

## 病料中猪圆环病毒(PCV)的分型检测及 PCV2 型不同毒株的培养

罗维, 赵墩, 王湘, 吴海超, 蒋大良, 余兴龙\*

(湖南农业大学动物医学院, 湖南 长沙 410128)

**摘要:**对湖南各地区送检猪病料进行了猪圆环病毒(PCV)的 PCR 检测, 并对 PCV 阳性病料的 DNA 进行了猪圆环病毒 1(PCV1)与 PCV2 的 PCR 分型检测。结果表明:送检的 192 份样品中, 有 117 份为 PCV 阳性; 117 份 PCV 阳性样品全部含有 PCV2 的 DNA, 其中 2 份既有 PCV2 也有 PCV1 的 DNA。对病料中的 PCV2 进行克隆, 获得的序列均为 PCV2-1 基因组, 对其中 2 株毒株的序列进行感染性克隆病毒的构建, 拯救的病毒命名为 PCV2(2-1)和 PCV2(4-1); 对 PCV2(2-1)和 PCV2(4-1)进行培养, 结果 2 株病毒均可以在换液维持的细胞中有效的复制。

**关键词:**猪圆环病毒 2; 分型; 感染性克隆; 毒株; 复制

中图分类号: S852.65<sup>+</sup>9.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2013)06-0626-05

### Type differentiation of porcine circovirus from tissues of sick pigs and replication characteristics of different strains of PCV2

LUO Wei, ZHAO Dun, WANG Xiang, WU Hai-chao, JIANG Da-liang, YU Xing-long\*

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

**Abstract:** PCR was conducted on tissues of pigs suspected to suffer from PCV2-associated diseases, and differentiation PCR for PCV1 and PCV2 was conducted on PCV positive samples. The results showed that 117 out of the 192 tissue samples were PCV positive, all of which harbored PCV2 genome, two of which harbored PCV1 simultaneously. PCV2 were cloned from the samples only harbored PCV2, and the sequences obtained all belonged to PCV2-1. Infectious clone viruses were constructed using two of these sequences, and the rescued viruses were named PCV2(2-1) and PCV2(4-1). Cultivation of these viruses showed that they replicated efficiently in cells maintained by alteration of culture medium.

**Key words:** porcine circovirus 2; type differentiation; infectious clone; virus; replication

猪圆环病毒 1 型(PCV1)和猪圆环病毒 2 型(PCV2)是感染猪群的 2 种病毒。在 1998 年分离到 PCV2 之前, 不致病的 PCV1 在猪群的感染非常普遍<sup>[1-2]</sup>; 在 PCV2 出现之后, PCV2 在世界各地的猪群的感染比较普遍, 而 PCV1 在猪群的检出率并不高<sup>[3-4]</sup>。PCV2 与断奶后多系统衰竭综合症等疾病相关, 根据全基因组的差异, PCV2 分为 3 个基因群:

基因 1 群、基因 2 群和基因 3 群。基因 3 群仅在瑞典发现过<sup>[5-6]</sup>。基因 1 群, 又称为 PCV2-1 或 PCV2b, 是 PCV2 的优势基因群<sup>[7-8]</sup>。本文将基因 1 群和基因 2 群病毒分别称为 PCV2-1 和 PCV2-2。PCV2-1 又可以分为 A、B、C 亚簇<sup>[5]</sup>。笔者之前对 PCV2-1 中的 B 亚簇毒株(PCV2-1B)进行了培养特性的研究<sup>[9]</sup>。笔者对猪病料进行 PCR 分型检测, 旨在从 PCV 阳

收稿日期: 2013-11-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(30571390)

作者简介: 罗维(1982—), 女, 湖南沅江人, 博士研究生, 主要从事动物疾病发病机理及防控研究, ms.luowei@163.com; \*通信作者, xlyu999@126.com

性病料中获得 PCV2 不同毒株的基因组,并构建感染性克隆病毒,以研究除 PCV2-1B 毒株之外的其他 PCV2 毒株的培养特征。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 供试病料、质粒、菌株、细胞

192 份猪病料为 2007—2009 年从湖南省各地送检的样品。p0 质粒(含 PCV2-1B 基因组,GenBank 登录号为 EU095020)<sup>[10]</sup>,pMD-18T(PCV1)质粒(含 PCV1 基因组,GenBank 登录号为 KC990120),猪伪狂犬病毒、猪瘟病毒阳性 DNA、*E.coli* DH5a 感受态细胞,由湖南农业大学分子与免疫学实验室构建或保存;PK15(A10)细胞<sup>[11]</sup>,维持培养在含 2%血清的 RPMI 1640 培养基中,传代时用含 6%血清的 RPMI 1640。

