RDD 基序对口蹄疫 Asia1 型毒株感染力的影响

郑海学*, 郭建宏*, 靳野, 尚佑军, 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, 兰州 730046

* 同等贡献

† 联系人, E-mail: hnxiaogao@hotmail.com

2009-10-26 收稿, 2009-12-24 接受

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

摘要 不同型口蹄疫病毒 1D 蛋白的 β G 和 β H 链之间都含有一个高度保守的 RGD 基序, 其结合细胞受体, 起始病毒感染. 但本文通过对 Asia1 型 FMDV 的 1D 序列分析证实, 田间毒株含有 RGD 和 RDD 基序(RGD 中的 G 突变为 D)的两种类型毒株. 通过反向遗传技术制备了分别含有 RGD 和 RDD 基序的两种病毒, 测定其生物学特性, 并通过细胞感染力和乳鼠致病力比较这两种病毒感染力的差别. 结果表明, 含有 RGD 和 RDD 的毒株都具有感染性, 含有 RDD 毒株的细胞感染力和乳鼠致病力比含 RGD 的高 10 倍左右, 为进一步阐明 RDD 基序 Asia1 毒株的感染机制的分子基础奠定必要的基础.

关键词

口蹄疫病毒
RGD
整联蛋白
细胞结合位点
反向遗传学

口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus)属于微 RNA 病毒科(Picornaviridae)口蹄疫病毒属(*Aphthovirus*)的单股正链 RNA 病毒, 包括 7 个型(O, A, C, Asia1, SAT1, SAT2 和 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]. 口蹄疫病毒颗粒由衣壳、非结构蛋白和基因组 RNA 构成, 其中衣壳由结构蛋白 VP1, VP2, VP3 和 VP4 各 60 个分子组成. 结构蛋白 VP1 暴露在病毒颗粒的表面, 在其 β G 和 β H 链之间含有一个高度易变的环(G-H 环), 该环上不仅含有病毒主要的抗原位点, 而且含有一个高度保守的精氨酸-甘氨酸-天门冬氨酸(arginine-glycine-aspartic acid, RGD)基序^[4-6]. 实验证明, RGD 基序是病毒粒子与细胞表面整联蛋白超级家族的受体结合, 是起始感染的主要结合位点^[7-9]. 随后, 研究证明, FMDV 的 RGD 基序主要利用 $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_1$ 和 $\alpha_v\beta_8$ 整联蛋白进行起始病毒感染^[10-13], 这些途径称为 RGD 依赖性整联蛋白途径(RGD-dependant integrin-mediated pathways). 然而, FMDV 也能够通过非 RGD 依赖性整联蛋白途径进入

细胞^[14,15]. Jackson 等人^[16]和 Sa-Carvalho 等人^[17]通过实验证明, 组织培养适应毒株也能够利用细胞表面的硫酸乙酰肝素(heparan sulfate, HS)进入细胞. 反向遗传学证明, FMDV 可以既不利用整联蛋白途径, 也不利用 HS 途径, 而利用一种未被鉴定的第 3 途径进入细胞^[18-20]. 这表明 FMDV 可能利用另外一种受体或机制进入细胞, 需全面而深入的研究.

上述研究集中在 O 和 A 型 FMDV 毒株上, 而其他型口蹄疫病毒与细胞相互作用和感染机制的研究仍然空白. 2005~2006 年, 中国发生 Asia1 型 FMD, 不仅对牛羊具有严重的致病性, 而且还对猪具有自然感染和致死性的罕见现象. 研究发现, 田间毒株不仅有 RGD 基序的毒株, 还有 RDD 基序(RGD 中的 G 突变为 D)的毒株, 之前未见这种 RDD 突变株. 为了阐明这种突变对毒株有何影响, 本研究利用 Asia1 型 FMDV 反向遗传系统, 分别构建能够编码 RGD 和 RDD 的全长 cDNA, 然后拯救出对应病毒并测定生物学特性, 比较这两种毒株的感染性差异, 以证实田间 RGD 和 RDD 毒株是否具有感染性并分析 RDD 基

