

猪圆环病毒 2 型广东株全基因组的克隆与序列分析

张得玉, 何逸民, 秦宏阳, 张翔峰, 何冉娅, 曹宗喜, 张桂红
(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:根据 GenBank 已发表的猪圆环病毒 2 型(PCV2) 全基因组序列,设计 2 对特异性引物,对广东省不同地区规模化猪场采集的疑似断奶仔猪多系统消耗综合征(PMWS) 组织病料进行了 PCV2 全基因组克隆和序列分析. 结果表明,PCV2 核苷酸序列较稳定,不同地区 6 个 PCV2 毒株全基因组序列均由 1 767 bp 组成,彼此间核苷酸序列相似性达 95.3% ~ 99.8%,亲缘关系密切;与 GenBank 已发表的国内不同地区 PCV2 参考毒株的相似性介于 70.1% ~ 99.1%;与欧洲各地区毒株的相似性介于 67.7% ~ 98.8%;其中与美国的毒株(AY094619) 差异性最大,介于 69.4% ~ 70.8% 之间.

关键词:猪圆环病毒 2 型; 全基因组; 序列分析
中图分类号:S851.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-411X(2010)01-0083-04

Cloning and Sequencing of Complete Genome of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Guangdong Strains

ZHANG De-yu, HE Yi-min, QIN Hong-yang, ZHANG Xiang-feng,
HE Ran-ya, CAO Zong-xi, ZHANG Gui-hong
(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: According to the genomic sequence of PCV2 published in GenBankTM, two pairs of primers were designed to amplify the complete genomes of PCV2 from the tissue of pigs suspected with PMWS sampled in different districts of Guangdong Province. The results showed that the complete genome of every strain consisted of 1 767 nucleotides. Nucleotide sequence homology between the six PCV2 isolates were found to be 95.3% – 99.8% respectively. The homologies were 70.1% – 99.1% compared with the sequences of PCV2 from different regions in China published in GenBankTM, 67.7% – 98.8% as compared with the sequences of PCV2 in different regions of Europe. The homologies were 69.4% – 70.8% compared with the sequence of the USA strain (AY094619), with which the variability was the biggest.

Key words: porcine circovirus type 2; complete genome; sequence analysis

猪圆环病毒(Porcine circovirus, PCV) 为圆环病毒科 Circoviridae 圆环病毒属成员,单股环状 DNA 病毒,为已知的最小动物病毒之一. PCV 存在 2 种血清型,即 PCV1 和 PCV2,两者的细胞培养物均不产生细胞病变^[1-3]. PCV2 首先由 Allan 等^[4] 从患断奶仔猪多系统衰竭综合症(Post-weaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) 的猪群中分离到,被证明为 PMWS 的重要病原之一. 此病主要侵害 6 ~ 12 周龄断奶仔猪,而主要症状为渐进性消瘦,黄疸和呼吸困难,剖检见淋巴结肿大,间质性肺炎,肺部弥漫性充血,肾脏苍白. PCV2 可以垂直传播,也可水平传播. 1991 年,PMWS 首先报道于加拿大,随后美国、法国、英国、意大利等国都相继报道了此病. 1998 年至今,中国、日本、韩国等亚洲国家养猪业都受到了 PCV2 感

染的威胁^[5]. 因此, PCV2 给养猪业造成巨大的经济损失, 已引起世界各国的广泛关注. 目前 PCV2 在国内广泛流行, 了解不同地区 PCV2 毒株间的遗传差异对预防和控制 PCV2 的流行具有重要意义. 为此我们对 2007—2009 年从广东省 6 个不同地区规模化猪场采集的疑似 PMWS 病料进行了 PCV2 全基因克隆和序列分析, 确定 PCV2 毒株基因序列的变异情况, 为我国 PCV2 毒株的分子流行病学及毒株来源的研究奠定基础.

1 材料与方法

1.1 病料

2007—2009 年采集于广东省佛山、惠州、梅州、增城、珠海、江门等地区疑似 PMWS 发病猪场病死猪的病料, 并分别命名为 FS、HZ、MZ、ZC、ZH、JM.

1.2 仪器

ZENTRIFUGEN ROTOFIX32 离心机(美国 Hettich 公司产品)、5145 小型台式高速离心机(德国 Eppendorf AG 公司)、PTC-200 型 PCR 仪(美国 MJ Research 公司)、T gradient PCR 仪(德国 Whatman Biometra 公司)、InGenius Bio Imaging 凝胶成像及分析系统(英国 GYNDENE 公司).

