

猪圆环病毒2型全基因组的克隆及病毒拯救

王紫凝,高章照,董沁芳,全滢平,姜永厚

(浙江理工大学生命科学学院,杭州 310018)

摘 要: 为构建猪圆环病毒(*Porcine circovirus*, PCV) 2型(PCV2)感染性DNA克隆,以淋巴结病料组织中分离的PCV2细胞培养适应毒株为材料,通过基因序列分析比对,在PCV2基因组序列Xba I酶切位点区设计重叠引物,进行全长扩增并克隆至pMD-18T和pBluescript SK,获得载体pMD-PCV2和pBluescript SK-PCV2。将pMD-PCV2重组质粒大量扩增后,用Xba I切出PCV2全基因组,在体外用T4 DNA连接酶使其自环化。通过脂质体法将PCV2自环化产物转染至PK15细胞,并且经15次连续传代,分别用PCR、RT-PCR和间接免疫荧光测定(Indirect immunofluorescence assay, IFA)检测到PCV2的复制、转录和蛋白表达。该研究成功构建具有感染性的PCV2全基因组DNA,为PCV2致病机理和基因功能研究奠定基础。

关键词: 猪圆环病毒2型;全长基因组克隆;细胞转染;病毒拯救

中图分类号: Q939.47

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851(2018)07-0468-06

0 引言

猪圆环病毒(*Porcine circovirus*, PCV)是最小的动物DNA病毒之一^[1],最早由德国学者Tischer在猪肾细胞系PK-15中被当作一种细胞污染物^[2],其病毒粒子主要以二十面体对称,无囊膜为主要特征,直径约17 nm。PCV基因组以滚环模式复制,大小约为1.7~2.0 kb,为单股环状闭合DNA。根据其核苷酸序列和致病性不同,PCV被分为PCV1、PCV2和PCV3。PCV1无致病性,PCV3为新发现的一种猪圆环病毒,可能与垂直传播或导致母猪繁殖障碍疾病有关^[3-5]。Allan等^[6]从猪群中分离并确认PCV2为断奶仔猪多系统衰竭综合征(PMWS)的主要病原,其主要影响6~8周断奶仔猪,通常表现为消瘦、呼吸困难和免疫抑制^[7-8]。PCV2还可诱导猪皮炎与肾炎,繁殖障碍和呼吸道综合征等疾病的综合感染^[9]。

PCV基因组中大于200 nt的开放阅读框(Open reading frame, ORF)有6个^[10],已全部鉴定完毕。

ORF1是其中最大的开放阅读框,编码启动病毒复制的Rep蛋白,为PCV2的DNA复制、相关蛋白表达及病毒粒子的产生所必需,不同PCV毒株ORF1的核苷酸同源性高达80%以上^[11];ORF2位于病毒基因组互补链,编码病毒的核衣壳蛋白Cap,是目前唯一已知的结构蛋白,不同PCV毒株的核苷酸同源性为63%左右^[12-13]。Cap蛋白具有免疫原性,存在多个免疫反应区,可诱导机体产生病毒中和抗体,是PCV2最重要的亚单位疫苗抗原^[14]。ORF3编码一种非病毒复制必需的非结构蛋白,通过构建ORF3缺失株证实ORF3蛋白能导致PK-15细胞凋亡的发生^[15],ORF4编码60个氨基酸,与ORF1和ORF3基因重叠,编码方向与ORF1相反,ORF4蛋白具有凋亡抑制功能但非病毒复制必需^[16-17]。ORF5可能通过调节NF- κ B信号通路在PCV2持续性感染中起重要作用^[18]。PCV2的ORF6蛋白对病毒复制是非必需的,可能参与Caspase调控和多个细胞因子表达^[19]。

目前,PCV2的分子致病机制尚未研究清楚。

收稿日期:2017-12-26 网络出版日期:2018-04-08

基金项目:浙江省自然科学基金项目(LY15C010006);浙江省科技厅项目(2018C37051);国家自然科学基金项目(31101831)

