

# 检测猪圆环病毒2型DNA的套式PCR方法的建立及应用

靳玉芬 (安阳工学院生物与食品工程学院, 河南安阳455000)

**摘要** 为了进一步调查研究PCV2的流行病学及其致病机制,根据猪圆环病毒2型GD株及已发表的PCV2的全基因组序列,对来自广东、广西、湖南、海南等地287个猪场送检的1560个可疑病料进行PCR扩增,并对扩增产物进行克隆、酶切、测序鉴定,建立了PCV2检测的套式PCR方法。结果表明,PCR扩增获得了预期大小的片断,将测序结果与GenBank收录的PCV2序列进行比较,发现同源性均在90%以上。该PCR方法对PCV2是特异的,并具有良好的重复性和稳定性。用该PCR方法对287个猪场的1560份样品进行了检测,其中983份为PCV2阳性,表明该病在我国广泛流行。

**关键词** 猪圆环病毒2型;套式PCR

中图分类号 S855 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)07-01950-02

## Establishment and Application of Nested PCR Assay for Testing PCV2

JIN Yu fen (College of Food Science and Biotechnology, Anyang Institute of Technology, Anyang, Henan 455000)

**Abstract** According to the published genome sequence of porcine circovirus type 1 and type 2 (PCV1, PCV2), 1560 doubtful diseased samples from 287 pig farms in Guangdong, Guangxi, Hunan, Hainan etc were made for PCR amplification. The amplified product was made for clone, enzyme restrictions test sequencing analysis and identification, then the nested polymerase chain reaction (nPCR) assay was established for PCV2. Results showed that PCR amplification got the factions that their size fixed in with expectation. Comparison of sequencing results and PCV2 sequence embodied by GenBank showed that the homology was more than 90%. The PCR assay was specificity to PCV2 and had good repeat and stability. 1560 samples from 287 pig farms had been detected for PCV2, from which 983 samples got the positive results for PCV2, suggesting that PCV2 infection is very popular in China.

**Key words** Porcine Circovirus Type 2 (PCV2); Nested Polymerase Chain Reaction (nPCR)

猪圆环病毒(porcine circovirus, PCV)最早被发现于一种猪肾细胞系中,可持续感染PK15细胞但不引起细胞病变。Bian等认为可根据PCV的致病性、抗原性及核苷酸序列将PCV分成PCV1和PCV2 2种基因型。PCV1无致病性,包括PK15-PCV及其他流行于猪群但无致病性的分离株,试验证明其广泛存在于猪原代细胞系及猪群中;PCV2具有致病性,与近年来世界各国广泛流行的断奶仔猪多系统衰竭综合症(Post Weaning Multisystemic Wasting Syndrome, PMWS)密切相关。该病主要以进行性消瘦和多系统病理损伤为特征,给全球养猪业造成了严重的经济损失。

PCV2全基因为1767 bp或1768 bp,共有11个阅读框,其中ORF1和ORF2是其最主要的阅读框。各毒株的序列同源性介于91.9%~100%,氨基酸同源性为90.2%~100%,较为保守。ORF1为945 bp,编码315个氨基酸,编码病毒的复制蛋白,与PCV1的ORF1编码蛋白有相同的抗原性。ORF2为705 bp,编码234个氨基酸,编码PCV2囊膜的主要结构成分,具有较好的免疫原性,是构建重组疫苗和检测的首选基因。ORF2的氨基末端区域的12~18和34~41位氨基酸对核定位起重要作用,而69~83和117~131位氨基酸所形成的位点对PCV2抗血清有特异性。为此,笔者选用ORF2的1个片段对不同地区来源的可疑病料进行PCR扩增,并对扩增产物进行克隆、酶切、测序鉴定,建立了PCV2检测的套式PCR方法,为PCV2的流行病学调查和致病机制研究奠定基础。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料 仪器。**PCR仪(ABI)、凝胶成像分析系统(AlphaMaster)、高速冷冻离心机(Eppendorf)。试剂。PCR试剂盒(Invitrogen)、DNA片断回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒等购自TaKaRa公司(大连);组织基因组DNA提取试剂盒购自

Watson公司;XbaI、BamHI、HindIII与T4 DNA连接酶购自New England Biolabs公司;pMD18-T载体购自TaKaRa公司(大连);病料。供试猪为广东、广西、湖南、海南等地287个猪场送检的1560份样品;菌种。大肠杆菌DH5购自Invitrogen公司。

**1.2 引物设计** 根据国外已发表的文献[6],选择PCV1(U49186)和PCV2(AF027217)作为扩增对象,采用套式PCR扩增目的片段。外部引物为P<sub>1</sub>:5'-CAACTGCTGTCCCAGCTGTAG-3';P<sub>2</sub>:5'-AGGAGGCGTTACCGCAGAAG-3'。内部引物为P<sub>3</sub>:5'-TAGGTTAGGGCTGTGGCCTT-3';P<sub>4</sub>:5'-CCGCACCTTCGGATA-TACTG-3'。外部引物可扩增PCV1和PCV2,内部引物只扩增PCV2。引物P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>、P<sub>3</sub>、P<sub>4</sub>由上海博亚生物有限公司合成。

