

陶宏卫,郭广富,曹军平,等.猪圆环病毒Ⅱ型盐城株的全基因组克隆与序列分析[J].江苏农业科学,2018,46(16):39-41.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.16.009

# 猪圆环病毒Ⅱ型盐城株的全基因组克隆与序列分析

陶宏卫<sup>1</sup>,郭广富<sup>1</sup>,曹军平<sup>1</sup>,申建荣<sup>2</sup>,张晋川<sup>1</sup>,练国俊<sup>1</sup>,朱爱萍<sup>1</sup>,张佳浩<sup>1</sup>,朱金其<sup>3</sup>

(1.江苏农牧科技职业学院动物医学院,江苏泰州 225300; 2.江苏泰州泰牧动物医院,江苏泰州 225300;

3.江苏滨海鸿盛生猪饲养有限公司,江苏滨海 224500)

**摘要:**采用 PCR 方法对采集自盐城地区的疑似猪圆环病毒病病料进行猪圆环病毒Ⅱ型(PCV 2)全基因组的扩增,确定了 2 份病料中的 PCV 2 的分子特征,分别命名为 BH07 株和 BH11 株,对其进行克隆、测序后,应用软件进行全基因组核苷酸序列比对分析。结果显示,BH07 株基因全长 1 767 bp,BH11 株全长为 1 766 bp,它们与天津的 AY181946 株同源性分别为 97.6%、97.8%;通过与 6 个不同基因亚型的 8 个参考株的猪圆环病毒全基因组序列进化分析,发现 BH07 株和 BH11 株均为 PCV2d 亚型。

**关键词:**猪圆环病毒Ⅱ型;全基因组;序列分析

**中图分类号:** S852.65;S858.285.3

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1002-1302(2018)16-0039-03

猪圆环病毒(porcine circovirus, PCV)为圆环病毒科(Circoviridae)、圆环病毒属(*Circovims*),是迄今为止发现的最小的动物病毒之一。根据致病性、抗原性以及核酸序列的不同,将 PCV 分为 PCV1 和 PCV2 这 2 个血清型。PCV2 感染猪

收稿日期:2016-10-14

基金项目:横向课题(编号:00010115009);江苏农牧科技职业学院级课题(编号:NSFPT201511、NSFPT201604);江苏省泰州市农业支撑项目(编号:TN201423)。

作者简介:陶宏卫(1976—),男,江苏泰州人,硕士,讲师,从事动物医学类教学及科研工作。E-mail:2260973045@qq.com。

通信作者:郭广富,硕士,讲师,从事动物医学类教学及科研工作, E-mail:ggf66@sina.com;曹军平,博士,教授,从事动物医学类教学、科研及社会服务工作, E-mail:cccc62@163.com。

2001,98(15):8909-8914.

[12] Pimenta L J, Liebrandt A, Arnold L, et al. Functional characterization of gibberellin oxidases from cucumber, *Cucumis sativus* L. [J]. Phytochemistry, 2013, 90:62-69.

[13] Spielmeyer W, Ellis M, Robertson M, et al. Isolation of gibberellin and metabolic pathway genes from barley and comparative mapping in barley, wheat and rice [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109(4):847-855.

[14] Wu J Z, Mizuno H, Sasaki T, et al. Comparative analysis of rice genome sequence to understand the molecular basis of genome evolution [J]. Rice, 2008, 1(2):119-126.

[15] Lo S F, Yu S M, Chen L J. Activation tagging of a newly identified gibberellin 2-oxidase causes a dwarf phenotype in a T-DNA insertion mutant [J]. Plant Physiology, 2006, 132(3):1283-1291.

[16] Teng F, Zhai L H, Liu R X, et al. *ZmGA3ox2*, a candidate gene for a major QTL, qPH3.1, for plant height in maize [J]. Plant Journal, 2013, 73(3):405-416.

[17] Kim C M, Piao H L, Park S J, et al. Rapid, large-scale generation of *Ds* transposant lines and analysis of the *Ds* insertion sites in rice [J]. Plant Journal, 2004, 39(2):252-263.

