

类猪圆环病毒 P1 的感染及其分子特征

温立斌¹, 何孔旺¹, 王凤芝², 俞正玉¹, 茅爱华¹, 解建平¹

(1. 江苏省农业科学院 兽医研究所 农业部兽用生物制品工程技术重点实验室,
国家兽用生物制品工程技术研究中心 江苏 南京 210014; 2. 南京农业大学 江苏 南京 210095)

摘要: 类猪圆环病毒 P1 是新发现的一种病原,能引起仔猪出现类似猪断奶后多系统衰竭综合征症状,是目前所知的具有最小基因组的病毒。为了解 P1 感染范围和基因组分子特征,采用 PCR 方法扩增 P1 全基因组,克隆测序后,应用生物信息学进行序列同源性比较及遗传进化分析。结果显示,P1 已在我国猪场流行,分离株之间的核苷酸序列同源性为 99.1%~100%,可分为 2 个亚分支;同时免疫组化结果也证实了 P1 在样品中的分布。

关键词: 类猪圆环病毒 P1; PCR; 免疫组化; 分子特征

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2013)05-0034-04

Porcine Circovirus like Virus P1 Infection and Its Molecular Characteristics

WEN Li-bin¹, HE Kong-wang¹, WANG Feng-zhi², YU Zheng-yu¹, MAO Ai-hua¹, XIE Jian-ping¹

(1. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Veterinary Biological Engineering and Technology, Ministry of Agriculture, National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China; 2. Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Porcine circovirus like virus P1 is a new pathogen emerging in porcine and causing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-like signs. P1 has the smallest genome up to now. To investigate the prevalence and molecular characteristics of P1, complete viral DNA genome sequences were amplified by PCR, cloned and sequenced. Bioinformatics was employed to analyze the nucleotide sequence and phylogeny. The results of this study indicated that the prevalence of P1 in the pig farms were quite high, the nucleotide sequence similarity of P1 was 99.1% to 100%, and it could be classified in two sublineage; Meanwhile, distribution of P1 in samples were also detected by immunohistochemistry.

Key words: Porcine circovirus like virus P1; PCR; Immunohistochemistry; Molecular characteristics

猪圆环病毒相关疾病(PCVAD)首次报道于20世纪90年代早期,之后迅速流行,成为危害世界养猪业健康发展最为重要的疾病之一^[1]。PCVAD包括多种多症候疾病,如猪断奶后多系统衰竭综合征(PMWS)、猪皮炎与肾病综合征(PDNS)、猪呼吸疾病综合征(PRDC)、繁殖障碍等^[2-5]。目前认为,PCVAD与猪圆环病毒2型(PCV2)有关^[6-7],PCV2属于圆环病毒科成员,该科包括一群能感染禽和猪的小的、单股环状DNA病毒。在圆环病毒属成员中,与PCV2关系最紧密的是PCV1,它最早被认为是猪肾细胞的污染物,目前普遍认为其对猪没有致病性^[8-10]。在研究PCV2过程中,首先发现了类猪

圆环病毒因子P1和P2,同PCV2一样,它们也具有环状DNA基因组,全长分别为648、993个核苷酸,为止目前拥有最小基因组的病毒。除大部分核苷酸序列与PCV2 ORF2高度同源外,它们的基因组序列还包含外源序列^[11-12],推测它们起源于PCV2与其他分子的重组。通过构建P1的分子克隆,证实了其在体内的感染性,接种猪出现病毒血症;有的出现了体质量减轻、皮肤苍白和腹泻等现象,与PMWS相似;病变主要有脑充血、膀胱黏膜出血、腹股沟淋巴结出血、肺萎缩和出血;组织学变化表现为蛛网膜下腔血管充血、间质性肺炎、心肌萎缩、扁桃体滤泡组织细胞增生以及胰腺细胞坏死等。利用PCR和

收稿日期:2013-07-07

基金项目:国家自然科学基金项目(31272574;30972184);江苏省农业科技自主创新资金项目(CX(11)2060)

作者简介:温立斌(1967-),男,河北宣化人,研究员,博士,主要从事动物分子病毒学与免疫学研究。

免疫组化等方法可以分别从肺、脑、心、肝、膀胱、胰、性腺等不同程度地检测到 P1 的核酸和抗原^[13]。先在江苏猪场的调查中发现, 50% 的猪场及近 20% 的猪感染了 P1^[14]。对于 P1 的感染范围及其分子进化特征的研究, 为更好地了解 PCVAD 的本质及 P1 与 PCV2 的关系提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 样品

