

## 口蹄疫病毒 O/CHN/Mya98/33-P 株前导蛋白对 病毒感染性的影响

张萌 白兴文 李平花 范朋举 包慧芳 孙普 卢曾军 曹轶梅 陈应理 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 甘肃 兰州 730046)

**摘要:**【目的】研究口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus, FMDV)前导蛋白对于病毒感染性的影响。【方法】利用反向遗传操作技术,以 O/CHN/93 现用疫苗株的感染性克隆为骨架,分别构建了含口蹄疫病毒中国分离株 O/CHN/Mya98/33-P 和 O/CHN/Mya98/HN1 前导蛋白的两株嵌合全长 cDNA 感染性克隆,采用实时荧光定量 PCR 检测两株不同的嵌合病毒感染猪肾原代细胞后细胞内 IFN $\beta$  和 OAS mRNA 的转录情况。【结果】嵌合病毒 rOHN1Lab 增殖能力较弱,其对应诱导产生的 IFN $\beta$  和 OAS mRNA 含量较高,而嵌合毒 rO33Lab 相对于 rOHN1Lab 增殖能力较强,他们诱导产生的 IFN $\beta$  和 OAS mRNA 含量较低。【结论】研究表明口蹄疫病毒中国分离株 O/CHN/Mya98/33-P 前导蛋白具有更强的抗 IFN $\beta$  mRNA 转录的能力,该研究能够为进一步鉴定 FMDV 前导蛋白抗宿主先天性免疫的关键性位点奠定基础。

**关键词:** 口蹄疫病毒, 嵌合病毒, 前导蛋白, IFN $\beta$ , 转录, 影响

## Foot-and-mouth disease virus O/CHN/Mya98/33-P strains leading protein effects on the virus infection

ZHANG Meng BAI Xing-Wen LI Ping-Hua FAN Peng-Ju BAO Hui-Fang SUN Pu  
LU Zeng-Jun CAO Yi-Mei CHEN Ying-Li LIU Zai-Xin\*

(State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, National Foot-and-Mouth Disease Reference Laboratory, Engineering Research Center of Biological Detection of Gansu Province, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730046, China)

**Abstract:** [Objective] This study is to research the influence of foot-and-mouth disease virus (FMDV) leader protein for virus infectivity. [Methods] Two full-length infected cDNA clones were constructed based on O/HN/93 strain cDNA using reverse genetic technique which contain the leader protein of Chinese isolates O/CHN/Mya98/33-P and O/CHN/Mya98/HN1. Though real-time fluorescent quantitative PCR detecting the situation of IFN $\beta$  and OAS mRNA transcription, when pig kidney primary cells were infected the two different chimeric viruses. [Results] We found that the proliferation ability of chimeric virus rOHN1Lab is weaker, and the content of IFN $\beta$  and OAS in-

基金项目: 中国农业科学院基本科研业务费预算增量项目(No. 2013ZL036)

\*通讯作者: Tel: 86-931-8342587; ✉: liuzaixin@caas.cn

收稿日期: 2014-01-15; 接受日期: 2014-03-13; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-04-14

duced is higher. However, the proliferation ability of chimeric virus rO33Lab relative to rOHN1Lab is higher, and the content of IFN $\beta$  and OAS which induced is lower. **[Conclusion]** This study suggests that the leader protein of the Foot and mouth disease Chinese isolates O/CHN/Mya98/33-P have the stronger ability to resist IFN $\beta$  mRNA transcription, which lay the foundation for further identification of FMDV leader protein critical sites for resisting host innate immunity.

**Keywords:** Foot-and-mouth disease virus, Chimeric virus, Leader protein, IFN $\beta$ , Transcription, Influence

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传染性疾病,主要感染猪牛羊等偶蹄动物<sup>[1]</sup>。FMDV 属于小 RNA 病毒科口蹄疫病毒属,其主要分为 O、A、C、Asia1、SAT1、SAT2、SAT3 七种血清型,并且有很多亚型<sup>[2]</sup>。FMDV 基因组全长约 8.5 kb,由 5'-非编码区(Untranslated regions, UTR)、开放阅读框(Open reading frame, ORF)和 3'-UTR 组成<sup>[3]</sup>。

口蹄疫病毒前导蛋白位于编码多肽链的氨基端,为第一个被翻译的非结构蛋白,正是由于其是第一个被翻译的蛋白,所以在 FMDV 复制和毒力方面起着至关重要的作用。FMDV 可以从两个可变的起始密码子(AUG)起始翻译,所以有两种形式的 L<sup>pro</sup> (Lab 和 Lb); Lab 从第一个 AUG 开始翻译,而 Lb 从第二个 AUG 开始翻译,一般情况下,两个 AUG 之间相距 84 nt<sup>[4]</sup>,现在一致认为通过核糖体扫描的方式选择两个不同的起始密码子起始病毒的翻译<sup>[5]</sup>。口蹄疫病毒前导蛋白长度一般为 201 aa,国家口蹄疫参考实验室分离到了一株缅甸 98 系的前导蛋白具有特征性长度, O/CHN/Mya98/33-P 为 200 aa。

