

# 中国部分地区猪圆环病毒 2 型的基因型分析

李文洁, 李文涛, 严伟东, 陈焕春, 何启盖\*

(华中农业大学动物医学院 农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070)

**摘要:** 对中国 11 个省(市)部分猪场收集的 812 份病料, 应用 ORF2-PCR 进行检测, 发现有 235 份为 PCV2 阳性病料。利用鉴别 PCR 方法从 235 份阳性病料中, 检出 10 份 PCV2a 基因型和 133 份 PCV2b 基因型, 检出率分别为 4.2%、56.6%。进一步对 ORF2-PCR 检测阳性的部分模板进行全基因组扩增, 构建阳性重组质粒, 对插入质粒的片段进行测序鉴定, 利用 DNASTar 进行同源性分析, 同 GenBank 参考毒株绘制系统发育树, 从系统发育树中也可分出 PCV2a、PCV2b 2 种基因型。鉴别 PCR 和测序结果说明, 我国部分地区流行的猪圆环病毒 2 型以 PCV2b 基因型为主, 少数为 PCV2a 基因型, 也有既非 PCV2a 又非 PCV2b 的基因型(PCV2c?)。

**关键词:** 猪圆环病毒 2 型; 分子流行病学; PCV2a; PCV2b

中图分类号: S852.659.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)09-1358-05

## Survey on Molecular Epidemiology of Porcine Circovirus Type 2 Isolates Collected from Some Area of China with a PCR

LI Wen-jie, LI Wen-tao, YAN Wei-dong, CHEN Huan-chun, HE Qi-gai\*

(State Key Laboratory of Agriculture Microbiology of Animal Virology, College of Animal Science and Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** Tissue samples were collected from pig farms of different regions of 11 provinces in China. 812 suspicious samples were detected by ORF2-PCR, and 235 samples were PCV2-positive. The genotype of 235 ORF2 fragments amplified from positive samples was identified by distinction PCR for PCV2a and PCV2b. The results showed that the isolated rates of PCV2a genotype and PCV2b genotype were 4.2% and 56.6%, respectively. A pair of primers was designed according to documented data in the GenBank, and the complete genomes of 235 PCV2-positive template were amplified by PCR. The PCR products of complete genome of PCV2 isolates were cloned and sequenced. The sequences were compared with those of other PCV2 strains in the GenBank, the results indicated that genomic sequences of PCV2 strains tested in this study could be divided into three genotypes, PCV2a, PCV2b and the other genotype that neither PCV2a nor PCV2b(PCV2c?). The results mentioned above also revealed that the epidemic characteristics of genotype of PCV2 in some areas of China were PCV2b, secondly for little PCV2a as well as neither PCV2a nor PCV2b(PCV2c?).

**Key words:** porcine circovirus type 2; molecular epidemiology; PCV2a; PCV2b

猪圆环病毒(Porcine circovirus, PCV), 属圆环病毒科(Circoviridae)圆环病毒属的成员, 根据病毒

的抗原性和基因组组成的差异分为 2 个基因型, 即 PCV1 和 PCV2<sup>[1]</sup>。PCV2 是引起猪断奶后多系统

收稿日期: 2008-12-15

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx07-034); 现代农业产业技术体系专项(nycytx-009)

作者简介: 李文洁(1980-), 女, 河北衡水人, 硕士, 主要从事动物疾病诊断与分子流行病学研究, Tel: 0318-7826998, E-mail: liwenjie0318@163.com

