

## 鹅圆环病毒浙江永康株全基因组的克隆及序列分析

余旭平<sup>1\*</sup> 郑新添<sup>1</sup> 何世成<sup>1,2</sup> 朱军莉<sup>3</sup> 沈琴芳<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 浙江大学动物科学学院 杭州 310029) (<sup>2</sup> 湖南省兽医总站 长沙 410007)

(<sup>3</sup> 浙江工商大学食品、生物与环境工程学院 杭州 310025)

**摘 要:** 为研究水禽流感大规模爆发的机理,进行了水禽流感病例中并发病原,特别是免疫抑制性病原的检测研究。根据已发表的鹅圆环病毒(*Goose circovirus*, GoCV)序列,设计了一对检测引物,对浙江永康禽流感病死鹅样品进行 PCR 扩增,获得与预期 552bp 大小相符的 DNA 片段,经测序确认为 GoCV 特异序列,推测样品中存在 GoCV。根据测定的序列进一步设计反向扩增引物,经扩增、测序、拼接后获得 GoCV 全长基因组序列。基因组序列分析表明,浙江永康株 GoCV-yk01 全长 1821bp,具有圆环病毒共同的与病毒复制相关的茎环结构和 Rep 蛋白保守基序等特征,它与德国、中国台湾发表的序列在全基因组水平有 91%~93% 的同源性,在 Rep 和外壳蛋白的氨基酸水平有 94%~97% 的同源性。应用 ClustalW 方法作进化树分析显示,GoCV-yk01 序列与德国株及中国台湾株均不在同一分支。圆环病毒可以感染淋巴细胞等增殖快的细胞,引起免疫抑制,从而造成其他病原的并发和继发感染,怀疑 GoCV 可能在 2004 年初永康爆发的鹅流感中起到了一定的协同作用。该 GoCV-yk01 是中国内地首次检测确认并测定全基因组序列的鹅圆环病毒。

**关键词:** 鹅圆环病毒,全基因组序列

中图分类号 S852.6 Q78 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2005)06-0860-05

2003 年冬开始在东南亚及我国相继大规模爆发了禽流感,大量的研究显示病原为禽流感 H5N1 病毒<sup>[1]</sup>。经观察,在爆发病例中有较大一部分是水禽。按照传统观点,水禽常潜伏感染禽流感病毒而极少出现明显的临床病症,但往往因水禽带毒排毒而引起鸡和火鸡等禽流感疫情的爆发<sup>[2]</sup>。为探讨水禽大规模爆发禽流感的机理,我们开展了水禽禽流感病例中并发病原的检测与研究,特别是一些可以引起免疫抑制的病原。

圆环病毒是目前已知最小的动植物病毒,包括两个属:*Gyrovirus* 和 *Circovirus*。前者目前只有鸡贫血病毒(*Chicken anemia virus*, CAV)一个成员,而后者包括猪圆环病毒 I 型(*Porcine circoviruses type I*, PCV-1)和 II 型(PCV-2),鸚鵡喙羽病毒(*psittacine Beak and feather disease virus*, BFDV)等成员。近年来,还在鸽子、鹅、Senegal doves、Cannaries、Finches、Ostrich、Gull 等发现了圆环病毒<sup>[3]</sup>。到目前为止除 PCV 可以在 PK-15 等细胞中繁殖外,其余圆环病毒均尚未能体外培养<sup>[3]</sup>。圆环病毒常潜伏感染而不引起动物发病,但它们往往侵染体内增殖速度快的细

胞,引起淋巴细胞数量的减少、免疫力下降,导致动物对多种条件性病原二次感染易感性的增加,因此,在一定条件下也可以引发临床病症,如 BFDV 可引起鸚鵡羽毛脱落、喙变形,CAV 可引起鸡传染性贫血和免疫力低下,而 PCV-2 与仔猪多系统衰竭综合征(Postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)有关<sup>[4]</sup>。

鹅圆环病毒(GoCV)最早于 1999 年由德国学者 Soike 等<sup>[5]</sup>从患病鹅病理组织中观察到。病鹅主要表现发育不良、体重下降、羽毛凌乱等,病理组织学检查发现法氏囊、脾脏和胸腺的淋巴细胞减少,其中法氏囊病变最明显,甚至出现整个囊结构的破坏,并可观察到嗜碱性的包含体。2001 年 Todd 等<sup>[6]</sup>根据 BFDV 和 PCV 的 V1 ORF 保守序列设计简并引物,克隆测定了 GoCV 的全基因组序列。2002 年中国台湾学者 Chen 等<sup>[7]</sup>应用 9 对引物分别扩增基因组不同片段,测序拼接后获得了 11 株 GoCV 的全基因组序列,并发现 GoCV 基因组序列间存在一定的差异。本文参照 Todd 等<sup>[6]</sup>的策略,根据已发表的 GoCV 序列并结合 PCV、BFDV 等圆环病毒序列设计一对引