英文引用格式: Zheng H X, Guo J H, Jin Y, et al. Infectivity of Asia1 type foot-and-mouth disease virus was increased via an alternative RDD motif (in Chinese). Chinese Sci Bull (Chinese Ver), 2010, 55:1370—1375, doi: 10.1360/972009-2254

序对感染力的影响. 本研究为进一步阐明含有 RDD 的与哪些受体或细胞因子作用行使功能以及 Asia1 毒株的致病机制研究提供研究材料, 也为进一步分析口蹄疫病毒感染噬性变异的机制奠定基础.

1 材料与方法

(i) 菌株、质粒与细胞. 2~3 日龄乳鼠购自兰州兽医研究所动物厂; BHK-21 细胞和 FMDV Asia1 株由国家口蹄疫参考实验室保存, 其中 FMDV 是 2006 年在河南省一猪场的猪体分离的毒株. 含有 pol I 和 pol II 启动子载体为基础的高效拯救系统 pPlcF-Asia1TI(图 1)为本室构建. 大肠杆菌 JM109 为 Promega 公司产品.

(ii) 酶与试剂. RNeasy Mini kit 购自 QIAGEN 公司; 所用限制性内切酶均购自 Promega 公司; DNA 连接试剂盒、DNA 回收试剂盒、质粒提取试剂盒、Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒均采用 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购自 Hyclone 公司.

(iii) 含 RGD 和 RDD 基序全长 cDNA 的构建. 从质粒 pPlcFAsia1TI 为框架, 通过 *Nsi* I 和 *Sac* II 限制性内切酶, 把从田间毒株基因株扩增而获得含有 RDD 的片段替换进该质粒. 由于替换片段的氨基酸仅仅 RGD 与 RDD 不同, 因此获得了仅 RGD 和 RDD 基序不同的全长 cDNA, 把重组的质粒分别命名为 prRGD-Asia1 和 prRDD-Asia1(图 1). 用 *Not* I 酶切, 对重组质粒进行序列测定.

(iv) 在 BHK-21 细胞内的病毒拯救. (1) 转染 BHK-21 细胞. 按照脂质体 Lipfection 2000 转染操作说明进行实验. 在 BHK-21 细胞生长至 70%~90%时, 用 OPTI-MEMI 培养基清洗细胞, 在以 10 μ L 脂质体 Lipfection 2000 的介导下将 4 μ g 的 prRGD-Asia1 和

prRDD-Asia1 转染 BHK-21, 在含有 5% CO₂ 的培养箱中, 于 37℃ 孵育 4 h 后用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 更换转染培养基. 继续培养, 观察细胞病变的出现情况, 待细胞出现 90% 左右病变时收获病毒. 冻融 3 次后再次接种 BHK-21 细胞, 直到病毒能稳定地产生细胞病变效应(CPE), 得到的毒性分别命名为 rRGD-Asia1 和 rRDD-Asia1.

(2) 拯救病毒的鉴定. ① RT-PCR 法检测病毒基因组以及对 RGD 和 RDD 稳定性的检测. 用 RNeasy Mini Kit 提取第 4, 6, 8 和 10 代的 rRGD-Asia1 和 rRDD-Asia1 病毒 RNA, 对 vp1 区利用引物对(5'-GCG CTGGCAAAGACTTTGA-3'和 5'-GACATGTCCTCC TGCATCTGGTTGA-3')进行 PCR, 并对扩增产物的序列进行测定. 正常细胞提取的 RNA 进行 RT-PCR, 作为阴性对照组, 并通过序列比较分析 RGD 和 RDD 是否稳定存在. ② 间接免疫荧光检测病毒抗原. 收取载有转染细胞的载玻片, 用 PBS 缓冲液漂洗 1~2 次, -20℃ 冷丙酮固定 30 min, 漂洗后吸净残液, 滴加 FMDV 兔阳性血清, 37℃ 湿盒中孵育 30 min, 再用 PBS 漂洗 5 次, 加 FITC 羊抗兔 IgG, 于 37℃ 湿盒中孵育 30 min, 用 70% 甘油封片于 Olympus 荧光显微镜下观察并拍照.

