

不同长度 poly(C)对口蹄疫病毒基因工程毒的毒力影响

白兴文, 李平花, 孙普, 李永亮, 包慧芳, 卢曾军, 曹轶梅, 郭建宏, 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, 国家口蹄疫参考实验室, 农业部畜禽病毒学重点开放实验室, 兰州 730046)

摘要:【目的】研究口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV) poly(C)区段的序列长度与 FMDV 毒力之间的关系。【方法】首先利用 *Nhe* /*Not* 线性化 FMDV pGEM-XJ/AKT/69 全长重组质粒, 制备体外转录本, 借助 Lipofectamine 2000 转染 BHK-21 细胞, 获得基因工程毒。随后, 在细胞传代过程中, 收取不同代数病毒培养液, 提取总 RNA 进行 poly(C)的长度测定, 并进行乳鼠致病性试验和 BHK-21 细胞 TCID₅₀ 的测定。【结果】我们发现, 基因工程毒在 BHK-21 上连续传代至第 6 代时, 可见明显的致细胞病变效应(cytopathic effect, CPE); 在经过一代乳鼠接种之后再重新适应到 BHK-21 细胞的过程中, poly(C)区段出现了缩短现象; 乳鼠致病性试验和 BHK-21 细胞 TCID₅₀ 测定结果表明, 尽管基因工程毒与母本毒相比毒力偏低, 但含有不同长度 poly(C)的基因工程毒之间并无显著差异。【结论】poly(C)区段的序列长度在 12~17 个 C 之间改变对 FMDV 基因工程毒的毒力无明显的影响。

关键词: 口蹄疫病毒; 基因工程毒; poly(C); 毒力

中图分类号: Q78, S852 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 12-1654-05

口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)感染引起的偶蹄动物共患的一种急性、热性、高度接触性传染病^[1]。FMDV 是人类发现的第一个被确认的动物病毒, 归类为小 RNA 病毒科(Picornaviridae), 口蹄疫病毒属(Aphthovirus)^[2]。病毒基因组为单股正链 RNA, 在其 5'-非编码区(5'-noncoding region, 5'-NCR)有一段特殊的长度约为 80~420 个核苷酸不等的 poly(C)区段, C 碱基的含量约 90%^[3,4]。推测它可能通过与 PCBP[poly(rC)-binding protein, 聚胞嘧啶结合蛋白]的相互作用, 在 FMDV 基因组的调控过程中发挥重要功能^[5]。早期研究表明, poly(C)的长度还与病毒的毒力有关^[6]。1984 年, Giomi 等^[7]通过比较具有不同长度 poly(C)的 FMDV 分离株后, 却得出该序列的长度与毒力无关结论。那么 poly(C)长度与 FMDV 毒力

之间究竟存在必然的联系与否? 源于人们在研究心病毒(Cardiovirus)的 poly(C)时发现该区段非常稳定且 poly(C)的长度对于病毒的毒力是必需的启发^[8], 许多科学工作者也试图通过构建具有不同长度 poly(C)的感染性分子克隆(包括感染性体外转录本和感染性 cDNA)等多种途径来寻找能够证明 FMDV 的 poly(C)区段与病毒的毒力是否有关的实验证据和理论依据。

本研究借助反向遗传操作技术, 利用已构建的全长 cDNA 制备体外转录本, 转染 BHK-21 细胞, RT-PCR、间接免疫荧光和电镜观察结果证实我们成功获得了基因工程毒。通过收集含有不同长度 poly(C)的细胞传代病毒, 进行了乳鼠致病性试验和 BHK-21 细胞 TCID₅₀ 测定。这些数据为说明 poly(C)序列长度与 FMDV 毒力之间的关系提供了直接、具体的试验证据。

基金项目: 国家“973 项目”(2005CB23201); “十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD06A03)

*通讯作者。Tel: +86-931-8342587; Fax: +86-931-8342052; E-mail: liukey@public.lz.gs.cn

作者简介: 白兴文(1981-), 男, 甘肃环县人, 博士研究生, 研究方向为病毒基因工程。E-mail: baixingwen@163.com

收稿日期: 2008-05-13; 修回日期: 2008-07-19

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和细胞、实验动物: FMDV pGEM-XJ/AKT/69 全长重组质粒为本实验室构建, BHK-21 细胞由本实验室保存, 3 日龄乳鼠购自兰州生物制品所。

