



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108085302 B

(45)授权公告日 2020.02.14

(21)申请号 201711093774.3

(22)申请日 2017.11.08

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108085302 A

(43)申请公布日 2018.05.29

(66)本国优先权数据
201611047932.7 2016.11.21 CN

(83)生物保藏信息
CGMCC NO.13148 2016.10.26
CGMCC NO.13149 2016.10.26
CGMCC NO.13150 2016.10.26

(73)专利权人 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所
地址 150069 黑龙江省哈尔滨市香坊区哈平路678号

(72)发明人 于力 杨德成 王海伟 周国辉

(74)专利代理机构 北京思元知识产权代理事务所(普通合伙) 11598

代理人 余光军

(51)Int.Cl.

C12N 7/04(2006.01)

A61K 39/135(2006.01)

A61P 31/14(2006.01)

(56)对比文件

CN 101838658 A,2010.09.22,

CN 103849637 A,2014.06.11,

高荣远等. IRES元件决定口蹄疫病毒细胞嗜性及其分子机制研究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库》.2014,(第11期),

Roberto Mateo等.Engineering Viable Foot-and-Mouth Disease Viruses with Increased Thermostability as a Step in the Development of Improved Vaccines.《JOURNAL OF VIROLOGY》.2008,第82卷(第24期),

审查员 王启扬

权利要求书1页 说明书16页
序列表2页 附图7页

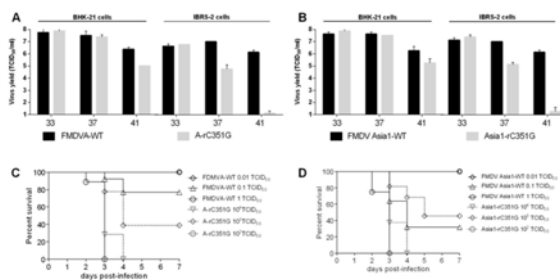
(54)发明名称

口蹄疫病毒温度敏感减毒株及其构建方法和用途

(57)摘要

本发明公开了口蹄疫病毒温度敏感减毒株及其构建方法和用途。本发明发现,FMDV IRES结构域4的K区环上的一个胞嘧啶突变为鸟嘌呤或腺嘌呤可获得温度敏感减毒株,该突变株具有高度的遗传稳定性,接种猪能够诱导产生高水平的O型FMDV中和抗体、并能够完全抵抗当前优势流行的O型不同基因型FMDV异源毒株的攻击,而且具有良好的安全性。本发明还发现,IRES C351是所有血清型FMDV毒株温度敏感减毒表型的分子决定因素。本发明提供的口蹄疫病毒温度敏感减毒突变株及其全长cDNA感染性克隆、IRES突变体或嵌合IRES序列,可用于制备口蹄疫减毒活疫苗、作为口蹄疫灭活疫苗生产用种毒、或用于制

备口蹄疫RNA疫苗。



CN 108085302 B

1. 一种口蹄疫病毒 (Foot and Mouth Disease Virus) 温度敏感减毒株的构建方法, 包括: 构建口蹄疫病毒全长cDNA感染性克隆质粒, 经体外转录得到口蹄疫病毒基因组RNA, 将口蹄疫病毒基因组RNA转染细胞并进行病毒的拯救; 其特征在于: 所述体外转录得到的口蹄疫病毒基因组RNA的IRES结构域4的K区环上的351位的胞嘧啶突变为鸟嘌呤或腺嘌呤, 突变后K区环的碱基序列为³⁵¹GUUUAA³⁵⁶或³⁵¹AUUUAA³⁵⁶。

2. 按照权利要求1所述构建方法得到的口蹄疫病毒温度敏感减毒株, 其特征在于: 用于拯救该温度敏感减毒株的全长cDNA感染性克隆质粒的微生物保藏编号是: CGMCC NO.13148。

3. 权利要求2所述的口蹄疫病毒温度敏感减毒株含有的IRES突变体, 其特征在于: 其核苷酸序列为SEQ ID No.1所示。

4. 微生物保藏编号是CGMCC NO.13149的全长cDNA感染性克隆质粒经拯救后在构建口蹄疫病毒温度敏感减毒株中的用途。

5. 以牛鼻病毒基因组的IRES结构域4置换口蹄疫病毒基因组的IRES结构域4所得到的嵌合IRES序列在构建口蹄疫病毒温度敏感减毒株中的用途, 所述嵌合IRES序列的核苷酸序列为SEQ ID No.2所示。

6. 一种口蹄疫病毒温度敏感减毒株的构建方法, 包括: 构建口蹄疫病毒全长cDNA感染性克隆质粒, 经体外转录得到口蹄疫病毒基因组RNA, 将口蹄疫病毒基因组RNA转染细胞并进行病毒的拯救; 其特征在于: 将经体外转录得到口蹄疫病毒基因组RNA的IRES结构域4的K区用牛鼻病毒基因组RNA的IRES结构域4的K区进行了替换。

7. 按照权利要求6所述构建方法得到的口蹄疫病毒温度敏感减毒株, 其特征在于: 用于拯救该口蹄疫病毒温度敏感减毒株的全长cDNA感染性克隆质粒的微生物保藏编号是: CGMCC NO.13150。

8. 将口蹄疫病毒基因组的IRES结构域4的K区用牛鼻病毒基因组的IRES结构域4的K区进行替换得到的嵌合IRES序列, 其特征在于: 其核苷酸序列为SEQ ID No.3所示。

9. 权利要求3所述的IRES突变体在制备口蹄疫减毒活疫苗中的用途、权利要求3所述的IRES突变体在制备口蹄疫RNA疫苗中的用途、或权利要求3所述的IRES突变体在制备口蹄疫灭活疫苗生产用种毒的用途; 权利要求8所述的嵌合IRES序列在制备口蹄疫减毒活疫苗中的用途; 权利要求8所述的嵌合IRES序列在制备口蹄疫RNA疫苗中的用途、或者权利要求8所述的嵌合IRES序列在制备口蹄疫灭活疫苗生产用种毒的用途。

10. 权利要求2或7所述的口蹄疫病毒温度敏感减毒株的全长cDNA感染性克隆在构建口蹄疫RNA疫苗中的用途; 或者, 权利要求2或7所述的口蹄疫病毒温度敏感减毒株的全长cDNA感染性克隆经拯救后制备口蹄疫减毒活疫苗中的用途; 或者权利要求2或7所述的口蹄疫病毒温度敏感减毒株的全长cDNA感染性克隆经拯救后制备口蹄疫灭活疫苗生产用种毒的用途。

11. 权利要求2或7所述的口蹄疫病毒温度敏感减毒株在制备口蹄疫减毒活疫苗中的用途; 或者权利要求2或7所述的口蹄疫病毒温度敏感减毒株在制备口蹄疫灭活疫苗生产用种毒的用途。

口蹄疫病毒温度敏感减毒株及其构建方法和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及口蹄疫病毒基因组IRES的定点突变体、嵌合体及其在构建口蹄疫病毒温度敏感减毒株中的用途,本发明进一步涉及所构建的口蹄疫病毒温度敏感减毒株在作为FMD防控的减毒疫苗株或用作生产口蹄疫灭活疫苗的安全种毒的用途,属于口蹄疫的防治领域。

背景技术

[0002] 口蹄疫(Foot and Mouth Disease,FMD)是由口蹄疫病毒(Foot and Mouth Disease Virus,FMDV)引起的,主要危害猪、牛、羊等偶蹄动物的一种急性、热性、高度接触性传染病(Grubman and Baxt.2004.Clinical Micro.Rev.17:465-493),该病一旦爆发会对国际贸易和社会经济造成严重影响,因此在国际上被称为政治经济病,历来受到各国政府的高度重视。

[0003] FMDV属于微RNA病毒科、口蹄疫病毒属成员,共有七个血清型(A、O、C、Asia1、SAT1、SAT2和SAT3),各血清型毒株之间无免疫交叉保护。该病毒基因组为单股正链RNA,全长约为8.5kb,由5'非编码区(5'UTR)、开放阅读框(ORF)和3'UTR组成。FMDV的基因组5'末端缺乏帽子结构,其蛋白翻译的起始依赖于5'UTR中的RNA顺式作用元件—内部核糖体进入位点(Internal ribosome entry site,IRES),它通过招募真核翻译起始因子及核糖体起始病毒蛋白的合成。FMDV IRES长度约为450nt,包括4个结构域,它是FMDV蛋白翻译起始的必需元件。

[0004] 免疫接种是控制FMD流行的的重要手段。然而,国内外使用的商业化口蹄疫灭活疫苗存在以下缺点:1)使用强毒株作为疫苗生产种毒,存在灭活不彻底散毒或工厂生产中散毒的风险;2)灭活的FMDV抗原免疫原性差,免疫保护期短,免疫动物在再次感染FMDV时易于形成持续性感染,持续感染动物可能成为再次流行的传染源,这会严重影响口蹄疫免疫清除计划的实施效果;3)口蹄疫病毒抗原易发生变异,疫苗生产种毒的更新赶不上病毒变异速度,这会对灭活疫苗的免疫效果产生较大的影响。人类和动物疫苗的研究历史表明,只有弱毒疫苗才能诱导快速、坚强、持久的免疫应答,可完全克服灭活疫苗存在的缺点和不足,通过使用弱毒疫苗在世界上已成功消灭了天花和牛瘟、控制了小儿麻痹症等病毒性疾病。虽然口蹄疫在世界许多国家和地区流行并且时而在无疫国家爆发,至今被广泛使用的疫苗仍然是免疫期短且成本高的灭活疫苗,国内外尚未成功研制出安全有效的FMDV减毒活疫苗。

[0005] 在过去的100年中,研究人员一直试图开发一种减毒活疫苗用于口蹄疫的防控,但由于该病毒毒力致弱表型不稳定、致弱毒株不能诱导有效的保护性免疫应答、减毒株在不同动物种属间的致弱程度不同、存在毒力返强的危险等原因,FMDV弱毒疫苗的研发至今尚未取得成功。近年来,随着分子病毒学技术的发展以及对口蹄疫病毒研究的不断深入,尤其是口蹄疫病毒感染性cDNA克隆的使用,可通过结构功能研究确定病毒毒力的决定因素,随后在口蹄疫病毒基因组中引入特定的改变、在体内外评估其减毒表型,这使得开发具有良好免疫原性、且在所有宿主动物中均成功减毒的口蹄疫病毒减毒活疫苗成为可能。开发一

种实用性FMDV减毒活疫苗需要满足以下条件：1) 对所有种属的易感动物均是减毒的，不引起临床症状；2) 免疫后诱导坚强的免疫应答，对免疫动物能够提供抗感染保护；3) 免疫接种动物不排毒，减毒疫苗株在接种动物与健康动物个体之间不传播，不能返祖。这些要求的指标极具挑战性，但它们是一种口蹄疫减毒活疫苗研究取得成功并且获得应用的前提条件。

发明内容

[0006] 本发明提供了一种口蹄疫病毒 (Foot-and-Mouth Disease Virus) 温度敏感减毒株的构建方法，包括：构建口蹄疫病毒全长cDNA感染性克隆质粒，经体外转录得到口蹄疫病毒基因组RNA，将口蹄疫病毒基因组RNA转染细胞并进行病毒的拯救；其中，所述体外转录得到的口蹄疫病毒基因组RNA的IRES结构域4的K区环 ($^{351}\text{CUUUA}^{356}$) 上的351位的胞嘧啶 (C) 突变为鸟嘌呤 (G) 或腺嘌呤 (A)，突变后K区环的碱基序列为 $^{351}\text{GUUUA}^{356}$ 或 $^{351}\text{AUUUA}^{356}$ 。

[0007] 本发明提供了采用上述构建方法得到的口蹄疫病毒温度敏感减毒株。具体的，本发明提供了用所述构建方法获得口蹄疫病毒温度敏感减毒株，其命名为rC351G；本发明所提供的口蹄疫病毒温度敏感减毒株rC351G具有高度的遗传稳定性且均具有温度敏感表型，其对所有易感的偶蹄动物 (体温38.5-40℃) 均是减毒的，符合减毒活疫苗的安全性需求。本发明将口蹄疫病毒温度敏感减毒株rC351G接种猪，接种动物不表现任何临床症状，但是能够诱导产生高水平的O型FMDV中和抗体并能够完全抵抗当前在中国优势流行的O型不同基因型FMDV异源毒株的攻击；本发明构建的口蹄疫病毒温度敏感减毒株rC351G具有良好的安全性，其在接种猪与健康猪之间不发生水平传播，并且在猪体内连续传代毒力不返强。因此，本发明所构建的口蹄疫病毒温度敏感减毒株rC351G可按照减毒活疫苗的常规制备方法制备成减毒活疫苗用于防治口蹄疫，或者是将口蹄疫病毒温度敏感减毒株rC351G作为灭活疫苗的安全种毒应用于预防口蹄疫；可将口蹄疫病毒温度敏感减毒株rC351G的全长cDNA感染性克隆经拯救后制备成减毒活疫苗用于防治口蹄疫、或者作为口蹄疫灭活疫苗的安全种毒、或者用于构建口蹄疫RNA疫苗。

