

广东省猪圆环病毒2型全基因组序列的比较和分析

于俊勇, 徐廷川, 张得玉, 罗玉钧, 何逸民, 张桂红

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:参考 GenBank 发表的猪圆环病毒2型(Porcine circovirus type 2, PCV2)全基因组序列,设计引物,通过 PCR 技术,从广东地区疑似“高热病”病猪的组织中,扩增 17 株 PCV2 流行株的全基因,并进行了序列测定分析.结果表明,17 个 PCV2 分离株基因组全长为 1 767 或 1 768 bp. 相似性比较发现,17 个分离株之间的核苷酸相似性为 96.7% ~ 99.8%,与 GenBank 上已发表的国外分离株比较,相似性为 95.6% ~ 99.8%;17 个分离株 ORF2、ORF3 的核苷酸相似性分别为 89.5% ~ 100% 和 97.5% ~ 100%;系统发育树显示,17 个毒株有 2 株属于 a 亚群,10 株属于 b 亚群,5 株属于 d 亚群.

关键词:猪圆环病毒2型;基因克隆;序列分析

中图分类号:S851.3

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2011)02-0089-04

Sequence Comparison and Analyses of Porcine Circovirus Type 2 of Seventeen Strains from Guangdong Province

YU Jun-yong, XU Ting-chuan, ZHANG De-yu, LUO Yu-jun, HE Yi-min, ZHANG Gui-hong

(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: According to the sequences of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolates in GenBank, the genomes were amplified by PCR from the tissues in suspect swine “high fever” from Guangdong province, followed by sequencing and analysis. The results showed that the complete genome of each of seventeen isolates were 1 767 or 1 768 bp in length. There were 96.7% to 99.8% homologies among the complete genomic nucleotides of seventeen isolates, and 96.7% to 99.8% homologies among isolates abroad in GenBank. The ORF2 of the seventeen isolates had 89.5% to 100% nucleotide sequence homologies and 97.5% to 100% amino acid homologies. Phylogenetic analysis showed that two strains belong to a subtypes, ten strains belong to the b subtypes and five strains belong to the d subtypes among the total seventeen.

Key words: porcine circovirus type 2; gene cloning; sequence analysis

猪圆环病毒(Porcine circovirus, PCV)为圆环病毒科圆环病毒属成员,单股环状 DNA 病毒,为已知最小动物病毒之一^[1]. 猪圆环病毒2型(PCV2)首先从患断奶猪多系统衰竭综合征(Post-weaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)的猪群中分离到,被证明为 PMWS 的重要病原^[2]. 之后,发现 PCV2 还与仔猪的 A2 型先天性震颤、怀孕母猪的繁殖障碍、

猪皮炎肾病综合征及猪呼吸道综合征等疾病有关^[3]. 自 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、韩国等亚洲国家的养猪业都受到了 PCV2 感染的威胁^[4]. 目前,PCV2 引发的或相关的疾病越来越多,给养猪业造成的损失无法估量,已引起世界各国的广泛关注.

收稿日期:2010-07-25

作者简介:于俊勇(1984—),男,硕士研究生;通信作者:张桂红(1968—),女,教授,博士,E-mail:guihongzh@scau.edu.cn

基金项目:国家现代农业产业技术体系项目(nyctx009);863 计划项目(2006AA10A204)

基于 PCV2 在国内广泛流行的现状,了解不同地区 PCV2 毒株间的遗传差异对预防和控制 PCV2 具有重要意义.2006—2009 年,华南农业大学传染病教研室从广东省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^[5-7].本研究继续跟踪广东部分地区 PCV2 的遗传演化规律,将对为我国 PCV2 毒株的分子流行病学及毒株来源的研究提供依据,同时,也为该疫病的预防与控制奠定理论基础.

1 材料与方法

1.1 病料与毒株

2007 年 9 月—2010 年 1 月,将采集于广东省佛山、惠州、清远、梅州、增城、珠海、江门等地区疑似 PMWS 发病猪场病死猪的病料,分别命名为 FS、HZ、QY、MZ、ZC、ZH、JM 等,从中检测阳性并经 PK15 细胞繁殖后的分离毒株命名为:PCV2-FS1、PCV2-FS2、PCV2-FS3、PCV2-FS4、PCV2-BY、PCV2-CC、PCV2-HZ、PCV2-JM、PCV2-MZ、PCV2-QY1、PCV2-QY2、PCV2-SH、PCV2-SZ、PCV2-TH、PCV2-ZC、PCV2-ZH.