基金项目 浙江省重点科技项目(011102120);宁波市重大科技项目(2002D40015)

作者简介 余旭平(1966-),男,浙江余杭人,副教授,从事动物传染病学与病原分子生物学研究。Tel/Fax: 86-571-86971096;

E-mail: xpyu@zju.edu.cn

收稿日期 2005-02-21,修回日期 2005-09-02

物,对来自浙江永康禽流感病死鹅病料进行 GoCV 检测,并进一步获得全长基因序列。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 病料** 浙江永康某鹅养殖场禽流感病死鹅的法氏囊、肝、脾、肾、肺等组织。

**1.1.2 试剂** chelex 购自 Sigma 公司,蛋白酶 K、RNA 酶 A、琼脂糖购自上海 Sangon 公司,胶回收试剂盒购自北京鼎国生物科技有限责任公司;Taq DNA 聚合酶、dNTP、pMD18-T 载体试剂盒购自大连 TaKaRa 公司,引物由上海博亚生物工程有限公司合成。其它试剂为国产分析纯。

### 1.2 病料核酸的提取

取鹅病料混合组织样品约 2g,加 200 $\mu$ L chelex (50mg/mL)悬液,加 2 $\mu$ L 蛋白酶 K (20mg/mL),65 $^{\circ}$ C 作用 4h,振荡 5~10s,99 $^{\circ}$ C 作用 8min,13000r/min 离心 3min,取上清备用。

### 1.3 GoCV 特异片段的 PCR 扩增与检测

根据发表的 GoCV (AJ304456)基因组序列 V1 ORF 保守区,同时参考 PCV、BFDV 等圆环病毒序列,设计引物 相应序列及对应参考序列位置如下: g-up :5'-CACTATTAATAACCCCTACCTTTG-3' (nt 114~136); g-dn :5'-ATAGCCRTCCCACTTCCC-3' (nt 666~646, R = A/G)。PCR 反应采用 50 $\mu$ L 体系:10 $\times$  PCR buffer 5 $\mu$ L,引物 g-up、g-dn (10 $\mu$ mol/L)各 1 $\mu$ L, dNTP Mixture (各 10mmol/L)1 $\mu$ L, Taq DNA 聚合酶 (5U/ $\mu$ L)0.5 $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补充至 50 $\mu$ L;PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 5min,94 $^{\circ}$ C 40s,57 $^{\circ}$ C 60s,72 $^{\circ}$ C 60s,共进行 30 个循环,72 $^{\circ}$ C 5min,4 $^{\circ}$ C 保存。扩增片段长度为 552bp。

### 1.4 GoCV 基因组的反向扩增

在已测定的 552bp 序列的基础上,设计如下反向引物。ip-up :5'-GTACCCGACGACTTATGTAATGTT-3' (nt 470~493); ip-dn :5'-CACGTCAGTTATCGGCAGACC-3' (nt 441~461)。PCR 反应采用 50 $\mu$ L 体系,除引物改变外其它同 1.3;反向 PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 5min,94 $^{\circ}$ C 40s,58 $^{\circ}$ C 60s,72 $^{\circ}$ C 2min,共进行 30 次循环,72 $^{\circ}$ C 5min,4 $^{\circ}$ C 保存。扩增片段长度为 1813bp。

### 1.5 特异性片段的回收与克隆测序

电泳检测后采用胶回收试剂盒回收目的片段。将回收片段与 pMD18-T 载体连接,转化大肠杆菌 TG1 经酶切和 PCR 筛选阳性克隆。阳性克隆分别用载体的通用测序引物和 PCR 扩增引物测序,反向扩增的 1813bp 片段还用合成的 seq-pri 引物[5'-

AAGCCCCAGTCCATTGTTC-3' (nt 1017~1034)]从中间起始测序。为保证测序结果的可靠性,每个扩增片段均选取 3 个不同的克隆进行测序。序列测定由上海博亚生物技术有限公司完成。测得的序列用 DNASTar 软件包中的 Seqman 程序进行拼接、校对。

