

# 猪圆环病毒 2 型广东株全基因的克隆与序列分析

戚一达<sup>1</sup>, 余业东<sup>2</sup>, 孙彦伟<sup>2</sup>, 罗满林<sup>1</sup>, 贺东生<sup>1</sup>, 刘镇明<sup>1</sup>

(1 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642; 2 广东省动物防疫监督总站, 广东 广州 510230)

**摘要:** 根据 GenBank 中发表的已知猪圆环病毒 2 型(Porcine Circovirus-2, PCV-2)全基因序列, 自行设计 2 对特异性引物, 从 2 株接种疑似断乳仔猪多系统衰竭综合征(post-weaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)仔猪病料的 PK-15 细胞中提取基因组 DNA, 以此为模板, 用 PCR 方法分 2 段扩增 2 个 PCV-2 广东株(GZ 株和 ZS 株)的全基因序列. 应用序列分析软件 DNASTar, 对所测 2 组 PCV-2 序列与 GenBank 中的国内外 PCV-2 毒株进行同源性比较, 并绘制系统进化发生树, 进行了序列分析. 结果表明, 2 个 PCV-2 广东株全基因组皆为 1 767 bp, 2 个毒株间全基因序列核苷酸同源性为 77.0%, 第一开放阅读框(ORF1)间的核苷酸同源性仅为 57.7%, 而第二开放阅读框(ORF2)间的核苷酸同源性却高达 99.1%. ZS 株和 GenBank 中国内外其他的 PCV-2 参考毒株序列的核苷酸同源性在 95.7%~99.5% 之间; 而 GZ 株和其他 PCV-2 参考毒株序列的核苷酸同源性仅在 74.2%~77.1% 之间.

**关键词:** 猪圆环病毒 2 型; 全基因序列; 克隆; 序列分析

中图分类号: S852.659.2; Q523.8

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2005)03-0093-03

## Cloning and sequence analysis of complete genomes of type 2 porcine circovirus isolated from Guangdong Province

QI Yi-da<sup>1</sup>, YU Ye-dong<sup>2</sup>, SUN Yan-wei<sup>2</sup>, LUO Man-lin<sup>1</sup>, HE Dong-sheng<sup>1</sup>, LIU Zhen-ming<sup>1</sup>

(1 College of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

2 Guangdong Provincial Veterinary Station of Epidemic Prevention & Supervision, Guangzhou 510230, China)

**Abstract:** Based on the complete genomic sequence of PCV-2 in GenBank, two sets of primers were designed, and genomic DNA was extracted from PK-15 cell inoculated with pathogenic materials of piglets with PMWS. Complete genomic sequences of two isolates from Guangdong Province were amplified. The two sequences were compared with that of other PCV-2 isolates in GenBank with the DNASTar software, and a phylogenetic tree of PCV-2 strains was drawn. The length of the complete genome of GZ and ZS strains was 1 767 bp; nucleotide similarity of the complete genome among two strains was 77.0%; but nucleotide similarity of ORF1 only was 57.7%, but which of ORF2 was 99.1% among two strains; nucleotide similarity of the complete genome among ZS strain and other strains were from 95.7%—99.5%, and were from 74.2%—77.1% among GZ strain and other strains.

**Key words:** PCV-2; complete genome; cloning; sequence analysis

猪圆环病毒 2 型是引起断乳仔猪多系统衰竭综合征(PMWS)的主要病原<sup>[1]</sup>. PMWS 最早在北美发现, 现已在全世界范围内传播开来. 郎洪武等<sup>[2]</sup>采集了来自北京、河北、山东、天津、江西、吉林、河南等 7 省(市)22 个猪群的 559 份血清, 用 ELISA 方法检测 20 日龄未断奶仔猪、1~2 月龄断奶仔猪、后备母猪及经产母猪, 结果总阳性率为 42.9%. 根据 GenBank 上发表的 PCV-2 毒株全基因序列得知, 我国黑龙江、河南、山东、湖北和杭州等多个省市都分离、检测到

PCV-2, PCV-2 在我国广泛存在并流行<sup>[3-5]</sup>. 华南农业大学兽医学院传染病实验室用 PCR 方法对广东省 20 个猪场送检的疑似 PMWS 患病断奶仔猪的病料进行 PCV-2 检测, 结果发现 100% 的呈阳性<sup>[6]</sup>. 这证明 PCV-2 也普遍存在于广东地区的猪场.

