

猪圆环病毒 2 型新疆株全基因组的滚环 扩增与序列分析

翟少伦^{1,2} 岳城² 冉多良² 龙进学^{1*} 袁世山^{1*}

(1. 中国农业科学院上海兽医研究所猪传染病研究室 上海 200241)

(2. 新疆农业大学动物医学学院 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘要: 滚环扩增技术是一种体外恒温 DNA 扩增方法, 特异性好, 敏感性强, 已广泛应用于微生物学领域。首先采用鉴别 PCR 对来自新疆某地区的 5 份猪病料进行猪圆环病毒 2 型的检测, 接着对检出的 2 份猪圆环病毒 2 型阳性 DNA 样品进行滚环扩增。滚环扩增产物经单一限制性内切酶 (*Sac* II) 酶切及琼脂糖凝胶电泳鉴定, 结果显示 2 份样品都出现了猪圆环病毒 2 型基因组大小的条带。对目的条带进行回收、克隆与测序, 结果表明 2 株新疆株猪圆环病毒 2 型的全基因组大小皆为 1768 bp。遗传进化分析显示 2 株的基因型为 PCV2a 和 PCV2e。

关键词: 猪圆环病毒 2 型, 新疆株, 滚环扩增, PCV2a, PCV2e

Rolling-circle Amplification and Sequence Analysis of PCV2 Genomes of Xinjiang Strains

ZHAI Shao-Lun^{1,2} YUE Cheng² RAN Duo-Liang² LONG Jin-Xue^{1*}
YUAN Shi-Shan^{1*}

(1. Department of Swine Infectious Diseases, Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China)

(2. College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052, China)

Abstract: Rolling-circle amplification (RCA) is an isothermal DNA amplification assay *in vitro*, which has good specificity and sensitivity and has been extensively applied to microbiological investigations. In this study, five diseased swine samples from certain region of Xinjiang were first detected by differential PCR for porcine circovirus type 2 (PCV2), and then RCA was utilized for amplification of the full-length genomic DNA of two positive samples. Verification with *Sac* II restriction enzymatic mapping showed that PCV2 specific genome-size bands appeared on agarose gel. The targeted bands were purified and cloned. With the aid of sequencing, the genomes of two viral strains were obtained and proved to be 1768 bp in length. Moreover, the phylogenetic analysis indicated that they were divided into two different genotypes (PCV2a and PCV2e).

基金项目: “十一五”国家科技支撑项目(No. 2006BAD06A04)

* 通讯作者: 袁世山: ✉ shishanyuan@shvri.ac.cn

龙进学: ✉ longjx@shvri.ac.cn

收稿日期: 2010-01-01; 接受日期: 2010-03-08

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

Keywords: Porcine circovirus type 2, Xinjiang strain, Rolling-circle amplification, PCV2a, PCV2e

猪圆环病毒 2 型(Porcine circovirus type 2, PCV2)是猪圆环病毒相关性疾病(Porcine circovirus associated diseases, PCVAD)的主要病原^[1], 自 1998 年^[2]发现以来, 给包括我国在内的世界养猪业带来了巨大的经济损失。猪圆环病毒按照血清型及基因型, 可以分为 PCV1 和 PCV2。PCV1 对猪不致病, 而 PCV2 与多种疾病相关。目前, PCV2 已是各国研究的热点。PCV2 基因组大小为 1767 bp 和 1768 bp。按照最新的基因型划分, PCV2 有 5 个基因型, 即 PCV2a、PCV2b、PCV2c、PCV2d 和 PCV2e^[3-4]。PCV2a 和 PCV2e 拥有同样大小的基因组(1768 bp), 而 PCV2b、PCV2c 和 PCV2d 拥有同长的基因组(1767 bp)。PCV2 有 2 个主要的开放阅读框(ORF1 和 ORF2), ORF1 位置(51-995 位)比 ORF2 位置(1030/1033/1034-1734/1735 位)稳定。ORF1 编码病毒的复制蛋白, 由 314 个氨基酸组成, 而 ORF2 编码病毒的衣壳蛋白, 由 233 或 234 个氨基酸组成。

