

Asia1 型口蹄疫病毒第 V 群猪源和牛源毒株 全基因组比较分析

郑海学 靳野 尚佑军 郭建宏 田宏 杨亚民 刘湘涛* 才学鹏

(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开放实验室
国家口蹄疫参考实验室 甘肃 兰州 730046)

摘要: 为了查明 Asia1 型 FMDV 第 V 群猪源和牛源毒株的序列差异, 采用 RT-PCR 方法, 对 Asia1 型 FMDV 第 V 群猪源分离毒株 Asia1/HN/06 的基因组全序列进行了扩增和测序, 并与第 V 群牛源和猪源参考毒株基因组进行比较分析。结果表明, Asia1/HN/06 毒株全基因组序列长约 8236 nt [含 38 个 A 的 poly(A) 尾], 其中 5'NCR 长 1116 nt, 前导蛋白(L)编码区长 603 nt, 结构蛋白与非结构蛋白编码区的核苷酸序列为 6990 nt, 3'NCR 长 93 nt, 3'端是至少含有 38 个 A 的 poly(A) 尾巴。猪源毒株和牛源毒株的全基因比较分析表明, 属于第 V 群, 全基因编码区核苷酸和氨基酸的同源性均为 98.0%, 主要差别是猪源毒株 Asia1/HN/06 在细胞受体结合位点变为 RDD 和 155 位置的 N 变为 S 或 D, 该群毒株 3A 更具有猪源毒株特征, 有 4 个特异性氨基酸变异。明确了 Asia1 型 FMDV 第 V 群猪源和牛源毒株的序列差异, 为进一步利用反向遗传技术研究猪源和牛源毒株差异位点或基因在病毒表型变异中的作用奠定基础。

关键词: FMDV, 全基因组, 受体结合位点, 3A 基因

Comparative Analysis of the Genomes of Foot-and-mouth Disease Virus Isolates from Porcine and Cattle Origin

ZHENG Hai-Xue JIN Ye SHANG You-Jun GUO Jian-Hong TIAN Hong
YANG Ya-Min LIU Xiang-Tao* CAI Xue-Peng

(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 Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730046, China)

Abstract: To investigate the differences between the genomes of foot and mouth viruses isolated from cattle and porcine origin, the complete genomes of two strains of Foot-and-mouth disease virus (FMDV), isolated from clinical tissue samples of pig and cattle, were amplified, sequenced and analyzed. The results showed that the genome sizes of the two viruses were 8236 nt in length, including 38-A poly (A) tail. The complete genomic nucleotide and amino acid identity between the two viruses

were above 98.0%–99.4%. The phylogenetic tree based on the amino acid sequences of the entire ORF revealed that the Chinese isolates clustered together with the isolates from Group V. Our results revealed that the complete genome between the viruses from pig and cattle origin had higher homology and some differences that RGD sequence of the 1D-encoding region of isolates from cattle change into RDD, and the amino acid S change into N or D at +9 site in the isolates from pig. The 3A gene had the genetic characteristics from pig. The results lay a foundation for further study of role of the mutated genes in the molecular basis of fitness variations and changes in host cell tropism.

Keywords: FMDV, Complete genome, Integrin, Cell binding site, 3A gene

口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus)属于微 RNA 病毒科(Picornaviridale)口蹄疫病毒属(Aphthovirus)的单股正链 RNA 病毒, 含有 7 个型(O、A、C、Asia 1、SAT1、SAT2、SAT3)和多种亚型^[1]。能够感染多种偶蹄动物, 造成严重的经济、政治和社会问题^[2-3]。FMDV 是一种具有高度变异性的病毒, 其基因组的变异往往影响到病毒毒力、宿主嗜性以及抗原性等多方面变化, 也是造成口蹄疫流行广泛、难以消灭的一个重要原因^[4]。对 Asia1 型 FMDV 的研究, 大多是针对牛、羊, 对猪的研究较少, 其全基因组序列资料更少。分离于猪的 Asia1 型 FMDV 国内外未见报道。2005 年, 我国爆发 Asia1 型第 V 群(Group V, GV) FMDV 引起的疫情^[5]。随后, 引起 15 次疫情爆发, 并蔓延至朝鲜、俄罗斯(据口蹄疫世界参考实验室报告材料, <http://www.wrlfmd.org>, Molecular Epidemiology/Genotyping Reports, 2008)。2006 年, 我国出现猪的 Asia1 型 FMD 感染, 母猪发病严重, 有死亡现象, 哺乳仔猪死亡率高。以前牛和羊感染, 很少有猪感染。为了揭示该病毒宿主变异以及致病力的分子基础, 从分子遗传学的角度进一步探讨猪 Asia1 型 FMDV 与牛、羊 Asia1 型 FMDV 的差异, 本研究对该毒株(Asia1/HN/06)的全基因组进行了克隆与测序, 并与国内外第 V 群参考毒株 Asia1/JS/05、Asia1/WHN/06 和 Asia1/MOG/05 进行了序列比较和分析, 为进一步证实猪和牛的 Asia1 型 FMDV 的基因差异导致表型不同奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 毒株与细胞

