

猪圆环病毒 2 型荧光定量 PCR 检测方法的建立

李 鹏^{1,2}, 郭军庆¹, 金前跃¹, 李青梅¹, 李清州³, 万 博¹, 王选年², 王川庆⁴, 张改平⁴

(1. 河南省农业科学院 农业部动物免疫学重点实验室, 河南省动物免疫学重点实验室, 河南 郑州 450002;

2. 新乡学院 生命科学与技术系 生物技术研究中心, 河南 新乡 453003;

3. 河南省农业科学院 农业经济与信息研究所, 河南 郑州 450002; 4. 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002)

摘要:根据 PCV2 ORF1 设计 1 对特异性引物, 建立了 SYBR Green I Real-time PCR 检测方法。该方法灵敏度可达 10~100 拷贝/μL, 比常规 PCR 检测方法灵敏度高 10 倍, 而与猪繁殖和呼吸综合征病毒 (PRRSV)、猪伪狂犬病毒 (PRV)、猪瘟病毒 (CSFV) 以及猪细小病毒 (PPV) 没有交叉反应, 利用该方法从 50 份临床病料中检测出 43 份阳性 PCV2 病毒, 阳性检出率为 94%。与常规 PCR 比较结果显示, 该方法具有较高的灵敏度和特异性, 能够快速检测和监控 PCV2 的感染流行。

关键词:猪圆环病毒 2 型; SYBR Green I; 荧光定量 PCR

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2014)02-0066-05

Rapid Detection of Porcine Circovirus Type 2 Using a SYBR Green I Real-time PCR

LI Peng^{1,2}, GUO Jun-qing¹, JIN Qian-yue¹, LI Qing-mei¹,

LI Qing-zhou³, WAN Bo¹, WANG Xuan-nian², WANG Chuan-qing⁴, ZHANG Gai-ping⁴

(1. Henan Provincial Key Laboratory of Animal Immunology, Key Laboratory of Animal Immunology of the Ministry of Agriculture, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;

2. Biotechnology Research Center, Department of Life Sciences and Technology, Xinxiang University, Xinxiang 453003, China; 3. Institute of Agricultural Information and Economy, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China; 4. College of Animal Science and Veterinary

Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Porcine circovirus type 2 (PCV2) is the causative factor of Post-weaning multi-systemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. Rapid detection of PCV2 is very important for the effective prophylaxis and treatment of PMWS. To establish a sensitive, specific assay for the detection and quantitation of PCV2, we designed and synthesized specific primers in the open reading frame 1 (ORF1), and to develop a SYBR Green I Real-time PCR. The results indicated that the Real-time PCR assay could detect 10–100 copies of the genomic DNA per reaction, and its sensitivity was 10 times of the conventional PCR. The assay did not cross-react with classical swine fever virus (CSFV), porcine parvovirus (PPV), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and pseudorabies virus (PRV). The limits of detection and quantitation were 10 and 100 copies, respectively. Using the established Real-time PCR system, 43 of the 50 samples we tested were detected as positive. In conclusion, the Real-time PCR assay is sensitive, specific, accurate and can be used for the monitoring of PCV2 infection.

Key words: Porcine circovirus type 2; SYBR Green I; Real-time PCR

猪圆环病毒 2 型 (Porcine circovirus type 2, PCV2) 是单股负链环状无囊膜的 DNA 病毒, 其基因组全长 1.7 kb, 直径约 17 nm^[1]。PCV2 感染后主要引起断奶仔猪多系统衰竭综合征 (Postweaning mul-

收稿日期: 2013-08-19

基金项目: 中国博士后科学基金项目 (2011M501179); 河南省教育厅科学技术研究重点项目 (13A230838)

