



安徽省部分地区 2016–2018 年猪圆环病毒 2 型遗传进化分析

俞赵荣^{Δ1} 张达^{Δ1} 白彩霞¹ 王小朋¹ 杨侃侃¹ 孙裴¹ 李传峰³ 彭开松¹ 李永东^{*2} 王勇^{*1}

1 安徽农业大学动物科技学院 安徽 合肥 230036

2 宁波市疾病预防控制中心 浙江 宁波 315010

3 中国农业科学院上海兽医研究所 上海 200241

摘要:【背景】猪圆环病毒(Porcine circovirus, PCV)可以引起断奶仔猪多系统衰竭综合症(Postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)。【目的】了解安徽省部分地区猪圆环病毒 2 型(PCV2)的遗传变异情况。【方法】采用 PCR 技术,对 2016–2018 年间安徽省部分地区猪场疑似 PMWS 感染的组织样品共计 31 份进行 PCV2 检测和全基因扩增,并通过 DNASTar 等生物信息学软件对所得到的 PCV2 毒株基因序列进行遗传进化分析。【结果】所得的 8 株 PCV2 安徽株与 GenBank 上已发表的国内外参考毒株相比较,核苷酸相似性为 92.8%–99.0%, ORF2 及其推导的氨基酸序列相似性分别为 85.8%–99.6%和 82.5%–100%。遗传进化树分析结果显示 8 株安徽株中有 1 株 PCV2a, 2 株 PCV2b, 5 株 PCV2d, 未发现 PCV2c、PCV2e 和 PCV2f 基因型。此外,通过对 ORF2 基因编码的氨基酸序列分析,发现各基因型 Cap 蛋白氨基酸序列上的位点具有其独特性。【结论】近年来 PCV2 在安徽地区的猪群中感染较为普遍,其中 PCV2d 基因型的感染病例增多,逐渐成为安徽地区的优势流行株。本研究为安徽地区的 PCV2 防控提供了一定的参考依据。

关键词: 猪圆环病毒 2 型(PCV2), 基因克隆, ORF2 基因, 遗传进化分析

Genetic evolution of porcine circovirus 2 strains in Anhui province during 2016–2018

YU Zhao-Rong^{Δ1} ZHANG Da^{Δ1} BAI Cai-Xia¹ WANG Xiao-Peng¹ YANG Kan-Kan¹
SUN Pei¹ LI Chuan-Feng³ PENG Kai-Song¹ LI Yong-Dong^{*2} WANG Yong^{*1}

1 College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China

2 Ningbo Municipal Center for Disease Control and Prevention, Ningbo, Zhejiang 315010, China

3 Shanghai Veterinary Research Institute, CAAS, Shanghai 200241, China

Abstract: [Background] Porcine circovirus can cause postweaning multisystemic wasting syndrome. [Objective] To understand the epidemiology and genetic variation of porcine circovirus 2 (PCV2) in

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31602063); Natural Science Foundation of Anhui Province (1508085QC60)

ΔThese authors equally contributed to this work

*Corresponding authors: E-mail: LI Yong-Dong: liyd@nbcddc.org.cn; WANG Yong: wangyong119@ahau.edu.cn

Received: 08-11-2018; Accepted: 22-02-2019; Published online: 16-04-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31602063); 安徽省自然科学基金(1508085QC60)

Δ对本文贡献相同

*通信作者: E-mail: 李永东: liyd@nbcddc.org.cn; 王勇: wangyong119@ahau.edu.cn

收稿日期: 2018-11-08; 接受日期: 2019-02-22; 网络首发日期: 2019-04-16

Anhui province. **[Methods]** Total 31 tissue samples of pig suspected suffering PMWS were collected. PCR was employed to identify PCV2 and its genome. genetic evolution of the PCV2 virus strains were analyzed by DNASTar and other bioinformatics software. **[Results]** Nucleotide comparability of identified 8 strains with the strains published on GenBank was 92.8%–99.0%. The comparability of ORF2 and its derived amino acid sequences was 85.8%–99.6% and 82.5%–100%, respectively. The results of genetic evolution showed that there were one strain of PCV2a, two strains of PCV2b and five strains of PCV2d among the eight strains. Moreover, there were no genotypes of PCV2c, PCV2e and PCV2f. In addition, through the analysis of amino acid sequence, unique site was found on Cap protein with each genotype. **[Conclusion]** PCV2 infection in pigs was common in Anhui province. PCV2d was the dominant genotype. This study provides a basis for PCV2 prevention and control in Anhui province.

