

猪 II 型圆环病毒全基因组的克隆及感染性鉴定

郝 鑫 陈焕春* 陈华平 曹胜波 琚春梅

(华中农业大学动物医学院动物病毒室 武汉 430070)

摘 要 设计合成一对扩增猪 II 型圆环病毒(PCV-2)全基因组的特异性引物,从 3 份患断奶后仔猪多系统衰弱综合征(PMWS)的死亡仔猪病料中,PCR 扩增和克隆了 3 株 PCV-2 全基因组序列。将所测序列与已公布的 PCV 毒株序列进行同源性比较,并绘制系统发育进化树。结果显示,所测毒株间的核苷酸同源性为 95.7%~99.4%,与其它毒株的同源性较高,达 95.1%以上;ORF1 的核苷酸同源性高达 97.8%以上,氨基酸同源性大于 98%;ORF2 的核苷酸同源性较低,为 90%~98%不等,推导的氨基酸序列同源性介于 87%~99.1%。进化树分析表明各分离毒株在进化上存在地域上的相关性。将克隆到的 PCV-2 基因组环化后,脂质体介导转染 PK-15 细胞,盲传 3 代。间接免疫荧光检测表明,克隆到的基因组具有感染性。

关键词 猪 II 型圆环病毒(PCV-2) 基因组 克隆 感染性

中图分类号:Q933 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2004)02-0172-05

猪圆环病毒(*Porcine circovirus*, PCV)为圆环病毒科(Circoviridae)圆环病毒属成员,最早是由 Tischer 等^[1]于 1974 年在 PK-15 传代细胞系(ATCC-CCL33)中发现的。病毒粒子为 20 面体对称结构,无囊膜,细胞培养不产生细胞病变。病毒基因组是一种环状、单股、负链 DNA,以滚环方式复制。猪圆环病毒有两种基因型,即 PCV-1 和 PCV-2,前者广泛存在于猪源肾细胞中,无致病性,基因组全长 1759bp;PCV-2 首先由 Allan 等^[2]从患断奶后仔猪多系统衰弱综合征(Postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)的猪群中分离到,是 PMWS 的重要致病因子^[3~4]。随着对 PCV-2 致病性研究的深入,近来发现该病毒还与猪的繁殖障碍、断奶猪和育肥猪的呼吸道疾病、皮炎与肾病综合征(Porcine dermatitis and nephropathy syndrome, PNDS)、幼龄猪的先天性震颤等疾病有关^[5~9]。由于到目前为止,还没有有效预防 PCV-2 感染的疫苗,致使 PMWS 等疾病有不断蔓延之势,对世界各国,特别是欧洲、北美、日本和台湾的养猪业危害严重,已成为影响养猪业发展的重要传染病之一^[10,11]。PCV-2 基因组为 1767bp 或 1768bp 与 PCV-1 的同源性低于 80%。PCV-2 的基因组序列相对稳定,到目前为止只发现一种基因型的 PCV-2,但分离自不同地区的毒株会存在一定的差异^[12],因此需对不同来源的 PCV-2 毒株基因组序

列有详细的认识,以确定 PCV-2 的基因序列变异程度,为建立有效的 PCV 研究方法提供条件。

临床上 PCV-2 常与呼吸与繁殖障碍综合征病毒(PRRSV)、细小病毒(PPV)、伪狂犬病毒(PRVC)及其它一些病原微生物混合感染,给 PCV-2 病毒的分离工作带来一定的困难。本研究旨在用 PCR 方法克隆获得了国内 PCV-2 毒株的全基因组,并对基因组序列进行测定与分析,对中国 PCV-2 的分子流行病学和毒株来源进行了探讨,并进一步将克隆到的复制型病毒基因组(RF DNA)转染细胞,获得高纯度的病毒,为开展病毒的免疫和致病机理研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

猪组织病料(包括肺、腹股沟淋巴结)采自湖北、上海、山东等地疑患 PMWS 的猪群。仔猪肾上皮传代细胞(PK-15)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 为本室保存。pMD-18T 载体、PCR 试剂盒、DNA Marker 及各种限制性内切酶均为 TaKaRa 公司产品。UNIQ-5 柱离心式 DNA 胶回收试剂盒购自上海 Sangon 公司,PCV-2 高免血清由本室制备。FITC 标记羊抗猪二抗购自晶美生物技术有限公司。其它试剂均为进口或国产分析纯试剂。

