

FMDV OH99 株基因组全序列的测定及其基因特征研究*

刘光清, 刘在新, 张显升, 常惠芸, 郭慧琛, 李冬, 刘相涛, 谢庆阁**

(中国农业科学院兰州兽医研究所农业部畜禽疫病重点实验室, 甘肃兰州 730046)

The Sequence Analyses of Full-Length Genome of FMDV OH99 Strain

LIU Guang-qing, LIU Zai-xin, ZHANG Xian-sheng, CHANG Hui-yun, GUO Hui-chen, LI Dong, LIU Xiang-tao,
XIE Qing-ge**

(Lanzhou Veterinary Research Institute, Lanzhou 730046, China)

Abstract: The full-length genome of *Foot-and-Mouth disease virus* (FMDV) OH99 strain was cloned by RT-PCR and 3'RACE, and sequenced. The result shows that the full-length genome of OH99 strain is 8040nt in length, including 5'NCR, Leader protein coding region, Polyprotein coding region, and 3'NCR. Their nucleotide sequence is 1026nt, 603nt, 6318nt, and 93nt respectively. Besides, poly (A) tail was also cloned by 3'RACE, it's 56nt in length. The full-length genome of OH99 strain was compared with other reference strains, and its genome characteristic is also analyzed. With the help of some biological ware, The Phylogenetic tree obtained from the nucleotide sequence of VP1 gene from OH99 strain and ten reference strains shows that OH99 strain could be ranked FMDV O style. Furthermore, this strain and OTY TW/97 are in the same genotype, their nucleotide sequence share high homology, but it shows remarkable divergence with other reference strains, including china99 strain. For example, two short genome segment was deleted in the function-unknown region and 3A coding region of OTY TW/97 and OH99 strain. Which would affect the host tropism of virus. The results suggest OH99 and OTY TW/97 may come from the same ancestor, but the genetic distance between OH99 and other reference strains is far.

Key Words: *Foot-and-Mouth disease virus* (FMDV); OH99 strain; Non-coding Region; Structural protein

摘要: 采用 RT-PCR 方法对 FMDV OH99 株基因组全序列进行了分子克隆与测序。结果表明 OH99 株基因组全基因组序列长 8040nt, 其中 5'NCR 长 1026nt, 前导蛋白 (L) 编码区长 603nt。该毒株结构蛋白与非结构蛋白编码区的核苷酸序列为 6318nt, 3'NCR 长 93nt, 其后是 poly (A) 尾巴, 测序结果表明该结构至少含有 56 个 A。应用分子生物学软件, 将 OH99 株与其它参考毒株进行了序列比较, 并对其基因特征、推导的氨基酸序列进行了研究分析。结果显示, 在分类地位上 OH99 株归属于 O 型 FMDV, 与 OTY TW/97 具有较高的同源性, 而与其他参考毒株的差异性比较大, 而且在基因组功能未知区域和 3A 编码区域具有两处明显的基因片段缺失现象, 其中 3A 编码区缺失 30nt, 与 OTY TW/97 株相同, 但功能未知区域的缺失状况与 OTY TW/97 稍有差异。根据 VP1 基因序列, 对 OH99 株与参考毒株进行了系统发生树分析, 分析结果表明 OH99 株与 OTY TW/97 株在同一基因型内, 其遗传关系最近, 而与其毒株遗传关系较远。

关键词: FMDV; OH99 株; 分子克隆; 非编码区; 结构蛋白

中图分类号: S852.6

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2003) 03-0259-06

口蹄疫病毒 (*Foot-and-Mouth disease virus*, FMDV) 属于微小 RNA 病毒科, 口蹄疫病毒属

收稿日期: 2002-09-23, 修回日期: 2002-11-14

* 基金项目: 国家“973”项目资助 (G1999011901)