样品于 2009 – 2012 年在中国中东部(河南、河北、浙江、江苏、安徽和上海) 83 个猪场、屠宰场采集, 包括 1 067 份血清, 14 份肺脏和 2 份空肠。其中 407 份血清来源于 30 个不同的健康猪场, 660 份血清来自临床有 PMWS 的猪场, 14 份肺脏来自屠宰场外观有病变的肺脏; 2 份空肠来源于腹泻引起死亡的 3 日龄猪。

1.2 仪器与试剂

柱式病毒 DNAout 试剂盒为北京天恩泽基因科技有限公司产品; pMD18-T 载体为 TaKaRa 产品; AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒为爱思进生物技术(杭州) 有限公司产品; Trans5 α 大肠杆菌感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司; 兔抗 P1 表位肽抗体由江苏省农科院兽医所人兽共患病防控研究室保存; 免疫组化染色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。Tissue-Tek VIP 脱水仪为 Sakura Finetek Japan Co., Ltd 产品; Tissue-Tek Tec 恒温包埋仪为 Sakura Finetek Japan Co., Ltd 产品; Leica RM 2235 切片机为 Germany 产品。

1.3 引物

依据江苏省农科院兽医所人兽共患病防控研究室登录 GenBank 的类猪圆环病毒 P1 的基因组序列(登录号: EF514716), 利用 Oligo 6.0 软件设计一对特异性引物, 上游: 5'-TTAAAGACCCCCACTTAA ACCCTAAATGA-3', 下游: 5'-AGTGGGGGTCTTTAA GATTAAATTCTCTG-3', 其可扩增 P1 病毒的完整基因组。引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

1.4 病毒 DNA 的提取、扩增及克隆

应用病毒基因组 DNA 提取试剂盒从血清和组织中提取基因组, 其中血清不加处理, 组织用 PBS 做 1:5 匀浆, 反复冻融 3 次, 离心取上清。将提取的 DNA 模板置 -20 °C 保存。PCR 总体系 50 μ L。扩增条件为: 95 °C 5 min 预变性; 然后 95 °C 45 s, 56 °C 45 s, 72 °C 45 s, 35 个循环; 72 °C 再延伸 10 min。经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 将 PCR 扩增产物用胶回收试剂盒回收, 然后克隆于 pMD18-T 载体, 转化

Trans5 α 大肠杆菌, 摇菌提取质粒, 经 PCR 和酶切鉴定后, 交南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

1.5 序列比较与系统进化分析

对测得的 P1 核苷酸序列和推导的氨基酸序列进行同源性比较的分析软件为 DNAMAN 5.2.2; 通过 Neighbor-Joining 方法建立系统进化树的分析软件为 MEGA 3.1。同时与选取的 PCV2(AF381175) 和 PCV1(GU722334) 一同进行系统发育分析, Bootstrap 检验值设为 1 000。

1.6 石蜡切片的制备

将采集的肺脏和空肠立即用 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液固定 24 h, 用 PBS(0.01 mol/L pH 值 7.4) 洗涤 2 次, 每次 30 min, 然后按常规步骤使组织块脱水至透明, 浸透和包埋, 修整后, 切成 4 μ m 的组织切片。将切片展开在用多聚赖氨酸处理的载玻片上, 于 37 °C 温箱中烤片 12 h 后, 备用。

1.7 免疫组化染色

石蜡切片脱蜡、水化; 30% H₂O₂ 室温孵育 10 min; 蒸馏水冲洗, 微波炉内抗原修复 15 min; 自然冷却后, PBS 冲洗 2 次; 5% BSA 室温封闭 20 min; 倾去血清, 滴加 1:40 稀释的兔抗 P1 表位肽多克隆抗体(一抗), 37 °C 孵育 1 h; PBS 冲洗 2 min \times 3 次; 滴加 IgG 抗体—HRP 多聚体(抗兔), 室温孵育 20 min; PBS 冲洗 5 min \times 3 次; DAB 显色; 自来水冲洗, 苏木素轻度复染, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 封片镜检。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。结果判定: P1 病毒抗原阳性细胞呈棕黄色, 阴性细胞不着色。

2 结果与分析

2.1 P1 感染情况

从表 1 可知, 从临床无 PMWS 猪场采集的 407 份血清中, 有 36 份阳性, 阳性率为 8.85%; 而有 PMWS 猪场所采集的 660 份血清中, 有 225 份阳性, 阳性率为 32.3%; 同时肺脏和空肠也有较高比例的 P1 感染。