基金项目 国家自然科学基金(36170701)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-27-87282608 E-mail hzauvet@public.wh.hb.cn

作者简介 郝 鑫(1980-)男,山东新泰人,硕士,主要从事病毒分子生物学研究。E-mail xixin23@hotmail.com

收稿日期 2003-09-25,修回日期 2002-12-22

1.2 引物设计

参考国内外已发表 PCV-2 的基因组序列 ,设计合成一对 PCV-2 特异性引物 P1 5'-TTTCCGCGGGCT-GGCTGAACCTTTTGAAAGT-3' ; P2 : 5'-AGCCCGCG-GAAATTTCTGACAAACGTTACA-3' ,此对引物 5'端包含有一重叠的 *Sac* II 位点 ,特异性的扩增 PCV-2 的全基因组。

1.3 PCR 模板制备

将组织病料按 1:5 比例加入 TEN(pH 7.0)充分研磨制成悬浊液 ,冻融 3 次 ,离心取上清 ,加入蛋白酶 K 至终浓度 500μg/mL ,SDS 终浓度 1% ,37℃温育过夜 ,苯酚 :氯仿 :异戊醇(25:24:1)及氯仿各抽提一次 ,吸取水相 ,加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc 及 2.5 倍体积的无水乙醇 - 20℃沉淀 30 min ,12000 r/min、4℃离心 5 min ,沉淀真空抽干后 ,溶于 ddH₂O 中。取适量用作 PCR 模板。

1.4 PCR 反应

PCR 反应采用 50μL 体系(5μL 10 × Buffer、2.5μL 25mmol/L MgCl₂、10mmol/L dNTPs 1μL、40μmol/L P₁和 P₂ 各 0.5μL、2U *Taq* 酶 1.5μL、模板 2μL、ddH₂O 37μL) ,于 95℃预变性 5min ,然后进入程序 :94℃ 1min 50℃ 1min ,72℃ 3min 30 个循环后 ,最后 72℃延伸 10min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.5 PCR 产物的克隆与序列分析

用 DNA 胶回收试剂盒回收 PCR 产物 ,按参考文献 [13] ,将目的片段与 pMD-18T 载体相连 ,转化 *E. coli* DH5α ,提取质粒用限制性内切酶进行酶切鉴定 ,阳性重组质粒由 TaKaRa 公司测序。利用 DNA star 和 BioEdit 软件分析测序结果 ,并与已公布的 PCV-2 基因组序列做同源性比较 ,绘制系统发育树。

1.6 脂质体介导基因组 DNA 转染真核细胞

用 *Sac* II 酶切重组质粒 ,回收线性化的 PCV-2 全基因组后 ,T4 DNA 连接酶室温连接过夜 ,环化线性的基因组。参照脂质体(Ipoectamine™ 2000 ,Invitrogen)产品说明书 ,将环化后的病毒基因组转染 PK-15 细胞。转染后的细胞继续培养 48 ~ 72h ,然后盲传 3 代。

1.7 间接免疫荧光试验 (IFA)

转染后的细胞经盲传 3 代后 ,以丙酮 :甲醇(4:1)溶液于 - 20℃固定 20min。pH 7.4 PBS 缓冲液冲洗 3 次后 ,与 1:100 稀释的 PCV-2 高免血清 37℃温育 1h ,PBS 洗 3 次后 ,再用 1:300 稀释的 FITC 标记羊抗猪二抗 37℃作用 45min ,PBS 缓冲液冲洗 3 次 ,每次 5min。置于荧光显微镜下观察。

2 结果

2.1 PCR 扩增及 PCR 产物的克隆

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳 ,紫外观察可见 3 个 PCR 扩增产物都出现特异条带 ,大小为 1.8 kb 左右 ,与预期相符(图 1)。产物纯化后与载体相连 ,转化 *E. coli* DH5α ,提取质粒 ,分别经 *Sac* II、*Stu* I 酶切鉴定 ,共筛选到 3 个阳性克隆 ,命名为 pT-HB(湖北病料)、pT-SH(上海病料)和 pT-QD(山东病料)。

