

## 3 种亚群 PCV-2 感染性克隆的构建及体内外感染性

李薇, 罗维, 余兴龙\*, 李润成, 白霞, 葛猛, 王亚, 向卫军, 李晶

(湖南农业大学 动物医学院, 湖南 长沙 410128)

**摘要:** 通过PCR扩增出猪圆环病毒2(PCV-2) 3个亚群(1A、1B、1C)毒株的全基因组DNA序列,并分别克隆入pMD-18T载体,获得含有PCV-2全基因组的3个重组质粒,分别命名为RP8(1A)、P0(1B)和P4-1(1C)。将3个重组质粒分别用Sac II 切出1 767 bp的PCV-2全基因组,并在体外分别用T4连接酶连接而环化。用脂质体将3种自身环化的基因组转染无PCV-1污染的PK-15细胞,并按常规病毒培养方法分别传代,第5代细胞培养物分别用间接免疫荧光试验(IFA)及PCR方法检测转染的细胞,检测结果均为阳性,说明已获得PCV-2共3个亚群1A、1B、1C的感染性克隆。用1A、1B、1C感染性克隆的第5代细胞培养物分别接种小鼠,可在接种小鼠的血液中分别检测到相应PCV-2亚型的基因组DNA,表明本试验构建的自身环化的1A、1B、1C亚型的PCV-2的全基因组DNA在体内、体外均具有感染性。

**关键词:** 猪圆环病毒2;感染性克隆;基因亚群;毒力

中图分类号: S855.3 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)01-0068-05

## Construction of an infectious molecular clone of three kinds of subgroups of PCV-2 and its *in vitro* and *in vivo* experimental infection

LI Wei, LUO Wei, YU Xing-long\*, LI Run-cheng, BAI Xia, GE Meng, WANG Ya, XIANG Wei-jun, LI Jing

(College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

**Abstract:** The complete genome of three subgroups(1A, 1B, 1C) of porcine circovirus 2 (PCV-2)was amplified by polymerase chain reaction(PCR) and cloned directly into plasmid pMD-18T, and recombinant plasmid carrying the complete genome was constructed, designated RP8(1A), P0(1B), P4-1(1C) respectively. The three entire genomes of PCV-2 were purified and recycled from recombinant pMD-18T with the digestion of Sac II enzyme and then circular genomic DNA were generated by self- ligating with T4 DNA ligase *in vitro*, resulting in three circular virus genome. The PCV1-free PK-15 cells were transfected with the PCV-2 circular genome using lipofectin reagent. At the fifth passages, PCV-2 virus and specific antigens could be detected by PCR and indirect immunofluorescent assay(IFA).Mice were inoculated with the cell cultures which were passed 5 times, the blood samples were collected 5 d after inoculation, the PCV-2 genomes were confirmed by PCR. The results indicate that the cloned circular PCV-2 genomic DNA is infectious both *in vitro* and *in vivo*, which will provide good foundation for further study of the relationship between different genotype PCV-2 strains and their virulence.

**Key words:** porcine circovirus 2; infectious molecular clone; subgroups; virulence

猪圆环病毒(Porcine Circovirus, PCV)为小型、病毒属, PCV 包括圆环病毒 1(PCV-1)和圆环病毒 2(PCV-2)2 种病毒,其中 PCV-1 对猪无致病力,而环状双义单链 DNA 病毒,属于圆环病毒科,圆环

收稿日期: 2010-04-20

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30571390; 30972167)

作者简介: 李薇(1984—),女,湖南湘潭人,硕士,从事病原分子生物学及免疫学研究, liwei0097@163.com; \*通信作者, xlyu999@yahoo.com.cn

