

口蹄疫病毒反向遗传学研究进展

白兴文 李平花 刘在新* 刘湘涛 谢庆阁

(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 甘肃 兰州 730046)

摘要: 反向遗传学操作技术在口蹄疫病毒(FMDV)病原学基础研究领域的应用,使得人们能够在基因组整体水平上研究病毒基因的功能。得益于反向遗传学系统的不断完善和发展,目前人们对 FMDV 分子病原学也有了更加深入的认识和理解。本文结合实验室在 FMDV 反向遗传学方向上所开展的探索性研究工作,综述了国内外利用反向遗传学操作技术在研究 FMDV 分子致病机制、病毒毒力与变异的关系、病毒复制的影响因素、新型 FMD 基因疫苗的研制等领域所取得的进展,展望 FMDV 反向遗传学研究新动向。

关键词: 口蹄疫病毒, 反向遗传学, 感染性分子克隆

Recent Advances on Reverse Genetics of Foot-and-mouth Disease Virus

BAI Xing-Wen LI Ping-Hua LIU Zai-Xin* LIU Xiang-Tao XIE Qing-Ge

(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, Gansu 730046, China)

Abstract: Usage of reverse genetic techniques in the research area of the fundamental etiology of foot-and-mouth disease virus (FMDV), has resolved the issue about the function of viral gene of FMDV on genomic integer level. At present, a further recognition and apprehension for the molecular etiology of FMDV based on the development in reverse genetics was made. Combined with the research work in our labs, we reviewed international advances about the molecular pathogenic mechanism, the relationship between virulence and variation in the genomes, influencing factors for the viral replication, and the development of new-type gene vaccine of FMD in this article, and propose the potential research aspects in reverse genetics of FMDV in the future.

Keywords: Foot-and-mouth disease virus, Reverse genetics, Infectious molecular clone

1 口蹄疫与口蹄疫病毒

口蹄疫(Foot-and-Mouth Disease, FMD)是由口蹄疫病毒(Foot-and-Mouth Disease Virus, FMDV)引

起的一种急性、热性、高度接触传染性的动物疫病。感染对象是猪、牛、羊等主要畜种及其他家养和野生偶蹄动物,易感动物多达 70 余种。该病虽然致死率不高(<5%, 幼畜除外),但可引起动物生产性能

下降,会造成惨重的经济损失,严重危害畜牧业乃至整个国民经济的持续健康发展,素有“政治经济病”之称。鉴于 FMD 可造成巨大经济损失和社会影响,世界动物卫生组织(OIE)将该病列入 OIE 疾病名录,我国政府也将 FMD 排在 14 个一类动物传染病的第一位^[1]。

FMDV 隶属于小 RNA 病毒科(Picornaviridae)口蹄疫病毒属(Aphthovirus),有 O、A、C、SAT₁、SAT₂、SAT₃、Asia 等 7 个血清型,各型之间无交叉免疫保护。病毒基因组为长度约为 8500 个核苷酸的单股正链 RNA,主要分为 3 个部分:5'非翻译区(5'-Untranslated Region, 5'-UTR;包括 S、poly(C)、PKs、CRE、IRES)、一个大的开放阅读框架(Open Reading Frame, ORF)、3'非翻译区(3'-Untranslated Region, 3'-UTR)。FMDV 基因组无帽子结构,而是在其 5'端连接一种由病毒自身编码的 VPg 蛋白,3'端为一 poly(A)尾巴。ORF 编码病毒多聚蛋白,它们依赖于自身编码的蛋白酶(L、2A、3C)及少数的宿主因子,经过 3 级裂解后,形成 3~4 种病毒结构蛋白(VP0 或 VP4, VP2、VP3、VP1)和 8~9 种非结构蛋白(Lab, Lb、2A、2B、2C、3A、3B、3C 和 3D)^[2]。

2 反向遗传学在口蹄疫病毒研究中的应用

所谓反向遗传学(Reverse Genetics)是相对经典遗传学而言的,与经典遗传学从生物的表型、性状到遗传物质来研究生命的发生与发展的思路相反,反向遗传学则是直接从生物的遗传物质入手,来阐述生命发生的本质现象,与之相关的各种技术统称为反向遗传学技术(Reverse Genetic Techniques)。它是通过构建 RNA 病毒的感染性分子克隆(包括感染性 cDNA 和感染性体外转录本),按照人们的研究方向和目的,在 DNA 分子水平上对病毒基因组进行体外操作,即将病毒 RNA 反转录成 cDNA,由含病毒基因组 cDNA 的质粒获取 RNA 病毒,观察其表型变化,从而研究病毒结构与功能。