#### 1.1.2 主要试剂

*Taq* 酶、*Taq* Plus DNA 聚合酶、*Trans* II 2K<sup>TM</sup> Plus DNA Marker、*Trans* 2K<sup>TM</sup> Plus DNA Marker、琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自北京全式金生物科技有限公司;dNTPs、DL 2000 DNA Marker、*T<sub>4</sub>* 连接酶、限制酶 *Sac* II、pMD-18T simple、病毒 DNA 提取试剂盒购自天泽恩公司;RPMI-1640 细胞培养基、10×胰酶、新生牛血清为 Gibco 公司产品;Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。其他试剂均为国产,分析纯。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 送检病料的 DNA 提取

用酚、氯仿-蛋白酶 K 消化法<sup>[12]</sup>提取病料的 DNA,每个样品均取 300 μL 进行 DNA 的提取,获得的 DNA 沉淀均用 300 μL 水悬浮。

#### 1.2.2 PCV 基因组的检测及分型

用引物 PCVFP1-24(5'-ACCAGCGCACTTCG GCAGCGGCAG-3')、PCVRP774-97(5'-GCGGGCC AAAAAAGGTACAGTTCC-3')<sup>[10]</sup>对病料进行 PCV

的检测。PCR 反应体系和扩增程序见文献<sup>[11]</sup>。

下载 GenBank 中收录的 PCV1 和 PCV2 的序列,进行同源性比对,根据 2 种病毒基因组序列的保守区域设计 2 对引物。一对用于检测 PCV1,上游引物 PCV1Fp1148-1170 的序列为 5'-GGTGTGGGTAT TTAAATGGAGCC-3',下游引物 PCV1Rp1432-1456 的序列为 5'-CTACCCCTACCTTTCCAATACTACC -3',预期扩增片段为 309 bp;另一对用于检测 PCV2,上游引物 PCV2 Fp937-956 的序列为 5'-GCC AGTTCGTCACCCTTTCC-3',下游引物 PCV2 Rp1579-1600 的序列为 5'-AACACCCGCCTCTCCC GCACC-3',预期扩增片段大小为 664 bp。

用检测 PCV1 的引物,分别以 p0 和 pMD-18T (PCV1)为模板进行 PCR,以测定 PCV1 引物的特异性。PCR 反应体系为 H<sub>2</sub>O 35.5 μL,10×PCR Buffer 5 μL,2.5 mmol/L dNTPs 2 μL,PCV1Fp1148-1170 (25 μmol/L) 1 μL,PCV1Rp1432-1456 (25 μmol/L) 1 μL,*Taq* 酶(5 U/μL) 0.5 μL,DNA 1 μL。PCR 反应程序为 95 °C 预变性 5 min→(94 °C 变性 30 s,63 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s) 30 个循环→72 °C 总延伸 7 min。用检测 PCV2 的引物,分别以 p0 和 pMD-18T(PCV1)为模板进行 PCR,以测定 PCV2 引物的特异性,PCR 反应体系同上,将引物改为 PCV2 Fp937-956 和 PCV2Rp1579-1600,PCR 反应程序同上,将退火温度改为 59 °C。以 p0 和 pMD-18T(PCV1)为模板,同时用 PCV1 和 PCV2 的引物进行 PCR。PCR 反应体系为 H<sub>2</sub>O 30.5 μL,10×PCR Buffer 5 μL,2.5 mmol/L dNTPs 2 μL,PCV1Fp1148-1170 (25 μmol/L) 和 PCV2 Fp937-956 各 1 μL,PCV1Rp1432-1456 (25 μmol/L)和 PCV2Rp1579-1600 各 1 μL,*Taq* 酶 (5 U/μL) 0.5 μL,p0 和 pMD-18T(PCV1)各 1 μL。PCR 反应程序同上,调整退火温度,以建立同时检测 PCV1 和 PCV2 的二重 PCR。