BHK-21 细胞、FMDV Asia1/HN/06 和 Asia1/JS/05 毒株由本室保存, 其中 Asia1/HN/06 毒株于 2006 年分离于猪, Asia1/JS/05 毒株于 2005 年分离于

牛, 这两个毒株在遗传关系上同属于 Asia1 型 FMDV 的第 V 群。

1.2 酶与试剂

RNaeasy Mini Kit 购自 QIAGEN 公司; 所用限制性内切酶、反转录酶和 DNA Taq 酶均购自 Promega 公司; DNA 连接试剂盒、DNA 回收试剂盒、质粒提取试剂盒均采用 Invitrogen 公司的产品; 琼脂糖购自美国 Biowest 公司, 细胞培养基及优等胎牛血清采用 Hyclone 公司。

1.3 参考毒株序列

本研究引用的中国国内参考毒株序列由国家口蹄疫参考实验室提供。国外参考序列引自 GenBank、EMBL、DDBJ 和 PDB 数据库。其中, 宿主为牛的序列为 AY304994、AY390432、AY593795、AY593796、AY593797、AY593798、AY593799、AY593800、DQ989303、DQ989304、DQ989305、DQ989306、DQ989307、DQ989308、DQ989309、DQ989310、DQ989311、DQ989312、DQ989313、DQ989314、DQ989315、DQ989316、DQ989317、DQ989318、DQ989319、DQ989320、DQ989321、DQ989322、DQ989323、EF149009 和 EF614458。其中第 V 群全序列来源于猪的有 Asia1/WHN/06 (FJ906802)和 Asia1/HN/06 (本研究测定), 来源于牛的有 Asia1/JS/05 (EF149009)和 Asia1/MOG/05 (EF614458), 本研究用于全基因组的分析主要用于这 4 株序列。

1.4 引物设计与合成

使用 DNASTar 引物设计软件, 根据参考毒株 FMDV Asia1/JS/05 株的基因序列(登录号: EF149009), 分别设计了涵盖整个基因组序列的 3 对引物(表 1)。

1.5 病毒 RNA 的提取

使用 RNaeasy Mini Kit 提取病毒 RNA, 具体操作按照说明书进行。

表1 扩增 FMDV HN/06 株全长 cDNA 所使用的引物
Table 1 Primers used for sequencing the full-length genome of Asia1 type FMDV Asia1/HN/06 strain

引物 Primer	核苷酸序列(5'→3') Nucleotide sequence (5'→3')	位置 Position
F (1-24)	TGAAAGGGGGCGCTAGGGTCTCA	1-24
R (350-373)	GGGGTAAAAGACGGGCTTCAGATA	350-373
F (382)	CCCCCTAAGTTTTACCGTTGTTGCA	373-382
R (969)	CCTCGGGGTACCTGAAGGGCAACA	945-969
F (659-685)	CCGTGCAACTTGAAGCTCCGGCTGATA	659-685
T-d (t)	GTCGACCTCCGAAGTTGGGGGGG(T) ₃₈	3'-end

注: 右下角数值 38 表示含有 T 的数目。

Note: The number 38 is indicated 38 Ts.

1.6 全基因组的扩增

使用所设计的 3 对特异性引物, 用高保真 RNA 聚合酶和 DNA 聚合酶, 进行 RT-PCR 反应, 分别扩增各目的基因片段。以引物 T-d(t)进行反转录, 合成 cDNA 第一链, 以之做模板, 使用引物 T-d(t)和 F(659-685)进行 PCR 反应, 扩增 3'末端序列(命为 C); 以引物 T-d(t)进行反转录的产物为模板, 以 F(382)和 R(969)引物对进行 PCR, 扩增 poly(C)后的 373 至 969 位的片段(命为 B); 以引物 R(350-373)进行反转录, 合成 cDNA 第一链, 以之做模板, 使用引物 F(1-24)和 R(350-373)进行 PCR 反应, 扩增 5'末端序列(命为 A)。取各目的基因 PCR 产物 5 μL; 纯化回收并进行序列测定。

1.7 基因特征比较和分析

用 ClustalW 程序进行序列比对, 使用邻近法 (Neighbour-joining) 进行系统树构建^[6]。这些方法被整合在 PHYLIP 3.5C 和 MEGA 4.1 系统进化树分析软件包^[7]。进化树绘制使用 TreeViewV1.6.6。

2 结果

2.1 FMDV Asia1/HN/06 株基因组全序列 PCR 扩增

使用所设计的 3 对特异性引物, 通过对 RT-PCR 条件的优化选择, 分别扩增出各目的基因片段, 其产物大小分别为约 380、600 和 7500 bp, 与预期结果相符(图 1)。