1.2 引物与主要试剂

参考 GenBank 上注册的 PCV2 基因组序列,应用 Primer Premier 5.0 软件,设计覆盖整个基因组的 2 对特异性引物.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'-AGAAGGGCTGGGTTATGGTAT-3',P4:5'-CGCTCGTCTTCGAAGG-3'预期扩增片段长 632 bp (B 片段).引物由上海英骏生物技术公司合成,用前溶解于灭菌的 ddH₂O 中,浓度为 25 μmol/L, -20 ℃ 保存. Taq 聚合酶和 dNTPs 为上海生工生物工程技术有限公司产品;胶回收纯化试剂盒为上海华舜生物公司产品;pMD18-T Vector,为宝生物工程(大连)有限公司产品;基因工程菌 DH5α 由华南农业大学兽医学院传染病教研室保存.

1.3 PCR 扩增

按常规酚-氯仿方法提取 DNA 后,建立 50 μL 反应体系,对目的基因片段进行 PCR 扩增.2 片段 PCR 扩增采用相同条件,所加 PCR 成分按试剂盒说明书.PCR 扩增条件设置为:95 ℃ 变性 10 min 后,按 94 ℃ 45 s,54 ℃ 40 s,72 ℃ 1 min 共进行 30 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min.用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检

测 PCR 产物.

1.4 PCR 产物的克隆及可疑重组质粒的鉴定、测序

将 PCR 全基因产物以回收试剂盒回收,回收产物与 pMD18-T Vector 连接过夜,转化感受态细胞.采用菌落 PCR 法筛选阳性重组质粒产物用 10 g/L 琼脂凝胶电泳检查.对经鉴定为阳性的菌液送上海博尚公司测序.

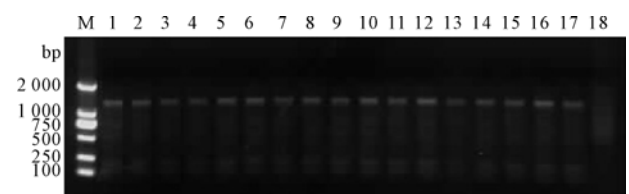
1.5 序列分析

应用 DNASTar 软件包分析 PCV2 分离株的基因组序列及推导的氨基酸序列,并与 GenBank 中所选的国外及国内代表株按照 Clustalw Method 进行对比,并生成系统进化树.

2 结果

2.1 PCV2 核酸片段扩增结果

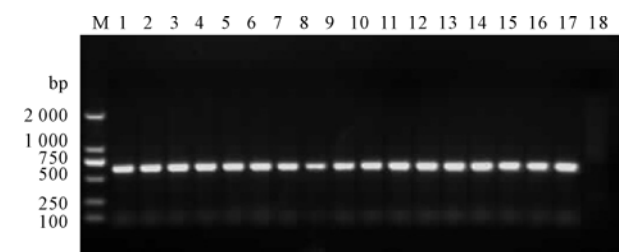
以各 PCV2 分离毒株基因组 DNA 为模板,分别用引物 P1/P2、P3/P4 2 对引物进行 PCR 扩增,结果分别扩增出 1 266 (A 片段) 和 632 bp (B 片段) 的特异目的条带,与预期大小相符,见图 1 和图 2.



M: DNA marker DL2000; 1 ~ 17 分别为: FS1、FS2、FS3、FS4、BS、BY、CC、HZ、JM、MZ、QY1、QY2、SH、SZ、TH、ZC、ZH; 18: 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 by PCR



M: DNA marker DL2000; 1 ~ 17 分别为: FS1、FS2、FS3、FS4、BS、BY、CC、HZ、JM、MZ、QY1、QY2、SH、SZ、TH、ZC、ZH; 18: 阴性对照.

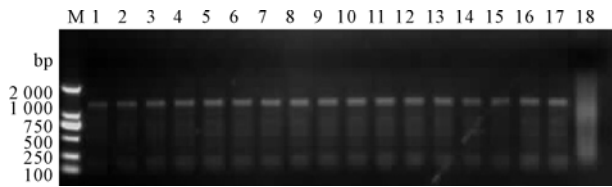
图 2 PCV2 各分离毒株 B 片段 PCR 扩增结果

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

2.2 PCR 扩增产物的克隆

将纯化回收的各基因片段分别连接到 pMD18-T Vector. 经筛选获得重组质粒 pMD1 266、pMD632. 各自用相应的引物进行 PCR 扩增,结果可扩增出与

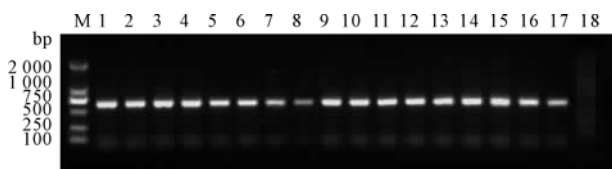
PCV2 各分离毒株基因组 PCR 产物大小相似的 1 266 和 632 bp 特异性条带,见图 3 和图 4. 由此表明: PCV2 各分离毒株基因组片段已经正确插入到 pMD18-T Vector 中.