2.2 P1 分子进化特征

选取不同时间、不同地区的 P1 代表毒株 22 株进行了进化分析, 它们的 GenBank 登录号分别是 JF803741、JF918541-44、JN040276-79、JN104035-37、JN104039 和 JN207908-14。核苷酸序列分析表明, 22 株 P1 同源性为 99.1% ~ 100%。ORF1、ORF2 和 ORF3 编码的氨基酸序列同源性分别为 99.1% ~ 100%, 99.1% ~ 100%, 99.3% ~ 100%。

系统进化分析表明, P1 与 PCV2 比与 PCV1 有更近的亲缘关系, 从图 1 中可见, 虽然 Bootstrap 检

验值不算高,但也可将 P1 细分为 2 个分支,它们主要的区别在于 170 位的 G/A 突变,而且此位点核苷

酸的突变似乎与 P1 分布的地理区域有关。

表 1 PCR 检测 2009–2012 中国不同猪场 P1 感染结果

Tab.1 Detection of P1 by PCR in different farms from China during 2009–2012

| 省(市) Provinces (Municipality) | 临床 PMWS History of PMWS | 样品种类 Sample types | 样品数量/份 Number of samples | P1 阳性份数(阳性率 /%) No. PCR P1 positive pigs(Positive rate) |
|--|----------------------------|----------------------|-----------------------------|---|
| 江苏、浙江 Jiangsu Zhejiang | 无 | 血清 | 407 | 36(8.85) |
| 江苏、浙江、安徽、上海 Jiangsu Zhejiang Anhui Shanghai | 有 | 血清 | 660 | 225(32.3) |
| 河南、安徽 Henan Anhui | 未知 | 肺脏 | 14 | 10(71.4) |
| 河北 Hebei | 未知 | 空肠 | 2 | 2(100) |

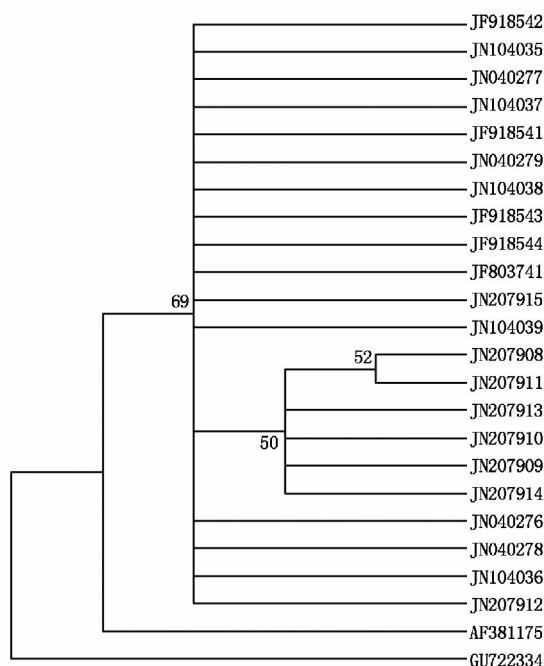
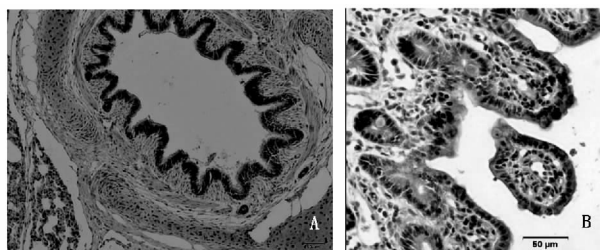


图 1 中国 22 株类圆环病毒 P1 的系统发育分析
Fig.1 Schematic phylogeny showing the genome sequences of the twenty-two porcine circovirus-like virus P1 from China swine herds based on the neighbor-joining method using Mega version 3.1



A. 肺脏; B. 空肠。
A. Lung; B. Jejunum.

图 2 肺脏和空肠的免疫组化检测 P1 结果

Fig.2 Immunohistochemical staining of lung and jejunum samples from P1-positive pigs from China

2.3 肺脏和空肠的免疫组化检测结果

从肺脏提取 DNA 模板进行 P1 PCR 扩增阴性的以及用 PBS 代替一抗作为对照的都无阳性信号出现;PCR 检测阳性(包括 2 份空肠)的有阳性信号

(图 2)。在肺脏 P1 抗原强阳性信号出现在肺泡及小支气管上皮细胞中,软骨细胞也呈阳性反应(图 2-A);在空肠则主要分布在杯状细胞中(图 2-B)。

3 讨论

P1 自发现以来,由于其拥有目前所知的最小基因组,又拥有与 PCV2 高度同源的核苷酸序列,因此对其深入研究、对 PCV2 进化乃至生命起源都有积极意义。本研究表明,P1 已在中国猪场流行,而且在呈现 PMWS 猪群中其感染比例远远高于临床表现健康猪群的感染率,说明 P1 与 PMWS 之间存在一定关系。