\* 通讯作者: 何启盖, Tel: 027-87286974, E-mail: heqigai@yahoo.com

衰竭综合征 (Postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) 和母猪繁殖障碍、断奶和育肥猪的呼吸道疾病,猪皮炎和肾病综合征 (Porcine dermatitis and nephropathy syndrome, PDNS) 以及猪的先天性震颤 (Congenital tremors) 的主要病原,在世界范围内广泛存在。PCV2 无囊膜,具有环状单链 DNA 基因组,基因组大小 1.76 kb,有 PCV2a 和 PCV2b 2 种主要亚型,即为 Horlen 等提到的 PCV2-2 和 PCV2-1 病毒<sup>[2-3]</sup>,在欧洲,2 种基因型均已被证实和猪圆环病毒相关疾病 (PCVD) 有关,2005 年,美国暴发的 PCVD 和 PCV2b 有联系<sup>[2-4]</sup>。尽管大多数猪群感染和 PCV2 有关,但是认为在临床表现上 PCV2 的 2 种基因型毒力不同<sup>[5]</sup>。Opriessnig 等认为 PCV2a 和 PCV2b 的毒力没有不同,二者存在交叉保护力<sup>[6]</sup>。该病主要以进行性消瘦和多系统病理损伤为主要特征,已给全球养猪业造成相当严重的经济损失。目前 PCVD 在我国还广泛存在,仍没有有效的预防和控制措施。本试验目的是通过对病料中的 PCV2 进行基因组测序和鉴别 2 种基因型,了解 PCV2 2 个亚型在我国的分布情况,为今后研制疫苗提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 病料

病料来自河南、湖南、湖北、浙江、陕西、福建、上海、重庆等 11 个省(市)的某些猪场,采集表现有呼吸困难、发热、消瘦等临床症状的断奶仔猪各组织器官,包括肺、心、肾、脑、腹股沟淋巴结、肠系膜淋巴结等,共 812 份。

### 1.2 主要试剂

DL2000 Marker, rTaq 聚合酶, LA Taq 聚合酶, dNTPs, Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (Perfect Real Time) 均购自大连 TaKaRa 生物工程有限公司; Plasmid Mini Kit 为 OMEGA 公司产品。

### 1.3 DNA 提取

取病料混合液 900  $\mu\text{L}$  于 Eppendorf 管中,加入 300  $\mu\text{L}$  消化液 (255  $\mu\text{L}$  TNE, 15  $\mu\text{L}$  10% SDS, 30  $\mu\text{L}$  20 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 蛋白酶 K), 于 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴过夜或 56  $^{\circ}\text{C}$  水浴 3 h, 用等体积的酚:氯仿:异丙醇 (25:24:1) 各抽提 1 次, 12 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 小心吸取上清于另一个干净的 Eppendorf 管中, 用等体积的酚:氯仿:异丙醇 (25:24:1) 再抽提 2 次, 12 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 小心吸取

上清, 加 2 倍体积的无水乙醇 -20  $^{\circ}\text{C}$  沉淀 30 min, 12 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 10 min 去上清, 加 75% 乙醇清洗重悬沉淀, 10 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 5 min 去上清, 50  $\mu\text{L}$  TE 或灭菌蒸馏水重悬沉淀, -20  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.4 ORF2-PCR

根据 GenBank 中的 ORF2 序列 (AF027217) 设计 1 对特异性引物, 上游引物 P1: 5'-CACG-GATATTGTAGTCTCTGGT-3'; 下游引物 P2: 5'-CGCACCTTCGGATATACTGTC-3', 由上海生工生物工程有限公司合成, 用 TE 缓冲液配成 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 贮存于 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。预期的扩增片段为 494 bp。

病料检测 PCR 反应体系 25  $\mu\text{L}$ : 模板 1  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$  Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , dNTPs 1  $\mu\text{L}$ , 引物 0.4  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  3 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 53  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 共 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。

### 1.5 PCV2 分型的鉴别 PCR

根据参考资料<sup>[5,7]</sup> 设计 2 对引物, 旨在通过 PCR 来区分 PCV2 的 2 个主要亚型 PCV2a 和 PCV2b。2 对引物共用 1 个上游引物, 引物序列分别如下, F-PCV2: 5'-CAGTTCGTCACC-3'; R-PCV2a: 5'-GGGGACCAACAAAATCTC-3'; R-PCV2b: 5'-GGGGCTCAAACCCCGCTC-3', 引物均由上海生工生物公司合成。用 TE 缓冲液配成 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 贮存于 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。

采用 25  $\mu\text{L}$  反应体系: 模板 1  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$  Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , dNTPs 1  $\mu\text{L}$ , 引物均为 0.3  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。反应条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  2 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 56  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 共 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。设无菌蒸馏水为阴性对照。

### 1.6 全基因组 PCR 反应

根据参考文献[8]设计 1 对引物, 扩增 PCV2 全基因组片段 (1 767 bp), P1: 5'-GTACCTTGTTG-GAGAGCGGG-3'; P2: 5'-TCACAGCAGTAGA-CAGGTCA-3'。

