

赵 靓, 白彩霞, 王小朋, 等. 猪细小病毒 6 型全基因组克隆及遗传进化分析[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(5): 1154-1160.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.05.022

猪细小病毒 6 型全基因组克隆及遗传进化分析

赵 靓¹, 白彩霞¹, 王小朋¹, 杨侃侃¹, 张 达¹, 李永东², 孙 裴¹, 王 勇¹

(1. 安徽农业大学动物科技学院, 安徽 合肥 230036; 2. 宁波市疾病预防控制中心, 浙江 宁波 315010)

摘要: 对猪细小病毒 6 型(PPV6)安徽分离株 PPV6 AH 进行全基因组序列克隆, 并进行遗传进化树构建及同源性分析。将病毒基因分 10 段进行 PCR 扩增并测序, 用 SeqMan 进行拼接, 获得全基因组序列。将 PPV6 AH 株与 GenBank 中 PPV6 其他毒株进行遗传进化分析。结果显示, PPV6 AH 基因组全长 6 180 bp, 与其他国内外 15 株 PPV6 全基因的核苷酸序列同源性达到 97.1%~99.5%。基于 *PPV6* 全基因、*NSI* 及 *Cap* 基因构建的遗传进化树显示 PPV6 AH 株与 PPV6 BJ、BJ2、SC 及 JS 株有着共同的进化起源。*NSI* 基因第 708、996、1 932 核苷酸位点发生突变; *Cap* 基因在第 1 205、1 211、1 582、1 614 核苷酸位点发生突变; *Cap* 蛋白氨基酸在第 402 和 404 位点发生突变。本研究首次报道 PPV6 在安徽省猪群中存在, 该研究结果为安徽地区 PPV6 的分子遗传进化特征提供了一定的参考。

关键词: 猪细小病毒 6 型; 全基因组; 同源性分析; 遗传进化分析

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2019)05-1154-07

Cloning and genetic evolution analysis of whole genome of porcine parvovirus type 6

ZHAO Liang¹, BAI Cai-xia¹, WANG Xiao-peng¹, YANG Kan-kan¹, ZHANG Da¹, LI Yong-dong²,
SUN Pei¹, WANG Yong¹

(1. Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2. Ningbo Municipal Center for Disease Control and Prevention, Ningbo 315010, China)

Abstract: The whole genome of porcine parvovirus type 6 (PPV6) Anhui (AH) strain was cloned, and the genetic evolution and homologies were analyzed in this study. The virus genes were divided into 10 segments for PCR amplification. After been sequenced, the SeqMan software was used for splicing to obtain the whole genome sequence. Genetic evolution analysis of PPV6 AH strain and other strains of PPV6 in GenBank was conducted. The results showed that the total length of the PPV6 AH genome was 6 180 bp. And the nucleotide homology was 97.1%~99.5% compared with other 15 domestic and foreign PPV6 genes. The genetic tree constructed based on *PPV6* gene, *NSI* gene and *Cap* gene showed that PPV6 AH strain had common evolutionary origin with PPV6 BJ, BJ2, SC and JS strain. Mutations occurred at nucleotide sites 708,

996 and 1 932 of *NSI* gene. The *Cap* gene was mutated at nucleoside sites 1 205, 1 211, 1 582 and 1 614. Amino acids of *Cap* protein mutated at 402 and 404. In this study, it was first reported that PPV6 existed in pigs in Anhui province. The results of this study provided references for the molecular genetic and evolutionary characteristics of PPV6 in Anhui province.

Key words: porcine parvovirus type 6; whole genome; homology analysis; genetic evolution analysis

收稿日期: 2019-05-24

基金项目: 家畜疫病病原生物学国家重点实验室开放课题(SKLVE-B2016KFKT003); 安徽省自然科学基金项目(1708085MC-83); 国家自然科学基金项目(31602063)

作者简介: 赵 靓(1995-), 女, 安徽合肥人, 硕士研究生, 主要从事动物传染病研究。(E-mail) no.zl.jump@gmail.com; 白彩霞为共同第一作者。