本研究从广东地区猪场疑似 PMWS 患病仔猪的病料中分离出的 2 株病毒中, 提取基因组 DNA, 并以此为模板, 扩增并拼接出 2 毒株的全基因序列, 与国内外的参考毒株进行同源性比较, 对 PCV-2 的流行

病学在分子水平上进行了探讨.

1 材料与方法

1.1 材料

PCV-2 细胞毒 GZ、ZS 株, 由华南农业大学兽医学院传染病教研室分离并保存.

PMD18-T 载体, 购自大连宝生物工程有限公司, 宿主菌 DH5 $\alpha$  为华南农业大学兽医学院传染病教研室保存.

EX *Taq* DNA 聚合酶, *Hind* II 和 *Bam*H I 限制性内切酶, DL 15 000 + 2 000、DL 2 000 Marker 为 TaKaRa 公司产品; DNA 胶回收试剂盒为杭州维特洁公司产品; 质粒小量抽提试剂盒为上海博亚生物技术有限公司产品; X-gal、IPTG 为 Sigma 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 引物设计和合成 参照 GenBank 发表的 PCV-2 全基因序列, 自行设计 2 对引物分 A、B 两段进行扩增.

- A1: 5'-CGAAAGAAGTCGCTGTAAG-3';
- A2: 5'-GCCGGCCAAAAAGATACAG-3';
- B1: 5'-GTACCTTTTGTGGCCCGCAG-3';
- B2: 5'-AGCGCACTTCTTTCGTTTTC-3'.

A1、A2 两引物间的理论跨幅为 821 bp, B1、B2 两引物间的理论跨幅为 979 bp. 两目的片段相互重叠 18 bp. 2 对引物由上海博亚生物技术有限公司合成并经 PAGE 电泳纯化, 使用前用灭菌三蒸水溶解, 浓度为 10  $\mu$ mol/L, -20  $^{\circ}$ C 保存.

1.2.2 病毒 DNA 的提取 将感染 PCV-2 的 PK-15 细胞冻融 3 次, 取 250  $\mu$ L 冻融的细胞悬浮液, 加入等体积的含蛋白酶 K 的细胞裂解缓冲液, 50  $^{\circ}$ C 作用 3 ~ 5 h, 用苯酚: 苯酚: 氯仿: 异戊醇 (体积比 25:24:1)、氯仿: 异戊醇 (体积比 24:1) 各抽提 1 次, 无水乙醇 -20  $^{\circ}$ C 沉淀 30 min, 体积分数为 70% 乙醇洗涤 2 遍自然晾干, 用适量灭菌双蒸水或 TE 溶液溶解沉淀备用.

1.2.3 全基因片段的 PCR 扩增 A 段 PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 6 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 1 min, 52  $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 运行 30 个循环; 最后 72  $^{\circ}$ C 后延伸 6 min.

B 段 PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 6 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 1 min, 53  $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 运行 30 个循环; 最后 72  $^{\circ}$ C 后延伸 6 min.

反应结束后, 各取 5  $\mu$ L PCR 产物于 9 g/L 琼脂糖凝胶中进行电泳检测.