[0008] 本发明将用于拯救口蹄疫病毒温度敏感减毒株rC351G的口蹄疫病毒全长cDNA 感染性克隆质粒提交专利认可的机构进行保藏，其微生物保藏编号是：CGMCC NO. 13148；分类命名是：大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*)；保藏时间是：2016年10月 26日；保藏单位是：中国普通微生物菌种保藏管理中心；保藏地址：北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所。

[0009] 本发明提供了口蹄疫病毒温度敏感减毒株的IRES突变体，其核苷酸序列为SEQ ID No.1所示；采用FMDV反向遗传技术手段，能够将所述的IRES突变体用于构建口蹄疫病毒温度敏感减毒株，进一步的，可以将构建的口蹄疫病毒温度敏感减毒株按照减毒活疫苗的常规制备方法制备成减毒活疫苗用于防治口蹄疫、或者是将构建的口蹄疫病毒温度敏感减毒株的全长cDNA感染性克隆经拯救后作为灭活疫苗的安全种毒、或者用于构建口蹄疫RNA疫苗。

[0010] 本发明提供了另一种口蹄疫病毒温度敏感减毒株的构建方法，包括：构建口蹄疫病毒全长cDNA感染性克隆质粒，经体外转录得到口蹄疫病毒基因组RNA，将口蹄疫病毒基因组RNA转染细胞并进行病毒的拯救；其中，所述经体外转录得到口蹄疫病毒基因组RNA的IRES结构域4用牛鼻病毒 (*Bovine rhinitis B virus, BRBV*) 基因组RNA的IRES结构域4进

行了替换。

[0011] 本发明采用上述构建方法得到另一株口蹄疫病毒温度敏感减毒株,其命名为FMDV (R4);本发明所提供的口蹄疫病毒温度敏感减毒株FMDV (R4) 具有高度的遗传稳定性且具有温度敏感表型,其温度敏感特性表明其对所有易感的偶蹄动物(体温 38.5-40℃)均是减毒的,符合减毒株的安全性需求。本发明将口蹄疫病毒温度敏感减毒株FMDV (R4) 接种猪,接种动物不表现任何临床症状,接种猪与健康猪之间不发生水平传播。更重要的是,接种猪也不产生针对FMDV的抗体,这表明本发明所构建的口蹄疫病毒温度敏感减毒株FMDV (R4) 作为口蹄疫灭活疫苗种毒具有更加良好的安全性,也可将口蹄疫病毒温度敏感减毒株FMDV (R4) 的全长cDNA感染性克隆经拯救后作为口蹄疫灭活疫苗的种毒。

[0012] 本发明将用于拯救口蹄疫病毒温度敏感减毒株FMDV (R4) 的口蹄疫病毒全长 cDNA感染性克隆质粒提交专利认可的机构进行保藏;其微生物保藏编号是:CGMCC NO.13149;分类命名是:大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*);保藏时间是:2016年 10月26日;保藏单位是:中国普通微生物菌种保藏管理中心;保藏地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所。

[0013] 本发明还提供了以牛鼻病毒基因组RNA的IRES结构域4置换口蹄疫病毒基因组RNA的IRES结构域4所得到的嵌合IRES(内部核糖体进入位点),其核苷酸全长序列为SEQ ID No.2所示;采用FMDV反向遗传技术手段,该嵌合IRES能够用于构建口蹄疫病毒温度敏感减毒株,进一步的,可以将所构建的口蹄疫病毒温度敏感减毒株按照减毒活疫苗的常规制备方法制备成减毒活疫苗用于防治口蹄疫,或者是将构建的口蹄疫病毒温度敏感减毒株的全长cDNA感染性克隆经拯救后作为口蹄疫灭活疫苗的安全种毒。

[0014] 本发明更进一步的提供了一种口蹄疫病毒温度敏感减毒株的构建方法,包括:构建口蹄疫病毒全长cDNA感染性克隆质粒,经体外转录得到口蹄疫病毒基因组 RNA,将口蹄疫病毒基因组RNA转染细胞并进行病毒的拯救;其中,经体外转录得到口蹄疫病毒基因组RNA的IRES结构域4的K区用BRBV基因组RNA的IRES结构域4的K区进行了替换。

[0015] 采用上述构建方法得到的一株口蹄疫病毒温度敏感减毒株,其命名为rdK;本发明所提供的口蹄疫病毒温度敏感减毒株rdK具有温度敏感表型且具有高度的遗传稳定性,其温度敏感特性表明它对所有易感的偶蹄动物(体温38.5-40℃)均是减毒的,符合减毒株的安全性需求。本发明将温度敏感减毒株rdK接种猪,接种动物不表现任何临床症状,接种猪与健康猪之间不发生水平传播。更重要的是,接种猪也不产生针对FMDV的抗体,这表明本发明所构建的口蹄疫病毒温度敏感减毒株rdK作为口蹄疫灭活疫苗种毒具有更加良好的安全性,因此,可以将口蹄疫病毒温度敏感减毒株rdK的全长cDNA感染性克隆经拯救后作为口蹄疫灭活疫苗的安全种毒。

[0016] 本发明将用于拯救口蹄疫病毒温度敏感减毒株rdK的口蹄疫病毒全长cDNA感染性克隆质粒提交专利认可的机构进行保藏,其微生物保藏编号是:CGMCC NO. 13150;分类命名是:大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*);保藏时间是:2016年10月26日;保藏单位是:中国普通微生物菌种保藏管理中心;保藏地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所。

[0017] 本发明提供了将口蹄疫病毒基因组RNA的IRES结构域4的K区用BRBV基因组RNA的IRES结构域4的K区进行替换得到嵌合IRES,其核苷酸全长序列为SEQ ID No.3所示;采用本

领域的常规FMDV反向遗传技术手段,该嵌合IRES能够应用于构建口蹄疫病毒温度敏感减毒株。

[0018] 本发明技术方案的详细描述

[0019] 本发明用O型FMDV反向遗传操作系统,对FMDV IRES的结构域4用BRBV IRES的对应区域进行置换,成功构建并拯救了IRES嵌合的突变株FMDV (R4)。用3日龄乳鼠为模型,对IRES嵌合病毒FMDV (R4)及其野生型病毒FMDV (WT)的毒力进行比较测定,测定结果表明,IRES结构域4嵌合病毒FMDV (R4)对乳鼠的毒力显著下降,与亲本病毒FMDV (WT)相比其毒力下降约100倍,证明IRES的亚结构域4是FMDV毒力的决定因素。

[0020] 为了确定FMDV (R4)的复制是否具有温度敏感特性,绘制了FMDV (R4)在仓鼠源BHK-21和猪源IBRS-2两种细胞上不同温度下的一步生长曲线。试验结果证实了IRES嵌合减毒株FMDV (R4)是一个温度敏感突变株,而且这种温度敏感特性在易感宿主动物猪源细胞IBRS-2上表现的尤为明显。

[0021] 为进一步剖析IRES嵌合病毒FMDV (R4)温度敏感减毒表型的分子决定因素,本发明用O型FMDV反向遗传操作系统对FMDV IRES的结构域4中的J、K或N亚结构域用BRBV IRES的对应区域进行逐一置换,成功构建并拯救了三株IRES的J、K或N亚结构域嵌合的FMDV突变株,分别命名为rdJ、rdK或rdN。对这三株嵌合病毒在不同温度下的复制动力学进行检测分析,并绘制一步生长曲线。结果发现,无论在BHK-21细胞上还是在IBRS-2细胞上,或在33℃、37℃和41℃的不同温度条件下,嵌合病毒rdJ、rdN与亲本毒FMDV (WT)均具有相似的增殖特性;而嵌合病毒rdK接种的BHK-21细胞在33℃和37℃条件下与亲本毒FMDV (WT)具有相似的复制能力,但在41℃条件下其复制能力明显下降、比亲本毒FMDV (WT)下降约100倍;在IBRS-2细胞上,即使37℃条件下嵌合病毒rdK的复制能力就显著下降,与亲本毒相比下降约100倍,在41℃时rdK的复制能力几乎丧失。嵌合病毒rdK(而不是rdJ和rdN)的复制特性与嵌合病毒FMDV (R4)的复制特征一致,表明IRES结构域4的K区决定嵌合病毒FMDV (R4)的温度敏感特性。同时,乳鼠毒力实验结果表明,与FMDV (WT)的毒力相比,rdK的毒力下降约 10^6 倍。综合以上结果表明,IRES结构域4的K区决定IRES嵌合病毒FMDV (R4)的温度敏感减毒表型。

[0022] FMDV和BRBV的IRES结构域4的K区,均由一个茎-环(stem-loop)结构组成。为了确定K区茎-环结构中FMDV温度敏感减毒表型相关的区域,本发明用反向遗传操作技术将FMDV IRES之K区的茎、环分别用BRBV IRES之K区的茎、环进行替换,拯救的两株嵌合病毒分别命名为rK (Stem)和rK (Loop),进而对这两株嵌合病毒在不同细胞不同温度下的复制动力学进行检测。嵌合病毒rK (Stem)无论在BHK-21或在IBRS-2细胞上还是在33℃、37℃和41℃不同温度条件下,均与亲本毒FMDV (WT)具有相似的增殖特性;而嵌合病毒rK (Loop)在两种细胞上的复制能力则随温度的升高而逐渐下降,其复制特性与rdK极其相近。上述结果表明,IRES结构域4之K区的环结构决定嵌合病毒FMDV (R4)的温度敏感性。对rK (Loop)的毒力进行测定发现,该病毒在乳鼠体内不稳定,在IRES 351位出现T351C回复性突变,这与该病毒在体外细胞上多次传代后IRES 351位所发生的回复突变相一致;这种回复性突变导致rK (Loop)K区的环结构接近亲本强毒株K区的环结构,使突变株rK (Loop)对乳鼠的致病力恢复到亲本病毒的水平。

[0023] FMDV的IRES K区的环(-³⁵¹CUUUA³⁵⁶-)与BRBV的IRES K区的环(-UUUAC-)结构相近,其主要差别是FMDV的IRES在其K区环结构的起始处351位多一个碱基C、在356位为碱基

A而BRBV IRES此处为碱基C。为了精细确定决定口蹄疫病毒温度敏感表型的分子因素,本发明首先将FMDV的IRES 356位A突变为BRBV的IRES 356位的C,构建并拯救的突变病毒命名为rA356C。该突变病毒在不同温度下的复制动力学显示,在33℃、37℃、41℃条件下,rA356C在BHK-21和 IBRS-2两种细胞上的复制能力均与亲本毒FMDV (WT) 相近,表明FMDV IRES的碱基356A与FMDV的温度敏感表型无关。

[0024] 为确定IRES的C351碱基与FMDV温度敏感表型的相关性,本发明对351位点的碱基C做了如下4种突变:

[0025] (1) 缺失碱基C351; (2) 碱基C351突变为碱基A; (3) 碱基C351突变为碱基G; (4) 碱基C351突变为碱基U。

[0026] 最终试验结果发现,第(1)种和第(4)种的突变方案由于八核苷酸环结构被破坏而没能拯救出病毒,而第(2)和第(3)种突变方案由于八核苷酸环结构不变均能拯救出病毒,所拯救的重组病毒分别命名为rC351A、rC351G。对这两株IRES点突变病毒在不同温度下的复制动力学进行检测。检测结果表明,两个IRES的351位碱基C点突变病毒的复制特性与IRES嵌合病毒rK (Loop) 相近,表明该位点是IRES 嵌合FMDV温度敏感表型的分子决定因素。本发明同时也发现,IRES C351位点突变的FMDV温度敏感突变株对乳鼠的毒力显著下降,与野生型病毒相比rC351G的毒力下降约10000倍、rC351A的毒力下降1000倍。以上试验结果最终表明,IRES结构域4的K区的环上的351位碱基C决定FMDV的温度敏感减毒表型。

[0027] 为检测FMDV温度敏感减毒株的遗传稳定性,本发明将IRES嵌合或定点突变的重组病毒FMDV (R4)、rdK、rK (Loop)、rC351G、rC351A以及亲本病毒FMDV (WT) 分别在BHK-21细胞上连续传20代,并对第20代病毒的IRES序列进行测定。测定结果表明,IRES嵌合或定点突变的FMDV温度敏感减毒株FMDV (R4)、rdK、rC351G 和rC351A具有高度的遗传稳定性;而IRES的K区的环嵌合的FMDV温度敏感减毒株rK (Loop) 是不稳定的,传至第20代时部分发生回复突变、传至第25代时病毒群完全发生回复突变。