M: DNA marker DL2000; 1 ~ 17 分别为: FS1、FS2、FS3、FS4、BS、BY、CC、HZ、JM、MZ、QY1、QY2、SH、SZ、TH、ZC、ZH; 18: 阴性对照.

图 3 各 PCV2 分离毒株基因组的质粒 PCR 扩增 A 片段结果

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



M: DNA marker DL2000; 1 ~ 17 分别为: FS1、FS2、FS3、FS4、BS、BY、CC、HZ、JM、MZ、QY1、QY2、SH、SZ、TH、ZC、ZH; 18: 阴性对照.

图 4 各 PCV2 分离毒株基因组的质粒 PCR 扩增 B 片段结果

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

2.3 全基因核苷酸相似性比较及遗传进化树分析

应用 DNASTar 分析软件通过 ClustalW (Slow/Accurate, IBU) 方法比对 17 个 PCV2 分离株全基因组序列与 GenBank 已经发表的 PCV2 全基因组序列, 包括美国分离株 (AY699793)、中国分离株 (AY579893、AY682995、DQ151643)、中国台湾分离株 (AY180397)、日本分离株 (AN072302)、澳大利亚分离株 (AY424403)、匈牙利分离株 (AY256455). 结果发现, 不同地域分离的 PCV2 毒株与参考株相似性很高, 相似性为 95.6% ~ 99.8%. 本研究分离毒株之间的差异性也很小, 为 96.7% ~ 99.8%.

为了解不同地域 PCV2 分离株基因组之间的亲缘关系, 从 GenBank 和已经发表的序列中选取了 8 个 PCV2 序列, 其中包括 2 个中国株 (CHN), 1 个美国株 (USA), 1 个德国株 (GER), 1 个日本株 (Japan), 1 个匈牙利株 (Hungary) 1 个澳大利亚分离株 (AUST) 和 1 个中国台湾株 (Taiwan). 通过 ClustalX1.83 分子生物学软件比较分析并用 MEGA3.1 绘制了 PCV2 全基因组进化树, 见图 5.

由 PCV2 分离株的系统发生进化树可以看出, 本研究分离的 17 个毒株有 2 株属于 a 亚群, 10 株属于 b 亚群, 5 株属于 d 亚群.

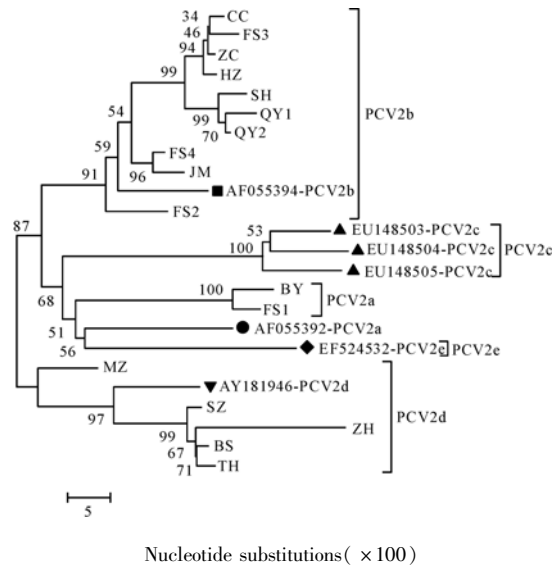


图 5 PCV2 分离株的系统发生进化树

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^[8-9]. 近年来, 广东某些猪场的断奶仔猪经常发生类似 PMWS 的病例, 给广东的养猪业造成的损失越来越大, 特别是 2006 年暴发猪“高热病”以来, 猪圆环病毒作为多种疾病的“帮凶”地位已经毫无疑问, 广东猪场猪圆环病毒的阳性率也在逐年增加. 对该疫病的防控已经迫在眉睫了. 目前, 对 PCV2 的致病机理及各个阅读框的功能认识还处在初级阶段, 本研究对该病毒序列的分析, 为进一步研究病毒的功能奠定了基础, 同时, 也为该疫病的防治提供了理论依据.

通过对广东地区分离株进行全基因组的测定与分析, 结果表明, 有 16 个分离株的全长为 1 767 bp, 1 分离株全长为 1 768 bp. 广东不同地方的 PCV2 分离株基因组的相似性高达 99.2%, 并且与 GenBank 中其他国家的分离株有较高的相似性. 由本研究可以看出, 广东各地区分离株与中国分离株、(AY682995、AY847748、AY579893)、德国分离株 (AY713470)、中国台湾分离株 (AY180396、AY180397) 的亲缘关系较近; 我国广东不同地区分离株不仅与中国其他地区分离株亲缘关系较近, 还与欧洲等国家的亲缘关系较近. 世界不同地域 PCV2 分离株的基因序列差异不大.

