

河南省及周边地区猪圆环病毒 2 型分子流行病学调查

焦文强, 王治方, 王克领, 白献晓, 郎利敏, 李海利, 朱文豪, 张青娴, 徐引弟*
(河南省农业科学院 畜牧兽医研究所, 河南 郑州 450002)

摘要: 为了解河南及周边地区猪圆环病毒 2 型(PCV2) 的分子流行病学情况, 运用 PCR 方法对 2014—2015 年采集到的河南及周边地区山东、山西、河北、甘肃 5 省共 158 份病料进行 PCV2 检测, 将 PCR 扩增得到的 PCV2 ORF2 基因片段进行测序, 分析研究 PCV2 遗传变异情况。结果显示, 158 份样品中, 有 69 份样品为 PCV2 阳性, 得到 19 株病毒的 ORF2 基因序列; 将检测到的 PCV2 ORF2 序列与国内外分离株进行比对发现, 核苷酸序列的同源性为 89.9%~99.9%, 其氨基酸序列同源性为 88.0%~99.6%。综上可知, 河南及周边地区 PCV2 流行广泛, 病毒变异频繁。

关键词: 猪圆环病毒 2 型; ORF2; 分子流行病学; 序列分析; 进化分析

中图分类号: S855.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2017)05-0125-05

Molecular Epidemiological Investigation of Porcine Circovirus Type 2 in Henan and Nearby Provinces

JIAO Wenqiang, WANG Zhifang, WANG Keling, BAI Xianxiao, LANG Limin,
LI Haili, ZHU Wenhao, ZHANG Qingxian, XU Yindi*
(Institute For Animal Husbandary and Veterinary Research, Henan Academy of
Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In order to investigate molecular epidemiology of porcine circovirus type 2(PCV2), a total of 158 samples including serum samples, lungs, lymph node were collected between 2014 and 2015 in Henan, Hebei, Shandong, Shanxi and Gansu provinces. All the 158 samples were subjected to PCR and the positive samples were sequenced to obtain the whole ORF2 gene. The results showed that 69 samples were PCV2 positive according to PCR, and 19 ORF2 genes were acquired. Sequence comparison showed that the nucleotide sequence homologies of ORF2 genes were up to 89.9%—99.9%, and the amino acid homologies were 88.0%—99.6%. The results indicated that the PCV2 was endemic in Henan province and provinces nearby, and PCV2 varied frequently.

Key words: porcine circovirus type 2(PCV2); ORF2; molecular epidemiology; sequence analysis; evolutionary analysis

猪断奶后多系统衰竭综合征(postweaning multi-systemic wasting syndrome, PMWS)是由猪圆环病毒 2 型(porcine circovirus 2, PCV2)感染引起的, 发生于 5~12 周龄的保育猪, 临床主要表现为呼吸困难、喘

气、皮肤苍白以及进行性消瘦^[1]。自 1991 年 PMWS 被首次报道以来, 欧洲、亚洲以及大洋洲等先后报道此病, 其呈全球性分布^[2-3]。2011 年, 郎洪武等^[4]首次成功分离 PCV2, 证明我国存在 PCV2 感染情况。

收稿日期: 2016-11-22

基金项目: 河南省科技攻关项目(162102110050)

作者简介: 焦文强(1982-), 男, 河南新乡人, 助理研究员, 博士, 主要从事分子病毒学方向研究工作。

E-mail: wenqiangjiao@163.com

* 通讯作者: 徐引弟(1974-), 女, 河北衡水人, 副研究员, 博士, 主要从事猪传染病分子病毒学研究工作。

E-mail: 645843634@qq.com

猪圆环病毒 (porcine circovirus) 是无囊膜的单股环状负链 DNA 病毒,根据血清型的不同,PCV 可以分为 PCV1 和 PCV2,其中,PCV1 对猪无致病性,PCV2 是引起 PMWS 的主要病原。PCV2 基因组为小型的单链环状 DNA,大小约 1.7 kb,包括 3 个开放阅读框 (open reading frames, ORFs),其中,ORF2 编码病毒的核包膜蛋白 Cap 蛋白,Cap 蛋白有较多的抗原表位,这些抗原表位在免疫压力下发生突变,使得 PCV2 不断变异进化^[7-9]。因此,研究 ORF2 的遗传变异情况对于 PCV2 的防控有重要意义。

