

口蹄疫病毒 A/AKT/58 株基因组全长感染性 cDNA 克隆的体内拯救

白兴文^{①*}, 李平花^①, 曹轶梅^①, 李冬^①, 卢曾军^①, 郭建宏^①, 孙德惠^①,
郑海学^②, 孙普^①, 刘湘涛^①, 罗建勋^①, 刘在新^{①*}

① 中国农业科学院兰州兽医研究所, 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, 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 兰州 730046;

② 广东省农业科学院, 广州 540640

* 联系人, E-mail: baixingwen@163.com; liukey@public.lz.gs.cn

收稿日期: 2008-02-25; 接受日期: 2008-06-16

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2005CB23201)和国家科技支撑计划(批准号: 2006BAD06A03)资助项目

摘要 构建了两种口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)基因组全长 cDNA 克隆 pTA/FMDV 和 pCA/FMDV, 利用体外转录和体内转录方法制备感染性病毒, 并对其抗原性, 乳鼠毒力(LD₅₀)和病毒生长动力学等生物学特性进行了分析. 为了鉴别野毒与重组病毒, 利用融合 PCR 技术在两种全长 cDNA 基因组内分别引入了几个点突变(pTA/FMDV: T1029G, pCA/FMDV: A174G, A308G, T1029G)作为遗传标记. 结果表明, 两种重组病毒对 3 日龄乳鼠均表现致病性. 但是由 pTA/FMDV 合成的感染性体外转录本 RNA 的毒力较弱(10⁻⁶); 而与 pCT7RNAP 质粒共转染的 pCA/FMDV 体内拯救病毒的毒力较强(10^{-7.5}), 并在 BHK-21 细胞上表现出与野毒相似的生长特性. 这一结果表明, 在 FMDV 的拯救过程中, 以 pCT7RNAP 为基础的体内拯救系统相比体外转录方法更为简便、实用. 该系统为利用反向遗传操作技术深入研究 FMDV 的分子致病机制及其准种特性等奠定了良好的基础.

关键词

口蹄疫病毒
感染性 cDNA 克隆
体内转录
A/AKT/58 株

口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)引起的, 主要以感染猪、牛、羊等偶蹄家畜为主的一种烈性传染病^[1,2]. 该病的发生会给疫情所在国家或地区造成惨重的经济损失. FMDV 属于小 RNA 病毒科(Picornaviridae)口蹄疫病毒属(*Aphthovirus*)^[3-5], 病毒基因组为单股正链 RNA, 长度约为 8500 个核苷酸, 主要由包括 S 片段、poly(C)区段、3~4 个假节、顺式作用复制元件(*cis*-acting replication element, CRE)、内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)在内的长度约为 1200 个核苷酸的 5'非编码区

(non-coding region, NCR)^[6-11]、一个大的可读框(open reading frame, ORF)以及约 90 个核苷酸的 3' NCR 3 部分组成. 基因组的 5' 端连接一种小蛋白 VPg, 3' 端为一 poly(A)尾巴^[12]. ORF 编码病毒多聚蛋白, 它们依赖自身编码的蛋白酶裂解形成 12~13 种成熟蛋白^[3,13].

目前, 利用反向遗传操作技术构建全长 cDNA 克隆并拯救感染性病毒已成为深入研究 FMDV 的一种重要手段^[14]. 在制备 FMDV 感染性克隆的过程中, 必须考虑两个关键性的技术环节: 首先是如何获得足够长的 poly(C)区段, 这一“瓶颈”问题随着 DNA 合成

技术的不断发展现已得到解决^[15]; 其次是如何制备忠实、完整的全长基因组 RNA. 目前, 利用体外转录方法已成功拯救了 O, A, SAT 等血清型在内的多株 FMDV 感染性克隆^[14-27], 但该方法存在诸多缺点, 如体外合成 RNA 的不均一性和不稳定性, 以及与野毒相比重组病毒的复制能力偏低、感染性较弱等^[28-31].

本研究利用体内转录方法替代体外转录方法成功实现了 FMDV 的拯救. 首先构建表达 T7 RNA 聚合酶的真核表达载体 pCT7RNAP, 并将 FMDV 全基因组置于 T7 启动子下游构建全长重组质粒 pCA/FMDV, 通过质粒共转染技术将 pCT7RNAP 和 pCA/FMDV 导入宿主细胞, 借助 T7RNAP 的转录活性在体内完成 FMDV 基因组全长 cDNA 到 RNA 的过程, 进而获得了重组病毒. 这一方法将为深入研究 FMDV 的抗原性、毒力、发病机理, 尤其是 FMDV 的分子致病机制及其准种特性等提供了有力的技术支持.