作者简介:王紫凝(1992-),女,安徽蚌埠人,硕士研究生,主要从事猪圆环病毒分子生物学研究。

通信作者:姜永厚,E-mail:yonghoujiang@zstu.edu.cn

为进一步研究 PCV2 基因组结构与功能、致病机制和免疫机理,本文通过 PCR 扩增 PCV-2 全基因组,构建自环化 PCV-2 全基因组 DNA,并进一步转染细胞,成功获得拯救病毒 PCV2。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 毒株与细胞

PCV2 细胞株(PCV2-SY)由扬州大学高崧教授提供;不携带 PCV 的 PK-15 细胞由本实验室保存。

1.1.2 载体与菌株

pMD18-T 连接试剂盒购于宝生物工程(大连)有限公司,大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 和 pBluescript SK(pSK)载体由本实验室保存。

1.1.3 试剂

Taq DNA 聚合酶、dNTP、胶回收试剂盒、相关引物、DMEM 高糖培养基均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;限制性内切酶 *Xba* I、*Eco*R I、*Hind* III、T4 DNA 连接酶、南美胎牛血清、细胞胰酶消化液(含酚红)和 Lipo 6000TM 转染试剂购自碧云天生物技术有限公司;质粒提取试剂盒购自康宁生命科学(吴江)有限公司。

1.2 引物设计

从美国国家生物技术信息中心(National center for biotechnology information, NCBI)网站下载 PCV2 全基因组序列并对序列进行同源分析,利用 Primer Premier 5.0 软件设计一对用于检测 PCV2 的特异引物,以及一对扩增基因组全长的引物,并引入 *Xba* I 酶切位点,以利于下游基因操作,本研究所用引物如表 1 所示。

表 1 本研究所用引物序列

引物	序列(5'→3')	产物预期大小/ bp
TF1094	CGGATATTGTATTCTGGTCGT	378
TR1471	CCGCTCTGTGCCCTTTGA	
GF1358	CCG TCTAGAATAACAGCACTGGAG	1767
GR1363	CCG TCTAGA TGATAACTTTGTAAACAAAGG	
CapR466	TGCTGCTCTGCAACGGTCA	486/878*

注:PCV2 的 Cap 蛋白转录正常剪接扩增产物大小为 486 bp,基因组 DNA 扩增产物则为 878 bp。

1.3 PCV2 株全基因组克隆

以用常规方法提取感染病毒细胞总 DNA 为模板,利用 PCV2 特异性引物 TF1094 和 TR1471 进行 PCR。PCR 反应首先在 94 °C 进行预变性 5.0 min;接着进行 30 个循环的 94 °C 变性 30 s,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,72 °C 延伸 5.0 min。反应结束后用

1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。以上述总 DNA 为模板,利用 GF1358 和 GR1363 引物对进行 PCV2 全基因组克隆。除 PCR 扩增延伸时间延长至 1.5 min 外其它反应参数同上。将 PCR 产物回收后与 pMD[®] 18-T 克隆载体连接,转化大肠杆菌 DH5 α ,经挑取单菌落,提取并将酶切鉴定的质粒进行测序。

1.4 pSK-PCV2 重组质粒构建

将测序正确的 pMD-PCV2 质粒用 *Xba* I 酶切,凝胶电泳分离 PCV2 片段,把回收的 PCV2 DNA 与 pSK 质粒用 T4 DNA 连接酶 16 °C 连接过夜。将连接产物直接转化大肠杆菌 DH5 α ,挑取单菌落,提取质粒送公司测序。

1.5 病毒双链裸 DNA 制备及转染

提取质粒并用 *Xba* I 内切酶做酶切鉴定,将切下的目的片段用 T4 DNA 连接酶自环化,获得病毒双链环化 DNA。按照 Lipofecter 脂质体转染试剂盒说明书,将鉴定正确的环化重组质粒转染 PK-15 细胞,并在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 48 h,反复冻融 3 次后收集上清液,接种于新培养的 PK-15 细胞并连传 15 代。