### 1.6 GoCV 基因组的序列分析

采用 www.ncbi.nlm.nih.gov 的 BLASTn 和 DNASTar 软件包中的 MegAlign、Editseq、ClustalW 等程序将测序获得的 GoCV 基因组序列,分别进行同源性分析、进化树构建、ORF 查找等基因组结构分析及同源序列联配。

### 1.7 用于同源性比较和进化树构建的其它圆环病毒序列

11 个 GoCV 中国台湾株 (tw1~tw11):AF539631~AF539641;GoCV 德国株 (Ger):AJ304456;BFDV:AF080560;PiCV:AJ298229;PCV-1:U49186;PCV-2:AF027217;CAV:NC-001427。

## 2 结果

### 2.1 GoCV 序列的检测

应用自行设计的 g-up 和 g-dn 引物对,对浙江永康禽流感病死鹅病料进行了 GoCV 特异性片段的 PCR 扩增和检测,结果扩增出约 550bp 与预计大小一致的片段,割胶回收后克隆测序,获得 552bp 序列,经 BLASTn 比较确认该序列为 GoCV 特异序列。

### 2.2 GoCV 序列的反向扩增及克隆测序

在获得 552bp 序列的基础上,设计反向引物 ip-up 和 ip-dn,PCR 扩增获得与预计一致的约 1.8kb 片段,经 T 载体克隆、分段测序,校对后获得 1813bp 序列。

### 2.3 浙江永康株 GoCV-yk01 全基因组序列的拼接

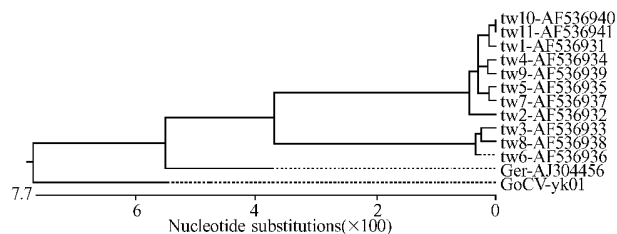
应用 DNASTar 软件包的 SeqMan 程序将两个片段测得的序列进行拼接,获得 GoCV-yk01 株 1821bp 的全基因组序列 (GenBank 登录号为 AY633653)。

### 2.4 GoCV-yk01 同源性分析和进化树构建

经 DNASTar 软件包 MegAlign 分析表明 GoCV-yk01 与德国株及中国台湾 11 株 GoCV 的同源性在 91%~93% 之间;与几株已知的其它圆环病毒比较,GoCV-yk01 株基因组序列与 PCV-1、PCV-2、BFDV、PiCV、CAV 的同源性分别仅为 27.2%、23.3%、24.4%、26.7% 和 1.8%。

将 GoCV-yk01 与现有 GoCV 株用 Clustal-W 法作进化树分析显示:GoCV 可以分为 4 个群 (group),中国台湾的 11 株分成 2 群, I 群包括 tw1/2/4/5/7/9/10/

11, II 群包括 tw3/6/8 德国株和 GoCV-yk01 各自成为一个独立的分支, 分别为 III 和 IV 群 (图 1)。



**图 1 GoCV 进化树分析图**

Fig.1 Phylogenetic tree of GoCVs

## 2.5 GoCV-yk01 基因组结构分析

经分析 GoCV-yk01 基因组编码 4 个 ORF :V1 ( nt 72 ~ 953 ) ,C1( nt 1760 ~ 1008 ) ,V2( nt 1612 ~ 1725 ) ,C2 nt 426 ~ 127 表 1 ,图 2-a ) ,据推测<sup>[6]</sup> V1 ORF 编码复制相关蛋白 Rep ,C1 ORF 编码外壳蛋白 ,V2 和 C2 ORF 功能未知。与现有 GoCV 基因组结构比较发现 ,GoCV-yk01 株基因组结构与中国台湾株更相似 ,V2 ORF 编码 37 个氨基酸 ,而德国株的 V2 ORF 编码 120 个氨基酸。但由于高变区缺失 1 个碱基 ,浙江永康株 GoCV-yk01 各 ORF 编码区起始核苷酸位置较中国台湾株和德国株前移一个核苷酸 (表 1)。

表 1 不同来源 GoCV 的基因组结构比较

Table 1 Comparison of GoCV genomes of different origin

Region isolated from	Zhejiang	Taiwan	Germany
Genome( nt )	1821	1820/1821 *	1821
ORF V1	293( nt 72 ) <sup>b</sup>	293( nt 73 )	293( nt 73 )
ORF V2	37( nt 1612 )	37( nt 1613 )	120( nt 1613 )
ORF C1	250( nt 1760 )	250( nt 1761 )	250( nt 1761 )
ORF C2	99( nt 426 )	99( nt 427 )	99( nt 427 )
Intergenic region( nt )	132	132	132
Nonamer sequence	TATTATTAC	TATTATTAC	TATTATTAC

a : Number of amino acids encoded by ORF ; b : nt position at which ORF starts ; \* : Among Taiwan isolates , tw/8 and tw/9 are 1820bp while the others are 1821bp in length.