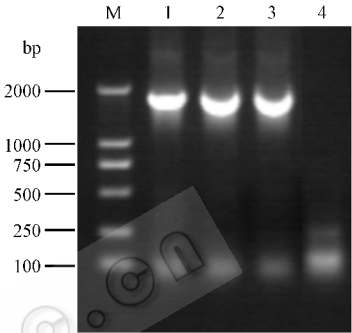


图 1 PCR 产物的 1% 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.1 PCR products of PCV-2 genome on 1% agerose gel
M. DL2000 DNA Marker ; 1 ~ 3. PCR product of Hubei ,Shanghai and Qingdao sample ; 4. Negative control .

2.3 序列分析

测序结果提交 GenBank ,登录号分别为 AY291316(QD)、AY291317(HB)和 AY291318(SH)。测序结果表明 ,克隆到的 3 个基因组 ,有两个(HB 和 QD 病料)全长为 1767bp ,另一个(SH 病料)全长为 1768bp ,两种类型的区别在于后者在第 1039 处插入了一个碱基 T。

利用 DNA star 和 BioEdit 软件 ,将所测序列与 GenBank 中已发表的中国大陆、中国台湾、日本、欧洲和北美的 20 株 PCV 毒株进行比较分析发现 ,3 个毒株与其它地域的 PCV-2 毒株间的核苷酸序列同源性都很高 ,均在 95.1% 以上 ,最高可达 99.7% ,3 个毒株中 SH 与 QD 的同源性较高 ,达 99.4% ,HB 与其它两毒株的同源性较低 ,分别为 95.9%(QD)和 95.7%(SH)。所有 PCV-2 毒株与 PCV-1 毒株间的核苷酸同源性都较低 ,不到 78%。根据比对结果绘制出的系统发育进化树见图 2 ,从发育树来看 ,整个 PCV 毒株可分为两个大的独立分枝 PCV-1 和 PCV-2。PCV-2 各分离毒株之间在进化上存在较明显的地理位置上的相关性 :3 株中国台湾分离株和一株日本分离株与其它毒株的同源性较低分别形成两个较大的分支 ,北美和欧洲分离株也各自形成两个

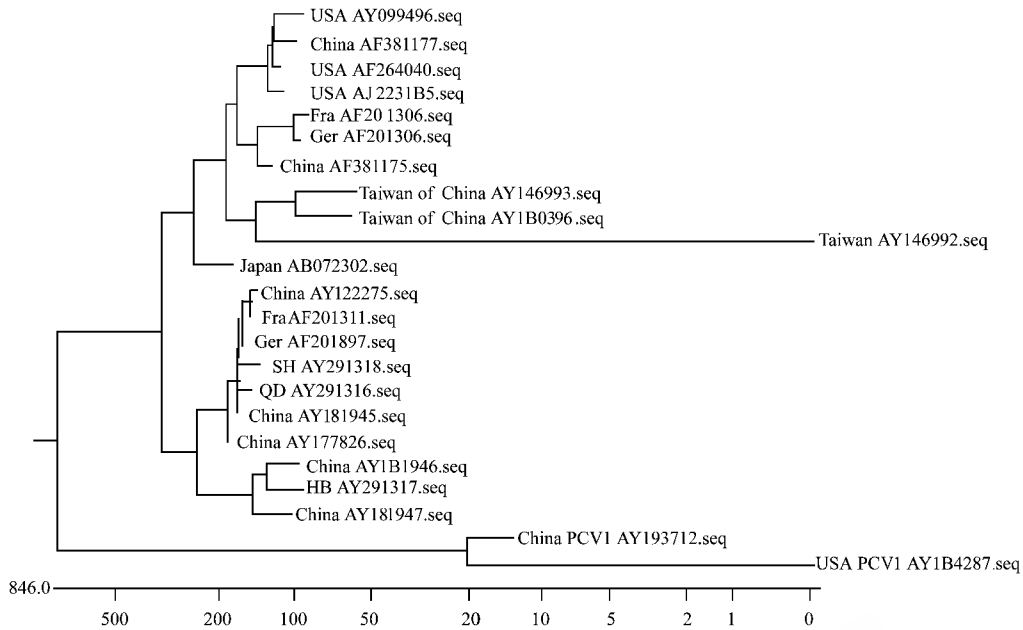


图 2 PCV 分离毒株的系统发育进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of PCV isolates