用建立的二重 PCR 对以上检测为 PCV 阳性的样品进行 PCR 检测,并挑阳性 PCR 产物送测序。

#### 1.2.3 PCV2 基因组的 TA 克隆

用引物对 Fp491-6(5'-CCGCGGGCTGGCTGA

ACTTTTGAAAG-3'), Rp471-6(5'-CCGCGGAAATTTCTGACAAACGTTAC-3'), 从 PCV2 阳性病料 DNA 中扩增 PCV2 的全长基因组, 具体方法见文献[10]。扩增产物用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收, 连接 pMD-18Tsimple 载体, 转化 *E.coli* DH5a 感受态细胞。用 Fp491-6 和 Rp471-6 引物对转化子进行 PCR 检测, 用质粒提取试剂盒对 PCV2 阳性转化子进行质粒提取, 并送英韦创津公司进行测序。

#### 1.2.4 PCV2 感染性克隆的构建及培养

对测序正确的序列进行基因进化分析, 并选取其中 2 个序列, 将序列自身环化的产物用 Lipofectamine 2000 试剂盒转染 PK15(A10)细胞, 具体步骤见文献[10]。用异步接毒法<sup>[11]</sup>, 将转染物于新的 PK15(A10)细胞上冻融传代 3 次, 获得的病毒液用于接种新的 PK15(A10)细胞, 待细胞长满后, 进行换液维持培养<sup>[11]</sup>, 隔天收集感染细胞的培养液。

收集的感染细胞培养液样品, 均取 200  $\mu$ L 用 DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取, 获得的 DNA 用 200  $\mu$ L 水溶解。用引物 Fp491-6/Rp471-6 对提取的 DNA 进行 PCR 检测<sup>[11]</sup>。

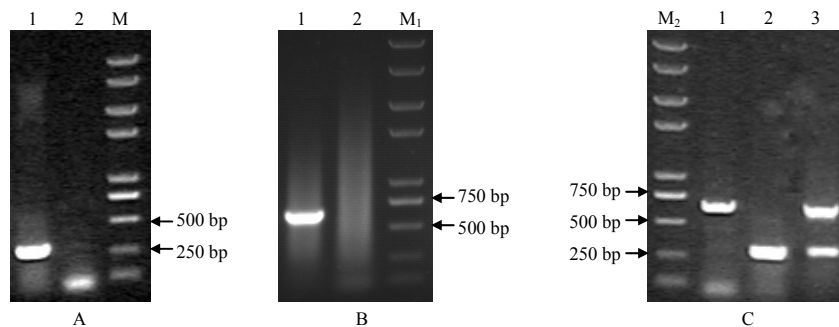


图 2 PCV1 和 PCV2 的鉴别 PCR 检测结果  
A 中 M 为 Trans 2K<sup>TM</sup> Plus DNA Marker, 1~2 均为以 PCV1 特异性引物进行的 PCR, 1 的模板为含 PCV1 基因组的质粒, 2 的模板为含 PCV2 基因组的质粒; B 中 M<sub>1</sub> 为 Trans II 2K<sup>TM</sup> Plus DNA Marker, 1~2 均为以 PCV2 特异性引物进行的 PCR, 1 的模板为含 PCV2 基因组的质粒, 2 的模板为含 PCV1 基因组的质粒; C 中 M<sub>2</sub> 为 Trans II 2K<sup>TM</sup> Plus DNA Marker, 1~3 均为以含 PCV1 基因组的质粒和含 PCV2 基因组的质粒为模板进行的 PCR, 1 为用 PCV2 的特异引物进行 PCR 扩增的结果, 2 为用 PCV1 的特异引物进行 PCR 扩增的结果, 3 为用 PCV1 和 PCV2 的特异引物进行二重 PCR 扩增的结果。

图 2 PCV1 和 PCV2 的鉴别 PCR 检测结果

Fig.2 Differential PCR for PCV1 and PCV2

用二重 PCR 对 117 份 PCV 阳性病料 DNA 进行检测的结果表明, 117 份 PCV 阳性 DNA 样品均含 664 bp 的 PCV2 基因组片段, 其中有 2 份还含有 309 bp 的 PCV1 基因组片段。PCR 扩增产物的片段见图 3。将 PCR 产物切胶回收, 送测序。结果表明,

## 2 结果

### 2.1 PCV 的检测结果

用引物 PCVFP1-24 和 PCVRP774-97 对 192 份病料 DNA 进行检测, 结果从 117 份样品中能扩增到预期的目的条带(797 bp)。图 1 为部分样品的 PCR 产物的电泳结果。