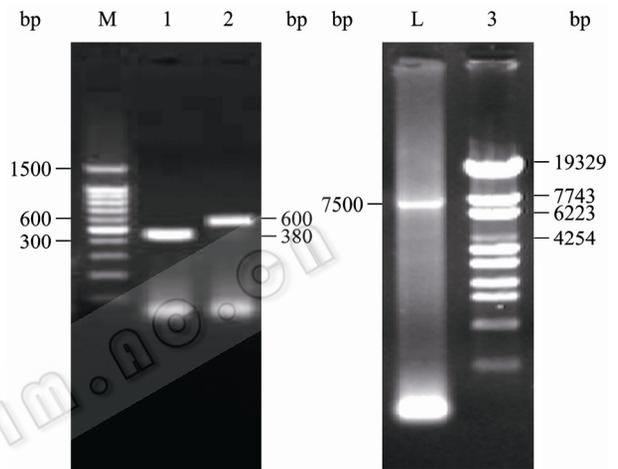


图1 RT-PCR 电泳结果

Fig. 1 PCR products RT-PCR were electrophoresed through 0.8% agarose gels

注: 1, 2 和 3: 产物大小分别约为 380、600 和 7500 bp; L: Marker λ -EcoT14 I; M: Marker 100 bp.

Note: The resultant PCR fragments about 380 bp, 600 bp and 7500 bp were detected in lane 1, lane 2 and lane 3, respectively. Molecular weight marker λ -EcoT14 I and 100 bp mark fragment (TaKaRa) were in lane L and land M, respectively.

2.2 序列测定结果

全基因组序列测定表明, 基因组序列长约 8236 nt, 其中 5'NCR 长 1116 nt, 前导蛋白(L)编码区长 603 nt。该毒株结构蛋白与非结构蛋白编码区的核苷酸序列为 6990 nt, 3'NCR 长 93 nt, 其后是 poly(A)尾巴, 测序结果表明该结构含有 38 个 A。各基因的大小和位置如表 2 所示。

表2 FMDV Asia1/HN/06 株基因组结构与对应位置
Table 2 FMDV Asia1/HN/06 genomic structure and the corresponding position

基因 Gene	5'UTR	L	VP4	VP2	VP3	VP1	2A	2B	2C	3A	3B	3C	3D	3'UTR	poly(A)
位置 Position	1-1116	1117-1718	1719-1973	1974-2627	2628-3284	3285-3911	3912-3965	3966-4427	4428-5381	5382-5843	5844-6053	6054-6692	6693-8102	8103-8198	8199-8236

2.3 非编码区的遗传特征分析

2.3.1 5'UTR 遗传特征分析: 5'UTR 长 1077 bp, 其中 1-370 bp 为 S 片段(Short fragment, S-fragment), 其后为 80-420 nt 的 poly(C) 片段 [poly(C)tract], 375-573 bp 处为 4 个连续的保守假节(Pseudoknot, PK)结构, 592-647 bp 处为顺式复制元件(*cis*-acting replication element, *cis*-cre), 内含“AAACA”基序; 600-1300 bp 处为小核糖体进入位点序列(Internal ribosome entry site, IRES), 内含嘧啶片段(TTTC、CTTCTTT 和 CCTTTCCTT)、GNRA、RAAA、ACCCC、基序 A 和 B 等功能基序。对所有功能基序进行比较, 这 4 株毒株(Asia1/JS/05、Asia1/HN/06、Asia1/MOG/05 和 Asia1/WHN/06)的功能基序没有变化(图 2)。但 Asia1/JS/05 有 3 个核苷酸缺失, 其中有 1 个缺失在 PK II 处, 表现在二级结构差别, Asia1/JS/05 有的 PK 结构和 IERS 与其他毒株有较大的区别。两个猪源毒株相似性较高, 特别是 IRES 几

乎完全相同(图 2 和 3), 这些变化对病毒生物学特性有何影响需要进一步研究。

2.3.2 3'UTR 遗传特征分析: Asia1/JS/05、Asia1/HN/06 和 Asia1/WHN/06 毒株的 3'UTR 长 96 bp (不含终止密码子 TAA 和 poly(A)尾), 但 Asia1/MOG/05 毒株 3'UTR 的 5'端缺失 12 个核苷酸, 因为第 1 个终止密码子突变, 造成了 3D 蛋白 3'端多出 4 个氨基酸所致。Asia1/HN/06、Asia1/WHN/06 和 Asia1/MOG/05 毒株都含有完整的 2 个“GAAAG”重复序列(Repeated sequence), 而 Asia1/JS/05 毒株的第 2 个重复序列被“GGAAG”替代(图 4)。

二级结构比较表明 Asia1/JS/05、Asia1/HN/06 和 Asia1/WHN/06 毒株含有 2 个茎-环结构(SL1 和 SL2), 茎环结构比较, Asia1/HN/06 和 Asia1/WHN/06 毒株的二级结构完全相同, 而与 Asia1/JS/05 有细微差别。Asia1/MOG/05 毒株 SL1 几乎缺失, 在此缺失的基础上序列重构, 变成了 3 个茎环(图 5)。

