

## 猪 II 型圆环病毒浙江株的分离及全基因组结构分析

陈庆新<sup>1,2</sup> 周继勇<sup>1\*</sup> 叶菊秀<sup>1</sup> 申会刚<sup>1</sup> 陈婷飞<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>浙江大学动物预防医学研究所 杭州 310029)

(<sup>2</sup>浙江大学生命科学学院 杭州 310029)

**摘要:**用 PCR 方法对从浙江省猪场收集的、以淋巴结肿大和生长迟缓为特征的患猪腹股沟淋巴结进行 PCV2 检测。将检测为阳性的病料研磨、离心、过滤除菌后,接种 PCV-free PK-15 细胞进行病毒分离,分离获得 3 株病毒,命名为 HZ0201、HZ0202、NB0301。PK-15 细胞增殖所得病毒离心纯化后,在电镜下可观察到直径约为 17~20nm,呈二十面体对称的病毒粒子。以组织和病毒的细胞 DNA 为模板进行 PCV2 的全基因扩增,测序结果显示 3 株病毒分离物全基因序列均由 1767bp 组成,直接来自病料与细胞分离毒株的核苷酸同源性为 100%。基因组内含有 11 个 ORF。通过比较发现,分离毒株与 PCV2 参考株的同源性介于 94.2%~99.7% 之间;与 PCV1 参考株的同源性为 77.2%~77.9%。

**关键词:**猪圆环病毒 2 型,病毒形态,基因结构分析

中图分类号:Q75 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2004)04-0526-04

猪 II 型圆环病毒(*Porcine circovirus type 2*, PCV2)是圆环病毒科圆环病毒属的成员,是导致断乳后猪多系统综合症(Post-weaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)的主要病原<sup>[1]</sup>。自从 1997 年加拿大首次报道以来,已在许多国家出现感染和流行<sup>[2]</sup>。国内周继勇等<sup>[3]</sup>应用 IFA 方法,对 2000 多份血清样品进行系统分析后,发现 PCV2 在猪群中的感染非常普遍,不同品种猪对 PCV2 的易感性不同,被 PCV2 感染的猪群降低了对疫苗的免疫应答。这些说明 PCV2 的感染在猪场已普遍存在。

Tischer 等<sup>[4,5]</sup>首先在 PK-15 细胞中发现并分离 PCV(I 型)。Ellis 等<sup>[6]</sup>通过 PCV-free PK-15 细胞从患 PMWS 的猪体内分离得到 PCV2 病毒。Hamel 等<sup>[7]</sup>通过分析猪 II 型圆环病毒的基因组结构发现 PCV2 可能存在 11 个阅读框,ORF1 和 ORF2 是其主要的阅读框分别编码复制相关 Rep 蛋白和主要结构蛋白 Cap 蛋白。其他阅读框的编码蛋白的功能还不清楚。最近 Cheung 等<sup>[8]</sup>在 PCV2 转录水平上发现,PCV2 在 PK-15 细胞复制过程中有了 9 种 RNA,除了 Rep 和 Cap 的 RNA 外,另外 ORF1 又可通过可变剪切的方式形成 Rep', Rep3a, Rep3b 和 Rep3c 4 种复制相关蛋白 RNA 与 NS515, NS672 和 NS03 种非结构蛋白 RNA。本文利用 PCV-free PK-15 细胞对来自浙江的 PMWS 进行病毒分离,克隆和测定 PCV2 的全基因序列并分析病毒的基因结构特征。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 病料来源:试验所用病料分别来源于宁波某猪场 40d

断奶仔猪(NB0301)以及杭州某猪场 78d(HZ0201)和 82d 保育猪(HZ0202)的腹股沟淋巴结,病猪呈现腹股沟淋巴结水肿、出血,肺部水肿,肉样变等病变特征。

**1.1.2 细胞、载体、试剂:**PK-15 细胞 Dulac 株,PCV 检测为阴性,由中国兽药监察所王琴研究员惠赠。pGEM-Teasy 载体购自 Promega 公司, *Escherichia coli* TOP10 由本研究室保存。

