

研究简报

双峰驼口蹄疫病毒受体 $\beta 6$ 亚基基因的分子特征^{*}独军政 常惠芸^{**} 高闪电 王景锋 邵军军 丛国正 林 彤 才学鹏 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)

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)

摘要 病毒受体是病毒宿主范围和组织嗜性的一个决定因素。研究表明,4种整联蛋白 $\alpha v\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha v\beta 6$ 、 $\alpha v\beta 8$ 能够介导口蹄疫病毒感染偶蹄动物,且 $\alpha v\beta 6$ 是主要的口蹄疫病毒受体。首次从健康双峰驼肺组织中克隆到了 $\beta 6$ 亚基基因并进行了比较分析。结果显示,双峰驼 $\beta 6$ 基因的编码区含有 2367 个核苷酸,编码 788 个氨基酸残基,其中信号肽由 26 个氨基酸组成;胞外域由 681 个氨基酸组成,含有 8 个潜在的糖基化位点(NXT/NXS)和 58 个半胱氨酸(Cys)残基;跨膜区由 29 个氨基酸组成(708~736aa);胞浆域由 52 个氨基酸组成,含有一个 NPLY 核心基序和一个潜在的糖基化位点(NVT),该基因在 GenBank 中的登录号为 EF613220。双峰驼 $\beta 6$ 基因与牛、猪、羊、人、小鼠、挪威大鼠 $\beta 6$ 基因的核苷酸序列同源性分别为 91.1%、91.8%、90.6%、90.5%、83.7%、84.1%,推导的氨基酸序列同源性分别为 94.3%、93.4%、93.4%、93.7%、88.7%、88.6%。偶蹄动物(双峰驼、牛、羊、猪)的 $\beta 6$ 基因同源性较高,在遗传进化树上同属于一个亚群,表明 $\beta 6$ 亚基可能与口蹄疫病毒的宿主范围有关。

关键词 口蹄疫病毒 受体 双峰驼 $\beta 6$ 基因 分子特征

中图分类号 Q75

口蹄疫是由口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)感染引起的偶蹄动物(猪、牛、羊、骆驼等)共患的急性、热性、接触性传染病,该病被世界动物卫生组织(OIE)列为 A 类传染病之首。FMDV 属小 RNA 病毒科口蹄疫病毒属,病毒粒子外壳由结构蛋白 VP1、VP2、VP3 和 VP4 各 60 个分子构成。病毒表面明显的特征是 VP1 的 G-H 环突出于表面,其跨度大约是 VP1 140~160 位的 20 个氨基酸残基,G-H 环含有高度保守的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)基序,这一基序是 FMDV 的细胞吸附位点。整联蛋白可与含有 RGD 基序的蛋白配体结合,这是整联蛋白作为 FMDV 受体的分子基础^[1]。

FMDV 具有严格的宿主范围,自然条件下其感染对象是猪、牛、羊及其他家养和野生偶蹄动物^[2]。骆驼在哺乳动物分类中属于偶蹄目,反刍亚目,骆驼科,骆驼属。依背部驼峰数目,有单峰驼和双峰驼之分。由于骆驼具有独特的生理结构,所以能长期适应于荒漠、半荒漠、和戈壁沙漠等极其恶劣的自然生态环境之中。双峰驼是我国的特色畜种之一,主要分布于华北和西北的干旱荒漠地带。口蹄疫可引起双峰驼发病,我国 20 世纪 60 年代几次口蹄疫大流行时,均有骆驼发病的报道。与猪、牛、羊口蹄疫相比,骆驼口蹄疫相对罕见,但是作为口蹄疫病毒的自然感染宿主之一,对其病毒受体的研究将有助于揭示 FMDV 的宿主范围与受体的关系。

病毒受体是病毒宿主范围和组织嗜性的一个决定因素^[3]。研究表明,4种人源整联蛋白 $\alpha v\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha v\beta 6$ 、 $\alpha v\beta 8$ 能介导 FMDV 的感染^[4~7],且 $\alpha v\beta 6$ 是主要