1.3 试剂

pMD18-T 载体为宝生物工程(大连)有限公司产品. DL2000 DNA Marker 为宝生物工程(大连)有限公司产品. 质粒快速提取试剂盒及 DNA 纯化试剂盒为 Omega 公司产品. 用于鉴定的 *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L)、dNTPs(100 mmol/mL)为北京鼎国生物有限公司产品. 基因工程菌 DH5 α 由华南农业大学兽医学院传染病教研室保存.

1.4 引物

根据 GenBank 中 PCV2 全基因组序列设计以下引物: P1: 5'-GCACGTCAGCAGCAACAT-3', P2: 5'-CTCGCGCCATACCATAAC-3' 预期扩增片段长 1 266 bp(A 片段); P3: 5'-AGAAGGGCTGGGTTATG-GTAT-3', P4: 5'-CGCTCGTCTTCGAAGG-3' 预期扩增片段长 632 bp(B 片段). 引物由上海英骏公司合成, 用前溶解于灭菌的 ddH₂O 中, 浓度为 25 μ mol/L, -20 $^{\circ}$ C 保存.

1.5 病毒 DNA 的提取

在 200 μ L 样品中加入 400 μ L DVI Buffer, 混匀; 加入 3 μ L Proteinase K, 混匀, 55 $^{\circ}$ C 保持 5 min; 加入 260 μ L 无水乙醇, 混匀, 然后用 1 mL TIP 头将样品全部转移到 UNIQ-10 柱, 柱子放入 2.0 mL 离心管.

用台式离心机, 10 000 r/min, 室温离心 1 min. 取下 UNIQ-10 柱, 弃去离心管中的废液. 将柱子放回同一根离心管中, 加入 500 μ L Wash Solution, 10 000 r/min, 室温离心 1 min. 再重复洗 1 次后取下 UNIQ-10 柱, 弃去离心管中的废液, 将柱子放回同一根离心管中, 10 000 r/min, 室温离心 1 min, 以除去残留的 Wash Solution. 将柱子放入一新的无菌的 1.5 mL 离心管中, 在柱子中央加入 30 μ L Elution Buffer, 室温放置 2 min. 10 000 r/min, 室温离心 1 min, 离心管中的液体即为病毒 DNA. 根据用途, 样品可以 4 $^{\circ}$ C 或 -20 $^{\circ}$ C 保存备用.

1.6 PCV2 核酸片段的扩增

两片段 PCR 扩增采用相同条件. 所加 PCR 成分按试剂盒说明书. PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 变性 10 min 后, 按 94 $^{\circ}$ C 1 min, 54 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min 共进行 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. 用 0.1 kg/L 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物.

1.7 PCR 产物的克隆

取 2 μ L 回收的 PCR 产物与 5 μ L 的 Ligation Solution I, 1 μ L 的 pMD18-T 和 2 μ L 的 ddH₂O, 在 16 $^{\circ}$ C 连接过夜. 转化 DH5 α 感受态细胞. 挑取白色菌落接种于 3 mL 含 Amp⁺ 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜.