MEM 培养基和胎牛血清均购自 Invitrogen 公司。D-氨基葡萄糖购自 OMIGA 公司。Proteinase K 购自德国 MERCK 公司。胰蛋白酶(1:250) UNIQ-5 柱离心式胶回收试剂盒、Taq plus DNA Polymerase 及 dNTP Mix 等分别购自上海生工生物工程技术有限公司。25cm<sup>2</sup> 和 75cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶购自比利时 ORANGE SCIENTIFIC 公司。

##### 1.2 PCV2 型病毒检测引物和全基因引物设计及合成

根据已发表的 PCV2 序列(GenBank No. AF027217)设计引物。PCV2 型特异性检测引物:Pt1:5'-GAATTGTACATAC-ATGGTTA-3'; Pt2:5'-CAAGGCTACCACAGTCAGAA-3',可扩增 1092~1565 之间长为 473bp 的核苷酸片段。全基因组扩增引物:Pg1:5'-GTACCTTGTTGAGAGCGGG-3'; Pg2:5'-TCA-CAGCAGTAGACAGGTCA-3',可扩增全长为 1768bp PCV2 基因组,引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

##### 1.3 病料 PCV2 的检测

称取 0.05g 病料,加入 500 $\mu$ L 组织裂解缓冲液(200mmol/L NaCl, 10mmol/L Tris-HCl, 100mmol/L EDTA, 0.5% SDS, pH 8.0)进行匀浆,倒入一离心管中,3000g 离心 10min;取上清加入 50 $\mu$ L 蛋白酶 K(20mg 蛋白酶 K 用 1mL TE 缓冲液溶解),50 $^{\circ}$ C 裂解 3h,加入等体积的酚:氯仿,12000g 离心 10min,取上清加

基金项目:浙江省重大科技攻关项目(2003C12012),国家自然科学基金(30370052)

\* 通讯作者。Tel:86-571-86971698; Fax:86-571-86971821; E-mail:jyzhou@zju.edu.cn

作者简介:陈庆新(1979-),男,山东省东营人,在读博士生,研究方向为病毒与基因工程。

收稿日期:2003-11-03,修回日期:2004-03-05

入两倍体积的无水乙醇, - 20℃ 沉淀 40min ;12000g 离心 10min ,然后加入 1mL 70% 乙醇洗涤 1 次 ,12000g 离心 5min ,弃上清 ,沉淀于室温干燥 ,加入适量的 TE 溶解沉淀。

PCR 反应体系 :组织总 DNA 3μL 为模板 ,加入 10 × PCR buffer (Mg<sup>2+</sup> Free) 5μL ,PtI (12μmol/L) 1μL , PtX (12μmol/L) 1μL , dNTP Mix (10mmol/L) 1μL , 25mmol/L MgCl<sub>2</sub> 4μL , Taq plus 0.5μL 和灭菌 ddH<sub>2</sub>O 24.5μL 。反应条件 :94℃ 2min ;94℃ 45s , 51℃ 45s , 72℃ 45s ,35 个循环 ;72℃ 10min 。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.4 病毒的分离

称取 PCV2 检测为阳性的病料 2g ,加入 MEM 生长液 10mL 进行研磨匀浆 ,反复冻融 3 次后 ,经 0.22μm 的细菌滤器过滤除菌 。将 PK15 细胞悬液 27mL 与病毒滤液 3mL 混合后 ,加入一细胞培养瓶 (75cm<sup>2</sup> ) ,于 5% CO<sub>2</sub> 和 37℃ 条件下培养 48h 。弃去生长液 ,用 300mmol/L 的 D-氨基葡萄糖于 37℃ 处理 20min 。倾去 D-氨基葡萄糖 ,用 MEM 洗两次后 ,加入 30mL 生长液继续培养 48 ~ 72h 。细胞反复冻融 3 次 ,收获病毒 。抽取细胞的总 DNA ,PCR 检测病毒的分离及适应情况。