为了深入了解 PCV2 遗传变异情况,本研究于 2014—2015 年共采集来自河南、河北、山西、山东、甘肃 5 省的 158 份样品,通过 PCR 扩增、测序,应用 DNA Star 软件比对 ORF2 的核苷酸及氨基酸序列的同源性,以期对 PCV2 的防控提供参考,为新型疫苗的研制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 供试样品

2014—2015 年期间采集来自河南、河北、山东、山西以及甘肃的样品 158 份,包括肺脏、淋巴结等。将样品进行标记后,−80℃ 保存。

1.2 主要菌株、试剂、载体

Taq DNA 聚合酶、pMD19-T Simple 载体、DL2000 Marker 均购自宝生物 (大连) 生物有限公司;T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司;基因组 DNA 提取试剂盒、小量质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒均购自杭州爱思进生物技术有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 样品处理以及 DNA 的提取 待检病料经过 3 次反复冻融,剪碎、研磨,加入 1 mL PBS 缓冲液,充分混合均匀后 13 000 r/min 离心 10 min,取上清液,按照杭州爱思进生物技术有限公司 DNA 抽提试剂盒操作说明提取基因组总 DNA。

1.3.2 引物设计及克隆 参考 NCBI 中收录的 PCV2 ORF2 的序列,选取其基因组中保守的序列,采用 Oligo 6.0 软件设计引物,扩增完整的 ORF2 基因。引物序列为 ORF2-F: 5′-ATTTCCGATTATAC-CAT-3′; ORF2-R: 5′-GCTGAACAGCATCCA-3′。以 1.3.1 提取的 DNA 为模板进行 PCR 检测,PCR 体系如下: DNA 5 μL,上、下游引物各 1 μL,10×Taq Buffer 5 μL,dNTP 8 μL,Taq DNA 聚合酶 1 μL,灭菌双蒸水补足 50 μL。PCR 反应程序如下: 95℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 62℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸

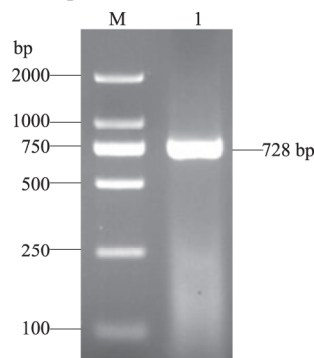
45 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。取 5 μL PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶中电泳检测,回收与预期大小相符的片段,连接 pMD19-T Simple 载体,4℃ 连接过夜,转化 JM109 感受态细胞,37℃ 培养 15 h 后挑取单克隆进行 PCR 检测,阳性克隆送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。

1.3.3 序列测定与分析 将测序结果使用 DNA Star 软件包中的 Edit Seq 软件进行序列拼接、编辑,使用 Meg Align 软件将本研究得到的序列与 GenBank 中收录的序列进行核苷酸和氨基酸的比对;应用 MEGA 5.0 软件进行遗传进化分析,采用 Neighbor-Joining 法生成系统进化树。

2 结果与分析

2.1 PCV2 ORF2 基因 PCR 检测结果

158 份样品中,有 69 份样品检测为 PCV2 阳性,阳性率高达 43.7%。从图 1 可以看出,PCR 扩增 PCV2 ORF2 基因,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,可以看到预期的 728 bp 大小的片段。



M. 2000 Marker; 1. 检测样品

图1 PCV2 ORF2 扩增结果

2.2 ORF2 核苷酸序列同源性比对结果

序列分析结果显示,从供试病料中共检测到 19 株 PCV2 毒株的 ORF2 基因序列,这 19 株 PCV2 毒株之间的 ORF2 区域核苷酸同源性为 90.0%~100%,与 GenBank 中收录的 PCV2 的同源性为 89.9%~99.9% (图 2)。

2.3 ORF2 氨基酸序列同源性比对结果

使用 DNA Star 软件中的 Edit Seq 将检测的 19 株 PCV2 ORF2 序列翻译成氨基酸序列,使用 DNA Star 软件中的 Meg Align 进行比对,结果发现,本研究检测到的 19 株 PCV2 之间 ORF2 氨基酸序列同源性为 88.4%~100%,与 GenBank 中收录的 PCV2 的氨基酸序列同源性为 88.0%~99.6% (图 3)。