收稿日期:2007-05-28 修回日期:2007-06-28

^{*} 国家“863”计划资助项目(2006AA10A204),国家科技支撑计划资助项目(2006BAD06A10)

^{**}通讯作者,电子信箱:changhuiyun@126.com

的功能受体^[8]。到目前为止,大部分 FMDV 受体的研究是以人源整联蛋白为对象的,但是人并不是口蹄疫病毒的自然宿主。为了阐明 FMDV 在自然条件下仅感染偶蹄动物的分子机制,本试验首次从健康双峰驼肺组织中克隆到了 $\beta 6$ 亚基基因并对其核苷酸序列和推导的氨基酸序列进行了比较分析。

1 材料与方法

1.1 材料

双峰驼来自内蒙古阿拉善右旗牧区,临检健康;RNA 提取试剂盒为 Qiagen 公司产品,AMV 反转录酶、Oligo(dT)₁₅、感受态细胞 JM109、pGEM T-easy 载体、连接酶为 Promega 公司产品,限制性核酸内切酶、IPTG、X-gal、Taq DNA 聚合酶、DNA Marker、DNA 片段纯化试剂盒均购自宝生物(大连)有限公司,其他试剂均为国产或进口分析纯。参考已发表的偶蹄动物(牛、羊、猪) $\beta 6$ 基因序列设计引物,上游引物(P1)为 5'-CTGAGACCGATGGCGATTGATCT-3';下游引物(P2)为 5'-ATGTTCTGTCCTTCGGAAG-3',这对引物用于扩增双峰驼 $\beta 6$ 亚基基因的编码区,预期大小约为 2.4kb。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取 剪取约 0.3g 的双峰驼肺组织,置于液氮预冷的研钵中,加入少量液氮研磨至无肉眼可见颗粒,参考 RNA 提取试剂盒操作说明提取细胞总 RNA,所有器皿和试剂均经 0.1% 的 DEPC(焦碳酸二乙酯)水溶液去 RNA 酶处理。

1.2.2 RT-PCR 反转录体系为:总 RNA 2 μ g, dNTP 4 μ l, Oligo(dT)₁₅ 1 μ l, 5 \times RT buffer 8 μ l, 反转录酶 1 μ l, RNA 酶抑制剂 1 μ l, 加双蒸水至 40 μ l 体系。混匀后置于 42 $^{\circ}$ C 水浴 2.5h, 99 $^{\circ}$ C 水浴 5min, 冰浴冷却备用。PCR 反应体系为:10 \times PCR buffer 10 μ l, dNTP 8 μ l, 上下游引物各 2 μ l, cDNA 10 μ l, Taq 酶 1 μ l, 加双蒸水至 100 μ l 体系;反应程序如下:94 $^{\circ}$ C 2min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 54 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 3min, 30 个循环后,72 $^{\circ}$ C 终延伸 10min;PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳观察结果。

1.2.3 基因克隆 将纯化的 PCR 产物和 pGEM T-easy 载体于 16 $^{\circ}$ C 水浴进行连接反应,转化感受态细胞 JM109,均匀涂布于含有 IPTG、X-gal 和 Amp 的 LB 琼脂平板上,37 $^{\circ}$ C 温育 12h 后,挑取白色单个菌落。以碱裂解法小剂量制备质粒,并进行酶切和 PCR 鉴定,将初步鉴定为阳性的 3 个重组质粒送上海生工生物工程公司测序。

1.2.4 序列分析 重组质粒序列测定后,借助 DNAstar、BioEdit、Mega3.1、ClustalX 等分子生物学软件参考序列比较分析。参考基因及 GenBank 登录号为:牛 $\beta 6$ (AF468060)、人 $\beta 6$ (NM000888)、挪威大鼠 $\beta 6$ (BC079069)、猪 $\beta 6$ (AM114538)、羊 $\beta 6$ (AJ439062)、小鼠 $\beta 6$ (NM021359)。

