

一株家养野猪源猪圆环病毒 2 型的分离与鉴定

王海燕 高 崧* 刘秀梵

(扬州大学 农业部畜禽传染病学重点开放实验室 扬州 225009)

摘要: 应用 PCR 方法从临诊疑似断奶仔猪多系统衰竭综合征(PMWS)家养野猪病例的淋巴结和脾脏中扩增出预期长度的猪圆环病毒 2 型(PCV2)的 DNA 片段, 在 Dulac 细胞中进行分离和培养, 扩增全基因组序列后进行同源性分析。结果显示, 扩增产物与家猪源参考毒株的序列同源性均在 98%以上, 该病毒与家猪源病毒差异不大。

关键词: 家养野猪, 猪圆环病毒 2 型, 分离, 鉴定

Isolation and Identification of Porcine Circovirus Type 2 Virus from a Domesticated Wild Boar

WANG Hai-Yan GAO Song* LIU Xiu-Fan

(Key Laboratory of Animal Infectious Diseases of Ministry of Agriculture, Yangzhou University, Yangzhou 225009)

Abstract: The nucleic acid fragment of porcine circovirus type 2(PCV2) was amplified using PCR from the tissues of a domesticated wild boar with suspected postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). The sample were then inoculated into the Dulac cells and passaged for 8 generation. The 4 nucleic acid fragments covered the complete genome for PCV2 were obtained by over-lapping PCR and sent to sequence. The sequence of genome was compared with other 9 strains originated from piglets in the same area. The result showed that these strains were in high homology.

Keywords: Domesticated wild boar, Porcine circovirus type 2, Isolation, Identification

猪圆环病毒 2 型 (porcine circovirus type 2, PCV2)能引起断奶仔猪多系统衰竭综合征(postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)、猪皮炎与肾病综合征、繁殖障碍等疾病^[1]。PMWS是一种以断乳仔猪渐进性消瘦、呼吸困难、腹泻、贫血、明显的淋巴组织病变为主要特征的疾病^[1,2]。自 1991 年在加拿大首次发现 PMWS 以来, 欧美多个国家和日本相继报道了 PMWS 的发生和流行^[3-6], 我国首次分离到该病毒是在 2001 年^[7]。随后国内学者们

证实该病毒在我国猪场广泛存在并造成了巨大经济损失^[8-10]。家猪和野猪被认为是 PCV2 的自然宿主^[1], 目前野猪感染发病的报道很少^[11,12]。近年来, 我国多个地区开始饲养野猪或杂交野猪, 随着野猪进入饲养环境中并与家猪接触, 其生存的生态和环境发生了变化, 与家猪携带的病原体接触频率增高, 一些传染病开始出现和流行。本研究对从疑为 PMWS 的野猪病料中分离到的一株 PCV2 进行了鉴定。

1 材料与amp;方法

1.1 病料和生物材料

来自江苏某猪场, 病猪死亡前主要表现体温升高、消瘦、呼吸困难等临床症状, 剖检取病变的淋巴结、肺和脾脏组织, 置于 -70°C 超低温冰箱中保存备用。Dulac 细胞(无 PCV1 污染) 由本室保存。PCV1 参考毒株由本室分离保存; PCV2 标准毒株由南京农业大学陈溥言教授惠赠。PCV2 分离株 ChangZhou0511、DaFeng0609、GaoYou0707、HuaiAn0609、SuZhou0511、Taizhou0512、TianChang0603、YangZhou0608 和 YangZhou0705 均由本室分离保存。

1.2 培养基和试剂

DMEM 为美国 GIBCO 公司产品; NCS 购自 Hyclone 公司; Taq DNA 聚合酶(含 $10\times$ Buffer)、dNTP、100 bp DNA Marker 购自大连 TaKaRa 生物工程有限公司; 蛋白酶 K、胰酶购自上海生工生物工程技术服务有限公司; 其他试剂均为国产分析纯产品。