### 1.5 病毒的纯化与形态观察

将收获病毒培养液在 12000g 离心 30min 除去细胞碎片和较大的杂质 。取上清于 15000g 离心 2.5h ,沉淀用适量 TE 缓冲液悬浮 。配制 40%、45%、50%、55%、60%、65% 6 个梯度的蔗糖水溶液 ,按照由低到高浓度依次加入各个梯度的蔗糖溶液 ,于 4℃ 平衡过夜 ,将悬浮液加入到平衡过夜蔗糖密度梯度管中 ,15000g 离心 2.5h 收集纯化病毒条带 。将纯化带进行 PCR 扩增和 SDS-PAGE 分析<sup>[9]</sup> ,纯化病毒用 2% 的磷酸钨酸 ,透射电镜观察病毒形态。

### 1.6 分离毒株全基因组的克隆与序列分析

各自以 PCV2 检测阳性的病料组织和细胞抽提获得的 DNA 3μL 为模板 ,加入 PCV2 全基因组扩增引物 Pg1 和 Pg2 ,按前述方法 2 构成 PCR 反应体系 。反应体系 :94℃ 2min ; 94℃ 45s , 59℃ 45s , 72℃ 2min ,35 个循环 ;72℃ 10min 。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物 。割胶回收目的条带 ,用 UNI-Q-5 柱进行 PCR 产物回收 。纯化的 PCR 产物与 pGEM-T easy 载体连接 ,转化 *E. coli* TOP10 。重组质粒经 PCR 和酶切鉴定后 ,测定核苷酸序列 。应用 Omega 2.0 和 DNA Star 软件进行序列分析。

## 2 结果

### 2.1 病料组织的 PCR 检测和病毒分离

从 3 个病料中提取 DNA 模板 ,经 PCR 扩增和 1% 琼脂糖凝胶电泳后 ,均可观察到约为 0.5kb 的特异性核苷酸条带 ,与预期相符 。将 PCV2 检测阳性的组织匀浆接种 PCV-free PK-15 细胞后进行连续传代 。结果显示 ,接种后 1 ~ 3 代的细胞不能用 PCV2 型特异性引物扩增到 PCV2 特异性 0.5kb 核苷酸片段 ;从第 4 代开始 ,用 PCV2 型特异性引物可稳定的从接种细胞中扩增获得 PCV2 特异性 0.5kb 片段。

### 2.2 病毒纯化和病毒形态

适应于 PK15 细胞的病毒分离物 ,密度梯度离心后 ,可见

到 2 条纯化带 。收集病毒条带进行 PCR 扩增和 SDS-PAGE 。结果显示 ,位于离心管顶层条带的 DNA 抽提物 ,经 PCR 扩增后未能获得 PCV2 特异性 0.5kb 核苷酸片段 ,而另外一条纯化带的 DNA 抽提物则获得了 PCV2 特异性 0.5kb 核苷酸片段 。两个条带经 SDS-PAGE 均可见分子量约 30kD 的蛋白条带 。说明位于离心管顶层的条带是病毒的蛋白空衣壳 。电镜下可观察到直径约为 17nm 的病毒粒子 (图 1)。

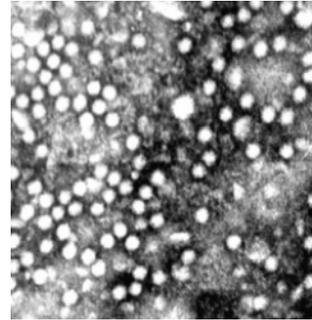


图 1 PCV2 株病毒粒子电镜照片

Fig.1 Transmission electron micrograph of purified PCV2 particles  
Electron micrograph of purified PCV2 particles negatively stained with phosphotungstic acid. Scale bar is 100nm.