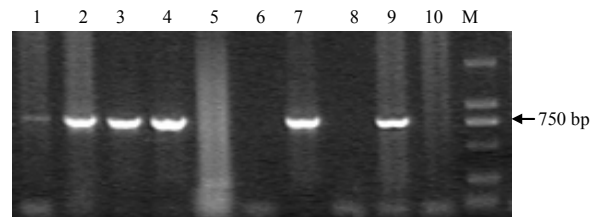


图 1 病料中 PCV 的 PCR 检测结果  
M 为 DL 2000 DNA Marker; 1~4、7、9 为能扩增出 PCV 目的条带的病料样品; 5、6、8 为不能扩增出 PCV 目的条带的病料样品; 10 为猪伪狂犬病毒、猪瘟病毒阳性 DNA 混合样品。

图 1 病料中 PCV 的 PCR 检测结果

Fig.1 PCR detection for PCV in tissues of submitted sick pigs

### 2.2 PCV1 与 PCV2 的鉴别检测结果

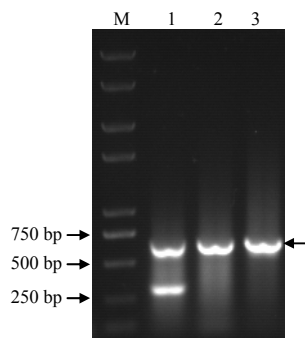
如图 2 所示, PCV1 与 PCV2 的检测引物均能特异性地扩增出预期为 309 bp 与 664 bp 的目的条带。在退火温度为 65  $^{\circ}$ C 时, 2 对引物可以用于二重 PCR, 同时检测 PCV1 与 PCV2(图 2)。

扩增出的 309 bp 的片段为 PCV1 的 DNA, 扩增出的 664 bp 的片段为 PCV2 的 DNA。

### 2.3 PCV2 基因组的克隆与测序

对 TA 克隆获得的经 PCR 检测及质粒提取鉴定为 PCV1 阳性的转化子进行测序。结果表明, 从

PCV2 阳性 DNA 样品中获得 4 株 PCV2 的基因组 (GenBank 登录号分别为 KC473166、KC473167、KC473168 和 KC907703)。经基因进化分析,发现获得的序列均为基因组全长为 1 767 bp 的 PCV2-1 毒株的序列。



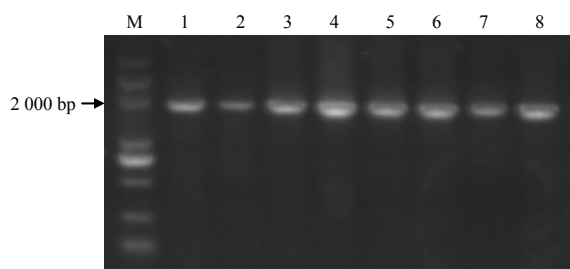
M 为 Trans II 2K™ Plus DNA Marker ; 1~3 均为用 PCV1 和 PCV2 的特异性引物对 PCV 阳性样品进行二重 PCR 检测的结果,1~3 的样品均检测到 PCV2 的目的条带,其中 1 的样品同时检测出 PCV1 和 PCV2 的目的条带。

图 3 PCV1 和 PCV2 的鉴别 PCR 检测结果

Fig.3 Differential PCR for PCV1 and PCV2

#### 2.4 PCV2-1 感染性克隆病毒的构建及在 PK15 (A10)细胞的维持培养

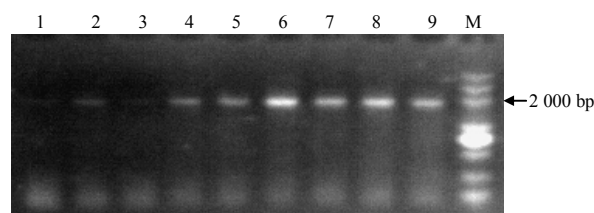
选取 GenBank 登录号为 KC473166 和 KC907703 的序列进行感染性克隆病毒的构建,将获得的毒株分别命名为 PCV2(2-1)和 PCV2 (4-1)。PCR 检测结果表明,用冻融传代盲传 3 代的 PCV2(2-1)和 PCV2 (4-1)病毒感染新的 PK15 (A10)细胞,2 株病毒均能在换液维持培养的细胞中持续复制。对收集的感染细胞培养液作 PCR 检测的结果见图 4 和图 5。从收集的样品中均能检测到 PCV2 的全长基因组。



M 为 Trans 2K™ Plus DNA Marker ; 1、2、3、4、5、6、7、8 分别为接毒后 4、6、8、10、12、14、16、18 d 换取的带毒细胞的培养液 DNA 样品的 PCR 产物。