1.3 PCV2 特异性引物

引物参照文献[13], 扩增的 PCV2 片段为 404 bp。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司。

1.4 病料处理

取疑似 PCV2 感染的野猪脾和淋巴结加入含

2000 U 青、链霉素的 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 液研磨, 离心取上清液 $500\ \mu\text{L}$ 。

1.5 DNA 的提取

加入终浓度为 $20\ \mu\text{g/mL}$ 胃蛋白酶 K 和 1% SDS, 58°C 消化 30 min, 用等体积的酚: 氯仿(1:1, V/V) 抽提, 2 倍体积冷乙醇沉淀 DNA, 将 DNA 溶解在 $25\ \mu\text{L}$ 含 $20\ \mu\text{g/mL}$ RNase A 的 pH 7.5 TE 缓冲液中, 取 $4\ \mu\text{L}$ 作为 PCR 反应模板。

1.6 病料中 PCV2 特异性基因片段的扩增

PCR 反应体系为 $50\ \mu\text{L}$, 实验操作按参考文献[13]进行。

1.7 病毒分离和鉴定

组织样品按 1:5 倍的体积加入 DMEM 细胞培养液研磨, 反复冻融 3 次, $12000\ \text{r/min}$ 离心 30 min, 取上清, $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌接种单层 Dulac 细胞。 37°C 孵育 1 h 后换上含 1% NCS 的 DMEM 继续培养 84 h, 收获病毒液。取第一代培养物, 再接种单层 Dulac 细胞, 同时设不接种病毒的 Dulac 细胞作空白对照, 连传 8 代。传代过程中通过 PCR 定性检测 Dulac 细胞中 PCV2 增殖情况。按 1.5 的方法提取全基因组 DNA。

1.8 PCV2 全基因组的扩增

参照 An DongJun 等^[14]设计的引物合成了 4 对引物进行重叠 PCR。引物序列见表 1。

表 1 引物序列(5'-3')
Table 1 Primer sequence(5'-3')

编号 Primer No.	方向 Orientation	核苷酸位置 ^a Nucleotide position ^a	序列(5'-3') Sequence (5'-3')
P1	Sense	116-135	TAATCCTTCCGAAGACGAGC
P2	Antisense	726-745	CGATCACACAGTCTCAGTAG
P3	Sense	531-550	CAGAAGCGTGATTGGAAGAC
P4	Antisense	1142-1161	ATGTAGACCACGTAGGCCTC
P5	Sense	863-882	AGAAGCTCTTTATCGGAGGA
P6	Antisense	1545-1564	AAGCGAACCACAGTCAGAAC
P7	Sense	1360-1379	CTAGAATAACAGCACTGGAG
P8	Antisense	193-214	GTTCGTCCTTCCTCATTACCCT

注: a: 核苷酸位置为 GenBank 中 AF201897 的序列

Note: a: Nucleotide position based on the genome sequence of strain deposited in GenBank (accession number AF201897)

其中, P1 和 P2 扩增 629 bp 的片段, P3 和 P4 扩增 630 bp 的片段, P5 和 P6 扩增 701 bp 的片段, P7 和 P8 扩增 621 bp 的片段。引物由上海生工生物工

程技术服务有限公司合成, 临用前用灭菌超纯水配成 $25\ \text{pmol/L}$, -20°C 保存备用。PCR 反应体系为 $50\ \mu\text{L}$, 实验操作按参考文献[14]进行。

1.9 DNA 片段的纯化回收及测序

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后, 用 Agarose gel DNA extraction kit(Roche 公司)按产品说明书回收片段, 最后用 40 μ L 缓冲液或超纯水洗脱, 寄出测序。

2 结果与分析

2.1 病料中 PCV2 特异性基因片段的扩增结果

提取全基因组 DNA 进行 PCR 扩增发现, 病料、接种病料的细胞液均出现 404 bp 的 PCV2 特异条带, 阴性对照细胞中未扩增出相应条带(见图 1)。