目前利用反向遗传学技术人们不仅成功获得了 FMDV 的感染性分子克隆,而且应用该项技术在研究 FMDV 分子致病机制、病毒毒力与变异的关系、病毒复制的影响因素、新型 FMD 基因疫苗的研制等领域也取得了令人瞩目的成就。现就 FMDV 的反向遗传学相关研究进展做如下概述。

2.1 揭示 FMDV 的分子致病机制

FMDV 与宿主细胞的吸附是病毒蛋白与细胞膜表面特定蛋白(受体)特异性结合的过程,它是病毒穿入细胞致使细胞感染的先决条件。目前,已鉴定了两类 FMDV 受体,即硫酸乙酰肝素(Heparan Sulfate, HS)粘蛋白和整联蛋白。FMDV 通过 HS 结合可刺激机体免疫防御必需的树突细胞产生特异性免疫反应^[3];而整联蛋白主要识别 VP1 G-H 环上的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp, RGD)基序,在 FMDV 感染的初始阶段,RGD 通过与整联蛋白形成稳定的复合体介导病毒与细胞受体结合^[4]。1997 年,Leippert 等在 O1K 株基因组全长 cDNA 分子 RGD 基序内部及其附近引入定点突变,体外转录后转染 BHK-21 细胞,结果发现在 RGD 基序内部发生定点突变的体外转录本在转染细胞后,不能产生感染性病毒粒子,而在 RGD 附近区段发生突变的转录本 RNA 则能够产生感染性病毒粒子;他们还利用表达田间分离株 P1 蛋白的 RNA 和在 RGD 基序内部发生点突变的 RNA 进行共转染试验,结果产生出具有感染性的病毒粒子,从而也佐证了 FMDV RGD 基序在病毒吸附过程中具有重要作用^[5]。值得一提的是,最近南非学者发现一 SAT₁ 型田间分离株在保守的 G-H 环的 RGD 上游存在第 2 个 RGD 基序,但它并不具有作为 BHK-21 细胞的受体结合位点的功能^[6]。刘在新发现 FMDV Akesu/58 牛源分离株的细胞受体结合位点为丝氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Ser-Gly-Asp, SGD)基序^[7]。有研究表明,RGD 利用 $\alpha V\beta 1$ 或 $\alpha V\beta 3$ 整联蛋白与细胞受体结合,这比 SGD 基序仅通过与 $\alpha V\beta 6$ 整联蛋白结合表现更高的毒力^[8]。 $\alpha V\beta 6$ 在 FMDV 病原学和流行病学中具有非常重要的地位,它不仅存在于牛体由于自然感染 FMDV 而产生病变部位的上皮细胞中,而且在气管上皮细胞、口腔、胃肠道、肾脏、汗腺、毛囊鞘以及蹄冠等部位都有表达,因而就有可能因为病原的粘附而导致疾病的发生^[9]。

2.2 阐明 FMDV 变异与毒力的关系

1990 年, Zibert 等构建了第 1 株 FMDV 感染性分子克隆,并且通过实验提出,要维持病毒的毒力, poly(C)区段的长度至少要保持 35 个 C 以上^[10]。到了 1993 年, Rieder 等^[11]构建了数个 A12 株全长 cDNA, 分别含有不同长度的 poly(C)(2、6、16、25、35 个 C), 发现这些 cDNA 转录本显示相似的感染性,

只含有 2 个 C 时,也可以稳定地增殖,但含有 6 个 C 以上的病毒在细胞上生长速度则更快些,并且能很快达到类似于野毒的病毒滴度,随着连续的传代后,发现 poly(C)序列长度也能够迅速延长,恢复到类似野毒的 poly(C)序列长度。将这些感染性 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。本实验室构建的 OH/99 株感染性分子克隆(poly(C)序列长度为 29 个 C)具有与自然毒株相似的感染性^[12]。据此分析, poly(C)区段最小必需长度可能与构建感染性分子克隆的策略有关。全长 cDNA 中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^[13]。O1K 株的感染性分子克隆在插入 poly(C)区段时,其上下游的非翻译区都引入了外源核苷酸,而 A12 株及 OH/99 株的感染性分子克隆则是利用病毒基因组的自然酶切位点将合成的 poly(C)区段插入全长 cDNA 分子中的,因此后者所构建的感染性分子克隆的感染性要比前者更强。