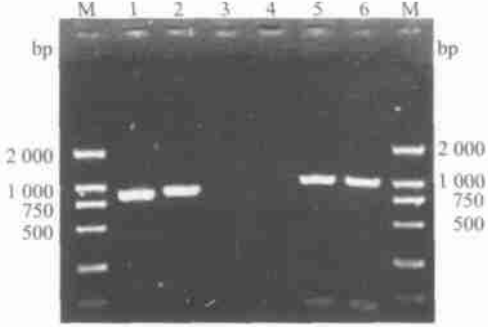
1.2.4 A、B 段 PCR 产物的克隆 切下琼脂糖凝胶中的目的条带, 按照回收试剂盒说明进行纯化回收. 回收产物经加尾 (腺苷酸-A) 反应后与 PMD18-T 载体相连 (16  $^{\circ}$ C 连接 4 h). 转化 DH5 $\alpha$  大肠杆菌, 抽提质粒, 双酶切鉴定.

1.2.5 序列测定及分析 经鉴定的阳性重组质粒, 送上海博亚生物技术有限公司进行测序, 从正反两个方向测通并验证无误后进行序列拼接. 将拼接的 PCV-2 全基因序列用 DNASTar 软件进行分析并绘制系统进化发生树.

2 结果

2.1 PCR 产物扩增

PCR 产物经 9 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测分析表明, 扩增出了 A、B 两个特异片段 (A 段约 821 bp, B 段约 979 bp), 与预期目的条带大小相符 (图 1).



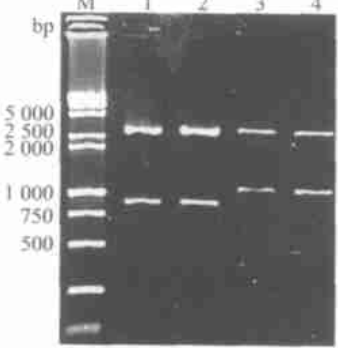
M: DL 2 000 Marker; 1: ZS 株 A 基因片段; 2: GZ 株 A 基因片段; 3, 4: 阴性对照; 5: ZS 株 B 基因片段; 6: GZ 株 B 基因片段  
M: DL 2 000 Marker; 1: A gene of ZS strain; 2: A gene of GZ strain; 3, 4: negative control; 5: B gene of ZS strain; 6: B gene of GZ strain

图 1 A、B 段的 PCR 扩增产物

Fig. 1 Products of A, B genes amplified by PCR

2.2 重组质粒的酶切鉴定

经 *Hind* II 和 *Bam*H I 双酶切后, 筛选到阳性重组质粒 (图 2). A、B 段的酶切产物两端带有 PMD18-T 载体上多克隆位点的内切酶序列, 大约 30 多个碱基, 所以酶切产物的长度要略大于相应的 PCR 产物.



M: DL 15 000 bp+2 000 bp DNA Marker; 1: ZS 株 A 段酶切产物; 2: GZ 株 A 段酶切产物; 3: ZS 株 B 段酶切产物; 4: GZ 株 B 段酶切产物  
M: DL 15 000 bp+2 000 bp DNA Marker; 1: digested products of A gene of ZS strain; 2: digested products of A gene of GZ strain; 3: digested products of B gene of ZS strain; 4: digested products of B gene of GZ strain

图 2 重组质粒双酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmids with double digesting

2.3 序列分析

经测序,GZ 株和 ZS 株的基因组全长都为 1 767 bp. 测序结果经互联网提交 NCBI 进行 Blast 检测,发现 ZS 株和 GenBank 中国内外已知的 PCV-2 参考毒株序列的同源性非常高,在 95.7%~99.5%之间;而 GZ 株和其他 PCV-2 参考毒株序列的同源性非常低,在 74.2%~77.1%之间. 在所比较的序列中(表 1),ZS 株和浙江的 PCV-2 毒株 (AY217743)同源性最高,达 99.5%,和湖北的 PCV-2 毒株 (AY291317)同源性最低,为 95.7%;ZS 株和法国的 PCV-2 毒株 (AY322003)的同源性也高达 98.9%. ZS 株和 GZ 株之间的全基因序列同源性仅为 77.0%,第一开放阅读框(ORF1)间的同源性仅为 57.7%,而第二开放阅读框(ORF2)间的同源性却高达 99.1%.