[0028] 为了验证IRES的C351G突变也决定其他血清型FMDV毒株的温度敏感性减毒表型,本发明进一步用A型和Asia1型口蹄疫病毒全长cDNA感染性克隆构建并拯救了IRES发生C351G替换的病毒突变株,分别命名为A-rC351G和Asia1-rC351G。对上述IRES突变病毒的温度敏感性进行测定,测定结果表明,无论是A-rC351G还是 Asia1-rC351G,在BHK-21和IBRS-2细胞中的复制能力均随温度的升高而下降,这表明IRES的C351G突变也能够使其他血清型的FMDV毒株获得温度敏感性表型。另外,A-rC351G和Asia1-rC351G对乳鼠的致病力检测结果显示,IRES的C351G突变同样能够使A型和Asia1型FMDV对乳鼠的毒力下降至少10000倍,说明在中国流行的O、A和Asia1三个血清型FMDV毒株的温度敏感减毒表型均是由IRES C351决定的。由于IRES的C351位点在所有FMDV毒株均是保守的,由此确定IRES C351 是所有血清型FMDV毒株温度敏感减毒表型的分子决定因素。

[0029] 本发明通过结构与功能研究和序列比对分析,最终确定FMDV IRES结构域4 的K区的环上的核苷酸C351决定所有七个血清型FMDV毒株的温度敏感减毒表型。IRES发生C351G替换的FMDV减毒突变株在细胞上连续传代显示出高度的遗传稳定性,并且该类毒株均具有温度敏感表型,因此对所有易感的偶蹄动物(体温 38.5-40℃) 均是减毒的,符合减毒活疫苗的安全性需求。

[0030] 本发明所提供的口蹄疫病毒温度敏感减毒突变株,接种易感动物并攻毒后展现的

安全性和有效性,具有显著的安全性优势,可作为减毒活疫苗或灭活疫苗的安全种毒用于预防口蹄疫;本发明所提供的IRES突变体或嵌合IRES序列及其口蹄疫病毒温度敏感减毒株的全长cDNA感染性克隆,可制备口蹄疫减毒活疫苗、用于制备口蹄疫灭活疫苗生产用种毒、或用于制备口蹄疫RNA疫苗。附图说明

[0031] 图1 IRES亚结构域4嵌合病毒FMDV (R4) 对乳鼠的毒力测定结果;

[0032] 图2 IRES嵌合病毒FMDV (R4) 及其亲本病毒在不同温度下的一步生长曲线图;

[0033] 图3 IRES结构域4的亚结构域嵌合FMDV突变株的一步生长曲线图;

[0034] 图4 IRES嵌合FMDV突变株rK (Stem) 和rK (Loop) 的一步生长曲线图;

[0035] 图5 IRES定点诱变的FMDV突变株rC351G和rC351A的一步生长曲线图;

[0036] 图6 IRES嵌合及定点突变FMDV毒株在BHK-21细胞上的遗传稳定性 (A) 及温度敏感性 (B) 检测结果;

[0037] 图7 FMDV温度敏感突变株对乳鼠的毒力测定结果;

[0038] 图8 A型和Asia1型FMDV的IRES C351G突变株的温度敏感性 (A和B) 及其对乳鼠的致病力 (C和D) 测定结果;

[0039] 图9 IRES C351G突变体介导的翻译起始效率分析:利用复制子系统检测IRES介导的蛋白翻译效率 (A);病毒感染BHK-21细胞 (B) 和IBRS-2细胞 (C) 后VP2 蛋白的表达量及产生病毒的滴度。

[0040] 图10减毒突变株及其野生型亲本病毒FMDV (WT) 接种猪的毒力评价测定结果。

具体实施方式

[0041] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但是应理解所述实施例仅是范例性的,不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换,但这些修改或替换均落入本发明的保护范围。

[0042] 1、试验材料与试验方法

[0043] 1.1细胞、载体和毒株

[0044] BHK-21细胞和IBRS-2细胞在含5%CO₂条件下于37℃培养,培养液为含有10% FBS的DMEM。pOK-12载体由Messing (1991) 惠赠;0型FMDV 0/YS/CHA/05 毒株 (GenBank登录号:HM008917) 及该病毒的感染性cDNA克隆pYS可通过文献 (中国发明专利公开号:CN101838658A (ZL201010160669.9)) 中披露的方式获取;Asia1 型FMDV Asia1/YS/CHA/05 毒株 (GenBank登录号:GU931682) 的感染性cDNA克隆可通过文献 (中国发明专利公开号CN101724636A (ZL200810171258.2)) 中所披露的方式获取;A型FMDV A/VN/03/2009毒株 (GenBank登录号:GQ406249) 由本发明人实验室保存。

[0045] 1.2引物设计及合成

[0046] 根据牛鼻病毒IRES基因序列 (GenBank登录号:EU236594) 和0型FMDV 0/YS/CHA/05 株的基因组序列,设计用于扩增两种病毒IRES不同结构域的引物 (表 1) 以及定点突变引物 (表2),所有引物均由上海英俊生物技术有限公司合成。

[0047] 表1构建IRES嵌合病毒的引物及其序列

[0048]

Primer	Sequence (5'→3')
4N-1:U	CGCAGATCTTAATACGACTCACTATAGGTTGAAAGGGGGCGTTAGGGTCTC
4N-1:L	CTCGGGGTACCTGAAGGGCATCCTTAGGCTGTCACCAGTGGTTGAGTACCAGTATC
4N-2:U	TGGTGACAGCCTAAGGATGCCCTTCAGGTACCCCGAGGTAACACGCGAC
4N-2:L	GGCCTCCGGTCACCTATTAGCTTAGACGTTTTTTAAACCAGGCGCTTTT
4N-3:U	CGGAGGCCGGCACCTTTCCTTCGAACAACCTGTCTTTAACC

[0049]

4N-3:L	GAGGATATCGCTAGCTTTGAAAACCAGTCGTTG
4J-1:U	CGCAGATCTTAATACGACTCACTATAGGTTGAAAGGGGGCGTTAGGGTCTC
4J-1:L	TTGTTACCCCGGGGTACCTGGAGGGCATCCTTAGCCTGTCACCAGT
4J-2:U	CGCAGATCTTAATACGACTCACTATAGGTTGAAAGGGGGCGTTAGGGTCTC
4J-2:L	TCCTCAGATCCCGGGTGTCACTTGTTACCCCGGGGTACCT
4J-3:U	CACCCGGGATCTGAGGAGGGGACTGGGGCTTCTTTAAAAGCG
4J-3:L	GAGGATATCGCTAGCTTTGAAAACCAGTCGTTG
4K-1:U	CGCAGATCTTAATACGACTCACTATAGGTTGAAAGGGGGCGTTAGGGTCTC
4K-1:L	GCTTTTTAAACTACGTAAAGTAGTCCCCTTCTCAGATCCCGAGTGT
4K-2:U	CTTTACGTAGTTTTAAAAGCTTCTACGCCTGAATAGGTGACC
4K-2:L	GAGGATATCGCTAGCTTTGAAAACCAGTCGTTG

[0050]

表2定点突变的引物及其序列

[0051]

Primer	Sequence (5'→3')
Loop-U	CTCGGGATCTGAGAAGGGGACTGGGGCTTTTTACAAGCGCCTGGTTTAAAAAGCTTC
Loop-L	GAAGCTTTTTAAACCAGGCGCTTGTA AAAAGCCCCAGTCCCCTTCTCAGATCCCGAG
Stem-U	CACTCGGGATCTGAGAAGGGGACTACCTTTAAGTAGTTTTAAAAGCTTCTACGCCTG
Stem-L	CAGGCGTAGAAGCTTTTTAAACTACTTAAAGGTAGTCCCCTTCTCAGATCCCGAGTG
C351G-U	CTCGGGATCTGAGAAGGG GACTGGGGCTTGTTTAAAAGCGCCTGGTTTAAAAAGCTTC
C351G-L	GAAGCT TTTTAAACCAGGCGC TTTTAAAC AAGCCCCAGTCCCCTTCTCAGATCCCGAG
C351A-U	CTCGGGATCTGAGAAGGGGACTGGGGCTT A TTTAAAAGC GCCTGGTTTAAAAAGCTTC
C351A-L	GAAGCTTTTTAAACCAGGCGCTTTTAA A AAGCCCCAGTCCCCTTCTCAGATCCCGAG
C351T-U	CTCGGGATCTGAGAAGGGGACTGGGGCTT TTTTAAAAGC GCCTGGTTTAAAAAGCTTC
C351T-L	GAAGCTTTTTAAACCAGGCGCTTTTAA A AAGCCCCAGTCCCCTTCTCAGATCCCGAG
Insert C351-U	CGGGATCTGAGAAGGGGACTAC TTTACGTAGTTTTAAAAGCTTCTACGCCTGAATAG
InsertC351-L	CAGGCGTAGAAGCTTTTTAAACTACGTAA A AGTAGTCCCCTTCTCAGATCCCGAGTG T
delta C351-U	CTCGGGATCTGAGAAGGGGACTGGGGCTTTTTAAAAGCGCCTGGTTTAAAAAGCTT C
delta C351-L	GAAGCT TTTTAAACCAGGCGCTTTTAAA AAGCCCCAGTCCCCTTCTCAGATCCCGAG
Type A-G351-U	CTCGGGATCTGAGAAGGGGACTGGGGCTTG TATAAAAAGCGCCCAGTTTAAAAAGCTTC
Type A-G351-L	GAAGCTTTTTAAACTGGGCGCTTTTATA A AAGCCCCAGTCCCCTTCTCAGATCCCGAG
Asia1-G351-U	CTCGGGATCTGAGAAGGGGACCGGGACTTG TTTAAAAGTGCCCGTTTAAAAAGCTTC
Asia1-G351-L	GAAGCTTTTTAAACCGGGCACTTTTAA A AAGTCCCGTCCCCTTCTCAGATCCCGAG

[0052] 1.3嵌合病毒全长cDNA感染性克隆质粒的构建

[0053] 利用融合PCR方法,构建置换BRBV IRES domain 4亚结构域N的嵌合FMDV IRES的全长感染性cDNA克隆。具体方法如下:首先,以质粒pYS为模板,以4N-1:U、4N-1:L为引物,扩增出片段A;以人工合成的BRBV IRES基因为模板,以4N-2:U、4N-2:L为引物,扩增出片段B;以pYS质粒为模板,以4N-3:U、4N-3:L为引物,扩增出片段C。纯化PCR扩增的片段A、B、C用作模板,以4N-1:U和4N-3:L为引物进行融合PCR,扩增出含部分BRBV IRES置换的FMDV 5'端基因片段,该片段大小约为1.9Kb。胶回收该片段,经Bgl II和Nhe I双酶切,克隆至pYS载体中,序列测定正确的克隆命名为p(dN)。同样,利用表1中引物分别构建含有BRBV IRES domain4亚结构域J和K的全长FMDV感染性cDNA克隆质粒,命名为p(dJ)和p(dK)。

[0054] 1.4 A型FMDV全长cDNA感染性克隆的构建

[0055] 根据口蹄疫病毒A/QSA/CHA/09株的全基因组测序结果,利用人工合成基因的方法合成基因组全长,并在全基因组cDNA的5'末端引入T7启动子序列和SpeI酶切位点(5'act agt TAA TAC GAC TCA CTA TAGGG 3'),在全基因组cDNA的3'末端引入EcoRV酶切位点(gat atc),用于全基因组cDNA的线性化。全基因组经限制性内切酶SpeI和EcoRV酶切后,克隆于低拷贝载体pOK12中,构建完成的感染性cDNA克隆命名为pQSA。

[0056] 1.5定点突变

[0057] 按照QuikChange[®]Site-Directed Mutagenesis Kit说明书,通过PCR的方法在感染性cDNA克隆上利用表2引物分别引入突变位点。PCR反应程序:94℃4min;94℃ 30s,68℃9min,18个循环;72℃10min。反应完成后,纯化PCR产物。用DpnI降解PCR产物中甲基化的模板(37℃作用1h),将处理后的PCR产物转化DH5 α 感受态细胞,挑菌,经测序鉴定正确重组质粒分别命名为pK(loop)、pK(stem)、pC351G、pC351A、pC351T、p Δ C351、pIn-351C、pA-rC351G、pAsial-rC351G。