1 材料和方法

1.1 细胞、毒株和质粒

BHK-21 细胞(含抗生素和 10%新生牛血清的

DMEM 培养基); 覆盖 A 型 FMDV A/AKT/58 株全基因组重叠片段的阳性重组质粒, 由国家口蹄疫参考实验室保存; pGEM-T 载体为 Promega 公司产品, pCDNA3.1(+)载体购自 Invitrogen 公司.

1.2 全长 cDNA 克隆的构建

以覆盖 FMDV A/AKT/58 株全基因组的 7 个重叠片段的阳性重组质粒分别为模板, 用 LA Taq DNA 聚合酶(TaKaRa)扩增各个目的基因片段. 利用融合 PCR 技术构建 5'半分子和 3'半分子. 随后用 *Bss*H /*Not* 消化 5'半长 cDNA 克隆和 3'半长 cDNA 分子, 构建全长重组质粒 pTA/FMDV. 利用特异性引物对, 以 pTA/FMDV 为模板扩增 SCnL 片段, 与 pGEM-T 载体相连, 得到 pSCnL, 再将 *Xba* /*Not* 释放的 pTA/FMDV 片段插入 pSCnL 质粒组装成新的全长 cDNA; 随后利用 *Nhe* /*Not* 将该全长 cDNA 克隆到 pCDNA3.1(+)载体中, 构建 pCA/FMDV 全长重组质粒(图 1). 并对 pTA/FMDV (T1029G)和 pCA/FMDV(A174G, A308G, T1029G)进行序列测定.

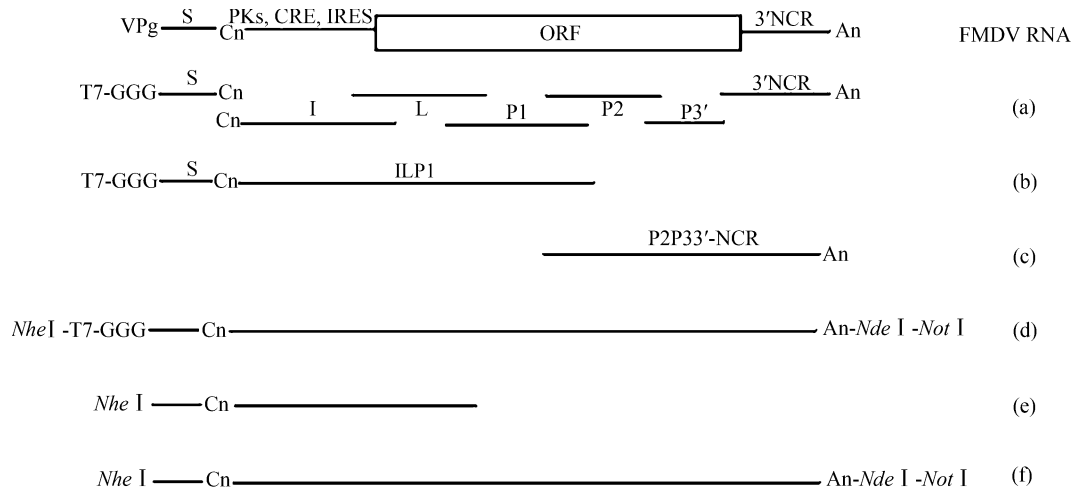


图 1 A 型 FMDV A/AKT/58 株全长 cDNA 克隆的构建策略

(a) 以保存的阳性重组质粒为模板, 利用特异性引物对经 PCR 扩增获得的覆盖 FMDV A/AKT/58 株全基因组的 7 个片段; (b), (c) 利用融合 PCR 技术构建的 5'半长 cDNA 和 3'半长 cDNA; (d) 借助 *Bss*H /*Not* 将 3'半长 cDNA 分子插入 5'半长 cDNA 后组装的全长 cDNA 重组质粒 pTA/FMDV; (e) 以 pTA/FMDV 为模板, 利用特异性引物对经 PCR 扩增所得到的 SCnL 片段; (f) 由 pSCnL 和 pTA/FMDV 借助 *Xba* /*Not* 组装的重组质粒, 经 *Nhe* /*Not* 消化所释放的片段与 pCDNA3.1(+)连接所构建的全长 cDNA 重组质粒 pCA/FMDV

1.3 pCT7RNAP 的构建及 pTA/FMDV 体外转录本的制备

利用特异性引物对(T7-上游: 5'-C[AAGCTT]_{Hind} CCACC_{Kozak}ATGAACACGATTAACATCG-3'; T7-下游: 5'-TAC[GAATTG]_{EcoR}TTACCGAACGCGAAGTCCGACTC-3')从 BL21(DE3)中扩增 T7 RNA 聚合酶基因, 利用 *Hind* /*EcoR* 将其克隆到 pCDNA3.1(+)载体中, 获得阳性重组质粒 pCT7RNAP. 利用 *Nhe* /*Not* 消化 pTA/FMDV, 经蛋白酶 K 处理、酚/氯仿抽提后, 乙醇沉淀. 根据 RiboMAXTM Large Scale RNA Production System(Stratagene)操作手册进行体外转录, 转录产物纯化(Ambion)后, 用 1%甲醛变性凝胶进行电泳检测.