PCV-2 与猪的多种疾病有关,如断奶仔猪多系统衰竭综合症(PMWS)和皮炎肾病综合症(PDNS)及 PCV-2 相关性猪呼吸道疾病综合症、繁殖障碍、增生性肠炎等,这些病统称为猪圆环病毒病(PCVD)。根据基因组的同源性分析,PCV-2 可分成 2 个基因群,即 1 群(1 767 bp)和 2 群(1 768 bp)。1 群 PCV2 又可分为 1A、1B、1C 共 3 个亚群(以上简称“三个亚群”);2 群 PCV2 又可分为 2A、2B、2C、2D、2E 共 5 个亚群<sup>[1-2]</sup>。2004 年,加拿大东部地区猪群中 PCVD 危害明显加重,这与当地出现了 1 群 PCV-2 的毒株有关<sup>[2]</sup>,类似的情况也见于美国和欧洲<sup>[3]</sup>。Grau-Roma 等<sup>[4]</sup>发现所有的 1 群 PCV-2 毒株全部来自发生 PMWS 的猪场,而从无 PMWS 的猪场中只能分离到 2 群 PCV-2,也表明 1 群 PCV-2 比 2 群 PCV-2 致病性可能更强。Opriessnig 等<sup>[5]</sup>发现不同 PCV-2 分离株间也存在毒力差异,这可能是感染 PCV-2 的猪不发病现象普遍存在的原因,提示应从不同基因群内各亚群上来研究毒株与毒力的关系。临床上,同一猪体内可以同时感染多种不同基因群或基因亚群的 PCV-2 毒株<sup>[1,4,6]</sup>,从而使研究毒株与毒力之间的关系变得更加复杂。笔者构建了 1 群 PCV-2 共 3 种基因亚群 1A、1B 和 1C 的感染性克隆,以便更好地研究 1 群 PCV-2 不同毒株与毒力的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 病料和细胞及小鼠

含 1B PCV-2 的病料来源于湖南邵阳某猪场疑似 PMWS 样品;含 1A 和 1C PCV-2 的病料从疑似 PMWS 病料在小鼠上传代获得;无 PCV-1 的 PK-15 细胞由中国农业大学杨汉春教授惠赠<sup>[7]</sup>;20 g 左右的昆明小鼠购自湖南省疾病控制中心。

#### 1.1.2 主要试剂及培养基

Taq plus DNA 聚合酶、Taq 酶、琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒分别购自天为时代生物有限公司;DL2000 DNA Marker、 $T_4$  连接酶、限制酶 *Sac II*、pMD-18T 试剂盒为 TaKaRa 公司产品;其他化学试剂均为国产分析纯。

MEM 培养基、新生犊牛血清、谷氨酰胺为 GIBCO 产品;羊抗鼠荧光二抗产品均购自 Sigma 公司;Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 引物的设计与合成

借助 DNASTar,将 GenBank 上已登录的 PCV-2 基因组序列作同源性比较后,设计并合成 PCV-2 引物(表 1),表 1 中 Fp1 及 Rp1 引物均包含基因组中 491 nt 处唯一的 *Sac II* 限制酶切序列,用下划线标示。

表 1 PCV-2 引物

Table 1 Primers of PCV-2

引物	序列	扩增长度/ bp	位置
Fp1	5'- <u>CCGCGGGCTGGCTGAAC</u> TTTTGAAAG-3'	491 ~ 516	扩增 PCV-2 全长基因组 1 767 bp
Rp1	5'- <u>CCGCGGAAATTCTGACAAAC</u> GTTAC-3'	471 ~ 496	
Fp2	5'-ACCAGCGCACTTCGGCAGCGGCAG-3'	1 ~ 24	扩增 PCV-2 基因组 500 bp
Rp2	5'-CCGCGGAAATTCTGACAAACGTTAC-3'	471 ~ 496	
1AFp	5'-ATTTTGTGAAGAAGCAGACT-3'	238 ~ 257	扩增 1A 亚群 140 bp 左右片段
1ARp	5'-TAGGAGCTCCACACTCC-3'	364 ~ 381	
1BFp	5'-GGAGCTTCCAATCTCCCTT-3'	148 ~ 167	扩增 1B 亚群 230 bp 左右片段
1BRp	5'-TAGGAGCTCCACATTCC-3'	364 ~ 381	
1CFp	5'-GGTTGGAAGTAATCGATTGTC-3'	1 210 ~ 1 231	扩增 1C 亚群 560 bp 左右片段
1CRp	5'-AATACTTACAGCGCACTTCTTTCG-3'	1 756 ~ 1 767	

#### 1.2.2 3 个亚群 PCV-2 全基因组的 PCR 扩增

适量含 1A、1B、1C 共 3 种亚群毒株的病料匀浆后,按蛋白酶 K、酚、氯仿抽提方法提取基因组,

用 PCV-2 基因组全长引物 Fp1 和 Rp1 扩增 PCV-2 全长基因组,PCR 反应程序为:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,68℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 90 s,30 个循环,72℃ 延伸 7 min,最后用 1%的琼脂糖凝胶