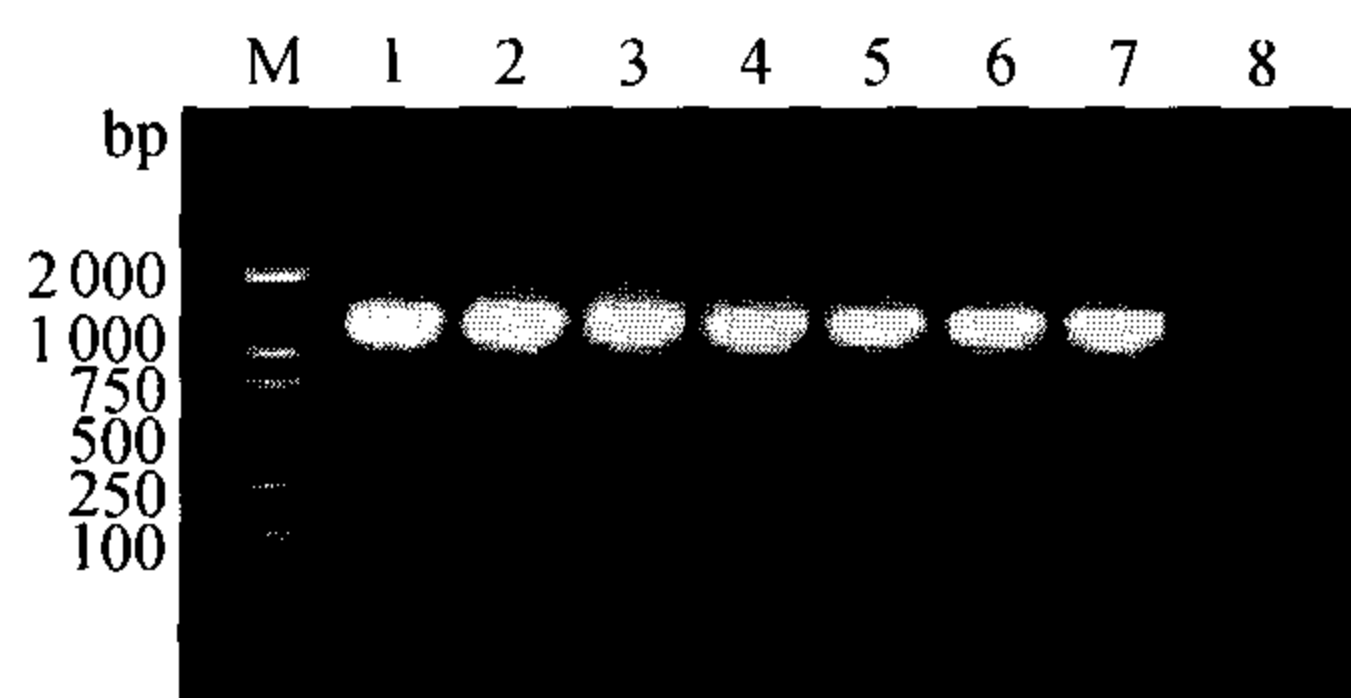
1.8 可疑重组质粒的筛选

采用菌落 PCR 法筛选阳性重组质粒. 待含 Amp⁺ 平板上的菌落长到合适大小, 先按 25 μ L PCR 体系在 0.5 mL PCR 管内配置 PCR 液: 即 10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μ L, dNTPs 2 μ L (2.5 mmol/L), 上游引物 0.5 μ L (25 pmol), 下游引物 0.5 μ L (25 pmol), Ex *Taq*TM 0.1 μ L (0.5 U), ddH₂O 19.5 μ L. 然后用无菌牙签蘸取 1 个单菌落, 快速将牙签插入 0.5 mL PCR 管的反应液中, 在 PCR 仪中进行扩增反应, 同时设立阴性 PCR 对照. 若扩增出与目的条带相近大小的特异性片段, 可以将相应菌落判定为阳性菌落, 再对鉴定的阳性克隆送上海博尚公司测序, 对测序结果用 DNASTar 软件进行序列分析.

2 结果

2.1 PCV2 核酸片段扩增结果

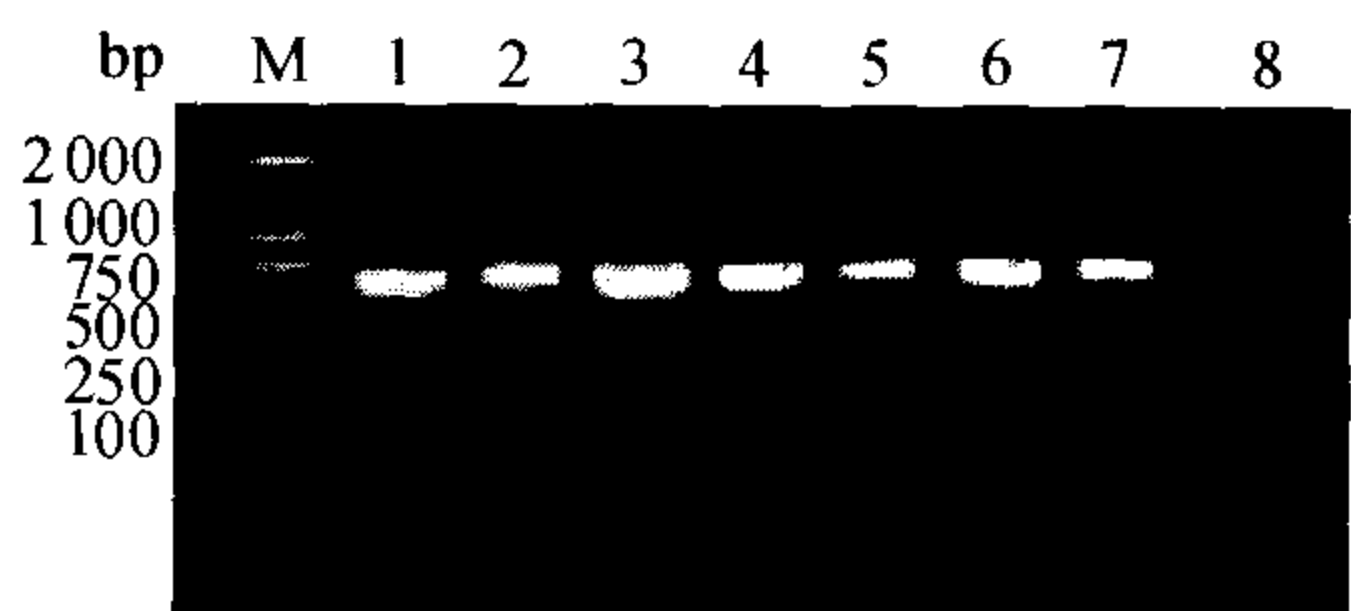
以组织中提取的总 DNA 为模板, 应用 2 对特异性引物分别进行 PCR 扩增, 经琼脂糖凝胶电泳后, 分别获得了 1 266 bp 和 632 bp 的目的片段, 与预期大小一致, 结果见图 1、图 2.