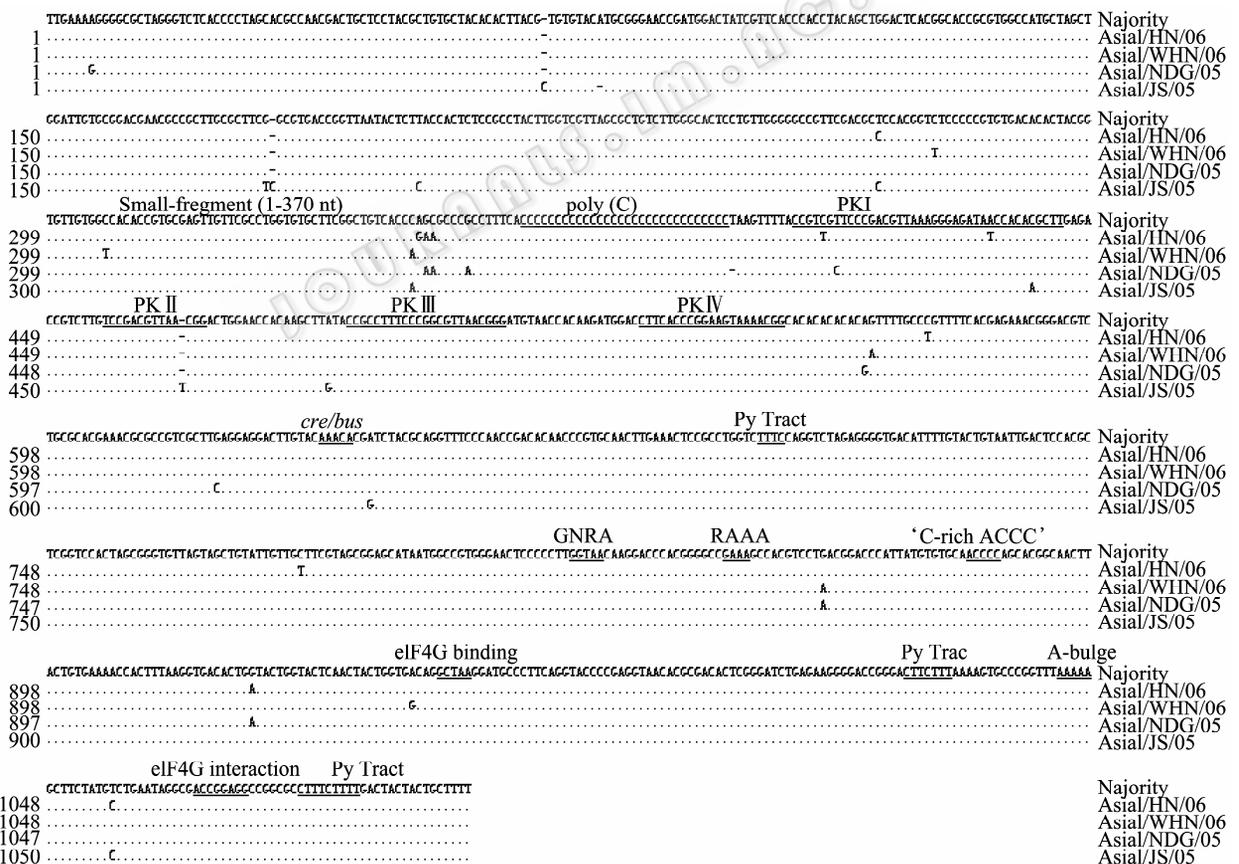


图 2 5'UTR 序列比较与基因结构图

Fig. 2 5'UTR sequence comparison and the gene structure diagram

注: 下划线序列表示不同元件。

Note: Sequences of different elements are indicated in underlined.