(3) 乳鼠致病力实验. 将 rRGD-Asia1 和 rRDD-Asia1 细胞培养液分别用 PBS 缓冲液 10 $\times$ 系列稀释, 分别取 10⁻⁵~10⁻⁹ 稀释的病毒液经皮下接种 2~4 日龄乳鼠, 按照 Read-Muench 法要求, 每个稀释度接种 4 只, 每只老鼠接种剂量为 0.2 mL. 空白对照组 4 只乳鼠只接种 PBS 缓冲液, 观察乳鼠死亡情况并记录, 用 Read-Muench 法统计并计算 LD₅₀.

(4) BHK-21 细胞感染力实验. 按照常规方法对 BHK-21 细胞进行消化, 加入含 10% 胎牛血清的 MEM 细胞培养基, 分装于 28 个 2 mL 细胞培养瓶中于 37℃

图 1 构建 prRGD-Asia1 和 prRDD-Asia1 示意图

pPlcFAsia1TI 为 Asia1 拯救系统, 含有聚合酶 I 启动子(pol I)和终止子(T I)序列、聚合酶 II 启动子(pol II)和终止子(T II)序列以及两端嵌合有榔头锤酶(hammerhead ribozyme, HamRz)和戊型肝炎酶(hepatitis delta ribozyme, Hdvrz)的核心序列

含有 5% CO₂ 的培养箱中培养,待细胞单层长到 90% 时备用.用 MEM 10×稀释病毒液,将各稀释度 ($10^{-3.0} \sim 10^{-8.0}$) 的病毒液分别加入 2 mL 细胞培养瓶,每个稀释度 4 瓶,按 10% 接毒后 37℃ 保温 1 h,用不含血清的 MEM 清洗细胞 2~3 次,加入不含血清的 MEM,放入 37℃ 含有 5% CO₂ 的培养箱中进行培养并观察 3 d.用 Read-Muench 氏法对 TCID₅₀ 进行测定.

2 结果

2.1 RGD 和 RDD 基序全长 cDNA 的构建与病毒拯救

(i) RGD 和 RDD 基序全长 cDNA 的构建.对重组质粒 prRGD-Asia1 和 prRDD-Asia1 进行 *Not* I 酶切鉴定出现了约 15.2 kb 目的条带(图 2).对插入片段进行测序表明,插入了含有 RGD 和 RDD 的片段,符合预期目的.

(ii) 含有 RGD 和 RDD 基序病毒的拯救.转染 BHK-21 细胞 48 h 后, rRGD-Asia1 和 rRDD-Asia1 感染细胞出现 CPE 现象,细胞变圆,成葡萄状分布,最终细胞崩解成碎片(图 3(a)和(b)).将细胞培养物连

续传代,细胞病变出现的时间缩短,病变更加典型,出现明显的 CPE 现象.对照细胞单层完整,形态规则,轮廓清晰(图 3(c)).

2.2 拯救病毒的鉴定

(i) 拯救病毒的 RT-PCR 鉴定及稳定性分析.用 Vp1 引物进行 PCR,成功扩增出了约 810 bp 的预期条带(图 4).序列测定表明, rRDD-Asia1 病毒含有 RDD 基序, rRDD-Asia1 病毒含有 RGD 基序,这两种病毒的其他基因氨基酸序列相同.阴性对照组没有扩增出目的条带.通过这两种病毒的第 4, 6, 8 和 10 代序列测定表明, RDD 和 RGD 能够稳定存在.