1998 年 Lizardi 等^[5]建立的滚环扩增(Rolling-circle amplification, RCA)技术是借鉴自然界中环状病原生物 DNA 分子滚环复制的方式, 用一个六聚体随机引物结合到环状 DNA 上, 在 DNA 聚合酶作用下扩增延伸, 产生一条具有大量重复序列并且与环状模板链完全互补的线性单链, 其产物 DNA 链是亲代 DNA 单位长度的成千上万倍。Cheglakov 等^[6]研究表明, 利用 RCA 技术能够放大环状病毒的靶核酸信号。滚环扩增技术在恒温下操作, 特异性好, 敏感性强, 已广泛应用于多瘤病毒^[7]、双生病毒^[8]、小麦矮腥黑穗菌^[9]及柑桔溃疡病菌^[10]等的检测, 环状病毒基因组扩增^[11-12]及宏基因组研究等领域。

目前, 国内已有许多省、自治区、直辖市报道 PCV2 的分子流行情况, 但新疆地区 PCV2 的分子流行情况几乎是个空白, 并且 RCA 技术应用于猪圆环病毒 2 型的报道也较少。因此, 本研究旨在通过滚环扩增技术扩增新疆株 PCV2 的全基因组, 并进一步分析其分子遗传演变情况。

1 材料

1.1 病料、载体和菌株

本研究中涉及的 5 份猪肺脏病料系来自新疆维

吾尔自治区某经历过“高热病”侵袭的猪场。病料编号分别为 XJ0901、XJ0902、XJ0903、XJ0904 和 XJ0905。pBluescript SK (+)载体为本实验室保存。TOP10 感受态菌购自北京天根生化科技有限公司。

1.2 引物

用于滚环扩增的六聚体随机引物及用于 PCV2 全基因组测序的引物 PCF1096 (5'-GGATATTGT AKTCCTGGTTCG-3')由上海 Invitrogen 公司合成。

1.3 工具酶和化学试剂(盒)

phi29 DNA 聚合酶、*Sac* II 酶和 T4 DNA 连接酶皆购自 NEB 公司。病毒基因组提取试剂盒、胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒分别购自北京天根生化科技有限公司、上海华舜生物工程有限公司和北京博大泰克生物基因技术有限公司。其他试剂均为国产分析纯或试剂纯。

2 方法

2.1 病毒 DNA 提取及鉴别 PCR 检测 PCV2

DNA 提取按照天根病毒基因组提取试剂盒说明操作。鉴别 PCR 检测 PCV2 参照文献^[13]描述。

2.2 滚环扩增 PCV2 全基因组

具体步骤参照文献^[11]描述。

2.3 酶切鉴定滚环产物

50 μ L 体系如下: 10 μ L 滚环产物、1.5 μ L *Sac* II、5 μ L 10 \times Buffer、0.5 μ L 100 \times BSA、33 μ L 双蒸水。反应条件: 37 $^{\circ}$ C 过夜。琼脂糖凝胶电泳鉴定酶切效果。

2.4 回收与连接

对 PCV2 全基因组大小的条带进行回收及连接 pBluescript SK (+)载体上的 *Sac* II 酶切位点。10 μ L 连接体系如下: 7 μ L 回收产物、1 μ L T4 DNA 连接酶、1 μ L 10 \times T4 DNA 连接酶缓冲液、1 μ L pBluescript 载体。连接反应条件: 16 $^{\circ}$ C 过夜。

