维普资讯 http://www.cqvip.com

第19卷5期
2004年10月

中国病毒学
VIROLOGICA SINICA

19（5）：454-457
October 2004

PMWS病猪猪圆环病毒2型全基因组序列分析*

冯志新[2]，范伟兴[1**]，李晓成[1]，姜 平[2]，李玉峰[2]

（1.中国农业部动物检疫所，山东青岛 266032；2.南京农业大学动物医学院,江苏南京 210095）

Sequence Clone and Analysis of Complete Genome of Porcine Circovirus (PCV2) from Piglets With PMWS

FENG Zhi-xin[2]，FAN Wei-xin[1**]，LI Xiao-cheng[1]，JIANG Ping[2]，LI Yu-feng[2]

(1.National Animal Quarantine Institute. Ministry of Agriculture, Qindao 266032, China; 2. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: According to the published genomic sequence of *Porcine circovirus*(PCV2), a pair of specific primers was designed to amplify the complete genome of PCV2 from tissues of piglets with PMWS. Five complete genomes of PCV2, named Fujian PCV, Guangxi PCV, Hainan PCV, Hunan PCV and Shandong PCV, were amplified and cloned into pMD 18-T vector, respectively. The genomes of PCV2 isolates showed that four of them were 1767bp in length, one genome, FujianPCV was 1768bp. The five sequences were compared with other published genomes of PCVs by DNAstar. The results showed that the sequences of the five isolates were closely related to those of other PCV2 isolates in the Genbank, homology were 93% to 98.8%. However, there were only 68.4% to 70% nucleotide identity with the PCV1 isolates. The amino acid sequences of ORF1 and ORF2 of the isolates showed high identities, from 98.1% to 99.4% and 88% to 99.1%.

Key Words: PMWS; Porcine circovirus(PCV2); Sequence analysis

摘要：根据GenBank中发表的猪圆环病毒2型（PCV2）全基因序列，设计一对特异性引物，用PCR方法直接从5省病料中分别扩增出5个PCV2毒株的全基因组，分别命名为FujianPCV、GuangxiPCV、HainanPCV、HunanPCV和ShandongPCV。将扩增片段克隆于pMD 18-T载体,进行序列测定,结果表明，除FujianPCV株核苷酸长度为1768 bp，其余四株均为1767 bp。应用DNAstar序列分析软件分析表明，本实验的5个PCV2分离株与世界上其它地区的PCV2分离株密切相关，核苷酸序列同源性达93%～98.8%，与PCV1毒株的序列同源性只有68.4%～70%。其中ORF1和ORF2所编码的氨基酸序列与国内外PCV2毒株比较，同源性也很高，分别为98.1%～99.4%和88%～99.1%。

关键词：PMWS；猪圆环病毒2型；序列分析

中图分类号：S852.65　　**文章标识码**：A　　**文章编号**：1003-5125(2004)05-0454-04

猪圆环病毒（*Porcine circovirus*, PCV）为无囊膜的单股环状负链DNA病毒，病毒粒子直径约17～20nm，是迄今已知最小的动物病毒之一[3]。PCV根据其抗原型及基因组成不同，分为两种基因型或血清型，即PCV1及PCV2。PCV1基因组全长1759bp，是1974年首次从猪传代细胞系PK-15中作为一种污染物分离出来的病毒[7]。动物实验表明该病毒无致病性，广泛存在于正常猪体内各组织器官[7]。PCV2基因组全长1767bp或1768bp，与断奶仔猪多系统衰竭综合症（PMWS）密切相关[2]。

收稿日期：2004-02-13，修回日期：2004-03-27

* 基金项目：国家动物流行病学中心专项基金( )；浙江省科技攻关项目(021102529)；国家自然基金项目（30270990）；江苏省高新技术项目（BG2002317）

