

猪圆环病毒 2 型流行株的分离及其感染性克隆的构建

陈瑞爱^{1,2*} 邵定勇² 同戈² 黄红亮² 李延鹏³ 黄文科²

(1. 华南农业大学 兽医学院 广东 广州 510000)

(2. 广东大华农动物保健品股份有限公司 广东 云浮 527400)

(3. 中国农业科学院生物技术研究所 北京 100081)

摘要: 【目的】通过分离一株猪圆环病毒 2 型(PCV2)流行毒株,并构建其感染性克隆,为研究 PCV2 基因功能提供操作平台。【方法】通过 PCR 方法,从疑似患断奶仔猪多系统衰竭综合症(PMWS)的仔猪淋巴结中鉴定为猪圆环病毒(Porcine circovirus, PCV) 2 型阳性。把阳性病料接种 PK-15 细胞传代培养,在培养物中扩增出 PCV2 的全基因序列。对扩增出的全序列进行序列测定,并与 GenBank 中公布的 5 株广东 PCV2 分离株(GD-pz、GD-gj、GD-jm、GD-ss 和 GD-sz)进行同源性分析。通过 *EcoR* I 和 *Sal* I 将 PCV2 全基因组序列克隆进 pUC18 载体中,获得含 PCV2 GD-zq 株全基因组单拷贝的重组质粒 pPCV2-GD-zq,再通过 *Sal* I 和 *Hind* III 把另一个全长拷贝克隆进 pPCV2-GD-zq 质粒中,使 PCV2 GD-zq 株基因组 DNA 以头尾相接的双重复方式克隆进 pUC18 载体中,获得重组质粒 pPCV2-2GD-zq。将 pPCV2-2GD-zq DNA 纯化和定量后转染 PK-15 细胞,拯救 PCV2 GD-zq 病毒。【结果】从 PMWS 感染的猪淋巴结中分离到了一株 PCV2,命名为 GD-zq 株;序列分析结果显示, GD-zq 株全基因组为 1 767 bp,与 GenBank 中公布的 5 株广东 PCV2 分离株 ORF1 核苷酸一致性为 97.1%–99.7%,编码氨基酸一致性为 98.7%–100%; ORF2 核苷酸一致性为 93.2%–99.6%,编码氨基酸一致性为 92.3%–99.1%;全基因一致性为 96.0%–99.6%。pPCV2-2GD-zq 质粒转染 PK-15 细胞后,其通过间接免疫荧光实验 (IFA)能从转染细胞及其传代细胞中,检测到拯救出的病毒。【结论】分离了一株 PCV2 广东株 GD-zq,成功构建了 PCV2 GD-zq 株的感染性克隆。

关键词: 猪 2 型圆环病毒, 全基因, 感染性克隆, 序列分析

Isolation and identification of porcine circovirus type 2 of GD-zq strain and construction of its infectious clone

CHEN Rui-Ai^{1,2*} SHAO Ding-Yong² TONG Ge² HUANG Hong-Liang²
LI Yan-Peng³ HUANG Wen-Ke²

(1. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510000, China)

(2. Guangdong Dahuanong Animal Health Products Co. Ltd., Yunfu, Guangdong 527400, China)

(3. Biotechnology Research Institute, CAAS, Beijing 100081, China)

Abstract: [Objective] To identify and construct an infectious clone for an isolation of porcine

基金项目: 重大动物疫病新型疫苗的关键技术与产业化项目(No. 2011A090200117)