2.5 转化与挑菌

连接产物转化 TOP10 感受态菌, 12-16 h 后, 挑取菌落, 37 $^{\circ}$ C、150 r/min 培养过夜进行质粒扩增。

2.6 质粒提取与测序

提取质粒, 电泳鉴定阳性重组质粒。对确定为

阳性重组质粒大小的质粒送华大基因公司测序。序列提交 GenBank, 登录号为 GU370063–GU370064。

2.7 分子遗传进化分析

序列比对采用 ClustalW 程序(DNAStar 软件), 进化树采用邻接法(MEGA 4.0 软件)构建。

3 结果

3.1 鉴别 PCR 检测 PCV2

对提取的 5 份病毒 DNA 进行 PCV2 的检测, 结果显示样品 XJ0901 和 XJ0904 为 PCV2a 或 PCV2e 阳性, 其他均为阴性(图 1)。

3.2 酶切鉴定 RCA 扩增 PCV2 全基因组

滚环扩增产物经 *Sac* II 酶切 12 h 后进行电泳鉴定, 结果显示样品 XJ0901 和 XJ0904 出现了猪圆环病毒 2 型基因组大小的目的条带(图 2)。

3.3 新疆株 PCV2 分子遗传进化分析

得到的 2 株新疆株圆环病毒 2 型全基因组与 5 个基因型参考株的全基因组序列同源性为 94.1%–99.2%(图 3)。两株的主要开放阅读框 ORF1 和 ORF2 长度分别等长(图 4)。遗传进化树显示 2 株新疆株 PCV2 分别属于基因型 PCV2a 和 PCV2e (图 5)。

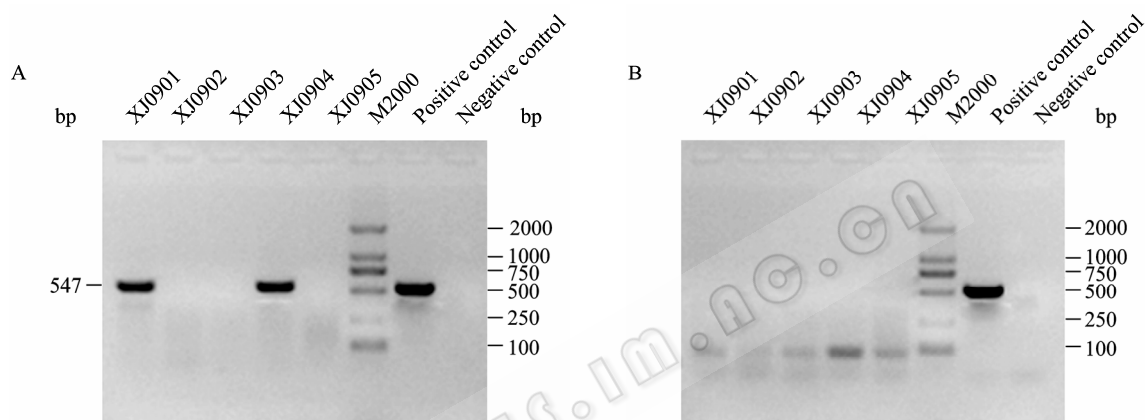


图 1 鉴别 PCR 检测 PCV2 结果

Fig. 1 Detection of PCV2 by differential PCR

注: A: PCV2a 或 PCV2e 的检测结果; B: PCV2b、PCV2c 或 PCV2d 的检测结果。

Note: A: Detection of PCV2a or PCV2e; B: Detection of PCV2b, PCV2c or PCV2d.