1.1.2 主要试剂: FMDV 兔阳性血清由本实验室马军武研究员惠赠; 限制性内切酶 *Nhe*、*Not* (Biolab); DNase、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega); RNAMaxx™ High Yield Transcription Kit (Stratagene); DMEM、OPTI-MEM、Lipofectamine 2000 (Invitrogen); Proteinase K、Ribonuclease Inhibitor、AMV Reverse Transcriptase、LA Taq (TaKaRa); MEGAclear (Ambion); Standard FBS (Hyclone); FITC 羊抗兔 IgG (Sigma)。

1.2 全长 cDNA 分子克隆感染性的鉴定

1.2.1 体外转录本的制备: 用 *Nhe*/*Not* 限制性内切酶消化重组质粒 pGEM-XJ/AKT/69, 回收目的片段; 蛋白酶 K 处理, 酚/氯仿抽提, 酒精沉淀, 重悬于适量体积的 RNase-free 水中; 使用 RNAMaxx™ High Yield Transcription Kit 进行体外转录; 反应结束后, 用 MEGAclear 立即进行转录产物的纯化, 具体操作按照操作说明书进行; 最后用含有甲醛的变性琼脂糖凝胶检测 RNA 的完整性。

1.2.2 细胞转染试验: 在 BHK-21 细胞生长至 80% 左右时, 室温条件下, 使用 2 mL OPTI-MEM I 清洗细胞。同时按照 2~5 μg/10 μL 将 RNA/Lipofectamine 2000 混合, 然后将该复合物加到清洗过的细胞表面, 于 5% CO₂ 的培养箱中 37 培养 4 h, 然后用含有 10% FBS 的 DMEM 更换转染培养基。继续培养至 72 h 收获病毒, 反复冻融 3 次, 再接种 BHK-21 细胞, 直到病毒能稳定地产生致细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE)。

1.2.3 基因工程毒的鉴定: RT-PCR 检测: 提取病毒总 RNA, 用特异性引物反转录出第一链 cDNA (5'-GTTCTGTACTGCTGCATGTAG-3'), 再进行 PCR 反应, 琼脂糖凝胶电泳, 然后回收目的片段, 进行序列测定。

间接免疫荧光检测: 参照文献 [9] 的方法, 将感染细胞与阴、阳性对照细胞用免疫荧光染色, 用 70% 甘油封片于 Olympus 荧光显微镜下观察。**电镜观察:** 参照文献 [10] 的方法, 用差速离心法纯化病毒。样品重悬于 pH 7.6 NET (100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 50 mmol/L Tris-HCl) 缓冲液后, 做常规负染, 置 H-7100FA 电子显微镜下观察病毒粒子。

1.3 乳鼠 LD₅₀ 和细胞 TCID₅₀ 的测定

选用 3 日龄乳鼠 (FMDV 抗原、抗体均呈阴性),

8 × 5 组, 5 只/组。实验组 (6 × 5 组): 用 PBS 缓冲液 10 × 系列稀释基因工程毒, 用系列稀释的病毒液经皮下接种乳鼠, 接种剂量 200 μL/只, 连续观察 72 h, 计算 LD₅₀。阴性对照组: 只注射 PBS (200 μL/只) 缓冲液。阳性对照组: 按照实验组的接种方法和剂量接种 FMDV A/XJ/AKT/69 株病毒液。采用微量法在 BHK-21 细胞上测定系列基因工程毒与母本毒的 TCID₅₀。

2 结果和分析

2.1 体外转录结果

按照 RNAMaxx™ High Yield Transcription Kit 操作说明进行体外转录, 转录产物纯化后, 用 1% 的甲醛变性凝胶进行电泳检测。结果可见大小约为 8.2 kb 的条带, 表明体外转录本 RNA 是完整的 (图 1)。

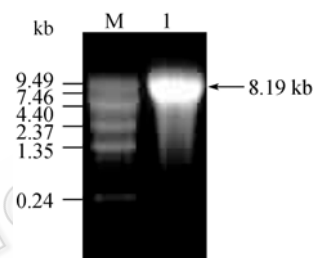


图 1 FMDV pGEM-XJ/AKT/69 全长重组质粒的体外转录本
Fig. 1 *In vitro* transcripts of the linearized full-length recombinant plasmid of FMDV pGEM-XJ/AKT/69. M. 0.24-9.5 kb RNA Ladder; 1. *in vitro* transcripts.