L 蛋白也是 FMDV 的一个主要的毒力相关因子。FMDV L 蛋白是一种半胱氨酸蛋白酶,以二聚体形式存在,其作用方式类似于木瓜蛋白酶,酶活性中心是 Cys51、His148 和 Asp164。它能抑制 IFN- β mRNA 的产生和阻断宿主细胞的翻译,限制宿主的先天性免疫反应^[14]。Leu143 决定其分子内切割的特异性^[15]。体外试验研究表明 Lb(从第 2 个 AUG 开始编码)是翻译的主要产物,第 2 个起始密码子是产生活病毒所必需的。缺失 Lb 基因的 cDNA 侵入细胞后其功能由其它半胱氨酸蛋白酶来代替。但是缺失包括第 1 个起始密码子在内的 Lab 基因所产生的活病毒对细胞的致病性比野生病毒要低,这主要是 Lab 蛋白可以通过裂解 eIF4G 关闭宿主蛋白合成所造成的;而缺失包括第 2 个起始密码子在内的 Lb 基因则不能产生活病毒^[16]。

1997 年, Sa-carvalho 等把 O1K 株编码衣壳蛋白的 cDNA 序列插入 A12 株的全长 cDNA 分子中,通过不断增加衣壳蛋白基因的长度,来分析嵌合病毒在细胞中的生长情况及其毒力变化,发现 FMDV 基因组上第 2134(VP2)和 3056(VP3)位氨基酸是吸附 HS 所必需的,在体外通过与 HS 结合选择出的 O 型 FMDV 毒株对自然宿主致病性减弱^[17]。1998 年,

Baranowski 等用 C 型 FMDV 的衣壳蛋白基因替换 O1K 株感染性分子克隆的衣壳蛋白基因构建了一种嵌合病毒,并用定点突变技术对其实施突变,将嵌合病毒在细胞培养物中连续传代,表明组织适应性病毒对 HS 的亲合力提高,但是在 CHO 细胞中表达高毒力的 FMDV,并不需要结合在细胞表面的 HS。缺乏粘多糖的 CHO 细胞所产生的病毒的毒力与野生型 CHO 细胞所产生的病毒的毒力相同甚至更高。嵌合病毒中发生的一些氨基酸置换(VP3 的第 173 位和 VP1 的第 144 位)与其对 HS 的亲合力下降相关。这些置换在 BHK-21 细胞中对病毒的毒力仅有微弱影响,但在 CHO 细胞中则可使病毒的感染性完全丧失^[18]。2003 年,我国学者赵启祖在 FMDV A12 株感染性分子克隆的基础上用 O/CHA/90 株的衣壳蛋白编码基因替换 A12 株的衣壳蛋白基因构建了嵌合病毒。以之转染细胞并连续传代,发现在二十面体病毒粒子的五重轴附近的氨基酸决定了病毒的宿主范围并且影响病毒在猪体内的致病性。这些氨基酸残基包括位于第 108~174 位的芳香性氨基酸,位于 VP1 基因的第 83~172 位的带正电荷的氨基酸。为了探讨这些氨基酸是否参与了病毒非整联蛋白依赖性的细胞结合活动,将嵌合病毒 VP1 基因中的 RGD 基序替换成 KGE 序列,通过细胞传代,发现含有 KGE 序列的嵌合病毒在细胞培养物中的生长对 HS 不具有依赖性,将其中的一种嵌合病毒感染猪,发现该病毒表现微弱的致病性,并能在猪体内维持 KGE 序列^[19]。同年, Baranowski 等将 FMDV 裸 RNA 直接注射乳鼠也表现感染性,有趣的是,VP1 衣壳蛋白中 L147P 突变导致该突变体转录本对 BHK-21 细胞不表现感染性^[20]。有研究表明:在实验条件下, O/TW/97 株 FMDV 在自然宿主猪体传代过程中发生毒力致弱现象,而 VP1 的氨基酸并未发生改变。这一结果暗示在 FMDV 自然进化过程中,病毒存在某种必需的毒力恢复机制^[21]。