[18] Sun B Y, Piao H L, Park S H, et al. Selection of optimal primers for

群能引起断奶仔猪多系统衰竭综合征(postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)、猪皮炎和肾病综合征(porcine dermatitis and nephropathy syndrome, PDNS)、猪呼吸道疾病综合征(porcine respiratory disease complex, PRDC)及怀孕母猪繁殖障碍(sow abortion and mortality syndrome, SAMS)等<sup>[1]</sup>。血清学和病原学调查证实, PCV2 呈世界性分布,给养猪业造成巨大的经济损失<sup>[2-3]</sup>。PCV2 基因组大小约 1.7 kp, 包括 5 个基因亚型: PCV2a、PCV2b、PCV2c、PCV2d 及 PCV2e<sup>[4]</sup>。

本研究通过盐城地区疑似发生 PMWS 的 2 个养猪场采集病料, PCR 扩增 PCV2 全基因组, 并进行序列测定和比较分析, 旨在了解 PCV2 的遗传变异情况, 为今后的深入研究和科学防控该病提供依据。

TAIL-PCR in identifying *Ds* flanking sequences from *Ac/Ds* insertion rice lines [J]. Chinese Journal Biotechnology, 2004, 20(6):821-826.

[19] Takeda K. Internode elongation and dwarfism in some gramineous plants [J]. Gamma Field Symposia, 1977, 16:1-18.

[20] Buell C R, Yuan Q, Ouyang S, et al. Sequence, annotation, and analysis of synten between rice chromosome 3 and diverged grass species [J]. Genome Research, 2005, 15(9):1284-1291.

[21] Bai L, Singh M, Pitt L, et al. Generating novel allelic variation through activator insertional mutagenesis in maize [J]. Genetics, 2007, 175(3):981-992.

[22] Zhou L, Mitra R, Atkinson P W, et al. Transposition of *hAT* elements links transposable elements and V(D)J recombination [J]. Nature, 2004, 432(7020):995-1001.

[23] Scott L A, Lafoe D, Weil C F. Adjacent sequences influence DNA repair accompanying transposon excision in maize [J]. International Conference on Educational & Information Technology, 1996, 1:183-189.

[24] Lazarow K, Doll M L, Kunze R. Molecular biology of maize *Ac/Ds* elements: an overview [J]. Methods in Molecular Biology, 2013, 1057:59-82.

1 材料与方法

1.1 材料

疑似断奶仔猪多系统衰竭综合症猪的腹股沟淋巴结、脾脏和肺脏等组织,于 2015 年 11 月采自盐城地区 2 个养猪场的 2 份病料。基因组 DNA 快速抽提试剂盒(动物)、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP Mix、25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、2 000 bp DNA Ladder、pUCm-T 载体及 10 × PCR buffer 均为上海生工生物工程有限公司产品,6 × DNA 凝胶载入染料(Loading Dye)、内切酶 *Pst* I 等购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 引物的设计与合成

根据文献[5],合成 1 对可扩增 PCV2 全基因组的引物,引物由上海生工生物工程有限公司合成。引物序列为:P1: 5′-TGTCCGCGGGCTGGCTGAACCTTTTGAAAGTGA-3′; P2: 5′-GCCCCGCGGAAATTTCTGACAAACGTTACA-3′。

1.3 病料中 PCV2 全基因组的 PCR 扩增

将采集的病猪脾脏、淋巴结和肺等组织混合,研磨粉碎,按 1:5 加入无菌含双抗的 PBS 溶液,混匀,-20 ℃ 反复冻融 3 次,4 ℃ 8 000 r/min 离心 7 min,取上清,用基因组 DNA 快速抽提试剂盒,按说明书上的操作方法提取组织病料 DNA。以提取的组织病料 DNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 采用 50 μL 反应体系:5 μL 10 × buffer、*Taq* DNA 聚合酶 1 μL、模板 DNA 3 μL、3 μL 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、1 μL 10 mmol/L dNTPs、20 pmol/L 的上下游引物各 1 μL,用灭菌超纯水补足 50 μL。反应条件为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 2 min,进行 35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min。反应结束后用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯下观察电泳图谱,拍照记录结果并回收胶。

1.4 PCV2 全基因组测序

将胶回收的 PCR 产物连接到 pUCm-T 载体上,转化至大肠杆菌感受态细胞 DH5α,挑取经 PCR 初步鉴定为阳性的白斑菌,扩大培养后提取质粒,进行重组质粒的 PCR 鉴定和酶切鉴定,筛选出阳性克隆。将鉴定为阳性克隆的菌液送至上海生工生物工程有限公司进行测序。

1.5 PCV2 基因序列的比较分析

应用 DNA Star 和 MEGA 5.2 分析软件对扩增的 PCV2 全基因组和 GenBank 中的 8 株 PCV2 基因序列进行遗传进化分析。用于本研究分析的参考毒株基因组序列均来自于 NCBI(表 1)。