2 结果

2.1 $\beta 6$ 基因的 RT-PCR 扩增

提取双峰驼肺组织细胞的总 RNA 后,反转录得到 cDNA,PCR 扩增得到约 2.4kb 的目的条带(图 1)。将凝胶纯化的 PCR 产物与 pGEM T-easy 载体 16 $^{\circ}$ C 连接 12h 后,转化 JM109,挑取白色单个菌落制备质粒,经 PCR、酶切鉴定片段大小与预期结果相符。

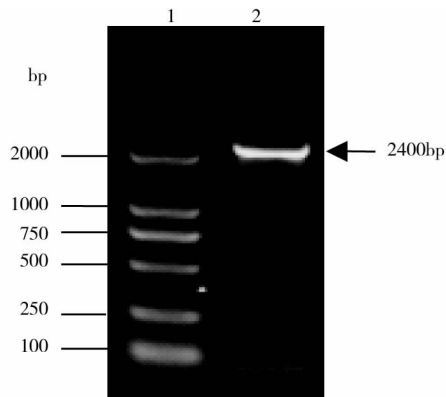


图 1 双峰驼 $\beta 6$ 基因的 RT-PCR 结果

1: DL2000 Marker; 2: PCR products

Fig. 1 RT-PCR results of bactrian camel $\beta 6$ cDNA

2.2 $\beta 6$ 基因的序列测定

测序结果表明,3 个重组质粒的序列完全一致,双峰驼 $\beta 6$ 亚基基因的编码区含有 2367 个核苷酸,编码 788 个氨基酸,其中信号肽由 26 个氨基酸组成;胞外域由 681 个氨基酸组成,含有 8 个潜在的糖基化位点(NXS/NXT)和 58 个半胱氨酸(Cys)残基;跨膜区由 29 个氨基酸组成;胞浆域由 52 个氨基酸组成,含有一个 NPLY 核心基序和一个潜在的糖基化位点(NVT)(图 2)。该基因在 GenBank 中的登录号为 EF613220。

2.3 $\beta 6$ 基因的序列分析

双峰驼 $\beta 6$ 基因与牛、猪、羊、人、小鼠、挪威大鼠 $\beta 6$ 基因的核苷酸序列同源性分别为 91.1%、91.8%、90.6%、90.5%、83.7%、84.1%,推导的氨基酸序列同源性分别为 94.3%、93.4%、93.4%、93.7%、88.7%、

