

## 猪圆环病毒2型 ORF2 基因序列分析及真核表达载体的构建\*

芦银华<sup>1</sup>, 陈德胜<sup>1</sup>, 华修国<sup>2</sup>, 黄伟坚<sup>1</sup>, 谈国蕾<sup>1</sup>, 陈溥言<sup>1\*\*</sup>

(1, 南京农业大学动物医学院, 南京 210095; 2, 上海交通大学农学院, 上海 200030)

## Sequence Analysis of ORF2 Gene of Type 2 Porcine Circovirus and Construction of Eukaryotic Expressing Vector of ORF2

LU Yin-hua<sup>1</sup>, CHEN De-sheng<sup>1</sup>, HUA Xiu-guo<sup>2</sup>, HUANG Wei-jian<sup>1</sup>, TAN Guo-lei<sup>1</sup>, CHEN Pu-yan<sup>1\*\*</sup>

(1, College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2, College of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China)

**Abstract:** According to the published ORF2 gene sequence of PCV-2, two primers were designed, and ORF2 gene was amplified from suspected PMWS sample using PCR. Then the PCR product was cloned into pGEM-T easy vector, and recombinant plasmid named pTORF2 was obtained. The cloned ORF2 gene in pTORF2 was sequenced and compared with other PCV isolates in GenBank, the results demonstrated that the ORF2 gene is closely related with a USA isolate AF264039, the homology of their nucleotide and amino acid sequence both were 100%. In addition, there existed 92.3% to 98.6% nucleotide sequence identity and 92.3% to 96.6% amino acid sequence identity with other PCV-2 isolates. Recombinant plasmid pTORF2 was digested with *Bam* H I/*Eco* R V, ORF2 gene was purified, and introduced into eukaryotic expressing vector pSecTag2/HygroB between *Bam* H I and *Eco* R V enzyme site, then pSecTagORF2 recombinant plasmid was constructed. Further research is underway to study the biological activity of ORF2 protein and establish the diagnostic kit of PCV.

**Key words:** Porcine circovirus; ORF2; Eukaryotic expressing vector; Construction

**摘要:** 根据 GenBank 中猪圆环病毒 2 型(PCV-2)ORF2 基因序列, 设计一对引物, 应用 PCR 从疑似断奶仔猪多系统消耗综合征(PMWS)的死亡仔猪组织病料中扩增出 ORF2 全基因(702bp)。将此片段克隆入 pGEM-T easy 载体, 筛选获得重组质粒 pTORF2, 并对此质粒中的插入序列进行了测序分析, 结果表明本试验克隆的 ORF2 与美国 PCV-2 分离株 AF264039 的核苷酸及氨基酸序列同源性均达到 100%, 与其他 PCV-2 毒株同源性分别为 92.3%~98.6% 和 92.3%~96.6%。重组质粒 pTORF2 经 *Bam* H I、*Eco* R V 双酶切, 回收 ORF2 基因, 转移入真核表达载体 pSec-Tag2/HygroB 的相应酶切位点之间, 构建成重组质粒 pSecTagORF2。此重组表达载体的构建成功为进一步研究 ORF2 编码蛋白的生物学活性及建立 PCV 诊断试剂盒打下基础。

**关键词:** 猪圆环病毒; ORF2; 真核表达载体; 构建

**中图分类号:** 文章标识码: A 文章编号: 1003-5125(2002)01-0087-05

猪圆环病毒(porcine circovirus, PCV)与鸡贫血病毒(CAV)、鸚鵡喙羽病病毒(PBFDV)和一些植物病毒同属于圆环病毒科(*Circoviridae*)成员, 为单股负链环状 DNA 病毒<sup>[1]</sup>。

PCV 存在两种不同的血清型, 即 PCV-1 和 PCV-2。PCV-1 无致病性, 普遍存在于猪源细胞系及正常猪体内各组织<sup>[2]</sup>。PCV-2 主要与许多国家发生的引起仔猪免疫缺陷的断奶仔猪多系统消耗综

收稿日期: 2001-07-10, 修回日期: 2001-09-20

\* 基金项目: 国家“863”项目资助(2001AA249012); 上海科技兴农重点攻关项目(农科公字 2001 第 3-5 号)

作者简介: 芦银华(1974-), 男, 江苏省吴江籍, 博士生, 研究方向为传染病与预防兽医学

\*\* 通讯作者: 陈溥言(1942-), 男, 江苏省南京籍, 教授, 研究方向为传染病与预防兽医学。 Correspondence author.