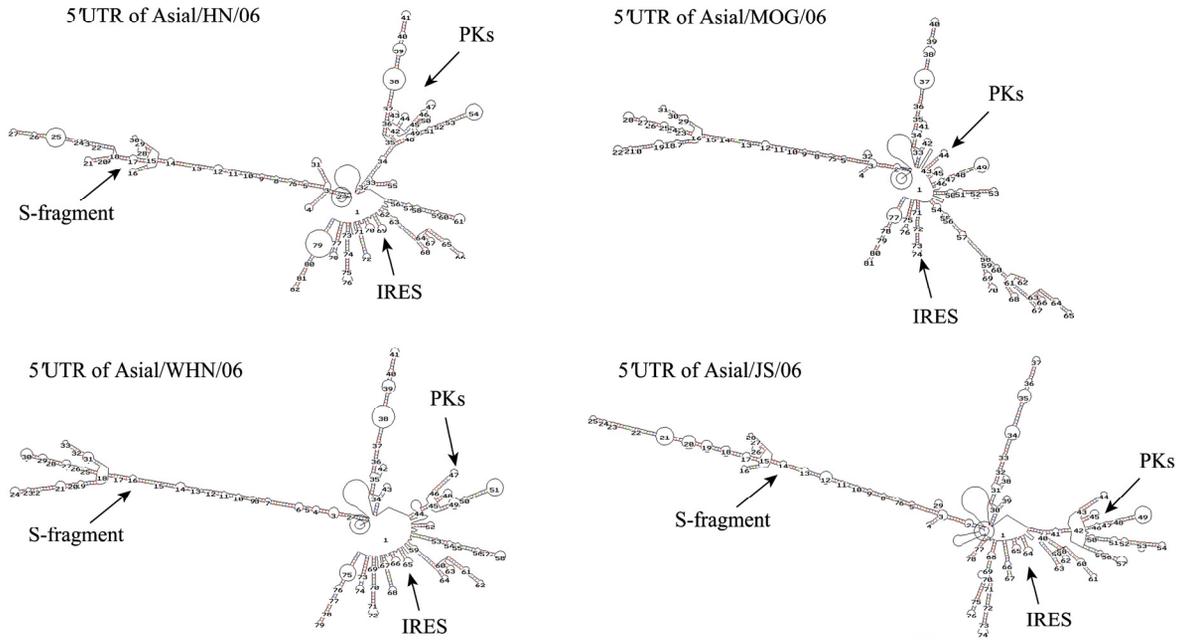


图 3 5'UTR 二级结构图

Fig. 3 The second structure of 5'UTR sequences

注: Asial/HN/06 毒株的 5'UTR 的 2-33 茎环为 S-fragment, 34-54 茎环为 PK 结构, 55-79 为 IERS 结构; Asial/MOG/05 毒株的 5'UTR 的 2-32 茎环为 S-fragment, 34-45 茎环为 PK 结构, 46-77 为 IERS 结构; Asial/HWN/06 毒株的 5'UTR 的 2-33 茎环为 S-fragment, 34-52 茎环为 PK 结构, 53-79 为 IERS 结构; Asial/JS/05 毒株的 5'UTR 的 2-29 茎环为 S-fragment, 30-41 茎环为 PK 结构, 42-77 为 IERS 结构。
 Note: In 5'UTR of Asial/HN/06, S-fragment contained No. 2-33 SL, PK contained No. 34-54 SL, IERS contained No. 55-79SL; In 5'UTR of Asial/MOG/05, S-fragment contained No. 2-33 SL, PK contained No. 34-45 SL, IERS contained No. 46-77 SL; In 5'UTR of Asial/HWN/06, S-fragment contained No. 2-33 SL, PK contained No. 34-52 SL, IERS contained No. 53-79 SL; In 5'UTR of Asial/JS/05, S-fragment contained No. 2-29 SL, PK contained No. 30-41 SL, IERS contained No. 42-77 SL.

	Repeated sequence	Repeated sequence	poly(A)	Majority
1	TAATCCCTCAGATGAACAAATTGGCAGAAAGACTCTGAGCGGACCGCACACCCTAGGAGCTGAAAAGCTCGAAAGGGCTTTTCCCGCTCCACATTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA			Asial/HN/06
1	..G.....A.T.....		Asial/WHN/06
1C.....		Asial/NDG/05
1TC.....G.....C.G.....TA..A.....		Asial/JS/05

图 4 3'UTR 序列比较与基因结构

Fig. 4 3'UTR sequence comparison and gene structure

注: 下划线序列表示重复序列, 方框表示缺失核苷酸序列。

Note: The repeated sequences are indicated in underlined, the deleted sequences are indicated in boxed.

2.4 编码区分析

这 4 株毒株 (Asial/HN/06, Asial/WHN/06, Asial/JS/05 和 Asial/MOG/05) 的编码蛋白同源性为 98%-99.4%, 高度同源。对各基因的氨基酸变异进行分析: L 蛋白, Asial/JS/05 的 L 蛋白有 3 个位点不同, 其他 3 个毒株 L 蛋白完全相同; VP4 蛋白, Asial/HN/06 的 VP4 蛋白有 3 个位点不同, 其他 3 个毒株 VP4 蛋白完全相同; VP2 蛋白, Asial/MOG/05 和 Asial/JS/05 完全相同, Asial/HN/06 有 13 个氨基酸不同, Asial/WHN/06 仅有 2 个氨基酸不同(图 3-3-5); VP3 蛋白, Asial/HN/06 有 1 个氨基酸不同, 其他毒株完全相同, 56 位都为精氨酸(3056R); VP1