1.4 转染和病毒拯救

单层 BHK-21 细胞在 6 孔板(Costar)中生长至 60%~90%时用于转染. 按照操作说明, 各取 5 g 由 pTA/FMDV 制备的 RNA 转录本和 *Not* 线化的 pCA/FMDV(与 pCT7RNAP 质粒共转染), 由 Lipofectamine 2000TM(Invitrogen)介导转染 BHK-21 细胞. 转染后 6 h 吸去细胞上清, 加入含 10%新生牛血清的 DMEM 培养基, 置 CO₂ 培养箱中 37℃继续培养至 72 h 后收获病毒. 反复冻融 3 次, 随后在 BHK-21 细胞上连续传至第 6 代.

1.5 RT-PCR 检测

为了鉴定重组病毒的基因组序列, 用 RNeasy mini kit (Qiagen)按操作说明书从转染的 BHK-21 细胞中提取总 RNA, 利用特异性引物对, RT-PCR 分别扩增重组病毒的 5'NCR 和 3'NCR 区段, 并将 PCR 产物送寄 TaKaRa 公司进行序列测定.

1.6 间接免疫荧光

利用间接免疫荧光检测 BHK-21 细胞中有无 FMDV 蛋白的表达^[32]. 将附于盖玻片上的细胞用含 3.7%多聚甲醛的 PBS(pH 7.5)固定 10 min, PBS 洗涤; 加入 FMDV 感染的阳性血清(1:100 稀释), 37℃孵育 45 min 后, PBS 洗涤 3 遍; 加入 FITC 标记二抗, 37℃孵育 30 min, PBS 洗涤 3 遍; 最后, 在荧光显微镜下观察.

1.7 电子显微镜检查

病毒悬液经 BEI 灭活后, 加入 0.1% Triton X-100 和终浓度为 20 mmol/L 的 EDTA(pH 8.0), 在 4℃条件下 8000 r/min 离心 30 min 以去除细胞碎片; 取上清液于 4℃ 45000 r/min 离心 3 h, 沉淀重悬于 NET 缓冲液中, 点样 5 μL 置 H-7100FA 电子显微镜下, 80 kV 观察病毒粒子.

1.8 重组病毒的动态生长曲线及其乳鼠毒力实验

单层 BHK-21 细胞接种 0.1 倍体积的重组病毒液, 吸附 1 h 后, 吸去病毒液, 加入新鲜培养基. 不同时间点取样, 测定病毒滴度^[14].

10 倍系列稀释重组病毒液, 皮下注射 3 日龄乳鼠, 每一稀释度接种 5 只, 0.2 mL/只. 观察 72 h, 根据乳鼠死亡情况利用 Reed-Muench 法^[33]计算 LD₅₀.

2 结果

2.1 全长 cDNA 克隆的构建及其序列测定

利用融合 PCR 技术和单一限制性内切核酸酶位点, 成功构建了 FMDV A/AKT/58 株的两种全长 cDNA 克隆 pTA/FMDV 和 pCA/FMDV. 序列测定结果表明, 病毒基因组由 8194 个核苷酸组成(包括 17 个 C 的 poly(C)区段), T7 启动子置于基因组全长 cDNA 的 5'端, 3'端为 21 个核苷酸的 poly(A)尾巴和两个限制性内切核酸酶位点(*Nde* 和 *Not*). 并在 pTA/FMDV (T1029G)和 pCA/FMDV(A174G, A308G 和 T1029G)中成功引入了可作为遗传标记的点突变.

2.2 体外转录本的制备和转染

以 *Nhe* /*Not* 线化的 pTA/FMDV 重组质粒为模板, 制备 RNA 体外转录本, 转录产物甲醛变性琼脂糖凝胶电泳结果如图 2 所示. 体外转录本和 *Not* 线化的 pCA/FMDV(与 pCT7RNAP 质粒共转染)转染 BHK-21 细胞后, 可见明显的致细胞病变效应(cytopathic effects, CPE), 与野毒无明显区别(图 3).

2.3 重组病毒的 RT-PCR 鉴定

为了证明拯救的重组病毒并非野毒污染以及相互污染所致, 提取病毒总 RNA, 利用 RT-PCR 方法分别扩增遗传标记所在 5' NCR 片段以及 3' NCR 片段, 测序结果不仅排除了三者相互污染的可能而且进一

步说明重组病毒基因组 RNA 是完整的.