2.2 病毒的分离和鉴定结果

病料组织在 Dulac 细胞上传代后经 PCR 鉴定, 证实分离到了 PCV2 病毒, 命名为 JiangYan_boar 0710。

2.3 全基因组的扩增

将 PCV2 分离株经重叠 PCR 扩增后, 1%琼脂糖凝胶电泳, 紫外光下观察可见该分离株获得 4 个与预期大小相符的目的条带, 将 PCR 产物测序。

2.4 基因组全长序列测定

该毒株全基因组序列测定 2 个克隆, 核苷酸序列一致, 提交 GenBank, 序列号为 EU503035。

2.5 基因组全长序列分析

拼接后该毒株全基因组长度 1767 个核苷酸。

运用 DNASTar5.0 软件对该毒株与同期在江苏地区分离的 9 个毒株序列(GenBank 号为 EU503031~EU503034、EU503036~EU503040)进行了比较, 结果发现同源性很高, 在 98.9%~99.5%之间, 说明该病毒可能在家猪和野猪之间相互传播(见图 2)。

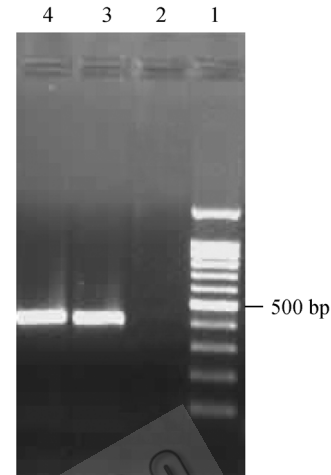


图 1 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR product of the PCV2

1: 100 bp DNA Ladder Marker; 2: 未接种病料的 Dulac 细胞 PCR 扩增结果; 3: 接种病料的 Dulac 细胞 PCR 扩增结果; 4: 病料 PCR 扩增结果

1: 100 bp DNA Ladder Marker; 2: PCR product of the Dulac cell; 3: PCR product of the Dulac cell inoculated with sample of the wild boar; 4: PCR product of the sample of the wild boar

		Percent identity											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Divergence	1	■	99.2	98.9	99.4	99.4	99.3	99.0	99.3	98.7	■	1	Porcine circovirus 2 strain ChangZhou05
	2	0.8	■	99.2	99.4	99.4	99.2	99.5	99.4	99.2	98.8	2	Porcine circovirus 2 strain DaFeng0609
	3	1.1	0.9	■	99.0	99.0	99.0	98.9	98.9	98.5	■	3	Porcine circovirus 2 strain GaoYou0707
	4	0.6	0.6	1.0	■	99.5	99.1	99.3	99.2	98.6	■	4	Porcine circovirus 2 strain HuaiAn0609
	5	0.6	0.6	1.0	0.5	■	99.0	99.4	99.0	98.7	■	5	Porcine circovirus 2 strain JiangYan bo
	6	1.0	0.9	1.0	0.9	1.0	■	99.0	99.0	98.9	98.3	6	Porcine circovirus 2 strain SuZhou0511
	7	0.7	0.5	1.0	0.7	0.6	1.0	■	99.1	98.9	98.7	7	Porcine circovirus 2 strain TaiZhou0512
	8	1.0	0.6	1.1	0.8	0.7	1.0	0.9	■	98.8	98.4	8	Porcine circovirus 2 strain TianChang06
	9	0.7	0.9	1.1	0.8	1.0	1.1	1.1	1.3	■	98.7	9	Porcine circovirus 2 strain YangZhou060
	10	1.3	1.2	1.5	1.4	1.3	1.7	1.3	1.6	1.3	■	10	Porcine circovirus 2 strain YangZhou070
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		

图 2 10 株 PCV2 分离株基因组的相似性

Fig. 2 The percentage of the similarity among the 10 isolates of PCV2

3 讨论

加拿大学者首次报道猪圆环病毒 2 型感染家猪引起 PMWS 后, 该病毒感染的报道越来越多^[3-6]。郎洪武等人首次报道在我国分离出该病毒^[7], 流行病学调查显示 PCV2 感染率越来越高^[8,9], 但我国尚未