作者简介: 李 鹏 (1976-), 男, 河南新乡人, 讲师, 博士后, 主要从事动物病毒学与分子免疫学研究。

通讯作者: 张改平 (1960-), 男, 河南内黄人, 中国工程院院士, 博士生导师, 主要从事动物免疫学及动物病毒分子致病机制研究。

tisystemic wasting syndrome, PMWS)^[2],能够与许多病原并发或继发感染,在猪机体内引起免疫抑制^[3]。1991年,加拿大猪群中首次暴发PCV2以后,在世界各地猪群中广泛流行^[4]。PCV2相关性疾病(Porcine circovirus associated disease, PCVAD)是一组复杂的、多因子疾病,除了引起PMWS以外,常发的还有猪皮炎与肾病综合征(Porcine dermatitis and nephropathy syndrome, PDNS)等,给世界养猪业造成了巨大的经济损失^[5]。一般情况下,PCV2感染是在5~18周,临床症状包括呼吸困难、进行性消瘦、体重减轻、发热以及伴随着呼吸和消化功能失调^[4]。

目前,临床检测PCV2的方法主要有病毒分离^[6]、免疫过氧化物酶单层细胞试验(IPMA)^[7]、间接免疫荧光(IFA)^[4]等方法,需在PCV2感染PK15细胞后进行鉴定,因此检测的敏感度不高。酶联免疫吸附测定(ELISA)^[8]、原位核酸杂交^[9]、免疫组织化学法(IHC)^[10]等检测方法特异性及敏感性不理想,且操作过程比较繁琐。常规PCR^[11]检测容易因交叉污染出现假阳性,对于低拷贝数的PCV2检测率不高,不能定量分析病毒增殖情况。Real-time PCR检测技术能够定量检测病毒拷贝数,已经大量运用到疾病的检测诊断中。Zhao等^[12]根据ORF2建立了Taq-Man Real-time PCR方法,各实验室也都建立了普通PCR检测方法对PCV2进行定量或定性分析。本试验根据PCV2 ORF1设计了1对特异性引物,以期建立PCV2 SYBR Green I Real-time PCR的检测方法,为监控PCV2的流行传播、快速诊断以及实验室研究提供一种快速检测PCV2的方法。

1 材料和方法

1.1 材料

PK15细胞由河南省农业科学院动物免疫学重点实验室保存。PCV2-ZM毒株为本实验室临床分离,猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪细小病毒(PPV)、猪瘟病毒(CSFV)、伪狂犬病毒(PRV)由本实验室分离保存。PCV2阳性、阴性血清购自VMRD(与PCV1无交叉反应),FITC-兔抗猪抗体购自SIGMA公司,pMD18-T载体、SYBR Premix Ex Taq购自大连宝生物工程有限公司,胶回收、质粒提取试剂盒购自OMEGA生物技术公司。

1.2 引物设计

根据GenBank(序列号:FJ667592.1)中PCV2基因序列,设计2对引物,1对用于构建标准曲线阳

性质粒,长度为600 bp,PCV2 IF:5'-GATCTCAAGGA CAACGGAGT-3',PCV2 IR:5'-CATATGGAAATTCAG GGCATGG-3'。1对用于荧光定量检测PCV2特异性引物,基因长度为116 bp,PCV2 RF:5'-GGAAAC-CACATACTGGAAACCACC-3',PCV2 RR:5'-GTCT-CAGTAGATCATCCCA-3'。

1.3 PCV2病毒DNA的制备

将临床分离到的PCV2-ZM毒株接种PK15细胞,待病毒增殖48代后,反复冻融3次,收集病毒液,12 000 r/min离心10 min,取上清,根据大连宝生物工程有限公司DNA提取试剂盒提取PCV2的DNA。

1.4 标准质粒的制备

以PCV2 DNA为模板,引物PCV2 IF与PCV2 IR进行PCR扩增,反应体系20 μ L: premix Ex Taq 10 μ L,引物PCV2 IF与PCV2 IR各0.5 μ L, DNA 1 μ L, ddH₂O 8 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 30个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。1%琼脂糖凝胶电泳。利用试剂盒回收纯化PCR产物,与pMD18-T室温连接2 h,转化到感受态DH5 α 中,制备标准阳性质粒,送大连宝生物工程有限公司测序分析,-20 $^{\circ}$ C保存备用。