采用 50  $\mu\text{L}$  反应体系: 模板 1  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$  Buffer 5  $\mu\text{L}$ , dNTPs 4  $\mu\text{L}$ , 引物均为 0.4  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  2 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 58  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  2 min, 共 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。以灭菌蒸馏水为阴性对照。

### 1.7 全基因组 PCR 产物连接转化及测序

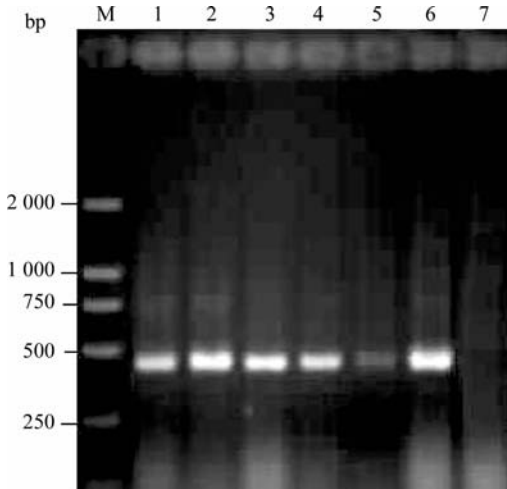
全基因组序列与 pMD18-T 载体进行连接反应,

连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,涂氨苄平板,在 37 °C 温箱内培养 12 h,挑白色单菌落,接种到含氨苄的 LB 液体培养基,37 °C 震荡过夜,提质粒,经酶切、PCR 鉴定后,送上海英骏生物技术有限公司测序。进行序列和系统进化树分析。

## 2 结果

### 2.1 ORF2-PCR 检测结果

检测病料 812 份,235 份为 PCV2 阳性,部分扩增结果见图 1。

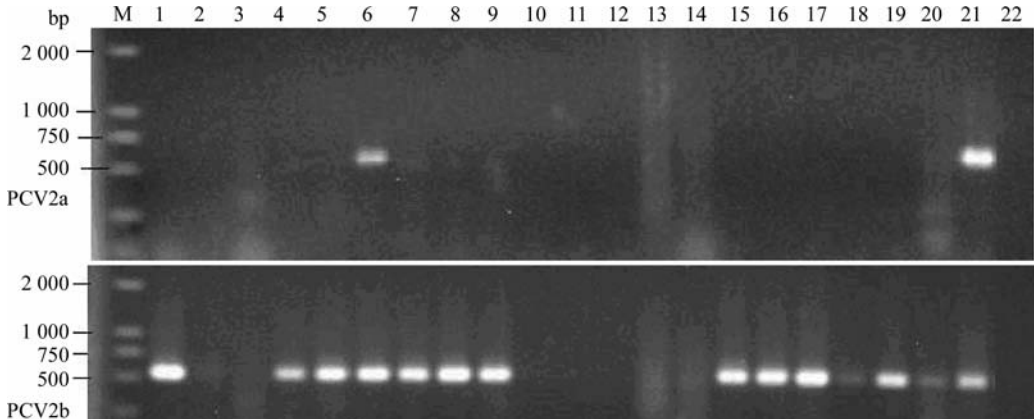


M. DL2000 DNA 分子质量标准;1~5. ORF2-PCR 阳性结果;6. 阳性对照;7. 阴性对照

M. DL2000 DNA marker; 1—5. Positive results of ORF2-PCR; 6. Positive control; 7. Negative control

图 1 ORF2-PCR 阳性扩增结果

Fig. 1 ORF2-PCR amplified products



M. DL2000 DNA 分子质量标准;6. PCV2a 阳性结果;1,4,5,7~9,15~20. PCV2b 阳性结果;21. 阳性对照;22. 阴性对照

M. DL2000 DNA marker; 6. Positive result of PCV2a; 1,4,5,7—9,15—20. Positive results of PCV2b; 21. Positive control; 22. Negative control

图 2 PCV2a、PCV2b PCR 的部分鉴别结果

Fig. 2 Partial results of distinction PCR for PCV2a and PCV2b

### 2.2 鉴别 PCR 的结果

通过鉴别 PCR 进一步检测了 235 份 PCV2 阳性病料,检测结果见表 1、图 2。其中 PCV2a 检出率为 4.2%; PCV2b 检出率为 56.6%。