2.4 ORF2 抗原位点比对结果

使用 DNA Star 软件中的 Meg Align 对本研究检

图2 ORF2 核苷酸序列比对结果

图3 ORF2 氨基酸序列比对结果

9 株属于 PCV1c 亚型(图 5)。

3 结论与讨论

自首次报道 PCV2 以来,众多学者针对 PCV2 分子流行病学开展了大量调查工作,国内相关数据表明,PCV2 在国内流行情况很严峻,且流行情况呈现蔓延的趋势^[10-12]。为分析河南及周边地区 PCV2 流行情况,笔者所在课题组相关工作人员于 2014—2015 年共收集 158 份疑似 PCV2 感染样品,通过 PCR 方法检测到 69 份阳性样品,阳性率高达 43.7%,这表明在河南及周边地区 PCV2 感染率很高,严重威胁了养猪业的健康发展。

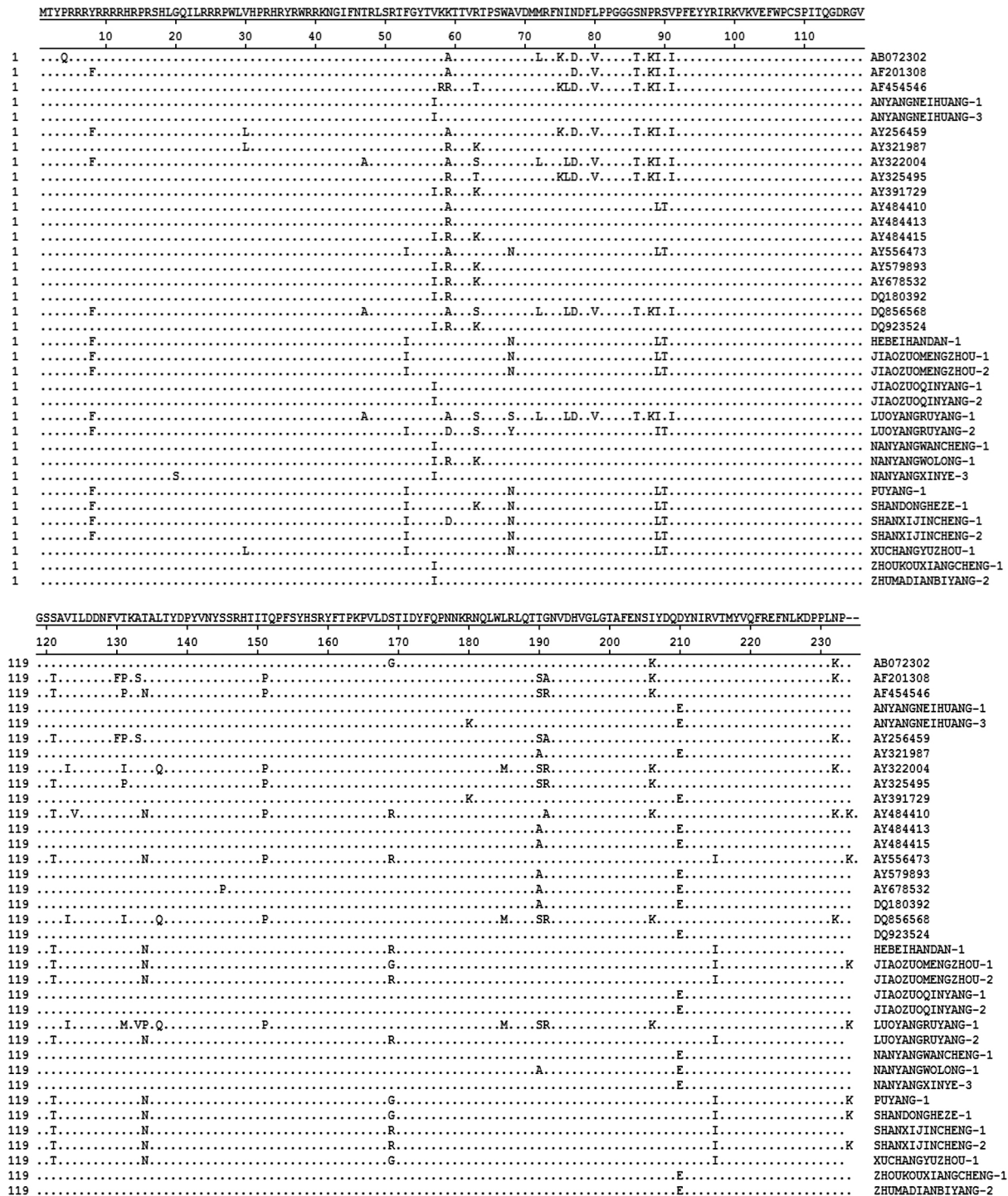


图 4 ORF2 主要抗原位点比对结果

本研究检测到的 19 株 PCV2 ORF2 序列中有 18 株为 PCV2b, 仅 1 株为 PCV2a, 表明 PCV2b 是目前河南及周边的主要流行毒株, 与前人研究结果一致^[3-4]。根据 PCV2 ORF2 基因序列遗传进化分析结果, 18 株 PCV2b 中 9 株为 PCV1a/1b 亚型, 9 株为 PCV1c 亚型。

有研究表明, 2008 年以前我国 PCV2 主要流行毒株为 PCV1a/1b, PCV1c 从无到有, 日趋成为主要流行毒株, 其起源以及是否会造成 PCV2b 毒力增强

等均需要进一步研究。PCV2b 能够取代 PCV2a 成为流行毒株, 主要是因为 PCV2b 毒株在细胞间扩散能力以及对宿主细胞的吸附能力均强于 PCV2a^[5], 较 PCV2a 具有更高的致病性^[5-6]。

Cap 蛋白是 PCV 主要的免疫原性蛋白, 由于处于疫苗的免疫压力下可能会以突变的形式逃避免疫反应, 进而 Cap 蛋白的抗原性、免疫原性等可能会受到影响^[7]。Cap 蛋白中 P110 和 R191 与病毒毒力直接相关, 本研究检测的样品中, P110 没有发生突变,