我国台湾省曾在 1997 年暴发 FMD,该病毒分离株只感染猪而不感染牛,序列分析发现其 3A 蛋白在第 93~102 位发生了 10 个氨基酸的缺失,利用反向遗传学技术证明这种缺失与病毒对牛的致病力减弱有一定关系^[22]。随后 Knowles 等对该地区早期(1970)的 O 型毒株序列的分析结果表明,这些毒株在 3A 基因上存在相同位置的缺失,依据它们在牛

源细胞上的生长特性, 推测 3A 基因上的核苷酸序列缺失可能与这些病毒对猪源细胞的嗜性有关^[23]。Nunez 等通过对 FMDV 在对豚鼠适应过程中的遗传变异分析表明, 在 3A 中的氨基酸取代: Q44R 明显使得 FMDV 具有了对豚鼠的致病性。此研究的结果暗示在 3A 蛋白上一个或少数几个氨基酸发生病毒准种范畴内的替换, 就有可能导致病毒对新的动物宿主的适应性^[24]。最近韩国学者发现一株 3A 蛋白完整的 FMDV 分离株(O/SKR/AS/2002)在猪体感染试验中病毒表现出高毒力, 而对牛的致病性较弱^[25]。这一结果提示我们, FMDV 宿主嗜性改变这一现象的发生并非单独的 3A 蛋白缺失就能够解释的, 而有可能是 FMDV 基因组在其分子进化过程中, 病毒准种特性赋予其多个基因联合作用的一个复杂性问题^[26]。

2.3 探讨影响 FMDV 复制的因素

FMDV RNA 进入宿主细胞后, 首先利用细胞的翻译起始因子和核糖体合成病毒蛋白。当病毒蛋白合成到一定水平时, 启动 RNA 复制。在此过程中, 病毒 RNA 编码的 L 蛋白主要负责关闭宿主细胞的蛋白合成系统。2000 年, McInerney 等研究发现缺失 Lb 编码序列和 P1 94% 的编码序列(衣壳蛋白前体)对于病毒 RNA 的复制没有明显的影响, 这说明 L 蛋白对于 FMDV 复制并非必需的。他们还发现, 在这些 FMDV 感染的细胞中, 缺乏缺陷型粒子的产生, 这主要是由于这些 FMDV 复制子的包装效率极低^[27]。有研究发现将小 RNA 病毒的 2A 插入单一 ORF mRNA 中, 可导致核糖体发生跳跃, 形成连接 2A 上游和下游序列的两个蛋白^[28]。而病毒非结构蛋白 2B 和 2C 或者是 2BC 前体能够抑制分泌蛋白由内质网向高尔基体的运输, 影响诱导信号分子的分泌并延迟宿主获得性免疫反应^[14]。

非结构蛋白 3A 在病毒复制过程中也具有非常重要作用: 在复制起始时与宿主细胞成分发生互作, 并诱导细胞内膜增生, 这是病毒 RNA 复制的一个前提条件, 并可作为宿主细胞受 RNA 病毒感染的标志^[29]。Knowles 等构建了含有缩短了 3A 的 O/TW/97 株, 研究发现该突变株在牛细胞中仅能产生少量的 RNA, 而且这种病毒在 BHK-21 细胞中 RNA 的合成量也有一定程度的减少, 即其 RNA 的复制能力减弱^[23]。刘光清等多株 FMDV 全基因组序列的比较

分析结果发现, 某些猪源嗜性毒 3A 缺失的同时在其基因组的 PKs 部位存在 42-44 个核苷酸的缺失^[30]; 而且, 基于 VP1 基因所绘制的系统发生树也在提醒我们, 三者在 FMDV 的分子进化过程中具有某种相同的趋化进程。另外, FMDV 的 3C 蛋白(酶)在多聚蛋白前体以及 RNA 复制过程中也扮演极其重要的角色, 其活性中心为 Cys163、His46 和 Asp84^[31]。在病毒 RNA 复制的起始阶段 VPg 发生尿苷酸化, 3C 蛋白的这些催化位点是必需的^[32]; 而且, 3C 蛋白通过剪切组蛋白 H3 可能影响宿主细胞的转录^[14]。