### 2.3 全基因组 PCR 结果

通过全基因组序列 PCR 方法,得到 12 条 PCV2 全基因序列,大小为 1 767、1 768 bp,序列名称及大小如下:湖北 HBxz-22a 株为 PCV2a 亚型,基因组为 1 768 bp;湖北 HBtm-4b、HBhn-13b、HBhn-14b、HBhn-15b、HBhn-16b 株,湖南 HNyy-7b 株、广东 SZ-1b 株,为 PCV2b 亚型,基因组为 1 767 bp;湖北 HBtm-5、HBwh-24、HBsy-21、HBtm-17 株,为 PCV2c 亚型,基因组为 1 767 bp。测序结果均符合鉴别 PCR 结果。

### 2.4 系统发育树分析

将以上得到的 PCV2 全基因核苷酸序列同 GenBank 中的美国株(EU594437、AF264038),日本株(AB426905、AB072302),法国株(AF201311、AY321985),西班牙株(AF201309),中国大陆株(FJ158606、EU647557)核苷酸序列建立系统进化树,结果见图 3。

## 3 讨论

PCV2 主要造成猪机体免疫系统抑制,给规模化猪场造成了严重损失,一些研究者做了 PCV2 分子流行病学研究,李文杰<sup>[9]</sup>应用复合 PCR 方法,对江苏地区的 162 份可疑病料进行了检测,结果 72 份

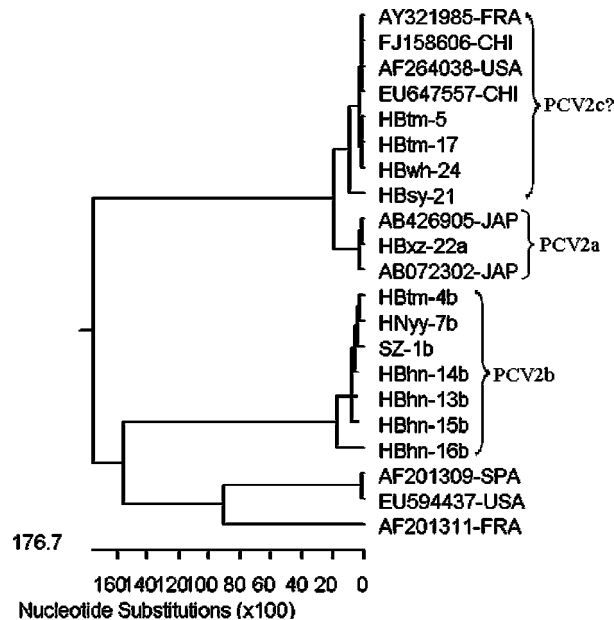
表 1 病料组织中 PCV2a、PCV2b PCR 扩增检测结果

Table 1 Detection of PCV2a and PCV2b genotype in the samples collected from some provinces by PCR

病料来源 Sample source	ORF2-PCR 阳性病料数 Positive number of ORF2-PCR	PCV2a 阳性数 Positive number of PCV2a	PCV2b 阳性数 Positive number of PCV2b
湖北 Hubei	94	4	56
河南 Henan	62	1	44
陕西 Shanxi	23	0	4
重庆 Chongqing	22	0	10
浙江 Zhejiang	21	1	12
福建 Fujian	4	0	0
安徽 Anhui	3	0	1
广东 Guangdong	2	2	2
辽宁 Liaoning	2	1	2
湖南 Hunan	2	1	1
上海 Shanghai	1	0	1
总计 Total	235	10	133
百分率/% Percentage		4.2%	56.6%

PCV2a 检出率为 4.2%；PCV2b 检出率为 56.6%

The isolated rates of PCV2a and PCV2b genotype were 4.2% and 56.6%, respectively



USA, America; CHI, China; FRA, France; JAP, Japan; SPA, Spain

图 3 PCV-2 毒株的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of PCV-2 isolates

病料为 PCV2 阳性,17 份为 PCV1 阳性,其中 7 份同时感染 PCV1、PCV2,说明该病已在江苏地区呈流行趋势。作者收集了河南、湖南、湖北、浙江、陕西、福建、上海、重庆等 11 个省(市)的病料,通过