表 1 各分离株信息

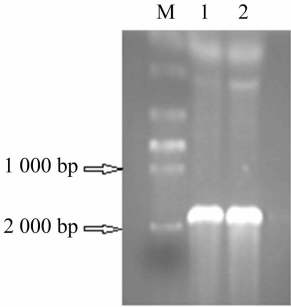
毒株名称	检出处	GenBank 收录号	基因亚型
Porcine circovirus Type II	加拿大	AF055392	pcv2a
GX0601	中国	EF524532	pcv2e
Porcine circovirus Type II	法国	AF055394	pcv2b
TJ	中国	AY181946	pcv2d
DK1980PMWSfree	丹麦	EU148503	pcv2c
DK1990PMWSfree	丹麦	EU148505	pcv2c
Porcine circovirus 1	中国	AY660574	pcv1
Porcine circovirus 1	中国	GU371908	pcv1

2 结果与分析

2.1 病料中 PCV2 全基因组的 PCR 扩增

以组织病料提取的 DNA 为模板,用 P1 和 P2 引物扩增

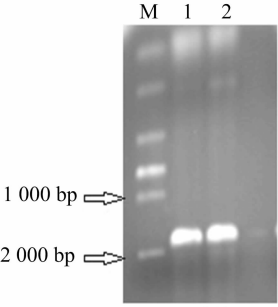
PCV2 全基因组,由图 1 可知,2 份病料均呈阳性,其 PCR 扩增片段大小约 1.7 kb,与预期的结果相符。将 2 个猪场检测到的 PCV2 分别命名为 BH07 株、BH11 株。



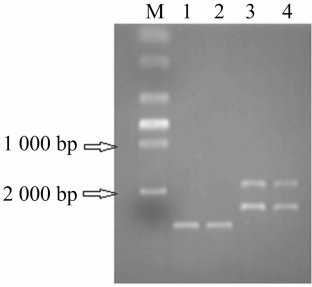
M—DNA marker; 1、2—病料 PCV2 PCR 扩增产物  
图1 扩增病料中的 PCV2 全基因组

2.2 重组质粒的鉴定

将胶回收的 PCR 产物连接到 pUCm-T 载体并转化至大肠杆菌感受态细胞 DH5α,获得重组质粒。PCR 鉴定重组质粒,结果为阳性(图 2);使用内切酶 *Pst* I 酶切鉴定重组质粒,结果呈阳性(图 3)。



M—DNA marker; 1、2—质粒 PCV2 PCR 扩增产物  
图2 PCR 鉴定重组质粒



M—DNA marker; 1、2—质粒酶切前; 3、4—质粒酶切后  
图3 酶切鉴定重组质粒

2.3 PCV2 全基因核苷酸同源性比较

将鉴定为阳性克隆的重组质粒进行测序,测序发现 BH07 株和 BH11 株全长分别为 1 767、1 766 bp。从 NCBI 上收录的毒株序列中选取 8 株 PCV2 基因序列,包含 PCV2 的 5 种基因亚型(PCV2a、PCV2b、PCV2c、PCV2d 及 PCV2e)的代表毒株和 PCV1 的代表株。运用 DNA Star 软件对其进行同源性分析,由表 2 可知,BH07 株和 BH11 株与不同亚型的分离株同源性均较高,最高为 99.0%,最低为 73.3%,其中 BH07 株与 PCV2d 代表株 AY181946 的核苷酸同源性最高,为 97.6%;BH11 株与 AY181946 的核苷酸同源性最高,为 97.8%;BH07

表 2 PCV2 全基因核苷酸同源性比较

毒株编号	核苷酸同源性(%)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	—	99.0	77.7	93.3	92.8	96.5	96.5	95.1	77.9	94.1
2	1.0	—	77.7	93.4	93.1	96.3	96.4	95.0	78.0	94.2
3	26.6	26.5	—	73.5	73.3	80.5	80.7	76.5	99.3	76.9
4	7.0	6.9	32.8	—	98.1	95.8	96.6	97.8	73.9	93.5
5	7.5	7.3	33.1	1.9	—	94.9	95.8	97.6	73.7	93.3
6	3.6	3.8	22.6	4.3	5.3	—	96.4	96.7	80.6	97.0
7	3.6	3.7	22.3	3.4	4.3	3.7	—	97.0	80.8	96.5
8	5.0	5.2	28.2	2.2	2.5	3.4	3.1	—	76.8	95.4
9	26.2	26.2	0.7	32.1	32.5	22.6	22.3	27.8	—	77.1
10	6.2	6.1	27.6	6.8	7.0	3.0	3.5	4.8	27.4	—