Keywords: PCV2, Gene clone, ORF2 gene, Genetic evolution analysis

猪圆环病毒(Porcine circovirus, PCV)属于圆环病毒科圆环病毒属, 为单股环状 DNA 病毒, 病毒无囊膜, 呈二十面体对称, 直径 12 nm–23 nm, 是当前已知最小的病毒^[1]。PCV 主要分为 3 种血清型: PCV1、PCV2 和 PCV3。其中 PCV2 是引起断奶仔猪多系统衰竭综合征(Postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)等相关疾病的主要病原。20 世纪 90 年代, PCV2 感染作为 PMWS 病因在加拿大被报道后, 美国、法国、英国等多个国家证实有 PCV2 的存在和流行^[2]。之后疫情不断扩散, 我国自 2000 年首次报道存在 PCV2 感染以来^[3], PCV2 在国内猪群已普遍存在。猪感染 PCV2 后免疫功能会受到损害, 机体抵抗力降低, 更易与其他病症如猪伪狂犬、猪繁殖与呼吸综合征甚至肠道疾病形成混合感染, 给养猪业造成巨大的经济损失, 被视为我国养殖业重大危害之一。

PCV2 属单股负链 DNA 病毒, 基因组全长 1 766–1 768 bp, ORF1 和 ORF2 是最主要的开放阅读框。ORF1 位于正链, 为最大的开放阅读框, 编码参与病毒复制的蛋白(Rep 和 Rep'蛋白)。ORF2 位于负链, 编码核衣壳蛋白(Cap), 诱导宿主免疫反应^[4–5]。ORF2 基因易突变, 对其进行遗传进化分析可反映 PCV2 全基因组的进化情况, 还能用于基因分型。2018 年 Bao 等对 PCV2 基因型进行了补充, 发现我国存在 PCV2a、PCV2b、PCV2c、PCV2d、PCV2e、PCV2f 6 种基因型, 各基因型间遗传距离

介于 0.047–0.172, 并指出 PCV2a、PCV2b、PCV2d 是目前国内流行株的 3 种主要基因型^[6]。根据近年来国内外报道, PCV2 的进化与点突变和基因重组的两种机制有关。这两种机制导致了 PCV2 遗传多样性的产生, 进而推动了病毒的全球迅速传播和 PCV2 流行株复杂化、多元化的趋势。为了解近几年安徽省地区 PCV2 的遗传变异情况, 本研究对 2016–2018 年间从安徽发病猪群中检测的 8 株 PCV2 毒株, 进行全基因组的遗传变异分析, 这对分析安徽地区 PCV2 流行病学及遗传变异趋势具有重要意义, 也为 PCV2 疫病的防控和基因型疫苗的研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 病料来源

病料来源于安徽省多个地市, 包括合肥、亳州、淮南、马鞍山等地的各个猪场。采集 2016–2018 年间疑似 PMWS 感染发病猪的组织器官, 包括淋巴结、脾、肺等。

1.2 主要试剂和仪器

pMDTM18-T 载体、DL2000 DNA Marker, *rTaq* DNA 聚合酶、Solution I 购自 TaKaRa 公司; 质粒 DNA 小量试剂盒购自 Axygen 公司; 病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司; 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自 TIANGEN 公司。

基因扩增仪, 高速离心机购自珠海黑马医学仪器有限公司; 恒温培养箱购自上海一恒科学仪器有限公司; 凝胶成像系统, 美国伯乐公司。

1.3 引物设计与合成

参考 GenBank 中收录的 PCV2 DZ205 株(NO. FJ644559)基因序列, 用 Primer Premier 5.0 软件设计 2 对引物。引物 P1 和 P2 为 PCV2 检测引物, 扩增片段长度为 475 bp, P3 和 P4 为 PCV2 全基因引物。引物由南京擎科生物科技有限公司合成。P1: 5'-GAATTGTACATACATGGTTA-3'; P2: 5'-CAAGGCTACCACAGTCAGAA-3'; P3: 5'-GTACCTTGTTG GAGAGCGGG-3'; P4: 5'-TCACAGCAGCAGTAGA CAGGTCA-3'。

1.4 病料 DNA 提取与检测

取适量采集的淋巴结、脾、肺等组织用研钵充分碾磨, 并加入含青霉素和链霉素各 1 000 IU/mL 的 PBS (pH 7.4) 匀浆。反复冻融 3 次, 6 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 置于 -80 °C 冰箱待用。将制备好的样品按照 DNA 提取试剂盒使用说明书提取 DNA, 并以所提取的 DNA 为模板进行 PCR 检测。PCR 反应体系: *rTaq* DNA 聚合酶 Mix 10 μ L, DNA 模板 1 μ L, P1、P2 引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, 补加 ddH₂O 至 20 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 45 s, 45 °C 45 s, 72 °C 45 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.5 PCV2 全基因组的克隆