ORF2-PCR 方法检测了 812 份病料,病料绝大部分来源于保育猪和育肥猪的肺、心、肾、脑、腹股沟淋巴结、肠系膜淋巴结等组织,可见 PCV2 主要感染 4~15 周龄的仔猪,检测得到 235 份 PCV2 阳性病料。进一步证实了 PCV2 感染在上述地区猪场猪群中的存在。

温立斌<sup>[10]</sup>利用 PCR 方法对北京等地区的 173 份 PCV2 阳性样本的全长 ORF2 基因进行扩增,然后进行 RFLP 分析,可将我国流行毒株分为 9 种基因型,即 CHN-2A、CHN-2B、CHN-2C、CHN-2D、CHN-2E、CHN-2F、CHN-2G、CHN-2H 和 CHN-2I,其中 CHN-2H 为我国 PCV2 流行毒株的优势基因型。作者在此采用了不同的分型方法。目前国外一些学者认为 PCV2 可分为 PCV2a 和 PCV2b 2 种基因型<sup>[3,11]</sup>,为了进一步证明中国 2 种基因亚型的存在情况,作者通过鉴别 PCR 检测了 235 份 ORF2-PCR 阳性病料,其中 PCV2a 检出率为 4.2%,PCV2b 检出率为 56.6%,因此认为中国大部分地区主要以 PCV2b 基因型存在为主。还存在一部分 PCV2 的基因型不能归入 PCV2a、PCV2b 这 2 种类型,是否可将不能归入上述 2 种基因型的 PCV2 定为 PCV2c,还有待于进一步研究。

为了验证鉴别 PCV2a、PCV2b PCR 的可靠性,

作者进行了全基因组核苷酸序列测序的方法,测序结果与鉴别 PCR 检测结果相符,将 11 条 PCV2 全基因核苷酸序列同 GenBank 中发表的美国株 (EU594437、AF264038),日本株 (AB426905、AB072302),法国株 (AF201311、AY321985),西班牙株 (AF201309),中国大陆株 (FJ158606、EU647557)核苷酸序列建立系统发育树,根据绘制的系统发育树,发现 PCV2 主要分为 2 个群,中国的 11 个毒株和国外的法国株 (AF201311)、美国株 (AF264038)、西班牙株 (AF201309)存在很大差异;中国的 11 个毒株又可分成 3 种基因型,PCV2a、PCV2b、PCV2c?,与鉴别 PCR 结果相符,PCV2c 基因型有待于进一步证明,中国的 HBxz-22a 株为 PCV2a 基因型,同日本的 2 株 (AB426905、AB072302)有很高的同源性,推测可能是地域相近的原因。

#### 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: 2171-2179.
- [ 2 ] CHEUNG A K, LAGER L M, KOHUTYUK O I, et al. Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds[J]. *Arch Virol*, 2007, 152: 1035-1044.
- [ 3 ] HORLEN K P, SCHNEIDER P, ANDERSON J. A cluster of farms experiencing severe porcine circovirus associated disease (PCVAD): clinical features and association with the PCV2b genotype [J]. *Swine Health Prod*, 2007, 15: 270-277.
- [ 4 ] HORLEN K P, DRITZ S S, NIETFELD J C, et al. A field evaluation of mortality rate and growth performance in pigs vaccinated against porcine circovirus type 2[J]. *Am Vet Med Assoc*, 2008, 232: 906-912.
- [ 5 ] HESSE R, KERRIGAN M, ROWLAND R R R. Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field[J]. *Virus Research*, 2008, 132: 201-207.
- [ 6 ] OPRIESSNIG T, RAMAMOORTHY S, MADSON D H, 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]. *J General virology*, 2008, 89: 2482-2491.
- [ 7 ] 柳美玲,秦晓冰,王爱华,等. 猪圆环病毒 2 型山东分离株全基因组的克隆与序列分析[J]. *动物医学进展*, 2008, 29(1): 13-17.
- [ 8 ] 陈庆新,周继勇,叶菊秀,等. 猪 II 型圆环病毒浙江株的分离及全基因组结构分析[J]. *微生物学报*, 2004, 44(4): 526-529.
- [ 9 ] 李文杰. 猪圆环病毒 2 型分子流行病学调查[D]. 扬州:扬州大学, 2006.
- [ 10 ] 温立斌. 猪圆环病毒 2 型的分子流行病学研究[D]. 北京:中国农业大学, 2005.