*通讯作者: ✉: chenruiaidhn@126.com

收稿日期: 2013-07-29; 接受日期: 2013-09-09; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-12

circovirus type 2 (PCV2). **[Methods]** PCR was used to identify an isolate, PCV2 GD-zq strain, from the tissues of clinical pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). The complete sequence of the isolate was megaligned with other 5 PCV2 Guangdong isolates (GD-pz, GD-gj, GD-jm, GD-ss and GD-sz) from GenBank by DNASTar. Two copies of the whole genomic sequence was amplified and cloned into pUC18 with the restriction enzymes *EcoR* I, *Sal* I, *Sal* I and *Hind* III, and the positive clone pPCV2-2GD-zq was identified by enzyme analysis. By purification and quantitation, the pPCV2-2GD-zq DNA was transfected to PK-15 cell lines to rescue the infectious PCV2 GD-zq. **[Results]** PCV2 GD-zq strain was isolated and identified from the lymphonodus of clinical pigs with PMWS. Sequence analysis shows that the isolate's complete genome was composed of 1 767 nucleotides, which shares 96.0%–99.6% homology between other 5 Guangdong reference strains, and shares 97.1%–99.7% homology in ORF1, 93.2%–99.6% in ORF2, respectively. Amino acid homology alignment shows 98.7%–100% in ORF1 and 93.2%–99.6% in OFR2. Seventy two hours post transfection of pPCV2-2GD-zq, GD-zq strain could be detected by immunofluorescence assay (IFA). **[Conclusion]** A PCV2 was isolated, and its infectious DNA clone was constructed successfully.

Keywords: Porcine circovirus type 2 (PCV2), Complete genome, Infectious clone, Sequence analysis

猪圆环病毒(Porcine circovirus ,PCV)为圆环病毒科圆环病毒属成员,是迄今发现的一种最小的动物病毒。PCV是一种无囊膜的单股环状负链DNA病毒,直径约17–20 nm,以滚环方式进行复制^[1]。根据其致病性、抗原性及基因组成不同,分为PCV1及PCV2两种基因型。PCV2基因组全长1 767 bp或1 768 bp,具有致病性,与断奶仔猪多系统衰竭综合征(Postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)密切相关^[2–4]。除引起PMWS外,PCV2还可引起猪的繁殖障碍、皮炎与肾病综合征、呼吸道疾病等多种疾病,给世界养猪业造成了巨大经济损失,是危害当前养猪业的重要病原^[5]。

迄今为止,关于PCV2的分子致病机制仍不太清楚。PCV2感染可造成机体出现免疫抑制,这是PCV2的致病机理之一^[6]。PCV2可以在机体的单核巨噬细胞中大量聚集,这影响了细胞外的免疫效应分子与病毒靶位点的结合,因此病毒可通过免疫逃避方式生存下来,在单核巨细胞中继续进行大量的增殖与聚集。当其增殖数量达到一定的滴度时,可干扰正常免疫细胞的防御功效,造成免疫效应分子、免疫因子及抗体消长情况偏离正常水平,从整体来说,机体的免疫应答功能降低,对外界致病因

子的抵抗力减弱了,一些存在于机体的条件致病物或外界致病物就会趁机大量繁殖,从而导致共感染或继发感染的出现^[7]。

PCV基因组大于200 nt的开放阅读框有6个^[8],其中有2个主要阅读框架,ORF1基因产物与病毒复制酶相关(Rep),ORF2基因产物构成病毒核衣壳蛋白(Cap)^[9]。ORF3编码蛋白诱导细胞凋亡作用而在病毒感染中扮演一定角色^[10]。PCV2通过其复制中间体(双链复制型DNA)以滚环复制方式进行复制^[11]。Fenaux等报道,串联双拷贝PCV2 DNA克隆的感染性明显强于单拷贝PCV2 DNA克隆^[12]。建立PCV2感染性克隆,为深入研究病毒蛋白基因功能以及疫苗开发都奠定了很好平台。

为了丰富PCV2流行毒株的基因组文库,进一步加强对PCV2的功能基因组学的研究,本文从临床患PMWS仔猪淋巴结中分离到一株PCV2(GD-zq),并对其进行了全基因组测序,比较了GD-zq株与部分国内外分离株的同源性。进一步构建了该分离株基因组的双拷贝重组质粒,通过转染试验,在体外拯救出了具有感染性的PCV2病毒,为进一步研究圆环病毒的致病机理搭建了平台。