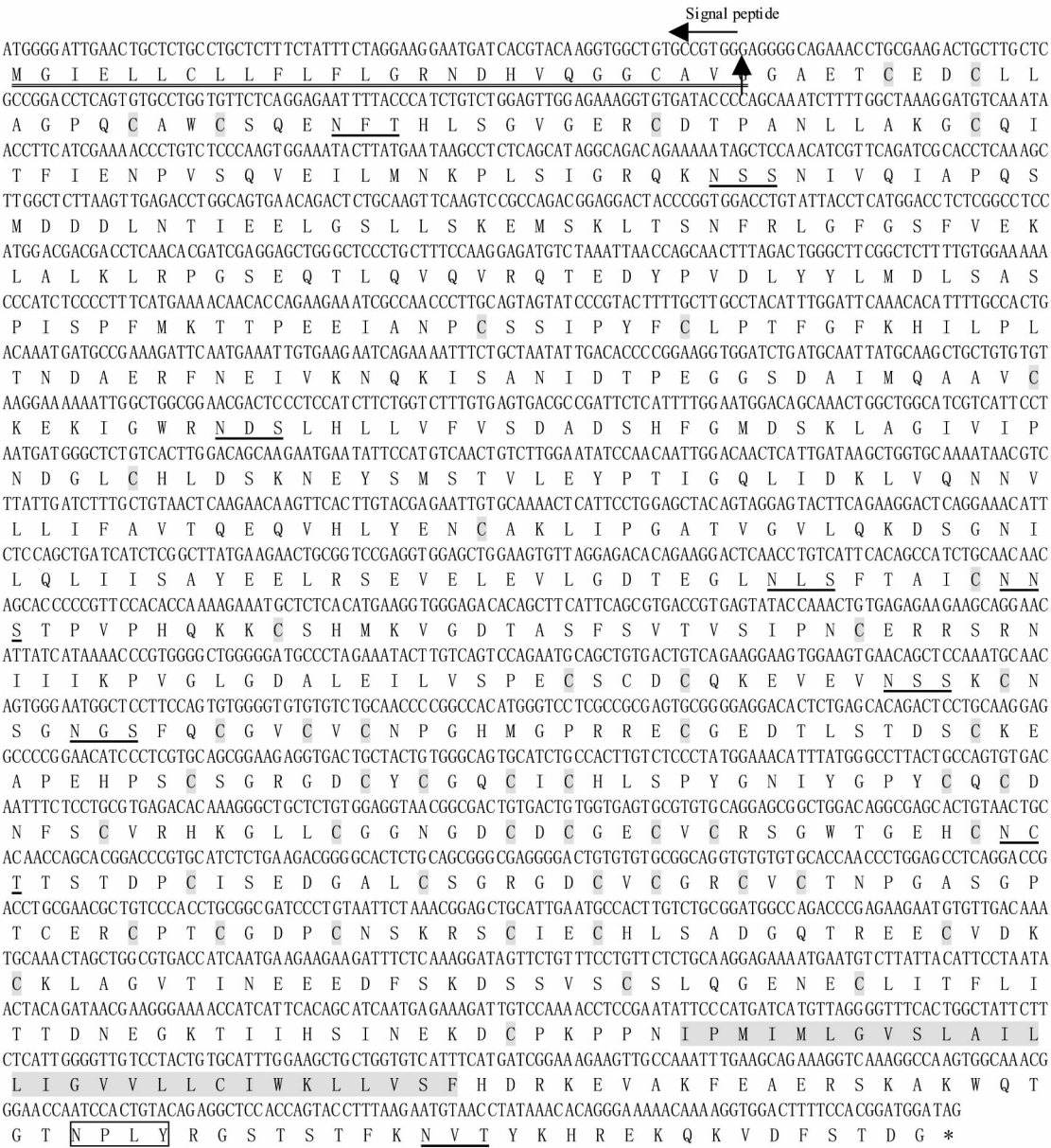


图2 双峰驼 $\beta 6$ 亚基的核苷酸及其预测的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence and predicted amino acid of bactrian camel $\beta 6$

The putative signal peptide is marked with the double underlines; The putative transmembrane domain is indicated by the shading; potential N-glycosylation sites are underlined; Cysteine residues are shaded; Arrows indicate putative cleavage sites; NPLY motif is boxed;The asterisk indicates the terminal codon

88.6%。双峰驼与不同物种来源的 $\beta 6$ 亚基各功能区段的核苷酸与氨基酸序列同源性有一定差异,跨膜区的同源性最高,平均氨基酸序列同源性达 98.9%,其次是胞浆域和胞外域,分别为 92.8% 和 91.8%,信号肽序列同源性最低仅 87.8% (表 1)。双峰驼与牛、猪、羊、人、小鼠、挪威大鼠 $\beta 6$ 亚基推导的氨基酸序列全长及其比较结果见图 3。从 $\beta 6$ 亚基的遗传进化树看,口蹄疫自然宿主双峰驼、牛、羊、猪等的亲缘关系较近,这些偶蹄动物则与人、小鼠、大鼠的亲缘关系较远(图 4)。