1.6 病毒体外转录鉴定

根据 RNAisoTM Plus 说明书提取总 RNA,并用 DNase I 处理,以除去混有 RNA 的少量病毒 DNA,以纯化后的 RNA 为模板,利用 M-MLV 逆转录酶逆转录合成 cDNA,再用引物对 CapR466 和 GF1358 进行 PCR。除循环次数增加到 35 个外,其它扩增条件同 1.3。用 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.7 间接免疫荧光检测

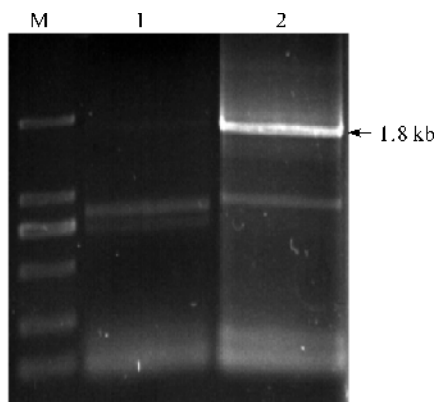
将传代培养 15 代的接毒细胞消化分装于 6 孔板,每孔注入 3.0×10^5 个细胞,在 CO₂ 培养箱中培养 48 h 后用 PBS 缓冲液洗涤,拍干,通过 100% 甲醇固定细胞 10.0 min,弃去固定液,用 PBS 清洗两次后以抗 PCV2 的 ORF2 兔多抗为一抗,37 °C 作用 1 h,FITC 标记羊抗兔荧光二抗(1:1000 稀释)为二抗,37 °C 作用 1 h,每孔加入 1 滴磷酸甘油封片液,荧光显微镜观察,以正常 PK15 细胞作为阴性对照。

2 结果与分析

2.1 PCV2 全基因组克隆及序列分析

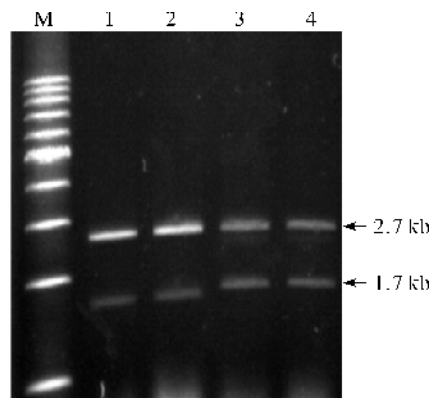
以细胞毒总 DNA 为模板,用 PCV2 全长引物对 GF1358/GR1363 扩增到约 1.8 kb 目的片段,结果如图 1 所示。将纯化的目的片段克隆到 pMD18-T 获得 pMD18-PCV2,阳性克隆经过 *Eco*R I 和 *Hind*

Ⅲ双酶切鉴定结果如图2所示。测序结果显示,本研究获得PCV2毒株基因组全长序列为1767 bp,将该序列与国内外27个代表性PCV2毒株进行序列比较,结果表明同源性在95.4%~99.9%之间,不存在明显特殊变异,与GQ996404的亲缘关系最密切,同源性达99.9%(图3)。



M:DL 2 000 DNA Marker; 1:未接毒 PK-15 细胞总 DNA;
2:接毒 PK-15 细胞总 DNA

图1 PCV2 全基因组扩增检测照片



M:1 kb DNA Ladder;1-4:重组质粒 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切

图2 重组质粒 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定照片

2.2 pSK-PCV2 重组质粒构建

质粒 pMD-PCV2 经 *Xba* I 限制性内切酶 37 °C 酶切,回收目的片段,并与 pSK 载体连接获得重组质粒 pSK-PCV2,将其再次经 *Xba* I 限制性内切酶酶切鉴定,产生与预期相符的 1767 bp 和 2961 bp 目的片段,结果如图4所示,表明 PCV2 全基因组成功克隆至载体 pSK。