[0058] 1.6病毒的拯救

[0059] 重组质粒p(dN)、p(dJ)和p(dK)、pK(loop)、pK(stem)、pC351G、pC351A、pC351T、p Δ C351、pIn-351C、pA-rC351G、pAsial-rC351G经限制性内切酶EcoRV酶切线性化后,按照RiboMAX[™] Large Scale RNA Production Systems-T7系统说明书胞外转录,反应体系为:25mmol/L rNTP 6 μ L,5 \times 缓冲液4 μ L,T7RNA聚合酶混合液2 μ L,EcoRV线性化的重组质粒8 μ L(2 μ g),总体积为20 μ L。将反应物充分混匀后,于37℃温育2.5h,用RNase-Free DNase消化15min,除去DNA模板,按酚氯仿抽提方法纯化转录产物。当6孔板中的BHK-21细胞生长至60%~90%单层时,用PBS洗2遍细胞,加1.5mL含2%胎牛血清的DMEM细胞培养液。将细胞外转录获得的RNA按QIAGEN公司的Effectene Transfection Reagent转染试剂盒说明书转染BHK-21细胞,进行病毒拯救。转染的细胞在5%CO₂条件下于37℃培养,观察细胞病变,大约3d左右收获病毒,反复冻融3次后传代接种BHK-21细胞,直到病毒能产生稳定的CPE。重组病毒经全长基因组测序验证准确的突变株用于后续试验。获得拯救的病毒分别命名为rdN、rdJ、rdK、rK(loop)、rK(stem)、rC351G、rC351A、rIn-351C、A-rC351G、Asial-rC351G。

[0060] 1.7一步生长曲线

[0061] 野生型FMDV、重组的IRES嵌合病毒以及IRES定点突变病毒,按0.05MOI 剂量分别接种处于对数生长期状态良好的BHK-21、IBRS-2细胞,分别置于33℃、37℃、41℃三种不同的温度下吸附1h,再用PBS洗去未吸附的病毒液,加入含2%胎牛血清的DMEM维持培养,并分

别在接种后4h、8h、12h、16h、20h、24h、28h、32h、40h收获病毒,测定不同时间点收获病毒的TCID₅₀滴度,每个时间点重复测定3次后计算平均值。以病毒的感染细胞的时间为横坐标,以病毒在不同时间点的TCID₅₀滴度的对数值为纵坐标,绘制不同温度下病毒复制的一步生长曲线。

[0062] 1.8病毒传代及遗传稳定性检测

[0063] 取野生型FMDV、嵌合病毒rK(loop)和点突变病毒rC351A、rC351G分别接种于BHK-21细胞中感作1h后,用PBS洗涤2次,加入含2%胎牛血清的DMEM维持培养。待细胞出现明显的细胞病变后,收获病毒。反复冻融3次后,向下传代,连续传20代。每隔5代提取病毒RNA,进行RT-PCR扩增及序列测定。

[0064] 1.9荧光素酶活性检测

[0065] 将转染嵌合病毒复制子RNA的BHK-21细胞和IBRS-2细胞的96孔板,分别培养在33℃、37℃、41℃温箱中,12h后收集细胞并裂解,并按照Renilla-GloTMLuciferase Assay System海肾荧光素酶检测试剂盒说明书,在GloMax发光仪上检测Rluc活性,反应体系为每10μL细胞裂解液加入50μL反应液,检测参数:2s预读延迟,10s检测时间。

[0066] 1.10 Western blot

[0067] 将接种100TCID₅₀野生型FMDV及其重组病毒的BHK-21细胞和IBRS-2细胞,培养12h后收获细胞,经裂解处理后,进行SDS-PAGE电泳,并转印至硝酸纤维素膜上。用5%脱脂乳封闭后,以MAb 4B2(1:1000稀释)作为一抗于37℃作用1h,用PBST洗涤后,加入HRP标记山兔抗鼠IgG二抗(1:5000稀释)于37℃作用1h,洗涤后加入DAB溶液显色。另外,内参选择β-Actin抗体(1:1000稀释)作为一抗,以HRP标记山羊抗小鼠IgG(1:10000稀释)作为二抗。

[0068] 1.11乳鼠毒力试验

[0069] 用灭菌PBS以10倍梯度系列稀释病毒,选用3日龄BALB/c乳鼠并随机分组,每组5只。每个毒株依次接种3个稀释度的病毒,每只乳鼠注射200μL病毒液,阴性对照组注射等量PBS。连续观察7天后,以乳鼠死亡时间为横坐标,以乳鼠存活率为纵坐标,绘制乳鼠的存活曲线。

[0070] 1.12本动物猪毒力评价试验、安全性试验、免疫接种及攻毒试验

[0071] 毒力评价试验

[0072] 20-30公斤的FMDV血清抗体阴性的健康架子猪20头,随机分成4组,每组5头。一组取3头猪颈部肌肉注射10⁵TCID₅₀/头剂量的野生型毒株FMDV(WT),另三组每组取3头猪颈部肌肉注射10⁶TCID₅₀/头剂量的IRES突变株rC351G,FMDV(R4)或rdK,24h后每组分别放入另2头猪作为同居动物。在接种后7天内,每天测量猪只体温、观察临床症状并采集鼻腔拭子、口腔拭子及血液。

[0073] 安全性试验

[0074] 30-40公斤的FMDV血清抗体阴性的健康架子猪9头随机分成3组,每组3头。第一组耳后肌肉注射10⁶TCID₅₀剂量的rC351G减毒株。在接种后5天进行剖杀,取扁桃体组织、血浆、口鼻分泌物混合进行匀浆处理,取2ml注射第二组猪。同样,第二组猪在接种后5天进行剖杀,取相同组织样品混合进行匀浆处理,取2ml注射第三组猪。每组猪在接种后每天测量体温、观察临床症状以及采集口鼻拭子和血液,第三组猪分别在接种后3天、7天、14天、21天采血。

[0075] 免疫接种及攻毒试验

[0076] 为了对减毒株rC351G的免疫保护效果进行评价,用该毒株接种3头猪、以接种PBS的2头猪作为攻毒对照,在接种后21天使用当前在中国呈优势流行的O型FMDV 毒株O/Mya-98/CHA/2010进行攻毒,以评价其免疫保护效果,具体方法如下:

[0077] 20-30公斤的FMDV血清抗体阴性的健康架子猪5头,3头颈部肌肉注射 10^6 TCID₅₀剂量的rC351G减毒株,2头颈部肌肉注射1ml PBS溶液作为对照。免疫组和对照组在接种后21天攻毒,每头猪颈部注射1000ID₅₀剂量的O/Mya-98/CHA/2010 病毒。在攻毒后7天内,每天测量体温、观察临床症状并采集鼻腔拭子、口腔拭子及血液。

[0078] 1.121临床症状观察

[0079] 每天仔细观察猪只临床发病情况并作记录,按照Pacheco andMason等描述的方法(Pacheco and Mason et al, J.Vet.Sci., 2010)进行临床打分:蹄部发病每只记3分,鼻部、舌部以及唇部发病各记3分,最大分值为20分。

[0080] 1.122病毒血症及排毒情况检测

[0081] 新鲜的鼻腔、口腔拭子及血液样品经TRIZOL法提取总RNA,使用Oligo (dT₁₅) 引物反转录获得的cDNA作为模板,以口蹄疫病毒特异性引物(3DF:5'GGA TGC CGT CTG GTT GTT 3';3DR:5'CGT AGG AGA TCA TGG TGT AAG AGT 3')进行荧光定量PCR检测。荧光定量PCR的具体操作按照Platinum[®]SYBR[®]Green qPCR Super Mix-UDG with ROX (Invitrogen)试剂盒说明书进行,通过标准曲线函数来计算样品中病毒基因组RNA的含量。以健康猪血液和口鼻拭子样品PCR扩增FMDV RNA的背景值为 $2.6(\bar{x} + SD = 2.26 + 0.34) \log_{10}$,病毒 RNA拷贝数/ml (viral RNA CN/ml) 高于此数值判为FMDV RNA阳性。

[0082] 1.123FMDV特异性抗体检测

[0083] 每天采集猪只全血,分离的血清部分用于检测FMDV抗体,按照兰州兽医研究所口蹄疫参考实验室生产的O型FMDV抗体液相阻断ELISA检测试剂盒的说明书进行操作。每一块血清稀释板设置1:2和1:4两孔作为阴性对照,1:16、1:32、1:64、1:128四孔作为阳性对照,另外病毒抗原设置4孔对照。被检血清做从1:8到1:1024依次做2倍倍比稀释。每步反应按说明书操作,反应终止后,用酶标仪测定 OD_{450nm}值。

[0084] 1.124 FMDV非结构蛋白3ABC抗体检测

[0085] 每天采集猪只全血,分离的血清用于检测FMDV非结构蛋白3ABC的抗体。按照兰州兽医研究所口蹄疫参考实验室3ABC-I-ELISA的说明书进行操作。血清在96孔ELISA板中被稀释,阴阳性对照各设两孔。将6 μ L血清稀释到120 μ L血清稀释液中,稀释度为1:21,每份设置1个重复,每块板子共稀释46份血清,将已稀释血清滴加到ELISA包被板上,作用一定时间后依次加入各种酶标试剂和底物,最后用酶标仪测定450nm波长下的光吸收值(OD_{450nm}值)。抗体效价 = (OD_{450nm}样品 - OD_{450nm}阴性) / (OD_{450nm}阳性 - OD_{450nm}阴性),若此值 > 0.2判为阳性。

[0086] 1.125微量细胞中和试验

[0087] 首先用BHK-21细胞测定FMDV O/YS/CHA/05病毒的TCID₅₀,然后采用固定病毒稀释血清的方法进行微量细胞中和试验:将血清于56℃灭活30min,用PBS做倍比稀释;用100TCID₅₀的病毒分别与等体积不同稀释度的血清混合,37℃温箱中温育1h;将上述血清-病

毒混合液分别接种BHK-21细胞,每孔100 μ L,每滴度设8孔重复,在37 $^{\circ}$ C于5%CO₂培养箱中培养,每日观察细胞,72h后做最终判定。另外,设病毒、阳性血清和正常细胞对照,根据细胞病变效应(CPE)情况按Reed-Muench方法(Reed and Muench., 1938)计算病毒中和滴度,即能保护50%BHK-21细胞不出现CPE的血清稀释浓度。

[0088] 1.126间接ELISA

[0089] 使用三种血清型(O型、A型和AsiaI型)FMDV抗体间接ELISA检测方法筛选FMDV血清抗体阴性猪。具体步骤如下:灭活并提纯的FMDV全病毒作为抗原,包被96孔ELISA酶标板,加5%脱脂乳4 $^{\circ}$ C过夜封闭;PBST洗涤3次后加入待检血清,每孔100 μ l,37 $^{\circ}$ C温育1h,用PBST洗涤3次后,每孔加入100 μ l HRP标记的羊抗猪IgG(1:5000)作为二抗(Sigma),37 $^{\circ}$ C温育1h;用PBST洗涤3次,加入TMB底物显色溶液50 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C避光反应15min;加入50 μ l/孔2M H₂SO₄终止反应,最后用酶标仪测定OD_{450nm}值。

[0090] 2. 试验结果

[0091] 2.1 IRES嵌合病毒FMDV(R4)是毒力致弱毒株

[0092] 本发明用O型FMDV反向遗传操作系统,对FMDV IRES的结构域4用BRBV IRES的对应区域进行置换,成功构建并拯救了IRES嵌合的突变株FMDV(R4)。乳鼠是公认的评价FMDV毒力的动物模型,因此用3日龄乳鼠为模型,对IRES嵌合病毒FMDV(R4)及其野生型病毒FMDV(WT)的毒力进行比较测定,测定结果如图1所示。对于FMDV(WT),1TCID₅₀接毒剂量引起全部乳鼠死亡,0.1TCID₅₀接毒剂量引起部分(50%)乳鼠死亡,而0.01TCID₅₀接毒剂量不引起乳鼠死亡;对于IRES嵌合病毒FMDV(R4)株,100TCID₅₀接毒剂量引起全部乳鼠死亡,10TCID₅₀接毒剂量引起部分(80%)乳鼠死亡,而1TCID₅₀接毒剂量不引起乳鼠死亡。上述结果表明,IRES结构域4嵌合病毒FMDV(R4)对乳鼠的毒力显著下降,与亲本病毒FMDV(WT)相比其毒力下降约100倍,证明IRES的亚结构域4是FMDV毒力的决定因素。