**1.3 模板的制备** 取患PMWS的病猪血清加入蛋白酶K至终浓度100 μg/ml,SDS至终浓度1%,55℃水浴2 h,用苯酚、苯酚:氯仿(1:1)、氯仿各抽提1次,吸取水相加入1/10倍体积的3 mol/L NaAC及2倍体积的无水乙醇沉淀1 h,4 12 000 r/min离心15 min,沉淀悬浮于ddH<sub>2</sub>O中,取适量用作PCR模板。

**1.4 病料的PCR扩增** 引物浓度为10 μmol/L,整个PCR反应体系50 μl:Premix Taq(DNA Polymerase, Buffer, dNTP mixtures),上下游引物各1 μl,模板DNA 3 μl,加ddH<sub>2</sub>O至50 μl,均匀混合。2次PCR采用相同条件即在94℃变性2 min后,按94℃变性1 min,65℃退火1 min,72℃延伸1 min进行30个循环,最后72℃延伸5 min。反应结束后取5 μl PCR产物用1.2%琼脂糖凝胶电泳观察。

**1.5 PCR产物的克隆** 按DNA回收试剂盒说明书回收PCR产物,然后在10 μl体系中分别加入2 μl回收产物、5 μl Ligation Solution、1 μl pMD18T载体,2 μl ddH<sub>2</sub>O,16℃水浴18 h后取出,转化大肠杆菌DH5,37℃培养12 h。

**1.6 阳性重组质粒的筛选及酶切、测序鉴定** 用牙签挑取上述转化皿中的白色单克隆菌落,接种到含Amp的LB液体培养基中,37℃振荡过夜至混浊,然后提取质粒;用XbaI、

BamHI/ Hnd 酶切鉴定重组质粒;对阳性重组质粒测序鉴定并与 GenBank 收录的PCV2 进行同源性比较。

**1.7 敏感性测定** 上述方法分别取PCV2 阳性血清和细胞培养物(PCV2- PK15) 200、100、50、10  $\mu$  稀释至200  $\mu$  提取DNA 作模板,检验该方法的敏感性。

**1.8 特异性测定** 为了论证该方法检测的特异性,常规提取非靶DNA(PCV1、HCV、PRRSV、PRV、PPV DNA 或cDNA) 及空白对照,用PCV2 特异性引物进行PCR 扩增。

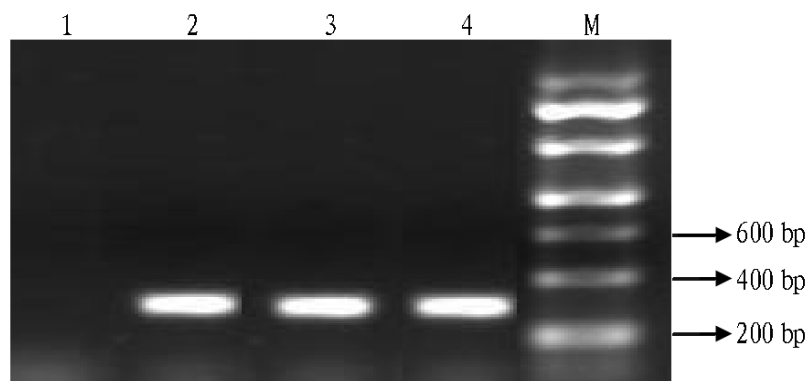
**1.9 重复性检验** 用所建立的套式PCR 法对3 份不同的PCV2 阳性组织样品分别进行5 次重复性试验,检验该方法的重复性和稳定性。

**1.10 套式PCR 的临床应用** 应用所建立的套式PCR 方法对来自287 个猪场的1 560 份样品进行检测,其中检测病理材料103 份,血清1 427 份,精液20 份。检测样品分布为广东233 场次,广西29 场次,海南11 场次,湖南14 场次,湖北4 场次。

## 2 结果与分析

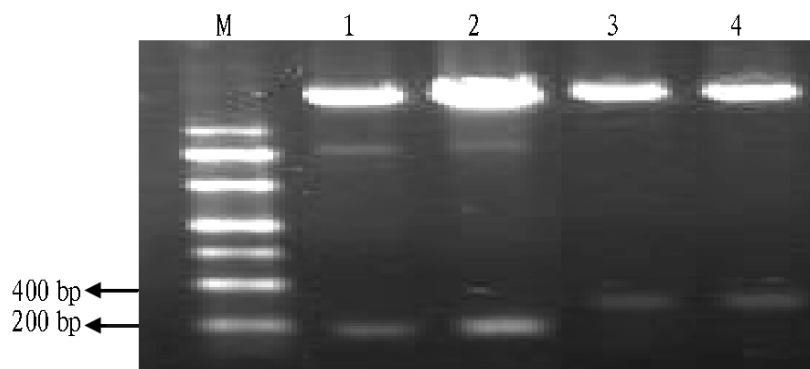
**2.1 病料PCR 扩增及扩增产物的鉴定结果** 血清经外部引物PCR 扩增得到1 条880 bp 的特异性扩增带,内部引物PCR 扩增得到263 bp 的扩增带(图1)。用 Xba 对重组质粒进行酶切,发现该目的片段中存在一个 Xba 酶切位点,用 BamH 、Hnd 双酶切重组质粒,得到1 条340 bp 左右的片段,与预期片段大小相符(图2);测序结果表明,PCR 扩增获得了预期大小的片段,该序列与 GenBank 收录的PCV2 同源性均在90% 以上。