2.4 重组病毒间接免疫荧光检测

实验结果显示, pTA/FMDV 体外转录本转染和 pCT7RNAP 质粒与 *Not* 线化的 pCA/FMDV 共转染的 BHK-21 细胞以及野毒感染的 BHK-21 细胞均表现强烈的绿色荧光信号, 而正常的 BHK-21 细胞无免疫荧光产生, 表明重组病毒感染的 BHK-21 细胞中有 FMDV 蛋白的表达(图 4).

2.5 重组病毒的电镜显微镜观察

为了进一步证实转染实验的结果, 通过电子显微镜可观察到有大量直径约为 20~30 nm 的 FMDV 粒子存在(图 5).

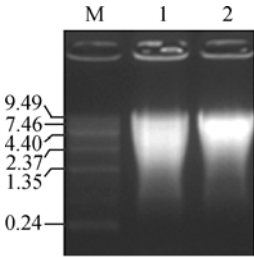


图 2 pTA/FMDV 体外转录本

M: 分子质量标准, 0.24~9.5 kb RNA Ladder(Invitrogen); 泳道 1: DV A/AKT/58 基因组 RNA; 泳道 2: A/FMDV 体外转录本

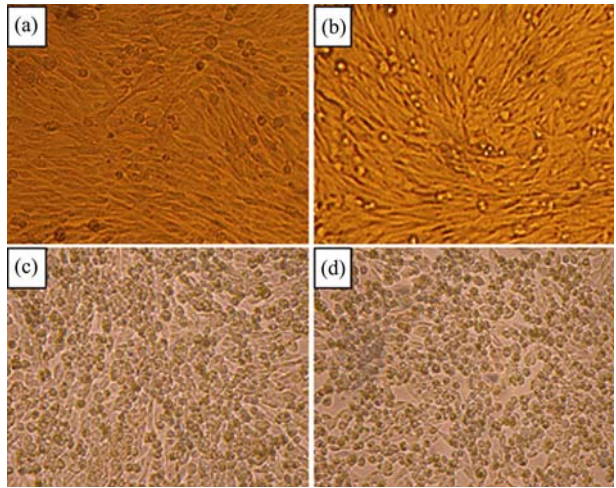


图 3 重组病毒感染 BHK-21 细胞后所引起的 CPE

(a) 正常的 BHK-21 细胞; (b) 仅转染 Lipofectamine 2000™ 试剂的 BHK-21 细胞; (c) pTA/FMDV 体外转录本转染的 BHK-21 细胞; (d) *Not* I 线化的 pCA/FMDV 与 pCT7RNAP 质粒共转染的 BHK-21 细胞

2.6 病毒生长曲线的绘制及其乳鼠毒力实验

为了比较重组病毒与野毒之间的动态生长特性, 制作病毒生长曲线, 结果如图 6 所示, pCA/FMDV 与 pCT7RNAP 质粒转染的重组病毒与野毒表现相似的致病力, 而 pTA/FMDV 体外转录本 RNA 拯救的重组病毒的病毒滴度较野毒偏弱. 乳鼠毒力实验结果表明, pCA/FMDV 体内转录制备的重组病毒的 LD₅₀ 为 10^{-7.5}, 野毒的 LD₅₀ 为 10^{-7.0}, 而 pTA/FMDV 体外转录获得的重组病毒的 LD₅₀ 仅为 10⁻⁶.

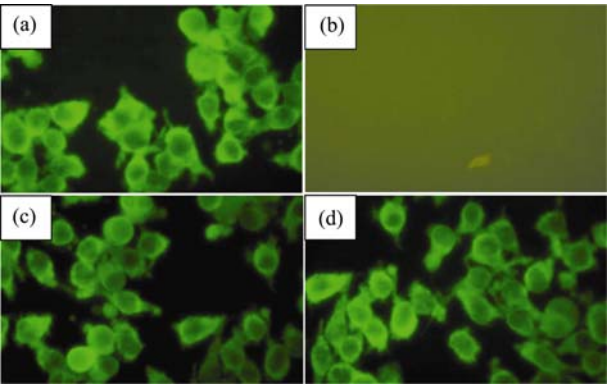


图 4 间接免疫荧光检测结果

(a) 野毒感染的 BHK-21 细胞(阳性对照); (b) 正常的 BHK-21 细胞; (c) pTA/FMDV 体外转录本转染的 BHK-21 细胞; (d) *Not* I 线化的 pCA/FMDV 与 pCT7RNAP 质粒共转染的 BHK-21 细胞