FMDV 前导蛋白一个木瓜蛋白酶样的半胱氨酸蛋白酶<sup>[6]</sup>,不仅能够从自身编码的多肽链上切割下来,还能切割一些宿主细胞特异性蛋白,如 eIF4G,进而影响宿主细胞内的翻译,而 FMDV 可以使用自己特有的内部核糖体进入位点(Internal ribosome entry site, IRES)起始病毒的翻译<sup>[7]</sup>。FMDV 前导蛋白的另一个重要作用是抗宿主细胞的先天性免疫反应。主要通过影响 NF- $\kappa$ B、IRF3/7 等转录因子的激活,进而影响宿主细胞 型干扰素

的产生能力,影响病毒的毒力<sup>[8-9]</sup>。目前对于 FMDV 前导蛋白影响宿主先天性免疫的关键性位点还不是很清楚,本研究通过反向遗传操作技术,拯救了含两株特征性病毒来源前导蛋白基因的嵌合病毒,通过实时荧光定量 PCR 研究不同嵌合病毒对抗 IFN $\beta$  mRNA 转录的差异,能够为进一步鉴定 FMDV 前导蛋白抗宿主先天性免疫的关键性位点奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒、细胞、质粒、试剂和仪器

O 型缅甸 98 系 O/CHN/Mya98/33-P (GenBank accession No.: JQ973889.1)、O/CHN/Mya98/HN1 毒株由国家口蹄疫参考实验室提供。FMDV O/HN/93 的全长 pOZF-Z1234 质粒为中国农业科学院兰州兽医研究所基因与分子标识课题组构建并保存<sup>[10]</sup>, FMDV O/HN/93 毒株为疫苗株,由国家口蹄疫参考实验室保存,前导蛋白序列见结果;表达 T7 RNA 聚合酶的 BHK-21 细胞(BSR/T7)由德国 Conzelmann 教授惠赠;BHK-21 和猪肾原代细胞由本实验室保存;RNA 提取试剂盒和一步探针法实时荧光定量 PCR 试剂盒购自 QIAGEN 公司;DNA Marker 购自上海捷瑞生物工程有限公司;质粒提取试剂盒,胶回收纯化试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司;扩增酶、AMV 反转录酶购自大连宝生物生物工程有限公司,限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司;Lipofectamine 2000、DMEM 购自 Invitrogen 公司。口蹄疫病毒 3A 蛋白单克隆抗体由本实验室保存,山羊抗鼠 IgG (H+L) FITC 荧光标记的二抗购自康为世纪公司;ABI 7000 实时荧光定量 PCR 仪,美国 ABI 公司;激光共聚焦显微镜,德国徕卡公司。

## 1.2 引物和探针的设计与合成

**1.2.1 嵌合质粒构建引物的设计与合成:**根据疫苗毒株和实验毒株的基因组序列设计引物(表 1),其中在引物 CXba+引入 *Xba* 酶切位点,引物 MayL-引入 *Bam*H 酶切位点(下划线表示),所有引物由 Invitrogen 公司合成。

### 1.2.2 实时荧光定量 PCR 引物与探针的设计与

合成:根据 FMDV O/HN/93、猪 IFN $\beta$ 、猪 OAS (2', 5'-oligoadenylate synthetase)和猪 GPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)基因序列,利用美国通用公司(Applied Biosystems)引物设计软件 1.5 版本设计实时荧光定量 PCR 引物与探针,如表 2 所示<sup>[11]</sup>。引物与探针由 Invitrogen 公司合成。

表 1 嵌合质粒构建引物的序列  
Table 1 The sequence of chimeric plasmid primers

名称 Names	引物序列 Sequence of primers (5'→3')	基因组中的位置 <sup>a</sup> The location in the genome <sup>a</sup>
Caba+	GTCTTTCCAGG <u>CTAGAG</u> GGGTGACACTTGTACTGTGCT	650-689
L600/3+	CTATTGACCACCACCAATCCATGAACACAGCTGGTTGTTTTATCGCT	1 041-1 088
L600/3-	AGCGATAAAACAACCAGCTGTGTTTCATGGATTTGGTGGTGGTCAATAG	1 041-1 088
MayL-	ACGTCGGAC <u>GGATCC</u> GGCGTCCAGGGGTAGAAATTCTTCGTCGTCG	1 547-1 591

注:<sup>a</sup>:以 O/HN/93 全基因组序列为标准;+:上游引物;-:下游引物。

Note:<sup>a</sup>: On the basis of the O/HN/93 full length genome; +: Forward primer; -: Reverse primer.