以检测为 PCV2 阳性的病料样品基因组 DNA 为模板, 进行 PCV2 全基因组扩增。PCR 反应体系: *rTaq* DNA 聚合酶 Mix 10 μ L, DNA 模板 1 μ L, P3、P4 引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, 补加 ddH₂O 至 20 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 2 min; 95 °C 45 s, 59 °C 45 s, 73 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 按照普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒使用说明书对 PCR 产物纯化回收, 并与 pMDTM18-T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 接种于氨苄抗性的 LB 平板上(含氨苄 100 μ L/mL)。37 °C 培养过夜后, 挑取单菌落进行

菌液 PCR 鉴定。对 PCR 检测结果呈阳性的菌液提取质粒并鉴定, 将鉴定为阳性的重组质粒命名为 pMDTM18-T-PCV2, 送至南京擎科生物科技有限公司测序。

1.6 PCV2 基因序列分析

使用 DNASTar 等软件对检测所得 8 株 PCV2 安徽株的基因序列与国内外 20 株 GenBank 上登录的 PCV2 参考毒株基因序列, 进行相似性比较, 并通过 MEGA 7.0 软件的邻接法构建系统发育树, 再对 ORF2 基因编码的氨基酸序列进行分析。

2 结果与分析

2.1 PCV2 的 PCR 检测结果

以受检病料 DNA 为检测模板, 并设置阴性对照, 使用引物 P1 和 P2 进行 PCR 检测。检测结果显示, 25 份病料中, 有 8 份样品扩增出约 475 bp 大小的目的片段(图 1), 与预期长度一致, 为 PCV2 阳性样。

2.2 PCV2 全基因组的扩增及测序结果

将检测为 PCV2 阳性的样品 DNA 作为扩增模板, 设置阴性对照, 使用引物 P3 和 P4 对 PCV2 进行全基因扩增, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 在 1 000–2 000 bp 处有特异性条带, 大小约 1.7 kb, 与预期一致(图 2)。将扩增的全基因克隆测序的结果显示: 得到的 8 株 PCV2 安徽株全基因序列中, 有 1 株为 1 768 bp, 其余 7 株均为 1 767 bp。

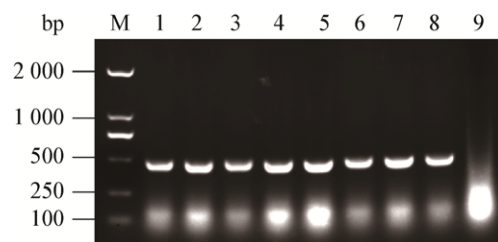


图 1 PCV2 的 PCR 检测结果

Figure 1 The detection of PCV2 by PCR

注: M: DL2000 DNA 分子质量标准; 1–8: 扩增的目的片段; 9: 阴性对照。

Note: M: DL2000 DNA marker; 1–8: PCR products of PCV2; 9: Negative control.

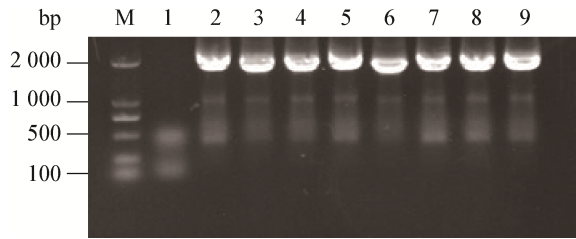


图 2 PCV2 全基因的扩增

Figure 2 The amplification of the complete genome of PCV2

注: M: DL2000 DNA 分子质量标准; 1: 阴性对照; 2–9: PCV2 全基因扩增产物。

Note: M: DL2000 DNA marker; 1: Negative control; 2–9: The PCR products of the complete genome of PCV2.

2.3 PCV2 全基因组序列分析

2.3.1 PCV2 全基因组核苷酸相似性比较

使用 DNASTar 中的 MegAlign 软件对检测毒株和参考毒株进行相似性比对分析。结果(图 3)显示, 8 株安徽株之间核苷酸相似性为 93.3%–99.4%, 与国内外 20 株参考毒株核苷酸相似性为 92.8%–99.0%。

2.3.2 ORF2 以及推导出的氨基酸相似性比较

使用 DNASTar 中的 MegAlign 软件对检测毒

株与参考毒株比较 ORF2 及 ORF2 推导出的氨基酸相似性。结果显示: 8 株 PCV2 安徽株之间的 ORF2 及 ORF2 推导的氨基酸相似性为 88.9%–99.6% 和 86.8%–100%, 与参考毒株 ORF2 及 ORF2 推导的氨基酸相似性为 85.8%–99.6% 和 82.5%–100%。