作者简介：冯志新（1979-），男，硕士研究生，研究方向为动物传染病防制。

** 通讯作者. Corresponding author. Tel: 0532-5628464, E-mail:

维普资讯 http://www.cqvip.c

此病主要侵害 6-12 周龄断奶仔猪，主要临床症状为渐进性消瘦、呼吸困难急促、贫血、腹泻、黄疸、间质性肺炎、淋巴腺炎及肾炎等。

Hamel 等[2]应用软件分析表明，两种血清型基因组均可能包含 11 个开放阅读框(ORF1-11)。ORFs 之间大小差异悬殊。ORF1、2 是最大的两个开放阅读框。ORF1 在病毒基因中，以顺时针方向排列，编码与病毒复制相关的 Rep 蛋白。该蛋白氨基酸序列相当保守，是 PCV1 与 PCV2 产生抗原交叉性的主要原因所在。ORF2 位于病毒基因组互补链，以逆时针方向排列，编码病毒的主要结构蛋白，为病毒的核衣壳。两血清型之间差异明显，氨基酸序列同源性低于 75%。

目前，PCV2 只有一个基因型，基因组序列相对稳定，但分离来自不同地区的毒株会有一定的差异[1]。通过各地区毒株的全基组序列进行分析，对确定 PCV2 毒株基因序列的变异程度及各地区发生该疾病的原因分析有很大帮助，并为在更大范围内对 PCV2 的分子流行病学调查奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 病料

病料分别来自山东、湖南、福建、广西和海南 5 省 PMWS 仔猪肺和淋巴结，分别命名为 ShandongPCV、HunanPCV、FujianPCV、Guangxi PCV 和 HainanPCV。

1.2 主要试剂、质粒与菌种

pMD 18-T Vector 购自 TaKaRa 公司。宿主菌 TG-Ⅰ由农业部动物检疫所流行病研究中心实验室保存。 DNAZol Reagent 试剂盒、PCR 试剂盒（包括 rTaq 酶、dNTPs、10×buffer 等）、DL-2000 Marker、DL-15000 Marker、氨苄青霉素（Amp）、DNA 胶纯化回收试剂盒均购自 TaKaRa 公司；*Hin*d Ⅲ、*Bam*H Ⅰ内切酶购自 Promega 公司。其余试剂均为分析纯产品。

1.3 引物

根据 GenBank 中发表的猪圆环病毒 2 型（PCV2）全基因序列，设计一对特异性引物（5'-primer:5'-GCGAATTCAACCTTAACCTTTCTTATTC-3'；3'-primer: 5'-ATGAATTCTGGCCCTGCTCCC- 3'），引物由大连 TaKaRa 公司合成。

1.4 病毒 DNA 提取

采集病猪的肺脏和淋巴结，取 50mg 剪碎后加入 1mL DNAZol 研磨匀浆，将该匀浆液转移至一个 1.5mL 的离心管中，10 000g 离心 10min，转移上清至另一离心管中，加入 500μL 无水乙醇，颠倒混匀，室温放置 5min，DNA 呈可见絮状物析出，用灭菌枪头小心将 DNA 挑至另一离心管，加入 1mL75% 的乙醇洗涤两次，空干 15s 后，缓慢加入 200μL 8mmol/L 的 NaOH 溶液溶解 DNA。-20℃冻存备用。取 10μL 用作 PCR 模板。

1.5 PCR 扩增

PCR 反应体积为 50μL。反应体系中含：10× PCR buffer(含 Mg^{2+})5μL（Mg^{2+}浓度为 25mmol/L），2.5mmol/LdNTPs 4μL，上下游引物各 1μL（50pmol/μL），模板 10μL，rTaq 酶 1μL(5U/μL)，用灭菌超纯水补足 50μL，PCR 扩增条件为：95℃变性 5min 后，按 94℃ 1min，54℃1min，72℃ 2.5min，共进行 35 个循环。循环结束后，72℃延伸 10 min，最后置 4℃保存。PCR 产物在含溴化乙锭的 1%琼脂糖凝胶上电泳，紫外光下观察 PCR 扩增结果。

1.6 PCR 扩增产物的克隆与酶切鉴定

PCR 产物在 1%琼脂糖电泳后，切下含有目的条带的琼脂块，用 DNA 胶纯化回收试剂盒回收凝胶中的 DNA。取 5μL 胶回收产物与 1μL pMD 18-T Vector 和 4μL Ligation Solution 在 4℃下连接过夜；按常规方法转化 TG-Ⅰ感受态细胞。