M: DNA Marker DL2000; 1~6 分别为 FS、HZ、MZ、ZC、ZH、JM; 7: 阳性对照; 8: 阴性对照

图1 PCV2 各分离毒株 A 片段 PCR 扩增结果

Fig. 1 Results of A fragments of each PCV2 strain of PCR



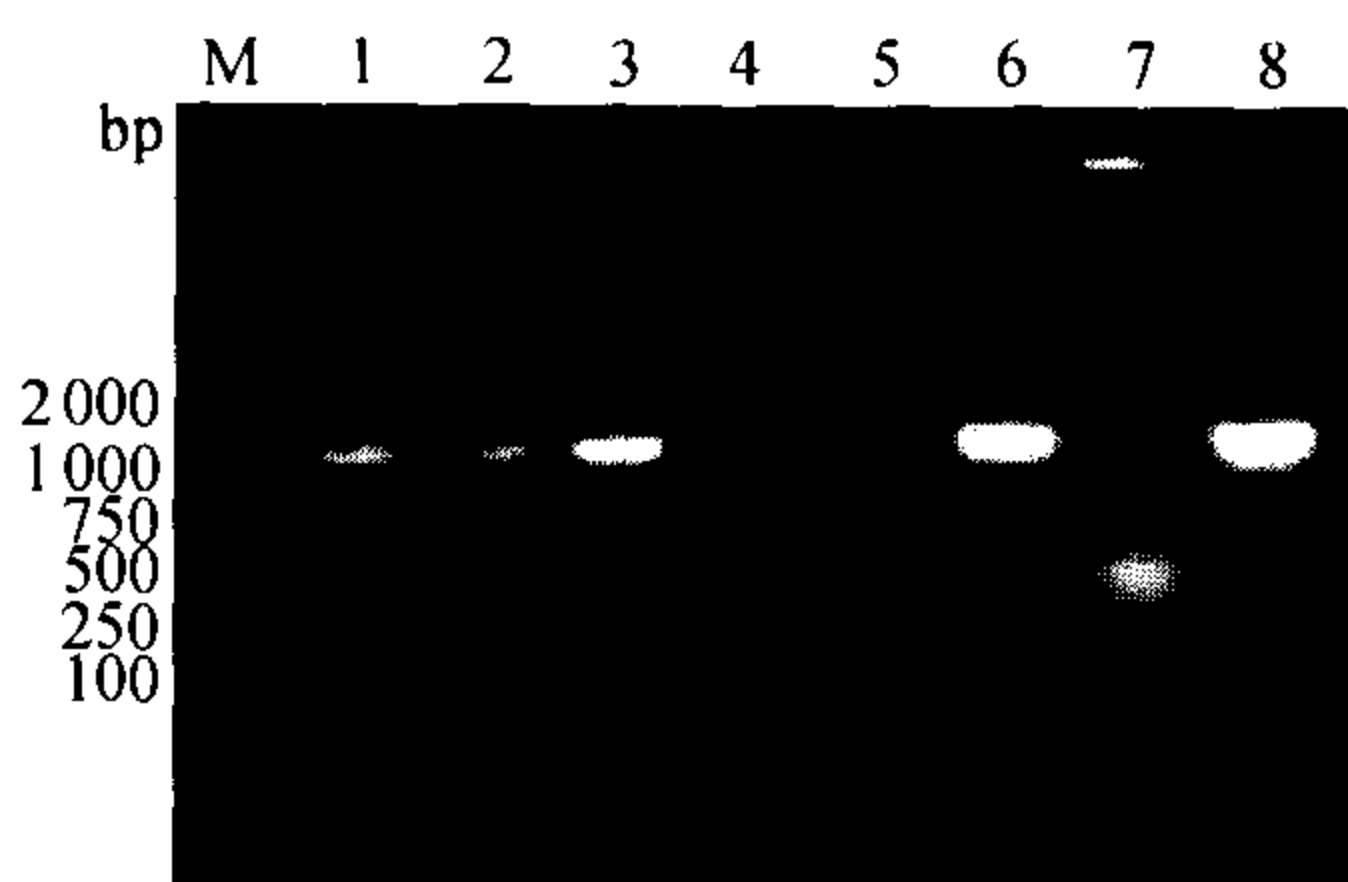
M: DNA Marker DL2000; 1~6 分别为 FS、HZ、MZ、ZC、ZH、JM; 7: 阳性对照; 8: 阴性对照