### 2.3 PCV2 分离毒株全基因组的克隆和序列测定

应用扩增 PCV2 全基因组的 PCR 引物 ,分别从病料组织和细胞适应毒中 ,扩增到 PCV2-HZ0201、HZ0202 和 NB0301 毒株 1.8kb 的核苷酸片段 ,与预期大小相符 。纯化的 PCR 产物经克隆、鉴定和核苷酸序列测定后 ,发现 PCV2-HZ0201、HZ0202 及 NB0301 毒株的全基因组均由 1767bp 组成 (GenBank 登录号分别为 AY088355、AY217743、AY391729)。

### 2.4 PCV2 分离毒株全基因组序列结构分析

图 2 所示 3 个 PCV2 分离毒株的基因组在 1734 ~ 50 位有一段保守的由约 80bp 组成的序列 ,在这一保守序列内含有一病毒复制和转录所必须的由 32 个核苷酸组成的茎环结

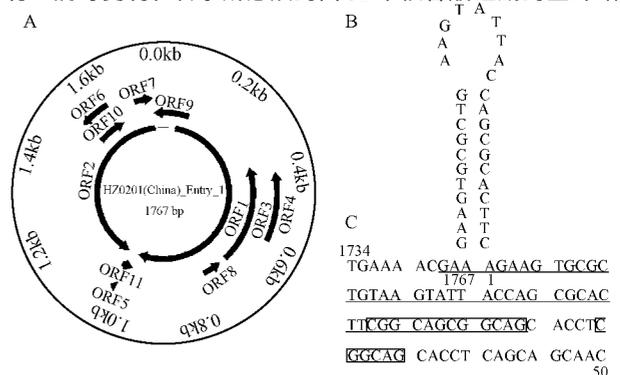


图 2 PCV2 浙江分离株的基因结构及序列分析

Fig.2 Physical map and sequence analysis of PCV2 HZ0201 isolates  
A Schematic representation of 11 putative ORFs of genome of PCV2 HZ0201 strain. B :A stem-loop structure presents at the origin of DNA replication in the putative encapsidated strand of PCV2 HZ0201 isolate. C Sequence of the replication origin of PCV2. The inverted repeat is underlined , the conserved nonanucleotide sequence is marked with a gray plain box , and the three 6-bp repeats are marked by plain box .

构(GAAGTGGCTGTAAGTATT↓ACCAGCGCACTTC),保守的9核苷酸AAGTATT↓ACC↓表示病毒滚环复制剪切位点)位于茎环结构的中央;茎环结构的3'端以外还存在3个5'-CGGCAG-3'的重复序列(重复子),这些重复序列是病毒复制酶蛋白的结合位点。基因组内含有ORF1(51~995)ORF2(1033~1734)ORF3(357~671)ORF4(386~565)ORF5(1016~1036)ORF6(1521~1610)ORF7(1670~1082)ORF8(688~753)ORF9(1731~92)ORF10(1523~1627)和ORF11(989~1033)等11个可能的ORF编码产物的分子量分别为35.8 kD、27.8 kD、11.9 kD、6.5 kD、0.76 kD、3.0 kD、1.9 kD、2.4 kD、4.5 kD、4.2 kD、1.8 kD。在ORF1的内部存在两个较大的ORF(363~995和528~995),分别编码23.7和17.8kD的蛋白。在ORF2的内部也存在两个ORF(1033~1521和1033~1086),分别编码18.7和2.1 kD的蛋白。另外,在分析所有浙江分离株的1767bp的PCV2序列后,发现病毒在1035位上T突变为A,

使TTA变为TAA导致了ORF5的提前终止。

## 2.5 分离毒株的同源性和进化

分离的HZ0201和HZ0202的同源性为100%,HZ0201和HZ0202与NB0301的同源性为99.5%。浙江PCV2分离株(HZ0201、HZ0202和NB0301)与法国毒株(AF055393)的同源性较高为99.4%~99.7%,与中国台北毒株AF364094的同源性最低为94.2%,与PCV1毒株的同源性较低(77.9%)。浙江PCV2分离株(HZ0201、HZ0202和NB0301)与国内其他地区分离株的核苷酸同源性为95.2%~95.7%。系统进化树可以看出PCV主要有两个较大的分支,一为PCV1构成的分支,另一个分支由PCV2构成。在PCV2构成的分支中,浙江分离毒株与FRA(France)及豫A株亲缘关系较近,他们的基因组长度均为1767bp,来自中国其他地区的PCV2毒株与其他国家的PCV2分离株形成PCV2的另一分支,其基因组长度为1768bp(图3),