挑取白色菌落接种 LB 液体培养基，37℃震摇过夜。以碱裂解法小量提取质粒。用 *Hin*d Ⅲ、*Bam*H Ⅰ内切酶双酶切鉴定重组质粒，以切出约为 1.7kb 片段的质粒为阳性重组质粒。

1.7 测序鉴定与分析

由大连 TaKaRa 公司测序，测序结果与 GenBank 中 PCV2 全基因组序列比较鉴定，并应用 DNAstar 序列分析软件将测得的 5 个 PCV2 毒株全基因组序列与 GenBank 中的序列进行同源性分析比较。

2 结果

2.1 PCR 扩增

从五个省的 PMWS 病猪病料中均扩出了位于 1.7kb 附近一特异性条带，大小与预期结果相符。

2.2 PCR 扩增产物的克隆

将 5 个毒株的 PCR 扩增产物分别与 pMD 18-T 载体连接，并转化 TG-Ⅰ感受态细胞，挑取菌落，扩增培养后，小量提取质粒。用 *Hin*d Ⅲ、*Bam*H Ⅰ双酶切鉴定(见图 1)，共获得 5 个含有不同 PCV2 毒株全基因组扩增片段的阳性重组质粒，分别命名为 pTShandong、pTHunan、pTFujian、pTGuangxi 和 pTHainan。

维普资讯 http://www.cqvip.com

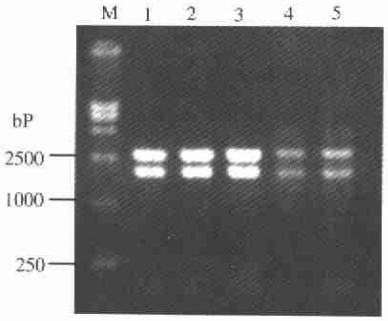

图1 重组质粒的酶切图谱

Fig. 1 Restriction enzyme map of the five PCV2 recombinant plasmids

M, DNA molecular weight marker; DL-15000; 1-5, Five PCV2 recombinant plasmids digested with *Hind* Ⅲ and *Bam*H Ⅰ.

2.3 序列鉴定与分析

2.3.1 序列鉴定：测序结果经 GenBank 中 PCV2 标准株序列比较鉴定，确认为 PCV2 序列。其中，Fujian PCV 株为 1768bp，而 Guangxi PCV、Hainan PCV、HunanPCV 和 ShandongPCV 均为 1767bp，与以往报道的资料一致。

2.3.2 全基因组序列分析：将5个PCV2的序列（登录号分别为 AY556473、AY556474、AY556475、AY556476 和 AY556477）与 GengBank 中的其它已知参考毒株进行比较。结果表明，5 个 PCV2 毒株与其它 PCV2 毒株间的同源性为 93%～98.8%。其中 GuangxiPCV 株（登录号为 AY556475）与澳大利亚株（登录号为 AY424405）同源性最高，为 98.8%。5 个 PCV2 毒株间同源性为 94.2%～98.4%，其中 FujianPCV 株（登录号为 AY556474）与其余四株同源性较低，只有 94.9%～95.6%，而其余四株的同源性较高。

2.3.3 ORF1 序列分析：分析表明，5 个 PCV2 毒株 ORF1 长度为 945 bp，编码 314 个氨基酸。5 个 PCV2 毒株 ORF1 内部核苷酸及推导氨基酸序列同源性分别为 97.2%～99.2%和 98.4%～99.7%。其核苷酸序列与 GenBank 中的 PCV2 毒株 ORF1 间的同源性为 97%～99.2%，而推导的氨基酸序列同源性为 98.1%～99.4%；与 PCV1ORF1 的氨基酸同源性只有 83.1%～85%。而且，PCV2 与 PCV1 毒株 ORF1 编码蛋白的氨基酸序列存在互相缺失的现象，而且缺失部位在 PCV2 和 PCV1 毒株间非常保守，PCV1ORF1 编码蛋白的第 6-8 位氨基酸缺失，而 PCV2ORF1 编码蛋白的 293 位氨基酸缺失。