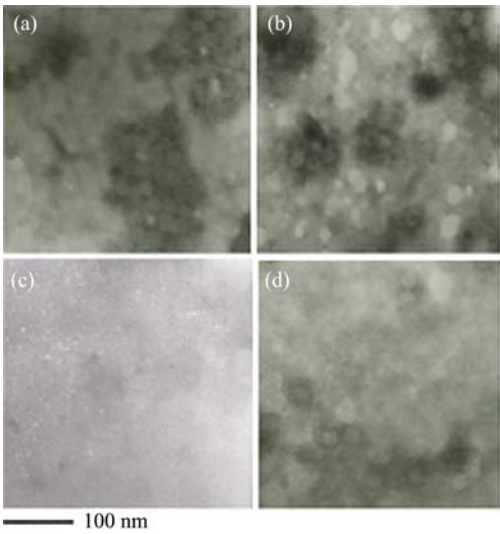


图 5 电子显微镜下的 FMDV 粒子(80000×)

(a) 阳性对照(野毒); (b) pCA/FMDV 重组病毒粒子; (c) 阴性对照; (d) pTA/FMDV 重组病毒粒子

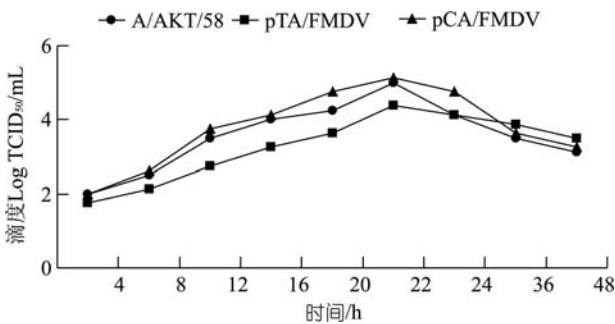


图 6 病毒生长曲线

病毒接种 BHK-21 细胞后, 分取 9 个时间点的样品, 测定病毒滴度(TCID₅₀)

3 讨论

通过体外合成和/或体内转录的方法构建感染性克隆, 对于研究 RNA 病毒的分子致病机制及其复制、确定毒力相关因子以及寻找抗病毒策略(如研制新型重组疫苗)等具有非常重要的意义[14,16,30-32,34-36]。Taniuchi 等人[37]利用反向遗传操作技术手段成功获得首例病原重组体模型——Qβ 噬菌体。尽管第一例动物 RNA 病毒感染性克隆——脊髓灰质炎病毒(poliovirus, 小 RNA 病毒科成员)[38]是通过体内转录的方法来完成的, 但在早期大量 RNA 病毒感染性克隆的构建还是依赖于大肠杆菌 RNA 聚合酶体外转录系统。如肝病毒(Hepatitis virus)[39]、肠道病毒(Enterovirus)[40,41]、鼻病毒(Rhinoviruses)[42]和心病毒(Cardioviruses)[30,43,44]等。Zibert 等人[16]构建了第一株 FMDV(O1K)感染性克隆, 随后 Rider 等人[15]和 Rensburg 等人[17]又成功构建了 FMDV A12 株和 ZIM/7/83 株(SAT 型)感染性克隆。通过构建的 FMDV 感染性克隆, 研究者阐明了如 poly(C)长度与 FMDV 毒力的关系[15]、3A 突变与病毒的宿主嗜性改变有关[24,25,27]以及 RGD 基序(motif)在病毒侵染宿主细胞过程中发挥重要作用[18,19]等问题。

然而, 在构建 FMDV 感染性克隆的过程中, 仍存在以下影响因素: (1) 点突变。在 RT-PCR 过程中, 由于反转录酶和 DNA 聚合酶的保真性不高导致点突变的频繁发生, 进而影响到转录本的感染性(多为致弱甚至无感染性)[45,46]。如 FMDV O1K 株 βG-βH 环中发生点突变会影响病毒与宿主细胞的吸附[16]。也有少数人为引入的点突变是为了鉴别全长 cDNA 与野