2004 年, van Rensburg 等构建了 SAT2 疫苗株 ZIM/7/83 的基因组全长感染性分子克隆, 并利用盒式交换策略构建 SAT2/A12 嵌合病毒, 研究发现 ZIM/7/83 的非结构蛋白与 A12 的 5'-UTR 不相容^[33]。

另外, FMDV 的 3'-UTR 也含有病毒复制所需要的一些重要元件, 替换或缺失该区域都将使病毒复制功能受到损害或丧失, 尤其一些关键核苷酸的点突变会严重影响病毒生活周期的正常进行, 它与病毒基因组的体外翻译效率有关。甚至某些药物如 2'-C-甲基胞苷亦可抑制 FMDV RNA 的合成^[34]。有研究表明, 将 FMDV O1K 株的 3'-UTR 缺失 74 个碱基后, 并不能重新获得 FMDV, 同时用 SVDV 的 3'-UTR 替换 FMDV 3'-UTR 也不能得到嵌合病毒^[35]。另外, 应用双顺反子进行表达研究发现, 含有 3'端序列的 FMDV RNA 与第 2 个顺反子连接, 对 IRES 介导的翻译有很强的刺激作用, 但对帽依赖性翻译过程没有影响。值得一提的是, 对于 poly(A)和 3'-UTR 对 IRES 介导的翻译的影响似乎是两个独立的事件, 因为 3'-UTR 单独就可以提高 IRES 的活性, 在细胞中 Lb 蛋白酶诱导的宿主蛋白翻译关闭的条件下, IRES 的活性可以提高 6 倍以上^[36]。poly(A)在病毒 RNA 复制过程的重要作用体现在: 该结构能够结合 PABP(Poly(A)Binding Protein), 在没有其它病毒或宿主蛋白存在的情况下, 有助于形成一座桥梁与病毒基因的 5'端结合^[37]。另外, 末端的 A 残基可以作为模板与作为引物的 3B-pUpU 杂交, 以合成病毒的负链 RNA。

2.4 研制新型 FMD 基因工程疫苗

1995 年, McKenna 等首先尝试 FMD 感染性分子克隆疫苗研究, 他们在 FMDV A12 株感染性分子克隆的基础上构建了缺失 RGD 基序的 FMDV, 用其免

疫牛获得了较好的免疫效果^[38]。两年后 Ward 等也在感染性分子克隆的基础上构建了缺失细胞吸附位点编码序列的基因工程毒, 将其导入实验动物体内, 动物表现了较强的免疫应答, 所产生的中和抗体可保护实验动物免受强毒的攻击^[39]。同年, Leippert 在 FMDV 基因组 RGD 基序内部及其附近设计点突变, 致使病毒的致病性丧失, 接种动物后, 能激发免疫反应, 但是并不能抵御第二轮感染的发生^[5]。后来, Almeida 等人分别构建了一种缺失 L 蛋白酶编码序列的嵌合病毒和一种缺失了 RGD 基序的嵌合病毒, 研究发现前一种嵌合病毒毒力偏弱, 但在猪体中仍能检测出毒性, 而后者在猪体中没有毒性, 但接种猪后, 并不能产生足够的免疫力对抗野毒感染^[40]。Chinsangaram 等人还利用基因工程技术, 将 FMDV A12 株感染性分子克隆的前导蛋白酶编码序列 L 基因缺失后利用该病毒分别作为活疫苗和化学灭活苗接种动物发现, 作为活苗接种后, 动物不表现临床症状, 没有散毒的危险, 能刺激机体产生中和抗体, 并能为动物提供部分免疫保护作用; 作为化学灭活苗接种动物后, 动物也能产生高水平的中和抗体, 抵御野毒的侵袭^[41]。最近, Fowler 等以 A12-119 毒株为模板, 以 O/C 型的相应区段替换其 VP1 G-H 环制备标记疫苗, 利用嵌合病毒制备的灭活疫苗能够对猪体产生完全保护, 在牛体接种疫苗后可诱导中和抗体的产生, 并在免疫后 21 d 仍可完全保护动物免受病毒的攻击^[42]。但是, 我们也获得了一株 RGD 基序发生突变的 FMDV 田间分离毒的感染性分子克隆, 该基因工程毒对 BHK-21 细胞和实验动物表现很强的致病力。所以说, 当前利用反向遗传操作技术制备 FMDV 基因工程疫苗仍然存在许多盲点, 距离真正的临床应用还有很长的路要走。