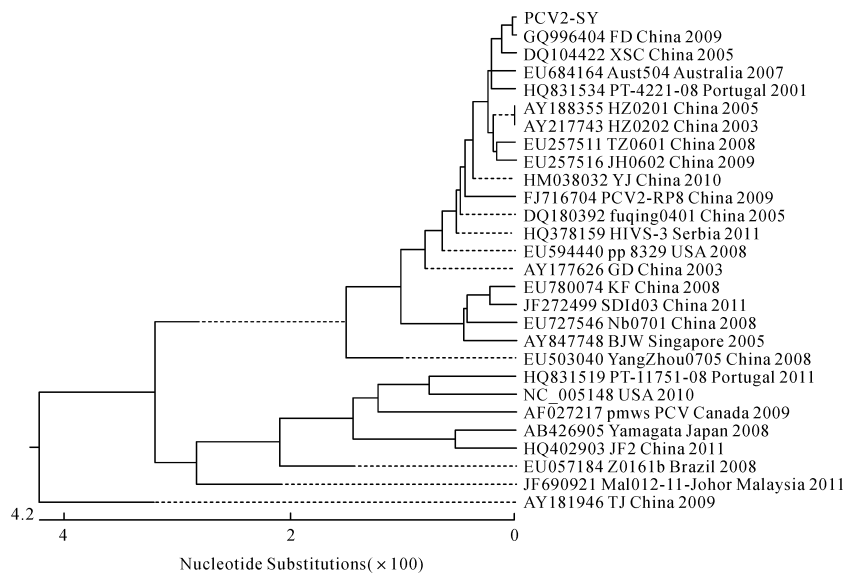
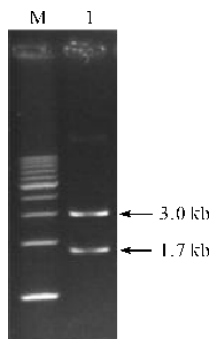


图3 PCV2-SY 毒株的系统进化关系

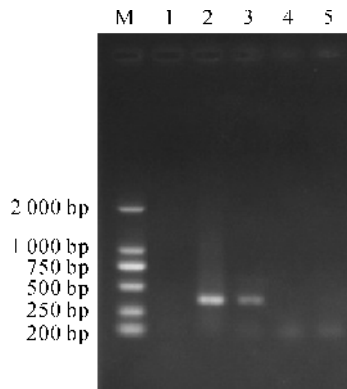


M: DNA Marker;1: *Xba* I 酶切产物

图4 pSK-PCV2 酶切鉴定照片

2.3 病毒自环化及转染

Xba I 酶切重组质粒并经凝胶电泳鉴定正确后,回收 PCV2 全基因组酶切产物并用 T4 DNA 连接酶 16 °C 连接过夜,形成自环病毒 DNA。重组病毒持续盲传 15 代,每一代都进行病毒液回收并再次感染新的 PK15 细胞,再对回收的病毒液提取 DNA 进行 PCR 检测。图5为盲传第10代 PCR 检测结果,自环化重组病毒和野毒均产生 378 bp 大小目的 PCR 产物,但 pBluescript SK-PCV2 转染细胞和 PK-15 细胞无阳性产物,表明自环化重组病毒已成功转染并可在 PK15 细胞内进行稳定复制传代。

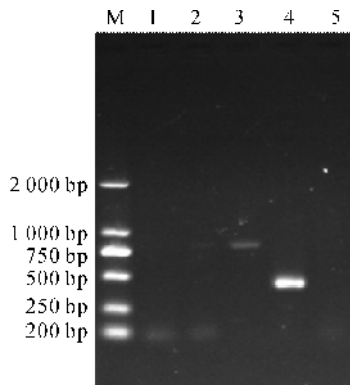


M: DNA Marker; 1: 空白阴性对照; 2: 野生 PCV2; 3: 重组 PCV2;
4: pSK-PCV2 转染 PK15 阴性细胞; 5: PK-15 阴性细胞