图2 PCV2 各分离毒株 B 片段 PCR 扩增结果

Fig. 2 Results of B fragments of each PCV2 strain of PCR

2.2 PCR 扩增产物的克隆

将 PCR 扩增产物与 pMD18-T 载体连接转化后, 随机挑取 8 个单个白色菌落, 摇菌 4~6 h 后做菌液 PCR 鉴定. 鉴定结果见图 3、图 4.



M: DNA Marker DL2000; 1~8: 挑取的单个白色菌落

图3 PCV2 A 片段 PCR 扩增产物的克隆

Fig. 3 The cloning of PCR products of PCV2 A fragments



M: DNA Marker DL2000; 1~8: 挑取的单个白色菌落

图4 PCV2 B 片段 PCR 扩增产物的克隆

Fig. 4 The cloning of PCR products of PCV2 B fragments

2.3 PCV2 分离株的序列测定及分析

序列分析表明, 6 株 PCV2 分离株全长均为 1 767 bp, 与资料报道相一致^[1]. 应用 DNASTar 将其与 GenBank 中的已知 PCV2 参考毒株进行相似性比

较, 广东省不同地区的 6 株序列之间的相似性最高, 介于 95.3%~99.8% 之间, 亲缘关系密切; 与国内不同地区毒株的相似性在 70.1%~99.1%; 与欧洲各地区毒株的相似性介于 67.7%~98.8%; 其中与美国的毒株 (AY094619) 差异性最大, 介于 69.4%~70.8%; 而美国毒株 (AY094619) 与欧洲各国及国内各地毒株的相似性参差不齐, 介于 70.0%~95.3%.

为了更好地了解 PCV 毒株的遗传学特性及相互的亲缘关系, 在分析所有毒株相似性的基础上绘制了系统发生进化树, 见图 5. 图 5 可以看出, 广东省不同地区的 6 个毒株在同一个大的分支上, 亲缘关系比较近. 而加拿大和美国 2 个北美国家的毒株分别在进化树的两端, 与其他毒株的亲缘关系比较远. 国内的不同地区的毒株如江苏 (FJ644559)、河北 (DQ910866) 等与欧洲各地区的毒株亲缘关系较近. 而欧洲各地区毒株的亲缘关系比较近. 由此可见, 虽然 PCV2 只有 1 个基因型, 但不同国家或地区的分离毒株系统进化树分析表明, 不同的 PCV2 分离株在进化上存在明显的地域相关性.