电泳鉴定。

### 1.2.3 PCR 扩增产物的克隆与鉴定

PCR 产物用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收后,与 pMD-18T 载体连接,转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞。用 PCR 方法鉴定重组菌落,并将阳性菌落接种到 LB 液体培养基培养过夜,菌液送英韦创津公司进行基因测序。

### 1.2.4 3 个亚群 PCV-2 基因组转染 PK-15 细胞

用碱裂解法大量提取测序正确的阳性重组质粒,用 *Sac* II 限制酶切出 PCV-2 全长基因序列,将此序列回收后再用 *T<sub>4</sub>* 连接酶 16 °C 连接过夜,让其自身连接,回收连接产物,并用核酸蛋白定量仪测定其核酸含量,连接产物分别命名为 icRP8(1A)、icP0(1B)、icP4-1(1C)。待 PK-15 细胞生长至 90% 满度,采用 Invitrogen 公司的 Lipofectamine 2000 将上述 3 种连接物分别转染 PK-15 细胞,转染过程参照其产品说明书。

### 1.2.5 感染性克隆在 PK-15 细胞上传代及体外感染性的测定

转染的 1A、1B、1C 亚群感染性克隆分别在 PK-15 细胞上盲传至第 5 代,按常规法提取基因组后,用 PCV-2 全长引物 Fp1 和 Rp1 扩增 PCV-2,并直接取 PCR 产物送英韦创津公司测序分析。用胰酶消化培养 72 h 第 5 代的细胞,滴加到带圆孔镀膜载玻片上的圆孔中,并在 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 条件下继续培养 4~5 h,待其贴壁,之后甩掉培养液,用 PBS 洗涤,80% 的冷丙酮 4 °C 固定 30 min,甩掉固定液,风干干燥,后加 1:20 稀释的抗 PCV-2 的鼠高免血清<sup>[8]</sup>,37 °C 作用 1 h, PBS 泡洗后,再滴加 0.01% 伊文斯兰 1:64 倍稀释的羊抗鼠荧光抗体,37 °C 作用 1 h, PBS 泡洗 3 次,干燥后滴加 50% 甘油磷酸缓冲液,置 OLYMPUS BX51 荧光显微镜下观察。

### 1.2.6 PCV-2 感染性克隆体内感染性的测定

取 20 g 左右的昆明小鼠,分 4 组,每组 6 只。第 1 组至第 3 组分别接种 1A、1B、1C 亚群感染性克隆的第 5 代细胞培养物。第 4 组接种正常的 PK-15 细胞培养物。接种方式均为腹腔注射结合滴鼻。在接种后第 5 天分别尾静脉取血,提取血液中的总 DNA,用

PCV-2 检测性引物检测 PCV-2,用 PCV2 1A、1B、1C 亚型的特异性引物进一步检测 3 种亚型。

## 2 结果与分析

### 2.1 3 个亚群 PCV-2 全长基因组的克隆

由琼脂糖凝胶电泳结果可以看出,用 PCR 方法,从病料中扩增出了预期大小的 1.8 kb 左右的 DNA 片段。此片段与 pMD-18T 载体连接后,经 PCR 鉴定后获得的重组质粒分别命名为 RP8、P0 和 P4-1 (GenBank 登录号分别为 FJ716704、EU095020、FJ667588)。同源性分析表明,RP8 代表的 PCV-2 序列属于 PCV-2 中的 1A 亚群序列,P0 为 PCV-2 1B 亚群,P4-1 为 PCV-2 1C 亚群序列。

### 2.2 3 个亚群感染性克隆的构建

1A、1B、1C 亚群的重组质粒用 *Sac* II 限制酶均能成功切出 1 800 bp 的 PCV-2 基因片段,构建的感染性克隆转染的细胞分别连续盲传 5 次后,经 PCR 检测,用引物 Fp1 和 Rp1 分别扩增出了 1 800 bp 的 PCV-2 目的片段。用间接免疫荧光检测转染的第 5 代细胞(图 1),可见荧光主要分布在细胞质中,没有 PCV-2 感染的细胞呈红色。PCR 结果和免疫荧光结果表明感染性克隆构建成功,已经产生出子代 PCV-2。