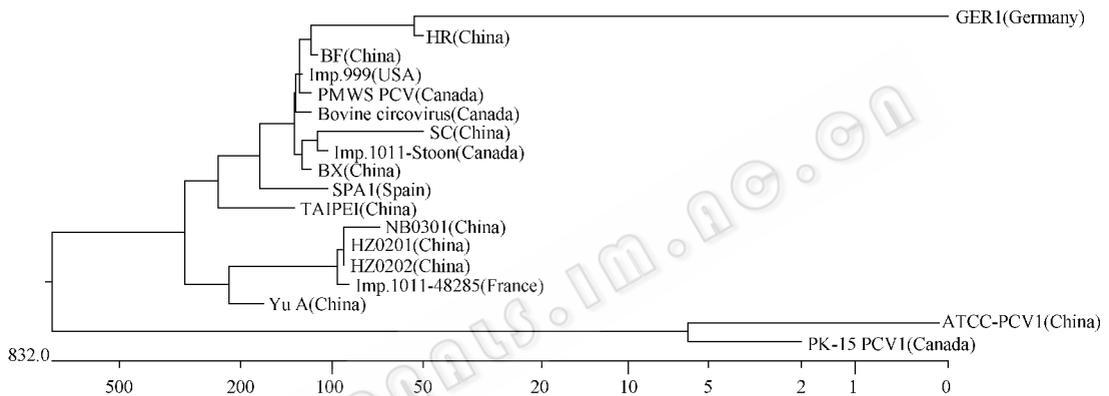


图3 PCV毒株的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of PCV genomes

## 3 讨论

PMWS从一出现就呈现世界范围内流行,给养猪业造成经济损失,引起人们的普遍重视。PCV2作为引起PMWS的一种主要病原,也成为研究的焦点。目前研究表明,PCV2仅能导致轻微的PMWS。但是当与PRRSV、PRV、PPV或细菌等共同感染时,则会复制出典型的PMWS症状<sup>[1]</sup>。我们在进行PCV2感染的血清学调查过程中,也发现PCV2感染严重的猪群,其PRRSV和PrV抗体的阳性率低,说明PCV2的感染在一定程度上影响了机体对PRRSV和PrV疫苗的免疫应答能力<sup>[3]</sup>。PCV2分离时,用D-氨基葡萄糖处理PK15细胞,有利于病毒对细胞的适应,这可能与D-氨基葡萄糖诱导细胞进入S期,促进病毒的增殖有关<sup>[5]</sup>。蔗糖密度梯度离心得到纯化的病毒粒子,观察病毒的形态呈正二十面体对称,直径大约为17~20nm,这与资料中报道的PCV2的形态和特征相符。在其他研究报道中,有学者用Vero、RK等细胞分离PCV2,但是病毒对细胞的适应性较差,并且有报道认为PCV1连续在Vero细胞传代时会导致病毒抗原性的改变<sup>[10]</sup>。

基因组核苷酸同源性和系统进化树分析发现,PCV2存在两种基因亚型,其中一种基因亚型的病毒基因组由1767bp

组成(I亚型),另一种基因亚型的病毒基因组由1768bp组成(II亚型),来自浙江的PCV2分离株为基因I亚型。来自中国大陆的其他PCV2分离株,有的属基因I亚型,有的属基因II亚型(图3)。就浙江的PCV2分离株而言,虽属同一基因型,但基因组核苷酸的一致性也存在一定差异,提示PCV2在不同外界环境条件下存在一些变异。