表1 PCV-2 GZ株、ZS 株与其他 PCV-2 毒株的核苷酸同源性比较

Tab. 1 Comparison of nucleotide similarity in the complete genomes among PCV-2 GZ, ZS strains and other strains %

| GenBank 序号     | AY596822(GZ 株) | AY596823(ZS 株) |
|----------------|----------------|----------------|
| AY596822(GZ 株) |                | 77.0           |
| AY596823(ZS 株) | 77.0           |                |
| AY217743       | 77.1           | 99.5           |
| AY181945       | 77.0           | 99.4           |
| AY181946       | 74.9           | 96.4           |
| AY291316       | 77.0           | 99.3           |
| AY291317       | 74.2           | 95.7           |
| AY322003       | 76.8           | 98.9           |

系统进化发生树能更直观、形象地表示各个毒株在遗传上的亲缘关系,为此,利用 DNASTar 软件绘制了系统进化发生树(图 3). 从图 3 可看出,在比较的毒株中,GZ 株单独位于一个分支,和其他毒株亲缘关系较远,ZS 株和其他毒株亲缘关系较近,不过也单独位于一个分支;亲缘关系最近的是天津株 (AY181946)和湖北株 (AY291317). AY217743 株、AY291316 株和 AY181945 株 3 个毒株位于同一个分支内.

两广东毒株序列经互联网提交 NCBI,登录 Gen-Bank,得到注册号:GZ 株:AY596822,ZS 株:AY596823.

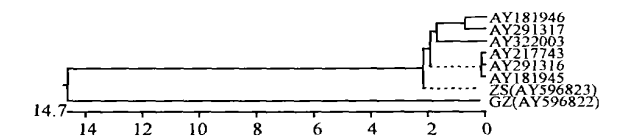


图3 PCV-2 毒株系统进化发生树

Fig. 3 Phylogenetic tree for PCV-2 strains

3 讨论

本研究自行设计了 2 对特异性引物,PCR 扩增 PCV-2 全基因序列. 考虑到猪源性 PCV-1 的广泛存在,在设计 A 对引物时,特意在 A 引物中保留有 PCV-1 所没有的一段核苷酸序列(PCV-1 的全基因组序列比 PCV-2 短 8~9 个碱基),这样在理论上避免了错误扩增 PCV-1 序列的可能性.

序列比较结果显示,ZS 株和国内外其他毒株序列的同源性非常高,在 95%以上,但在系统进化发生树上还是单独位于一个分支,而 GZ 株和其他毒株之间不但核苷酸序列同源性非常低,更是在系统进化发生树上位于一个独立的分支. GZ 株和 ZS 株两毒株间全基因核苷酸同源性仅为 77%,GZ 株和国内外其他毒株间的核苷酸同源性也在 77.1%以下,该结果表明此 PCV-2 毒株在广东地区可能发生了较大的变异. 但 GZ 株和其他毒株的 ORF2 核苷酸同源性却很高,达 90%以上,GZ 和 ZS 两株间的 ORF2 核苷酸同源性更是达到 99.1%,证明了 PCV-2 的 ORF2 具有很好的保守性.