注:毒株各编号分别代表以下毒株:1 为 EU148503,2 为 EU148505,3 为 GU371908,4 为 BH11,5 为 BH07,6 为 AF055392,7 为 AF055394,8 为 AY181946,9 为 AY660574,10 为 EF524532。

株与 BH11 株的核苷酸同源性为 98.1%。

#### 2.4 PCV2 全基因遗传进化分析

应用软件 MEGA 5.2 中的邻近归并法绘制遗传进化树,系统重复参考值设定为 1 000 次重复。从绘制的进化树(图 4)中可见,PCV 分成 2 个完全独立的大分支,其中 8 株 PCV2 构成 1 个大的分支,其他 2 株 PCV1 则组成另一独立的大分支。本研究获得的 BH07 株和 BH11 株属于 8 株 PCV2 中的组成部分,且与 PCV2d 代表株 AY181946 共同构成 1 个独立的小分支。由此可知,BH07 株和 BH11 株 PCV2 均属于 PCV2d 基因亚型。

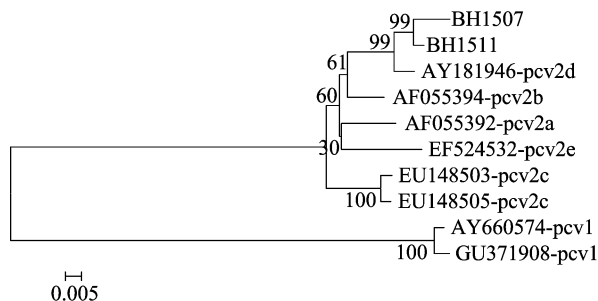


图 4 pcv2 全基因组序列的系统进化树

### 3 讨论

欧盟根据 PCV2 全基因组在进化树上遗传距离大小的不同将其分成 PCV2a、PCV2b、PCV2c、PCV2d 及 PCV2e 等 5 个基因亚型,其中 PCV2e 和 PCV2a 均属于传统分类方法中的 PCV2a,PCV2c、PCV2d 和 PCV2b 均属于传统分类方法中的 PCV2b。Wang 等对中国多个省份病料中的 PCV2 进行了分离鉴定及亚型区分,首次报道了 PCV2d 亚型在中国存在<sup>[6]</sup>。本次试验的 2 个毒株经过核苷酸同源性比较和遗传进化树的分析验证,最终确定 BH07 株和 BH11 株 PCV2 均属于 PCV2d

基因亚型。PCV2 基因组全长为 1 766 ~ 1 768 bp,本次测序结果 BH07 株和 BH11 株全长不一致,分别为 1 767、1 766 bp,比较二者基因序列发现 BH11 株在 824 位缺失了 1 个碱基。这与曹东阳等报道的江苏盐城地区存在基因大小 1 766 bp 的 PCV2d<sup>[7]</sup>是一致的。本试验对盐城地区 2 个猪圆环病毒病猪场的病料进行了 PCV2 全基因组克隆与序列分析,为今后进一步深入研究该病毒的生物学特性及开发有效的免疫制剂提供了科学的参考依据。

#### 参考文献:

- [1] Grau - Roma L, Fraile L, Segalés J. Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2[J]. Veterinary Journal, 2011, 187(1): 23 - 32.
- [2] Gillespie J, Opriessnig T, Meng X J, et al. Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus - associated disease[J]. Journal of Veterinary Internal Medicine, 2009, 23(6): 1151 - 1163.
- [3] Opriessnig T, Meng X J, Halbur P G. Porcine circoviruses type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies [J]. J Vet Diagn Investig, 2007, 19: 591 - 615.
- [4] Wang F, Guo X, Ge X, et al. Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2[J]. Virus Research, 2009, 145(1): 151 - 156.
- [5] 李俊, 时建立, 于周, 等. 猪圆环病毒 2 型双拷贝感染性 DNA 的构建及体外拯救[J]. 生物工程学报, 2009, 25(11): 1633 - 1638.
- [6] Wang F, Guo X, Ge X, et al. Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2[J]. Virus Research, 2009, 145(1): 151 - 156.
- [7] 曹东阳, 王小敏, 钱爱东, 等. 江苏省及周边地区猪圆环病毒 II 型 (PCV2) 分子流行病学调查[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(2): 390 - 398.