表 2 用于实时定量 PCR 的引物和探针  
Table 2 Oligonucleotide primer and probe sequences for real-time RT-PCR

基因 Genes	引物和探针名称 <sup>b</sup> The name of primers and probes <sup>b</sup>	序列 Sequences (5'→3')	GenBank 序列号 <sup>c</sup> GenBank accession No. <sup>c</sup>
FMDV	FMDV-7814F	CAAACCTGTGATGGCTTCGA	
	FMDV-7919R	CCGGTACTCGTCAGGTCCA	
	FMDV-7851T	CTCTCCTTTGCACGCCGTGGGAC	
GPDH <sup>a</sup>	pGAPDH-327F	CGTCCCTGAGACACGATGGT	AF017079
	pGAPDH-380R	CCCAGTGCAGCCAAAT	
	pGAPDH-348T	AAGGTCGGAGTGAACG	
IFN $\beta$ <sup>a</sup>	pIFN $\beta$ -11F	AGTGCATCCTCCAAATCGCT	M86762
	pIFN $\beta$ -69R	GTCATGGAAAGAGCTGTGGT	
	pIFN $\beta$ -32T	TCCTGATGTGTTTCTC	
OAS <sup>a</sup>	pOAS-889F	CTGTGCTTGGACGATGTATGCT	AJ225090
	pOAS-954R	CAGCCGGGTCCAGAATCA	
	pOAS-919T	TCAAGAAACCCAGGCCT	

注:<sup>a</sup>:引物和探针来自于参考文献[11].<sup>b</sup>:F:上游引物;R:下游引物;T:TaqMan 6 羧基荧光素 MGB (Minor groove binding) 探针;数字为在基因中的位置.<sup>c</sup>:NCBI GenBank 登录号。

Note:<sup>a</sup>: Primers and probe were obtained from reference [11].<sup>b</sup>: F: Forward primer; R: Reverse primer; T: TaqMan 6-carboxyfluorescein-MGB probe; Number: The location in the genome.<sup>c</sup>: NCBI GenBank accession number.

### 1.3 嵌合FMDV前导蛋白全长cDNA的构建

用 Qiagen RNeasy Mini Kit 提取 O/CHN/Mya98/33-P、O/CHN/Mya98/HN1 两株病毒的总 RNA。以总 RNA 为模板, 以 L600/3+和 MyaL-为引物 RT-PCR (Reverse transcription-PCR) 分别扩增 O/CHN/Mya98/33-P 和 O/CHN/Mya98/HN1 前导蛋白的基因序列, 分别命名为 33-Lab 和 HN1-Lab; 以质粒 pOZF-Z1234 为模板, 以 CXba+和 L600/3-为引物扩增与 33-Lab 和 HN1-Lab 融合的上游序列, 命名为 33/HN1-LabF。以 CXba+和 MyaL-为引物, 将 33/HN1-LabF 分别与 33-Lab 和 HN1-Lab 融合, 分别命名为 OZ-33Lab 和 OZ-HN1Lab。将回收后的 PCR 产物 OZ-33Lab、OZ-HN1Lab 以及全长 cDNA 质粒 pOZF-Z1234 用 Xba 和 BamH 双酶切, 以 pOZF-Z1234 酶切后的大片段为载体与 OZ-33Lab 和 OZ-HN1Lab 双酶切产物连接, 构建全长嵌合 3 种不同毒株前导蛋白的 cDNA 质粒, 分别命名为 pOZF-33Lab 和 pOZF-HN1Lab。最终构建的全长质粒以 Xba 和 BamH 双酶切鉴定, 并且将酶切鉴定正确的质粒送上海桑尼生物技术有限公司测序。

### 1.4 全长质粒的转染及嵌合病毒的拯救

将两个嵌合前导蛋白的全长质粒用 Not 线性化后, 用 PCR 纯化试剂盒纯化后备用。当培养的单层 BSR/T7 细胞铺满六孔板底部 70%~90%时, 利用脂质体 2000 将线性化后的质粒转入细胞, 并于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 继续培养 72 h 收获重组病毒, 反复冻融 3 次后于 BHK-21 细胞上继续传代<sup>[12]</sup>, 线性质粒 pOZF-33Lab 和 pOZF-HN1Lab 转染后, 拯救的病毒分别命名为 rO33Lab 和 rOHN1Lab。

### 1.5 嵌合病毒的鉴定

**1.5.1 反转录 PCR:** 将嵌合病毒 rO33Lab 和 rOHN1Lab 在 BHK-21 细胞上连续传至第 10 代, 提取第 10 代嵌合病毒的总 RNA, 利用 CXba+和 MyaL-为引物反转录 RCR 扩增嵌合病毒的前导蛋白序列及与之相连的部分 5'UTR 序列, 送上海桑尼生物技术有限公司测序。