1.5 建立标准曲线

根据重组质粒的OD_{260 nm}值计算其浓度,然后按照10倍梯度依次从 1×10^8 稀释到 1×10^1 拷贝/ μ L,将其作为标准品制作标准曲线。以重组质粒为模板,引物PCV2 RF与PCV2 RR进行扩增。反应体系20 μ L: SYBR premix Ex Taq 10 μ L,引物PCV2 RF与PCV2 RR各0.5 μ L, DNA 1 μ L, ddH₂O 8 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 10 s, 94 $^{\circ}$ C 15 s, 61 $^{\circ}$ C 45 s, 40个循环。

1.6 敏感性、特异性、重复性试验

敏感性试验:将制备的标准品($1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^1$ 拷贝/ μ L)作为模板,引物PCV2 IF与PCV2 IR进行普通PCR扩增,反应体系及条件参照1.4,比较常规PCR与SYBR Green I Real-time PCR敏感性差别。

特异性试验:用所建立的SYBR Green I Real-time PCR方法对已知阳性样品PCV2、PPV、PRV、CSFV、PRRSV病毒DNA进行检测,确定该方法的特异性。

重复性试验:将标准品($1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^1$ 拷贝/ μ L)作为模板,用SYBR Green I Real-time PCR方法扩增3次,每次3个重复,进行组内和组间重复性试验,根据扩增结果,数据分析,验证其重复性。

1.7 临床样品检测

采集河南省各地猪场淋巴结、肾脏等脏器,提取

病毒 DNA, 分别用所建立的 SYBR Green I Real-time PCR 和常规 PCR 方法进行检测, 并比较检测结果, 分析各自检出率。

2 结果与分析

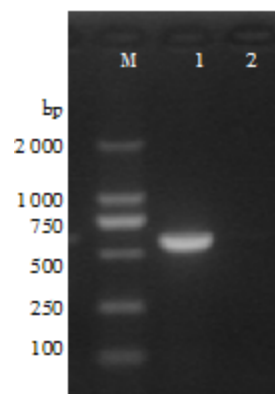
2.1 标准质粒的制备

以 PCV2 DNA 为模板, 引物 PCV2 IF 与 PCV2 IR 进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳结果与显示, 目的片段大小约为 600 bp, 宝生物测序结果与预期结果一致 (图 1)。

2.2 建立标准曲线

重组质粒的 OD_{260nm} 值为 $34.9 \text{ ng}/\mu\text{L}$, 根据公式计算得出其拷贝数为 1.93×10^{10} , 然后将标准品按照 10 倍梯度稀释, 从 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^1$ 作为模板进行 SYBR Green I Real-time PCR 反应, 结果显示其线