ORF2 位于 PCV2 基因组负链上的第 1 034 ~ 1 735 核苷酸, 大部分由 702 个核苷酸组成, 推导氨基酸数目为 233, 编码病毒的主要结构蛋白, 相对分子

质量约为 27 800^[10],这与吕艳丽^[11]分析的结果相同。但是本研究中分离的 BS、BY、FS1、SZ、TH 和 ZH 毒株的 ORF2 由 705 个核苷酸组成。结果显示,不同地域的分离株编码复制蛋白的 ORF2 基因序列相似性高,变异很小,相似性为 89.5%~100%。

ORF3 基因位于 PCV2 基因组的负链,在 ORF1 基因内部,方向与 ORF1 基因相反。全长 315 bp,由 105 个氨基酸组成,相对分子质量约为 12 000。ORF3 蛋白是新发现的 PCV2 的非结构蛋白,其功能研究才刚刚起步。本研究分离的毒株 ORF3 全长均为 315 bp,并且,不同地域分离毒株编码的 ORF3 蛋白基因序列相似性高,变异性小,相似性为 97.5%~100%。

本研究通过对广东省不同地区 PCV2 序列的分析及相似性的研究,明确了目前广东地区 PCV2 流行毒株基因组的分子流行病学特征。对于进一步预防和控制 PCV2 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] 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.
- [3] 王永康. 猪圆环病毒[J]. 国外畜牧学:猪与禽, 2002 (5): 34-38.
- [4] ALLAN G M, JOUN A. Porcine circovirus: A review[J]. *J Vet Diagn Invest*, 2000, 12: 3-14.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 张得玉, 何逸民, 秦宏阳, 等. 猪圆环病毒 2 型广东株全基因组的克隆与序列分析[J]. 华南农业大学学报, 2010, 31(1): 84-86.
- [8] 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): 103-114.
- [9] 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.
- [10] MAHE D, BLANCHARD P, TRUONG C, et al. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circovirus and identification of immunorelevant epitopes[J]. *J Gen Virol*, 2000, 81(7): 1815-1824.
- [11] 吕艳丽, 杨汉春, 郭鑫. 用 PCR 检测猪圆环病毒 II 型[J]. 中国兽医学报, 2002, 22(6): 552-554.

【责任编辑 柴 焰】

(上接第 84 页)

- [7] HIDEKI T, CHANG K L, CHAN C Y, et al. *In vitro* and *in vivo* gene delivery by recombinant baculoviruses[J]. *J Virol*, 2003, 77: 9799-9808.
- [8] GRABOWSKA A K, LIPINSKA A D, ROHDE J, et al. New baculovirus recombinants expressing pseudorabies virus (PRV) glycoproteins protect mice against lethal challenge infection[J]. *Vaccine*, 2009, 27(27): 3584-3591.
- [9] YOSHIDA S, KAWASAKI M, HARIGUCHI N, et al. Baculovirus dual expression system-based malaria vaccine induces strong protection against plasmodium berghei sporozoite challenge in mice[J]. *Infection and Immunity*, 2009, 77(5): 1782-1789.
- [10] YANG Ding-gang, CHUNG Yao-chi, LAI Yiu-kay, et al. Avian influenza virus hemagglutinin display on baculovirus envelope: Cytoplasmic domain affects virus properties and vaccine potential[J]. *Mol Ther*, 2007, 15(5): 989-996.
- [11] FAN Hui-ying, PAN Yong-fei, FANG Liu-rong, et al. Construction and immunogenicity of recombinant pseudotype baculovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus type 2 in mice[J]. *J Virol Methods*, 2008, 150: 21-26.
- [12] HU Yu-chen, YAO Kun, WU Tzong-yuan. Baculovirus as an expression and/or delivery vehicle for vaccine antigens[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2008, 7: 363-371.
- [13] PRABAKARAN M, VELUMANI S, HE Fand, et al. Protective immunity against influenza H5N1 virus challenge in mice by intranasal co-administration of baculovirus surface-displayed HA and recombinant CTB as an adjuvant[J]. *Virology*, 2008, 380(2): 412-420.
- [14] WU Qun-fen, FANG Liu-rong, WU Xue-bao, et al. A pseudotype baculovirus-mediated vaccine confers protective immunity against lethal challenge with H5N1 avian influenza virus in mice and chickens[J]. *Mol Immunol*, 2009, 13: 2210-2217.
- [15] BARSOUM J, BROWN R, MCKEE M, et al. Efficient transduction of mammalian cells by a recombinant baculovirus having the vesicular stomatitis virus G glycoprotein[J]. *Hum Gene Ther*, 1997, 8(17): 2011-2018.
- [16] PIERONI L, MAIONE D, MONICA N L. *In vivo* gene transfer in mouse skeletal muscle mediated by baculovirus vectors[J]. *Hum Gene Ther*, 2001, 12(8): 871-888.

【责任编辑 柴 焰】