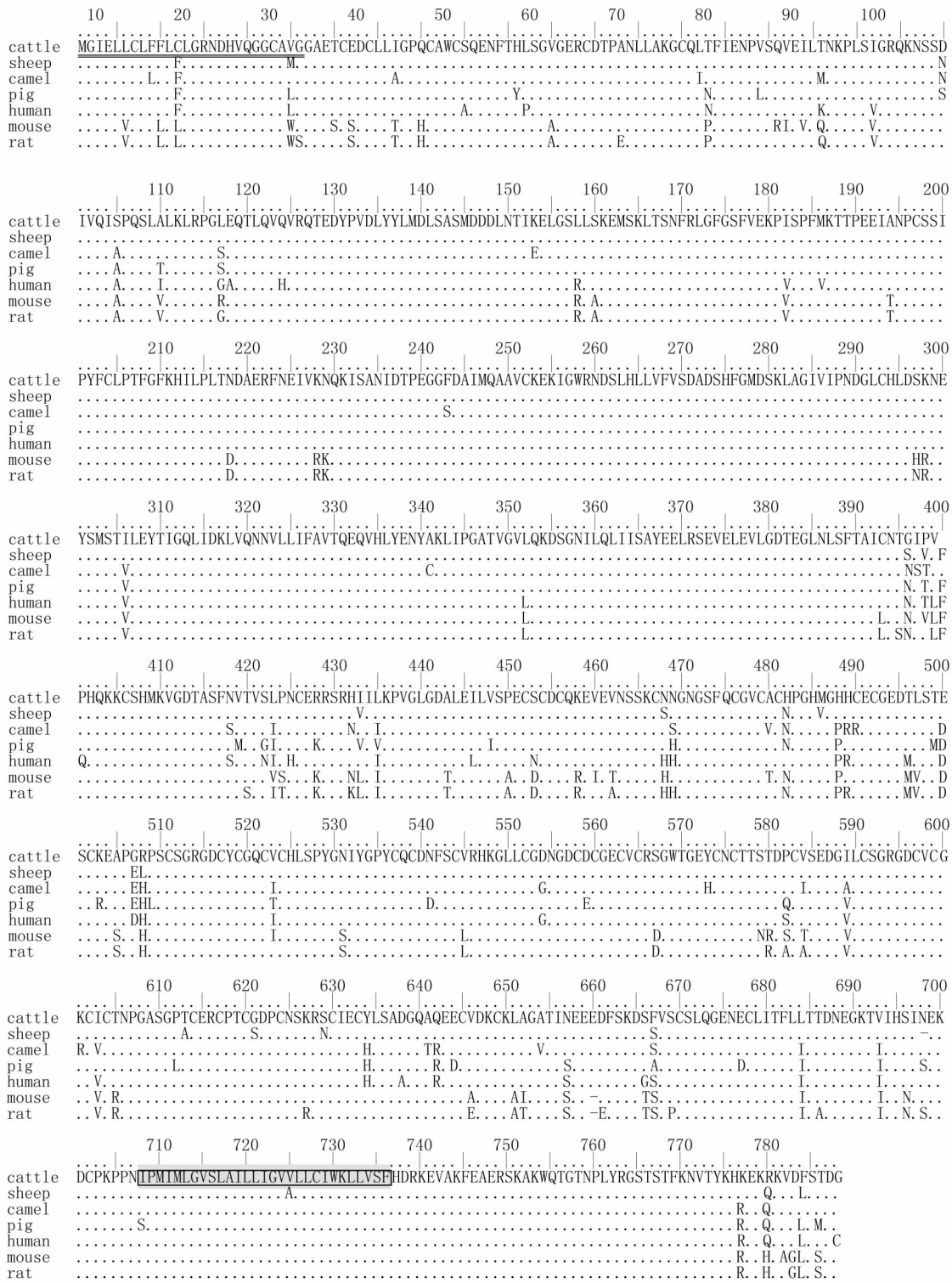


图3 双峰驼和几种动物 $\beta 6$ 的氨基酸序列比较

Fig.3 Alignment of predicted amino acid sequence of bactrian camel $\beta 6$ with other animal $\beta 6$

