	Y	7	1	45
Cycle 8	+++	Y	8	2	40
Cycle 9	+++	Y	10	2	36

+: Clinical symptoms were observed in 48 h post-inoculated; ++: Severe clinical symptoms were observed in 48 h post-inoculated; +++: Very severe clinical symptoms were observed in 48 h post-inoculated; Y: Emergence of viremia.

2.2 蚀斑表型和一步生长曲线

用常规方法分别对 FMDV O/HK/CHA/99 MF4 和 FMDV O/HK/CHA/99 MF4C5 进行了蚀斑表型和一步生长曲线分析。结果表明,适应前和适应后病毒 FMDV 均可在 BHK-21 细胞上形成蚀斑,且蚀斑形态大小相同(图 2-A)。一步生长曲线也表明 2 个病毒 FMDV 和 BHK-21 细胞上具有相似的复制能力。说明 FMDV O/HK/CHA/99 MF4 通过在体内和体外的循环适应并没有改变其蚀斑表型和病毒的复制特性。

2.3 FMDV 对乳鼠的致病性

将 FMDV O/HK/CHA/99 MF4 和 FMDV O/HK/CHA/99 MF4C5 不同稀释度病毒分别接种 2 日龄乳鼠,其中 FMDV O/HK/CHA/99 MF4C5 10^{-3}

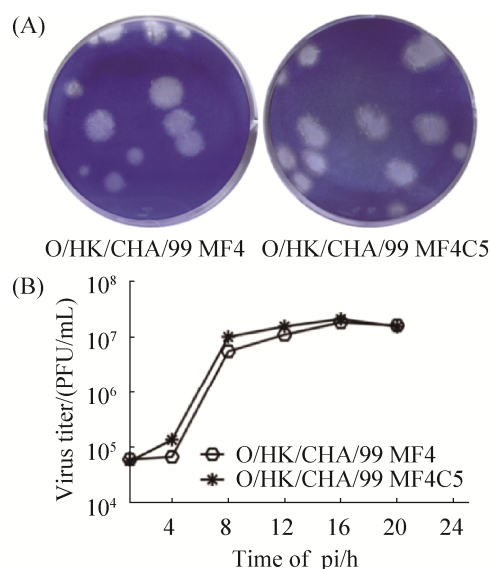


图 2. FMDV 蚀斑表型和一步生长曲线

Figure 2. The plaque phenotype and one-step growth curves of FMDVs. A: the plaque phenotype of FMDVs; B: one-step growth curves of FMDVs.

至 10^{-7} 接种的乳鼠在 40 h 内全部死亡, 而接种 FMDV O/HK/CHA/99 MF4 10^{-3} 至 10^{-6} 的小鼠在接种后 48 h 内全部死亡。剩余乳鼠和对照乳鼠连续观察 1 周均未出现任何 FMD 临床症状和死亡。统计乳鼠的死亡情况, 计算 O/HK/CHA/99 MF4 和 FMDV O/HK/CHA/99 MF4C5 对乳鼠的 LD_{50} , 分别为 $10^{6.5}$ 和 $10^{7.5}$ 。结果说明 FMDV O/HK/CHA/99 MF4 经体内和体外循环传代后, 对乳鼠的致病力明显增强, 这可能是传代适应的 FMDV 致 C57BL/6 小鼠出现临床症状和死亡的原因。

2.4 FMDV 对 C57BL/6 小鼠的致病性

选取循环适应传代的第 5 和第 9 轮 FMDV, 检测其对 C57BL/6 小鼠的致病性。结果测得适应 5 轮和 9 轮后的 FMDV 对 C57BL/6 小鼠的 LD_{50} 分别为 $10^{2.8}$ 和 $10^{5.1}$, 表明增加 FMDV 在小鼠和原代细胞中的循环传代次数, 能够增强 FMDV 对 C57BL/6 小鼠的致病力。两病毒接种 C57BL/6 小鼠后死亡情况见图 3。