作者简介: 刘光清 (1968-), 安徽砀山县籍, 博士研究生, 主要从事动物病毒分子生物学等方面的研究。

** 通讯作者。Correspondence author. Fax: 0931-8340977

(*Aphthovirus*), 主要引起偶蹄兽发生口蹄疫。这是一种烈性传染病, 国际兽疫局 (OIE) 也一直将其列在“*A* 类动物疫病名单之首”。FMDV 是一种具有高度变异性的病毒, 其基因组的变异往往影响到病毒毒力、宿主嗜性以及抗原性等多方面的变化, 也是造成口蹄疫流行广泛, 难以消灭的一个重要原因。以前, 对 FMDV 的研究, 大多是针对牛、羊 FMDV 进行的, 对猪口蹄疫病毒的研究较少, 其全基因组序列资料更少, 目前仅台湾公布了猪口蹄疫病毒的基因组序列^[1]。为了从分子遗传学的角度进一步探讨猪 FMDV 与牛、羊 FMDV 的差异, 我们对猪源 FMDV OH99 株进行了研究。该毒株与国内外 FMDV 参考毒株均表现出不同的生物学特性, 对猪表现出高致病性, 鼠体接种也呈现较高的毒力作用, 接种 BHK-21 细胞系能产生典型的 FMDV 致细胞病变, 经血清学鉴定, 该毒株为 O 型 FMDV。本研究对 OH99 株的全基因组进行了克隆与测序, 并与国内外参考毒株进行了序列比较和分析, 讨论了它们之间的遗传关系。本研究为研究猪 FMDV 的致病机理、分子变异发生机制以及研制针对猪 FMDV 的新型基因疫苗奠定了物质基础。

1 材料与方 法

1.1 毒株

试验毒株 OH99 株是从猪体中分离到的口蹄疫病毒, 由兰州兽医研究所病毒室保存并提供。参考毒株分别为 O1K、OTY TW/97、China99、A12、AsiaI、O1Campos、C1, 其序列资料俱引自 GenBank。

1.2 工程菌与载体

本研究所使用的菌种为大肠杆菌 JM109。所使用的载体为 pGEM-T Easy (Promega)。

1.3 引物设计与合成

使用 Oligo.4.1 引物设计软件, 根据参考毒株 O1K 的基因序列, 分别设计了涵盖整个基因组序列的 6 对引物。

S₍₊₎ 5'-TTGAAAGGGGGCGCTAGGG-3'
 S₍₋₎ 5'-GGTGAAAGGCGGGCTTCGGGTGA-3'
 L₍₊₎ 5'-AAG TTT TAC CGT CGT TCC C-3'
 L₍₋₎ 5'-ATGTTTTCTTTTCACCGTTGTAGAG-3'
 C1₍₊₎ 5'-TCG GGA TCT GAG AAG GGG ATT-3'
 C1₍₋₎ 5'-CTG TCT GAG TCC GTA TTC GTG-3'
 C2₍₊₎ 5'-CCA CCC CGC AAC CTG CTA CCA-3'
 C2₍₋₎ 5'-ACT TTG ACC AAA CCG GCC AAC-3'
 D₍₊₎ 5'-ACCGGCCTTGAG ATTCTGGACAG-3'
 D₍₋₎ 5'-GCGCGAGCTTGGTTTTGCGCATC -3'

E₍₊₎ 5'-CATCGACCCCGAACCACACCAC -3'
 E₍₋₎ 5'-ACTAGTGCGGCCGCCATATGTT-3'
 E_{RT(-)} 5'-ACTAGTGCGGCCGCCATATGTT₁₅-3'

1.4 病毒 RNA 的提取

使用 RNaeasy Mini kit 提取病毒 RNA, 具体操作按照说明书进行。

1.5 FMDV OH99 株基因组全序列的扩增

使用所设计的 6 对特异性引物, 用高保真 RNA 聚合酶和 DNA 聚合酶, 进行 RT-PCR 反应, 分别扩增各目的基因片段。采用 3'RACE 方法扩增基因组 3'末端序列, 首先以引物 E_{RT} 进行反转录, 合成 cDNA 第一链, 以之做模板, 使用引物 E₍₊₎ 和 E₍₋₎, 进行 PCR 反应, 扩增 3'末端序列。

1.6 目的基因的克隆与鉴定

将各目的基因 PCR 产物纯化回收后, 分别克隆于 pGEM-TEasy 载体中, 转化 JM109 感受态细胞, 在 LB 培养基中过夜培养, 用碱裂解法提取质粒, 以 PCR 法和限制性内切酶酶切分析法鉴定阳性重组子。