通讯作者: 孙 裴, (E-mail) sunpei@ahau.edu.cn; 王 勇, (E-mail) wangyong119@ahau.edu.cn

细小病毒是属于细小病毒科的单链非囊膜线性 DNA 病毒,其基因组大小为 4.0~6.3 kb,由 5' 端 UTR、非结构蛋白(NS1)、结构蛋白(Cap)和 3' 端 UTR 组成。细小病毒科宿主范围广,可根据感染宿主的不同分为感染脊椎动物的 Parvovirinae 亚科和感染节肢动物的 Densovirinae 亚科。Parvovirinae 亚科由 9 个属组成,包括 *Dependoparvovirus*、*Copiparvovirus*、*Bocaparvovirus*、*Amdoparvovirus*、*Aveparvovirus*、*Protoparvovirus*、*Tetraparvovirus*、*Erythroparvovirus* 和 *Marinoparvovirus*^[1]。猪细小病毒 1 型(PPV1)属于 *Protoparvovirus* 属,于 1965 年首次从德国的细胞培养污染物中分离得到^[2-3]。PPV1 被认为是导致发生猪繁殖障碍的主要原因之一^[1,4],主要表现为怀孕母猪出现流产、产死胎、畸形胎或木乃伊胎等症状,造成了全球养猪业巨大的经济损失^[4]。

在过去的二十年中,在猪的身上检测发现一些新型的猪细小病毒,分别被命名为 PPV2~PPV7。PPV2 是 2001 年在缅甸的一次戊型肝炎病毒血清调查中发现的^[5]。PPV3 又称 PARV4 或 Hokovirus,与人类细小病毒 4 型(PARV4)密切相关,于 2008 年在中国香港被发现^[6]。PPV4、PPV5 和 PPV6 是近年来发现的,属于 *Copiparvovirus* 属^[1]。与其他猪细小病毒相比,PPV4 拥有一个额外的 ORF3,它于 2010 年在与 PCV2 共同感染的猪中被发现^[7]。2013 年和 2014 年,在中国和北美分别发现了 PPV5 和 PPV6^[8-11]。基于遗传进化分析显示,PPV4、PPV5 和 PPV6 密切相关,形成一个明显的分支^[9,11]。PPV7 是 2016 年美国研究人员通过对猪直肠拭子进行宏基因组测序发现的一种细小病毒^[12]。然而,目前仍不清楚这些新发现的 PPV 基因型是否与临床症状有关。

本研究从安徽地区采集到患病猪的 7 份临床样品,从中检测发现有一个样本呈现 PPV6 阳性。本研究对其进行全基因组克隆及遗传进化分析,为后续开展 PPV6 相关研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 病料来源

7 份有发生流产现象的死猪肝脏及肺脏样本,采集于安徽省部分地区,样本放置-80℃冰箱保存备用。

1.2 主要试剂

病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、2×Taq PCR MasterMix、DL2000 DNA Marker 和 DH5α 感受态细胞均购自 TIANGEN 公司,50×TAE 缓冲液和 GoldView I 型核酸染色剂(×10 000)购自北京索莱宝科技有限公司,pMD™19-T Vector、Solution I 购自宝日医生物技术(北京)有限公司(TaKaRa 中国),质粒 DNA 小量试剂盒购自 AXYGENT 公司。

1.3 引物的设计与合成

根据 GenBank 登录的 PPV6 基因序列(登录号:KY094494),利用 Primer Premier 5.0 软件,分别设计 1 对 PPV6 鉴定引物和 10 对特异性引物,用于扩增 PPV6 全基因序列。引物由通用生物系统有限公司合成(表 1)。

1.4 病毒 DNA 提取

取适量采集的肝肺组织放置研钵中,加入含终含量为 1 000 IU/ml 的青霉素和链霉素的 PBS (pH7.4)中充分碾磨至匀浆。反复冻融 3 次后,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液置于-80℃冰箱待用。根据病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒使用说明提取病毒基因组 DNA,提取后的 DNA 模板放置于-20℃备用。

1.5 阳性 PPV6 样本检测

以上述提取的 DNA 产物为模板,使用鉴定引物 PPV6-F/PPV6-R 进行常规 PCR。反应体系 20 μl: 2×Taq PCR Master Mix 10 μl, DNA 模板 1 μl, 上、下游引物各 1 μl, ddH₂O 补足至 20 μl。反应程序为: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 54℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30 个循环; 72℃ 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,回收并纯化扩增产物,将其克隆至 pMD™19-T 载体中,转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中,涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板,放置 37℃ 培养箱培养过夜,次日筛选阳性单克隆提取质粒,将鉴定正确的阳性重组质粒送至南京擎科生物科技有限公司进行测序。测序结果进行 BLAST 比对验证。