合症(Postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)密切相关<sup>[3-9]</sup>,此病已经给世界各国养猪业造成了很大的经济损失。PCV-2与PCV-1基因组核苷酸序列同源性仅为68%~76%<sup>[3,8]</sup>,两者均包含两个主要阅读框ORF1和ORF2,ORF1编码与病毒复制相关的Rep蛋白,此蛋白在两种病毒之间有85%的同源性,是PCV-1、2产生抗原交叉性的主要原因所在<sup>[10]</sup>;ORF2编码病毒的主要结构蛋白(核衣壳蛋白),PCV-1、2的ORF2蛋白具有约68%的同源性;此蛋白具有良好的免疫原性,血清中抗体维持时间很长,可作为PCV血清流行病学调查对象,以此确定猪群PCV的感染情况及对PMWS进行初步诊断。

本试验扩增克隆了PCV2 ORF2,并构建了含ORF2的真核表达载体,为进一步研究ORF2编码蛋白的生物学特性及建立PCV诊断试剂盒打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒及菌种

pGEM-T easy vector 购自 Promega 公司, pSec-Tag2/HygroB(5.7kb)真核表达载体为广东中山大学谢伟东博士惠赠;宿主菌 DH5 $\alpha$  为本实验室保存。

### 1.2 试剂

PCR 试剂盒为 Takara 公司产品, X-gal、IPTG、氨苄青霉素购自南京科威公司。

### 1.3 引物

引物 1: 5'-CCGATATCTTAGGGGTTAAGT-GGGG-3'

引物 2: 5'-GCGGATCCATGACGTATCCAAG-3'

为了方便基因的克隆,在引物 1 中加有 *Eco*R V 酶切位点,引物 2 中含有 *Bam*H I 位点。扩增片段为 ORF2 全基因(长 702bp)。引物由大连 Takara 公司合成。本品为冻干粉,用灭菌超纯水溶解。-20℃ 冻存。

### 1.4 PCR 模板制备

将死亡猪组织病料充分研磨制成悬浮液,冻融 3 次,离心取上清,加入蛋白酶 K 至终浓度 500 $\mu$ g/mL, SDS 至终浓度 1%, 55℃ 水浴 30min, 用苯酚、苯酚:氯仿(1:1)及氯仿各抽提一次,吸取水相,加入 1/10 体积的 3mol/L NaAc 及 2.5 倍体积的无水乙醇沉淀, 12 000r/min、4℃ 离心 15min, 沉淀悬浮于超

纯水中。取适量用作 PCR 模板。

### 1.5 PCR 扩增

按 Takara 公司 PCR 试剂盒说明书进行,略加改进。PCR 总体积为 50 $\mu$ L。引物浓度 20pmol/ $\mu$ L, 每种 dNTP 浓度为 2.5mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 浓度 25mmol/L。反应体系如下:超纯水 32.5 $\mu$ L, 10 $\times$  buffer 5 $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> 3 $\mu$ L, dNTP 4 $\mu$ L, 引物 11 $\mu$ L, 引物 21 $\mu$ L, 模板 3 $\mu$ L, Taq 酶 0.5 $\mu$ L, 均匀混合。95℃ 变性 10min 后,按 94℃ 1min, 53℃ 1min, 72℃ 1.5min 进行 35 个循环,最后 72℃ 延伸 10min。反应结束,取 5 $\mu$ L PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳观察。