2.3.3 遗传进化分析

系统发育树结果(图 4)表明, 8 株 PCV2 安徽株可以分为三大分支(PCV2a、PCV2b 和 PCV2d)。其中有 5 株属于 PCV2d (2017 年 4 株, 2018 年 1 株), 2 株属于 PCV2b (2018 年 2 株), 1 株属于 PCV2a (2016 年 1 株), 未发现其他亚型。

2.3.4 ORF2 基因编码的氨基酸序列分析

将检测所得的 8 株安徽株与国内外 20 株 GenBank 上登录的 PCV2 参考毒株 ORF2 基因编码的氨基酸序列进行分析, 结果显示: PCV2 各基因型 ORF2 氨基酸序列上的位点具有其独特性。PCV2a 基因型的 ORF2 氨基酸序列中特异性氨基酸位点主要集中在第 80V, PCV2b 基因型的 ORF2 氨基酸序列中特异性氨基酸位点主要集中在第 89R 和 210E, PCV2c 基因型的 ORF2 氨基酸序列中特异性氨基酸位点主要集中在第 52S、54V、58N、60S、

		Percent identity																												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
Divergence	1	■	97.6	98.6	98.2	97.8	95.7	96.3	94.4	94.3	97.0	94.1	96.9	98.2	95.4	95.5	95.0	95.2	94.9	95.0	96.2	95.6	97.7	97.5	96.9	94.5	94.6	97.5	94.3	AHbz-2017(17).seq
	2	2.5	■	97.9	97.7	98.3	94.8	95.0	93.8	93.4	95.4	93.5	95.3	98.8	94.9	94.9	94.4	94.6	94.2	94.3	95.5	94.7	98.3	98.1	95.3	93.9	94.0	98.1	93.4	AHbz-2017(21).seq
	3	1.4	2.1	■	99.4	96.8	95.6	95.3	93.4	93.3	96.0	93.2	95.9	97.3	94.5	94.5	94.1	94.3	93.9	94.1	95.2	94.6	96.7	96.5	95.9	93.5	93.6	96.5	93.4	AHbz-2017(41).seq
	4	1.8	2.3	0.6	■	96.7	95.4	95.1	93.3	93.0	95.8	92.8	95.7	97.1	94.2	94.3	93.9	94.1	93.7	93.8	95.0	94.4	96.5	96.3	95.7	93.3	93.4	96.3	93.0	AHbz-2017(49).seq
	5	2.2	1.7	3.2	3.4	■	94.6	95.3	93.9	93.8	95.6	93.9	95.5	99.0	95.1	95.1	94.9	94.7	94.9	95.8	95.0	98.5	98.3	95.5	94.3	94.3	98.3	93.8	AHbz-2018(1).seq	
	6	4.4	5.4	4.6	4.8	5.6	■	98.0	94.2	93.7	97.9	93.5	97.8	94.9	95.0	95.0	94.7	94.9	94.6	94.7	97.3	95.1	94.9	94.7	97.8	94.6	94.6	94.6	93.7	AHbz-2018(2).seq
	7	3.8	5.2	4.9	5.1	4.9	2.1	■	94.9	94.5	98.6	94.3	98.5	95.7	95.6	95.7	95.4	95.6	95.5	95.9	98.1	96.0	95.6	95.5	98.5	95.4	95.4	95.4	94.5	AHbz-2018(2).seq
	8	5.8	6.4	6.9	7.0	6.3	6.1	5.3	■	93.5	95.1	93.4	95.0	94.3	95.5	95.5	95.1	95.4	97.3	97.4	95.4	96.6	94.6	94.5	95.0	96.7	96.7	94.4	93.6	AHbz-2018(2).seq
	9	5.9	6.9	7.0	7.4	6.4	6.6	5.8	6.8	■	94.9	98.8	94.6	94.3	95.0	95.1	94.8	95.0	94.3	94.3	95.2	93.8	94.5	94.4	94.6	94.2	94.2	94.3	99.0	AHbz-2018(2).seq
	10	3.1	4.7	4.1	4.3	4.5	2.1	1.4	5.0	5.3	■	94.7	99.7	96.0	95.9	96.0	95.6	95.9	95.8	95.8	98.6	96.2	96.1	96.0	99.7	95.7	95.8	95.9	94.9	FU608539.1.2b.seq
	11	6.1	6.7	7.2	7.6	6.3	6.8	5.9	6.9	1.2	5.5	■	94.5	94.3	94.7	94.8	94.5	94.7	94.2	94.2	95.1	93.8	94.6	94.5	94.5	93.9	93.9	94.4	99.1	FU608539.1.2b.seq