1.6 目的基因分段扩增及测序

以检测出 PPV6 阳性样品为模板,用特异性引物(表 1)进行 PCR 扩增。反应体系 20 μl: 2×Taq PCR Master Mix 10 μl, DNA 模板 1 μl, 上、下游引物各 1 μl, ddH₂O 补足至 20 μl。反应程序为: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 退火(每对引物有对应的退火温度)

30 s, 72 °C (每对引物的长度不同有对应的延伸时间), 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经 1 % 琼脂糖凝胶电泳进行检测后, 参照方法 1.5 的方法步骤进行测序。

表 1 PPV6 全基因扩增引物序列

Table 1 Primer sequences for the whole genome amplification of PPV6

引物名称	序列 (5'→3')	位置	大小(bp)
PPV6-F	AGCATTTTCTCTGTTC-CAGATCCT		
PPV6-R	ATCTTCCTCTTGTTCCTCTTTA		495
F1	GGCGCGCGGAAGTGACGTTT		
R1	TAAGACACCTGCAGCCAATG	1~458	457
F2	TGACTCCTGAGCGGTATATT-TATGC		
R2	CGGCGCTCCGTAGTCACAT	358~985	627
F3	TGATAATGATGTGACTACG-GAGCGC		
R3	GCTGGGCCTTTCTCATGTAC	959~1761	802
F4	CCATGTTCTTCTGGCAATT		
R4	GAATCTATCTACATCCTGAT-AGGCT	1 652~2 484	832
F5	CGTCCTTCTACCTCAG-CATCTT		
R5	GATTATGAAGCCAGACGAC-CC	2 389~3 336	947
F6	TGCGATGTGACAATCTCCAC		
R6	CTCGCTGAGCATTATCCAAGT	3 013~3 700	687
F7	CTTCGTCTTGCCTTCTCAC-CACTAC		
R7	CACTAGAGACTGGATGCT-CACTTTA	3 528~4 446	918
F8	CCTTGGTGCTATTATGATCT		
R8	TGGCGGTCTATCATGACCTT	4 321~4 957	636
F9	CCTTTTCGGTTCAAAGGTCAT-GATA		
R9	TTGGGTCTAGGCTTAACCTT-CCATA	4 924~5 714	790
F10	CCTCCTAATGTCAGTACTTGC		
R10	GTGCACAAAATAAAAGTGT-GATGGT	5 602~6 199	597

1.7 遗传进化树的构建

利用 DNASTar 中的 SeqMan 软件将测序结果进行拼接。从 GenBank 中下载已经发表的 15 株全基因组 PPV6 参考毒株(表 2), 使用 MEGA7.0 软件中 Neighbor-Joining 法构建基于全基因序列的遗传进化

树。从 GenBank 中下载已经发表的 29 株 PPV6 参考毒株的序列, 构建基于 *NSI* 和 *Cap* 基因的遗传进化树。

1.8 序列分析

通过 DNASTar 的 MegAlign 软件, 利用 Clustal W 算法将 PPV6 AH 株与参考毒株进行全基因序列核苷酸同源性分析。将 PPV6 AH 株的 *NSI* 基因与 *Cap* 基因的核苷酸序列及编码的氨基酸序列与参考株进行位点分析。

表 2 PPV6 参考毒株

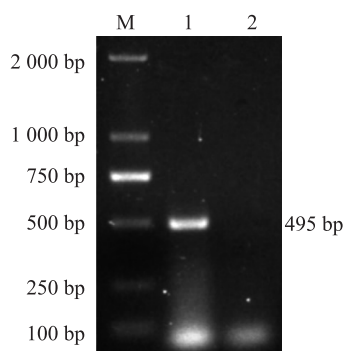
Table 2 Reference sequences of PPV6 strains