1.7 OH99 株基因组全长 cDNA 序列的测定及装配

阳性重组子的测序由宝生物 (大连) 工程公司完成, 根据各基因片段的重复序列, 使用 DNA Club 等分子生物学软件, 将各基因片段首尾相连对接成基因组全序列。

1.8 OH99 株基因组序列的比较及其基因特征研究

用 DNA star 等分子生物学软件, 对 OH99 株基因组的核酸序列及推导的氨基酸序列进行分析研究, 并与参考毒株的序列进行比较分析。

1.9 FMDV OH99 株系统发生树分析

将 OH99 株的 VP1 基因分别与 O 型参考毒株: OTY TW/97、TW/99、RUS/95、SKR/2000、JPN/2000、O1Campos、AsiaI、China99、C1 等毒株的 VP1 基因进行序列比较, 使用 DNA star 软件绘制系统发生树, 研究分析 OH99 株与其它毒株的遗传进化关系。

2 结 果

2.1 FMDV OH99 株基因组全序列 PCR 扩增

使用所设计的 6 对特异性引物, 通过对 RT-PCR 条件的优化选择, 分别扩增出各目的基因片段, 其产物大小分别为 376bp、800bp、1662bp、1840bp、2500bp 和 1500bp, 与预期结果相符。使用 3'RACE 方法也扩增出 OH99 株的 3'末端序列和 poly (A) 结构。

2.2 阳性重组子的鉴定

以 PCR 法和限制性内切酶酶切分析法鉴定阳

性重组子, 结果证明得到目的基因产物。

2.3 序列测定及全长 cDNA 序列组装

根据各基因片段的重复序列, 使用 DNA star 等分子生物学软件, 将各基因片段首尾相连对接成

OH99 株基因组全序列(表 1)。序列测定结果表明, OH99 株基因组全长 8040bp, 其中 5'NCR 长 1026bp, 编码区全长 6921nt, 共编码 2307aa, 3'NCR 长 93bp, 其后是 poly(A)结构至少含有 56 个 A。

表 1 OH99 株基因组的组成
Table 1 The constitutes of the OH99 strain genome

Genome Segments	5' NCR			L	P1				P2			P3				3'NCR	
	S	Function unknow	Region		IRES	VP1	VP2	VP3	VP4	1A	2B	2C	3A	3B	3C		3D
Nucleotide	375	213		438	603	639	660	654	207	48	462	954	429	213	639	1413	95
Amino acid					201	213	220	218	69	16	154	318	143	71	213	471	

表 2 OH99 株与参考毒株的核苷酸和氨基酸序列(斜体)同源性比较

Table 2 Comparison of the percentage of the identity nucleotides (or amino acids in italics) of the RNA genome between OH99 strain and reference strains

Reference strain	OTY TW97		CHINA99		OIK		A12		C1	
S	86.8	-	79.1	-	67.3	-	76.9	-	74.9	-
5' NCR IRES	94.3	-	90.4	-	87.2	-	86.6	-	?	-
L	92.0	93.0	81.1	87.1	78.9	86.1	76.3	81.1	76.9	82.1
P1	91.2	95.5	82.5	95.5	79.1	90.5	66.3	78.4	68.6	?
P2	93.1	98.2	87.5	96.5	87.8	96.1	87.5	96.3	87.2	95.7
P3	94.2	98.2	86.0	92.9	85.3	94.1	85.1	92.1	84.7	93.5
3' NCR	91.0	-	74.2	-	66.3	-	73.0	-	65.2	-