与其它鹅圆环病毒一样,GoCV-yk01 株在 V1 ORF 和 C1 ORF 的起始之间有一茎环结构,茎环上有保守的九碱基序列 TATTATTAC,在茎环附近还有 2 个正向重复的七碱基序列 GTACTC(图 2-b)。据推测<sup>[6]</sup>该序列与基因组的滚环复制相关。此外,在茎环结构的两侧相应于 nt 1772 ~ 1777(GCTTC)和 nt 36 ~ 41(GGAAGC)的位置还存在一对反向重复序列。

相应于 91% ~ 93% 的全基因组同源性,在茎环结构的下游,对应于序列 nt 27 ~ 72 间存在一个高变异区域(图 2-c)。MegAlign 分析显示,GoCV-vk01 除与

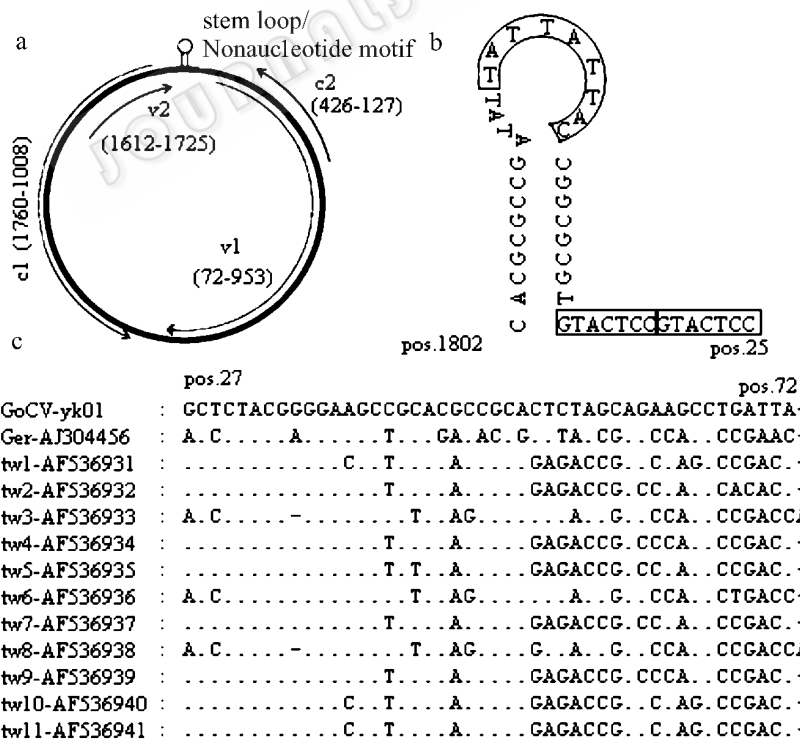


图 2 GoCV-vk01 基因组结构图

Fig.2 Genome organization of GoCV-yk01

a : Genome organization of the replicative form DNA of GoCV-yk01 ; b : Structure of the stem-loop element located in the short intergenic region of GoCV/yk-01 ; c : GoCV variable region between nt 27 ~ 72. Comparing to GoCV-yk01 , the differences of other GoCVs are listed and the identical and deleted nucleotides are showed with dot and dash line respectively.