毒株名称	登录号	国家	基因
Br	KY094494.1	巴西	全基因
KSU7-SD-2014	KR709268.1	美国	全基因
KSU6-IA-2014	KR709267.1	美国	全基因
KSU5-NE-2014	KR709266.1	美国	全基因
KSU4-NE-2014	KR709265.1	美国	全基因
KSU3-KS-2014	KR709264.1	美国	全基因
KSU2-AZ-2014	KR709263.1	美国	全基因
KSU1-AZ-2014	KR709262.1	美国	全基因
FJ2017	MG760726.1	中国	全基因
3456/2012	MH558679.1	西班牙	全基因
TJ	NC_023860.1	中国	全基因
SC	KF999684.1	中国	全基因
JS	KF999683.1	中国	全基因
BJ2	KF999682.1	中国	全基因
BJ	KF999681.1	中国	全基因
K13-4	KX384819	波兰	<i>NSI+Cap</i>
K13-8	KX384813	波兰	<i>NSI+Cap</i>
K17-3	KX384821	波兰	<i>NSI+Cap</i>
K17-10	KX384820	波兰	<i>NSI+Cap</i>
P15-1	KX384823	波兰	<i>NSI+Cap</i>
U18-1	KX384822	波兰	<i>NSI+Cap</i>
U18-4	KX384814	波兰	<i>NSI+Cap</i>
U18-5	KX384818	波兰	<i>NSI+Cap</i>
U18-7	KX384815	波兰	<i>NSI+Cap</i>
U18-8	KX384816	波兰	<i>NSI+Cap</i>
U18-9	KX273435	波兰	<i>NSI+Cap</i>
U18-9	KX384817	波兰	<i>NSI+Cap</i>
SK-CA-2018	MH820262	加拿大	<i>NSI+Cap</i>
SMU	MG345036	中国	<i>NSI+Cap</i>

2 结果与分析

2.1 病毒 PCR 鉴定结果

以病毒 DNA 为模板,使用 *PPV6-F/PPV6-R* 引物进行 PCR 扩增,结果显示在 495 bp 位置出现特异性条带,条带大小符合预期(图 1)。BLAST 比对结果显示,该毒株为猪细小病毒 6 型,相似性达到 97%。



M: DL2000 marker; 1: 阳性 PCR 产物; 2: 阴性对照。

图 1 PPV6 PCR 鉴定结果

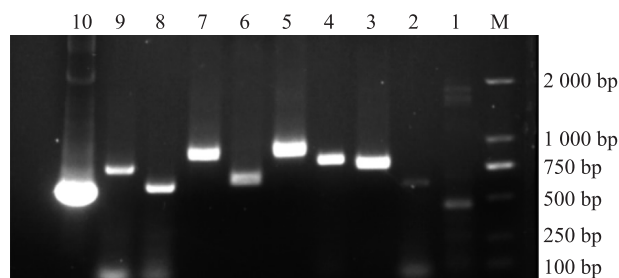
Fig.1 PCR identification results of PPV6

2.2 全基因序列扩增结果

将检测出的阳性模板以表 1 中 F1/R1、F2/R2、F3/R3、F4/R4、F5/R5、F6/R6、F7/R7、F8/R8、F9/R9 和 F10/R10 为引物进行全基因分段 PCR 扩增。琼脂糖凝胶电泳结果显示,在 457 bp、627 bp、802 bp、832 bp、947 bp、687 bp、918 bp、636 bp、790 bp 和 597 bp 位置出现条带(图 2),与预期的条带大小相符。序列拼接获得完整的 *PPV6* 全基因序列,基因组全长 6 180 bp,检测出的病毒命名为 PPV6 AH 株。将所得序列上传至 NCBI (GenBank 登录号: MK825573)。

2.3 遗传进化树构建结果

基于 *PPV6* 全基因组构建的遗传进化树结果显示,PPV6 AH 株与 SC 株、BJ2 株及 BJ 株的亲缘关系较近,与 JS 株都属于同一分支(图 3)。基于 *PPV6 NSI* 基因构建的遗传进化树结果显示,PPV6 AH 株与 SC、BJ 和 BJ2 株属于同一分支,亲缘关系较近(图 4)。基于 *PPV6 Cap* 基因构建的遗传进化树结果显示,PPV6 AH 株与 JS、BJ2、SC 和 BJ 株亲缘关系较近,属于同一分支(图 5)。结果表明,本研究分离的 PPV6 AH 株与多数中国分离的 PPV6

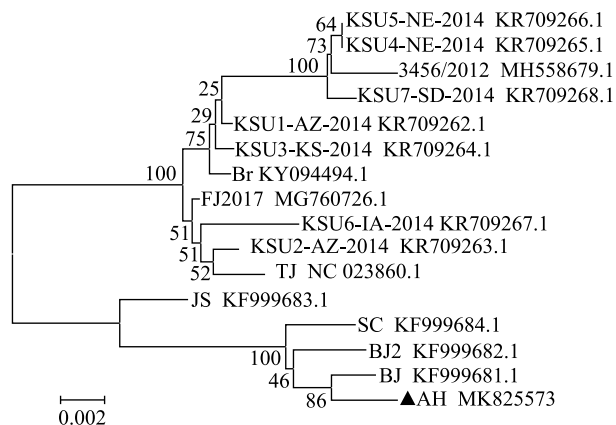


M: DL2000 marker; 1: F1/R1; 2: F2/R2; 3: F3/R3; 4: F4/R4; 5: F5/R5; 6: F6/R6; 7: F7/R7; 8: F8/R8; 9: F9/R9; 10: F10/R10。