### 1.6 PCR 产物的克隆

PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,切下含目的条带的凝胶,体积尽可能小,用胶回收试剂盒提取 PCR 产物。按常规方法<sup>[11]</sup>与 pGEM-T easy 载体连接、转化 DH5 $\alpha$ 、蓝白斑筛选及提取质粒酶切鉴定,筛选含目的基因的重组质粒。

### 1.7 测序分析

测序由 Takara 公司完成。应用通用引物对重组质粒中的插入片段进行序列测定,将所测序列与 GenBank 中其他 PCV 毒株的 ORF2 基因核酸序列进行比较,并对由核苷酸序列推导出来的氨基酸序列进行比较,以确定扩增片段的可靠性。

### 1.8 含 ORF2 基因的真核表达载体的构建

将克隆于 pGEM-T easy 载体中的 ORF2 用 *Eco*R V/*Bam*H I 双酶切出,电泳回收。真核表达载体 pSecTag/HygroB 经同样处理。按常规方法连接、转化,氨苄青霉素抗性酶切鉴定,筛选重组真核表达载体。

## 2 结果

### 2.1 PCR 扩增

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳观察。扩增产物中可清晰地看到位于 750bp 附近的特异性条带,大小与预期结果相符。见图 1。

### 2.2 PCR 产物克隆

经 *Bam*H I/*Eco*R V 双酶切筛选鉴定,获得阳性重组质粒,命名为 pTORF2。

### 2.3 pTORF2 中插入片段的序列测定及分析

测序得知,克隆于 pTORF2 的基因长 702bp,与预期结果相符。将其与 GenBank 中的 PCV 毒株 ORF2 基因的核苷酸及其推导的氨基酸序列进行了同源性比较。序列分析结果显示,所有 PCV(包括

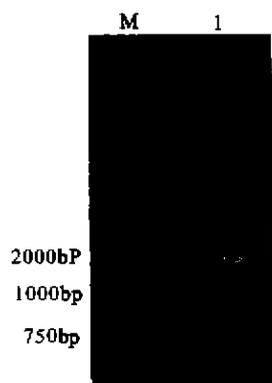


图 1 PCR 产物电泳图

1, PCR 扩增产物; M, DNA 分子量标准 DL-200.

Fig. 1 Map of PCR product

Lane 1, PCR product; M, DNA marker DL-2000.

PCV-1、2)的 ORF2 基因均长 702bp, 编码 233 个氨基酸。PCV-2 的 ORF2 核苷酸序列同源性介于 91.9%~100% 之间, 推导的氨基酸序列同源性为 90.2%~100%。其中, 本组扩增克隆的 ORF2 与美国 AF264039 的核苷酸及氨基酸序列同源性均达到 100%, 与中国的两个毒株 AY035820、AF318877 的核苷酸序列同源性分别为 93.0% 和 95.4%, 氨基酸

序列同源性为 92.3% 及 94.5%, 与其余 PCV-2 毒株的同源性分别为 92.3%~98.6% 和 92.3%~96.6%。两株 PCV-1 之间的 ORF2 核苷酸及推导的氨基酸序列同源性分别为 97.4% 和 95.7%, 它们与 PCV-2 ORF2 同源性仅为 67.1%~69.4% 和 65.2%~70.0% (表 2)。同时还可以看出, 不管是 PCV-1 还是 PCV-2 的 ORF2 N-端都含有大量的碱性氨基酸(Arg)且较为保守(图 2)。

表 1 本研究所引用的毒株情况

Table 1 PCV isolates used in this study

PCV 血清型	毒株代号	地区分布	毒株来源
Serotype	Isolate No.	Geographic location	Isolate source
PCV-1	AF012107	法国 France	GenBank
	AF071879	美国 USA	GenBank
PCV-2	AF118095	加拿大 Canada	GenBank
	AF201311	德国 German	GenBank
	NC002173	德国 German	GenBank
	AY035820	中国 China	GenBank
	AF318877	中国 China	GenBank
	AF204042	美国 USA	GenBank
	AF264039	美国 USA	GenBank
	AF364094	中国台北 Taipei	GenBank