	12	3.2	4.9	4.2	4.4	4.6	2.2	1.5	5.2	5.6	0.3	5.7	■	95.9	95.9	96.0	95.6	95.8	95.6	95.7	98.5	96.0	96.0	95.9	99.5	95.6	95.6	95.8	94.7	FU644932.1.2b.seq
	13	1.8	1.3	2.8	3.0	1.0	5.3	4.4	5.9	5.9	4.1	5.9	4.2	■	95.5	95.5	95.1	95.3	95.0	95.1	96.2	95.4	99.0	98.8	95.9	94.7	94.7	98.8	94.2	KM272212.1.2d.seq
	14	4.7	5.3	5.8	6.0	5.1	5.2	4.5	4.7	5.2	4.2	5.5	4.2	4.7	■	98.8	98.2	98.2	95.7	95.7	96.2	95.6	95.6	95.5	95.8	96.2	96.3	95.4	94.9	KT369068.1.2f.seq
	15	4.7	5.3	5.7	5.9	5.0	5.2	4.4	4.6	5.1	4.1	5.4	4.1	4.6	0.2	■	98.3	98.3	95.8	95.8	96.3	95.6	95.7	95.5	95.9	96.3	96.3	95.5	95.0	KT369070.1.2f.seq
	16	5.2	5.8	6.1	6.4	5.5	5.5	4.8	5.0	5.4	4.5	5.8	4.5	5.1	1.8	1.7	■	99.1	95.4	95.5	95.9	95.4	95.2	95.1	95.5	95.6	95.6	95.0	94.7	LC004736.1.2f.seq
	17	4.9	5.6	5.9	6.2	5.3	5.3	4.6	4.8	5.2	4.3	5.5	4.4	4.9	1.8	1.7	0.9	■	95.6	95.7	96.2	95.5	95.5	95.3	95.8	95.8	95.9	95.2	94.9	LC008135.1.2f.seq
	18	5.3	6.0	6.3	6.6	5.5	5.6	4.6	2.7	5.9	4.4	6.0	4.5	5.2	4.4	4.4	4.7	4.5	■	99.4	96.0	97.7	95.4	95.2	95.7	96.8	96.8	95.2	94.6	AB072301.1.2a.seq
	19	5.2	5.9	6.2	6.5	5.3	5.5	4.2	2.7	5.9	4.3	6.1	4.4	5.0	4.4	4.4	4.7	4.5	0.6	■	98.1	97.8	95.5	95.3	95.8	96.8	96.9	95.3	94.5	AF027217.1.2a.seq
	20	4.0	4.7	5.0	5.2	4.4	2.8	2.0	4.8	4.9	1.4	5.1	1.5	4.0	3.9	3.8	4.2	4.0	4.1	4.0	■	96.1	96.2	96.1	98.5	95.9	96.0	96.0	95.2	AF055394.1.2b.seq
	21	4.6	5.5	5.6	5.8	5.2	5.0	4.1	3.5	6.4	4.0	6.4	4.1	4.7	4.6	4.5	4.7	4.6	2.4	2.2	4.0	■	95.5	95.3	96.1	96.9	96.9	95.3	94.2	AF201308.1.2a.seq
	22	2.4	1.7	3.4	3.6	1.5	5.3	4.5	5.6	5.7	4.0	5.6	4.1	1.0	4.5	4.4	4.9	4.7	4.7	4.6	3.9	4.6	■	99.8	96.0	95.1	95.1	99.8	94.5	AY291317.1.2d.seq
	23	2.5	2.0	3.6	3.8	1.7	5.5	4.6	5.8	5.8	4.1	5.7	4.3	1.3	4.7	4.6	5.1	4.9	5.0	4.8	4.0	4.9	0.2	■	95.9	94.9	95.0	99.5	94.4	AY682994.1.2d.seq
	24	3.2	4.9	4.2	4.4	4.6	2.2	1.5	5.2	5.6	0.3	5.7	0.5	4.2	4.3	4.3	4.6	4.4	4.4	4.3	1.5	4.0	4.1	4.3	■	95.6	95.6	95.8	94.7	DQ180393.1.2b.seq
	25	5.7	6.3	6.7	7.0	5.9	5.6	4.8	3.4	6.1	4.4	6.4	4.6	5.5	3.9	3.8	4.6	4.3	3.3	3.3	4.2	3.2	5.1	5.3	4.6	■	99.9	94.9	94.1	EF524532.1.2e.seq
	26	5.6	6.3	6.7	6.9	5.9	5.6	4.7	3.4	6.0	4.4	6.3	4.5	5.5	3.8	3.8	4.5	4.3	3.2	3.2	4.1	3.1	5.0	5.2	4.5	0.1	■	94.9	94.1	26
	27	2.6	1.9	3.6	3.8	1.7	5.6	4.7	5.8	5.9	4.3	5.8	4.4	1.3	4.7	4.7	5.2	4.9	5.0	4.8	4.1	4.9	0.2	0.5	4.4	5.3	5.3	■	94.3	27
	28	5.9	6.9	6.9	7.3	6.4	6.6	5.7	6.7	1.0	5.3	0.9	5.5	6.0	5.3	5.2	5.5	5.3	5.6	5.7	4.9	6.1	5.7	5.8	5.5	6.2	6.1	5.9	■	28