[0093] 2.2 FMDV(R4)是温度敏感突变株

[0094] 为了寻找FMDV(R4)毒力减弱的原因,本发明首先用M-fold软件对野生型病毒与嵌合病毒FMDV(R4) IRES的二级结构稳定性进行分析,结果显示,野生型病毒IRES的 ΔG 值为-196.60kcal/mol,嵌合病毒FMDV(R4) IRES的 ΔG 值为-185.40kcal/mol,表明嵌合IRES比野生型IRES的稳定性差,具备温度敏感性的结构基础;另外,FMDV(R4)的嵌合IRES之结构域4来自牛鼻病毒,而牛鼻病毒主要感染牛上呼吸道,具有在低于体温的环境(33 $^{\circ}$ C)下复制的特性。综合上述分析认为,FMDV(R4)是一个温度敏感减毒突变株,FMDV(R4)的减毒表型是其获得温度敏感特性的结果。

[0095] 为了探究FMDV(R4)的复制是否具有温度敏感特性,绘制了FMDV(R4)在仓鼠源BHK-21和猪源IBRS-2两种细胞上不同温度下的一步生长曲线,结果如图2所示。在BHK-21细胞上,在33 $^{\circ}$ C条件下,FMDV(R4)复制能力略微高于FMDV(WT);在37 $^{\circ}$ C的条件下,FMDV(R4)复制能力略微低于FMDV(WT);然而在41 $^{\circ}$ C条件下,嵌合病毒FMDV(R4)的复制能力明显下降,较之亲本病毒FMDV(WT)下降约100倍。在IBRS-2细胞上,在33 $^{\circ}$ C的条件下嵌合病毒FMDV(R4)与亲本病毒FMDV(WT)具有相似的增殖特性;在37 $^{\circ}$ C条件下,嵌合病毒FMDV(R4)的复制能力就明显下降,比亲本病毒FMDV(WT)下降至少100倍;在41 $^{\circ}$ C的条件下,嵌合病毒FMDV(R4)复制能力完全丧失,而其亲本病毒FMDV(WT)仍能达到较高的复制滴度(10^{6.25}TCID₅₀/ml)。以上试验结果证实了IRES嵌合减毒株FMDV(R4)是一个温度敏感突变株,而且这种温度敏感性在易感宿主

动物猪源细胞IBRS-2上表现的尤为明显。

[0096] 2.3 IRES结构域4的K区决定FMDV (R4) 的温度敏感性减毒表型

[0097] 为了进一步剖析IRES嵌合病毒FMDV (R4) 温度敏感减毒表型的分子决定因素,本发明用O型FMDV反向遗传操作系统对FMDV IRES的结构域4中的J、K和N亚结构域用BRBV IRES的对应区域进行逐一置换,成功构建并拯救了三株IRES的J、K和N亚结构域嵌合的FMDV突变株,分别命名为rdJ、rdK和rdN。对这三株嵌合病毒在不同温度下的复制动力学进行检测分析,并绘制一步生长曲线,结果如图3所示。无论在BHK-21细胞上还是在IBRS-2细胞上,或在33℃、37℃和41℃的不同温度条件下,嵌合病毒rdJ、rdN与亲本毒FMDV (WT) 均具有相似的增殖特性;而嵌合病毒rdK接种的BHK-21细胞在33℃和37℃条件下与亲本毒FMDV (WT) 具有相似的复制能力,但在41℃条件下其复制能力明显下降、比亲本毒FMDV (WT) 下降约100倍;在IBRS-2细胞上,即使37℃条件下嵌合病毒rdK的复制能力就显著下降,与亲本毒相比下降约100倍,在41℃时rdK的复制能力几乎丧失。嵌合病毒rdK (而不是rdJ和rdN) 的复制特性与嵌合病毒FMDV (R4) 的复制特征一致,表明IRES结构域4的K区决定嵌合病毒FMDV (R4) 的温度敏感特性。同时,乳鼠毒力实验结果表明,与FMDV (WT) 的毒力相比,rdK的毒力下降约 10^6 倍(图7)。综合以上结果表明IRES结构域4的K区决定IRES嵌合病毒FMDV (R4) 的温度敏感减毒表型。

[0098] 2.4 IRES结构域4的K区的环结构决定FMDV (R4) 的温度敏感减毒表型

[0099] FMDV和BRBV的IRES结构域4的K区,均由一个茎-环(stem-loop)结构组成。为了确定K区茎-环结构中FMDV温度敏感减毒表型相关的区域,本发明采用反向遗传操作技术将FMDV IRES的K区的茎、环分别用BRBV IRES之K区的茎、环进行替换,拯救的两株嵌合病毒分别命名为rK (Stem) 和rK (Loop),进而对这两株嵌合病毒在不同细胞不同温度下的复制动力学进行检测,一步生长曲线如图4所示。嵌合病毒rK (Stem) 无论在BHK-21或在IBRS-2细胞上还是在33℃、37℃和41℃不同温度条件下,均与亲本毒FMDV (WT) 具有相似的增殖特性;而嵌合病毒rK (Loop) 在两种细胞上的复制能力则随温度的升高而逐渐下降,其复制特性与rdK极其相近。上述结果表明,IRES结构域4的K区的环结构决定嵌合病毒FMDV (R4) 的温度敏感性。对rK (Loop) 的毒力进行测定发现,该病毒在乳鼠体内不稳定,在IRES 351位出现T351C回复性突变,这与该病毒在体外细胞上多次传代后IRES 351位所发生的回复突变相一致(图6A);这种回复性突变导致rK (Loop) K区的环结构接近亲本强毒株K区的环结构,使突变株rK (Loop) 对乳鼠的致病力恢复到亲本病毒的水平(图7)。

[0100] 2.5 IRES结构域4的K区环上的351位碱基C决定FMDV的温度敏感减毒表型

[0101] FMDV的IRES K区的环(-³⁵¹CUUUA³⁵⁶-)与BRBV的IRES K区的环(-UUUAC-)结构相近,其主要差别是FMDV的IRES在其K区环结构的起始处351位多一个碱基C、356位为碱基A而BRBV IRES此处为碱基C。为了准确确定决定口蹄疫病毒温度敏感表型的分子因素,本发明首先将FMDV的IRES 356位A突变为BRBV的IRES 356位的C,将构建并拯救的突变病毒命名为rA356C。该突变病毒在不同温度下的复制动力学(图5)显示,在33℃、37℃、41℃条件下,rA356C在BHK-21和IBRS-2两种细胞上的复制能力均与亲本毒FMDV (WT) 相近,表明FMDV IRES的碱基356A与FMDV的温度敏感表型无关。

[0102] 为确定IRES的C351碱基与FMDV温度敏感表型的相关性,本发明对351位点的碱基C做了如下4种突变:

[0103] (1) 缺失碱基C351; (2) 碱基C351突变为碱基A; (3) 碱基C351突变为碱基G; (4) 碱基C351突变为碱基U。

[0104] 最终试验结果发现,第(1)种和第(4)种的突变方案由于八核苷酸环结构被破坏(图5A)而没能拯救出病毒,而第(2)和第(3)种突变方案由于八核苷酸环结构不变(图5A)均拯救出病毒,拯救的重组病毒分别命名为rC351A、rC351G。对这两株IRES点突变病毒在不同温度下的复制动力学进行检测,结果如图5所示。在 BHK-21细胞上33℃和37℃的条件下,rC351G和rC351A与其亲本毒具有相近的增殖特性,当温度升高到41℃时rC351G和rC351A比亲本毒的复制能力下降100倍;在猪源IBRS-2细胞上,rC351G和rC351A与亲本毒相比其复制能力随温度的升高逐渐下降,在41℃条件下的复制水平与亲本毒相比显著下降达10000倍。上述结果表明,两个IRES的351位碱基C点突变病毒的复制特性与IRES嵌合病毒rK(Loop)相近,表明该位点是IRES嵌合FMDV温度敏感表型的分子决定因素。同时也发现,IRES C351位点突变的FMDV温度敏感突变株对乳鼠的毒力显著下降,与野生型病毒相比,rC351G的毒力下降约10000倍、rC351A的毒力下降约1000倍。综合以上试验结果最终表明,IRES结构域4的K区的环上的351位碱基C,决定FMDV的温度敏感性减毒表型。

[0105] 2.6温度敏感减毒株体外连续传代的遗传稳定性

[0106] 为检测FMDV温度敏感减毒株的遗传稳定性,本发明将IRES嵌合或点突变的重组病毒FMDV(R4)、rdK、rK(Loop)、rC351G、rC351A以及亲本病毒FMDV(WT)分别在BHK-21细胞上连续传20代,并对第20代病毒的IRES序列进行测定。在 BHK-21细胞上传20代,FMDV(R4)、rdK、rC351G和rC351A的IRES序列均无任何突变产生,而且重组病毒仍保持原有的温度敏感特性(图6B)及乳鼠致病力减毒表型(图7)。然而,rK(Loop)虽然在传至第15代时尚无任何突变产生,第20代时已有部分病毒在IRES 351位出现T351C突变,将病毒再传5代则T351C突变病毒成为优势克隆(图6A);同时,rK(Loop)第25代病毒的温度敏感特性丧失(图6B),对乳鼠的致病力回复到与野生型病毒相近的水平(图7)。上述试验结果表明,IRES 嵌合或定点突变的FMDV温度敏感减毒株FMDV(R4)、rdK、rC351G和rC351A具有高度的遗传稳定性;而IRES的K区的环嵌合的FMDV温度敏感减毒株rK(Loop)是不稳定的,传至第20代时部分发生回复突变、传至第25代时病毒群完全发生回复突变。

[0107] 2.7 IRES C351是FMDV毒株共享的温度敏感性减毒表型的决定位点

[0108] 虽然rC351G和rC351A均具有高度的遗传稳定性,但rC351G的减毒效果比 rC351A更为显著,因此后续研究均选择rC351G以及IRES C351G作为研究对象。上述研究结果,均是用O型FMDV毒株产生的。为了验证IRES的C351G突变也决定其他血清型FMDV毒株的温度敏感性减毒表型,用A型和Asia1型口蹄疫病毒全长cDNA感染性克隆构建并拯救了IRES发生C351G替换的病毒突变株,分别命名为 A-rC351G和Asia1-rC351G。对上述IRES突变病毒的温度敏感性进行测定,结果如图8A和8B所示:无论是A-rC351G还是Asia1-rC351G,在BHK-21和IBRS-2细胞中的复制能力均随温度的升高而下降,这表明IRES的C351G突变也能够使其他血清型的FMDV毒株获得温度敏感性表型。另外,A-rC351G和Asia1-rC351G对乳鼠的致病力检测结果显示,IRES的C351G突变同样能够使A型和Asia1型FMDV对乳鼠的毒力下降至少10000倍(图8C和8D),说明在中国流行的O、A和Asia1三个血清型FMDV毒株的温度敏感减毒表型均是由IRES C351决定的。由于IRES的C351位点以及围绕该点的功能性茎-环结构在所有FMDV毒株均是保守的,由此推断,IRES C351是所有血清型FMDV毒株温度敏感减毒

表型的分子决定因素。

[0109] 2.8 IRES C351G突变体介导的翻译起始能力受温度调控

[0110] 口蹄疫病毒感染细胞后,病毒基因组RNA作为mRNA模板翻译一个大的多聚蛋白,随后进行病毒多聚蛋白的加工以及病毒RNA的复制。为了确定病毒生命周期中的哪个步骤导致FMDV突变株rC351G的毒力减弱,构建了两个病毒复制子 FMDV (WT)-luc和rC351G-luc,这两个复制子分别含有病毒的正常IRES及其C351G 突变体。将这两个复制子在33℃、37℃和41℃不同温度下分别转染BHK-21和IBRS-2 细胞,评估IRES及其突变体介导的翻译水平。为了区分荧光素酶信号是转染的复制子RNA而不是新合成的RNA产生的,其中一部分转染细胞加入能够有效抑制FMDV RNA复制的抑制剂(2mM GnHC1)。结果如图9A所示,在BHK-21细胞中,发生 C351G突变的IRES尽管在33℃和37℃的翻译效率与野生型IRES相似,但是在41℃时明显下降;在IBRS-2细胞中,发生C351G突变的IRES介导的翻译起始效率随温度的升高而降低,在41℃温度条件下降最明显,IRES突变体C351G在此温度下的翻译能力几乎丧失。IRES突变体C351G这种翻译起始效率的改变,与突变株病毒 rC351G在BHK-21和IBRS-2细胞中不同温度下的生长动态规律相一致,均呈现温度敏感性特征,而且这种温度敏感特性在病毒的靶动物猪细胞上表现的更为强烈。以上结果表明,C351G发生突变的IRES以温度敏感性方式改变其翻译起始效率,从而以温度敏感性方式影响病毒的复制能力和毒力。