2.5 FMDV 全序的测定和编码氨基酸的比对分析

循环传代前和循环适应后第 3、5 和 9 代 FMDV 进行核苷酸序列的测定, 结果表明第 3 代病毒发生 2 个核苷酸(VP3 C123T, 2C C278T)的突变, 第 5 代病毒发生了 6 个核苷酸的突变(VP4 G189A, VP2 C309T, VP3 C123T+C294T, VP1 G37A+C168G, 2C C278T), 第 9 代 FMDV 发生了 7 个核苷酸的突变(VP4 G189A, VP2 C309T, VP3 C123T+C294T, VP1 G37A+C168G, 2C C278T)。利用 MegAlign 分子生物学软件对测定 FMDV 的编码氨基酸进行比对分析, 结果表明第 3 代病毒发生了 1 个氨基酸(2C A93T)的突变, 第 5 代和第 9 代病毒均获得了 2 个氨基酸的突变(VP1 A13T 和 2C A93T)。传代病毒核苷酸和氨基酸的变化详情见表 3。循环传代病毒核酸的变化主要发生在结构蛋白 VP4、VP2、VP3、VP1 和 2C 区域, 而氨基酸的变化仅发生在 VP1 和 2C 蛋白上。这些氨基酸的变化是否导致 FMDV 对小鼠致病力的增强有待进一步研究。

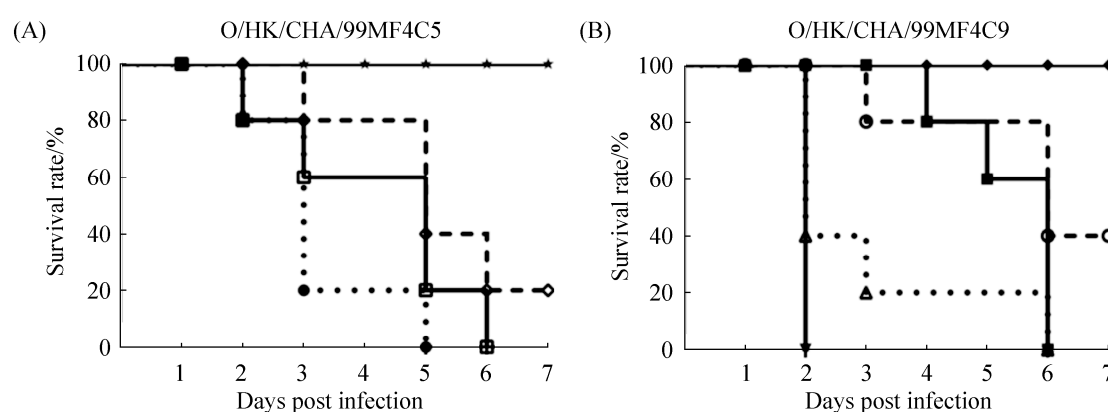


图 3. FMDV 感染 C57BL/6 小鼠的存活率

Figure 3. The survival of C57BL/6 mice infected with FMDVs. A: The survival of C57BL/6 mice infected with FMDV O/HK/CHA/99 MF4C5; B: The survival of C57BL/6 mice infected with FMDV O/HK/CHA/99 MF4C9. ●: 10^6 TCID₅₀; □: 10^5 TCID₅₀; ◇: 10^4 TCID₅₀; ★: 10^3 TCID₅₀; ▼: 10^5 TCID₅₀; △: 10^4 TCID₅₀; ■: 10^3 TCID₅₀; ○: 10^2 TCID₅₀; ◆: 10^1 TCID₅₀.

表 3. 传代 FMDVs O/HK/CHA/99 MF4 核酸和氨基酸的变化

Table 3. Change of nucleotides and amino acids of serial passage of FMDVs O/HK/CHA/99 MF4

Gene	(O/HK/CHA/99 MF4C3)		(O/HK/CHA/99 MF4C5)		(O/HK/CHA/99 MF4C9)	
	Nucleotide	Amino acid	Nucleotide	Amino acid	Nucleotide	Amino acid
VP4	–	–	G189A	–	G189A	–
VP2	–	–	C309T	–	C309T	–
VP3	C123T	–	C123T	–	C123T	–
	–	–	C294T	–	C294T	–
VP1	–	–	G37A	A13 T	G37A	A13 T
					C168G	
2C	C278T	A93T	C278T	A93T	C278T	A93T