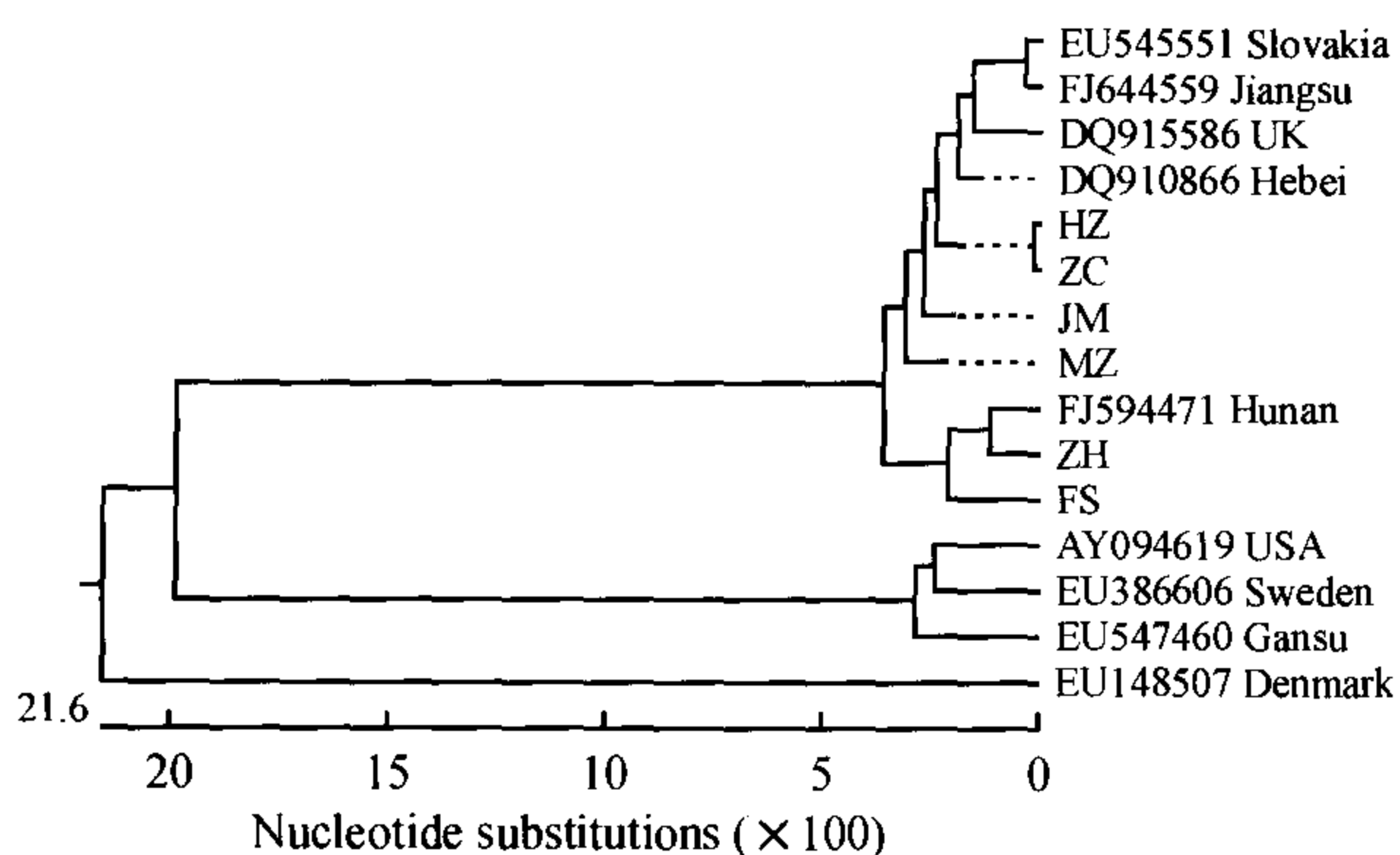


图5 PCV2 分离株的系统发生进化树

Fig. 5 Phylogenetic cladogram of the PCV2 strains

3 讨论

PMWS 是近 10 多年来出现的影响世界养猪业的重要传染病之一, PCV2 是引起该病的主要病原, 但不是惟一病原, PCV2 单独感染可出现轻微的病変^[6-7]. 用 PCV2 与猪细小病毒 (Porcine parvovirus, PPV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 同时感染仔猪可复制出典型的 PMWS 症状^[8-10]. 临床上出现的 PMWS 病例多为 PCV2、PPV 及 PRRSV 的混合感染. 尤其是最近几年暴发的猪高致病性蓝耳病 (即高致病性猪繁殖与呼吸综合征), 更是伴随有 PCV2 的感染^[11-12]. 有研究表明, 将 PCV2 与 PRRSV 混合感