2.4 FMDV 全基因组序列分析及其基因特征

2.4.1 5'NCR 的序列分析

5'NCR 位于病毒基因组的 5'端, 其序列为 1026nt。该区有一段特殊的 poly(C) 序列, 以该序列为界线可将 5'NCR 分为 S 段 (small fragment) 和 L 段 (long fragment)。S 段位于 5'NCR 的 5'末端, 以 U 碱基开始, 其核苷酸序列长 375nt。序列比较结果表明该区域核苷酸序列的变异率比较大, OH99 株核苷酸序列与 A12、C1、Asia1、O1K、O1Campos 株序列的核苷酸变异率分别为 19.1%、20.3%、20.1%、23.3%和 19.8%。但是它与 OTY TW/97 株的核酸同源性却比较高, 为 86.8%。值得注意的是, 该区的 G+C 含量比较高(约 60%), 而且四种碱基的分布有一定的特征, 例如在 S 片段的第 1~6、143~159、200~211、224~236 区域富含 A、T, 而在第 7~19 位 G 的含量高达 75%, 第 361~373C 的含量也为 75%, 在其它区域也有这种具有单一 C 或单一 G 重复排列的现象。poly(C) 序列下游的 5'NCR 称为 L 片段, 包括一个功能未知区域和内部核糖体进入位点 (Internal ribosome

entry site, IRES), 测序表明该区段长 651nt。其中功能未知区域长 213nt, IRES 区域长 438nt。序列比较结果显示, 功能未知区域第 24~44 和第 47~68 区域有碱基缺失现象(图 1), IRES 则是比较保守的区段, 与各参考毒株序列的同源性都在 85%以上(表 3), 与 OTYTW /97 株的同源性则高达 94.3%。在该区存在多个保守性基序, 分别位于第 23~28、39~67、74~83、89~99、101~106、112~120、135~149、152~162、165~173、183~193、219~241、266~274、279~289、293~338、342~365、266~274、392~405、409~417、419~432 等区域, 值得一提的是, OH99 株与 OTYTW97 株一样, 在第 245、439 位分别有一个碱基插入。IRES 区碱基的分布也富有特征性, 在第 10~21、28~38、373~382、391~405 区域富含 A、T 碱基, 而第 39~48、152~160、183~193、419~435 区域 G、C 的含量较高。

2.4.2 L 编码区的序列分析

OH99 株 L 蛋白编码区长 603nt, 编码 201aa。序列比较结果显示 OH99 株与 TW / 97 株的同源性最高, 其核酸序列和氨基酸序列的同源性分别为

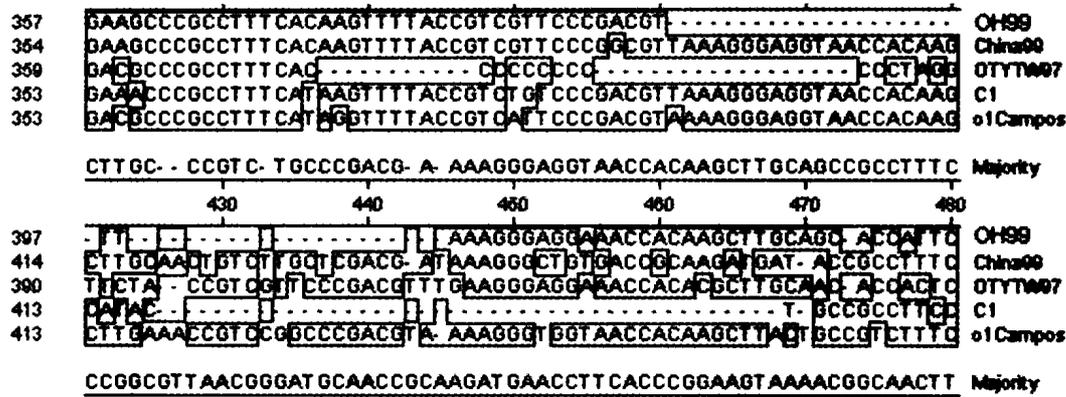


图 1 OH99 株与参考毒株功能未知区域的部分序列比较
 短线表示缺失的碱基，带有方框的碱基表示碱基的差异

Fig.1 Sequence comparison of function-unknown region of between OH99 strain and reference strains
 Dashes represent deletion, Boxes represent variance

92%、93%，与 A12 株的同源性最远，其核酸序列和氨基酸序列的同源性分别为 76.3%、81.1%。L 编码区有两个起始密码子：ATG，相隔 81nt，因而该区可有两种编码方式，其编码产物分别为 Lab 和 lb 两种蛋白。推导的氨基酸序列第 41~54、57~64、90~103、113~142、148~172、177~189 区域的氨基酸相当保守。在第 9、28、40、67、175、198、202、282、291、334、390 等位 OH99 株与 OTYTW/97 株分别发生相同的碱基突变，而其它参考毒株则分别为不同类型的碱基。