毒基因组。本实验, 为了对重组病毒进行相互区分并与野毒鉴别, 利用融合 PCR 技术在全长 cDNA 克隆中引入了点突变。(2) 足够长度的 poly(C)区段和 poly(A)尾巴。poly(C)位于 5' NCR 中, 长度约为 100~420 个 C 残基, 3' 端偶尔有 U 残基的掺入, 其精确的生物学功能还不清楚[47]。尽管目前对于 poly(C)区段的长度与 FMDV 的毒力是否有关仍无定论。但是, 人们一致认为要获得 FMDV 感染性克隆, poly(C)区段是必需的。由于 FMDV poly(C)区段形成了非常牢固的二级结构导致无法通过 RT-PCR 获得其真实序列, 但反转录过程是成功的。本实验通过融合 PCR 技术获得了 17 个 C, 发现该长度的 poly(C)对于 FMDV A/AKT/58 株感染性克隆是足够的。poly(A)尾巴可能在 FMDV 感染性中具有重要作用, 对于转录本来讲必须满足其最小阈值, 有报道[48]认为 poly(A)的长度与其感染性正相关。然而, 对 A 型 FMDV 来讲, poly(A)序列的长度少于 10 个碱基时病毒的感染性与具有大约 40 个 A 的 FMDV 感染性相同。本实验中, FMDV A/AKT/58 株全长 cDNA 中含有 21 个 A, 该重组病毒对 BHK-21 细胞和乳鼠均具有感染性。(3) 非病毒核苷酸的影响。基因组末端冗余核苷酸往往会对病毒转录本的感染性产生负效应[31]。一般认为全长转录本 5' 端冗余对感染性的影响较大, 即使只带有 1 到 2 个非病毒核苷酸, 转录本的感染性也会降低甚至丧失。然而, Zibert 等人[16]也有报道在 FMDV 的 5' 端带有很长的非病毒核苷酸对转录本的感染性无太大影响, 而且 Klump 等人[49]还发现在 B3 型柯萨奇病毒(coxsackievirus B3, CB3)的 5' 端带有两个额外残基(GG)甚至能增强病毒的感染性。相比之下, 病毒转录本 3' 端额外序列对感染性的影响较小, 即使 3' 端带有一段 30 个核苷酸的冗余序列仍具有感染性。本文所构建的两种感染性克隆中, pTA/FMDV 体外转录本的 5' 端带有 3 个额外核苷酸(GGG), pCA/FMDV 的 5' 端带有 8 个非病毒核苷酸, 两者在 3' 端均带有长达 12 个的非病毒核苷酸。实验结果表明, 该冗余并未对重组病毒的感染性产生太大的影响。(4) 体外转录本 RNA 的不均一性。不完全 RNA 转录本、完全 RNA 序列中的突变、合成 RNA 的降解等都会影响体

外 RNA 转录本的转染效率和重组病毒滴度. 这些不利因素对重组 FMDV 感染性的影响在本实验中也部分得到证实.

利用体内转录的方法来拯救重组 FMDV 可能更加高效、简便, 体内制备病毒的 RNA 转录本减少了 RNA 的降解, 不需要昂贵的体外转录试剂并避免了繁琐的操作, 简化了实验步骤. 已知一些动、植物病毒全长 cDNA 依赖载体辅助系统在体内完成转录过程, 并成功拯救出了感染性 RNA, 这些载体辅助系统包括 VV/T7, Vac/T7, FPV/T7, MAV/T7, Bac/T7 和 AAV/T7 系统, 依赖 pol 系统和依赖 pol 反向遗传系统等^[50-57]. 本实验结果表明, 与体外 RNA 转录本相比, 尽管 *Not* 线化的全长 cDNA 质粒在其 5 端带

有更多的非病毒核苷酸, 线化的 pCA/FMDV 与 pCT7RNAP 共转染 BHK-21 细胞后仍能获得感染性 FMDV, 而且该重组病毒对细胞和乳鼠的致病力较前者强约 10 倍. 由此看来, 通过建立表达 RNA 聚合酶 (包括 T7/SP6 RNA 聚合酶, pol 和 pol) 的 BHK-21 细胞系来完善反向遗传操作手段直接从全长 cDNA 拯救 FMDV 感染性克隆, 选择足够容纳量的转录/表达载体保证全长 cDNA 克隆在宿主菌中的稳定性, 以及在 FMDV RNA 转录本的 5 端和 3 端连接锤状核酶和丁型肝炎核酶, 来对病毒基因组末端的非病毒序列进行精确剪切, 都有助于提高 FMDV 感染性克隆的拯救效率. 该方法为未来研究 FMDV 的分子致病机制及其准确特性等提供良好的、更为有力的技术支持.