2.2 BHK-21 细胞转染结果

用体外转录本 RNA 转染 BHK-21 细胞, 72 h 后收集细胞培养液。连续传代至第 6 代时, 细胞在接种后 24 h 内可见明显的 CPE, 细胞变圆、呈葡萄串状、核致密化, 随着培养时间的延长, 细胞逐渐崩解; 而阴性对照细胞生长良好, 单层完整, 形态规则 (图 2)。

2.3 基因工程毒的鉴定结果

2.3.1 RT-PCR 鉴定结果: 收集病毒液, 提取病毒总 RNA, RT-PCR 扩增产物用琼脂糖凝胶电泳分析 (图略)。结果表明, 扩增片段符合预期大小, 序列测定进一步确证为 FMDV。而且, 在细胞传代过程中, 我们还获得了含有不同长度 poly(C) 的基因工程毒, 其 poly(C) 长度分别为 17、12、13、14 个核苷酸。

2.3.2 免疫荧光检测结果: 将用体外转录本转染的 BHK-21 细胞、FMDV A/XJ/AKT/69 株病毒液感染的 BHK-21 细胞与未经转染的 BHK-21 细胞进行间接免

疫荧光染色, 荧光显微镜下可见用体外转录本转染的 BHK-21 细胞和阳性对照中有特异荧光产生, 表明细胞中有 FMDV 蛋白的存在; 而未转染的阴性对照细胞中无特异荧光出现(图 3)。

2.3.3 电镜观察结果: 病毒液浓缩后, 做常规负染, 置于电镜下观察, 可见直径约 20~30 nm 的 FMDV 颗

粒, 病毒粒子呈球形(图 4)。以上结果说明 FMDV pGEM-XJ/AKT/69 全长 cDNA 感染性分子克隆构建成功。

2.4 乳鼠致病性试验和 BHK-21 细胞 TCID₅₀ 测定结果
选择第 6 代细胞传代基因工程毒(F6)和经过 1 代乳鼠接种后重新适应 BHK-21 细胞的 MBF1(17 个 C)、

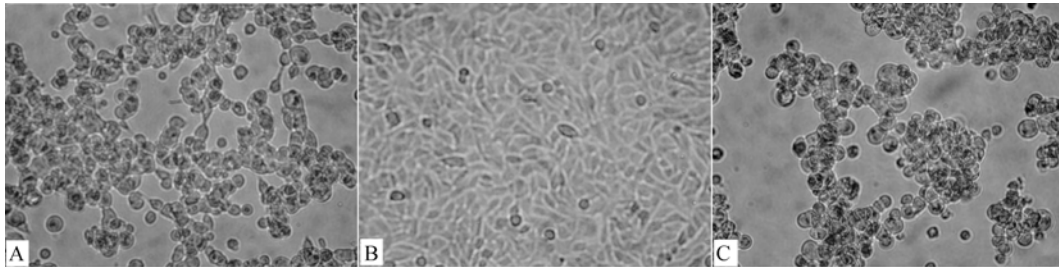


图 2 体外转录本 RNA 转染 BHK-21 细胞结果

Fig. 2 The results of BHK-21 cells transfected with the *in vitro* transcripts RNA. A: BHK-21 cells transfected with *in vitro* transcripts; B: normal BHK-21 cells; C: BHK-21 cells infected with wild virus.

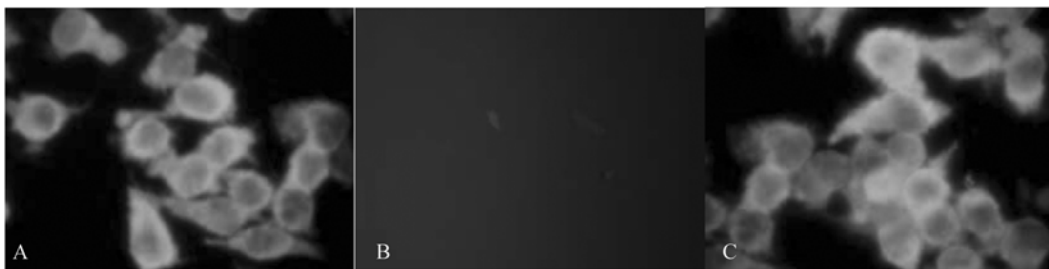


图 3 免疫荧光检测结果

Fig. 3 The results of indirect immunofluorescence assay. A: BHK-21 cells transfected with *in vitro* transcripts; B: normal BHK-21 cells; C: BHK-21 cells infected with wild virus.