一株中国台湾株 tw/6 的同源性为 71.7% 外,与其它中国台湾株间的同源性在 50% ~ 58.7%,而与德国株的同源性仅为 32.6%。

## 2.6 GoCV-yk01 Rep 蛋白及外壳蛋白的同源性分析

将 GoCV-yk01 株与已发表的 GoCV 及 PCV-1、PCV-2、BFDV、PiCV 的 Rep 蛋白(V1 ORF)及外壳蛋白(C1 ORF)的氨基酸序列应用 Clustal-W 程序进行联配分析,结果显示 GoCV-yk01 株 Rep 蛋白与 GoCV 德国株、GoCV/tw1 和 GoCV/tw8 间的氨基酸同源性分别为 96.3%、96.0% 和 96.9%,与 PCV-1、PCV-2、BFDV 和 PiCV 间的氨基酸同源性分别为 45.6%、45.3%、50.6% 和 42.3%;与其它圆环病毒一样,GoCV-yk-01 的 Rep 蛋白也存在 3 个与滚环复制相关的保守基序,即 FTLNN、HLQG 和 YCSK,此外还包括其它的保守基序:WWDGY、DDFYGWLP、DRYP 等。GoCV-yk01 外壳蛋白与德国株及中国台湾株 GoCV 的同源性在 94% ~ 95% 之间,而与 PCV-1、PCV-2、BFDV 和 PiCV 的同源性分别为 28.3%、23.2%、24.7% 和 19.2%。由此可见,Rep 蛋白比外壳蛋白相对保守些。

## 3 讨论

自 1974 年 Tischer<sup>[8]</sup>首次从 PK-15 细胞发现圆环病毒至今,已从猪、鸡、鸚鵡、鸽子、鹅等动物、人类、甚至植物(*Banana bunchy top virus*, BBTV、*Coconut foliar decay virus*, CFDV、*Subterranean clover stunt virus*, SCSV 等)中发现了圆环病毒。1999 年 Soike 等<sup>[5]</sup>首次报道了鹅圆环病毒,2001 年 Todd 等<sup>[6]</sup>发表了一株 GoCV 德国株的序列并分析了其基因组结构,2003 年中国台湾 Chen 等<sup>[7]</sup>分析了 11 株 GoCV 序列,显示不同 GoCV 株间存在序列差异。

本实验用 PCR 法对浙江永康的禽流感病死鹅病料进行了 GoCV 的检测,结果克隆到了一株鹅圆环病毒 GoCV-yk01 全基因组。序列同源性分析显示 GoCV-yk01 相对地与 PCV-1、PCV-2、BFDV、PiCV、CAV 同源性较低,但与现已报道的 12 株 GoCV 的同源性高(全基因组核苷酸水平、Rep 和外壳蛋白氨基酸水平的同源性分别在 91% ~ 93% 和 94% ~ 97% 之间),且基因组结构中具有极其保守的与圆环病毒复制相关的茎环结构、并编码与滚环复制相关的保守基序等,由此说明 GoCV-yk01 为鹅圆环病毒。将 GoCV-yk01 与已报道的 GoCV 株应用 Clustal-W 法作进化树分析显示 GoCV 可以分为 4 个群,说明 GoCV 存在多个遗传分支 GoCV-yk01 独立成一个群,由此

说明浙江永康株 GoCV-yk01 可能与德国株和中国台湾株具有不同的来源,或者它们相互间已经过了长时间的传代和变异,因此不排除 GoCV-yk01 株已经在国内存在了较长时间的可能性。

另外,在茎环结构的下游,对应于 nt 27 ~ 72 间存在一个高变异区域,GoCV-yk01 除与一株中国台湾株 tw/6 的同源性为 71.7% 外,与其它中国台湾株间的同源性在 50% ~ 58.7%,而与德国株的同源性仅为 32.6%。鉴于该区域与其他毒株特别是德国株间存在极大的差异,推测该高变区可能是一个与病毒自身生存相关性不十分明显的间区,然而,该序列位于与复制相关的茎环结构和 V1 ORF 起始密码之间,因此,我们怀疑它也有可能影响到 Rep 蛋白的表达,可能与病毒的毒力有一定的关系,尚有待进一步分析和研究。

圆环病毒结构简单,其复制需要依赖于旺盛的宿主细胞活力,增殖速度快的淋巴细胞是圆环病毒侵染的主要宿主。因此,圆环病毒感染往往导致机体免疫混乱、免疫力下降,进而引起多种条件性病原的二次感染。PCV-2 被认为与仔猪断奶多系统衰弱综合症及猪皮炎肾病综合症密切相关,可能就与其导致免疫抑制有关<sup>[9-11]</sup>。水禽通常被认为是禽流感的储存宿主,很少大规模发病死亡<sup>[12]</sup>,然而,2003 年冬开始在东南亚及我国相继大规模爆发的 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 高致病力禽流感病例中有较大一部分是有背传统观点的水禽流感,此外,近年来,还出现了一些有背传统观点的水禽新城疫等新疫病<sup>[12]</sup>,使我们怀疑可能存在致水禽免疫抑制的因素。鹅圆环病毒的感染是否引起机体免疫抑制或是否为引起免疫抑制的唯一因素,进而引起鹅流感等疫病的爆发尚需要进一步的研究。