见对野猪感染该病毒病例的报道, 国外一些学者对野猪进行了血清流行病学调查和病毒携带状况调查, 证实野猪广泛带毒, 血清阳性率也很高, 在 2007 年首次报道了野猪感染发病的病例^[11,12]。我国部分山区存在一定量的野猪群, 有些地区将捕获的野猪与家猪杂交或将家猪放养与野猪杂交, 杂交的猪在市

场上价格较高。也有部分地区开始饲养野猪进行驯化和繁殖, 野猪肉价更高。随着这些养殖活动的开展, 家猪和野猪生态系统出现了新的变化, 出现了新的生态学嵌合体, 这些都为疫病的传播提供了条件。本文从一家养病野猪中分离到了一株 PCV2 病毒, 进行了全基因组序列测定, 并与同期该地区家猪中分离到的 PCV2 病毒基因组进行了比较, 结果发现这些病毒毒株之间同源性很高。这些结果表明 PCV2 病毒可以在家猪和家养野猪之间传播, 为我国 PCV2 病毒感染控制带来了新问题。目前我国动物疫病的防制体系仍不完善, 类似新问题提醒我们在进行养殖活动中要考虑疾病传播的生态学。

参 考 文 献

- [1] Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, *et al.* Diseases of swine. 9th edition. Iowa: Blackwell publishing, 2006, pp.299-308.
- [2] Nayar GP, Hamel A, Lin L, *et al.* Detection and characterization of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Can Vet*, 1997, **38**(6): 385-386.
- [3] Allan GM, 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**(1): 3-10.
- [4] Kennedy S, Allan G, McNeilly F, *et al.* Porcine circovirus infection in Northern Ireland. *Vet Rec*, 1998, **142**(18): 495-496.
- [5] Onuki A, Abe K, Togashi K, *et al.* Detection of porcine circovirus from lesions of a pig with wasting disease in Japan. *J Vet Med Sci*, 1999, **61**(10): 1119-1123.
- [6] Segales J, Sitjar M, Domingo M, *et al.* First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Spain. *Vet Rec*, 1997, **141**(23): 600-601.
- [7] 郎洪武, 王 力, 张广川, 等. 猪圆环病毒分离鉴定及猪断奶多系统衰竭综合征的诊断. *中国兽医科技*, 2001, **31**(3): 3-5.
- [8] 王忠田, 杨汉春, 郭 鑫. 规模化猪场猪圆环病毒 2 型感染的流行病学调查. *中国兽医杂志*, 2002, **38**(10): 3-6.
- [9] 宋建国, 高生智, 魏润生. 规模化猪场猪圆环病毒 2 型感染的血清学调查. *中国兽医科技*, 2004, **34**(12): 26-28.
- [10] 叶俊平, 盛 瑜, 朱丽娜, 等. 江苏省猪高热病病例主要继发感染病毒的多重 PCR 检测. *中国兽医科学*, 2007, **37**(12): 1029-1034.
- [11] Ruiz-Fons F, Vicente J, Vidal D, *et al.* Seroprevalence of six reproductive pathogens in European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: the effect on wild boar female reproductive performance. *Theriogenology*, 2006, **65** (4): 731-743.
- [12] Lipej Z, Segales J, Jemersic L, *et al.* First description of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in wild boar (*Sus scrofa*) in Croatia and phylogenetic analysis of partial PCV2 sequences. *Acta Vet Hung*, 2007, **55**(3): 389-404.
- [13] Quintana J, Segales J, Rosell C, *et al.* Clinical and pathological observations on pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Rec*, 2001, **149**(12): 357-361.
- [14] An DJ, Roh IS, Song DS, *et al.* Phylogenetic characterization of porcine circovirus type 2 in PMWS and PDNS Korean pigs between 1999 and 2006. *Virus Res*, 2007, **129**(2): 115-122.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学各分支学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。