图 3 全基因组核苷酸相似性比较

Figure 3 Nucleotide similarity for complete genomic sequences

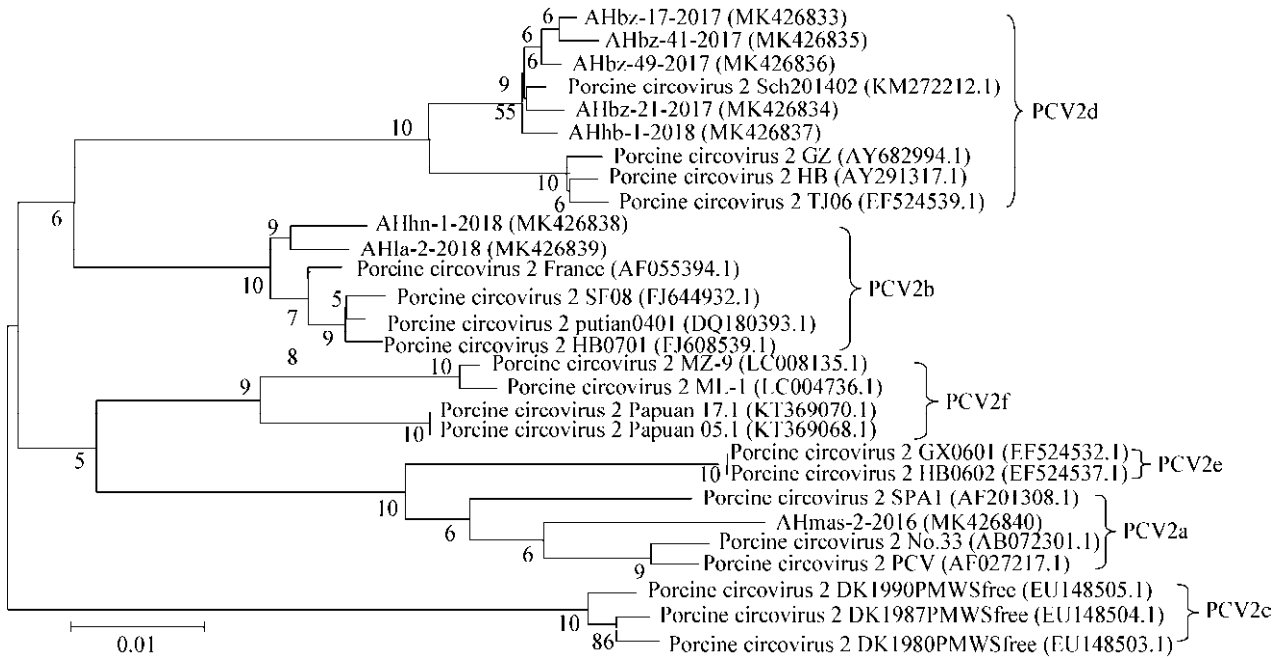


图 4 基于 ORF2 序列的系统进化树

Figure 4 Phylogenetic tree based on ORF2 sequence

注: 标尺表示序列差异的分支长度; 括号内的数字为 GenBank 序列号; 节点处的数字为 Bootstrap 值; 括号内为 GenBank 数据库的登录号。

Note: Bar: Nucleotide divergence; Numbers in parenthesis represented GenBank accession number; Numbers at the branch points indicated the Bootstrap values; Those in parentheses are GenBank accession number.

61Q、64P、78Q、106F、107A、108R、200H、203Q、206T、207N、208A 和 210A, PCV2d 基因型的 ORF2 氨基酸序列中特异性氨基酸位点主要集中在第 53I、68N、134N、169R 和 215I, PCV2e 基因型的 ORF2 氨基酸序列中特异性氨基酸位点主要集中在

第 47S、187I、191K, PCV2f 基因型的 ORF2 氨基酸序列中特异性氨基酸位点主要集中在第 233T。根据 PCV2 各基因型的 ORF2 氨基酸序列上特异性位点的不同, 可在分子水平上区分 PCV2 的基因型。由图 5 可见, 有部分 ORF2 的特异性氨基酸位点恰