**1.5.2 间接免疫荧光检测嵌合病毒非结构蛋白 3A:** 将第 10 代嵌合重组病毒 10 个 MOI (PFU/Cell) 接种于六孔板中铺满 40%~50%的 BHK-21 细胞, 阳性对照为 FMDV O/HN/93 细胞适应毒, 阴性对照为空白对照, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 温箱培养 4 h; 每孔用 4%的多聚甲醛 1 mL 室温固定 20 min; 每孔加入 1 mL 的 0.5% Triton X-100 室温作用 5 min; 每孔加入 1 mL 的 2% BSA, 4 °C 过夜封闭; 每孔加入 1 mL 1:100 稀释后的口蹄疫病毒非结构蛋白 3A 单克隆抗体, 37 °C 孵育 1 h; 之后每孔加入 1 mL 1:100 稀释过的山羊抗小鼠 [IgG(H+L)] FITC 荧光标记的二抗, 37 °C 作用 1 h; 加入 1:10 000 稀释过的 DAPI 1 mL, 室温作用 5 min; 最后用 PBS 缓冲溶液漂洗 5 次, 其中各步骤之间都用 PBS 缓冲溶液漂洗 3 次; 利用激光共聚焦显微镜观察并拍照。

### 1.6 实时荧光定量PCR

**1.6.1 对病毒 RNA 相对定量:** 利用第 3 代嵌合病毒, 0.1 个 MOI 感染猪肾原代细胞, 每组设 3 个重复, 分别于 0、4、6、8、10 h 收获病毒, 反复冻融 3 次, 利用 Qiagen RNeasy Mini Kit 提取总 RNA; 以 0 h 病毒 RNA 的量为内参, 以 0 h 病毒 RNA 为对照, 利用一步探针法实时荧光定量 PCR 试剂盒和 ABI 7000 实时荧光定量 PCR 仪对感染 4、6、8、10 h 后病毒 RNA 的变化进行相对定量, 引物和探针见表 2。

**1.6.2 对 IFN $\beta$  和 OAS 进行相对定量:** 将第 3 代嵌合病毒 10 个 MOI 接种猪肾原代细胞, 每组设 3 个重复, 分别于 0、4、6、8、10 h 收获细胞, 反复冻融 3 次, 利用 Qiagen RNeasy Mini Kit 提取总 RNA; 以猪肾细胞内 GPDH 的量为内参, 以 0 h 细胞内的 RNA 为对照, 对猪肾细胞内的 IFN $\beta$  和 OAS mRNA 的变化进行相对定量, 引物和探针见表 2。

## 2 结果与分析

### 2.1 两株实验毒株前导蛋白的序列比对

利用 DNASTar 软件对两株缅甸 98 系病毒

(O/CHN/Mya98/33-P、O/CHN/Mya98/HN1)前导蛋白氨基酸序列进行比对(图 1)。其中 FMDV O/CHN/Mya98/33-P 株前导蛋白氨基酸长度为 200 个,相对于标准的 201 个,其在第二个起始密码子前面缺失一个谷氨酸;FMDV O/CHN/Mya98/HN1 株前导蛋白长度为标准的 201 个;FMDV O/CHN/Mya98/HN1 株与 FMDV O/CHN/Mya98/33-P 株 Lb 片段氨基酸相比具有特征性差异,其中 FMDV O/CHN/Mya98/33-P 株 84 位氨基酸变为 G,该位点位于 SAP (For SAF-A/B, Ainus and PIAS) 区域<sup>[13]</sup>;除此之外在 147 位变为 R,该位点位于酶活性位点 149H 附近(氨基酸的位置以 FMDV O/CHN/Mya98/HN1 株为基准)。由于口蹄疫病毒进入细胞后,主要通过第二个起始密码子起始病毒的翻译,故 Lb 在病毒翻译的前导蛋白中占多数。

## 2.2 嵌合病毒全长质粒的鉴定

将构建好的重组全长质粒用 *Xba* 和 *Bam*H

双酶切鉴定,结果切出与预期相符的带,其中嵌入片段大小为 900 bp (图 2)。测序结果也与目标序列一致,表明在全长质粒 pOZF-Z1234 中成功替换了目的序列。

## 2.3 嵌合病毒鉴定

**2.3.1 反转录 PCR:** 提取第 10 代嵌合病毒的总 RNA,以 CXba+和 MyaL-为引物,反转录 PCR 扩增病毒前导蛋白序列及与之相连的部分 5'UTR 序列,PCR 目的片段大小为 900 bp (图 3),测序结果显示与目标序列一致,表明嵌合病毒拯救成功。

**2.3.2 间接免疫荧光检测口蹄疫病毒非结构蛋白 3A:** 利用第 10 代拯救病毒接种 BHK-21 细胞,利用间接免疫荧光试验检测细胞中口蹄疫病毒非结构蛋白 3A 表达情况(图 4)。结构表明在 BHK-21 细胞中均能检测到 3 株嵌合病毒以及阳性对照的非结构蛋白 3A,而阴性对照检测不到非结构蛋白 3A,进一步表明病毒的拯救成功。