1 材料与方法

1.1 病料和细胞

病料：50 日龄长白猪淋巴结，来自广东肇庆某猪场患多系统衰弱综合症(PMWS)的仔猪。无PCV 污染的猪肾细胞系 PK-15 购自美国菌种保藏中心(ATCC)。

1.2 主要试剂

LA *Taq*酶、T4 DNA连接酶、PCR试剂、凝胶回收试剂盒等购自大连宝生物工程公司；限制性核酸内切酶购自NEB公司；高纯度质粒小提中量试剂盒购自TIANGEN公司；脂质体(Lipfectamine)、TRIzol LS Reagent购于Invitrogen公司；猪抗PCV2阳性血清和小鼠抗PCV2 ORF 2血清由本实验室制备和保存；异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗鼠IgG抗体均购自Sigma公司。

1.3 引物及模板制备

1.3.1 引物：参照文献[13-14]，选取PCV1与PCV2全基因组序列中的保守区域，利用常用生物信息学软件Oligo 6.0设计一对通用引物，用于鉴定病料中是否含有PCV。上游引物P1为5'-GCTGAAC TTTTGAAAGTGAGCGGG-3'，下游引物P2为5'-TC ACACAGTCTCAGTAGATCATCCCA-3'，该对引物预计扩增片段长度为243 bp。GenBank中发表的猪圆环病毒2型(PCV2)全基因序列，设计两对特异性引物，用于扩增PCV2全基因组序列。上游引物F_(PCV-EcoR I)为5'-GAAGAATTCGCTGGCTGAAC TTGAAAG-3'，5'端含EcoR I位点；下游引物R_(PCV-Sal I)为5'-GCAGTCGACAAATTTCTGACAAA CGTTA-3'，5'端含Sal I位点。上游引物F_(PCV-Sal I)为5'-GTTGTCGACGCTGGCTGAAC TTTTGAAAG-3'，5'端含Sal I位点；下游引物R_(PCV-Hind III)为5'-GCAAAGCTTAAATTTCTGACAAACGTTA-3'，5'端含Hind III位点，预期的PCR产物大小均为1 767 bp。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.3.2 病毒DNA提取：取50 mg淋巴结剪碎后加入1 mL PBS研磨匀浆，将该匀浆液转移至1.5 mL的

离心管中，10 000×g离心10 min，吸取537 μL上清至另一离心管中，加入60 μL 10% SDS (终浓度为1%)和3 μL蛋白酶K (终浓度为100 mg/L)，颠倒混匀，50 °C水浴60 min，用等体积的酚:氯仿抽提，12 000 r/min离心10 min，再用等体积氯仿:异戊醇抽提一次。吸取上清液至新离心管中，加入1/10倍体积醋酸钠和2倍体积无水乙醇，沉淀DNA。12 000×g离心10 min，加入20 μL灭菌超纯水溶解DNA，-20 °C冻存储备用。

1.4 PCR及其产物的酶切鉴定

以1.3中提取的DNA作为PCR反应模板，以P1、P2作为引物进行PCR鉴定。PCR反应体积为25 μL。反应体系中含：10×PCR buffer (不含 Mg²⁺) 2.5 μL，2.5 mmol/L dNTPs 2 μL，25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL，上下游引物各1 μL (50 pmol/L)，模板DNA 1 μL，*rTaq*酶1 μL (5 U/μL)，用灭菌超纯水补足25 μL。PCR反应程序为：94 °C 5 min；94 °C 45 s，56 °C 45 s，72 °C 45 s，共30次循环，72 °C 10 min。回收PCR产物，用限制性内切酶Nco I进一步酶切鉴定。

1.5 病毒的分离培养及免疫荧光鉴定

1.5.1 病毒的分离培养：将经检测为PCV2阳性的淋巴结处理上清液用氯仿反复抽提3次，去除囊膜病毒的污染。将抽提上清液接种到汇合度达60%的PK-15细胞表面，培养72 h后，冻融细胞，以其作为第一代病毒液，将第1代病毒液再接种到单层PK-15细胞瓶中培养72 h，冻融收获第2代病毒液。按上述相同方式冻融、传代，如此做5次病毒盲目传代后进行间接免疫荧光实验(IFA)检测。