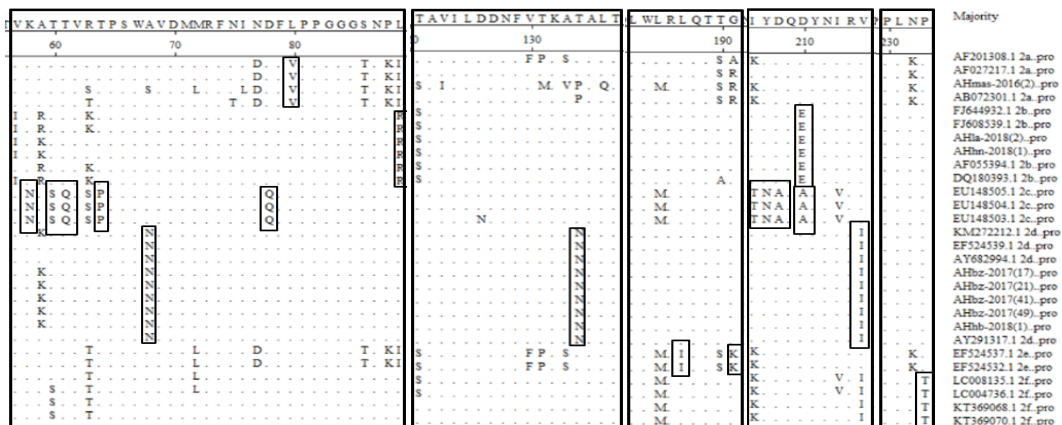


图 5 PCV2 ORF2 基因推导的氨基酸序列分析

Figure 5 The analysis of amino acid derived from ORF2 genes of PCV2

注: 框内为参比的 5 个抗原表位区。

Note: Antigenic epitope region of 5 reference in box.

好落在 5 个抗原表位区内, 这可能会使 PCV2 各基因型表现出不同的抗原性和致病性。

将 PCV2a、PCV2b、PCV2d 三种基因型 ORF2 氨基酸序列中的 5 个抗原表位区 A (57–91)、B (121–137)、C (183–191)、D (206–215)、E (230–233) 分别与国内外相应的亚型进行比较(图 5)。发现本研究中的 PCV2d 基因型 ORF2 氨基酸序列在第 59 位有统一的变异, 其他表位区保持高度一致; PCV2a、PCV2b 基因型 ORF2 氨基酸序列中的 5 个抗原表位区中存在部分变异(表 1)。这些变异对于病毒抗原性的影响还需进一步研究。

3 讨论与结论

自 1991 年发现 PCV2 以来, PCV2 已经成为最流行的猪病毒之一, 各种针对 PCV2 的疫苗被研发制作并投入使用^[7]。直到几年前, PCV2 还被认为是一种被成功控制的突发病原体, 但随着不断有 PCV2 疫苗免疫失败报道出现, 人们逐渐认识到对 PCV2 的防控并不简单^[2]。特别是对于 PCV2a 型, 在引入疫苗后, 已经检测到一种促进病毒衣壳改变而远离疫苗特异性抗原决定簇的定向选择。有报道称, 与病毒衣壳相关的抗原表位, 其变异导致了免疫逃逸^[8]。鉴于 PCV2 的普遍性和不断变异和进化, 解读其分子进化和流行病学是一项艰巨的任务。

本研究首先对安徽地区的送检病料进行检测, PCV2 的感染率为 25.8%, 说明 PCV2 已在安徽猪群中普遍存在。将检测为 PCV2 阳性的样品 DNA 进行全基因的克隆与分析, 结果显示: 获得

的 8 株 PCV2 毒株之间核苷酸、ORF2 及 ORF2 推导氨基酸的相似性分别为 93.3%–99.4%、88.9%–99.6%、86.8%–100%。与国内外参考毒株核苷酸、ORF2 及 ORF2 推导氨基酸的相似性为 92.8%–99.0%、85.8%–99.6%、82.5%–100%, 均无明显差异, 表明安徽地区 PCV2 毒株与国内外参考株之间存在较高的相似性。再绘制遗传进化树比对, 发现所得的 8 株 PCV2 安徽株含 1 株 PCV2a (2016 年 1 株), 5 株 PCV2d (2017 年 4 株, 2018 年 1 株), 2 株 PCV2b (2018 年 2 株)。最后对 ORF2 基因编码的氨基酸序列进行分析, 发现各基因型在 Cap 蛋白氨基酸序列上具有其独特变异位点: 同基因型在某些氨基酸位点上具有相同的氨基酸残基, 但却与其他基因型在相同位置的氨基酸残基不同, 这对划分 PCV2 基因型起到一定程度的指导意义。PCV2 中 ORF2 基因主要负责编码 PCV2 的 Cap 蛋白, 该蛋白是重要的结构蛋白, 能刺激机体产生中和抗体。Cap 蛋白具有 5 个主要的抗原表位, 如果该蛋白存在单一氨基酸变异, 可能会使 PCV2 表型发生改变, 导致致病力增强^[9]。本研究通过对比 PCV2a、PCV2b、PCV2c、PCV2d、PCV2e、PCV2f 这 6 种基因型 Cap 蛋白的 5 个抗原表位, 发现 6 种基因型的氨基酸变异位点和各亚型特异性氨基酸位点在 5 个抗原表位区内都有分布, 这些氨基酸的变异是否会造成 PCV2a、PCV2b、PCV2c、PCV2d、PCV2e、PCV2f 这 6 种基因型毒株的抗原性的变化和致病力的增强, 还需要进一步研究。