蛋白, Asial/HN/06 的 RGD 基序(143-145 位)变为了 RDD, 在 RGD 的下游 155 位氨基酸 N 变为 S, Asial/WHN/06 在此相同位置变为了 D; 2A 蛋白, Asial/HN/06 的 2A 蛋白 3'端由 S 变为 P; 2B 蛋白, Asial/JS/05 有 1 个氨基酸不同, 其他 3 个毒株的完全相同; 2C 蛋白, Asial/JS/05 的有 7 个氨基酸不同, 其他的毒株相同; 3A 蛋白, Asial/MOG/05 和 Asial/WHN/06 各有 2 个氨基酸不同, 另外 2 个毒株的相同; 3B 蛋白, Asial/JS/05 的有 3 个氨基酸不同, 其他的毒株相同; 3C 蛋白, 所有毒株 3C 蛋白相同; 3D 蛋白, Asial/MOG/05 的 3D 蛋白 3'端多出 QSLR, 其他毒株仅有 2-3 个氨基酸不相同。

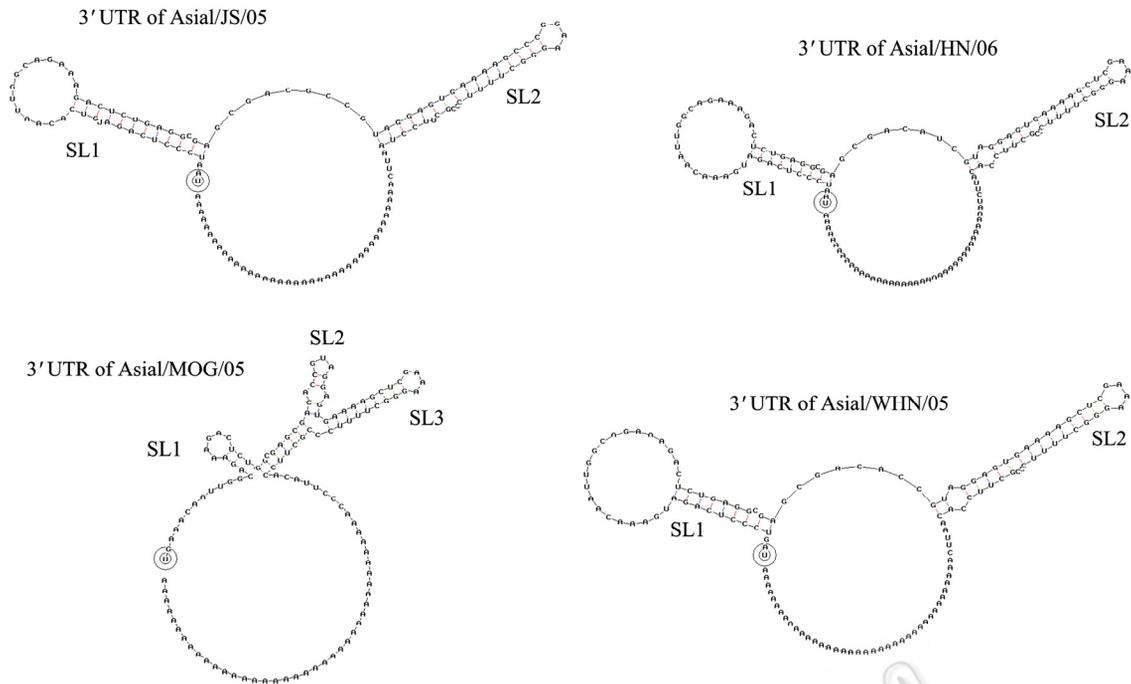


图 5 3'UTR 二级结构
Fig. 5 The secondary structures of 3'UTR

ALCLTLLANVINIRETRKRQMQVDDAVNEYIEKANITDDNTLDEAEKNPLETSGASTVGFRRERTLPGHKVSDDDVNSEPKPVVEEQPAE Mijority													
1490	1500	1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570					
								T	DQ989314				
	H							T	DQ989318				
								T	DQ989321				
								T	DQ989320				
								T	DQ989323				
								V	DQ989317				
								T	DQ989322				
								T A	DQ989303				
								T A	DQ989304				
								T A	DQ989306				
								H A A	AY593796				
	N	D	T			R	T		FJ906802				
	N	D				R	T		EF614458				
	N	D				R	T	Y	HN/06				
	N	D				R	T	S	EF149009				
L	Q	R	S	PL	DS	I	GD	AT	HPPTTEQTE.ADA.VFGR.R	0/0718			
L	Q	R	S	PL	DG	I	GD	D	A	PPTEQTE.A.A.VLGR.R	0/WFL		
L	Q	R	S	SP	DS	I	GD	A	PPTEQTE.A.A.VFGR.R	0/HKN/2002			
L	Q	R	S	E	PL	DG	GT	GD	E	A	SPAEQTE.A.A.VLGR.R	0/E3/2001	
L	Q	Y	S	PL	DG	V	GD	A	SPTEQTE.A.A.VFGR.R	0/Taiwan/97			
								Q	TR	E	T	ER	0/Akesu/S8
								T	X	A	A	A	0/SKR/2000
								A	X	A	A	A	0/CHA/99
								T	X	AG	A	A	0/WKG/2001