[0111] 为了进一步证实C351G突变介导IRES翻译起始的温度敏感效应,本试验分析了IRES突变病毒rC351G与其亲本毒FMDV (WT) 之VP2结构蛋白的表达动力学。结果如图9B和9C所示,突变病毒rC351G在BHK-21和IBRS-2细胞中VP2蛋白的表达量均随温度的升高而降低,尤其是在猪源细胞IBRS-2中,病毒VP2蛋白在41℃条件下的表达几乎丧失。IRES的C351G突变介导病毒VP2蛋白翻译水平的这种温度敏感效应,与不同温度下IRES突变株rC351G在猪源细胞IBRS-2中感染性病毒粒子复制滴度的变化,是完全一致的,表明IRES C351G突变体的翻译起始能力受温度的调控。

[0112] 2.9突变株rC351G对乳鼠和本动物猪的毒力试验结果

[0113] 乳鼠毒力试验结果表明,与FMDV (WT) 的毒力相比,rC351G的毒力下降约 10^4 倍(图7)。

[0114] rC351G毒株对本动物猪的的毒力试验结果如图10所示。分别接种 10^5 TCID₅₀剂量野生型病毒FMDV (WT) 的3头猪(15#、46#、18#),在接种后48h体温均达到41℃,出现典型的口蹄疫症状,具体表现为食欲下降、精神沉郁,四蹄及鼻部均出现水疱;接种猪在接种后1天即形成病毒血症,血液及口鼻拭子中病毒RNA的含量显著高于健康猪 $2.6 \log_{10}$ viral RNA CN/ml的水平,接种后4天病毒血症达到高峰为 $8.7 \log_{10}$ RNA copies/ml。2头同居猪(10#、35#)的感染和发病较WT接种猪滞后,在接种后4天(同居后3天)体温达到41℃,四蹄均出现水疱;同居猪在接种后3天血液及口鼻拭子中的病毒RNA为阳性,接种后5天达到高峰 $7.1 \log_{10}$ viral RNA CN/ml 的水平。然而,用相当于上述野生型病毒接种10倍剂量的减毒突变株rC351G(10^6 TCID₅₀/头)接种3头猪(36#、49#、59#),2头猪(57#、28#)用作同居对照,在接种后7天内均无任何临床症状,也无体温升高现象;接种猪以及同居猪的血液及口鼻拭子中病毒RNA检测均为阴性。虽然rC351G接种猪不产生病毒血症,但在接种后21天均可产生针对FMDV非结构蛋白3ABC的抗体,而同居猪在接种后21天检测3ABC抗体均为阴性,这表明减毒株rC351G在接种猪体内呈低水平局部复制但不产生病毒血症不排毒也不发生水平传播。

以上试验结果表明,rC351G病毒对乳鼠的毒力显著下降,对本动物猪的毒力丧失。

[0115] 2.10减毒株rC351G的稳定性和安全性评价试验结果

[0116] 1) 体外细胞传代

[0117] 为检测减毒株rC351G的遗传稳定性,将其在BHK-21细胞上连续传20代,并对第20代病毒的全基因组序列进行测定。结果表明,rC351G株具有高度的遗传稳定性,在体外连续传20代其IRES C351G不发生回复突变,而且其减毒表型也不发生改变。

[0118] 2) 同居动物不感染

[0119] 同居试验结果如图1所示,健康猪(57#、28#)与rC351G接种猪(36#、49#、59#)同居后不表现任何临床症状,7天内采集的血液样品及口鼻拭子检测病毒RNA均为阴性,在21天检测血清中针对FMDV非结构蛋白3ABC的抗体也为阴性,这表明同居猪未发生FMDV rC351G的感染。以上同居试验结果表明,由于减毒突变株 rC351G接种猪后不产生病毒血症、不排毒、因对易感动物失去毒力也不能够水平传播,具有优良的安全性。

[0120] 3) 本动物连续传代毒力不返强

[0121] 为进一步评价减毒株rC351G的安全性,对该毒株在仔猪体内进行连续传代。结果表明,减毒株rC351G在猪体连续传3代,每代接种3头猪,所有猪在5天观察期内体温均正常、且无任何临床症状。检测第三代接种猪在接种后3、7、14、和21天采集的血清抗体,结果显示:FMDV结构蛋白抗体为阴性(LPBE值小于1:8),FMDV非结构蛋白3ABC的抗体也为阴性(OD值<0.2),在接种后3、7、14、21天血液及口鼻拭子中检测病毒RNA也为阴性。以上试验结果表明,减毒株rC351G在猪体内传代毒力不返强,这在前面证明同居不传播的基础上进一步表明人工接种传代也不发病,在体内具有良好的安全性。

[0122] 2.11减毒株rC351G免疫猪的免疫保护效力试验结果

[0123] rC351G免疫猪的免疫保护效力试验结果如表3所示。

[0124] 表3 rC351G免疫猪对FMDV O/Mya-98/CHA/2010株攻击的保护效果

接种物	攻毒剂量 (ID ₅₀)	猪号	临床打分 (发病日期)	病毒分离	血液中病毒 RNA拷贝数 (发病日期)	鼻拭子中病毒 RNA拷贝数 (发病日期)	中和抗体滴度	
							0 dpc	7 dpc
[0125] rC351G	10 ⁵	60	0	阴性	阴性	阴性	128(180)	512(720)
		66	0	阴性	阴性	阴性	128(180)	512(720)
		68	0	阴性	阴性	阴性	64(90)	256(360)
PBS	10 ⁵	65	18(2)	阳性	8.7log ₁₀ (3)	8.5log ₁₀ (3,4)	<8(<8)	128(180)
		73	16(3)	阳性	6.2log ₁₀ (2)	7.8log ₁₀ (3,4)	<8(<8)	64(90)

[0126] 根据试验结果可见,2头对照猪(65#、73#)在攻毒后2天体温升高至41℃,食欲下降、精神沉郁,攻毒后3天2头猪四蹄均出现水疱;在攻毒后48h,对照猪即形成病毒血症,血液及口鼻拭子中FMDV RNA的检测即为阳性,病毒血症在攻毒后3天达到高峰为8.7log₁₀viral RNA CN/ml,此时血液及口鼻拭子中均可分离到病毒。然而,减毒株rC351G接种的3头猪(60#、66#、68#)在攻毒后7天内均无任何临床症状及体温升高现象,且免疫猪血液及口鼻拭子中FMDV RNA的检测也为阴性,病毒分离也为阴性;攻毒后的FMDV抗体检测结果显示,rC351G免疫组在攻毒后7天O型FMDV中和抗体滴度由1:128小幅上升到1:512,LPBE抗体由1:180上升到1:720,而PBS对照组在攻毒后7天FMDV中和抗体水平由小于1:8迅速上

升到1:128、LPBE抗体也由1:8迅速上升到1:180。攻毒试验结果表明,减毒株rC351G病毒免疫猪能够对当前流行的O型FMDV不同基因型毒株的攻击提供完全的抗感染保护。

[0127] 2.12 FMDV (R4) 和rdK对本动物猪的毒力试验结果

[0128] 用减毒突变株FMDV (R4) 和rdK (10^6 TCID₅₀/头) 分别接种3头猪,24h后每组另外放入2头猪用作同居动物。结果如图10所示,接种后7天所有猪只均无任何临床症状,也无体温升高现象;接种猪以及同居猪的血液及口鼻拭子中病毒RNA检测均为阴性。接种后21天FMDV抗体检测结果显示,所有接种猪和同居猪FMDV中和抗体均为阴性(<1:8)。以上试验结果表明,减毒突变株FMDV (R4) 和rdK本动物猪失去感染性,接种猪不产生病毒血症、不排毒、不发生水平传播、也不诱生抗体,因此作为灭活疫苗的种毒具有更好的安全性。

- [0001] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110> 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所
- [0003] <120> 口蹄疫病毒温度敏感减毒株及其构建方法和用途
- [0004] <130> HLJ-2016-166780
- [0005] <160> 3
- [0006] <170> PatentIn version 3.5
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 438
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> Artificial Sequence
- [0011] <220>
- [0012] <221> misc_feature
- [0013] <222> (351)
- [0014] <223> n is g or a
- [0015] <400> 1
- [0016] gtgcaacttg gaactccgcc tggctcttcc aggtctagag gggtgacatt ttgtactgtg 60
- [0017] cttgactcca cgctcggtcc actggcgagt gctagtaaca gcaactgttg ttcgtagcgg 120
- [0018] agcatggtgg ccgcgggaac tcctccttgg taacagggac ccgcggggcc gaaagccacg 180
- [0019] tcctcacgga cccaccatgt gtgcaacccc agcacggcaa ctttattgtg aaaaccactt 240
- [0020] taaggtgaca ctgatactgg tactcaacca ctggtgacag gctaaggatg cccttcaggt 300
- [0021] accccgaggt aacacgcgac actcgggatac tgagaagggg actggggcct ntttaaaagc 360
- [0022] gcctggttta aaaagcttct acgcctgaat aggtgaccgg aggccggcac ctttccttcg 420
- [0023] aacaactgtc tttaaatg 438
- [0024] <210> 2
- [0025] <211> 425
- [0026] <212> DNA
- [0027] <213> Artificial Sequence
- [0028] <220>
- [0029] <221> chimeric gene
- [0030] <222> 位置: (1) ... (277)
- [0031] <223> Foot-and-Mouth Disease Virus gene
- [0032] <220>
- [0033] <221> chimeric gene
- [0034] <222> 位置: (278) ... (374)
- [0035] <223> Bovine rhinovirus gene
- [0036] <220>
- [0037] <221> chimeric gene
- [0038] <222> 位置: (374) ... (425)

[0039] <223> Foot-and-mouth disease virus gene
[0040] <400> 2
[0041] gtgcaacttg gaactccgcc tggctttcc aggtctagag gggtgacatt ttgtactgtg 60
[0042] cttgactcca cgctcgggtcc actggcgagt gctagtaaca gcaactgttgc ttcgtagcgg 120
[0043] agcatggtgg ccgcgggaac tcctccttgg taacagggac ccgcggggcc gaaagccacg 180
[0044] tcctcacgga cccaccatgt gtgcaacccc agcacggcaa ctttattgtg aaaaccactt 240
[0045] taaggtgaca ctgatactgg tactcaacca ctggtgacag cctaaggatg ccctccaggt 300
[0046] accccggggt aacaagtgac acccgggatc tgaggagggg actactttac gtagtttaaa 360
[0047] aaacgtctaa gctgaatagg tgaccggagg ccggcacctt tccttcgaac aactgtcttt 420
[0048] aaatg 425
[0049] <210> 3
[0050] <211> 426
[0051] <212> DNA
[0052] <213> Artificial Sequence
[0053] <220>
[0054] <221> chimeric gene
[0055] <222> 位置: (1) ... (339)
[0056] <223> Foot-and-Mouth Disease Virus gene
[0057] <220>
[0058] <221> chimeric gene
[0059] <222> 位置: (340) ... (356)
[0060] <223> Bovine rhinovirus gene
[0061] <220>
[0062] <221> chimeric gene
[0063] <222> 位置: (357) ... (426)
[0064] <223> Foot-and-mouth disease virus gene
[0065] <400> 3
[0066] gtgcaacttg gaactccgcc tggctttcc aggtctagag gggtgacatt ttgtactgtg 60
[0067] cttgactcca cgctcgggtcc actggcgagt gctagtaaca gcaactgttgc ttcgtagcgg 120
[0068] agcatggtgg ccgcgggaac tcctccttgg taacagggac ccgcggggcc gaaagccacg 180
[0069] tcctcacgga cccaccatgt gtgcaacccc agcacggcaa ctttattgtg aaaaccactt 240
[0070] taaggtgaca ctgatactgg tactcaacca ctggtgacag gctaaggatg cccttcaggt 300
[0071] accccgaggt aacacgcgac actcgggatc tgagaagggg actactttac gtagtttaaa 360
[0072] aagcttctac gcctgaatag gtgaccggag gccggcacct ttccttcgaa caactgtctt 420
[0073] taaatg 426