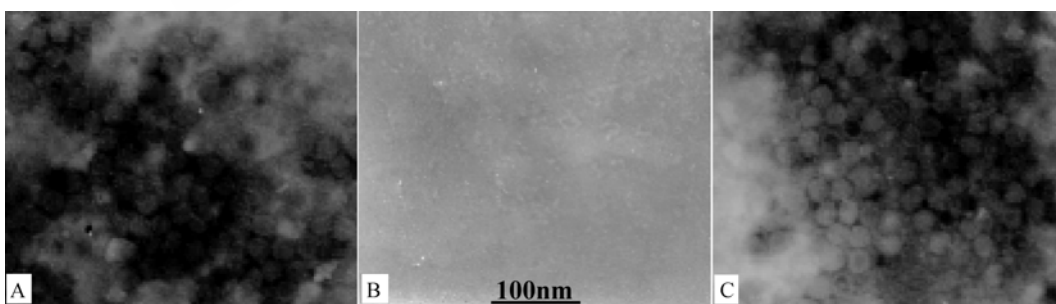


图 4 电镜下观察到的 FMDV 病毒粒子 (80000×)

Fig. 4 Electron micrographs of FMDV particles (80000 ×). A: rescued virus; B: negative control; C: wild virus.

MBF2(12 个 C)、MBF3(13 个 C)、MBF4(14 个 C) 以及 MBF6(poly(C)恢复到类似母本毒的序列长度)传代基因工程毒, 接种 3 日龄乳鼠, 结果在接种 28~60 h 部分乳鼠表现典型的呼吸困难、后肢麻痹等症状, 最终死亡。根据统计结果, 依据 Reed-Muench 法计算

LD₅₀; 微量法测得病毒 TCID₅₀。基因工程毒与其母本毒 A/XJ/AKT/69 株相比 LD₅₀ 稍有偏低(< 10 × 倍), 且在 BHK-21 细胞上测得的 TCID₅₀ 相差至少一个数量级。但在乳鼠致病性上和细胞病变效应上, 不同代数基因工程毒并没有表现出明显的区别(表 1)。

表 1 FMDV A/XJ/AKT/69 株及基因工程毒 LD₅₀ 和 TCID₅₀ 测定结果Table 1 Detection results for LD₅₀ and TCID₅₀ of parental virus and rescued viruses from differential passages.

Virus	A/XJ/AKT/69	F6	MBF1	MBF2	MBF3	MBF4	MBF6
LD ₅₀	10 ⁻⁷	10 ^{-6.3}	10 ^{-6.3}	10 ^{-6.5}	10 ^{-6.0}	10 ^{-6.3}	10 ^{-6.5}
TCID ₅₀	10 ^{-5.5}	10 ^{-4.375}	10 ^{-4.125}	10 ^{-4.25}	10 ^{-4.125}	10 ^{-4.375}	10 ^{-4.5}

3 讨论

利用反向遗传操作技术构建 FMDV 感染性分子克隆,保持一定长度的 poly(C)序列是必需的。但是,由于 FMDV 基因组 RNA 的 poly(C)区段形成了比较牢固的二级结构,根据目前的技术手段还无法直接从病料当中克隆到这一区段的真实序列。在构建全长 cDNA 的过程中,克服这一困难的策略有:末端转移酶加尾法^[11]、重叠延伸技术^[12]和人工模拟法^[13,14]等,其中后两种方法比较常用。刘光清^[10]等构建的 FMDV OH/CHA/99 株基因组全长 cDNA 中 poly(C)区段的序列长度分别为 12、16、29 个 C,并在 BHK-21 细胞中均成功实现了体外转录本 RNA 的拯救;van Rensburg 等^[15]构建的 ZIM/7/83 株(SAT 型)感染性克隆中 poly(C)的序列长度为 21 个 C;就 A 型 FMDV 而言,poly(C)序列的长度不少于 6 个核苷酸,就能够满足构建感染性分子克隆的需要^[11]。为了较为真实地反映该结构的特性,本实验室所构建的 FMDV pGEM-XJ/AKT/69 全长重组质粒经序列测定发现 poly(C)的长度为 17 个 C,该长度满足了构建 A 型 FMDV 感染性分子克隆的需要并足以维持未来基因工程毒的毒力。