图 6 猪源和牛源 FMDV 的 3A 蛋白比较
Fig. 6 The results of comparison of 3A proteins of FMDV

综合来看, 有 2 个明显的差异: (1) Asia1/HN/06 的受体蛋白识别位点 RGD 变为了 RDD 和+9 位置的 N 变为 S 或 D(以 RGD 的右第一个氨基酸为 +1 位为准), 该毒株在 VP2 和 2C 上变异较大, 而其他病毒在该区域比较保守(表 3); (2) Asia1/MOG/05 毒株

的 3D 的尾端多出了 4 个氨基酸 QSLR, 其他蛋白很难概括有规律差异。

2.5 3A 蛋白分析

本研究选择 4 组 FMDV (第 1 组是 Asia1 型 FMDV 第 II 群毒株, 第 2 组是 Asia1 型 FMDV 第 V

表3 Asia1/HN/06, Asia1/WHN/06, Asia1/JS/05 和 Asia1/MOG/05 毒株不同蛋白的氨基酸差异表
Table 3 Amino acid differences among the proteins of FMDV Asia1/HN/06, Asia1/WHN/06, Asia1/JS/05 and Asia1/MOG/05

氨基酸位置 Amino acid residue	在病毒上的差异氨基酸 Amino acids present in FMDV			
	Asia1/ HN/06	Asia1/ WHN/06	Asia1/ JS/05	Asia1/ MOG/05
L 2	D	D	N	D
L 137	F	F	S	F
VP2 63	C	K	K	K
VP2 72	D	G	D	D
VP2 107	V	I	I	I
VP2 181	V	A	V	V
VP3 133	A	T	T	T
VP1 144	D	G	G	G
VP1 155	S	D	S	S
VP1 162	E	K	E	E
2B 147	D	D	E	D
2B 148	L	L	P	L
2C 36	S	S	P	S
2C 55	R	R	P	R
2C 59	D	G	G	D
2C 64	E	E	K	E
2C 92	I	T	V	I
2C 305	E	K	E	E
3A 94	I	N	I	I
3A 99	I	T	I	I
3A 139	Y	N	N	N
3A 145	P	P	S	P
3B 5	P	P	A	P
3B 6	L	L	F	L
3B 11	P	P	I	P
3C 80	D	D	N	D
3D 3	V	V	I	V
3D 48	E	G	E	E
3D 105	I	V	V	V
3D 143	V	V	V	I
3D 161	T	A	T	T
3D 257	F	L	F	F
3D 274	V	I	I	I
3D 322	P	H	H	H
3D 322	T	I	I	I
3D 471-474	----	----	----	QLSR

群毒株,第3组为仅感染猪的CATHAY拓扑系毒株,第4组是PanAsia拓扑系毒株)的3A序列进行比较,结果表明,所有毒株3A的3'端非常保守。Asia1型FMDV第V群的猪源和牛源毒株的3A没有区别,

与来自牛源的Asia1型FMDV的3A比较,有7个氨基酸不同;与牛源O型FMDV的PanAsia毒株比较,有7个位点不同;与猪源的O型FMDV的CATHAY毒株相比较,CATHAY毒株除缺失10个氨基酸外,有多个位点不同,但Asia1第V群毒株3A的1510位置D处于CATHAY毒株缺失区域,1555处的T与CATHAY毒株的氨基酸相同。这些氨基酸变化是否决定宿主嗜性的变异,需要进一步实验证实(图6和表2)。

3 讨论

Asia1/JS/05和Asia1/HN/06毒株全基因组序列的测定,为分析和深入研究该病毒奠定必要的基础。Asia1/JS/05和Asia1/HN/06毒株属于Asia1型第V群毒株,目前该群毒株仅4个全基因组序列,其中本研究室测定一个猪源和一个牛源毒株。对这4个全序进行比较和分析,这些毒株整体差异不大,区别主要在猪源毒株含有RDD序列(田间分离株有的含有RDD,有的含有RGD),155位置的N变为S或D。一般认为,尽管有其他受体途径可供选择,FMDV自然感染的宿主特异性还是主要由特异的整联蛋白决定,但决定FMDV易感性的机制仍不清楚。含有RDD基序对毒株毒力有何影响,整联蛋白是否改变,与自然感染猪的现象是否有关,需要进一步证实。目前,我们实验室已经通过反向遗传技术证明,RDD基序能够提高病毒感染力。

Asia1/JS/05、Asia1/HN/06和Asia1/WHN/06毒株的3'UTR含有2个茎-环结构(SL1和SL2),Asia1/HN/06和Asia1/WHN/06的二级结构完全相同,而与Asia1/JS/05有细微差别。Asia1/MOG/05毒株的SL1几乎缺失,在此缺失的基础上,序列重构,变成了3个茎环。已经利用反向遗传技术证明,茎-环2是病毒复制必须结构,而茎环1缺失或变短严重影响病毒复制能力,导致病毒感染滴度变低^[8]。Asia1/MOG/05的复制力和滴度可能较低的原因与此有关。