猪圆环病毒(PCV)有 2 种基因型,即 PCV-1 和 PCV-2,PCV-1 无致病性,PCV-2 是断奶仔猪多系统衰竭综合征的重要病原. 二者在猪群中的感染都比较普遍,但由于后者有致病性,且常和猪蓝耳病病毒 (PRRSV)、猪细小病毒 (PPV)、猪伪狂犬病病毒 (PRV) 等病毒混合感染造成更大的经济损失<sup>[7,8]</sup>. PCV-2 在广东地区广泛存在及流行,已给养猪业带来了巨大的经济损失,当务之急是研制 PCV-2 的诊断试剂和疫苗,及时控制和预防 PMWS 的发生和流行. 由于 PCV-1 广泛存在,用 PCV 全病毒作诊断抗原不能区分 PCV-1 和 PCV-2,而 PCV-1 和 PCV-2 的 ORF2 间的核苷酸同源性非常低,各株 PCV-2 间的 ORF2 核苷酸序列同源性又很高,且 ORF2 编码 PCV-2 的结构蛋白,具有良好的免疫原性<sup>[9,10]</sup>,所以可利用 ORF2 基因的表达产物作疫苗或诊断抗原,开发疫苗或临床应用的诊断试剂,本研究正是为蛋白表达等后期工作提供了理论基础.

参考文献:

[1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社,1997. 324—325; 1180—1181.  
[2] 郎洪武,张广川,吴发权,等. 断奶仔猪多系统衰竭综合征血清抗体检测[J]. 中国兽医科技,2000,30(3): 3—5.  
[3] 王文军,张加勇,孙刚,等. 黑龙江省猪圆环病毒血清流行病学调查[J]. 黑龙江畜牧兽医,2003, (8): 37—38.  
[4] 陈庆新,商绍彬,叶菊秀,等. 杭州地区猪Ⅱ型圆环病毒抗体的血清学调查[J]. 中国兽医科技 2003, 33(7): 26—27.

(下转第 99 页)

还需进一步摸索.

在马氏珠母贝精液中加入含甘油或 DMSO 的抗冻液后, 镜检发现精子运动能力均下降. 有研究表明甘油可造成哺乳类精子损伤<sup>[10]</sup>, 而 DMSO 渗透力强、亲水性好, 能使原生质保持水分并降低其冰点, 保护效果优于甘油<sup>[11]</sup>. 在本试验中, 添加 DMSO 的组别在 4℃ 冷冻 24 h 后, 还有 85% 精子存活, 表明在较短的时间里, DMSO 对精子的损害不严重; 但在 4℃ 冷冻 72 h 后, 只有约 20% 的存活率, 而对照组有超过 50% 的存活率, 则表明 DMSO 的毒害作用随着接触时间的延长而明显增大. DMSO 对精子有毒性但又有较好防冻效果的双重特性, 需要 DMSO 有一个适宜使用浓度, 既能起到良好的抗冻作用, 又不会导致精子损伤. 杨爱国等<sup>[3]</sup>发现浓度 8%~10% 的 DMSO 对扇贝的精子保护最好. 笔者的试验也表明, 体积分数 10%~12% 的 DMSO 可对马氏珠母贝的精子有较好的抗冻保护作用.

3.2 降温平衡和精子保存温度

精液和抗冻剂混合后在低温(0~10℃)中平衡的目的是使抗冻剂充分渗透. 笔者发现平衡 60 min 的组别的受精率明显比 30 min 的低. 本试验表明, 精子稀释后在 4℃ 平衡时间太长会产生较大的危害. 对比 4℃ 平衡 30 和 60 min 结果, 发现虽然解冻后的精子存活率无明显区别, 但受精率对比表明, 平衡时间的延长损害了精子的受精能力, 这也说明活动着的精子并不一定就具有受精功能.

本试验采用了 4 和 -18℃ 2 种温度, 一方面这是偏远养殖场取样和前期处理中用普通冰箱就可以达到的温度, 另一方面 -18℃ 也是添加抗冻剂前后, 精子内外水分结冰与不结冰的温度. 笔者希望通过比较 2 种温度下, 加入抗冻剂前后的精子活动和受精状况, 来确定超低温冷冻前的适宜平衡程序. 根据李赞等<sup>[5]</sup>的研究, DMSO 在 4℃ 以上对精子会产生较大的毒害作用, 当温度下降到 2.5℃ 时它对精子的

毒害会大大的降低. 而 -18℃ 保存 72 h 存活率虽然比没有加抗冻剂的对照组高许多, 但并不比 4℃ 下保持的效果好, 推测 -18℃ 可能会减低 DMSO 毒性, 但这个温度对精子也有不利影响.