3 讨论

实验动物模型在各种病毒疫苗的研究中具有重要的作用,利用动物模型可对疫苗的安全性、免疫原性以及保护效力进行评估。因此,寻求一种经济、方便、操作简单和来源充足的 FMDV 动物模型备受研究者的关注。对于 FMDV 来说,除豚鼠和乳鼠动物模型外^[5-6],C57BL/6 小鼠模型一直未能建立。推测可能是因为许多的 FMDV 株不能引起 C57BL/6 小鼠发病^[5-6]。直到 2016 年,韩国学者发现一些不引起 C57BL/6 小鼠发病的 FMDV (O Jincheon/SKR/2014、A Malaysia 97 和 Asia1 MOG/2005),通过在 C57BL/6 小鼠体内(1 次)+胎新生山羊舌上皮细胞(ZZ-R)传代(2 次),共 5 轮循环传代后,3 个病毒均可引起 C57BL/6 小鼠出现典型的 FMDV 临床症状和死亡,但其机制仍不清楚。另外他们也发现 C57BL/6 模型动物对 FMDV 疫苗效力的评价结果与在靶动物上取得的结果一致。因此,他们认为应用 C57BL/6 小鼠可以有效地评估 FMDV 疫苗的效力^[7]。

为了在本实验室成功建立 FMDV 的 C57BL/6 小鼠模型,用于低成本、简单、有效评估 FMD 疫苗的效力以及一些病毒致病机制的探索,本研究选取一株不引起 C57BL/6 小鼠发病的 FMDV

O/HK/CHA/99 的第 4 代乳鼠毒(O/HK/CHA/99 MF4),在 C57BL/6 小鼠和 FPK 原代细胞之间循环适应传代。结果我们成功获得一株能够引起 C57BL/6 小鼠发病和死亡的 FMDV 突变株。该突变株随着传代次数的增加,对小鼠的致病力也逐渐增强(如相比第 5 轮传代病毒,第 9 轮传代病毒对 C57BL/6 小鼠的 LD₅₀增加了约 100 倍)。我们的结果说明,对 C57BL/6 小鼠不敏感的 FMDV,可以通过在 C57BL/6 小鼠体内和体外细胞的循环传代而引起 C57BL/6 小鼠发病和死亡,且随着传代次数的增加,病毒的毒力也逐渐增强。但传代 FMDV 对 C57BL/6 小鼠致病力的增强与病毒在细胞上的复制没有直接的相关性。

为了未来揭示传代前和传代后 FMDV 对 C57BL/6 致病性差异的分子机制,我们对传代前和传代后第 3、5 和 9 代病毒的编码氨基酸进行了比对分析,发现第 3 轮传代病毒获得 1 个氨基酸的突变(2C A93T),第 5 轮和第 9 轮病毒均获得 2 个氨基酸(VP1 A13T 和 2C A93T)的突变。这与韩国学者的报道相似, O/Jincheon/SKR/2014、A/Malaysia/97 经过 5 轮循环传代也获得了多个氨基酸的突变,但 Asia1 MOG/2005 经过 5 轮循环传代只发生了 1 个核苷酸的变化,没有氨基酸的突变^[7]。但至今为止,无论是韩国学者还是本研