(ii) 免疫荧光检测结果.将 rRGD-Asia1 和 rRDD-Asia1 感染的细胞及未经转染的 BHK-21 细胞用免疫荧光染色,在免疫荧光显微镜下可见用 rRGD-Asia1 和 rRDD-Asia1 感染的 BHK-21 细胞中有特异荧光产生(图 5(a)和(b));而未转染的空白细胞中没有特异荧光出现(图 5(c)).

2.3 拯救病毒的致病性

(i) 乳鼠致病力(LD₅₀)实验结果.皮下接种的乳鼠,20 h 后开始发病,但症状不典型,24 h 后,乳鼠运动不灵活,用镊子夹尾巴和四肢其反应迟钝,叫声嘶哑;48 h 乳鼠出现四肢和尾巴僵直、呼吸困难等症状,72 h 接种的乳鼠全部死亡,而对照组乳鼠很健康,说明在细胞中拯救出的病毒对乳鼠有致病性.用 Read-Muench 氏法测得 rRGD-Asia1 的 LD₅₀ 为 $10^{-5.8}/0.2$ mL, rRDD-Asia1 的 LD₅₀ 为 $10^{-6.9}/0.2$ mL,接种亲本毒株的对照组 LD₅₀ 为 $10^{-7.5}/0.2$ mL.

(ii) TCID₅₀ 测定结果. rRGD-Asia1 和 rRDD-Asia 接种细胞后的病变能够时间稳定在 9~10 h.把该毒株进行 TCID₅₀ 实验,空白对照组 BHK-21 细胞培养 24 h 长满 96 孔细胞培养板,符合实验要求.实验

图 2 含有全长 cDNA 重组质粒 *Not* I 单酶切电泳结果
1 和 2, 质粒 prRDD-Asia1 *Not* I 单酶切电泳结果; 3 和 4, 质粒 prRGD-Asia1 *Not* I 单酶切电泳结果. M, λ -EcoT14 I 标准(TaKaRa)

图 3 转染 BHK-21 细胞所产生的 CPE
(a) rRGD-Asia1 感染的 BHK-21 细胞; (b) rRDD-Asia1 感染的 BHK-21 细胞; (c) 正常 BHK 细胞

图4 RT-PCR 鉴定电泳结果

1, rRGD-Asia1; 2, rRDD-Asia1; 3, 阴性对照. M, 100 bp 分子量标准 (TaKaRa)

组培养到 4 h, 各稀释度的细胞大部分出现病变, 培养到 9~14 h 细胞全部脱落. 用 Read-Muench 氏法进行计算, rRGD-Asia1 的 $TCID_{50}$ 为 $10^{-7.0}/0.2$ mL, rRDD-Asia1 的 $TCID_{50}$ 为 $10^{-7.9}/0.2$ mL, 亲本毒株的 $TCID_{50}$ 为 $10^{-8.2}/0.2$ mL.

3 讨论

应用反向遗传学技术是研究 RNA 病毒分子致病机制的有效途径之一^[21], 目前已有许多 RNA 病毒在体外获得了拯救^[22,23]. O 型 FMDV 的体外拯救是 1990 年由 Zibert 等人^[24]首次完成的, 随后美国的 Rieder 等人^[25]也完成了 A 型 FMDV 的体外拯救. 以此技术为平台, FMDV 研究的各个领域有了飞速发展. 而我国在 FMDV 致病分子机制研究等方面一直落后于国外, 很大程度上就是由于我国没有建立这样一个技术平台. 2004 年, Liu 等人^[26]建立了 O 型口蹄疫病毒的体外转录拯救方法, 阐述分析了体外病毒具有许多缺点导致该方法拯救效率低, 这也是体外方法成为深入研究该病毒的“瓶颈”. 本研究首次利用聚合酶 I 和 II 系统建立了 FMDV 体内拯救方法, 直接转

染质粒, 能够快速(在第 4~6 代)获得病变稳定的病毒, 把反向遗传拯救技术简化成一步快速稳定的方法. 为利用该技术深入研究 FMDV 的基因功能、致病机制、研制高效疫苗等提供了很好的操作平台.