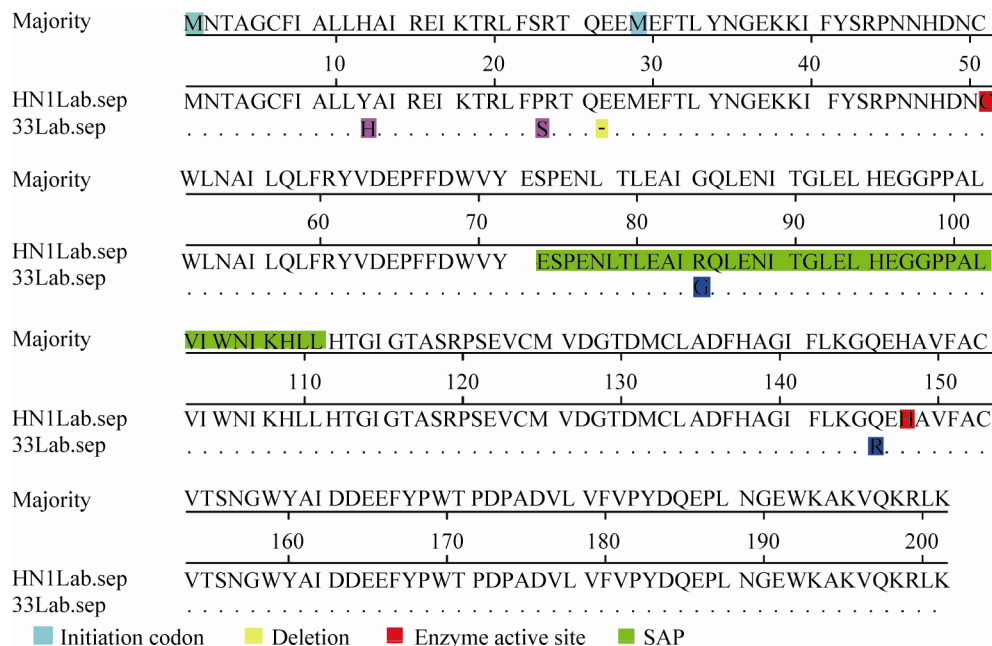


图 1 两株实验毒株前导蛋白氨基酸序列间的部分比对

Figure 1 Alignment of partial amino acid sequence of two experimental strain leader protein

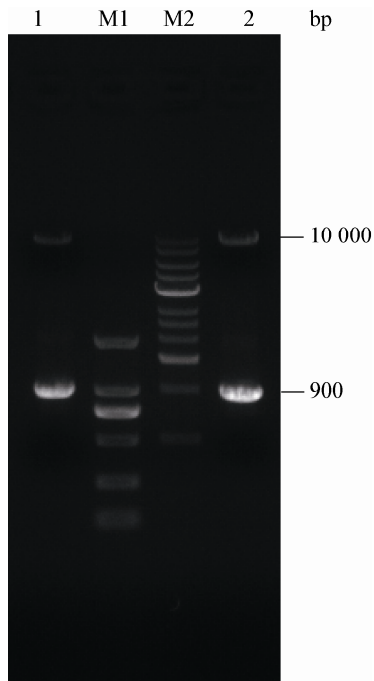


图 2 嵌合全长质粒的酶切鉴定

**Figure 2 Restriction enzyme digestion analysis of chimeric full-length plasmids**

注: M1: DL2000 DNA 分子质量标准; M2: DL12000 DNA 分子质量标准; 1: pOZF-HN1Lab 酶切产物; 2: pOZF-33Lab 酶切产物.

Note: M1: DL2000 DNA marker; M2: DL12000 DNA marker; 1: The products of the pOZF-HN1Lab digested with *Xba* I and *Bam*H I; 2: The products of the pOZF-33Lab digested with *Xba* I and *Bam*H I.

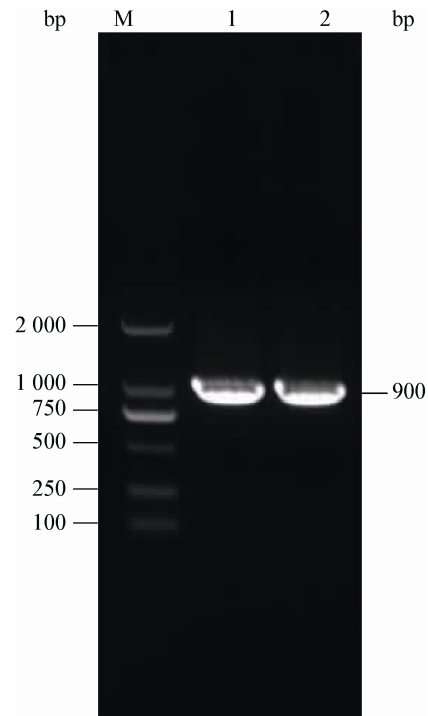


图 3 嵌合病毒的反转录 PCR

**Figure 3 The reverse transcription PCR of the chimeric virus**

注: M: DL2000 DNA 分子质量标准; 1: rOHN1Lab 反转录 PCR 产物; 2: rO33Lab 反转录 PCR 产物.

Note: M: DL2000 DNA marker; 1: The reverse transcription PCR product of rOHN1Lab; 2: The reverse transcription PCR product of rO33 Lab.