图 4 PCV2(2-1)感染性克隆病毒在细胞中维持培养的 PCR 检测结果

Fig. 4 PCR tests for PCV2(2-1) grown in cells maintained through culture medium exchange



M 为 Trans 2K™ Plus DNA Marker ; 1、2、3、4、5、6、7、8 分别为接毒后 2、4、6、8、10、12、14、18 d 换取的带毒细胞的培养液 DNA 样品的 PCR 产物。

图 5 PCV2(4-1)感染性克隆病毒在细胞中维持培养的 PCR 检测结果

Fig. 5 PCR tests for PCV2(4-1) grown in cells maintained through culture medium exchange

### 3 讨论

本研究的检测 PCV 的引物,其特异性好,敏感性高(数据未显示),但不能区分 PCV1 和 PCV2。在此基础上,针对 PCV1 和 PCV2 基因序列变异较大的地方设计各自的特异性引物,扩增试验表明,设计的引物能够用于区分 PCV1 和 PCV2。对 PCV 阳性 DNA 进行 PCV1 与 PCV2 分型检测的结果显示,PCV 阳性 DNA 中只有 2 个阳性样品检出 PCV1,说明 PCV1 的检出率非常低。从 PCV2 阳性 DNA 样品中克隆出的序列均为 1 767 bp 的 PCV2-1 群病毒的基因组,这间接说明患病猪中 PCV2-1 比 PCV2-2 更加普遍。

用 PK15(A10)和异步接毒方法<sup>[10]</sup>将 PCV2 基因组自身环化产物转染及冻融传代,获得了感染性克隆病毒,将其于 PK15(A10)中换液维持培养,病毒能够持续复制,并保持较高复制效率,这与 PCV2-1B 毒株<sup>[9]</sup>的复制特征相似。在感染性病毒构建的过程中发现,用 PK15(A10)细胞及异步接毒方法比以往用 PK15 混合细胞和同步接毒法更容易构建出感染性克隆病毒(数据未显示),下一步研究可以此方法从 PCV2 阳性 DNA 获得更多的 PCV2 感染性克隆毒株,以筛选出复制效率更高的 PCV2 毒株。

#### 参考文献:

- [1] Meehan B M ,McNeilly F ,Todd D ,et al .Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs[J] .Journal of General Virology ,1998 , 79(9) : 2171-2179 .

- [2] Tischer I, Miels W, Wolff D, et al. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus[J]. Archives of Virology, 1986, 91(3/4): 271-276.
- [3] Ouardani M, Wilson L, Jette R, et al. Multiplex PCR for detection and typing of porcine circoviruses[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1999, 37(12): 3917-3924.
- [4] de Boissésou C, Béven V, Bigarré L, et al. Molecular characterization of Porcine circovirus type 2 isolates from post-weaning multisystemic wasting syndrome-affected and non-affected pigs[J]. J Gen Virol, 2004, 85(2): 293-304.
- [5] Olvera A, Cortey M, Segalés J. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: Phylogeny and clonality[J]. Virology, 2007, 357: 175-185.
- [6] Wiederkehr D D, Sydler T, Buergi E, et al. A new emerging genotype subgroup within PCV-2b dominates the PMWS epizooty in Switzerland[J]. Veterinary Microbiology, 2009, 136(1/2): 27-35.
- [7] Li Y, Chen R, Xu D W, et al. Genetic characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) from pigs in Anhui province[J]. Journal of animal and veterinary advances, 2011, 10(8): 1024-1031.
- [8] Li W, Wang X, Ma T, et al. Genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains isolated between 2001 and 2009: genotype PCV2b predominate in postweaning multisystemic wasting syndrome occurrences in eastern China[J]. Virus Genes, 2010, 40: 244-251.
- [9] 罗维, 赵墩, 吴海超, 等. 猪圆环病毒 2 型基因 1 群 B 亚簇的体外培养特征[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2013, 39(5): 534-538.
- [10] 李薇, 罗维, 余兴龙, 等. 三种亚群 PCV-2 感染性克隆的构建及体内外感染性试验[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2011, 37(1): 68-72.
- [11] 罗维, 赵墩, 蒋大良, 等. 适合猪圆环病毒 2 生长的 PK15 均质细胞株的构建[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2013, 39(4): 404-408.
- [12] 萨姆布鲁 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 金冬雁, 黎孟枫, 侯云德, 等译. 北京: 科学出版社, 2002.

责任编辑: 罗 维

英文编辑: 罗 维