图 5 PCR 检测传代 10 代病毒 DNA***

2.4 病毒 Cap 蛋白基因转录检测

提取盲传 10 代的重组细胞病毒液中总 RNA 后,经 DNase I 处理,RT-PCR 扩增后电泳检测条带大小约 486 bp,表明转染细胞中 Cap 基因 mRNA 存在特异性剪接和表达(图 6)。



M: DNA Marker; 1: 阴性对照; 2: 未经 DNase I 处理 PCV2 RNA;
3: PCV2 DNA; 4: DNase I 处理的 PCV2 RNA;
5: PK-15 阴性细胞 RNA

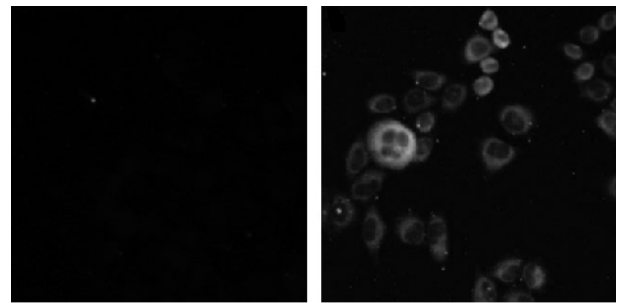
图 6 重组病毒 Cap RNA 检测

2.4 间接免疫荧光检测

重组病毒感染爬片细胞后 48 h 利用 IFA 检测 PCV2 ORF2 表达,结果如图 7 所示,重组 PCV2 感染细胞用抗 PCV2 ORF2 抗体为一抗在荧光显微镜下检测到特异性绿色荧光,而阴性对照细胞无特异荧光产生,因此自环病毒在体外转染后再感染细胞可以产生具感染性的子代 PCV2 病毒。

3 讨 论

越来越多的研究表明,PCV2 通常以混合感染的方式引起猪只 PMWS,因此由 PCV2 混合感染病料直接接种细胞难以获得纯的 PCV2 病毒,给 PCV2 相关研究增加难度^[20-22]。Meerts 等^[23]发现,PCV2 在接种



(a) 未感染对照细胞 (b) 重组病毒感染细胞

图 7 重组病毒感染 PK-15 细胞间接免疫荧光检测

后 6~12 h 的 PK-15 细胞内可检测到 Cap 蛋白表达,接种后 12~24 h 的 Cap 主要分布在细胞核周围,并有子代病毒产生。通过细胞连续传代表明 PCV2 增殖能力较强,因而利用病毒的感染性 DNA 克隆,获得遗传背景单纯的拯救病毒,是 PCV2 致病机理、相关疾病防治和疫苗开发研究的有力工具。

国内外已有应用 PCV2 全基因组复制出完整病毒的报道。Liu 等^[24]构建含有 PCV2 全基因组的重组质粒,体外环化转染猪视网膜细胞系得到具有感染性的病毒,应用构建的感染性病毒在进行致病性实验时可避免其它病毒的干扰,容易定量和在细胞传代过程中不易产生变异等优点。Fenaux 等^[25]和郝鑫等^[26]用酶切位点 *Sac* II 构建 PCV2 体外感染性分子克隆,但采用体外自环的方式将 PCV2 全基因环化再转染 PCV 阴性 PK15 细胞,在其子代细胞中检测到病毒相应的抗原,而 Fenaux 将线性化的两条单拷贝 PCV2 同向连接在一起,利用酶切位点 *Sac* II 与 pBluescript SK 载体连接构成重组质粒后转染 PK-15 细胞,再感染以获得成熟病毒粒子,同时发现双拷贝比单拷贝体外转染细胞效率高。本研究利用高拷贝的质粒载体 pMD18-T 正向插入单拷贝的 PCV2 全基因,两端引物含 *Xba* I 序列重叠,经自环化显示构建的自环化质粒 ds-PCV2 具有感染性,但与李俊等^[27]研究结果不同,重组质粒 pSK-PCV2 转染 PK-15 细胞没有检测到子代病毒,推测与 PCV2 的滚环复制机制和共价闭环状 DNA 基因组有关^[28-29]。连到 pBluescript SK 载体上的 PCV2 全基因组 DNA 分子因载体序列的分隔使 PCV2 全基因组不连续,因而失去部分重要功能。另一种可能原因是由于重组质粒 pSK-PCV2 转染产生子代病毒但在 PK-15 细胞中的增殖滴度不高,基因组转染效率较差,导致转染后细胞 PCR 检测呈阴性。