在基因工程毒的传代过程中,我们选择对不同代数基因工程毒的 poly(C)序列长度进行测定,结果发现,第 6 代细胞传代基因工程毒(F6)在经过一代乳鼠接种之后再重新适应到 BHK-21 细胞的过程中,poly(C)区段出现了缩短现象(MBF1→MBF2);这与通常认定的基因工程毒在连续的传代后,poly(C)序列长度能够迅速延长恢复到类似野毒的 poly(C)区段长度的观点^[11,13]不同。这一事实也暗示我们,FMDV 的 poly(C)区段在宿主细胞中不仅具有自动延伸机制,而且还有缩短的可能。我们认为造成 poly(C)序列缩短这一现象的原因可能与 FMDV 的准种特性有关。当然,其具体机制目前还不清楚。

研究者发现,与 FMDV 同属小 RNA 病毒科的门戈病毒(Mengovirus)的含有截短 poly(C)序列的感

染性 cDNA 在 HeLa 细胞上表现出与母本毒相似的生长特性,但是当该序列的长度少于 30 个核苷酸时,病毒在鼠体上的毒力显著减弱,有趣的是它能刺激机体产生高滴度的中和抗体,并能对抗致死性病毒的攻击^[16]。为了进一步确定 poly(C)序列长度与 FMDV 毒力之间的关系,Rieder 等^[11]构建了数株含有不同长度 poly(C)(2、6、16、25、35 个 C)的 FMDV 全长 cDNA 分子克隆,通过细胞转染试验和实验动物接种发现,这些 cDNA 的转录本在 BHK 细胞上显示了相似的感染性:只含有 2 个 C 时,也仍可以稳定的繁殖,但含有 6 个 C 以上的病毒在细胞上生长速度更快些,并且能很快达到类似于母本毒的病毒滴度。刘光清等^[14]构建的 OH/99 株 FMDV 感染性分子克隆的 poly(C)序列只含有 29 个 C 也具有与自然毒株相似的感染性,这与 Zibert 等^[13]提出的 poly(C)区段的长度至少要要保持 35 个 C 以上病毒才具有感染性的论据相悖。分析其原因可能是与构建感染性分子克隆的策略有关,尤其是非病毒基因组核苷酸序列的存在,有可能影响病毒的感染性^[17,18]。

Rider 等^[11]将 FMDV 接种 7 日龄乳鼠,发现含有短的 poly(C)(仅有 2 个 C)的基因工程毒与含有较长 poly(C)(75-140 个 C)的病毒以及野生型毒株(185 个 C)在毒力上没有显著的差异。我们源于同一株基因工程毒,但却含有不同长度 poly(C)的传代毒的乳鼠致病性试验和细胞毒力试验为研究 poly(C)区段的序列长度与 FMDV 毒力之间的关系提供了充实的试验数据。试验结果表明,poly(C)区段的序列长度在 12~17 个 C 范围内改变并未对 FMDV 基因工程毒的毒力产生明显的影响。

参 考 文 献

- [1] 谢庆阁,主编. 口蹄疫. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [2] 洪健,周雪平. ICTV 第八次报告的最新病毒分类系统. 中国病毒学(*Virologica Sinica*), 2006, 21(1): 84-96.
- [3] Francisco S, Esterban D. Foot-and-mouth disease current perspectives. Norfolk, UK: Horizon Bioscience, 2004.
- [4] Chumakov KM, Agol VI. Poly(C) sequences is located near the