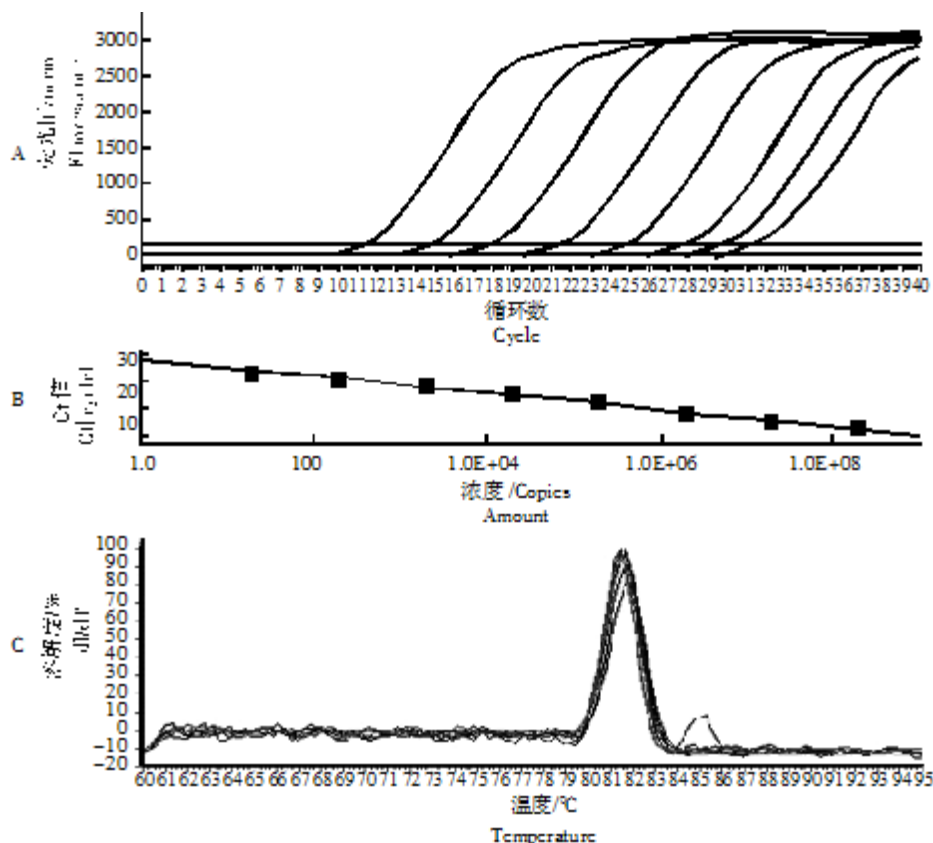
性关系良好 (图 2)。



M. DL2000; 1. PCV2-ZM 扩增产物; 2. 阴性对照。
M. DL2000; 1. PCR product of PCV2-ZM; 2. Negative control.

图 1 标准质粒构建 PCR 结果

Fig. 1 PCR product of plasmid standard



A. 扩增曲线; B. 标准曲线; C. 溶解曲线。

A. Amplification curve; B. Standard curve; C. Melting curve.

图 2 荧光定量 PCR 标准曲线构建

Fig. 2 Construction of Real-time PCR standard curve

2.3 敏感性试验结果

依次用稀释好的标准品 ($1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^1$ 拷贝/ μL) 作为模板, 引物 PCV2 IF 与 PCV2 IR 进行普通 PCR 扩增。结果显示, 常规 PCR 最小检出量为 1×10^3 拷贝/ μL , 而 SYBR Green I Real-time PCR 最低检出量为 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^1$ 拷贝/ μL , 结果表明,

SYBR Green I Real-time PCR 的敏感性约为常规 PCR 的 10 倍 (图 3)。

2.4 特异性试验结果

将已知阳性样品 PCV2、PPV、PRV、CSFV、PRRSV 作为模板进行 SYBR Green I Real-time PCR 检测, 结果显示, 只有 PCV2 出现特异性扩增, 而其

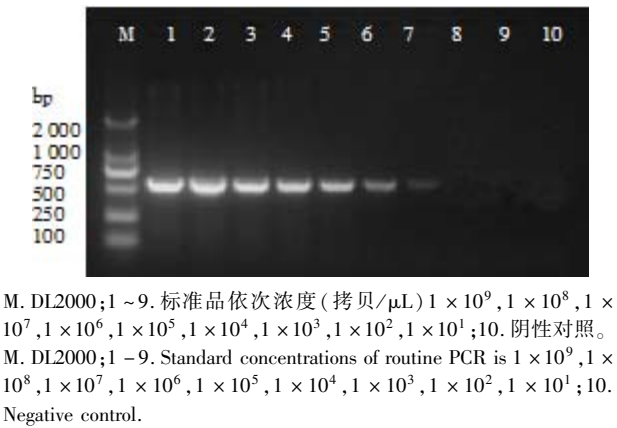


图 3 常规 PCR 敏感性检测

Fig.3 The sensitivity of routine PCR for detection of PCV2

表 1 SYBR Green I Real-time PCR 特异性检测结果

Tab.1 Result of specificity of the SYBR Green I Real-time PCR

样品 Samples	标准品 Standard								PPV	PRV	PRRSV	CSFV
Ct 值 Ct value	11.87	15.30	18.74	22.36	25.87	29.22	31.79	32.14	-	-	-	-
拷贝数 Copies number	1×10^8	1×10^7	1×10^6	1×10^5	1×10^4	1×10^3	1×10^2	1×10^1	-	-	-	-