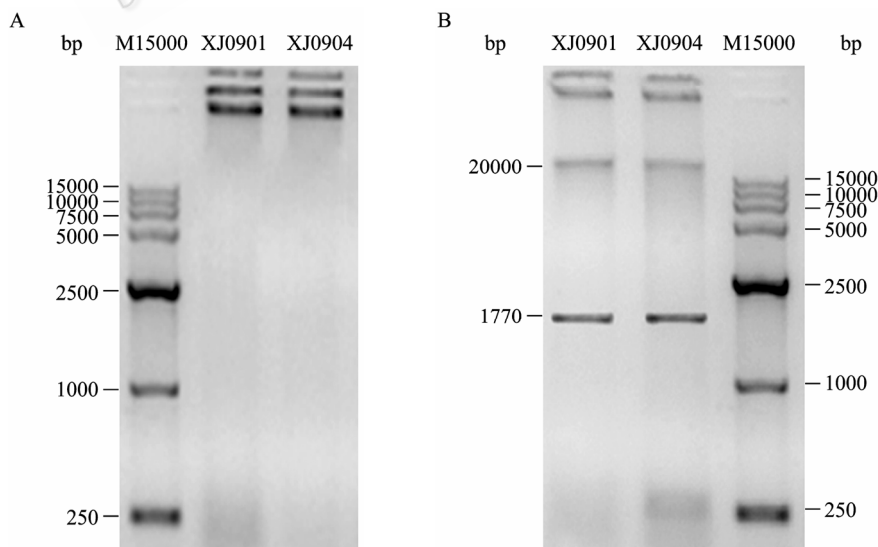


图 2 滚环扩增产物电泳鉴定

Fig. 2 Identification of RCA products on agarose gel

注: A: 滚环扩增产物未经 *Sac* II 酶切鉴定; B: 滚环扩增产物经 *Sac* II 酶切鉴定。

Note: A: Identification of RCA products without *Sac* II digestion; B: Identification of RCA products with *Sac* II digestion.

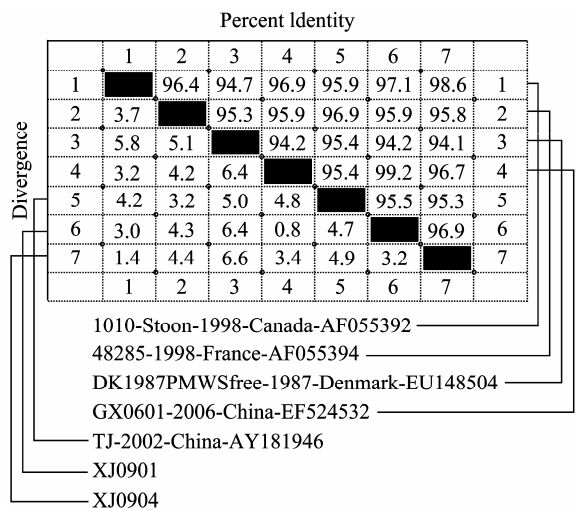


图3 猪圆环病毒2型全基因组同源性比较
Fig. 3 Homology comparison based on complete genome of PCV2

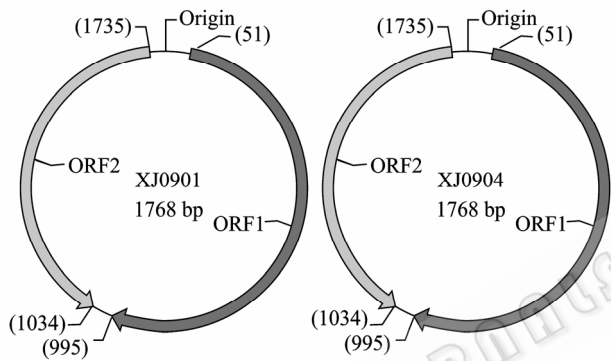


图4 猪圆环病毒2型 XJ0901 株和 XJ0904 株的基因组结构
Fig. 4 Map of PCV2 genome from the strains of XJ0901 and XJ0904

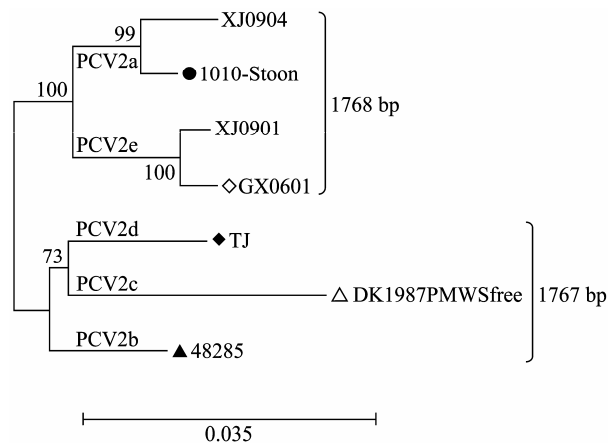


图5 猪圆环病毒2型全基因组系统进化树分析
Fig. 5 Phylogenetic analysis based on complete genome of PCV2
注: 标有不同符号的病毒株为 PCV2 不同基因型的参考株。
Note: The reference strains of different PCV2 genotypes were labelled with different symbols.