参考文献

- Sobrinho F, Domingo E. Foot-and-mouth Disease. London: Horizon Press, 2004. 1—18
- Thomson G R, Bastos A D S. Foot-and-mouth disease. In: Coetzer J A W, Tustin R C, eds. Infectious Diseases of Livestock. Cape Town: Oxford University Press, 2004. 1323—1365
- Rueckert R R. Picornaviridae and their replication. In: Fields B N, Knipe D M, eds. Fields Virology. New York: Raven Press, 1990. 507—548
- Rueckert, R R. Picornaviridae: the viruses and their replication. In: Fields B N, Knipe D M, Howley P M, eds. Fields Virology. New York: Raven Press, 1996. 609—654
- Grubman M, Baxt B. Foot-and-mouth disease. Clin Microbiol Rev, 2004, 17: 465—493^[DOI]
- Brown F, Newman J F E, Scott J, et al. Poly(C) in animal viral RNAs. Nature, 1974, 251: 342—344^[DOI]
- Mason P W, Bezborodova S V, Henry T M. Identification and characterization of a *cis*-acting replication element (cre) adjacent to the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus. J Virol, 2002, 76: 9686—9694^[DOI]
- Belsham G J, Brangwyn J K. A region of the 5' noncoding region of foot-and-mouth disease virus RNA directs efficient internal initiation of protein synthesis within cells: involvement with the role of L protease in translational control. J Virol, 1990, 64: 5389—5395
- Clarke B E, Brown A L, Currey K M, et al. Potential secondary and tertiary structure in the genomic RNA of foot-and-mouth disease virus. Nucleic Acid Res, 1987, 15: 7067—7079^[DOI]
- Kuhn R, Luz N, Beck E. Functional analysis of the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus. J Virol, 1990, 64: 4625—4631
- Newton S E, Carroll A R, Campbell R O, et al. The sequence of foot-and-mouth disease virus RNA to the 5' side of the poly(C) tract. Gene, 1985, 40: 331—336^[DOI]
- Mason P W, Grubman M J, Baxt B. Molecular basis of pathogenesis of FMDV. Virus Res, 2003, 91: 9—32^[DOI]
- Ryan M D, Belsham G J, King A M Q. Specificity of enzyme-substrate interactions in foot-and-mouth disease virus polyprotein processing. J Virol, 1989, 173: 35—45^[DOI]
- Liu G Q, Liu Z X, Xie Q G, et al. Generation of an infectious cDNA clone of an FMDV strain isolated from swine. Virus Res, 2004, 104: 157—164^[DOI]
- 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
- Zibert A, Maass G, Strebel K, et al. Infectious foot-and-mouth disease virus derived from a clone full-length cDNA. J Virol, 1990, 64: 2467—2473
- van Rensburg H G, Henry T M, Mason P W. 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: 61—68[DOI]
- 18 Leippert M, Beck E, Weiland F, et al. Point mutations with the beta G-beta H loop of foot-and-mouth virus O1K affect virus attachment to target cells. *J Virol*, 1997, 71: 1046—1051
- 19 Storey P, Theron J, Maree F F, 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: 184—192[DOI]
- 20 Piccone M E, Zellner M, Kumosinski T F, et al. Identification of the active-site residues of the L proteinase of foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 1995, 69: 4950—4956
- 21 Sá-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: 5115—5123
- 22 Baranowski E, Sevilla N, Verdager N, et al. Multiple virulence determinants of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J Virol*, 1998, 72: 6362—6372
- 23 Baranowski E, Molina N, Núñez J I, 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: 11290—11295[DOI]
- 24 Knowles N J, Davies P R, 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: 1551—1556[DOI]
- 25 Nunez J I, 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: 3977—3983 [DOI]
- 26 McNerney G M, King A M, Ross-Smith N, et al. Replication-competent foot-and-mouth disease virus RNAs lacking capsid coding sequences. *J Gen Virol*, 2000, 81: 1699—1702
- 27 Beard C W, Mason P W. Genetic determinants of altered virulence of Taiwanese foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 2000, 74: 987—991[DOI]
- 28 Domingo E, Biebricher C, Eigen M, et al. Quasispecies and RNA Virus Evolution: Principles and Consequences. Austin: Landes Bioscience, 2001, 173
- 29 Smith D B, McAllister J, Casino C, et al. Virus ‘quasispecies’: making a mountain out of a molehill? *J Gen Virol*, 1997, 78: 1511—1519
- 30 郑海学, 刘湘涛, 尚佑军, 等. 猪水泡病病毒 HK/70 株全长 cDNA 分子克隆感染性的鉴定. *科学通报*, 2006, 51(16): 1900—1905
- 31 刘光涛, 刘在新, 陈应理, 等. 口蹄疫病毒 OH/CHA/99 株全长基因组感染性克隆的构建. *科学通报*, 2004, 49(9): 42—46
- 32 Liu G Q, Liu Z X, Xie Q G, et al. Infectious foot-and-mouth disease virus derived from a cloned full-length cDNA of OH/CHA/99. *Chinese Sci Bull*, 2004, 49: 1137—1141[DOI]
- 33 Reed L J, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg*, 1938, 27: 493—497
- 34 van Gennip H G P, van Rijn P A, Widjoatmodjo M N, et al. Recovery of infectious classical swine fever virus (CSFV) from full-length genomic cDNA clones by a swine kidney cell line expressing bacteriophage T7 RNA polymerase. *J Virol Methods*, 1999, 78: 117—128[DOI]
- 35 Zimmermann A, Botta A, Arnold G, et al. The poly(C) region affects progression of encephalomyocarditis virus infection in Langerhans’ islets but not in the myocardium. *J Virol*, 1997, 71: 4145—4149
- 36 Osorio J E, Martin L R, Palmenberg A C. The immunogenic and pathogenic potential of short poly(C) tract Mengo viruses. *Virology*, 1996, 223: 344—350[DOI]
- 37 Taniguchi T, Palmieri M, Weissman C. Q β DNA-containing hybrid plasmids giving rise to Q β phage formation in the bacterial host. *Nature*, 1978, 274: 223—228[DOI]
- 38 Racaniello V R, Baltimore B. Cloned poliovirus complementary DNA is infectious cells. *Science*, 1981, 214: 916—919[DOI]
- 39 Cohen J I, Ticehurst J R, Feinstone S M, et al. Hepatitis A virus cDNA and its RNA transcripts are infectious in cell culture. *J Virol*, 1987, 61: 3035—3039
- 40 Kandolf R, Hofschneider P H. Molecular cloning of the genome of a cardiotropic coxsackie B3 virus: full-length reverse-transcribed recombinant cDNA generates infectious virus in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82: 4818—4822[DOI]
- 41 Martino T A, Tellier R, Petric M, et al. The complete consensus sequence of coxsackievirus B6 and generation of infectious clones by long RT-PCR. *Virus Res*, 1999, 64: 77—86[DOI]
- 42 Duechler M, Skern T, Blas D. Short communications: human rhinovirus serotype 2: *in vitro* synthesis of an infectious RNA. *Virology*,