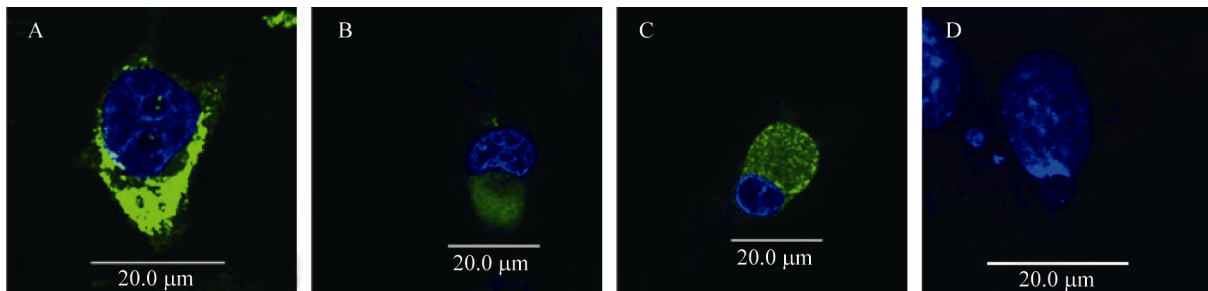


图 4 激光共聚焦显微镜检测嵌合病毒非结构蛋白 3A 在 BHK-21 表达

**Figure 4 Laser confocal microscopy analysis chimeric virus nonstructural protein 3A expression in infected BHK-21 cells**

注: A: BHK-21 细胞接种口蹄疫病毒 O/HN/93; B: BHK-21 细胞接种嵌合病毒 rO33Lab; C: BHK-21 细胞接种嵌合病毒 rOHN1Lab; D: 空白对照; 绿色: 3A; 蓝色: 细胞核.

Note: A: BHK-21 cells infected with FMDV O/HN/93; B: BHK-21 cells infected with chimeric virus rO33Lab; C: BHK-21 cells infected with chimeric virus rOHN1Lab; D: Mock infected; Green: 3A; Blue: Nucleus.

## 2.4 实时荧光定量PCR

由于RNA病毒的准种特性,重组病毒的鉴定采用第10代病毒是因为:其能够清除转染质粒残留的影响;生物活性的鉴定采用低代次病毒才能说明目的蛋白的作用。由于第3代重组病毒致细胞病变时间达到稳定,故实时定量PCR采用第3代重组病毒。

**2.4.1 分析嵌合病毒RNA的变化:**将第3代嵌合病毒0.1个MOI分别接种猪肾原代细胞,以接种病毒RNA的量为内参及对照,检测接种不同时间后口蹄疫病毒RNA相对于接种前的增殖情况。结果如图5所示,相对于嵌合病毒rOHN1Lab,嵌合病毒rO33Lab增殖速率较快。

**2.4.2 分析猪原代细胞中IFN $\beta$ 和OAS mRNA的变化:**将第3代嵌合病毒10个MOI分别接种猪肾原代细胞,以猪肾原代细胞内的GPDH mRNA含量为内参,以没有接种病毒猪肾原代细胞中IFN $\beta$

和OAS mRNA的含量为对照,检测接种不同时间后细胞内IFN $\beta$ 和OAS含量的变化。结果如图6所示,在接种6h后,差异较显著,其中rOHN1Lab诱导产生的IFN $\beta$  mRNA的含量最高,8h和10h诱导产生IFN $\beta$  mRNA的含量开始下降。通过对比接种6h IFN $\beta$ 的含量表明,口蹄疫病毒O/CHN/Mya98/33-P株L蛋白具有抗IFN $\beta$  mRNA产生的特性。通过检查IFN的一个下游信号OAS, OAS是一个干扰素刺激基因(ISGs, IFN-stimulated genes),如图7所示,结果在接种6h后rOHN1Lab诱导产生的OAS mRNA产生的量比rO33Lab高,进一步说明口蹄疫病毒O/CHN/Mya98/33-P前导蛋白具有抗干扰素产生的特性。然而,在接种8h后, rO33Lab诱导的OAS mRNA产生量比rOHN1Lab高,可能是由于rO33Lab复制较快,在接种8h时候,两者病毒含量不同,这可能是造成该现象的主要原因。