表 1 PCV2 安徽株 ORF2 氨基酸序列的 5 个抗原表位的变异情况

Table 1 Variation of 5 epitopes of ORF2 amino acid sequence of PCV2 Anhui strain

Epitopes	PCV2a	PCV2b	PCV2d
A Epitope region (57–91)	R ⁶³ →S ⁶³ , A ⁶⁸ →S ⁶⁸ , M ⁷² →L ⁷² , I ⁷⁶ →L ⁷⁶	R ⁵⁹ →K ⁵⁹ , K ⁶³ →R ⁶³	A ⁵⁹ →K ⁵⁹
B Epitope region (121–137)	T ¹²¹ →S ¹²¹ , V ¹²³ →I ¹²³ , T ¹³¹ →M ¹³¹ , A ¹³³ →V ¹³³ , L ¹³⁶ →Q ¹³⁶	N/A	N/A
C Epitope region (183–191)	L ¹⁸⁵ →M ¹⁸⁵	N/A	N/A
D Epitope region (206–215)	N/A	N/A	N/A
E Epitope region (230–233)	N/A	N/A	N/A

因大量使用疫苗后导致 PCV2 进化模式的改变,使得对 PCV2 流行病学进行持续性监测变得非常关键。结合本研究和中国各地区对 PCV2 多种基因型流行趋势的分析^[10-12]可以发现,PCV2d 基因型已经逐渐取代 PCV2b 基因型成为在安徽省流行的 PCV2 优势毒株,这对可能出现的疫苗逃逸突变体作出迅速反应有重要的意义。对 PCV2 各基因型 ORF2 编码氨基酸的分析,为安徽地区 PCV2 的防控和疫苗的开发提供了有利数据。此外,本研究进行遗传进化分析时引用了新发现的 PCV2f 基因型^[6],增加了分析所得数据的可靠性和全面性。

REFERENCES

- [1] Rosario K, Breitbart M, Harrach B, et al. Revisiting the taxonomy of the family *Circoviridae*: establishment of the genus *Cyclovirus* and removal of the genus *Gyrovirus*[J]. *Archives of Virology*, 2017, 162(5): 1447-1463
- [2] Karuppanan AK, Opriessnig T. Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccines in the context of current molecular epidemiology[J]. *Viruses*, 2017, 9(5): E99
- [3] Zhai SL, Chen SN, Xu ZH, et al. Porcine circovirus type 2 in China: an update on and insights to its prevalence and control[J]. *Virology Journal*, 2014, 11: 88
- [4] Guo LJ, Lu YH, Wei YW, et al. Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China[J]. *Virology Journal*, 2010, 7: 273
- [5] Xiao CT, Halbur PG, Opriessnig T. Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d[J]. *Journal of General Virology*, 2015, 96(7): 1830-1841
- [6] Bao F, Mi S, Luo Q, et al. Retrospective study of porcine circovirus type 2 infection reveals a novel genotype PCV2f[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65(2): 432-440
- [7] Meng XJ. Porcine circovirus type 2 (PCV2): pathogenesis and interaction with the immune system[J]. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2013, 1: 43-64
- [8] Franzo G, Tucciarone CM, Cecchinato M, et al. Porcine circovirus type 2 (PCV2) evolution before and after the vaccination introduction: a large scale epidemiological study[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 39458
- [9] Li DL, Du Q, Wu B, et al. Immunogenicity of adenovirus vaccines expressing the PCV2 capsid protein in pigs[J]. *Vaccine*, 2017, 35(36): 4722-4729
- [10] Zhai SL, Chen SN, Xu ZH, et al. Porcine circovirus type 2 in China: an update on and insights to its prevalence and control[J]. *Virology Journal*, 2014, 11: 88
- [11] Li LM, Yuan WZ, Guo HY, et al. Prevalence and genetic variation of porcine circovirus type 2 in Hebei, China from 2004 to 2014[J]. *Gene*, 2016, 586(2): 222-227
- [12] Jiang CG, Wang G, Tu YB, et al. Genetic analysis of porcine circovirus type 2 in China[J]. *Archives of Virology*, 2017, 162(9): 2715-2726