表 2 PCV ORF2 核苷酸和氨基酸序列同源性比较

Table 2 Comparison of the nucleotide/amino acid sequence identities of ORF2 genes

毒株代号 Isolate No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1		97.4/95.7	68.3/69.1	69.3/69.5	67.7/67.4	69.4/70.0	68.1/69.1	68.4/69.1	68.1/68.2	68.1/67.0	68.1/68.2
2			67.7/67.4	68.6/67.8	67.1/65.7	68.9/68.2	67.6/67.4	67.9/67.4	67.6/67.0	67.4/65.2	67.6/67.0
3				92.6/93.2	96.6/96.2	93.9/94.5	99.0/97.9	99.4/99.6	98.3/96.6	95.2/95.3	98.3/96.6
4					91.9/90.2	95.0/95.7	92.6/93.6	92.6/93.6	92.3/92.3	91.6/90.6	92.3/92.3
5						93.2/91.5	95.9/94.0	96.3/95.7	95.4/94.5	93.5/91.5	95.4/94.5
6							93.7/93.6	93.9/94.9	93.0/92.3	92.9/92.3	93.0/92.3
7								99.0/97.4	98.6/97.0	95.0/94.5	98.6/97.0
8									98.3/96.2	94.9/94.9	98.3/96.2
9										94.0/92.8	100.0/100.0
10											94.0/92.8
11											

注: 1、2 分别为 PCV-1 毒株 AF012107、AF071879; 3-10 分别为 PCV-2 毒株 AF118095、AF201311、NC002173、AY035820、AF318877、AF204042、AF264039、AF364094; 11 为本实验克隆的 PCV-2 ORF2。

Note: 1 and 2 are PCV-1 isolates AF012107 and AF071879; 3 to 10 represent PCV-2 isolates AF118095、AF201311、NC002173、AY035820、AF318877、AF204042、AF264039 and AF364094, respectively; 11 is PCV-2 ORF2 gene cloned in this study

Majority	MTYPRRRYRRRRHRPRSILGQILRRRPWL VHP--RIIRYRWRKNGIFNTRLSRTFGYTKATTVRTPSWAVDMMRFNIDD	
AF012107. pro	..W.....T.....N.....Y...AF.N.....T...S...E.VL.IRGGH-SQ...N.NEL...GQ	79
AF071879. pro	..W.....T.....N.....Y.A..AF.N.....T...S...TELVL.I.GGY-SQ...N.NYLK...GQ	79
AF118095. pro	.....	78
AF201311. pro	.....R.....N.	78
NC002173. pro	.....F.....A.....S.....L..L.	78
AY035820. pro	.....F.....K.....N.	78
AF318877. pro	.....K.....	78
AF204042. pro	.....	78
AF264039. pro	.....L...R...T...KL..	78
AF364094. pro	.....GG...F...C...F...S...N.	78
jiangsuPCV. pro	.....L...R...T...KL..	78
Majority	FVPPGGGTNKISIPFEYRIRKVKVEFWPCSPITQGGDRGVGSTAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSRHTIPQPFSYHS	
AF012107. pro	.L..S...PLPL..Q.....A.Y..Y.RD...SNQ.....V...A...PS.N.A...I.....R...T... 159	
AF071879. pro	.L..S...PLPL..Q.....A.Y..Y.RD...SNQ.....V...A...PS.N.A...I.....R...T... 159	
AF118095. pro	.....	158
AF201311. pro	.L...S.PR.V.....S.....T... 158	
NC002173. pro	.....S.I...I...Q..... 158	
AY035820. pro	.L...S.PLTV.....T... 158	
AF318877. pro	.....P..... 158	
AF204042. pro	..... 158	
AF264039. pro	.....P..... 158	
AF364094. pro	.....P..... 158	
jiangsuPCV. pro	.....P..... 158	
Majority	RYFTPKPVL DSTIDYFQPNNKRNLWLR LQTSRNV DHVGLGTAFENSKYDQDYNI RVTM YVQFREFNLKDPPLNP-	
AF012107. pro	.....E.Q...W.....H.N.HT..E.T...Y.LQ.ATTA.N.VV.L.I.....I...-..E. 234	
AF071879. pro	.....E.Q...W.H.....H.N.HT..E.T...Y.LQ.AATA.N.VV.L.I.....I...-..K. 234	
AF118095. pro	.....M.....AG...I...E...F.....K. 234	
AF201311. pro	.....M.....AG...I...E...F.....K. 234	
NC002173. pro	.....M.....AG...I...E...F.....K. 234	
AY035820. pro	.....A.....I.....K. 234	
AF318877. pro	.....G.....I.....K. 234	
AF204042. pro	.....M.....I.....K. 234	
AF264039. pro	.....I.....K. 234	
AF364094. pro	.....S.....A.....T.....K. 234	
jiangsuPCV. pro	.....I.....K. 234	