表 2 组间与组内 Real-time PCR 重复性试验

Tab.2 Intra-assay and inter-assay reproducibility of the Real-time PCR

标准质粒/(拷贝/μL)	组内分析 Intra-assay			组间分析 Inter-assay		
Standard plasmid	Mean CT	SD	CV/%	Mean CT	SD	CV/%
1×10^7	14.22	0.055	0.387	14.40	0.596	4.142
1×10^5	20.93	0.150	0.718	20.09	0.757	3.770
1×10^3	27.78	0.210	0.756	27.27	0.874	3.207

2.6 临床检测结果

根据河南省各地猪场所采集的临床样品,提取病毒 DNA,进行 SYBR Green I Real-time PCR 和普通 PCR 检测。结果显示,50 份组织病料中 SYBR Green I Real-time PCR 检出率为 94% (47/50),普通 PCR 检出率为 76% (38/50),比普通 PCR 检出率高 18 个百分点(表 3)。

表 3 普通 PCR 与 Real-time PCR 临床样品检测结果

Tab.3 Comparison between conventional PCR and Real-time PCR for unknown samples

普通 PCR	Real-time PCR		总计/份
Conventional RCR	+ /份	- /份	Total
+	38	0	38
-	9	3	12
总计 Total	47	3	50

3 讨论

猪圆环病毒 2 型 (Porcine circovirus type 2, PCV2) 主要引起断奶仔猪多系统衰竭综合征 (Post-weaning multisystemic wasting syndrome, PMWS), 该

他病毒 DNA 均无特异性扩增(表 1)。表明,本研究构建的 PCV2 SYBR Green I Real-time PCR 检测方法具有良好的特异性。

2.5 重复性试验结果

将标准品 ($1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^1$ 拷贝/μL) 作为模板,经过 3 次重复试验,每次 3 个重复,进行组内和组间重复性试验,根据试验数据分析,结果显示,其组内变异系数为 0.387% ~ 0.756%,组间变异系数为 3.207% ~ 4.142%,小于 5%,表明所建立的 SYBR Green I Real-time PCR 方法具有良好的重复性(表 2)。

病在世界各国猪群中广泛流行,常与猪许多疾病并发或继发感染,增加了其防治难度^[13]。PCV2 相关性疾 病 (Porcine circovirus associated disease, PCVAD) 每年给全球养猪业带来巨大的经济损失^[14]。目前,对 PCVAD 的诊断标准、致病机理以及针对病毒本身和 PCVAD 的防治研究还不十分清楚。虽然目前国内外均有针对 PCV2 的疫苗上市,但免疫效果仍不理想。

临床血清学检测结果显示,我国很多地方养殖场 PCV2 阳性抗体高达 100%,越来越多的猪场由于 PCV2 感染而导致的死亡率由 2% ~ 3% 增长到了 14% ~ 30%^[15]。因此,快速、灵敏检测和定量分析 PCV2 感染对于当前养猪业及实验室研究尤为重要。与普通 PCR 相比,SYBR Green I Real-time PCR 具有敏感性高,避免污染,检测时间短等优点,而普通 PCR 会因环境的污染出现假阳性,且检测时间较长。Zhao 等^[12] 根据 ORF2 基因序列设计探针建立了 TaqMan Real-time PCR 从不同组织和血清中检测 PCV2,扩增片段大小为 84 bp。Chung 等^[16] 利

用 Taq-Man Real-time PCR 从病料中扩增出 269 bp 来检测 PCV2。Yang 等^[17] 也根据 ORF2 设计引物利用 SYBR Green I PCR 检测 PCV2。

本研究根据 GenBank 上 PCV1 与 PCV2 全基因序列大量进行比较,根据 PCV2 ORF1 基因上的保守序列设计一对引物,能够区分 PCV1 和 PCV2,建立了 SYBR Green I Real-time PCR 的方法,扩增片段为 120 bp。通过对临床样品的检测,结果显示,Real-time PCR 从 50 份病料中检出比例为 94% (47/50),而普通 PCR 检出率为 76% (38/50)。并且经过重复性检测表明,该方法具有良好的稳定性、灵敏性、特异性,与猪的其他相关疾病如 CSFV、PRRSV、PRV、PPV 等没有交叉反应。本研究建立的 SYBR Green I PCR 方法提供了一种快速鉴定检测 PCV2 的方法,并且可以分析临床上灭活疫苗的病毒载量,为疫苗评价也提供了一种方法。