- 5'-end of encephalomyocarditis virus RNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 1976, 71: 551–557.
- [5] Graff G, Cha J, Blyn HB, *et al.* Interaction of poly(rC) binding protein 2 with 5'-noncoding region of Hepatitis A virus RNA and its effects on translation. *J Virol*, 1998, 72(12): 9668–9675.
- [6] Harris TJ, Brown F. Biochemical analysis of a virulent and an avirulent strain of foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol*, 1977, 34: 87–105.
- [7] Costa Giomi MP, Bergmann IE, Scodeller EA, *et al.* Heterogeneity of the polyribocytidylic acid tract in *aphthovirus*: biochemical and biological studies of viruses carrying polyribocytidylic acid tracts of different lengths. *J Virol*, 1984, 51(3): 799–805.
- [8] Duke GM, Palmenberg AC. Cloning and synthesis of infectious cardiovirus RNAs containing short, discrete poly(C) tracts. *J Virol*, 1989, 63(4): 1822–1826.
- [9] 金宁一, 张洪勇, 尹革芬, 等. 共表达口蹄疫病毒衣壳蛋白前体 P1-2A 基因和蛋白酶 3C 基因重组鸡痘病毒的构建及其免疫原性. *科学通报(Chinese Science Bulletin)*, 2004, 49(6): 576–579.
- [10] Liu GQ, Liu ZX, Xie QG, *et al.* Infectious foot-and-mouth disease virus derived from a cloned full-length cDNA of OH/CHA/99. *Chinese Science Bulletin*, 2004, 49(11): 1137–1141.
- [11] Rieder E, Bunch T, Brown F, *et al.* Genetically engineered foot-and-mouth disease viruses with poly(C) tracts of two nucleotides are virulent in mice. *J Virol*, 1993, 67: 5139–5145.
- [12] 郑海学. 动物 RNA 病毒反向遗传系统的研究和建立. 中国科学院博士学位论文. 2007.
- [13] Zibert Z, Maass G, Strebel K, *et al.* Infectious foot-and-mouth disease virus derived from a cloned full-length cDNA. *J Virol*, 1990, 64(6): 2467–2473.
- [14] Liu GQ, Liu ZX, Xie QG, *et al.* Generation of an infectious cDNA clone of a FMDV strain isolated from swine. *Virus Res*, 2004, 104: 157–164.
- [15] van Rensburg HG, Henry TM, Mason PW. Studies of genetically 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 Gen Virol*, 2004, 85(1): 61–68.
- [16] Martin LR, Neal ZC, McBride MS, *et al.* Mengovirus and encephalomyocarditis virus poly(C) tract length can affect virus growth in murine cell culture. *J Virol*, 2000, 74(7): 3074–3081.
- [17] Sarnow P. Role of 3'-end sequences infectivity of poliovirus transcripts made *in vitro*. *J Virol*, 1989, 63: 467–470.
- [18] Boyer JC, Haenni AL. Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virology*, 1994, 198: 415–426.

Virulence comparison of genetic engineering virus containing different length poly(C) tract of foot-and-mouth disease virus

Xingwen Bai, Pinghua Li, Pu Sun, Yongliang Li, Huifang Bao, Zengjun Lu, Yimei Cao, Jianhong Guo, Zaixin Liu*

(Lanzhou Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, State Key Laboratory of Veterinary Etiological biology, National Foot-and-Mouth Disease Reference Laboratory, Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, Lanzhou 730046, China)

Abstract: [Objective] Study the association of the length of poly(C) tract with virulence of foot-and-mouth disease virus. [Methods] The recombinant plasmids pGEM-XJ/AKT/69 containing the full-length cDNA of FMDV were linearized by *Nhe*I/*Not*I and transcribed by T7 RNA polymerase. The *in vitro* transcripts were transfected into BHK-21 cells using Lipofectamine 2000 reagent. Then, the genetic engineering virus was rescued from BHK-21 cells. The poly(C) tracts were sequenced at different passages of rescued virus, and the pathogenicities were evaluated with 3-day-old mice and BHK-21 cells by detection of LD₅₀ and TCID₅₀. [Results] After six passages in BHK-21 cells, cytopathic effect was observed by microscopy. The rescued virus was rejuvenated once in unweaned mice, and then came back to cell passage. We found that the poly(C) tract of rescued virus was shortened when the virus was passaged twice in BHK-21 cells. Although the data of LD₅₀ in mice and TCID₅₀ in BHK-21 cells showed that the virulence and infectivity of genetic engineering viruses were lower than its parental virus, no significant difference was observed between the genetic engineering viruses with the different length poly(C) tract. [Conclusion] The length of poly(C) tract ranged from 12 to 17 nucleotides did not cause significant influence on the virulence and infectivity of genetic engineering virus.

Keywords: foot-and-mouth disease virus; genetic engineering virus; poly(C); virulence

Supported by the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2005CB23201) and the National Science and Technology Support Project of China (2006BAD06A03)

*Corresponding author. Tel: +86-931-8342587; Fax: +86-931-8342052; E-mail: liukey@public.lz.gs.cn

Received: 13 May 2008/ Revised: 19 July 2008