该 GoCV-yk01 是我国内地首次检测确认并测定全基因组序列的鹅圆环病毒,有关 GoCV 感染的流行病学调查、GoCV 的病理作用等工作正进行中。

## 参 考 文 献

- [1] Capua I, Alexander D J. Avian influenza: recent developments. *Avian Pathology*, 2004, 33(4): 393 - 404.
- [2] Calnek B W. 禽病学. 高福,苏敬良主译. 第 10 版. 北京:中国农业出版社,1999:742 - 761.
- [3] Todd D. Avian circovirus diseases: lessons for the study of PMWS. *Veterinary Microbiology*, 2004, 98: 169 - 174.
- [4] 陆承平. 兽医微生物学. 北京:中国农业出版社,2001:491.

- [ 5 ] Soike D , Kohler B , Albrecht K. A circovirus-like infection in geese related to a runting syndrome. *Avian Pathology* , 1999 , **28** :199 – 202.
- [ 6 ] Todd D , Weston J H , Soike D , *et al.* Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon. *Virology* , 2001 **286** 354 – 362.
- [ 7 ] Chen C L , Chang P C , Lee M S , *et al.* Nucleotide sequences of goose circovirus isolated in Taiwan. *Avian Pathology* , 2003 ,**32** : 165 – 171.
- [ 8 ] Todd D , Weston J H , Soike D , *et al.* Circoviruses : immunosuppressive threats to avian species. A review. *Avian Pathology* , 2000 , **29** 373 – 394.
- [ 9 ] Chae C. Postweaning multisystemic wasting syndrome : a review of aetiology , diagnosis and pathology. *Vet J* , 2004 , **168** ( 1 ) :41 – 49.
- [ 10 ] Harding J C. The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. *Vet Microbiol* , 2004 , **98** ( 2 ) :131 – 135.
- [ 11 ] 郎洪武 ,王 力 ,张广川 ,等. 猪圆环病毒分离鉴定及断奶仔猪多系统衰弱综合征的诊断. *中国兽医科技* , 2001 , **31** ( 3 ) :3 – 4.
- [ 12 ] 万洪全 ,吴艳涛 ,刘秀梵 ,等. 4 株鹅源新城疫病毒融合蛋白基因的克隆及序列分析. *微生物学报* , 2002 , **42** ( 2 ) :208 – 213.

## Cloning and analysis of the complete genome of a *Goose circovirus* from Yongkang Zhejiang

YU Xu-ping<sup>1\*</sup> ZHENG Xin-tian<sup>1</sup> HE Shi-cheng<sup>2</sup> ZHU Jun-li<sup>3</sup> SHEN Qin-fang<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> College of Animal Sciences , Zhejiang University , Hangzhou 310029 , China )

(<sup>2</sup> Veterinary Station of Hunan Province , Changsha 410007 , China )

(<sup>3</sup> College of Food Science , Biotechnology & Environmental Engineering , Zhejiang Gongshang University , Hangzhou 310025 , China )

**Abstract** : To investigate the mechanism of avian influenza outbreak widely in water fowls , the co-pathogens , especially that caused immuno-depression were studied. A pair of degenerated primers , which amplified a fragment of 552bp in length , was designed and synthesized based on the published goose and other *Circovirus* sequences. The specific PCR product was amplified from the goose sample of Yongkang avian influenza case of Zhejiang Province. The fragment was then sequenced and the result showed the existence of the GoCV. The opposite part of the genome was further amplified using inverse primers designed based on the 552bp sequence obtained and the 1821bp full length genomic sequence of GoCV-yk01 was compiled using Seqman program of DNASTar. Sequence analysis showed that the GoCV-yk01 possessed common features of circovirus included potential replication associated stem-loop structure and the Rep protein motifs. Homology analysis showed that the sequence of GoCV-yk01 had 91% ~ 93% similarity to that of Taiwan and Germany strains. Phylogenetic analysis with ClustalW , however , showed that the GoCV-yk01 was on a different branch away from Taiwan and Germany strains. *Circovirus* usually causes immuno-depression and results in secondary infection , as it infects rapid growing cells as lymphocyte. It is speculated that the infection of GoCV may be a part of the reason of the avian influenza outbreak of the Yongkang case. The GoCV-yk01 is the first GoCV strain reported in mainland of China.

**Key words** : Goose , *Circovirus* , The complete genome