1.5.2 间接免疫荧光实验(IFA)检测：按常规方法进行，简略步骤如下：将在24孔细胞培养板上培养72 h的接毒细胞用PBS (pH 7.2)洗涤3遍，用80%冷丙酮固定细胞10 min。每孔滴加1 mL猪抗PCV2阳性血清(1:50倍稀释)，37 °C孵育45 min，PBS洗3遍后，滴加1 mL FITC-羊抗猪IgG (1:500倍稀释)，37 °C孵育45 min；最后加1 mL PBS/甘油封底，倒置荧光显微镜下观察结果。IFA阳性的病毒命名为PCV2-GD-zq株。

1.6 病毒全基因组的扩增及感染性克隆构建

1.6.1 PCV2全基因组序列的扩增：提取第5代感染细胞的基因组DNA为模板，以 $F_{(PCV-EcoR\ I)}$ 、 $R_{(PCV-Sal\ I)}$ 和 $F_{(PCV-Sal\ I)}$ 、 $R_{(PCV-Hind\ III)}$ 为引物，分别扩展PCV2全基因组序列。PCR扩增条件为：94℃ 5 min；94℃ 1 min，48℃ 1 min，72℃ 3 min，共30个循环；72℃ 10 min，最后4℃保存。ORF2基因的PCR扩增条件为：94℃ 5 min；94℃ 1 min，56℃ 1 min，72℃ 1 min，共30个循环；72℃ 10 min。电泳观察结果，用DNA胶纯化回收试剂盒回收凝胶中的DNA。

1.6.2 PCV2感染性克隆的构建：用限制性核酸内切酶 $EcoR\ I$ 和 $Sal\ I$ 酶切由 $F_{(PCV-EcoR\ I)}$ 、 $R_{(PCV-Sal\ I)}$ 为引物获得的PCR产物，将其按常规方法克隆进同酶处理的pUC18质粒中，经酶切鉴定阳性的质粒命名为pPCV2-GD-zq。用 $Sal\ I$ 和 $Hind\ III$ 将由 $F_{(PCV-Sal\ I)}$ 、 $R_{(PCV-Hind\ III)}$ 为引物获得的PCR产物酶切处理后，克隆进同酶处理的pPCV2-GD-zq载体中，通过酶切鉴定筛选阳性重组质粒pPCV2-2GD-zq，并对获得的阳性克隆进行序列测定。

1.7 序列分析和比对

用DNASTar软件对pPCV2-2GD-zq测序结果进行分析，将本研究中分离株的测序结果与GenBank公布的其它5株广东分离株(GD-pz、GD-gj、GD-jm、GD-ss和GD-sz)的核苷酸和氨基酸序列进行比对。

1.8 质粒转染及拯救病毒的检测

1.8.1 重组质粒转染：按照Invitrogen转染试剂盒说明书，将pPCV2-2GD-zq质粒转染无PCV污染的PK-15细胞，并设立空pUC18载体转染对照。在转染后72 h进行拯救病毒检测；同时将部分拯救病毒接种新培养的PK-15细胞并连传3代。

1.8.2 拯救病毒的检测：参照文献[15-16]中的方法，对PK-15转染细胞进行固定、洗涤等处理后，用小鼠抗PCV2 ORF2阳性血清作为一抗，用FITC-羊抗鼠IgG作为二抗，进行间接免疫荧光试验(IFA)检测病毒抗原。

1.9 拯救病毒的生长特性

将来源于pPCV2-2GD-zq质粒转染拯救的病毒

第5代细胞毒做梯度稀释，接种到生长良好的K-15细胞单层上，0.1 mL/孔，从 10^{-2} – 10^{-8} 共7个稀释度，每个稀释度接种4孔，另外设立一组对照。吸附1 h后，弃掉病毒液，加入DMEM维持液，培养72 h，每天注意观察并中途更换营养液一次；72 h后弃去上清液，按1.8.2中描述的方法进行IFA检测，孔内细胞被染成绿色的判为阳性，未被染色的判为阴性。按照Reed-Muench法计算其TCID₅₀。同时取第5代细胞毒DNA，扩增与克隆拯救病毒的全基因组序列，并与1.6.2中的测序结果进行比对。