2.3.4 ORF2 序列分析：分析结果表明，不同 PCV2 毒株 ORF2 之间差异比较明显，本实验的 5 个 PCV2 毒株 ORF2 的核苷酸序列与 GenBank 中的 PCV2 毒株 ORF2 间的同源性为 89%～99.9%，而推导的氨基酸序列同源性为 88%～99.1%，其中 GuangxiPCV 株（AY556475）与澳大利亚株（登录号为 AY424405）的 ORF2 核苷酸序列同源性最高，为 99.9%。；本实验分离的 5 个 PCV2 毒株 ORF2 内部核苷酸及推导氨基酸序列差异也较大，分别为 89%～98.9%和 88.8%～98.7%。与 ORF1 相比，不同血清型 ORF2 间的差异更为明显，PCV1 与 PCV2ORF2 的氨基酸同源性只有 63.5%～66.5%。但位于 ORF2 N 端的氨基酸高度保守，主要由碱性氨基酸组成，这与 Fenaux 等[1]报道的一致。

根据 ORF2 推导的氨基酸序列，对 PCV 两种血清型的 ORF2 编码蛋白的抗原性分别进行了预测比较。结果发现，两个血清型内部不同毒株间的 ORF2 编码蛋白的抗原性差异不明显，但两种血清型之间 ORF2 的抗原性存在明显差异。其中，最为显著的是与 PCV1 ORF2 编码蛋白相比，PCV2 ORF2 编码蛋白在 69-81 位、124-141 位及 201-213 位氨基酸存在着差异。这与 Mahe[5]报道的相近。

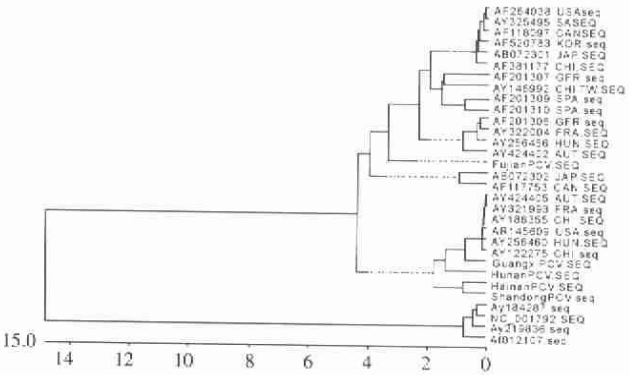

图2 PCV 毒株系统发生树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on the complete genomic nucleotide sequences of PCV isolates

USA, United State of America; CAN, Canada; KOR, Korea; SA, South Africa; GER, Germany; HUN, Hungary; FRA, France; AUT, Australia; CHI, China; JAP, Japan; SPA, Spain

2.3.5 PCV 毒株的遗传学关系分析：对所有 PCV 毒株基因组序列进行同源性分析，并绘制了系统发生进化树（见图 2）。从中可以看出，PCV 分成 PCV1 和 PCV2 两大分支。在 PCV2 组成的大分支中，存在着许多微小分支，其中本试验中的 HainanPCV（登录号为 AY556476）和 ShandongPCV（登录号为 AY556473）两个毒株亲缘关系密切，共同组成一组微小分支；同时这两株又和 GuangxiPCV（登录号为 AY556475）及 HunanPCV（登录号为 AY556477）两毒株关系较近，与一美国株（登录号

维普资讯 http://www.cqvip.c

为 AR145609)、一法国株(登录号为 AY321993)、一澳大利亚株(登录号为 AY424405)、一匈牙利株(登录号为 AY256460)及两中国株(登录号为 AY188355、AY122275)共同组成一较大分支。而 FujianPCV 毒株成为另一较大分支中的一员，与本试验中的另四株遗传关系较远。

3 讨论

本研究考虑到 PCV2 在细胞上分离的繁锁性和困难性，利用 PCV2 全序列特异性引物直接从组织病料中扩增全基因，通过全基因测序以确定所扩增序列为 PCV2，并能直接对测序结果进行分析，从而节省了大量时间，适合于大范围分子流行病学调查。本实验从国内 5 省病料中都扩出了 PCV2 全基因组，说明我国 PCV2 的感染已很普遍。PMWS 在临床及病理剖检上缺乏特征性的表现，除猪圆环病毒外还常常与其它病原混合感染，而 PCV2 又可出现于正常猪群，所以需要对 PCV2 毒株基因组序列有较详细的认识，以确定 PCV2 毒株的致病特性。