3 结语

以上有关 FMDV 反向遗传学的科研成果多为国外科学工作者完成的, 而我国开展 FMDV 反向遗传学的研究工作相对较晚。2001 年, 受国家重点基础研究发展计划项目(973)(G1999011901)资助, 在项目首席科学家谢庆阁研究员的指导下, 开启了国内 FMDV 反向遗传学研究的先河。2004 年, 刘光清等利用反向遗传学操作技术成功构建国内第一例 FMDV 感染性分子克隆^[43]。目前, 在新“973 项目”

(No. 2005CB23201)资助下, 启动了 A 型和 Asia 型反向遗传学研究工作, 现已完成对其代表性毒株之一 Asia1/JS/CHA/2005 全基因组序列的测定^[44]。

随着国内学者对该领域认知的不断深入, 并受国外同行的启发^[39], 我们也开始着手解决制约深入开展 FMDV 反向遗传学研究的“瓶颈”问题之一——转录系统。为了化解由全长 cDNA 到 RNA 这一转录过程体外操作易形成不完全转录本、拯救效率低、试验重复性差以及所获得的基因工程病毒毒力偏低等诸多缺点, 通过构建表达原核 RNA 聚合酶的真核细胞系或是利用宿主细胞本身所具有的聚合酶系统, 可简化试验操作步骤, 实现体内转录并提高拯救效率和 FMDV 毒力, 为完善 FMDV 反向遗传操作技术平台奠定坚实的物质基础。2007 年, 郑海学等利用鼠源聚合酶系统成功完成 FMDV 的体内拯救, 这不仅证明了聚合酶可在细胞质中转录长度为 8.2 kb 的 FMDV 全长 cDNA, 也标志着国内 FMDV 反向遗传学研究又上了一个新的台阶^[45]。

FMDV 反向遗传学的未来研究方向将主要包括以下内容: ①更加深入而全面地鉴定 FMDV 基因组所编码蛋白的结构和功能; 阐明遗传网络和蛋白质作用路径的组织方式, 确定它们如何在病毒侵染宿主细胞的过程中发挥作用提供一定物质基础。②寻求对 FMDV 基因组的可遗传变异的详细理解, 进一步探讨 FMDV 的进化变异及其机制。③确定 FMDV 基因组中真正与病毒复制有关的基因和毒力相关基因; 此项工作在未来应用研究战略方面, 对于研制开发成熟而实用的新型 FMD 基因工程疫苗也有重要意义。

参考文献

- [1] 谢庆阁. 口蹄疫. 北京: 中国农业出版社, 2004, p.1.
- [2] Sobrino F, Domingo E. Foot-and-mouth disease current perspectives. Norfolk, UK: Horizon Bioscience, 2004, pp.19–76.
- [3] Harwood LJ, Gerber H, Sobrino F, *et al.* Dendritic cell internalization of foot-and-mouth disease virus: influence of heparan sulfate binding on virus uptake and induction of the immune response. *J Virol*, 2008, **82**(13): 6279–6394.
- [4] Dicara D, Burman A, Clark S, *et al.* Foot-and-mouth disease virus forms a highly stable, EDTA-resistant complex with its principle receptor, integrin $\alpha\beta 6$: implications for