2 结果与分析

2.1 PCR扩增及分型鉴定结果

以P1、P2作为引物，从送检淋巴结中成功扩增出大小为243 bp的特异性产物，PCR产物经限制性内切酶 $Nco\ I$ 酶切后，出现两种片段，与DL500 marker做比较，大小分别为168 bp和75 bp(图1)，表明病料中含有PCV2，不含PCV1。

2.2 组织传代病毒的间接免疫光试验结果

将盲传5代的淋巴组织分离液接种于PK-15细胞在24孔板中，培养72 h后，用丙酮固定，经PCV2阳性血清、FTTC-羊抗猪IgG作用后，在倒

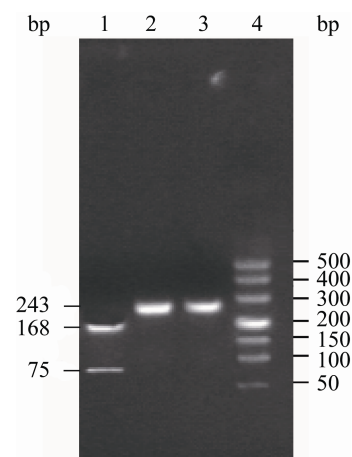


图1 病料组织的PCR鉴定

Figure 1 PCR identification for the PCV2-suspected tissue samples

注：1： $Nco\ I$ 酶切的PCR产物；2、3：PCR产物；4：DL500 marker.

Note: 1: PCR product digested by $Nco\ I$; 2, 3: PCR products; 4: DL500 marker.

置显微镜下观察。结果视野中有 50%以上的细胞呈现特异性荧光,对照细胞无荧光,表明分离的病毒为猪圆环病毒 2 型(图 2)。

2.3 单拷贝和双拷贝PCV2-GD-zq株DNA克隆的鉴定

用限制性核酸内切酶 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切鉴定单拷贝质粒 pPCV2-GD-zq; 用 *Sal* I 和 *Hind* III 酶切鉴定 pPCV2-2GD-zq 质粒。结果 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切 pPCV2-GD-zq 质粒后获得大小分别为 2.7 kb 和 1.7 kb 左右的预期片段; *Sal* I 和 *Hind* III 双酶切 pPCV2-2GD-zq 质粒后获得大小分别为 4.4 kb 和 1.7 kb 左右的预期片段(图 3)。

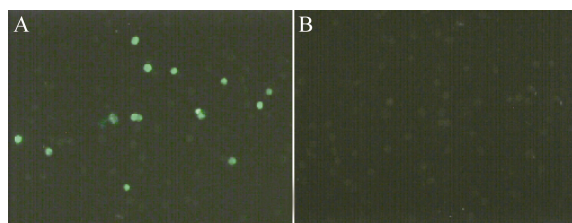


图2 病料传代样品的间接免疫荧光试验结果(100×)

Figure 2 The detection result for PCV2 with IFA (100×)

注: A: 接毒样品; B: 未接毒的对照样品。

Note: A: PK-15 cells infected by the isolate; B: Un-infected PK-15 cells.

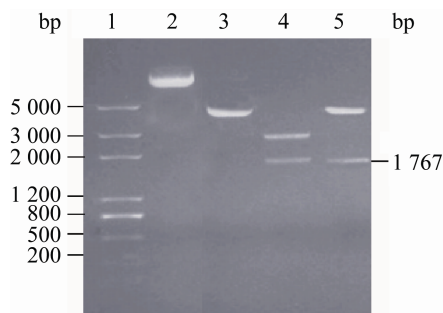


图3 PCV2 重组质粒酶切鉴定图

Figure 3 The restriction enzyme analysis for the recombinants of pPCV2-GD-zq and pPCV2-2GD-zq

注: 1: BM5000 DNA marker; 2: pPCV2-2GD-zq *EcoR* I 酶切; 3: pPCV2-GD-zq *EcoR* I 酶切; 4: pPCV2-GD-zq *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切; 5: pPCV2-2GD-zq *Sal* I 和 *Hind* III 双酶切。

Note: 1: BM5000 DNA marker; 2: pPCV2-2GD-zq digested by *EcoR* I; 3: pPCV2-GD-zq digested by *EcoR* I; 4: pPCV2-GD-zq digested by *EcoR* I and *Sal* I; 5: pPCV2-2GD-zq digested by *Sal* I and *Hind* III.