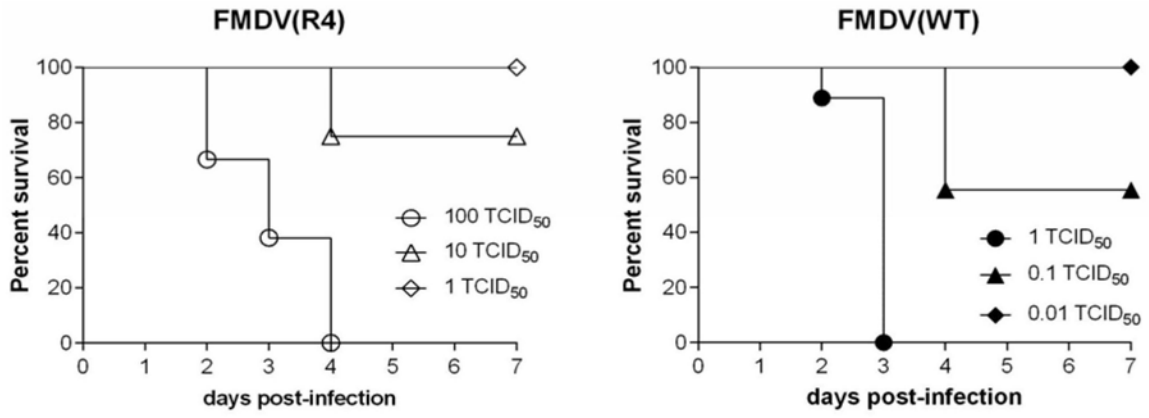


图1

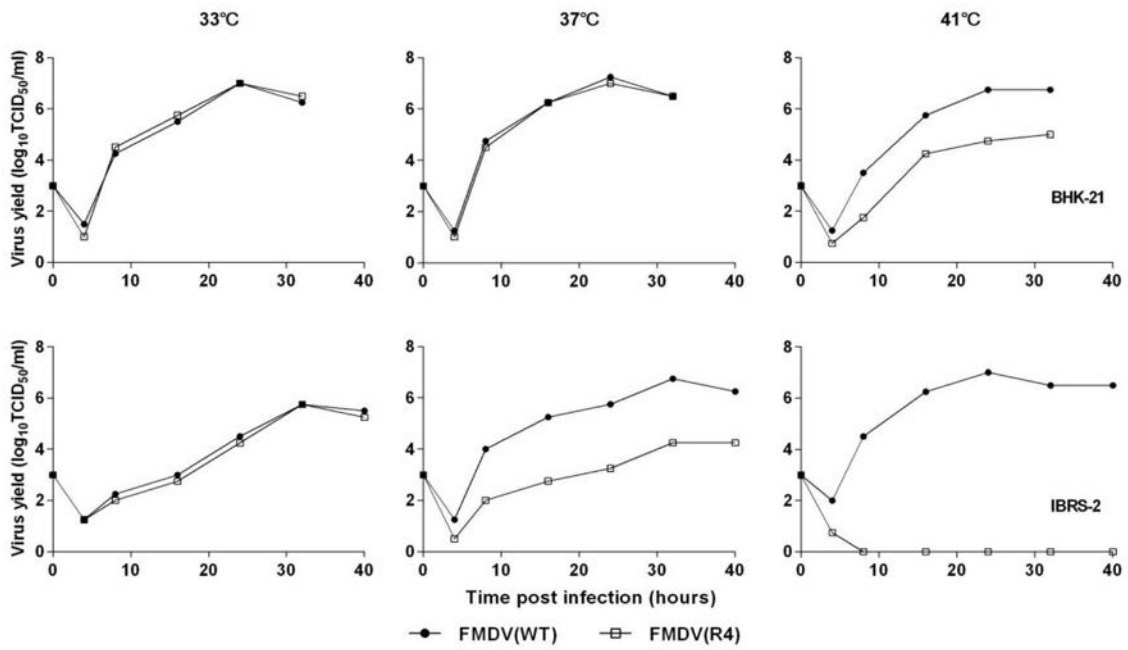


图2

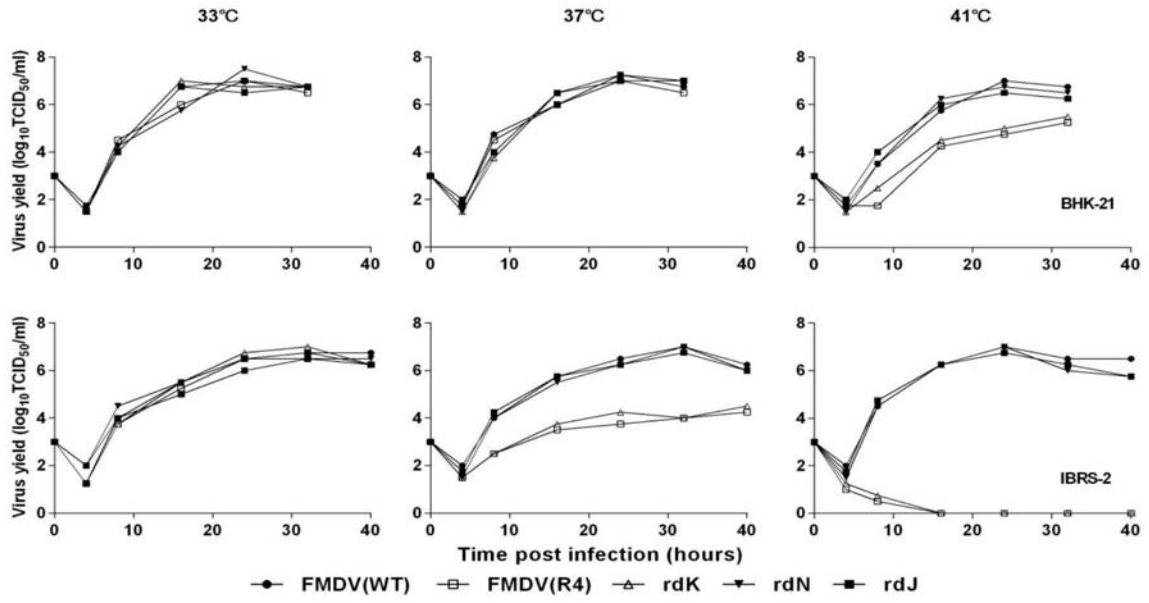


图3

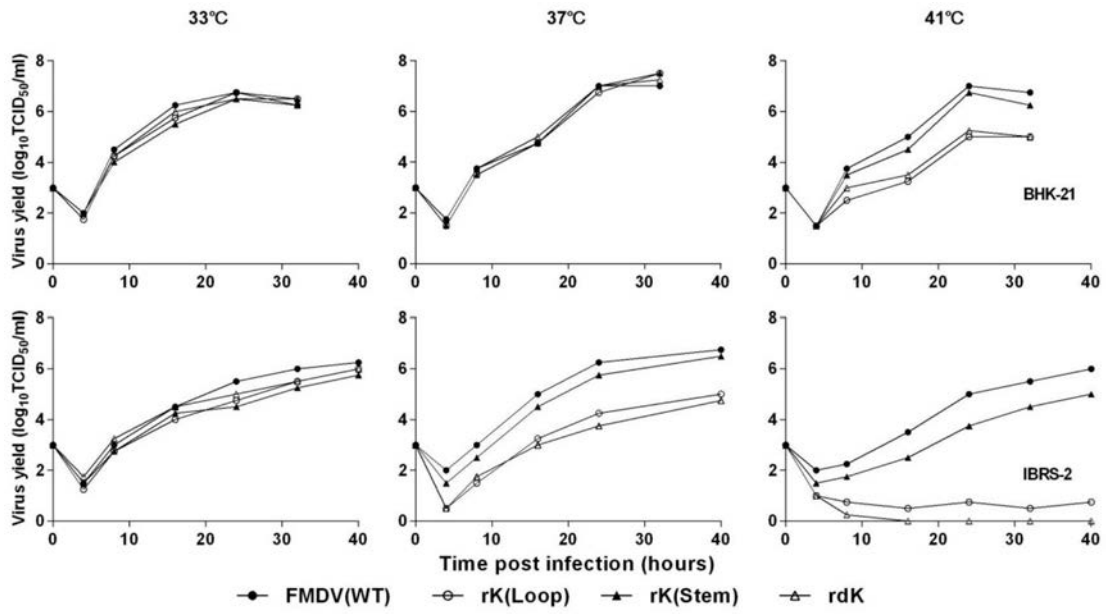


图4

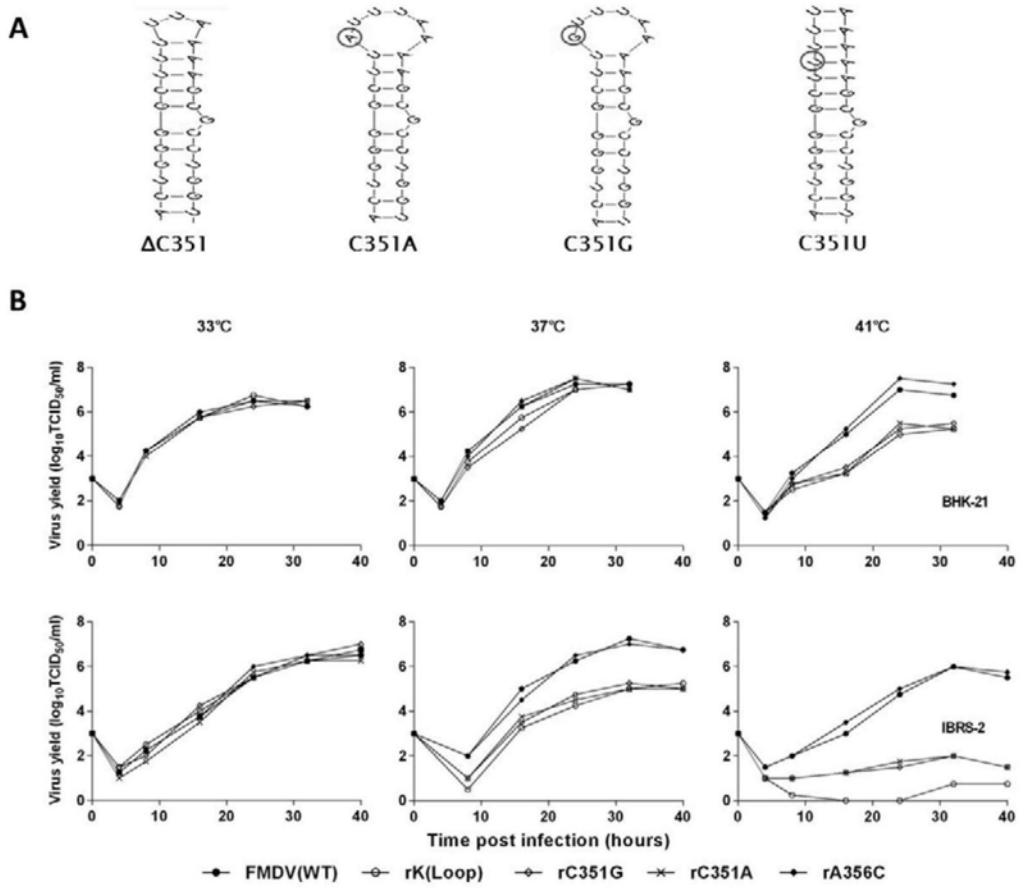


图5