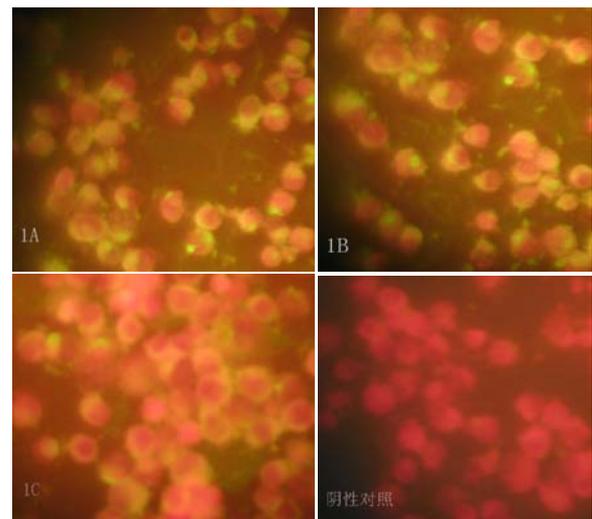
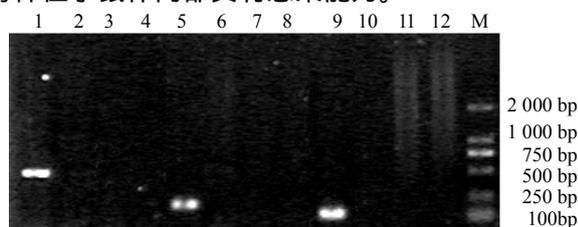


图 1 3 个亚群 PCV-2 感染性克隆免疫荧光结果 (40×0.75)  
Fig.1 IFA results of an infectious molecular clones of three subgroups of PCV-2 (40×0.75)

### 2.3 3 个亚群感染性克隆的体内感染性

将 1A、1B、1C 感染性克隆的细胞培养物分别接种 3 组小鼠后,用引物 Fp2 和 Rp2 进行 PCR 扩增,分别能从 3 组小鼠中检测到 500 bp 左右的 PCV-2 特异性片段,而对照组没有。用 PCV-2 亚型特异引物扩增,接种 PCV-2 RP8 第 1 组老鼠只能用 1A 型引物扩增出 140 bp 左右的特异条带,接种 P0 的第 2 组老鼠只能用 1B 型引物扩增出 230 bp 左右的特异条带,接种 P4-1 的第 3 组老鼠只能用 1C 型引物扩增出 560 bp 左右的特异条带(图 2),但是接种小鼠不表现任何临床症状。PCR 结果表明,构建的 1A、1B、1C 亚群的感染性克隆,即 RP8、P0 和 P4-1 毒株在小鼠体内都具有感染能力。



1、2、3 分别为 1C 引物对第 3、第 1、第 2 组小鼠的 PCR 检测; 4 为 1C 引物 PCR 检测的阴性对照; 5、6、7 分别为 1B 引物对第 2、第 1、第 3 组小鼠的 PCR 检测; 8 为 1B 引物 PCR 检测的阴性对照; 9、10、11 分别为 1A 引物对第 1、第 2、第 3 组小鼠的 PCR 检测; 12 为 1A 引物 PCR 检测的阴性对照; M 为 DNA Marker DL 2000。

图 2 PCV-2 的 3 个亚群特异性引物小鼠内 PCR 检测结果  
Fig.2 PCR amplification result of three subgroups of PCV-2 in mice using specific subgroup primers

### 3 结论与讨论

将获得的 1A、1B、1C 亚群毒株的基因组通过酶切自身连接环化的方法分别构建成不同的感染性克隆,转染 PK-15 细胞并传代,PCR 与 IFA 检测均证明构建的 1A、1B、1C 感染性克隆在体外均具有感染性。为进一步研究 1A、1B、1C 感染性克隆在体外的感染性,分别将 1A、1B、1C 感染性克隆的细胞培养物接种小鼠,并采取滴鼻与腹腔注射结合的接种方式,以确保病毒能接到小鼠体内。PCR 检测证明 1A、1B、1C 感染性克隆在小鼠体内也具有感染性。