2.4 序列分析与比对结果

pPCV2-2GD-zq 质粒送上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序验证,结果正确。用 DNASTar 软件将本研究分离和克隆 PCV2-GD-zq 株全基因组序列与 GenBank 公布的其它 5 株广东分离株 (GD-pz、GD-gj、GD-jm、GD-ss 和 GD-sz) 序列进行比较。结果 GD-zq 株 ORF1 与 5 株广东分离株核苷酸一致性在 97.1%–99.7%, 编码氨基酸一致性为 98.7%–100%, 与 GD-ss 株的氨基酸序列完全一致; ORF2 核苷酸一致性为 93.2%–99.6%, 编码氨基酸一致性为 92.3%–99.1%; ORF2 的核苷酸一致性在 93.2%–99.6%, 全基因的一致性在 96.0%–99.6% 之间。全基因组同源性分析结果见图 4。

2.5 GD-zq感染性克隆转染及病毒拯救

将 pPCV2-2GD-zq 质粒转染 PK-15 细胞 72 h 后, 通过 IFA 检测结果显示, 多数转染细胞的胞浆和部分转染细胞的胞浆和胞核中可观察特异性亮绿色荧光, 对照载体质粒转染样品无荧光出现(图 5)。

		Percent identity						Divergence	
		1	2	3	4	5	6		
1			98.4	96.1	98.4	96.3	98.5	1	GD-pz
2	1.7			96.1	98.8	96.1	98.3	2	GD-gj
3	4.0	4.0			95.9	99.6	96.0	3	GD-jm
4	1.6	1.2	4.2			96.2	99.5	4	GD-ss
5	3.8	4.0	0.4	3.9			96.2	5	GD-sz
6	1.5	1.7	4.1	0.5	4.0			6	GD-zq
		1	2	3	4	5	6		

图4 6株 PCV2 广东分离株全基因组序列的核苷酸同源性比较

Figure 4 Identity comparison of the nucleotides of 6 PCV2 isolates

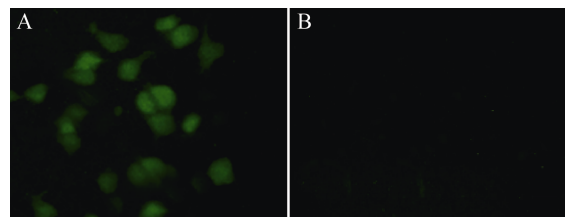


图5 PCV2 拯救病毒的 IFA 检测(400×)

Figure 5 Identification of the infectious DNA clone of PCV2 by IFA (400×)

注: A: pPCV2-2GD-zq 转染拯救的病毒; B: 空载体对照。

Note: A: Transfection of pPCV2-2GD-zq; B: Transfection of pUC18 (control).

2.6 拯救病毒TCID₅₀的测定及序列分析

拯救病毒第5代细胞毒经IFA测定后,其病毒滴度TCID₅₀/0.1 mL为 $10^{-5.0}$,表明拯救PCV2在体外具有良好的增殖能力。序列测定结果与重组质粒pPCV2-2GD-zq测序结果一致性为99.89%,有2个碱基存在差异,分别位于全基因组的第164位(C→A)和第148位(A→G),第164位碱基位于ORF1区,该变异未导致编码氨基酸(Ser)的变化;第148位碱基位于ORF2区,该变异导致相应位置的编码氨基酸由Val突变为Ala。