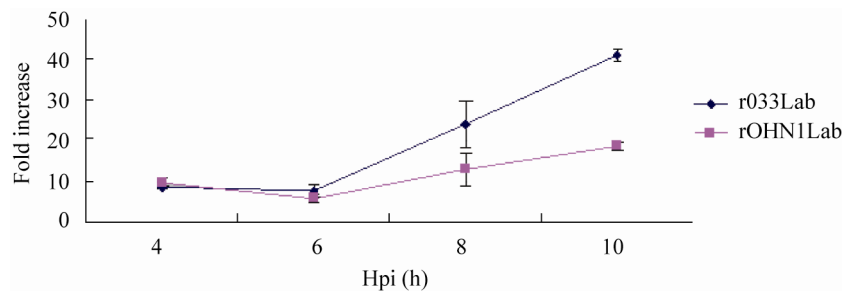


图5 实时定量PCR检测嵌合病毒RNA增殖变化

Figure 5 Real-time PCR analysis the proliferation changes of chimeric virus RNA

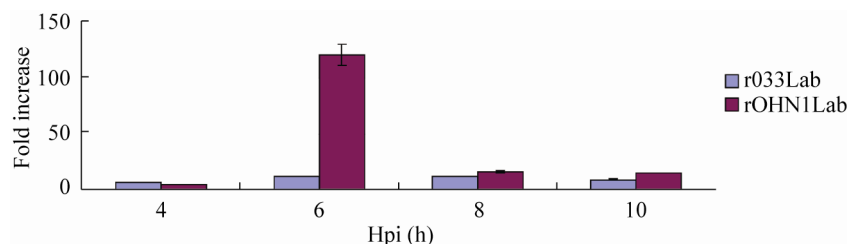


图6 嵌合病毒接种猪肾原代细胞不同时间后IFN $\beta$  mRNA产生量的变化

Figure 6 The changes of IFN $\beta$  mRNA in pig kidney primary cells after infected with chimeric virus

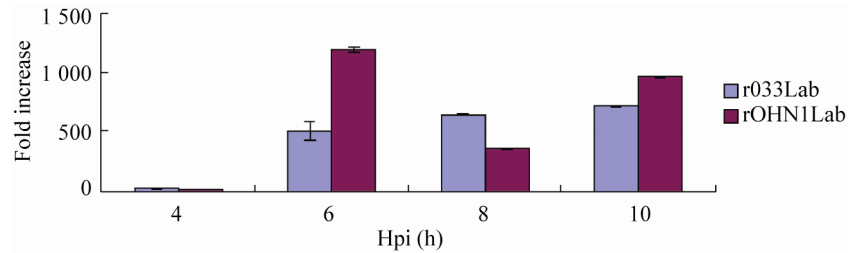


图 7 嵌合病毒接种猪肾原代细胞不同时间后 OAS mRNA 产生量的变化

Figure 7 The changes of OAS mRNA in pig kidney primary cells after infected with chimeric virus

### 3 讨论

口蹄疫病毒前导蛋白是口蹄疫病毒的一个重要的毒力因子,其不仅能够降低细胞内 NF- $\kappa$ B 和 IRF3/7 蛋白水平,还能够通过其去泛素化活性,影响 NF- $\kappa$ B 的激活,进而影响到 I 型干扰素的产生<sup>[14]</sup>。本研究不但证明口蹄疫病毒前导蛋白能够影响宿主细胞 IFN $\beta$  mRNA 的转录,口蹄疫病毒 O/CHN/Mya98/33-P 株前导蛋白抗宿主产生 IFN $\beta$  的能力更强。通过检测嵌合不同来源的前导蛋白重组病毒的复制能力及干扰素信号通路下游信号 OAS mRNA 转录水平的差异,进一步证明上述结论的正确性。

序列比对发现口蹄疫病毒 O/CHN/Mya98/33-P、O/CHN/Mya98/HN1 两者差异主要位于两个起始密码子之间的区域(图 1),FMDV O/CHN/Mya98/HN1 两个起始密码子之间的长度为常见的 84 nt<sup>[4]</sup>,而 FMDV O/CHN/Mya98/33-P 株长度比较独特,为 81 nt。目前研究表明两个起始密码子之间区域的核苷酸具有较高易变性,但是 RNA 的二级结构相对保守<sup>[15]</sup>,推测该区域可能参与病毒复制的起始。除此之外,该区域插入一个 57 nt 的转座子或者两个表位(HA 和 Flag)或者一个含 4 个半胱氨酸基序(CCGPCC)均能使病毒致弱<sup>[16]</sup>。本研究表明两种嵌合病毒起始密码子之间的长度不同可能是导致病毒复制差异的主要因素,通过影响病毒的复制,可能会进一步影响病毒抗宿主 IFN $\beta$  产生的能力。由于口蹄疫病毒进入细胞后,主要通过第二个起始密码子起始

病毒的翻译,故 Lb 在病毒翻译的前导蛋白中占多数。两个起始密码子之间序列长度和同源性的差异可能会造成病毒复制的差异。而 Lb 同源性的差异可能会造成前导蛋白生物活性的差异,进而导致两个不同嵌合病毒抗 I 型干扰素能力的差异。