2.4.3 P1 区的序列分析

OH99 株 P1 区核苷酸序列长 2160nt，编码 720aa，该编码区含有四个小结构蛋白（VP4、VP2、VP3、VP1）编码区，其核苷酸序列分别是 207nt、654nt、660nt 和 639nt，推导的氨基酸序列则分别为 69aa、218aa、220aa 和 213aa。各结构蛋白之间的连接氨基酸分别为 Ala/Asp（VP4/VP2）、Glu/Gly（VP2/VP3）和 Gln/Thr（VP3/VP1），与已报道的资料相符合^[2]。VP1 区第 145~147 位氨基酸存在细胞受体结合位点：RGD 基序。序列比较结果表明（表 3），OH99 株与 OTY TW/97 株的核苷酸同源性与氨基酸同源性分别为 91.2%、95.5%，但与其他各毒株的同源性则较低，例如它与 CHINA99、O1K 株核苷酸序列同源性分别为 82.5%、79.2%。值得注意的是 OH99 株有些位点碱基的突变与 OTY TW/97 表现一致，有些突变碱基又与 OTY TW/97 不一致，而与 China99 或 Asia I 一致。总的来说，四种结构蛋白编码区所呈现的变异率差别很大，其中以 VP1 的变异率最大，VP3 次之，VP2 较小，VP4 最小。

VP1 发生变异的氨基酸主要是第 41、44、66、134、155、156 位氨基酸。在 OH99 株 VP1 基因中，G→A（90）、C→T（111）、A→G（141）、A→G（330）、G→A（351）、C→A（387）、G→A（597）等位点的突变是其它毒株所没有的。

2.4.4 P2 区的序列分析

OH99 株 P2 区的核苷酸序列长 1494nt，编码 498aa。含有这三非结构蛋白（2A、2B、2C）的编码区，其推导的氨基酸序列分别为 16aa、154aa、318aa。序列比较结果（表 3）表明该区是比较保守的区域，尤其是 2A 编码区，除与 A12 株第 15 位的氨基酸不同外，其余的氨基酸同源性都是 100%。OH99 株 P2 区与 OTY TW/97 的同源性最高，其核苷酸和氨基酸同源性分别为 93.1%、96.5%，与其他各型的 P2 区相比，其同源性也都在 85% 以上，在 2B、2C 编码区，该毒株与其它型各毒株主要表现在以下位点的差异：第 25（S→A）、28（S→T）、137（V→A）、159（R→Q）、182（I→V）、231（S→G）、418（I→V），但与 OTY TW/97 相同。

2.4.5 P3 区的序列分析

OH99 株 P3 区的核苷酸序列长 3694nt，编码 898aa，包括 4 种非结构蛋白（3A、3B、3C 和 3D）的编码区域，其推导的氨基酸序列长度分别为：143aa、71aa、213aa 和 471aa，在 3D 编码区末端有整个 ORF 的终止密码子 TAA。序列比较分析发现 3A 编码区极具特征性变化：第 92~101 位缺失 10aa 的编码序列，而且其侧翼序列氨基酸的突变也比较频繁（图 2）。3B、3C、3D 编码区则相对比较保守，只有个别的氨基酸发生变异，并没有特征性。相对