越来越多的资料支持 1 群 PCV-2 是毒力更强的毒株<sup>[3,4,9-12]</sup>的观点。1 群 PCV-2 的不同亚群间是否

存在着毒力的差异,还有待研究。从病猪体内分离的病毒,往往是多种 PCV-2 毒株的混合物,不利于弄清不同类型 PCV-2 与毒力的关系。2000 年 Fenaux 等<sup>[13]</sup>首次报道利用感染性分子克隆接种 SPF 猪,并复制出 PCV-2 典型的临床症状和病理变化。Opriessnig 等<sup>[1]</sup>构建了 2 个可引起感染猪不同临床症状的 PCV-2 毒株的感染性克隆,因此,可构建不同类型毒株的感染性克隆来研究其与毒力的关系。

从病料中克隆的 3 个 PCV-2 全基因经测序分析,分别属于 PCV-2 的 1A、1B、1C 亚群,其中 1B 亚群分离自湖南邵阳某猪场疑似 PMWS 猪淋巴组织,1A、1C 亚群则是将该疑似 PMWS 猪病料接种小鼠并在小鼠体内传代获得的,将在小鼠内获得的毒株序列与 GenBank 收录的所有 PCV-2 序列进行同源性比较,发现很多 PCV-2 序列与本试验小鼠内获得序列的同源性在 99% 以上,表明在传代小鼠体内获得的毒株也普遍存在于猪群中,后来经检测,在原始病料中即含有同样的 1A 与 1C 亚型病毒。

### 参考文献:

- [1] Opriessnig T, McKeown N E, Zhou E M, et al. Genetic and experimental comparison of porcine circovirus type 2 (PCV-2) isolates from cases with and without PCV-2-associated lesions provides evidence for differences in virulence[J]. J Gen Virol, 2006, 87: 2923-2932.
- [2] Delay J, McEwen B, Carman S, et al. Porcine circovirus type 2-associated disease is increasing[J]. AHL Newsletter, 2005(9): 22.
- [3] Dupont K, Nielsen E O, Baekbo P, et al. Genomic analysis of PCV-2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time[J]. Veterinary Microbiology, 2008, 128: 56-64.
- [4] Grau-Roma L, Crisci E, Sibila M, et al. A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence[J]. Vet Microbiol, 2008, 128: 23-35.
- [5] Opriessnig T, Ramamoorthy S, Madson DM, et al. Differences in virulence among porcine circovirus type 2 isolates are unrelated to cluster type 2a or 2b and prior infection provides heterologous protection[J]. Journal of

- General Virology, 2008, 89: 2482–2491.
- [6] Lefebvre D J, Costers S, Van Doorselaere J, et al. Antigenic differences among porcine circovirus type 2 strains, as demonstrated by the use of monoclonal antibodies [J]. Journal of General Virology, 2008, 89: 177–187.
- [7] 王芳, 盖新娜, 郭鑫. 猪圆环病毒 2 型 BF 株感染性分子克隆系列突变株的构建[J]. 中国兽医杂志, 2007, 43(12): 17–19.
- [8] 侯强红, 余兴龙, 李薇. 猪圆环病毒 2 群 Cap 蛋白部分基因序列与大肠杆菌 LTB 成熟肽基因的融合表达及免疫原性研究[J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(11): 847–851.
- [9] Carman S, Cai H Y, Delay J, et al. The emergence of a new strain of porcine circovirus-2 in Ontario and Quebec swine and its association with severe porcine circovirus associated disease-2004-2006[J]. Canadian Journal of Veterinary Research, 2008, 72: 259–268.
- [10] Olvera A, Cortey M. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: Phylogeny and clonality[J]. Virology, 2007, 357: 175–185.
- [11] Cheung A K, Bolin S R. Kinetics of porcine circovirus type 2 replication[J]. Arch Virol, 2002, 147: 43–58.
- [12] Meerts P, Misinzo G, McNeilly F, et al. Replication kinetics of different porcine circovirus 2 strains in PK-15 cells, fetal cardiomyocytes and macrophages[J]. Arch Virol, 2005, 150: 427–441.
- [13] Fenaux M, Halbur P G, 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]. Journal of Virology, 2002 (6): 541–551.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 罗文翠