口蹄疫病毒前导蛋白在细胞质中表达后,并不是在细胞中均匀分布,而是首先进入细胞核,随后才出现在细胞质中<sup>[17]</sup>。FMDV 感染细胞后,能够激活 NF- $\kappa$ B,随后激活的 NF- $\kappa$ B 进入细胞核,而进入细胞核的前导蛋白能够降解激活的 NF- $\kappa$ B,进一步影响 I 型干扰素的产生<sup>[8-9,14]</sup>。经过生物信息学预测,并经过实验证实,L<sup>pro</sup> 存在一个保守的区域 SAP (For SAF-A/B, Ainus and PIAS),其位于 Lb 蛋白的 47-83 aa (第二个起始甲硫氨酸为 1M),在某些情况下,该结构域与前导蛋白进入细胞内的速率有关。如果 SAP 区域内发生突变,病毒的毒力将会下降,因为细胞核中不出现 L<sup>pro</sup>,细胞核中的 NF- $\kappa$ B 也没有被降解<sup>[13]</sup>。FMDV O/CHN/Mya98/33-P 在 Lb 编码区存在两个特异性位点,56G 和 118R (第二起始密码氨基酸为 1M)。其中 56G 位于 SAP 区域;除此之外在前导蛋白的二级结构中 56G 处于  $\alpha$  螺旋的中间位置,由于在二级结构  $\alpha$  螺旋中 G 出现的概率极低,推测该氨基酸突变影响的口蹄疫病毒前导蛋白的二级结构;两种原因使其前导蛋白进入细胞核内的速率更快,抵抗宿主诱导 IFN $\beta$  转录的能力更强,进而能够促进病毒的复制能力。118R 位于酶活性中 120H 附近,推测该位点影响病毒前导蛋白酶的活性,影响



宿主细胞的翻译。

本研究为进一步鉴定口蹄疫病毒抗宿主产生型干扰素的关键性位点的确定,以及揭示口蹄疫病毒抗宿主先天性免疫的分子机制,打下了坚实的基础。

## 参 考 文 献

- [1] Grubman MJ, Baxt B. Foot-and-mouth disease[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2004, 17(2): 465-493.
- [2] Knowles NJ, Samuel AR. Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus[J]. *Virus Research*, 2003, 91(1): 65-80.
- [3] Racaniello VR. Picornaviridae: the viruses and their replication[M]//Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al. eds. *Fields Virology*, Philadelphia: Lippincott William & Wilkins, 1996, 1: 609-654.
- [4] Cao X, Bergmann IE, Füllkrug R, et al. Functional analysis of the two alternative translation initiation sites of foot-and-mouth disease virus[J]. *Journal of Virology*, 1995, 69(1): 560-563.
- [5] Sangar DV, Newton SE, Rowlands DJ, et al. All foot and mouth disease virus serotypes initiate protein synthesis at two separate AUGs[J]. *Nucleic Acids Research*, 1987, 15(8): 3305.
- [6] Roberts PJ, Belsham GJ. Identification of critical amino acids within the foot-and-mouth disease virus leader protein, a cysteine protease[J]. *Virology*, 1995, 213(1): 140-146.
- [7] Devaney MA, Vakharia VN, Lloyd RE, et al. Leader protein of foot-and-mouth disease virus is required for cleavage of the p220 component of the cap-binding protein complex[J]. *Journal of Virology*, 1988, 62(11): 4407-4409.
- [8] De Los Santos T, Diaz-San Segundo F, Grubman MJ. Degradation of nuclear factor kappa B during foot-and-mouth disease virus infection[J]. *Journal of Virology*, 2007, 81(23): 12803-12815.
- [9] Wang D, Fang L, Luo R, et al. Foot-and-mouth disease virus leader proteinase inhibits dsRNA-induced type I interferon transcription by decreasing interferon regulatory factor 3/7 in protein levels[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 399(1): 72-78.
- [10] Li P, Bai X, Sun P, et al. Evaluation of a genetically modified foot-and-mouth disease virus vaccine candidate generated by reverse genetics[J]. *BMC Veterinary Research*, 2012, 8(1): 57.
- [11] De Los Santos T, de Avila Botton S, Weiblen R, et al. The leader proteinase of foot-and-mouth disease virus inhibits the induction of beta interferon mRNA and blocks the host innate immune response[J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(4): 1906-1914.
- [12] Li P, Bai X, Cao Y, et al. Expression and stability of foreign epitopes introduced into 3A nonstructural protein of foot-and-mouth disease virus[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41486.
- [13] De Los Santos T, Diaz-San Segundo F, Zhu J, et al. A conserved domain in the leader proteinase of foot-and-mouth disease virus is required for proper subcellular localization and function[J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(4): 1800-1810.
- [14] Wang D, Fang L, Li P, et al. The leader proteinase of foot-and-mouth disease virus negatively regulates the type I interferon pathway by acting as a viral deubiquitinase[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(8): 3758-3766.
- [15] Carrillo C, Tulman ER, Delhon G, et al. Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus[J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(10): 6487-6504.
- [16] Piccone ME, Segundo FDS, Kramer E, et al. Introduction of tag epitopes in the inter-AUG region of foot and mouth disease virus: effect on the L protein[J]. *Virus Research*, 2011, 155(1): 91-97.
- [17] García-Briones M, Rosas MF, González-Magaldi M, et al. Differential distribution of non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus in BHK-21 cells[J]. *Virology*, 2006, 349(2): 409-421.