于 FMDV 基因组其他区域来说, P3 区是保守性最高的区域, 无论是同一基因型内还是不同基因型间

的毒株, 其核苷酸同源性都在 85% 以上, 氨基酸同源性则在 90% 以上 (表 2)。

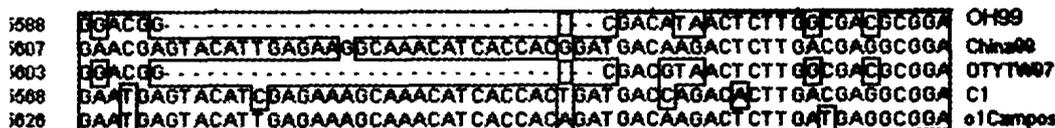


图 2 OH99 株 3A 部分基因与参考毒株的序列比较

Fig.2 Sequence comparison of OH99 and reference strains in3A coding region

Dashes represent deletion, Boxes represent variance

2.4.6 3'NCR 的序列分析

本研究使用 3'RACE 方法成功克隆到 OH99 株的 3'末端序列及 poly (A) 结构。测序结果表明 3'NCR 位于终止密码子之后, 长 93nt, 随后的 poly (A) 尾巴至少长 56nt。序列分析结果表明, OH99 株的 3'NCR 与 OTY TW/97 的核苷酸同源性较高, 为 91.0%, 而与其他毒株的同源性则比较低 (表 2)。该区核苷酸的变异率较大, 主要集中于的第 23~30、64~68 位核苷酸, 其中第 65 位还缺失一个 C/T 碱基。但 3'NCR 仍存在一些保守性基序: TCCCTCAGA、CTGAGGCG、AGGAGTG、TTTTCCCGCTTCCT、CTTAATCC 等。

2.5 系统发生树分析

将 OH99 株的 VP1 基因与 OTY TW/97 等 10 株参考毒株的 VP1 基因序列进行了序列比较和分析, 并使用 DNA star 软件绘制了系统发生树 (图 3)。

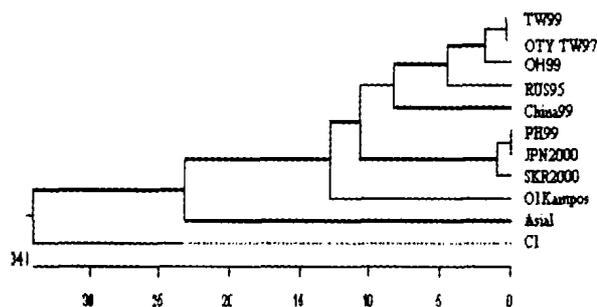


图 3 根据 VP1 基因对 OH99 株与参考毒株绘制系统发生树

Fig.3 Phylogenetic tree obtained from the nucleotide sequence of VP1 gene from OH99 strain and ten reference strains

系统发生树显示 OH99 株与 TW/99、OTY TW/97 的遗传关系最近, 其离核苷酸同源性在 90% 以上, 与 CHINA99 及其它毒株的同源性较低, 都在 85% 以下, 表明其遗传关系更远。根据核苷酸序列同源性大于 85% 为一个基因型, 大于 90% 为一个亚型的

基因分型原则^[3], 则 OH99 株 OTY TW/97、TW/99、RUS/95 为同一基因型, 而 OH99 与 OTY TW/97、TW/99 位于同一基因亚型。

3 讨论

本研究直接从病料组织中提取病毒 RNA, 应用高保真 RNA 聚合酶和 RNA 聚合酶, 进行 RT-PCR 反应, 最大限度地降低了 PCR 反应过程中可能产生的核苷酸变异, 而经宿主转换的 RNA 病毒基因组的序列往往会发生不同程度的基因变异, 因此本研究所得到的病毒基因组序列是比较接近自然毒的基因组的。但我们没有克隆出 FMDV 特有的 poly (C) 序列, 其原因可能是: 1) 现有的模板依赖性 DNA 聚合酶难以忠实的产生这样的序列。2) 宿主细菌不能忠实的维持含有长聚合物 dC-dG 序列的 DNA 质粒。迄今, 国内外尚没有关于克隆到 poly (C) 自然序列的报道。即使在构建感染性 cDNA 时, 也是通过人工合成方法或利用末端转移酶的催化活性, 在目的 DNA 片段末端加上短 dC-dG 寡聚核苷酸序列, 以恢复病毒的感染性^[4, 5]。