Firth 等^[15]于 2009 年根据 160 株 PCV2 全基因组分析,得出其突变率为 1.2×10^{-3} 置换/位点/年,另一报道的结果也与其相似,突变率为 $3.1 \times 10^{-3} \sim 6.6 \times 10^{-3}$ 置换/位点/年^[16]。研究结果表明,对于 DNA 病毒来说,PCV2 存在较高的突变率,与许多 RNA 病毒突变率相似^[17]。在这点上,P1 与 PCV2 类似。虽然 P1 全基因组只有 648 个核苷酸,但进化分析表明,P1 也可分为 2 个小分支,突变的主要位点虽然未引起所编码氨基酸的差异,但也间接说明 P1 一直处于活跃的进化过程中。

对肺脏进行免疫组化检测 P1 结果表明,在小支气管和肺泡等上皮细胞中呈强阳性反应,推测其在猪呼吸道疾病中起着一定作用;对空肠进行的检测结果表明,P1 主要感染空肠的杯状细胞,以前认为肠道内杯状细胞只发挥一种作用,即分泌黏液。但最近研究表明,杯状细胞在将抗原传输到树突细胞过程中起关键作用^[18],因此 P1 病毒感染杯状细胞,有可能对机体的免疫功能造成一定影响。近年来,由流行性腹泻病毒引起的仔猪死亡情况严重,本次所采集的空肠也正是来源于腹泻引起死亡的仔猪,P1 是否参与疾病过程及机制还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Allan G M ,Ellis J A. Porcine circoviruses: a review[J]. J Vet Diagn Invest 2000 ,12: 3 – 14.
- [2] Chae C. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology ,diagnosis and pathology [J]. Vet J , 2004 ,168(1) : 41 – 49.
- [3] Chae C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases [J]. Vet J 2005 ,169: 326 – 336.
- [4] 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]. J Vet Diagn Invest 2007 ,19(6) : 591 – 615.
- [5] Ramamoorthy S ,Meng X J. Porcine circoviruses: a minuscule yet mammoth paradox [J]. Anim Health Res Rev , 2009 ,10(1) : 1 – 20.
- [6] Clark E G. Post-weaning wasting syndrome [J]. Proc Am Assoc Swine Pract ,1997 ,28: 499 – 501.
- [7] Harding J C S. Post-weaning multisystemic wasting syndrome(PMWS) : preliminary epidemiology and clinical presentation [J]. Proc Am Assoc Swine Pract ,1997 ,28: 503.
- [8] Tischer I ,Gelderblom H ,Vettermann W ,et al. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA [J]. Nature ,1982 295(5844) : 64 – 66.
- [9] Tischer I ,Mields W ,Wolff D ,et al. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus [J]. Arch Virol ,1986 91(3 – 4) : 271 – 276.
- [10] Tischer I ,Rasch R ,Tochtermann G. Characterization of papovavirus-and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines [J]. Zentralbl Bakteriolog A , 1974 226(2) : 153 – 167.
- [11] Wen L B ,He K W ,Yu Z Y ,et al. Complete genome sequence of a novel porcine circovirus-like agent [J]. J Virol 2012 ,86(1) : 639.
- [12] Wen L ,He K ,Yang H ,et al. Complete nucleotide sequence of a novel porcine circovirus-like agent and its infectivity in vitro [J]. Sci China C Life Sci ,2008 ,51(5) : 453 – 458.
- [13] Wen L ,He K ,Xiao Q ,et al. A novel porcine circovirus-like agent P1 is associated with wasting syndromes in pigs [J]. PLoS One 2012 ,7(8) : e41565.
- [14] Wen L ,He K ,Yang H ,et al. Prevalence of porcine circovirus-like agent P1 in Jiangsu ,China [J]. Virol J 2011 , 8: 543.
- [15] Firth C ,Charleston M A ,Duffy S ,et al. Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: porcine circovirus 2 [J]. J Virol 2009 ,83(24) : 12813 – 12821.
- [16] Pérez L J ,de Arce H D ,Cortey M ,et al. Phylogenetic networks to study the origin and evolution of porcine circovirus type 2 (PCV2) in Cuba [J]. Vet Microbiol , 2011 ,151(3 – 4) : 245 – 254.
- [17] Duffy S ,Shackelton L A ,Holmes E C. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants [J]. Nat Rev Genet 2008 9(4) : 267 – 276.
- [18] McDole J R ,Wheeler L W ,McDonald K G ,et al. Goblet cells deliver luminal antigen to CD103 + dendritic cells in the small intestine [J]. Nature 2012 ,483(7389) : 345 – 349.