图 2 PCV ORF2 基因推导的氨基酸序列比较  
(相同氨基酸用“.”, 缺失的氨基酸以“-”表示)

Fig. 2 Comparison of deduced amino acid sequence of ORF2 gene of PCV  
(Same amino acid expressed with “.”, deletions are indicated by “-”)

### 2.4 含有 PCV-2 ORF2 基因的真核表达载体的构建

通过氨苄青霉素抗性及 *Bam*H I/*Eco*R V 双酶切筛选, 获得含有 ORF2 的重组质粒, 命名为 pSec-TagORF2。酶切结果图见图 3。

### 3 讨论

本研究应用 PCR 技术成功地将 PCV-2 ORF2 基因(编码衣壳蛋白)扩增克隆, 并进行了序列分析。结果表明, 本实验克隆的 PCV-2 ORF2 与其他 PCV-2 参考毒株的核苷酸和氨基酸序列同源性介于 92.3%~100% 之间, 其中与美国株 AF264039 同源性最高, 达 100%, 这可能预示了此两株 PCV-2 毒

株来源相同; 另外与中国的两个毒株 AY035820、AF318877 的核苷酸序列同源性分别为 93.0% 和 95.4%, 氨基酸序列同源性为 92.3% 及 94.5%, 同源性相对较低, 可能与这些毒株的分离地点不同有关, 也就是说 PCV 毒株存在地区差异性。从总的情况来看, PCV-2 ORF2 基因变异相对较大, 有些毒株之间的 ORF2 核苷酸及推导的氨基酸序列同源性仅为 91.9% 和 90.2%, 变异散布于整个 ORF2, 但 ORF2 编码蛋白的 N 端较为保守, 且含有大量的碱性氨基酸, 这可能与衣壳蛋白结合 PCV DNA 的活性相关<sup>[12]</sup>。

PCV-1 无致病性, 广泛存在于健康猪体内各器官组织中并刺激动物机体产生抗体。由于 PCV-2

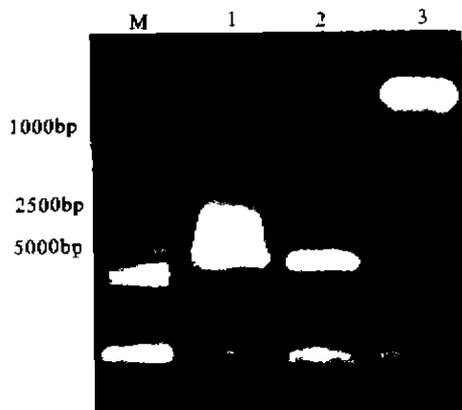


图 3 重组质粒酶切图谱

M, DNA 分子量标准 DL-15000; 1, pSecTag/HygroB *Bam*H I/*Eco*R V 酶切; 2, 重组质粒 pSecTagORF2 *Bam*H I/*Eco*R V 酶切; 3, ORF2 PCR 产物。

Fig. 3 Restriction map of recombinant plasmid

M, DNA marker DL-15000; Lane 1, pSecTag/HygroB digested with *Bam*H I/*Eco*R V; 2, recombinant plasmid pSecTagORF2 digested with *Bam*H I/*Eco*R V; Lane 3, ORF2 PCR product.