- infectiousness. *J Virol*, 2008, **82**(3): 1537–1546.
- [5] Leippert M, Beck E, Weiland F, *et al.* Point mutations within the β G- β H loop of foot-and-mouth virus O1K affect virus attachment to target cells. *J Virol*, 1997, **71**(2): 1046–1051.
- [6] Storey P, Theron J, Maree FF, *et al.* A second RGD motif in the 1D capsid protein of a SAT1 type foot-and-mouth disease virus field isolate is not essential for attachment to target cells. *Virus Res*, 2007, **124**(1-2): 184–192.
- [7] 刘在新. 口蹄疫病毒基因组及其编码蛋白一级结构研究. 中国农业科学院博士论文, 2002.
- [8] Rieder E, Henry T, Duque H, *et al.* Analysis of a foot-and-mouth disease virus type A24 isolate containing an SGD receptor recognition site *in vitro* and its pathogenesis in cattle. *J Virol*, 2005, **79**(20): 12989–12998.
- [9] Brown JK, McAleese SM, Thornton EM, *et al.* Integrin- $\alpha\beta$ 6, a putative receptor for foot-and-mouth disease virus, is constitutively expressed in ruminant airways. *J Histochem Cytochem*, 2006, **54**(7): 807–816.
- [10] 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.
- [11] Rieder E, Bunch T, Brown F, *et al.* Genetically engineered foot-and-mouth disease viruses with poly(C) tracts of two nucleotide are virulent in mice. *J Virol*, 1993, **67**(9): 5139–5145.
- [12] Liu GQ, Liu ZX, Xie QG, *et al.* Generation of an infectious cDNA clone of an FMDV strain isolated from swine. *Virus Res*, 2004, **104**(2): 157–164.
- [13] Boyer JC, Haenni AL. Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virol*, 1994, **198**(2): 415–426.
- [14] Grubman MJ, Moraes MP, Diaz-San Segundo F, *et al.* Evading the host immune response: how foot-and-mouth disease virus has become an effective pathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2008, **53**(1): 8–17.
- [15] Mayer C, Neubauer D, Nchinda AT, *et al.* Residue L143 of the foot-and-mouth disease virus leader proteinase is a determinant of cleavage specificity. *J Virol*, 2008, **82**(9): 4656–4659.
- [16] Piccone ME, Zellner M, Kumosinski TF, *et al.* Identification of the active-site residues of the L proteinase of foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 1995, **69**(8): 4950–4956.
- [17] Sa-Carvalho D, Rieder E, Baxt B, *et al.* Tissue culture adaptation of foot-and-mouth disease virus selects viruses that bind to heparin and are attenuated in cattle. *J Virol*, 1997, **71**(7): 5115–5123.
- [18] 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.
- [19] Zhao QZ, Pacheco JM, Mason PW. Evaluation of genetically engineered derivatives of a Chinese strain of foot-and-mouth disease virus reveals a novel cell-binding site which functions in cell culture and in animals. *J Virol*, 2003, **77**(5): 3269–3280.
- [20] Baranowski E, Molina N, Núñez JI, *et al.* Recovery of infectious foot-and-mouth disease virus from suckling mice after direct inoculation with *in vitro*-transcribed RNA. *J Virol*, 2003, **77**(20): 11290–11295.
- [21] Carrillo C, Lu Z, Borca MV, *et al.* Genetic and phenotypic variation of foot-and-mouth disease virus during serial passages in a natural host. *J Virol*, 2007, **81**(20): 11341–11351.
- [22] Beard CW, Mason PW. Genetic determinants of altered virulence of Taiwanese foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 2000, **74**(2): 987–991.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] Oem JK, Yeh MT, McKenna TS, *et al.* Pathogenic characteristics of the Korean 2002 isolate of foot-and-mouth disease virus serotype O in pigs and cattle. *J Comp Pathol*, 2008, **138**(4): 204–214.
- [26] Heath L, van der Walt E, Varsani A, *et al.* Recombination patterns in aphthoviruses mirror those found in other picornaviruses. *J Virol*, 2006, **80**(23): 11827–11832.
- [27] McInerney GM, King AMQ, Ross-Smith N, *et al.* Replication-competent foot-and-mouth disease virus RNAs lacking capsid coding sequences. *J Gen Virol*, 2000, **81**(Pt7): 1699–1702.
- [28] Funston GM, Kallioinen SE, de Felipe P, *et al.* Expression of heterologous genes in oncolytic adenoviruses using picornaviral 2A sequences that trigger ribosome skipping. *J Gen Virol*, 2008, **89**(Pt2): 389–396.
- [29] Weber S, Granzow H, Weiland F, *et al.* Intracellular membrane proliferation in *E. coli* induced by foot-and-mouth disease virus 3A gene products. *Virus Genes*, 1996, **12**(1): 5–14.
- [30] Liu GQ, Liu ZX, Zhang XS, *et al.* The complete genomic sequence of a foot-and-mouth disease virus isolated from the swine. *Agricultural Sciences in China*, 2004, **3**(5): 395–400.
- [31] Curry S, Roqué-Rosell N, Zunszain PA, *et al.* Foot-and-mouth disease virus 3C proteinase: recent structural and functional insights into an antiviral target. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, **39**(1): 1–6.
- [32] Nayak A, Goodfellow IG, Woolaway KE, *et al.* Role of RNA structure and RNA binding activity of foot-and-mouth disease virus 3C protein in VPg uridylylation and