FMDV O型的CATHAY谱系毒株在3A的92-102位置缺失10个氨基酸,CATHAY谱系毒株仅感染猪。其他毒株没有缺失,但在100-150位置变异较多。Asia1型第V群毒株3A有4个特异性的氨基酸变异,其中1510位置的D处于CATHAY毒株

缺失区域(图 6), 这些变异与自然感染猪的现象有何关联, 仍需进一步实验证实。实验表明, FMDV 感染鸡胚后, 在 3A 基因的 92–102 区域有 19 到 20 个密码子的缺失, 该病毒还表现出对牛的致病力减弱^[9–10]。通过反向遗传学分析, 该缺失片段具有对牛致病力减弱的功能^[11], 进而对台湾地区近 30 年流行的病毒分析表明, 除了这些基因的缺失外, 在缺失基因的周围区段有氨基酸突变, 同样有对牛致病力减弱的功能^[12]。而对猪的致病力减弱的分子基础是降低了病毒 RNA 合成, 在牛的细胞中比猪的细胞中明显有更高程度病毒 RNA 合成水平^[13]。病毒在细胞中, 不管是从猪源弱毒株还是牛源强毒株的 3A 蛋白, 都富集在 RNA 复制复合物(RNA replication complexes)上, 能够引起牛和猪的细胞的高尔基体的断裂, 进而影响蛋白的复制和转运^[13]。Nunez 等实验也表明, 3A 蛋白中仅一个氨基酸的变化就会改变 FMDV 对猪适应性, 然而, 在不同的区段发生突变和缺失与对猪致病性变弱的表型的关联性差别较大^[14]。然而, 迄今为止, 为什么 3A 蛋白部分的缺失会影响病毒在牛的细胞中比猪的细胞中复制水平高的基础, 仍然不清楚。

参 考 文 献

- [1] Grubman MJ, Baxt B. Foot-and-mouth disease. *Clin Microbiol Rev*, 2004, **17**(2): 465–493.
- [2] Thomson GR, Vosloo W, Bastos AD. Foot and mouth disease in wildlife. *Virus Res*, 2003, **91**(1): 145–161.
- [3] Thomson AD. Foot-and-mouth disease. *Infectious Diseases of Livestock*. London: Oxford university press, 2004: 1323–1365.
- [4] Baranowski E, Sevilla N, Verdaguer N, *et al.* Multiple virulence determinants of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J Virol*, 1998, **72**(8): 6362–6372.
- [5] Guo H, Liu X, Liu Z, *et al.* Recent outbreaks of foot-and-mouth disease type asia 1 in China. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 2006, **53**(s1): 29–33.
- [6] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 1987, **4**(4): 406–425.
- [7] Felsenstein KM, Lewis-Higgins L. Processing of the beta-amyloid precursor protein carrying the familial, Dutch-type, and a novel recombinant C-terminal mutation. *Neurosci Lett*, 1993, **152**(1/2): 185–189.
- [8] Rodriguez Pulido M, Sobrino F, Borrego B, *et al.* Attenuated foot-and-mouth disease virus RNA carrying a deletion in the 3' noncoding region can elicit immunity in swine. *J Virol*, 2009, **83**(8): 3475–3485.
- [9] Giraudo AT, Beck E, Strebel K, *et al.* Identification of a nucleotide deletion in parts of polypeptide 3A in two independent attenuated aphthovirus strains. *Virology*, 1990, **177**(2): 780–783.
- [10] Sagedahl A, Giraudo AT, De Mello PA, *et al.* Biochemical characterization of an aphthovirus type C3 strain Resende attenuated for cattle by serial passages in chicken embryos. *Virology*, 1987, **157**(2): 366–374.
- [11] Beard CW, Mason PW. Genetic determinants of altered virulence of Taiwanese foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 2000, **74**(2): 987–991.
- [12] Knowles NJ, Davies PR, Henry T, *et al.* Emergence in Asia of foot-and-mouth disease viruses with altered host range: characterization of alterations in the 3A protein. *J Virol*, 2001, **75**(3): 1551–1556.
- [13] O'Donnell VK, Pacheco JM, Henry TM, *et al.* Subcellular distribution of the foot-and-mouth disease virus 3A protein in cells infected with viruses encoding wild-type and bovine-attenuated forms of 3A. *Virology*, 2001, **287**(1): 151–162.
- [14] Nunez JI, Baranowski E, Molina N, *et al.* A single amino acid substitution in nonstructural protein 3A can mediate adaptation of foot-and-mouth disease virus to the guinea pig. *J Virol*, 2001, **75**(8): 3977–3983.