图 2 PPV6 AH 株基因的分段 PCR 扩增

Fig.2 PCR amplification of PPV6 AH gene segments

(SC、BJ、BJ2、JS) 属同一分支,有着共同的进化起源,与部分中国分离株 (SMU、TJ、FJ2017) 及来自美国分离株 (KSU1-7)、波兰分离株 (K13-4、K13-8、K17-3、K17-10、P15-1、U18-1、U18-4、U18-5、U18-7、U18-8、U18-9)、加拿大分离株 (SK-CA-2018)、巴西分离株 (Br) 和西班牙分离株 (3456/2012) 亲缘关系较远,由此说明本研究的 PPV6 AH 株属于中国流行毒株。



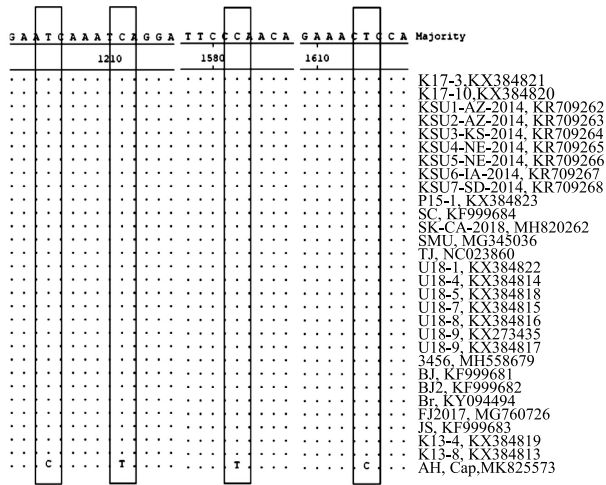
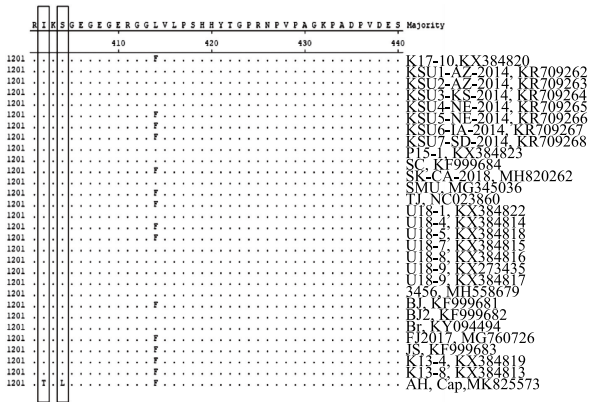
▲为测序毒株。

图 3 PPV6 AH 株与其他 PPV6 代表毒株全基因遗传进化树

Fig.3 The phylogenetic tree of full-sequenced PPV6 AH strain and other PPV6 strains

2.4 序列分析结果

利用 MegAlign 软件中 Clustal W 算法将 PPV6 AH 株与参考毒株基因序列进行序列比对,结果显示,PPV6 AH 株 (MK825573) 与巴西毒株 Br (KY094494.1) 的核苷酸序列之间同源性为 97.7%,与西班牙毒株 3456/2012 (MH558679.1) 的同源性为 97.1%,与国内参考毒株 (MG760726.1、NC_0238-

图7 猪细小病毒6型 *Cap* 基因的序列同源性分析Fig.7 Sequence homology analysis of *Cap* gene of porcine parvovirus type 6图8 *Cap* 蛋白中主要氨基酸位点分析Fig.8 Analysis of major amino acid sites in the *Cap* protein

床症状^[13]。而 PPV2~PPV7 感染猪后是否致病仍然尚不清楚。目前,PPV6 在中国还未被广泛发现,其基础病原学特性及致病机制还未有较深入的研究。PPV6 基因组大约 6 100 bp,包含 2 个开放阅读框(ORFs)、5'和 3'非编码区。ORF1 编码的非结构蛋白 NS1 包含 662 个氨基酸,ORF2 编码含有 1 189 个氨基酸的衣壳蛋白 VP1^[11]。PPV6 与细小病毒其他亚科成员具有 20.5%~42.6% 的序列同源性,有研究结果表明 PPV6 与 PPV4 关系最密切,与其他类型相距较远。