3 讨论

断奶仔猪多系统衰竭综合症(PMWS)是最近出现的影响世界养猪业的重要传染病之一,PCV2是引起该病的主要致病因子之一。据报道,将PCV2与PRV、PPV、PRRSV等同时感染仔猪,则可复制出典型的PMWS症状^[17-18],临床上出现的PMWS病例,多为PCV2、PPV、PRV及PRRSV的混合感染一株PCV2病毒,并构建了其基因组单拷贝和双拷贝的质粒克隆。

PCV2全基因组序列中含有限制性内切酶Nco I酶切位点而PCV1则没有^[13],PCR产物经过酶切可出现3种情况,若病料中只含有PCV2,酶切结果为2片段(168 bp和75 bp);若病料中只含有PCV1,酶切结果为1片段(大小为243 bp);若酶切结果为3片段(243、168、75 bp);则表示同时含有PCV1和PCV2。本研究中PCR产物经酶切后为2片段(图1),表明病料中只含有PCV2,不含PCV1。

不同PCV2分离株核苷酸的保守性很高,基因组一致性在94%以上,但随着其在猪群中的感染与流行,病毒仍然不断变异而出现新的基因型,生长特性和致病性也存在一定差异^[19-22]。在感染性DNA克隆的构建中,扩增序列与模板序列的高度一致性是保证拯救病毒的感染性及其复制酶功能的关键因素。在PCR扩增过程中,采用了高效高保真酶,保证了病毒全基因组扩增产物与模板序列的一致。pPCV2-2GD-zq质粒测序与GenBank公布的其它5株广东分离株基因组序列进行比较,结果

一致性介于96.0%–99.6%之间,显示了GD-zq株与其它5株广东分离株序列的高度同源性。进一步对ORF1和ORF2进行序列比对发现,ORF1与其它分离株一致性在97.1%–99.7%,ORF2的一致性在93.2%–99.6%,表明ORF2的变异略高于ORF1。而氨基酸同源分析结果进一步证实了分离株的ORF1与其它5株广东分离株的一致性更高,甚至达到完全一致(与GD-ss株),但是ORF2在氨基酸水平上的一致性却低于核苷酸的一致性,与GD-jm株的一致性仅92.3%。上述研究结果充分表明,PCV2毒株间的变异主要集中在ORF2区,为进一步研究本分离株感染性克隆的功能确定了候选位点。

GD-zq株拯救病毒基因组与pPCV2-2GD-zq质粒测序结果一致性为99.89%,全长1767个碱基中只有2个碱基序列有差异,该差异分别存在于ORF1和ORF2基因序列中,但仅ORF2中存在的差异导致其编码氨基酸发生变化。由Val突变成Ala。至于该差异是由拯救病毒自身发生的变异,还是序列测定本身导致的变异仍不得而知,但测序结果的高度同源性证实了拯救病毒的稳定性。

Fenaux等较早报道含有PCV2全基因组的DNA分子克隆对病毒的自然宿主具有感染性,由于PCV2全基因组很小,PCV2感染性DNA克隆成为PCV2相关研究的重要载体。构建PCV2感染性DNA克隆的方法,国外主要采用双拷贝基因组策略。双拷贝形式PCV2 DNA克隆的感染性明显强于单拷贝形式的PCV2 DNA克隆,拯救病毒的增殖滴度接近其亲本病毒^[12]。双拷贝PCV2 DNA克隆的感染性明显强于单拷贝克隆,与PCV2的基因组结构特点及其独特的复制机制有关^[11]。由于PCV2全基因组呈闭环状,而其PCR产物呈线性状,将线性状的单个PCV2全基因组产物连接到载体上构建的DNA分子克隆而获得的病毒全基因组是不连续的,但将2个PCV2全基因组克隆产物以顺式串联形式连接到载体上便形成了一个连续的全基因组。由于PCV2采用滚环复制方式,含有连续的病毒全基因组的双拷贝PCV2 DNA克隆更接近自然PCV2毒株全基因组形式,从而明显增强了

感染性。在此背景下,本文采用将 PCV2 广东分离株 GD-zq 全基因组串联克隆进 pUC18 载体中,并成功拯救出具有良好复制能力的病毒,为下一步对其进行功能研究提供了物质基础。