- 1989, 168: 159—161[DOI]
- 43 Zimmermann A, Nelsen-Salz B, Kruppenbacher J P, et al. The complete nucleotide sequence and construction of an infectious cDNA clone of a highly virulent encephalomyocarditis virus. *Virology*, 1994, 203: 366—372[DOI]
- 44 Hahn H, Palmenberg A C. Encephalomyocarditis viruses with short poly(C) tracts are more virulent than their mengovirus counterparts. *J Virol*, 1995, 69: 2697—2699
- 45 Domingo E, Holland J J. Mutation rates and rapid Evolution of RNA viruses. In: Morse S S, eds. *Evolutionary Biology of Viruses*. New York: Raven Press, 1994. 161—184
- 46 Ramirez B C, Barbier P, Seron K, et al. Molecular mechanisms of point mutations in RNA Viruses. In: A Gibbs, C H Calisher, eds. *Molecular Basis of Viral Evolution*. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. 105—118
- 47 Deng G, Wu R. An improved procedure for utilizing terminal transferase to add homopolymers to the 3' termini of DNA. *Nucleic Acids Res*, 1981, 9: 4173—4188[DOI]
- 48 Grubman M J, Baxt B, Bachrach H L. Foot-and-mouth disease virion RNA: studies on the relation between the length of its 3'-poly(A) segment and infectivity. *Virology*, 1979, 97: 22—31[DOI]
- 49 Klump W M, Bergmann I, Müller B C, et al. Complete nucleotide sequence of infectious coxsackievirus B3 cDNA: two initial 5' uridine residues are regained during plus-strand RNA synthesis. *J Virol*, 1990, 64: 1573—1583
- 50 Garcin D, Pelet T, Calain P, et al. A highly recombinogenic system for the recovery of infectious *Sendai paramyxovirus* from cDNA: generation of a novel copy-back nondefective interfering virus. *EMBO J*, 1995, 14: 6087—6094
- 51 Fuerst T R, Niles E G, Studier F W, et al. Eukaryotic transient expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 8122—8126[DOI]
- 52 Britton P, Green P, Kottier S, et al. Expression of bacteriophage T7 RNA polymerase in avian and mammalian cells by a recombinant fowlpox virus. *J Gen Virol*, 1996, 77: 963—967[DOI]
- 53 Schnell M J, Mebatsion T, Conzelmann K K. Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *EMBO J*, 1994, 13: 4195—4203
- 54 Yap C C, Ishii K, Aoki Y, et al. A hybrid baculovirus-T7 RNA polymerase system for recovery of an infectious virus from cDNA. *Virology*, 1997, 231: 192—200[DOI]
- 55 Dubensky T W Jr, Driver D A, Polo J M. Sindbis virus DNA-based expression vectors: utility for *in vitro* and *in vivo* gene transfer. *J Virol*, 1996, 70: 508—519
- 56 Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, et al. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 6108—6113[DOI]
- 57 Qi X L, Gao Y L, Gao H L, et al. An improved method for infectious bursal disease virus rescue using RNA polymerase II system. *J Virol Meth*, 2007, 142: 81—88[DOI]