4 结 论

本文通过 PCR 成功扩增出 PCV2 1767bp 全基

基因组,利用设计的一对含 *Xba* I 酶切位点的特异性引物成功构建 PMD-PCV2 重组质粒。将质粒体外酶切自环化后转染 PK-15 细胞并检测到 PCV2 病毒的复制,结果表明,本研究成功构建 PCV2 全长 DNA 克隆和拯救病毒。经过测序的 PCV2-SY 株系为 PCV2b 亚型,与国内外毒株有着极高的同源性,介于 95.4%~99.9% 之间,具有很强的代表性,为后续研究 PCV2 病毒致病机理、疫苗开发和有效治疗奠定基础。

参考文献:

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京:科学出版社, 1997:27-30.
- [2] Tischer I, Gelderblom H, Vetteermann W, et al. A very small porcine virus with circular single stranded DNA[J]. *Nature*,1982,295(7):64-66.
- [3] Allan G M and Ellis J A. Porcine circoviruses: A review [J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2000,12(1):3-14.
- [4] Opriessnig T, Meng X J and Halbur P G. Porcine circovirus type 2 associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2007, 19 (6): 591-615.
- [5] Palinski R, Pineyro P, Shang P, et al. A novel porcine circovirus distantly related to known circoviruses is associated with porcine dermatitis and nephropathy syndrome and reproductive failure[J]. *Journal of Virology*, 2016,91(1):e01879-16.
- [6] Allan G, Meehan B, Todd D, et al. Novel porcine circovirus from pigs with wasting disease syndromes[J]. *Veterinary Record*,1998,142(17):467-468.
- [7] Morozov I, Sirinarumit T, Sorden S, et al. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome[J]. *Journal of Clinical Microbiology*,1998,36(9):2535-2541.
- [8] Hamel A, Lin L, Nayar G P. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs[J]. *Journal of Virology*, 1998,72(6):5262-5267.
- [9] Allan G M, Ellis J A. Porcine circoviruses: A review[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*,2000,12 (1):3-14.
- [10] Segalés J, Allan G M, Domingo M. Porcine circovirus diseases[J]. *Animal Health Research Reviews*,2005, 6(2):119-142.
- [11] Cheung A K. Comparative analysis of the transcriptional patterns of pathogenic and nonpathogenic porcine circoviruses[J]. *Virology*,2003,310(1):41-49.
- [12] Mankertz A, Hillenbrand B. Replication of porcine circovirus type 1 requires two proteins encoded by the viral rep gene[J]. *Virology*,2001,279(2):429-438.
- [13] Nawagitgul P, Morozov I, Bolin S R, et al. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein[J]. *Journal of General Virology*, 2000,81(9):2281-2287.
- [14] Mahé D, Blanchard P, Truong C, et al. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes [J]. *Journal of General Virology*, 2000, 81 (7):1815-1824.
- [15] Liu J, Chen I, Kwang J. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis[J]. *Journal of Virology*,2005,79(13):8262-8274.
- [16] He J, Cao J, Zhou N, et al. Identification and functional analysis of the novel ORF4 protein encoded by porcine circovirus type 2[J]. *Journal of Virology*,2013,87(3): 1420-1429.
- [17] Gao Z, Dong Q, Jiang Y, et al. ORF4-protein deficient PCV2 mutants enhance virus-induced apoptosis and show differential expression of mRNAs in vitro[J]. *Virus Research*,2014,183(7):56-62.
- [18] Lv Q Z, Guo K K, Xu H, et al. Identification of putative ORF5 protein of porcine circovirus type 2 and functional analysis of GFP-Fused ORF5 protein [J]. *PLoS One*,2015,10:e0127859.
- [19] Li D, Wang J, Xu S, et al. Identification and functional analysis of the novel ORF6 protein of porcine circovirus type 2 in vitro[J]. *Veterinary Research Communications*, 2018,42(1):1-10.
- [20] Opriessnig T, Meng X J, Halbur P G. Porcine circovirus type 2-associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*,2007,19(6):591-615.
- [21] 郭龙军,陆月华,黄立平,等. 猪圆环病毒 2 型不同基因型毒株感染性克隆的构建及拯救毒株的体外生物学特性[J]. *中国农业科学*,2011,44(23):4918-4925.
- [22] 杨顺利,尹双辉,沈小燕,等. 猪圆环病毒 2 型感染性 DNA 的构建及病毒拯救[J]. *中国兽医学报*,2011,31 (2):169-173.
- [23] Meerts P, Misinzo G, McNeilly F, et al. Replication kinetics of different porcine circovirus 2 strains in PK-15