PCV-2 虽然只有 1 个基因型，但不同国家或地区的分离毒株全基因序列进化树分析表明，该病毒已出现了与区域相关的多个基因分支，其中，法国的 2 个分离毒株、台湾的 1 个分离毒株及加拿大的 2 个分离毒株分别形成了 3 个独立分支[1]。本试验绘制的系统发生进化树显示，PCV1 与 PCV2 分别组成了两大分支，并且由共同的祖先演化而来。PCV 在基因序列上无地域性差异。本试验的 5 个毒株中，GuangxiPCV、HainanPCV、ShandongPCV 和 HunanPCV 四株亲缘关系相对较近，核苷酸同源性在 96%以上。但 FujianPCV 株与上述四株的关系则较远，核苷酸同源性只有 95%左右，其 Cap 蛋白氨基酸序列与另外四株相比，同源性更低，不到 90%。因此国内 PCV2 株可能来源于不同国家或地区。

ORF1 为 PCV 病毒基因组中最大的开放阅读框，编码与病毒基因组复制相关的 Rep 蛋白。ORF2 编码病毒的核衣壳蛋白，该蛋白为病毒的主要结构蛋白。ORF1 与 ORF2 序列分析结果表明：所有 PCV2 毒株 ORF1 高度保守，核苷酸及推导氨基酸序列同源性分别达 96.7%～100%和 98.1%～99.7%。而且 PCV1 与 PCV2 之间 ORF1 同源性也相对较高，达 85%左右。而 ORF2 变异较大，有些 PCV2 毒株之间同源性不到 90%，PCV1 与 PCV2 两种血清型之间变异更为明显，同源性仅为 64%左右。Mankertz A 等认为 ORF2 的变异与 PCV2 的致病性存在内在的联系，不同的 ORF2 编码蛋白(Cap 蛋白)可能会导致 PCV2 不同的组织嗜性[6]。虽然 PCV 的 ORF2 变异较大，但所有 PCV Cap 蛋白的 N 端高度保守，且主要由碱性氨基酸组成，Liu Q 等认为这与 Cap 蛋白的 DNA 结合活性及核内定位密切相关[4]。本试验还对 PCV 两种血清型的 ORF2 编码蛋白（Cap 蛋白）的抗原性进行了预测比较。结果发现，两个血清型内部不同毒株间的 Cap 蛋白的抗原性差异不明显，但两血清型之间差异则相对较大。与 PCV1 Cap 蛋白相比，PCV2 Cap 蛋白在 69-81 位、124-141 位及 201-213 位氨基酸存在着差异。这与 Mahe[5] 的报道较为接近。这为利用 ORF2 编码蛋白来检测区分 PCV1 与 PCV2 的方法，提供了理论支持。

参考文献

[1] Fenaux M, Halbur P K, Gill M, *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 differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2[J]. J Clin Microbiol, 2000, 2494-2503.

[2] Hamel A L, Lin L L, Nayar G P. Nucleotide sequence of the porcine circovirus associated with postweaning multisystemic was- ting syndrome in pigs[J]. J Virol, 1998, 72:5262-5267.

[3] Lukert P D, de Boer G F, Dale J L, *et al*. The Circoviridae[A]. Murphy F A, Fauquet C M, Bishop D H L, Ghabrial S A, Jarvis A W, Martelli G P, Mayo M A, and M D Summer eds. Virus taxonomy. 6th Report of the International Committee Taxonomy of Viruses[C]. Vienna and New York: Springer-Verlag, 1995. 166-168.

[4] Liu Q, Tiskoo S, Babluk L A. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2[J]. Virology, 2001, 285: 91-99.

[5] Mahe D, Blanchard P, Truong C, *et al*. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circovirus and identification of immunorelevant epitopes[J]. J Gen Virol, 2000, 81: 1815-1824.

[6] Mankertz A, Domingo M, Folch J M, *et al*. Characterization of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France[J]. Virus Res, 2000, 66: 65-77.

[7] Tischer I, Rasch R, and Tochtermann G. characterization of papovavirus- and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines[J]. Zentralbl Bakteriol, 1974, 226:153-167.