**2.2 敏感性测定** 敏感性测定结果表明,用50  $\mu$  的血清检测时仍能看到清晰的核酸带,但用10  $\mu$  的血清观察不到核酸带;而细胞培养物10  $\mu$  也能检测到清晰的核酸带。



注:M 为 DNA marker ;1 为阴性对照;2 ~4 为阳性血清。

图1 血清PCR 检测结果



注:M 为 DNA marker ;1,2 为 Xba I ;3,4 为 BamHI Hnd III。

图2 重组质粒的酶切鉴定

**2.3 特异性测定** 特异性测定结果表明,用PCV2 特异性引物不能检测出PCV1、HCV、PRRSV、PRV 和PPV 的核酸,说明该PCR 方法对PCV2 是特异的。

**2.4 重复性试验** 试验表明,5 次重复性检测结果均呈阳性,说明该方法具有良好的重复性和稳定性。

**2.5 临床应用** 临床应用结果表明,检测的样品中阳性率为63%,其中阳性猪场达72%。说明PCV2 感染在我国已普遍存在。

## 3 讨论

1991 年,断奶仔猪多系统衰竭综合征首次被报道发生于加拿大<sup>[7]</sup>,但迄今为止,PMWS 的发病机理尚不清楚。人们普遍将PCV2 与PMWS 的发生联系起来,认为PCV2 是引起临床PMWS 的主要病原体。目前,世界各地均有PMWS 发生的报道。血清学调查表明,PCV2 感染广泛,多数猪群血清阳性率为20%~50%。在北美和欧洲猪群中,发病率占被侵袭猪群的5%~10%,死亡率达100%;德国屠宰猪血清中PCV2 抗体阳性率达85%;英国随机采集的猪血清样品中PCV2 血清阳性率达80%;比利时对1985~1999 年不同类型猪血清样品检测表明,PCV2 阳性率达100%;郎洪武等应用ELISA 法对我国7 个省市不同类型猪群559 份样品进行检测,总阳性率达42.9%<sup>[5]</sup>。

由于PCV 有PCV1 和PCV2 2 种基因型,两者全基因序列有近67% 的同源性,其ORF1 同源性高达83%,但ORF2 同源性只有67%<sup>[8-9]</sup>,因此,选用ORF2 的1 个片段作为扩增对象,以保证PCR 的特异性。试验发现,PCV2 扩增产物的目的片段与欧洲毒株的同源性要高于美洲和台湾的毒株,其中与德国株AF201897 的同源性最高,达到99.7%。为了证明获得的PCR 产物是PCV2 的特异性片段,把PCR 产物克隆至T 载体,对重组质粒的酶切和测序进行鉴定,结果证明所扩增片段为PCV2 的基因组。PCR 检测结果表明,PCV2 在我国广东、广西、海南等省已有流行,检测阳性率为63.3%。由于PCV2 可以引发PMWS,主要侵害感染动物的免疫器官,使机体免疫功能低下,造成其他疾病的混合感染,国外也有PCV2 与PRRS、PPV、PRV 混合感染的报道<sup>[10]</sup>。因此,PCV2 与PRRS、PRV、PPV 等传染病的发病、流行及免疫间是否存在特定关系有待于进一步研究。

## 参考文献

- [1] MEEHAN B, MCNEILLY F, TODD D, et al. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs[J]. J Gen Virol, 1997, 79: 2171 - 2179.
- [2] ALLAN G M, MEEHAN B, TODD D, et al. Novel porcine circovirus from pigs with wasting disease syndromes[J]. Vet Rec, 1998, 142: 467 - 468.
- [3] ALLAN G M, MCNEILLY F, MEEHAN B, et al. Isolation and characterization of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland[J]. Vet Microbiol, 1999, 66: 115 - 123.
- [4] CLARK E G. Post weaning multisystemic wasting syndrome[J]. Proceeding of the American Association of Swine Practitioners, 1997, 28: 499 - 501.
- [5] 郎洪武, 张广川, 吴发权, 等. 断奶猪多系统衰弱综合征血清抗体检测[J]. 中国兽医科技, 2000, 30(3): 3 - 5.
- [6] RENEE L, ANDZEJ B. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38: 4629 - 4632.
- [7] MORZOVI, SIRNARUMTIER T, SORENS D, et al. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pig with postweaning multisystemic wasting syndrome[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36: 2535 - 2541.
- [8] SORENS D, HARMS P A, SIRNARUMTIER T, et al. Porcine circovirus and PRRS virus co-infection in pig with chronic bronchointerstitial pneumonia and lymphoid depletion: an emerging syndrome in Midwestern swine[J]. Proc Am Assoc Vet Lab Diagn, 1998, 41: 75.