远,而独立形成两个分支,本试验所研究的 3 个毒株与其它中国分离株在进化关系上非常密切,而与美洲和欧洲的毒株亲源关系较远,除了 AF381177 处于北美分支,AF381176 处于欧洲分支外,所有的中国大陆分离株形成一个和其它地区分离株平行的分枝,在此分枝上还有与 SH 和 QD 株遗传距离较小的法国分离株 AF201311 和德国分离株 AF201897。此外,中国大陆分离株间也存在变异,分化成两个相对独立的分枝。

比较结果还显示,各 PCV-2 毒株间的 ORF1 高度保守,核苷酸同源性在 97.8% 以上,推导的氨基酸序列同源性更高达 98% 以上。与此相比,ORF2 区段则较易发生突变,核苷酸同源性从 90% 到 98% 不等,氨基酸同源性为 87% ~ 99.1%,与 PCV-1 毒株的氨基酸序列同源性低于 70%。

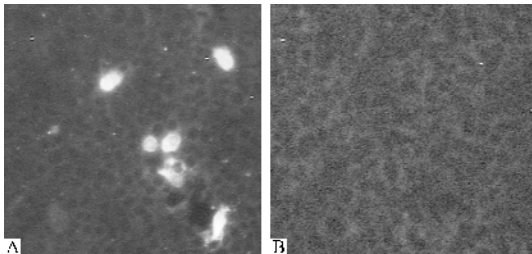


图 3 转染后细胞的间接免疫荧光试验

Fig.3 IFA of transfected cells

A. PK-15 cells transfected with the cloned PCV-2 genome; B. Mock-transfected PK-15 cells.

2.4 间接免疫荧光试验

利用抗 PCV-2 高免血清作一抗,对再次转染后的细胞进行 IFA 检测。结果发现,克隆到的 QD 毒株基因组转染细胞后,可见致密的胞核内荧光(图 3),与已报道的情况相一致^[14]。

3 讨论

针对 PCV-2 基因组呈环状,且长度较短的特点,我们设计了一对 5'端都包含 Sac II 位点重叠区域的 PCV-2 特异性引物。利用这对引物可一次性的扩增和克隆包含有病毒全基因组的重组质粒,避免了分段扩增的烦琐步骤。由于 Sac II 位点在 PCV-2 的基因组上是唯一的,且相当保守,这就保证了扩增产物经克隆、酶切后,可以释放得到完整的病毒基因组。但是,由于模板中组织细胞 DNA 以及少量蛋白质的干扰,外加扩增片段相对较长,所以需对反应条件进行反复优化,以达到消除非特异性反应,提高保真度的目的。

在本研究中,我们成功的扩增和克隆到了 3 株 PCV-2 病毒的复制型基因组,并测定了基因组序列。将所测序列与国内外毒株进行了同源性比较和进化分析。从生成的系统进化发育树来看,分离毒株在进化上存在明显的地理位置上的相关性,所有的 PCV-2 毒株组成两个较大的分支,其中一支又分化为美洲、欧洲、台湾及日本四个分支,其中中国毒株 AF264040 与 3 株美国分离株亲源关系较近,而另一

毒株 AF381176 与欧洲分离株亲源关系密切。这表明这两株病毒可能分别来源于美洲和欧洲。与这一分支平行的另一较大分支包括了本研究所涉及的 3 个毒株在内的几乎所有中国大陆分离毒株,此分支进而又根据亲源关系的远近不同,分化成两个分支,QD 株和 SH 株由于同源性较高而与其它 3 株中国株和两株欧洲株组成一支,HB 株则与其它两株中国分离株形成另一独立的分支。从分析结果看,中国毒株的来源可能较为复杂,有的来源于欧洲等国;有的来源于北美。造成这种情况的可能原因是我国养猪规模庞大,疾病防制水平低,且与欧美国家有频繁的种猪交流,对于这种情况,我们应加强引种时的检验检疫工作,杜绝 PCV-2 继续传入我国。从另一方面看,中国分离株在进化上又相对独立,这可能是由于 PCV-2 早已传入我国,经长期的演化逐渐形成了自己的地方株。朗洪武等^[15]通过 ELISA 方法在可疑猪群中大量检测到 PCV-2 抗体,也说明了这点。目前,研制 PCV-2 的诊断试剂和疫苗已成当务之急。从对 ORF2 的分析结果来看,该基因在 PCV-2 和 PCV-1 之间差异最大,且其编码病毒的衣壳蛋白,具有良好的免疫原性,是 PCV-2 的理想诊断抗原和基因工程疫苗的首选基因。