The putative signal peptide is marked with the double underlines; The putative transmembrane domain is indicated by the shading box;

(·) indicates sequence identity in relation to bovine $\beta 6$; (*) indicate identical residues; (-) indicates amino acid deletions;

Sequence dissimilarity is indicated in single letter code

表 1 双峰驼与几种动物 $\beta 6$ 亚基各功能区段的核苷酸和氨基酸同源性比较(%)^{a)}

Table 1 Nucleotide and amino acid similarities of integrin $\beta 6$ between bactrian camel and other animals

功能区 Function domain	牛 cattle	羊 sheep	猪 pig	人 human	鼠 mouse	挪威大鼠 Norway rat	平均值 Mean
成熟肽 Mature subunit	91.0	90.5	91.7	90.3	83.7	84.1	88.6
信号肽 Signal peptide	94.4	93.4	93.4	93.7	89.0	89.0	92.2
胞外域 Ecto - domain	93.6	93.6	96.2	96.2	83.3	82.1	90.8
跨膜区 Transmembrane domain	92.3	92.3	92.3	92.3	80.8	76.9	87.8
胞浆域 Cytoplasmic domain	90.7	90.2	91.3	90.1	83.7	83.9	88.3
	94.1	93.2	93.2	93.4	88.5	88.4	91.8
	90.8	89.7	95.4	95.4	89.7	88.5	91.6
	100	96.6	96.6	100	100	100	98.9
	95.6	95.0	94.3	89.3	80.5	84.3	89.8
	94.3	94.3	94.3	94.3	88.7	90.6	92.8

a) 表中奇数行表示核苷酸序列的同源性;偶数行表示氨基酸序列的同源性

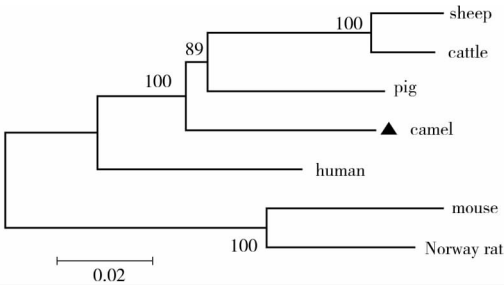


图 4 双峰驼和几种动物 $\beta 6$ 的遗传进化树
Fig. 4 Phylogenetic tree of bactrian camel and other animal $\beta 6$

3 讨论

整联蛋白是一类由 α 和 β 亚基非共价结合形成的膜蛋白家族,该蛋白家族包括由 18 种不同的 α 亚基和 8 种 β 亚基形成的 24 种 $\alpha\beta$ 复合物。整联蛋白的亚基属于 I 型穿膜蛋白,含有一个大的胞外结构域和小的穿膜与胞浆结构域,每条链都包括胞外区、穿膜区和胞浆区三部分。 α 和 β 链的氨基末端形成的球形区域部分为细胞外配体结合域。 α 链的胞外区含有二价阳离子(Mg^{2+})结合部位,胞浆区与特异性底物结合。 β 链胞外区氨基末端的氨基酸残基则通过链内二硫键紧密折叠在一起,胞内结构域含有特殊的序列,参与细胞内外的信号转导、整联蛋白的激活和亚基构象的改变,可与细胞骨架相连发挥信号转导作用^[9]。在 FMDV 与整联蛋白结合进入细胞的过程中信号转导的通路究竟如何目前尚无证据。在已经发现的 24 种整联蛋白 $\alpha\beta$ 复合物中,仅有 $\alpha v\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha v\beta 6$ 、 $\alpha v\beta 8$ 、 $\alpha v\beta 5$ 、 $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha 8\beta 1$ 、 $\alpha_{IIb}\beta 3$ 8 种整联蛋白能够识别 RGD 序列而与其配体相