软件分析表明,PCV2和PCV1之间变异表现为碱基的插入、缺失和突变。PCV2与PCV1相比主要在38~39、46~47、65~73、1028、1037~1044、1544~1545位上发生碱基的插入;在932~933、1004~1005、1634~1635、1737~1738、1761~1762位之间发生碱基的缺失。另外,在其他位置发生大量点突变和连续突变。65~73位上的插入和932~933位之间的碱基缺失导致PCV2的ORF1编码的Rep蛋白比PCV1多两个氨基酸。碱基的插入主要发生在PCV的ORF1,这提示病毒在宿主细胞内的增殖和复制的方式有差异,而导致了PCV1可以在细胞内持续感染,而PCV2则可以导致宿主发病。在PCV的ORF2阅读框中发生大量的碱基点突变。而PCV2病毒之间的差异主要是在ORF1的前400个碱基内的散在点突变和ORF2内大量的点突变。ORF1的突变位点较少,且发生位置多在密码子的第2、3位,ORF2的突变位点较多,且突变频率较快。除了在密码

子的第 2 3 位也都存在突变现象外, 在第 1 位也存在较多的突变点。这种突变是否与它逃避免疫应答的机制有关, 需要通过实验进一步验证。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Allan G M, McNeilly F, Kennedy S, *et al.* Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J Vet Diagn Invest*, 1998, **10** (3): 3-10.
- [ 2 ] Allan G M, Eills J A. Porcine circovirus: a review. *J Vet Diagn Invest*, 2000, **12** (1): 3-14.
- [ 3 ] 周继勇, 陈庆新, 叶菊秀, 等. 猪圆环病毒 2 型感染的血清学分析. *中国兽医学报* 2004, **24** (1): 1-3.
- [ 4 ] Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, *et al.* A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature*, 1982, **295** (7): 64-66.
- [ 5 ] Tischer I, Peters D, Rasch R, *et al.* Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. *Arch Virol*, 1987, **96** (1-2): 39-57.
- [ 6 ] Ellis J, Hassard L, Clark E, *et al.* Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can Vet J*, 1998, **39** (1): 44-51.
- [ 7 ] Hamel A L, Lin L L, Nayar G P. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J Virol*, 1998, **72** (6): 5262-5267.
- [ 8 ] Cheung A K. Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2. *Virology*, 2003, **305** (1): 168-180.
- [ 9 ] 周继勇. 传染性支气管炎病毒嗜腺胃毒株(ZJ971 毒株)结构蛋白和 S1 基因的结构分析. *中国兽医学报*, 2000, **20** (5): 429-433.
- [ 10 ] Allan G M, Mackie D P, McNair J, *et al.* Production, preliminary characterization and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus. *Vet Immunol Immunopathol*, 1994, **43** (4): 357-371.

## Isolation and Genomic Structure of *Porcine Circovirus* Type II in Zhejiang

CHEN Qing-Xin<sup>1,2</sup> ZHOU Ji-Yong<sup>1\*</sup> YE Ju-Xiu<sup>1</sup> SHEN Hui-Gang<sup>1</sup> CHEN Ting-Fei<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Preventive Veterinary Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

(<sup>2</sup> College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

**Abstract:** Using specific primer of PCV type II, the nucleotide fragment was amplified by PCR from the inguinal lymph nodes collected from pig farms in Zhejiang province and characterized with enlarged lymph nodes and progressive weight loss. Positive samples detected with PCV2 type-specific primer by PCR were homogenized with a mortar in MEM. The suspension was clarified and filtered. The suspension was mixed with PCV-free PK-15 cells, and then incubated subsequently at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in an incubator. Three isolates of *porcine circovirus* type 2 were isolated and named as HZ0201, HZ0202, and NB0301. Purified virus is a 17nm in diameter and icosahedral virion in transmission electron microscope. The complete genome of three virus isolates is composed of 1767 nucleotides containing 11 ORFs. Nucleotide comparison of the virus isolates adapted in PK15 cells revealed 100% identity to that origin from the lymphoid tissue of the diseased pigs. Genome of the virus isolates shared 94.2% ~ 99.7% homology with PCV2 reference strains from GenBank, 77.2% ~ 77.9% homology with PCV1.

**Key words:** *Porcine circovirus*, Morphology, Genomic structure