PMWS 的病因非常复杂,到目前为止尚无定论。有报道称^[16~18],用 PCV-2 感染断奶仔猪仅可复制出轻微的 PMWS 病变,但症状不明显,但如果将 PCV-2 与 PRRSV 或 PPV 联合攻毒,则可复制出典型的 PMWS 的病变和症状。在 PMWS 的临床病例中常可检测到 PCV-2、PRRSV 和 PPV 的共同存在,这说明 PMWS 可能是 PCV-2 其它多种病毒混合感染的结果,这给 PCV-2 的分离工作带来极大的困难。为了得到高纯度的病毒,在本试验中我们尝试利用克隆到的病毒基因组,经环化后,质脂体介导体外转染 PK-15 细胞,结果克隆到的 3 株病毒的基因组,在转染后 IFA 都没有检测到荧光,但将转染细胞盲传 3 代后,QD 毒株的基因组转染的细胞检测到了荧光,而其它两株仍然无荧光,分析原因,可能是 PCR 扩增的保真度不够,致使某些克隆子发生点突变,影响到了病毒基因组的转录和复制,另外也可能是因为 PCV-2 在 PK-15 细胞中的增殖滴度不高,基因组转染效率较差,使得转染后的细胞 IFA 试验呈阴性,在试验中,我们曾尝试用 300mmol/L D-氨基葡萄糖对转染细胞进行处理以提高病毒滴度^[19],但由于 D-氨基葡萄糖对 PK-15 细胞毒性太大而告失败。

本试验证实了 QD 株基因组具有感染性,IFA 结

果显示得到了一株高纯度的 PCV-2,这为进一步开展 PCV-2 感染性分子克隆的研究,以及进行病毒的免疫和致病机理研究以及病毒的分子流行病学研究奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, et al. A small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature*, 1982, **295**: 64 - 66.
- [2] Allan G M, Meehan B, Todd D. Novel porcine circovirus from pigs with wasting disease syndrome. *Veterinary Record*, 1998, **142**: 467 - 468.
- [3] Bolin S R, Stoffregen W C, Nayar G P. Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inclusion of cesarean-derived, colostrums-deprived piglets with type 2 porcine circovirus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2001, **13**(3): 185 - 194.
- [4] Kenny S, Allan G, McNeilly F. Porcine circovirus infection in Northern Ireland. *Veterinary Record*, 1998, **142**: 495 - 496.
- [5] West K H, Bystrom J M, Wojnarowicz C. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1999, **11**: 530 - 532.
- [6] Allan G M, Mcneilly E, Kennedy S. PCV-2-associated PDNS in Northern Ireland in 1990. *Veterinary Record*, 2000, **146**(24): 711 - 712.
- [7] Stevenson G W, Kiupel M, Mittal S K. Tissue distribution and genetic typing of porcine circovirus in pigs with naturally occurring congenital tremors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2001, **13**(1): 57 - 62.
- [8] Harms P A, Sorden S D, Halbur P G. Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection. *Journal of Swine Health and Production*, 2002, **38**: 528 - 539.
- [9] White M, Higgins R J. Dermatitis nephropathy syndrome of pigs. *Veterinary Record*, 1993, **132**: 199.
- [10] Allan G M, McNeilly F, Kennedy S. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in USA and Europe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1998, **10**: 3 - 10.
- [11] Atsushi O, Keiichi A, Katsuhiro T. Detection of porcine circovirus from lesions of a pig with wasting disease in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 1999, **61**: 1119 - 1123.
- [12] Marrijin F, Patrick G H, Mike G. Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North American and development of a different PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, **38**(7): 2794 - 2503.
- [13] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 分子克隆指南. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997.
- [14] Liu Q, Suresh K, Babiuk A, et al. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2. *Virology*, 2001, **285**: 1 - 10.