本研究以临床检测的 PPV6 阳性样本为模板,通过 PCR 技术进行 PPV6 全基因组分段扩增,成功

获得 1 个 6 180 bp 的全基因核苷酸序列。进行 BLAST 验证后,证实为 PPV6。将国内外的 PPV6 基因组序列与之进行核苷酸比较,结果发现,PPV6 AH 株与所有的 PPV6 毒株同源性非常高,可见目前 PPV6 毒株尚未发生较为明显的变异。遗传进化树结果显示,PPV6 AH 株与中国分离的 PPV6 BJ、BJ2、SC 和 JS 株亲缘关系近,有共同的进化起源。NS1 和 *Cap* 核苷酸序列分析结果发现,NS1 基因第 708、996、1 932 位点核苷酸发生新的点突变,*Cap* 基因第 1 205、1 211、1 582、1 614 位点核苷酸发生新的点突变。氨基酸位点分析结果显示,*Cap* 蛋白第 402 和 404 位点氨基酸发生新的点突变:第 402 位点 I→T;第 404 位点 S→L。与其他 PPV6 *Cap* 结构蛋白存在差异性,这种突变是否会对 *Cap* 蛋白的功能以及病毒的生物学特性造成改变,仍需要进一步研究。而 NS1 蛋白氨基酸分析未发现有新的突变,推测 NS1 蛋白在遗传进化过程中较为保守。

本研究首次报道 PPV6 在安徽地区猪群中的存在,研究结果不仅丰富了 PPV6 的流行病学数据,为后续疫苗研究提供理论依据,同时也为进一步研究 PPV6 的致病机理及毒力相关研究提供基础。

参考文献:

- [1] STRECK A F, CANAL C W, TRUYEN U. Molecular epidemiology and evolution of porcine parvoviruses[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2015, 36:300-306.
- [2] MAYR A, MAHNELH. Cultivation of hog cholera virus in pig kidney cultures with cytopathogenic effect [J]. *Zentralbl Bakteriell Orig*, 1964, 195(2):157-166.
- [3] MAYR A, BACHMANN P A, SIEGL G, et al. Characterization of a small Porcine DNA virus[J]. *Archiv Für Die Gesamt Virusforschung*, 1968, 25(1):38-51.
- [4] MENGELING W L, LAGER K M, VORWALD A C. The effect of porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine reproductive performance[J]. *Animal Reproduction Science*, 2000, 60(3):199-210.
- [5] HIJIKATA M, ABE K, WIN K M, et al. Identification of new parvovirus DNA sequence in swine sera from Myanmar[J]. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 2001, 54(6):244-245.
- [6] LAU S, WOO P, TSE H, et al. Identification of novel porcine and bovine parvoviruses closely related to human parvovirus 4[J]. *Journal of General Virology*, 2008, 89(8):1840-1848.
- [7] HUANG L, ZHAI S L, CHEUNG A K, et al. Detection of a novel porcine parvovirus, PPV4, in chinese swine herds[J]. *Virology Journal*, 2010, 7(1):333.

- [8] CHAO-TING X, GIMENEZ-LIROLA LUIS G, YONG-HOU J, et al. Characterization of a novel porcine parvovirus tentatively designated PPV5[J]. PLoS ONE, 2013, 8(6):e65312.
- [9] NI J, QIAO C, HAN X, et al. Identification and genomic characterization of a novel porcine parvovirus (PPV6) in china[J]. Virology Journal, 2014, 11(1):203.
- [10] WU R, WEN Y, HUANG X, et al. First complete genomic characterization of a porcine parvovirus 5 isolate from China[J]. Archives of Virology, 2014, 159(6):1533-1536.
- [11] SCHIRTZINGER E E, SUDDITH A W, HAUSE B M, et al. First identification of porcine parvovirus 6 in North America by viral metagenomic sequencing of serum from pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Virology Journal, 2015, 12(1):170.
- [12] PALINSKI R M, MITRA N, HAUSE B M. Discovery of a novel Parvovirinae, virus, porcine parvovirus 7, by metagenomic sequencing of porcine rectal swabs[J]. Virus Genes, 2016, 52(4):564-567.
- [13] JOHNSON R H, COLLINGS D F. Experimental infection of piglets and pregnant gilts with a parvovirus[J]. Veterinary Record, 1969, 85(16):446-447.

(责任编辑:陈海霞)