和 PCV-1 存在抗原交叉性,因此如使用全病毒作为抗原进行 PCV-2 抗体检测,难以确定抗体是针对 PCV-1 还是 PCV-2,这给 PCV-2 感染及 PMWS 的诊断带来很大的困难。目前,国内外已建立了多种用于特异性检测 PCV-2 的分子生物学方法,包括 PCR、ISH、PCR-RFLP 等,但这些方法仅限于实验室研究,无法用于临床诊断工作。因此当务之急是建立实用、快速、准确的 PCV-2 特异性常规检测方法。

两种 PCV 基因组均包括两个主要阅读框,即 ORF1 和 ORF2,两种病毒的 ORF1 编码蛋白有 85% 的同源性,可能是两种病毒产生抗原交叉性的原因所在;ORF2 编码蛋白同源性低于 70%,试验表明 PCV-2 ORF2 蛋白上存在三个特异性抗原位点,可以与 PCV-1 相区别;同时亦存在共同抗原表位,但有研究证实这些抗原表位不与 PCV-1 抗体发生交叉反应,可能是因为它们位于整个蛋白的内部<sup>[13]</sup>。因此,PCV-2 ORF2 蛋白可以作为特异检测 PCV-2 感染及诊断 PMWS 的有力试剂。鉴于此,本研究构建了含有 ORF2 基因的真核表达载体,为表达 ORF2 蛋白提供了物质基础,同时也为研究 ORF2 编码蛋白的生物学活性及建立实用特异的 PCV-2 诊断试剂盒打下了基础。

## 参考文献

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 第二版,科学出版社,1997.
- [2] Tischer I, Miels W, Wolff D, *et al.* Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus[J]. Arch Virol, 1986, 91: 271-276.
- [3] Martijn F, Patrick G H, Mike G, *et al.* Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infectious with PCV-1 and PCV-2[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38: 2494-2503.
- [4] Andre L H, Lihua L L, Gopip S N. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs[J]. J Virol, 1998, 72: 5262-5267.
- [5] Atsushi O, Keuchi A, Katsuhiko T, *et al.* Detection of porcine circovirus from lesions of a pig with wasting disease in Japan[J]. J Vet Med Sci, 1999, 61: 1119-1123.
- [6] Allan G M, Meehan B, Todd D, *et al.* Novel porcine circovirus from pigs with a wasting disease syndromes[J]. Vet Rec, 1998, 142: 467-468.
- [7] 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]. J Vet Diagn Invest, 1998, 10: 3-10.
- [8] Hanel A L, Lin L L, Nayar G P, *et al.* Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs[J]. J Virol, 1998, 72: 5262-5267.
- [9] Allan G M, McNeilly F, Cassidy J P, *et al.* Pathogenesis of porcine circovirus: experimental infectious of colostrums deprived piglets and examination of pig foetal material[J]. Vet Microbiol, 1995, 44: 49-64.
- [10] Roman M P, Kyoung J Y, Perry A H, *et al.* Characterization of immune response of young pigs to porcine circovirus type 2 infection[J]. Viral Immun, 2000, 13: 143-153.
- [11] 金冬雁,黎孟枫. 分子克隆实验指南[M]. 第二版,北京:科学出版社,1997.
- [12] Nnagro F D, Forsthoefel A N, Lawther R P, *et al.* Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circovirus[J]. Arch Virol, 1998, 143: 1723-1740.
- [13] Dominique M, Philippe B, Catherine T, *et al.* Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and 2 porcine circovirus and identification of immunorelevant epitopes[J]. J Gen Virol, 2000, 81: 1815-1824.