- 91 - 99.
- [15] 郎洪武 张广川 吴发权. 断奶仔猪多系统衰弱综合征血清学抗体检测. 中国兽医科技 2000 ,30(3) 3 - 5.
- [16] Ellis J A , Bratanich A , Clark E G. Coinfection by PCV and PPV in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2000 ,12 21 - 27.
- [17] Krakowka S , Ellis J A , Meehan B. Viral wasting syndrome of swine : experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Veterinary Pathology* 2000 ,37 254 - 263.
- [18] Sirinarunidr T , Sorden S D , Morozov I. Double in situ hybridization for simultaneous detection of porcine reproduction and respiratory syndrome virus(PRRSV) and porcine circovirus(PCV). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* , 2001 ,13 68 - 71.
- [19] Tischer I , Peters D , Rashch R , et al. Replication of porcine circovirus induction by glucosamine and cell cycle dependence. *Achieve of Virology* , 1987 ,96 39 - 57.

Cloning of Full Length Genome of Porcine Circovirus Type 2 and Identification of The Infectivity

XI Xin CHEN Huan-Chun* CHEN Hua-Ping CAO Sheng-Bo JU Chun-Mei

(Laboratory of Animal Virology , College of Veterinary Medicine , Hua Zhong Agricultural University , Wuhan 430070 , China)

Abstract : A pair of specific primers which were designed according to the published genome sequences of PCV-2 were synthesized to amplify the full length of viral genome by PCR from clinically suspected PMWS samples. The PCR product was cloned into pMD-18T vector and sequenced. After comparison the sequence with other PCV isolates in GenBank , phylogenetic analysis was performed on the PCV isolates. The results showed that there was 95.7% ~ 99.2% nucleotide identity among the three cloned PCV-2 genome and more than 95.1% identity between our cloned genomes and other PCV-2 isolates in GenBank. The ORF1 of the cloned genomes shared more than 97.8% nucleotide identities and more than 98.0% deduced amino acid identities with other PCV-2 isolates , while the ORF2 has 90% ~ 98% nucleotide sequence identity and 87% ~ 99.1% amino acid identity. Phylogenetic tree analysis showed there is correlation between PCV-2 isolates and geographic regions. The circulated genomes are transfected into PK-15 cell line with IpfectamineTM 2000. IFA was conducted after 3 passages of the transfected cells and the results showed that the genome was infectious.

Key words : Porcine circovirus type 2 , Genome , Cloning , Infectivity

Foundation item : National Nature Science Foundation of China(36170701)

* Corresponding author. Tel/Fax 86-27-87282608 , E-mail hzauvet@public.wh.hb.cn

Received date 09-25-2003

第五届世界食用菌生物学及产品大会将于 2005 年在上海召开

“世界食用菌生物学及产品大会”(以下简称大会)是由世界食用菌生物学及产品学会(简称 WSMBMP)组办的世界食用菌大会,内容涉及食用菌生理生化、分子生物学、遗传育种、分类、病虫害防治、栽培技术、菌种制备、营养及药用成分的研发、食品安全及质量控制、产品开发、市场贸易等各个领域。每三年召开一次,前四届已分别在香港、美国、澳大利亚和墨西哥举行。第五届世界食用菌生物学及产品大会将在我国召开,这也是世界食用菌大会首次在中国举行。

第五届大会由 WSMBMP 和上海市农业科学院主办,中国食用菌协会、中国菌物学会、中国农学会食用菌分会、上海对外科技交流中心协办。大会拟定于 2005 年 4 月 8 日至 12 日在上海召开,历时 5 天,有专题演讲、学术讨论、海报展示、产品展览、参观考察等多项内容。欢迎国内外对食用菌生产、研究、开发、贸易有兴趣的单位或个人参加本届大会。

欲知详情,请与大会组委会秘书处联系。

电话 86-21-52630034、86-21-52630137、86-21-62201337,或登录 www.sh-mushroom.com。