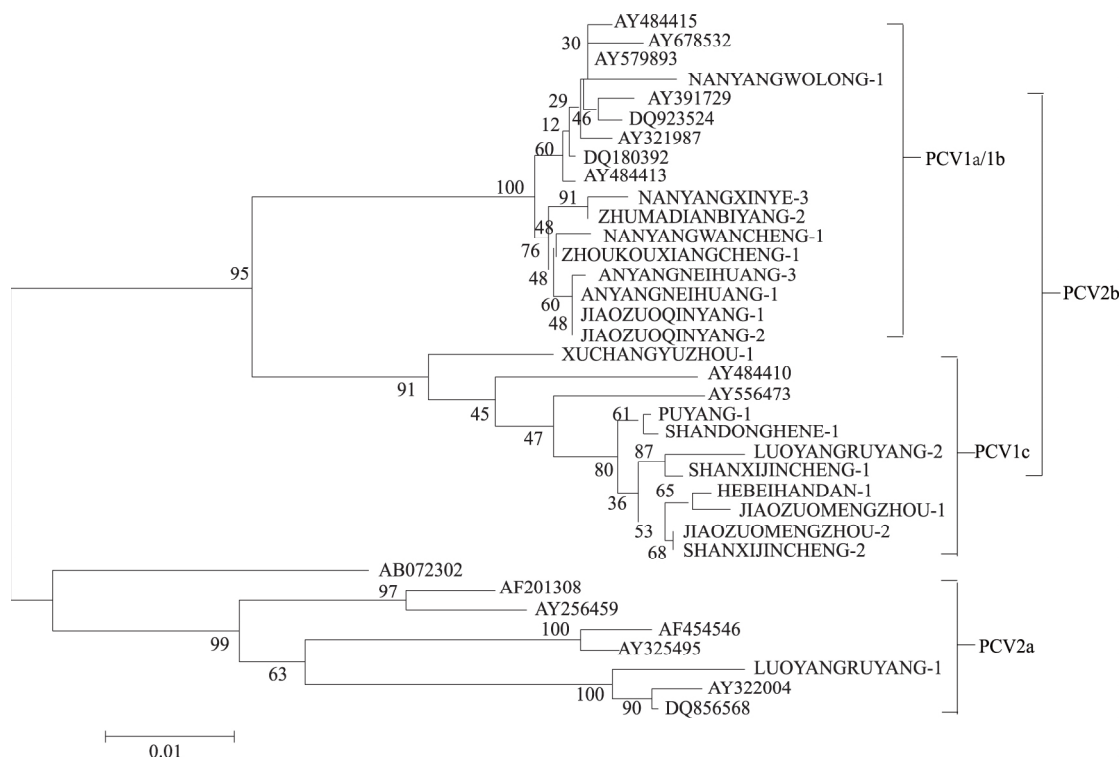


图 5 基于 ORF2 构建的系统进化树

而第 191 位氨基酸发生了 G - R 的突变。本研究中,通过氨基酸序列比对发现, Cap 蛋白存在 3 个变异较为集中的区域,主要为 59—101 aa、134—169 aa 和 180—210 aa,这与先前的研究一致^[7]。值得注意的是,PCV1c 日渐成为流行毒株,这需要引起足够的重视。

参考文献:

- [1] Ellis J, Hassard L, Clark E. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome [J]. *Can Vet J*, 1998, 39(1): 44-51.
- [2] Allan G M, Mcneilly F, Kennedy S D, *et al.* Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe [J]. *J Vet Diagn Invest*, 1998, 10(1): 3-10.
- [3] Choi C, Chae C. In-situ hybridization for the detection of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome [J]. *Comp Pathol*, 1999, 121(3): 265-270.
- [4] Trujano M, Iglesias G, Segales J, *et al.* PCV-2 from emaciated pigs in Mexico [J]. *Vet Rec*, 2001, 148(25): 792.
- [5] Wellenberg G J, Pesch S, Bermdsen F W, *et al.* Isolation and characterization of porcine circovirus type 2 from pigs showing signs of post-weaning multisystemic wasting syndrome in the Netherlands [J]. *Vet Q*, 2000, 22(3): 167-172.
- [6] 郎洪武, 王力, 张广川, 等. 分离鉴定及猪断奶多系统衰竭综合征的诊断 [J]. *中国兽医科技*, 2001, 31(3): 3-5.
- [7] 梅林, 邢海云, 郭丽春, 等. 中国北方部分地区猪圆环病毒 II 型分子流行病学调查 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2011, 24(1): 1-4.