口蹄疫病毒的 RGD 基序与细胞整联蛋白相互作用是病毒感染细胞的第一步, 对 RGD 功能及与细胞相互作用具有重要意义. 本研究分离的 Asia1 型毒株具有 RGD 和 RDD 两种形式, 是首次报道具有 RDD 的毒株, 但仍然不清楚 RDD 是否具有类似 RGD 的功能, 还是 RGD 的一种“准种”形式. 查明 RDD 在起始病毒感染的作用及其对不同宿主的致病性, 对揭示 Asia1 型口蹄疫致病机制具有重要意义. 利用建立的 Asia1 高效拯救系统, 通过基因重组的方法, 构建了含 RGD 和 RDD 的全长 cDNA, 在 BHK-21 细胞中拯救出含有 RGD 和 RDD 的病毒, 通过测序表明不同代次病毒的 RGD 和 RDD 稳定存在. 通过对细胞感染力和乳鼠的致病力实验比较发现, 含有 RDD 比含有 RGD 的毒株感染力和致病力较强, 除了实验系统误差外, 这一差异可能是由于 RDD 决定的, 因为除了这一差异外, 其他基因组完全一样, 说明仅仅是 G 变为 D 导致了病毒毒力增强, 这一现象值得关注. 噬斑形成实验的结果也证明了这一点, 含有 RDD 的毒株形成的噬斑比含 RGD 毒株的大. 本研究所利用细胞不表达 HS 的 BHK-21 细胞进行拯救病毒, 口蹄疫病毒无法通过 HS 途径进行感染, 在该细胞内拯救出病毒表明尽管 G-H 环高度异变, 而 RGD 基序是很保守. Asia1 型 FMDV 能够利用 RGD 基序启动感染, 也可以利用 RDD 基序代替 RGD 进行感染. 含有 RDD 的病毒是利用整联蛋白还是利用未知的第三途径启动感染, 是下一步研究要解决的问题. 但也有部分 RGD 突变的毒株, 它们是含 SGD 的 O/Akesu/58 和 A10/61 以及 A24Cru 毒株^[27-29], 含 RGE 的 Asia1/2ISRL/63 毒株, 含 HGD

图5 免疫荧光检测结果

(a) rRGD-Asia1 感染的 BHK-21 细胞; (b) rRDD-Asia1 感染的 BHK-21 细胞; (c) 正常 BHK-21 细胞

的 Asia1/3kimron/63 毒株 A27Colo- mbia/67(PGD)等无 RGD 基序的 12 株口蹄疫病毒^[30]. 这些突变带来一些病毒表型的变化, 但这些突变受体识别位点的功能以及对病毒有何影响的研究很少. Rieder 等人^[29]通过细胞传代和噬斑筛选出含有 SGD 的 A 型 A24Cru 毒株, 通过反向遗传学方法对该突变位点进行分析, 证明了 SGD 主要利用 $\alpha_v\beta_6$ 介导 FMDV 感染, 而正常含有 RGD 的 A 型病毒主要利用 $\alpha_v\beta_1$ 和 $\alpha_v\beta_3$, 效率比 $\alpha_v\beta_6$ 高. 而含有 RGD 的 O 型毒株主要是利用 $\alpha_v\beta_6$ 介导 FMDV 感染^[31]. Asia1 型口蹄疫所用哪种整联蛋白需要证实, 这为揭示各型口蹄疫病毒感染差异以及病毒宿主变异的分子基础提供了很好基础. 通过反向遗传学技术已经证明, 有些 FMD 毒株可以既不利用整联蛋白途径, 也不利用 HS 途径, 而利用一种未被鉴定的第 3 途径进入细胞^[19,20,31]. 本研究中, 如果

RDD 基序不利用整联蛋白感染细胞, 暗示 Asia1 型 FMDV 利用第三途径进行感染. 一般认为, 尽管有其他的受体途径可供选择, 口蹄疫病毒自然感染的宿主特异性还是由特异的整联蛋白决定的, 但决定口蹄疫病毒易感性的机制仍不清楚.