- cells[J]. Archives of Virology, 2005, 150(3):427-441.
- [24] Liu Q, Wang L, Willson P, Babiuk L A. Quantitative competitive PCR analysis of porcine circovirus DNA in serum from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38(9):3474-3477.
- [25] 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, 76(2):541-551.
- [26] 郗鑫, 陈焕春, 陈华平, 等. 猪Ⅱ型圆环病毒全基因组的克隆及感染性鉴定[J]. 微生物学报, 2004, 44(2):172-176.
- [27] 李俊, 时建立, 于周, 等. 猪圆环病毒2型双拷贝感染性DNA的构建及体外拯救[J]. 生物工程学报, 2009, 25(11):1633-1638.
- [28] Hamel A L, Lin L L, Nayar G P. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs[J]. Journal of Virology, 1998, 72(6):5262-5267.
- [29] Cheung A K. Rolling-circle replication of an animal circovirus genome in a theta-replicating bacterial plasmid in Escherichia coli[J]. Journal of Virology, 2006, 80(17):8686-8694.

Cloning and virus rescue of full length genome of porcine circovirus type 2

WANG Zining, GAO Zhangzhao, DONG Qinfang, QUAN Yanping, JIANG Yonghou

(College of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: In order to construct the infectious DNA clone of *Porcine circovirus 2* (PCV2), the adapted strain cultured with PCV2 cell separated from lymphadenopathy tissues was used as the material, the overlap primer was designed in the *Xba* I enzyme cutting site area of PCV2 genome sequence through gene sequence analysis and comparison to conduct full length amplification and clone it to pMD-18T and pBluescript SK so as to gain the carriers pMD-PCV2 and pBluescript SK-PCV2. After amplification of pMD-PCV2 recombinant plasmid in quantity, *Xba* I was used to cut PCV2 whole genome, and T4 DNA ligase was used in vitro to make it auto-cyclized. Auto-cyclized product of PCV2 was transfected to PK15 cell by liposome method. After 15 continuous passages, PCR, RT-PCR and indirect immunofluorescence assay (IFA) were used to detect replication, transcription and protein expression of PCV2. In this research, DNA of whole genome of infective PCV2 was successfully constructed. Thus, this research lays a foundation for the research on PCV2 pathogenesis and gene functions.

Key words: *Porcine circovirus* type 2; full length genome cloning; cell transfection; virus rescue

(责任编辑: 唐志荣)