究, 对于传代病毒致病性发生改变的机制仍不清楚, 是否由于传代过程中获得氨基酸突变所致, 还是可能存在其他未知的机制, 有待未来进一步的研究。

本研究通过在 C57BL/6 小鼠和 FPK 原代细胞的多轮循环传代, 成功建立了 FMDV 的 C57BL/6 小鼠模型, 为未来 FMD 疫苗效力的评估和病毒致病机制的研究奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Núñez JI, Baranowski E, Molina N, Ruiz-Jarabo CM, Sánchez C, Domingo E, Sobrino F. A single amino acid substitution in nonstructural protein 3A can mediate adaptation of foot-and-mouth disease virus to the guinea pig. *Journal of Virology*, 2001, 75(8): 3977–3983.
- [2] Yao QX, Qian P, Huang QF, Cao Y, Chen HC. Comparison of immune responses to different foot-and-mouth disease genetically engineered vaccines in guinea pigs. *Journal of Virological Methods*, 2008, 147(1): 143–150.
- [3] Guo HC, Liu ZX, Sun SQ, Bao HF, Chen YL, Liu XT, Xie QG. Immune response in guinea pigs vaccinated with DNA vaccine of foot-and-mouth disease virus O/China99. *Vaccine*, 2005, 23(25): 3236–3242.
- [4] Salguero FJ, Sánchez-Martín MA, Díaz-San Segundo F, de Avila A, Sevilla N. Foot-and-mouth disease virus (FMDV) causes an acute disease that can be lethal for adult laboratory mice. *Virology*, 2005, 332(1): 384–396.
- [5] García-Núñez S, König G, Berinstein A, Carrillo E. Differences in the virulence of two strains of foot-and-mouth disease virus serotype A with the same spatiotemporal distribution. *Virus Research*, 2010, 147(1): 149–152.
- [6] Habiela M, Seago J, Perez-Martin E, Waters R, Windsor M, Salguero FJ, Wood J, Charleston B, Juleff N. Laboratory animal models to study foot-and-mouth disease: a review with emphasis on natural and vaccine-induced immunity. *Journal of General Virology*, 2014, 95(1): 2329–2345.
- [7] Lee SY, Ko MK, Lee KN, Choi JH, You SH, Pyo HM, Lee MH, Kim B, Lee JS, Park JH. Application of mouse model for effective evaluation of foot-and-mouth disease vaccine. *Vaccine*, 2016, 34(33): 3731–3737.
- [8] You SH, Kim T, Choi JH, Park G, Lee KN, Kim B, Lee MH, Kim HS, Kim SM, Park JH. Coinjection of a vaccine and anti-viral agents can provide fast-acting protection from foot-and-mouth disease. *Antiviral Research*, 2017, 143: 195–204.
- [9] Zhou GH, Wang HW, Wang F, Yu L. Recombinant adenovirus expressing type Asia1 foot-and-mouth disease virus capsid proteins induces protective immunity against homologous virus challenge in mice. *Research in Veterinary Science*, 2013, 94(3): 796–802.
- [10] Li PH, Ma XQ, Yuan H, Yuan ZW, Sun P, Bai XW, Lu ZJ, Liu ZX. Construction of type A foot-and-mouth disease marker virus with deletion of 104–115 amino acids of 3A protein. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(5): 907–915. (in Chinese)
- 李平花, 马雪青, 袁红, 袁子文, 孙普, 白兴文, 卢曾军, 刘在新. 3A 蛋白 104–115 位氨基酸缺失口蹄疫 A 型标记病毒的构建. *微生物学报*, 2019, 59(5): 907–915.

Passage of a type O foot-and-mouth disease virus in mice and cell and analysis of its complete sequence

Ting Gong², Shulun Huang¹, Jingjing Zha¹, Pu Sun¹, Xueqing Ma¹, Xingwen Bai¹, Hong Yuan¹, Yimei Cao¹, Kun Li¹, Jing Zhang¹, Zengjun Lu¹, Zaixin Liu¹, Pinghua Li^{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 Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450000, Henan Province, China

Abstract: [Objective] To successfully establish the C57BL/6 mice experimental infection model for foot-and-mouth disease virus. [Methods] The foot-and-mouth disease virus O/HK/CHA/99 MF4 strain, which is insensitive to C57BL/6 mice, was selected and continuously passaged in C57BL/6 mice (*in vivo*) and fetal pig kidney cells (*in vitro*). [Results] We successfully obtained a foot-and-mouth disease virus mutant (O/HK/CHA/99 MF4C5), which was sensitive to C57BL/6 mouse. [Conclusion] This study successfully established C57BL/6 mice model for a foot-and-mouth disease virus mutant strain, which lays a foundation for the evaluation of the efficacy of foot-and-mouth disease vaccine and the study on pathogenicity in the future.

Keywords: Foot-and-mouth disease virus, mice, cell, cyclic passage, analysis of complete sequence

(本文责编: 张晓丽)

Supported by National Key Research and Development Program of the 13th Five-Year Plan (2017YFD0501104)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-931-8342587; E-mail: lipinghua@caas.cn

Received: 23 September 2019; Revised: 16 December 2019; Published online: 26 May 2020