互作用^[10],已发现前 4 种是 FMDV 的受体,后 4 种尤其是 $\alpha v\beta 5$ 和 $\alpha 5\beta 1$ 已被许多实验证实并非 FMDV 受体。 $\beta 6$ 是异二聚体 $\alpha v\beta 6$ 的一个亚基,单独存在时并不能介导 FMDV 感染。另外,整联蛋白也可作为其他病毒的受体或共受体,如鼻病毒、柯萨奇病毒、人肠道孤病毒、人腺病毒、汉坦病毒、艾博拉病毒等^[3]。

1995 年,Berinstein 等^[4]首次报道了 $\alpha v\beta 3$ 是 FMDV 的功能受体,后来人们发现 $\alpha v\beta 1$ 和 $\alpha v\beta 8$ 也是 FMDV 的受体^[6,7]。2000 年,Jackson 等^[5]发现正常情况下不感染 FMDV 的人 SW480 细胞在转染了人整联蛋白 $\beta 6$ cDNA 后,即变得对 FMDV 易感,且这种介导作用可被抗 $\alpha v\beta 6$ 的单克隆抗体所抑制,从而证实了 $\alpha v\beta 6$ 是 FMDV 的受体。最新研究表明, $\alpha v\beta 6$ 整联蛋白不仅对 FMDV 吸附起作用,而且在病毒的脱壳、复制等过程中也发挥着重要作用^[11]。整联蛋白胞浆域的保守基序 NPLY 在细胞信号转导过程中具有重要作用。Neff 等^[12]将人源 $\beta 6$ 胞浆域 C 末端大部分氨基酸残基或包含 NPLY 的核心区去掉后, $\alpha v\beta 6$ 则不能正常介导 FMDV 感染。本试验克隆的双峰驼 $\beta 6$ 亚基第 760~763 位氨基酸为 NPLY 基序,该基序在双峰驼感染 FMDV 过程中的作用机制有待进一步研究。FMDV 受体的发现均是以人源整联蛋白基因进行受体重建实验的。已有实验表明,与人源整联蛋白相比较,FMDV 能更加有效地利用牛源整联蛋白^[13],因此,开展口蹄疫自然宿主的受体研究对于揭示病毒的致病机制和宿主嗜性具有重要意义。本研究组此前已成功克隆到了猪和牛的 $\beta 6$ 亚基基因。本试验首次从双峰驼肺组织中克隆到了 $\beta 6$ 亚基基因并进行了序列分析。从序列比较结果看,口蹄疫自然感染宿主(双峰驼、猪、牛、羊等偶蹄动物) $\beta 6$ 亚基的亲

缘关系较近,而与人、小鼠、大鼠等口蹄疫非易感物种的进化关系较远。这是否表明不同物种间 $\beta 6$ 亚基的同源性高低与 FMDV 的宿主范围存在一定的相关性有待更多实验证明。本研究下一步拟构建分别表达牛、猪、双峰驼等 $\alpha \nu \beta 6$ 整联蛋白的细胞模型,进行不同物种来源的 $\beta 6$ 受体介导病毒感染的差异研究,阐明 $\beta 6$ 亚基与病毒宿主嗜性的关系。