总之, 本研究通过建立高效反向遗传系统, 首次证实含有 RGD 和 RDD 基序的毒株都具有感染性, 含有 RDD 的毒株感染力比含有 RGD 的毒株的高 10 倍左右, 表明 Asia1 型 FMDV 存在 RGD 至 RDD 基序的变异, 并发现 RDD 基序可提高毒株的毒力, 值得关注. 本研究为进一步分析 Asia1 型口蹄疫受体识别位点与细胞相互作用奠定了基础, 进而可能揭示该毒株自然感染噬性变异现象的分子基础. 该研究也为揭示 Asia1 型口蹄疫可能利用第三途径提供必要的素材.

参考文献

- 1 Grubman M J, Baxt B. Foot-and-mouth disease. Clin Microbiol Rev, 2004, 17: 465—493
- 2 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
- 3 Thomson G R, Vosloo W, Bastos A D. Foot and mouth disease in wildlife. Virus Res, 2003, 91: 145—161
- 4 Acharya R, Fry E, Stuart D, et al. The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. Nature, 1989, 337: 709—716
- 5 Logan D, Abu-Ghazaleh R, Blakemore W, et al. Structure of a major immunogenic site on foot-and-mouth disease virus. Nature, 1993, 362: 566—568
- 6 Mateu M G, Camarero J A, Giralt E, et al. Direct evaluation of the immunodominance of a major antigenic site of foot-and-mouth disease virus in a natural host. Virology, 1995, 206: 298—306
- 7 D'Souza S E, Ginsberg M H, Plow E F. Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): A cell adhesion motif. Trends Biochem Sci, 1991, 16: 246—250
- 8 Fox G, Parry N R, Barnett P V, et al. The cell attachment site on foot-and-mouth disease virus includes the amino acid sequence RGD (arginine-glycine-aspartic acid). J Gen Virol, 1989, 70: 625—637
- 9 Mason P W, Rieder E, Baxt B. RGD sequence of foot-and-mouth disease virus is essential for infecting cells via the natural receptor but can be bypassed by an antibody-dependent enhancement pathway. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 1932—1936
- 10 Berinstein A, Roivainen M, Hovi T, et al. Antibodies to the vitronectin receptor (integrin $\alpha_v\beta_3$) inhibit binding and infection of foot-and-mouth disease virus to cultured cells. J Virol, 1995, 69: 2664—2666
- 11 Jackson T, Clark S, Berryman S, et al. Integrin $\alpha_v\beta_8$ functions as a receptor for foot-and-mouth disease virus: Role of the beta-chain cytodomain in integrin-mediated infection. J Virol, 2004, 78: 4533—4540
- 12 Jackson T, Mould A P, Sheppard D, et al. Integrin $\alpha_v\beta_1$ is a receptor for foot-and-mouth disease virus. J Virol, 2002, 76: 935—941
- 13 Jackson T, Sheppard D, Denyer M, et al. The epithelial integrin $\alpha_v\beta_6$ is a receptor for foot-and-mouth disease virus. J Virol, 2000, 74: 4949—4956
- 14 Baxt B, Mason P W. Foot-and-mouth disease virus undergoes restricted replication in macrophage cell cultures following Fc receptor-mediated adsorption. Virology, 1995, 207: 503—509
- 15 Mason P W, Baxt B, Brown F, et al. Antibody-complexed foot-and-mouth disease virus, but not poliovirus, can infect normally insusceptible cells via the Fc receptor. Virology, 1993, 192: 568—577
- 16 Jackson T, Ellard F M, Ghazaleh R A, et al. Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. J Virol, 1996, 70: 5282—5287
- 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: 5115—5123