5'NCR 的核糖体进入位点 (IRES) 是一种顺式作用元件, 在反式作用因子 (如 eIF2) 的帮助下, 可启动 FMDV 基因组内部翻译的开始过程^[6]。其顺式元件作用的发挥要求具有一定稳定性的二级结构的支持, 因此在 IRES 区存在众多的保守性基序, 并形成比较稳定的二级结构。序列比较结果还显示, 在 OH99 株的功能未知区域有两段碱基缺失, 与参考毒株明显不同。无独有偶, 在 3A 编码区也发生了长达 30 个碱基的缺失。至于其生物学意义, Beard 等^[7]的研究证明这种突变可能会导致病毒毒力的改变, 进而影响病毒宿主嗜性的改变。OH99 株非结构蛋白编码区比较保守, 这与其编码产物的生物学功能有一定关系。其中 P3 区的 3D 编码病毒的复制酶, 该区的高度保守性, 对于维持 FMDV 的正

常复制十分重要^[8]。FMDV 结构蛋白 (VP1、VP2、VP3、VP4) 编码区则具有很大的基因变异性, 其中 VP1 区是变异率最大的区域, 我们的研究结果也证明了这一点。

应用 3'RACE 方法, 我们得到了 3'NCR 的真实序列, 其序列虽不长, 但是在病毒的复制过程中却具有不可替代的功能, 一些保守性的基序的存在无疑对维持该区的正常生物学功能具有重要作用^[9]。同时, 我们还得到了 FMDV 基因组的 poly (A) 结构, 据报道 FMDV 自然毒株基因组的 poly (A) 尾巴长约 35~100nt^[10], 我们的结果与此相似, 为 56 个 A。用 RT-PCR 方法得到如此长的 FMDV poly(A) 结构, 目前还没有见报道。

根据 VP1 基因序列, 我们对 OH99 株与 10 株参考毒株进行了系统发生树分析, 结果显示所选用的 10 株 O 型 FMDV 参考毒株可分为 4 个基因型, 其中 OH99 株 OTY TW/97、TW97、RUS95 株为同一基因型, 表明它们具有较近的亲缘关系, 而与其它参考毒株的遗传关系则较远。

本研究的序列分析结果表明, OH99 株是一株独具特色的口蹄疫病毒, 深入研究猪源 FMDV 和牛源 FMDV 的遗传关系和生物学特性的异同具有重要意义。本研究不仅对研究猪 FMDV 的基因功能、致病机理、表达调控的机制等提供了物质材料, 而且为研制新型猪 FMD 基因工程疫苗或核酸疫苗奠定了良好的物质基础。

参考文献

- [1] Beard C W, Mason P W. Genetic determinants of altered virulence of Taiwanese foot-and-mouth disease virus [J]. *J Virol*, 2000, 74, 987-991
- [2] Joachim S, Alba G, Ernst B, *et al.* The structures of picornaviral proteinases[J]. *J Virus Res*, 1999, 62: 159-168
- [3] Rico-Hess E R, Pallansch M A, Nottay B K, *et al.* Genophic distribution of wild poliovirus type I genotypes[J]. *Virology*, 1987, 160: 311-322
- [4] Rieder E, Bunch T, Brown F, *et al.* Genetically engineered foot and mouth disease virus with poly (C) tracts of two nucleotide are virulent in mice [J]. *J Virol*, 1993, 67: 5139-5145
- [5] Zibert A, Maass G, Strebel K, *et al.* Infectious foot and mouth disease virus derived from a cloned full-length cDNA [J]. *J Virol*, 1990, 64: 2467-2473
- [6] Lope de, Quinto S, Martinez-Salas E. Conserved structural motif located in distal loops of aphthovirus IRES domain 3 are required for internal initiation of translation [J]. *J Virol*, 1997, 71: 4174-4175
- [7] Beard C W, Mason P W. Genetic determinants of altered virulence of Taiwan FMDV [J]. *J Virol*, 2000, 74: 987-991
- [8] Xiang W A, Cuconati D, Hope k, *et al.* Complete protein linkage map of poliovirus P3 protein: interaction of polymerase 3D^{pol} with genetic variants of 3AB [J]. *Virology*, 1998, 72: 6732-6741
- [9] Saiz M, Gomez S, Martine-salas E. Deletion or substitution of the poliovirus 3NCR abrogate infectivity and virus replication [J]. *J Gen Virol*, 2001, 82: 93-101
- [10] Barry B, Marvin J G, Howard L B. The relation of poly (A) length to specific of viral RNA: A comparison of different types of foot and mouth disease virus [J]. *Virology*, 1979, 98:480-483