染3周龄健康仔猪,出现了PRRSV单独感染时所没有的病变^[13]。目前,PCV2的致病机理及各个阅读框的功能还在进一步的研究当中。所以,对该病毒序列的分析,为进一步的病毒功能性研究奠定了基础。同时也为该疫病的防治提供了理论依据。

通过对2007—2009年从广东省不同地区采集的疑似PMWS病料进行PCV2全基因组克隆,得到6个PCV2全基因组序列。相似性分析表明,这6个毒株彼此关系密切,相似性在95.3%以上,并没有随着时间和地区的不同而发生较大的变异,这可能与本地区的习惯性引种有关。系统进化分析结果表明,这6个毒株与国内的毒株亲缘关系比较近,处于同一个分支上。其中瑞士(EU386606)和英国(DQ915586)2个国家的毒株与国内的几个毒株在同一个大的分支上,跟中国各地区的亲缘关系比较近。而美国毒株(AY094619)与国内各地区的毒株亲缘关系参差不齐。由进化分析结果可以看出,国内的PCV2分离株还与欧洲等国家的分离株的亲缘关系较近。这表明广东省不同地区PCV2有的可能从欧洲国家传入。因此,我国应加强引进种畜禽的检疫,杜绝疫病的传入。同时应加强对PCV2的研究工作,进行广泛的流行病学调查,掌握PCV2流行规律,制定有效的防控措施。

本研究通过对广东省不同地区PCV2序列的分析,明确了目前我国PCV2流行毒株基因组的分子学特征。虽然由于引种等因素造成了PCV2存在一定的地区差异性,但是,毒株之间亲缘关系密切,变异度不大。因此,在没有有效疫苗的情况下,我们可以运用传统的方法或分子生物学方法,进行有效的检测和防控。目前,虽然国外已经研制出有效的疫苗,但是由于病毒区域性差异等因素的影响,还需要作进一步的试验研究才能应用于临床。所以本试验对广东省多个地区PCV2进行了序列分析及相似性的研究。对于进一步开展我国PCV2所致疾病的预防与控制具有重要的指导意义。

参考文献:

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2版. 北京:科学出版社,1997.
- [2] 何逸民,罗玉钧,孔留五,等. 两株猪圆环病毒2型

ORF2基因的克隆和序列分析[J]. 动物医学进展, 2007,28(11):4-7.

- [3] 何逸民,孔留五,罗玉钧,等. 2株猪圆环病毒2型全基因组的克隆及序列分析[J]. 华南农业大学学报,2008, 29(3):81-84.
- [4] ROMAN M, YOON K J, PERRY A H, et al. Characterization of immune response of young pigs to porcine circovirus type 2 infection[J]. *Viral Immune*, 2000, 13:143-153.
- [5] ALLAN G M, JOUN A. Porcine circovirus: A review[J]. *J Vet Diagn Invest*, 2000, 12:3-14.
- [6] OPRIESSNIG T, MADSON D M, PRICKETT J R, et al. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and PCV2 coinfection[J]. *Veterinary Microbiology*, 2008, 131(1/2):103-104.
- [7] 王天户, 娄忠子, 刘思当. 猪PRRSV单独感染及与PCV2混合感染的免疫病理学研究[J]. 西南农业学报, 2008, 21(1):187-190.
- [8] MARTIJN F, PATRICK G H, MIKE G, et al. Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV1 and PCV2[J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(7): 2494-2503.
- [9] 萨姆布鲁克, 弗里奇, 曼尼阿蒂斯. 分子克隆试验指南[M]. 2版. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 北京:科学出版社, 1997.
- [10] LIU Q, WILSON P, ATTOHPOLU S, et al. Bacterial expression of an immunologically reactive PCV2 ORF2 fusion protein[J]. *Protein Expression*, 2001, 21(1):115-120.
- [11] 温永俊, 吴国军, 蔡雪辉, 等. 猪圆环病毒和猪繁殖与呼吸综合征病毒混合感染对仔猪致病性的评估[J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(5):336-340.
- [12] 徐绍建, 李俊, 曹帅, 等. 猪圆环病毒2型全序列分析及感染性克隆的构建[J]. 中国兽医杂志, 2009, 45(1): 21-23.
- [13] TOMAS A, FERNANDES L T, VALERO O, et al. A meta-analysis on experimental infections with porcine circovirus type 2 (PCV2) [J]. *Veterinary Microbiology*, 2008, 132(3/4):260-273.

【责任编辑 柴 焰】