参 考 文 献

- [1] Tischer I, Gelderhlom H, Vettermann W, et al. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA[J]. *Nature*, 1982, 295(5844): 64-66.
- [2] Hamel AL, Lin LL, Nayar GPS. Nucleotide sequence of the porcine circovirus associated with post weaning multisystemic wasting syndrome in pigs[J]. *Journal of Virology*, 1998, 72(6): 5262-5267.
- [3] Allan GM, Meehan B, Todd D, et al. Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes[J]. *Veterinary Record*, 1998, 142(17): 467-468.
- [4] Bolin SR, Stoffregen WC, Nayar GP. Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inclusion of cesarean-derived, colostrums-deprived piglets with type 2 porcine circovirus[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2001, 13(3): 185-194.
- [5] Opriessnig T, Meng XJ, Halbur PG. Porcine circoviruses type 2-associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2007, 19: 591-615.
- [6] Walker IW, Konoby CA, Jewhurst VA, et al. Development and application of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to porcine circovirus type 2[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2000, 12(4): 400-405.
- [7] Kennedy S, Moffett D, Mcneilly F, et al. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus[J]. *Journal of Comparative Pathology*, 2000, 122(1): 9-24.
- [8] Segalés J, Allan GM, Domingo M. Porcine circovirus diseases[J]. *Animal Health Research Reviews*, 2005, 6(2): 119-142.
- [9] Mankert A, Caliskan R, Hattermann K, et al. Molecular biology of *Porcine circovirus*: analyses of gene expression and viral replication[J]. *Veterinary Microbiology*, 2004, 98(2): 81-88.
- [10] Liu J, Zhu Y, Chen I, et al. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 interacts porcine ubiquitin E3 ligase Pirh2 and facilitates p53 expression in viral infection[J]. *Journal of Virology*, 2007, 81(17): 9560-9567.
- [11] Cheung AK. Rolling-circle replication of an animal circovirus genome in a theta-replicating bacterial plasmid in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(17): 86-94.
- [12] Fenaux M, Opriessnig T, Halbur PG, 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]. *Journal of Virology*, 2002, 76(2): 541-551.
- [13] Fenaux M, Halbur PG, Gill M, et al. Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction PCV-1 and PCV-2[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38(7): 2494-2503.
- [14] 吴星星. 猪圆环病毒2型新疆株的分离鉴定及感染性克隆的构建[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学硕士学位论文, 2012.
- [15] 邵小雪, 周双海, 谢俊岭, 等. 猪圆环病毒1型感染性克隆的构建[J]. *中国兽医科学*, 2011, 41(2): 148-151.
- [16] 谢俊岭, 邵小雪, 孟凡伟, 等. 猪圆环病毒 II 型感染性 DNA 克隆的构建[J]. *中国农学通报*, 2012, 28(32): 84-88.
- [17] Ellis JA, Bratanich A, Clark EG, et al. Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2000, 12(1): 21-27.
- [18] Sirinarumitr T, Sorden SD, Morozov I, et al. Double *in situ* by hybridization for simultaneous detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and porcine circovirus (PCV)[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2001, 13(1): 68-71.
- [19] Kim HH, Park SI, Hyun BH, et al. Genetic diversity of porcine circovirus type 2 in Korean pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome during 2005-2007[J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2009, 71(3): 349-353.
- [20] Cortey M, Pileri E, Sibila M, et al. Genotypic shift of porcine circovirus type 2 from PCV-2a to PCV-2b in Spain from 1985 to 2008[J]. *Veterinary Journal*, 2011, 187(3): 363-368.
- [21] Harding JC, Ellis JA, McIntosh KA, et al. Dual heterologous porcine circovirus genogroup 2a/2b infection induces severe disease in germ-free pigs[J]. *Veterinary Microbiology*, 2010, 145(3/4): 209-219.
- [22] 杨芳, 陈立功, 李艳琴, 等. 猪圆环病毒 II 型 SD/2008株对仔猪的致病性[J]. *中国兽医学报*, 2013, 33(4): 538-565.