4 讨论

新疆地处祖国西部边陲,地域辽阔,近年来养猪业也快速兴起,养猪规模不断扩大。但 2006 年以来,猪“高热病”也在天山南北猪场肆虐,给新疆养猪业带来了巨大损失。PCV2 是猪“高热病”的致病因子之一,由于科研设施、水平及实验室条件相对落后等因素制约,目前新疆地区 PCV2 的分子流行情况几乎是个空白。因此,本研究室从新疆采集 5 份猪组织病料来进行研究,以期拉开调查 PCV2 在新疆分子流行情况及特征的序幕。

本研究在滚环扩增前首先使用鉴别 PCR 方法检测 PCV2,旨在调查 5 份病料是否存在 PCV2 不同基因型间共感染情况,使得在滚环扩增后有针对性地克隆不同基因型的 PCV2 基因组,不至于忽视了共感染的存在。在本研究中,经鉴别 PCR 方法检测,5 份新疆病料中不存在 PCV2 不同基因型间共感染情况,XJ0901 和 XJ0904 仅仅为 PCV2a 或 PCV2e 的单纯感染。

在酶切滚环扩增产物中,本研究使用的酶是本研究室常用的 *Sac* II,其正好对应于 PCV2 基因组中的单一 *Sac* II 酶切位点^[14]。在先前的研究^[13,15]中,单一限制性酶 *Eco*R I 和 *Nco* I 也曾使用。选择酶切用酶可以根据自己实验室需要或条件适当选择。滚环扩增技术是一项很好的分子生物学工具,先前报道称其可以提高 PCV2 感染性克隆的感染滴度^[13],可以扩增出人类细环病毒(Human torque teno virus, HTTV)和猪细环病毒(Porcine torque teno virus, PTTV)^[16]的全基因组及避免人为造成的同源重组^[11]。此外,在宏基因组方面也有很好的应用前景,猪细环病毒 2 型(PTTV2)就是这样被发现的^[11]。本研究中用 *Sac* II 酶切滚环扩增产物,除了产生 PCV2 基因组大小的目的片段外,还出现了一个 20 kb 左右大小的酶切片段(图 3),该片段可能是未知的核苷酸序列,这与先前文章报道相似^[11]。本研究中对该序列进行多次克隆但未获成功,原因可能是片段过长很难被 pBluescript SK (+)载体上的单一 *Sac* II 酶切位点连接上去,下一步准备尝试多种限制酶进行酶切并实行分段连接和测序等,以期得到该片段的核苷酸序列。

通过克隆、测序,本研究得到了 XJ0901 和 XJ0904 两株 PCV2 的全基因组,基因组大小均为

1768 bp。基因型分析显示两株分别为 PCV2e 和 PCV2a, 两者同源性为 96.9%。XJ0901 株与 PCV2e 参考株(GX0601)同源性最高(99.2%), 与 PCV2c 参考株(DK1987PMWSfree)同源性最低(94.2%), 而 XJ0904 株与 PCV2a 参考株(1010-stoon)同源性最高(98.6%), 与 PCV2c 参考株(DK1987PMWSfree)同源性最低(94.1%), 这些数据初步表明了该地区 PCV2 的流行还是存在基因型多样性的。目前的研究报道显示, PCV2b 在我国为主要流行基因型^[4], 但本研究只检测到 PCV2a 和 PCV2e 在新疆某地区的流行, 造成这种结果差异的原因可能有: (1) 本研究收集病料的数量有限, PCV2b、PCV2c 和 PCV2d 是否在新疆流行还有待于收集更多的临床病料进行检测; (2) 目前我国对 PCV2 的共感染情况调查甚少且往往被忽视, 这就很可能造成 PCV2 某种基因型(如 PCV2b)占主导流行。事实上, 在先前研究中通过调查 PCV2 的共感染情况发现, 在 PCV2a 或 PCV2e 与 PCV2b 等的流行上差异并不显著^[13], 且 PCV2a 或 PCV2e 为主要流行基因型。