参考文献:

- [1] Fu F, Tian H, Li X, *et al.* C-terminal heat shock protein 70 of *Mycobacterium tuberculosis* as a molecular adjuvant for DNA vaccination with the porcine circovirus type 2 ORF2 (capsid) gene in mice[J]. *Vet J*, 2013, 195(2): 244 – 247.
- [2] 苏金存, 常孝勇, 王隆绥, 等. 猪圆环病毒 2 型感染后猪血液学指标研究[J]. *河南农业科学*, 2012, 41(8): 163 – 166.
- [3] Borghetti P, Morganti M, Saleri R, *et al.* Innate pro-inflammatory and adaptive immune cytokines in PBMC of vaccinated and unvaccinated pigs naturally exposed to porcine circovirus type 2 (PCV2) infection vary with the occurrence of the disease and the viral burden[J]. *Vet Microbiol*, 2013, 163(1 – 2): 42 – 53.
- [4] Yang K, Li W, Niu H, *et al.* Efficacy of single dose of an inactivated porcine circovirus type 2 (PCV2) whole-virus vaccine with oil adjuvant in piglets[J]. *Acta Vet Scand*, 2012, 54: 67.
- [5] Grasland B, Blanchard P, Kéranflec'h A, *et al.* Evaluation of the transmission of porcine circovirus type 2 (PCV-2) genogroups a and b with semen from infected specific-pathogen-free boars[J]. *Vet Microbiol*, 2013, 162(2/4): 381 – 387.
- [6] Wen L, He K, Li B, *et al.* *In vitro* and *in vivo* isolation of a novel rearranged porcine circovirus type 2[J]. *J Virol*, 2012, 86(23): 13120.
- [7] Priscilla F G, Flávia M G, Ângela M Q L, *et al.* Fetal infections and antibody profiles in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2 (PCV2) [J]. *Can J Vet Res*, 2012, 76(1): 38 – 44.
- [8] Meng Ge, Wei Luo, Daliang Jiang, *et al.* Development and application of a double-antigen sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to porcine circovirus 2 [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2012, 19(9): 1480 – 1486.
- [9] Siegfried K, Titus S, Dieter Z, *et al.* Coreplication of the major genotype group members of porcine circovirus type 2 as a prerequisite to coevolution may explain the variable disease manifestations [J]. *J Virol*, 2011, 85(21): 11111 – 11120.
- [10] Lakshman N A G, Kathleen A M, Sarah P, *et al.* Efficacy of parenteral vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) in seropositive piglets [J]. *Can J Vet Res*, 2012, 76(4): 301 – 307.
- [11] 王宏魁, 彭志峰, 孙彦婷, 等. 猪圆环病毒复合 PCR 检测方法的建立及应用[J]. *河南农业科学*, 2009(1): 109 – 111.
- [12] Zhao K, Han F, Zou Y, *et al.* Rapid detection of porcine circovirus type 2 using a TaqMan-based Real-time PCR [J]. *Virol J*, 2010(7): 374.
- [13] 祁艳华, 王爱萍, 李学武, 等. 猪圆环病毒 2 型 ORF2 基因片段的克隆与原核表达[J]. *河南农业科学*, 2010(3): 112 – 115.
- [14] Grau-Roma L, Fraile L, Segalés J. Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2 [J]. *Vet J*, 2011(1): 23 – 32.
- [15] Esther S, Carole B, Heidi G, *et al.* Cellular adaptive immune response against porcine circovirus type 2 in subclinically infected pigs [J]. *BMC Vet Res*, 2009(5): 45.
- [16] Chung W B, Chan W H, Chaung H C, *et al.* Real-time PCR for quantitation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 in naturally-infected and challenged pigs [J]. *J Virol Methods*, 2005, 124: 11 – 19.
- [17] Yang Z Z, Habib M, Shuai J B, *et al.* Detection of PCV2 DNA by SYBR Green I -based quantitative PCR [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2007, 8(3): 162 – 169.