- virus replication. *J Virol*, 2006, **80**(19): 9865–9875.
- [33] van Rensburg HG, Henry TM, Mason PW. Studies of genetically defined 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**(Pt1): 61–68.
- [34] Goris N, De Palma A, Toussaint JF, *et al.* 2'-C-methylcytidine as a potent and selective inhibitor of the replication of foot-and-mouth disease virus. *Antiviral Res*, 2007, **73**(3): 161–168.
- [35] Sáiz M, Gómez S, Martínez-Salas E, *et al.* Deletion or substitution of the *aphthovirus* 3'NCR abrogates infectivity and virus replication. *J Gen Virol*, 2001, **82**(Pt1): 93–101.
- [36] López de Quinto S, Sáiz M, de la Morena D, *et al.* IRES-driven translation is stimulated separately by the FMDV 3'-NCR and poly(A) sequences. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30**(20): 4398–4405.
- [37] Barton DJ, O'Donnell BJ, Flanagan JB. 5' Cloverleaf in poliovirus RNA is a *cis*-acting replication element required for negative-strand synthesis. *EMBO J*, 2001, **20**(6): 1439–1448.
- [38] McKenna TS, Lubroth J, Rieder E, *et al.* Receptor binding site-deleted foot-and-mouth disease (FMD) virus protects cattle from FMD. *J Virol*, 1995, **69**(9): 5787–5790.
- [39] Ward G, Rieder E, Mason PW. Plasmid DNA encoding replicating foot-and-mouth disease virus genomes induces antiviral immune responses in swine. *J Virol*, 1997, **71**(10): 7442–7447.
- [40] Almeida MR, Rieder E, Chinsangaram J, *et al.* Construction and evaluation of an attenuated vaccine for foot-and-mouth-disease difficulty adapting the leader proteinase-deleted strategy to the serotype O1 virus. *Virus Res*, 1998, **55**(1): 49–60.
- [41] Chinsangaram J, Mason PW, Grubman MJ. Protection of swine by live and inactivated vaccines prepared from a leader proteinase-deficient serotype A12 foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*, 1998, **16**(16): 1516–1522.
- [42] Fowler VL, Paton DJ, Rieder E, *et al.* Chimeric foot-and-mouth disease virus: evaluation of their efficacy as potential marker vaccines in cattle. *Vaccine*, 2008, **26**(16): 1982–1989.
- [43] 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.
- [44] Li D, Shang YJ, Liu ZX, *et al.* Comparisons of the complete genomes of two Chinese isolates of a recent foot-and-mouth disease type Asia 1 virus. *Arch Virol*, 2007, **152**(9): 1699–1708.
- [45] 郑海学. 动物 RNA 病毒反向遗传系统的研究和建立. 中国农业科学院博士论文, 2007.

新辟栏目介绍

教学科研单位及成果展示

为了更好地宣传我国生命科学领域取得的成绩, 总结和交流我国微生物学研究和开发的新成果, 增强学术刊物与科研、教学和开发等各界同仁的广泛合作与联系, 共谋发展, 决定开设“教学科研单位及成果展示”栏目, 现诚邀有关单位参加。具体安排如下:

- 1、在《微生物学通报》显著位置开辟精美彩色专版, 刊登科研、开发、教学单位介绍, 展示科研成果、学科建设成就、生物技术新产品等, 图文并茂, 生动活泼, 每页内容要求: 图片 2~5 张, 文字 1000 字以内。
- 2、参加单位将获赠刊有本单位宣传内容的本期《微生物学通报》刊物 5 本; 获赠《微生物学通报》杂志全文检索数据光盘版(1974~2006)一张。
- 3、参加单位提供的简介、科研及教学成果、学科建设成就、新产品新技术展示、招生信息、人才引进及招聘启事、优秀人才推介等内容均可在本刊网站的“科研单位成果展示”等栏目免费发布一年, 并可将主页网址与我刊友情链接。
- 4、参加单位应保证宣传材料真实客观、数据翔实、文责自负, 来稿请加盖公章, 以示负责。
- 5、本栏目将适当收取版面制作及网页维护费。
- 6、本栏目联系方式:

联系电话: 010-64807336; 010-64807521

联系人: 武文 王 闵

电子信箱: gg@im.ac.cn