参考文献

- [1] Fry E, Lea S M, Jackson T, et al. The structure and function of a foot-and-mouth disease virus-Oligosaccharide receptor complex. *EMBO J*, 1999, 18: 543 ~ 554
- [2] Thomson G R, Vosloo W, Bastos A D. Foot and mouth disease in wildlife. *Virus Res*, 2003, 91: 65 ~ 80
- [3] Norkin L C. Virus receptor: implications for pathogenesis and design of antiviral agents. *Clin Micro Rev*, 1995, 8(2): 293 ~ 315
- [4] Berinstein A, Roivainen M, Hovi T, et al. Antibodies to the vitronectin receptor (integrin $\alpha \nu \beta 3$) inhibit binding and infection of foot-and-mouth disease virus to cultured cells. *J Virol*, 1995, 69: 2664 ~ 2666
- [5] Jackson T, Sheppard D, Denyer M, et al. The epithelial integrin $\alpha \nu \beta 6$ is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 2000, 74: 4949 ~ 4956
- [6] Jackson T, Mould A P, Sheppard D, et al. Integrin $\alpha \nu \beta 1$ is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 2002, 76: 935 ~ 941
- [7] Jackson T, Clark S, Berryman S, et al. Integrin $\alpha \nu \beta 8$ functions as a receptor for foot-and-mouth disease virus: role of the b-chain cytodomain in integrin-mediated infection. *J Virol*, 2004, 78: 4533 ~ 4540
- [8] Monaghan P, Gold S, Simpson J, et al. The $\alpha \nu \beta 6$ integrin receptor for foot-and-mouth disease virus is expressed constitutively on the epithelial cells targeted in cattle. *J Gen Virol*, 2005, 86: 2769 ~ 2780
- [9] Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 2002, 110: 673 ~ 687
- [10] Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1996, 12: 697 ~ 715
- [11] Berryman S, Clark S, Monaghan P, et al. Early events in integrin $\alpha \nu \beta 6$ -mediated cell entry of foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 2005, 79: 8519 ~ 8534
- [12] Neff S, Baxt B. The ability of integrin $\alpha \nu \beta 3$ to function as a receptor for foot-and-mouth disease virus is not dependent on the presence of complete subunit cytoplasmic domains. *J Virol*, 2001, 75: 527 ~ 532
- [13] Duque H, Baxt B. Foot-and-mouth disease virus receptors: comparison of bovine $\alpha \nu$ integrin utilization by type A and O viruses. *J Virol*, 2003, 77: 2500 ~ 2511

Molecular Characteristics of cDNA Encoding Bactrian Camel $\beta 6$ Subunit for FMDV Receptor

DU Jun-zheng CHANG Hui-yun GAO Shan-dian WANG Jing-feng SHAO Jun-jun CONG Guo-zheng
LIN Tong CAI Xue-peng XIE Qing-ge

(National Foot-and-mouth Disease Reference Laboratory, Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China)

Abstract Receptors play a crucial role in determining the host specificity and tissue tropism of virus. Foot-and-mouth disease virus (FMDV) has been showed to use four integrins, $\alpha \nu \beta 1$, $\alpha \nu \beta 3$, $\alpha \nu \beta 6$ and $\alpha \nu \beta 8$ as receptors to initiate infection and $\alpha \nu \beta 6$ functions as the major receptor. The cDNA encoding bactrian camel integrin $\beta 6$ from the lung tissue was cloned and sequenced. The 2367bp cDNA of bactrian camel integrin $\beta 6$ encodes a polypeptide of 788 amino acids consisting of a 26-residue putative signal peptide, a 681-residue ectodomain with 8 potential N-linked glycosylation sites and 58 cysteine residues, a 29-residue transmembrane domain, and a 52-residue cytoplasmic domain with a NPLY motif and 1 potential N-linked glycosylation site. The nucleotide sequence similarity of integrin $\beta 6$ between bactrian camel and cattle, pig, sheep, human, mouse, Norway rat is 91.1%、91.8%、90.6%、90.5%、83.7%、84.1%, and the amino acid sequence similarity is 94.3%、93.4%、93.4%、93.7%、88.7%、88.6%, respectively. The bactrian camel $\beta 6$ gene exhibited the higher sequence homology with the $\beta 6$ gene of cattle, pig and sheep, indicating their close genetic relationships. It is possible that host tropism of FMDV may related to divergence in $\beta 6$ receptors among different species.

Key words FMDV Receptor Bactrian camel integrin $\beta 6$ cDNA Molecular characteristics