- [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 occurrence in eastern China [J]. *Virus Genes*, 2010, 40(2): 244-251.
- [9] Wang F X, Guo X, Ge Z, *et al.* Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2 [J]. *Virus Research*, 2009, 145(1): 151-156.
- [10] 李超, 魏建忠, 凌英济, 等. 安徽省猪圆环病毒 2 型感染的流行病学调查 [J]. *中国微生态学杂志*, 2010, 22(4): 330-332.
- [11] 吴媛, 范红结, 李君荣, 等. 金华地区猪圆环病毒病原流行病学调查 [J]. *家畜生态学报*, 2010, 31(6): 79-82.
- [12] 赵津, 张小敏, 周斌, 等. 2008—2010 年华东地区猪圆环病毒 2 型感染血清学调查 [J]. *中国动物传染病学报*, 2010, 18(6): 49-52.
- [13] 李玲, 李国新, 周艳君, 等. 2008—2011 年中国部分地区猪圆环病毒 2 型的分子流行病学调查 [J]. *中国动物传染病学报*, 2012, 20(2): 1-10.
- [14] 邵萌, 吕亚辉, 杜谦, 等. 2010—2012 年陕西地区猪圆环病毒 2 型分子流行病学调查 [J]. *西北农林科技大学学报*, 2013, 41(10): 19-26.
- [15] Cheung A K, Lager K M, Kohutsky O I, *et al.* Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States in herds [J]. *Arch Virol*, 152(5): 1035-1044.
- [16] Dupont K, Nielsen E O, Baekbo P, *et al.* Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time [J]. *Vet Microbiol*, 2008, 128(1/2): 56-64.
- [17] Grenfell B T, Pybus O G, Gon J R, *et al.* Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens [J]. *Science*, 2004, 303: 327-332.