综合试验的结果, 笔者认为, 对于马氏珠母贝的精子保存而言, 十几个小时的保存, 应不加抗冻剂直接在 4℃ 放置, 而几天以至更长时间的保存, 应将精子用含有 DMSO 的保护液稀释后, 在 4℃ 下平衡不超过 30 min, 然后转入液氮冻存.

参考文献:

[ 1 ] 李广武, 郑从义, 唐 兵. 低温生物学[ M ]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1998. 3—6; 30—33; 43—45.

[ 2 ] 陈章波, 张建华, 雷淑芬, 等. 配子的冷冻原理及其在水产界的应用[ J ]. 中国水产, 1989, 44(3): 7—17.

[ 3 ] 杨爱国, 王清印, 孔 杰, 等. 扇贝精液超低温冷冻保存技术的研究[ J ]. 海洋与湖沼, 1999, 30(6): 624—628.

[ 4 ] 李 纯, 李 军, 薛钦昭. 栉孔扇贝精子的超低温保存研究[ J ]. 海洋水产研究, 2000, 21(1): 57—61.

[ 5 ] 李 赞, 王品虹, 贺桂珍, 等. 太平洋牡蛎精液的超低温保存[ J ]. 青岛海洋大学学报, 2002, 32(2): 207—211.

[ 6 ] 林岳光, 姜卫国. 三倍体和二倍体合浦珠母贝育珠比较的初步研究[ J ]. 热带海洋, 1993, 12(3): 90—94.

[ 7 ] 王爱民, 阎 冰, 叶 力, 等. 马氏珠母贝不同地理种群内自繁和种群间杂交子一代主要性状的比较[ J ]. 水产学报, 2003, 27(3): 200—206.

[ 8 ] 楼允东. 组织胚胎学[ M ]. 北京: 农业出版社, 1996. 295—298.

[ 9 ] 喻达辉, 陈竞春, 苏天凤, 等. 合浦珠母贝精子的实验生物学初步研究[ J ]. 热带海洋, 1998, 17(1): 83—86.

[ 10 ] 李新红, 顾孝连, 华修国, 等. 甘油浓度对蓝狐精子低温冷冻保存的影响及冻融前后精子的超微结构[ J ]. 动物学研究, 2003, 24(6): 421—428.

[ 11 ] 柯亚夫, 蔡难儿. 中国对虾精子超低温保存的研究[ J ]. 海洋与湖沼, 1996, 27(2): 187—192.

【责任编辑 柴 焰】

(上接第 95 页)

[ 5 ] 邱永敏, 刘金章, 程方程, 等. 个体户猪场圆环病毒 II 型血清学调查[ J ]. 河南畜牧兽医, 2003, 24(6): 26—27.

[ 6 ] 梁红虎, 罗满林, 刘镇明, 等. 检测猪圆环病毒 2 型的一种 PCR 方法[ J ]. 华南农业大学学报(自然科学版), 2003, 24(3): 91—92.

[ 7 ] TISCHER I, MIELDS W, WOLFF D, et al. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus[ J ]. Arch Virol, 1986, 91: 271—276.

[ 8 ] 仇化吉, 童光志. 猪病研究新进展[ J ]. 畜禽业, 2002

(10): 6—8.

[ 9 ] LIU Q, WILLSON P, ATTOH-POKU S, et al. Bacterail expression of an immunologically reactive PCV2 fusion protein[ J ]. Protein Expr Purif, 2001, 21(1): 115—120.

[ 10 ] BLANCHARD P, MAHÉ D, CARIOLET R, et al. Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins[ J ]. Vaccine, 2003, (21): 4 565—4 575.

【责任编辑 柴 焰】