本研究应用滚环扩增技术成功扩增到了 2 株 PCV2 的全基因组, 这是国内首次报道新疆株 PCV2 的全基因组特征, 滚环扩增技术为 PCV2 的全基因组分离提供了一种新方法。此外, 该方法对已知的鸡贫血病毒、鸭圆环病毒、鹅圆环病毒等环状病毒的全基因组分离及环境中未知环状病毒的宏基因组研究也有很好的启发和指导意义。

参 考 文 献

- [1] Chae C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Vet J*, 2005, **169**(3): 326–336.
- [2] Morozov I, Sirinarumitr T, Sorden S, *et al.* Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol*, 1998, **36**(9): 2535–2541.
- [3] Segales J, Olvera A, Grau-Roma L, *et al.* PCV-2 genotype definition and nomenclature. *Vet Rec*, 2008, **162**(26): 867–868.

- [4] Wang F, Guo X, Ge XN, *et al.* Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2. *Virus Res*, 2009, **145**(1): 151–156.
- [5] Lizardi PM, Huang XR, Zhu Z, *et al.* Mutation detection and single molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nat Genet*, 1998, **19**(3): 225–232.
- [6] Cheglakov Z, Weizmann Y, Basnar B, *et al.* Diagnosing viruses by the rolling circle amplified synthesis of DNazymes. *Org Biomol Chem*, 2007, **5**(2): 223–225.
- [7] John R, Wittig W, Fernandez de-Luco D, *et al.* Characterization of two novel polyomaviruses of birds by using multiply primed rolling-circle amplification of their genomes. *J Virol*, 2006, **80**(7): 3523–3531.
- [8] 余玲玲, 钱亚娟, 周雪平. 用滚环扩增技术检测双生病毒. *植物病理学报*, 2008, **38**(6): 570–575.
- [9] 蔡俊, 殷幼平, 葛建军, 等. 超分支滚环扩增法检测小麦矮腥黑穗菌. *中国农业科学*, 2009, **42**(10): 3493–3500.
- [10] 黄冠军, 殷幼平, 张仑, 等. 柑桔溃疡病菌滚环扩增检测体系的建立. *微生物学报*, 2008, **48**(3): 375–379.
- [11] Niel C, Diniz-Mendes L, Devalle S. Rolling-circle amplification of Torque teno virus (TTV) complete genomes from human and swine sera and identification of a novel swine TTV genogroup. *J Gen Virol*, 2005, **86**(Pt5): 1343–1347.
- [12] Dezen D, Rijsewijk F, Teixeira T, *et al.* Multiply-primed rolling-circle amplification (MPRCA) of PCV2 genomes: Applications on detection, sequencing and virus isolation. *Res Vet Sci*, 2010, **88**(3): 436–440.
- [13] 翟少伦, 张建武, 韦祖樟, 等. PCV2a 与 PCV2b 鉴别诊断 PCR 方法的优化及应用. *中国动物传染病学报*, 2010, **18**(1): 1–7.
- [14] Fenaux M, Halbur P, Haqshenas G, *et al.* Cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus is infectious when injected directly into the liver and lymph nodes of pigs: characterization of clinical disease, virus distribution, and pathologic lesions. *J Virol*, 2002, **76**(2): 541–551.
- [15] Navidad P, Li H, Mankertz A, *et al.* Rolling-circle amplification for the detection of active porcine circovirus type 2 DNA replication *in vitro*. *J Virol Methods*, 2008, **152**(1/2): 112–116.
- [16] 陆承平. 兽医微生物学. 第 4 版. 北京: 中国农业出版社, 2007: 376.