- 18 Baranowski E, Ruiz-Jarabo C M, Sevilla N, et al. Cell recognition by foot-and-mouth disease virus that lacks the RGD integrin-binding motif: Flexibility in aphthovirus receptor usage. *J Virol*, 2000, 74: 1641—1647
- 19 Martinez M A, Verdager N, Mateu M G, et al. Evolution subverting essentiality: Dispensability of the cell attachment Arg-Gly-Asp motif in multiply passaged foot-and-mouth disease virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 6798—6802
- 20 Zhao Q, Pacheco J M, Mason P W. 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: 3269—3280
- 21 Racaniello V R, Baltimore D. Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science*, 1981, 214: 916—919
- 22 Bridgen A, Elliott R M. Rescue of a segmented negative-strand RNA virus entirely from cloned complementary DNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 15400—15404
- 23 Sumiyoshi H, Hoke C H, Trent D W. Infectious Japanese encephalitis virus RNA can be synthesized from in vitro-ligated cDNA templates. *J Virol*, 1992, 66: 5425—5431
- 24 Zibert A, Maass G, Strebel K, et al. Infectious foot-and-mouth disease virus derived from a cloned full-length cDNA. *J Virol*, 1990, 64: 2467—2473
- 25 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
- 26 Liu G, Liu Z, Xie Q, et al. Generation of an infectious cDNA clone of an FMDV strain isolated from swine. *Virus Res*, 2004, 104: 157—164
- 27 Carroll A R, Rowlands D J, Clarke B E. The complete nucleotide sequence of the RNA coding for the primary translation product of foot and mouth disease virus. *Nucleic Acids Res*, 1984, 12: 2461—2472
- 28 Li D, Liu Z X, Bao H F, et al. The complete genome sequence of foot-and-mouth disease virus O/Akesu/58 strain and its some molecular characteristics. *Arch Virol*, 2007, 152: 2079—2085
- 29 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: 12989—12998
- 30 Carrillo C, Tulman E R, Delhon G, et al. Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 2005, 79: 6487—6504
- 31 Burman A, Clark S, Abrescia N G, et al. Specificity of the VP1 GH loop of Foot-and-Mouth Disease virus for alphav integrins. *J Virol*, 2006, 80: 9798—9810

Infectivity of Asia1 type foot-and-mouth disease virus was increased via an alternative RDD motif

ZHENG HaiXue, GUO JianHong, JIN Ye, SHANG YouJun, TIAN Hong, YANG YaMin, LIU XiangTao & CAI XuePeng

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 730046, China

The amino acid sequence motif Arg-Gly-Asp (RGD), located in the surface-exposed β G- β H loop of the 1D protein of different serotypes and subtypes of foot-and-mouth disease virus (FMDV), is highly conserved and participates in binding of FMDV to susceptible cells. Previous sequence analyses of the 1D-encoding region of a FMDV serotype Asia1 field isolates from China indicated the presence of an alternative RDD motif instead of the conserved β G- β H loop RGD. The role of the RGD and RDD sequences in virus infection was investigated by recovering viruses with the β G- β H loop RGD (named rRGD-Asia1) and a RDD tripeptide (named rRDD-Asia1), respectively, using a genome-length infectious chimeric cDNA clone. The results show that the infectivity of the rRDD-Asia1 virus for baby hamster kidney cells (BHK-21) and baby hamsters was higher as 10 times. These results also demonstrate that field isolates with RGD and an alternative RDD receptor recognition site have infectivity, and RDD motif can increase the infectivity of the viruses. The study lays a foundation for further study of the existence of other receptor molecules and alternative mechanisms for FMDV entry into cells.

FMDV, RGD, integrin, cell binding site, reverse genetics

doi: 10.1360/972009-2254