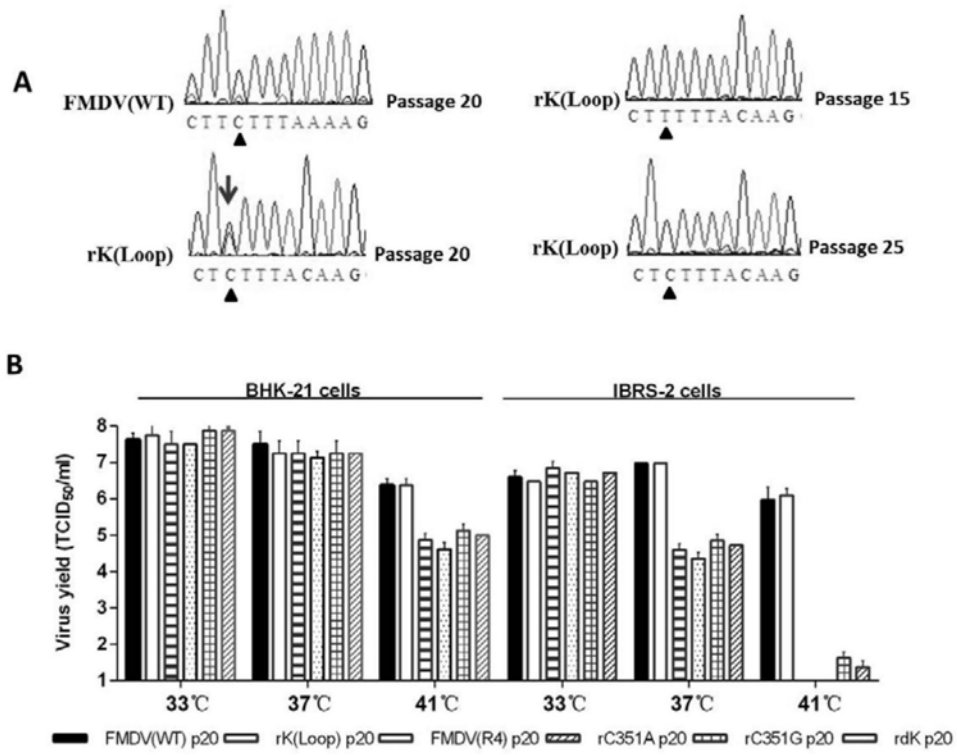


图6

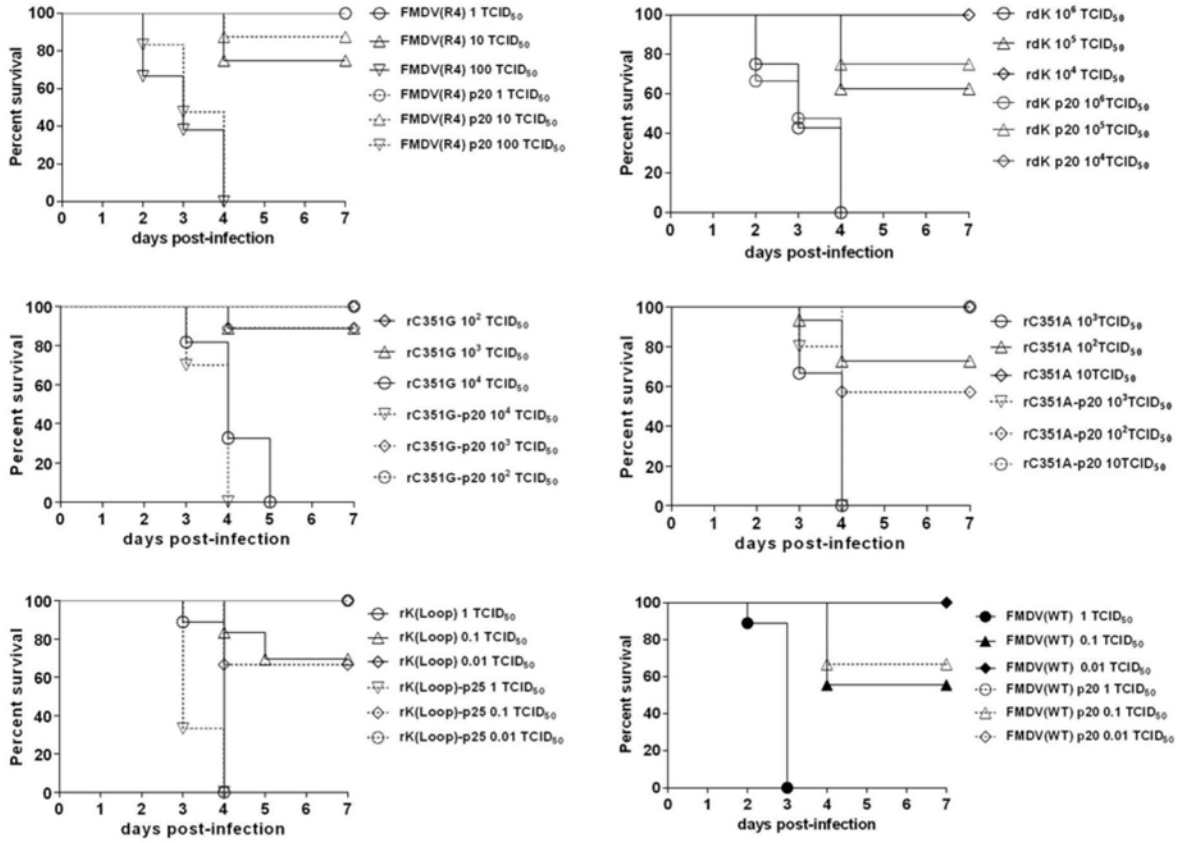


图7

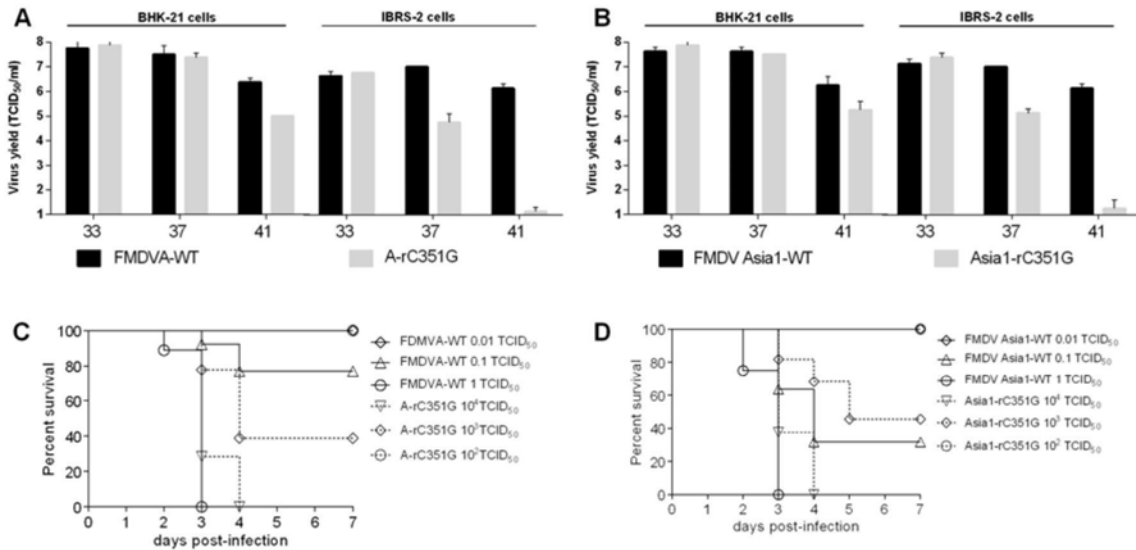


图8

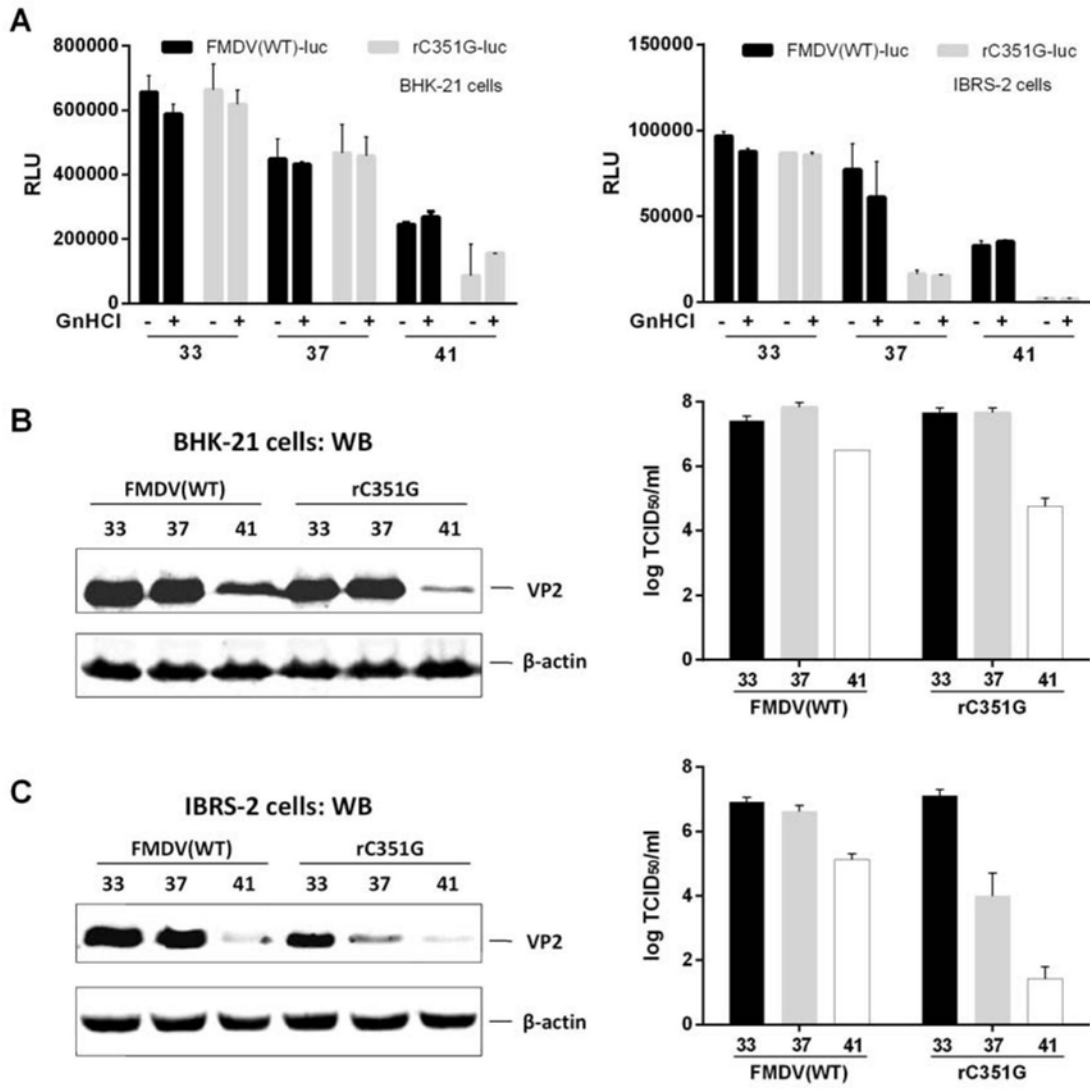


图9

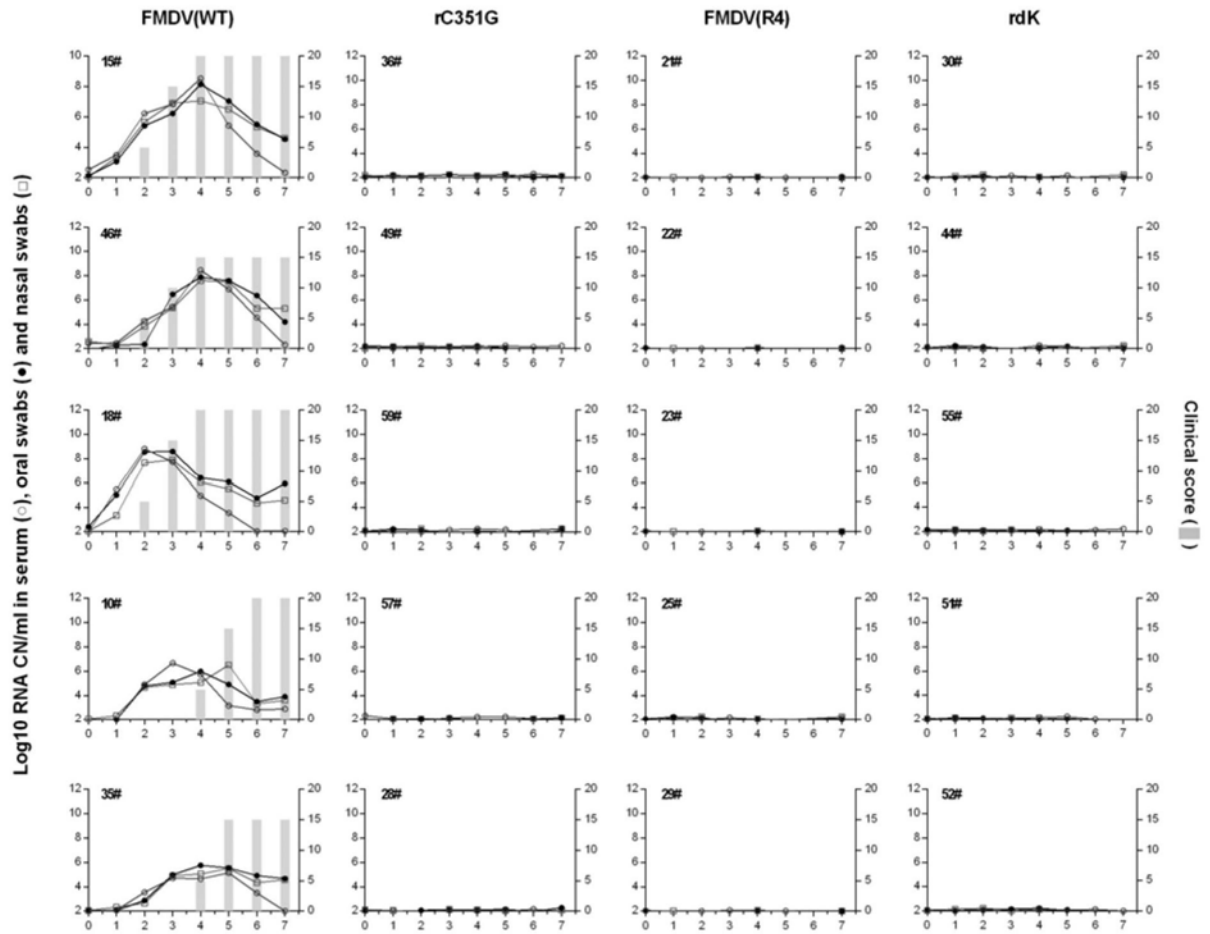


图10