

检测猪圆环病毒2型PCR方法的建立

杭柏林 刘丽艳 王宪文 王丽荣 李银曼 胡建和* (河南科技学院动物科学学院, 河南新乡 453003)

摘要 [目的] 为快速诊断猪圆环病毒病提供参考。[方法] 根据 GenBank 中猪圆环病毒2型(PCV-2)的核苷酸序列设计并合成1对特异性引物, 建立诊断PCV-2地方分离株的PCR方法。[结果] 各物质在PCR反应中最佳浓度分别为:dNTP 220 pmol/ml, Taq 酶0.1 U/μl, 引物20 pmol/μl。从PCV-2阳性病料中提取DNA, 在优化条件下进行PCR扩增, 获得预期的494 bp 特异性条带。用该PCR方法对PCV-2、PRRSV、HCV、SIV、PPV进行检测, PCV-2为阳性, 而PRRSV、HCV、SIV、PPV检测均为阴性, 未出现交叉反应, 说明该PCR方法对PCV-2具有良好的特异性。该PCR方法可检出1.25 ng 模板DNA, 具备较高的敏感性。[结论] 使用该PCR方法检测PCV-2是切实可行的。

关键词 PCR; 检测; 猪圆环病毒2型

中图分类号 S858.28 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)16-06678-02

Establishment of PCR Method for Detecting Porcine Circovirus 2

HANG Bolin et al (College of Animal Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003)

Abstract [Objective] The aim of the research was to provide reference for rapid diagnosis of porcine circovirus disease. [Method] According to the nucleotide sequence of PCV-2 on GenBank website, one pair of primers were designed and synthesized. And PCR method for diagnosing the local isolates of PCV-2 was established. [Result] The optimum concn. of each substance in PCR reaction were as follows: dNTP 220 pmol/ml, Taq enzyme 0.1 U/μl, primers 20 pmol/μl. DNA was extracted from diseased materials with the positive PCV-2 to make PCR amplification under the optimized conditions, and the expected specific bands with the size of 494 bp was obtained. PCV-2, PRRSV, HCV, SIV and PPV were detected by this PCR method, PCV-2 was positive and PRRSV, HCV, SIV and PPV were negative, without cross reaction. This indicated that this PCR method had good specificity to PCV-2. 1.25 template DNA could be detected by this PCR method which had higher sensitivity. [Conclusion] It was feasible to detect PCV-2 by using this PCR method.

Key words PCR; Detection; Porcine Circovirus virus 2

猪圆环病毒(Porcine circovirus, PCV)为圆环病毒科圆环病毒属的成员, 属单股环状DNA病毒。该病毒无囊膜, 具20面体, 平均直径17 nm, 不具备血凝活性, 可抵抗pH值3的酸性环境, 能在vero细胞中生长繁殖, 但不产生细胞病变。根据PCV的致病性、抗原性或核苷酸序列, 可将PCV分为两个型, 即PCV-1和PCV-2。PCV-1无致病性, 广泛存在于猪群中^[1-2]。

具致病性的PCV-2能引起多种疾病综合症, 如能引起仔猪断奶后多系统衰竭综合症(PMWS)、猪皮炎和肾炎综合症、猪增生性坏死性间质性肺炎等, 能与弓形体、附红细胞体混合感染, 同时能加剧诸如猪繁殖与呼吸综合症、猪细小病毒病等的发生和流行^[1]。PCV-2广泛存在于世界各地, 对有些国家和地区养猪业造成的危害特别严重。

目前, 诊断该病的方法虽多, 但速度较慢, 而PCR技术可以在短时间内诊断出疾病。笔者根据GenBank中的PCV-2序列设计出特异性引物, 建立猪圆环病毒2型地方分离株的PCR诊断方法, 以期快速诊断猪圆环病毒病提供参考。

1 材料与方 法

1.1 毒株 猪圆环病毒2型(PCV-2)阳性病料由河南科技学院兽医院提供(经ELISA检测确认为阳性); 猪繁殖与呼吸综合症病毒(PRRSV)、猪瘟病毒(HCV)、猪细小病毒(PPV)、猪流感病毒(SIV)均由河南科技学院预防兽医学实验室提供。

1.2 工具酶和主要试剂 Taq DNA聚合酶、dNTPs、Ladder Marker、蛋白酶K均购自TaKaRa公司, SDS、饱和酚、氯仿、无水乙醇均购自华美生物工程有限公司。

1.3 引物设计与合成 参照GenBank上发表的20株PCV-2

的核苷酸序列, 通过引物设计序列软件Primer 5.0设计1对引物, 上游引物为:5'-GGAGTCTGGTGACCGITGG-3'; 下游引物为:5'-CTTCCTCCGTTGGATTGTTCT-3', 引物由上海生物工程有限公司合成。

1.4 PCV-2 DNA 模板的制备^[3] 取部分病料0.5~2.0 g, 研磨并用Hank's液(pH值7.2~7.4)稀释成1:3乳剂, 反复冻融3次以上后, 8 000 r/min 10 min, 取上清液于-20℃保存备用。取病料上清液500 μl, 加入10% SDS 50 μl, 蛋白酶K 20 μl, 混匀后55℃水浴1 h。加800 μl 苯酚混匀, 12 000 r/min 5 min。取上清液, 加苯酚、氯仿各300 μl, 混匀, 12 000 r/min 5 min。取上清液, 加等量氯仿, 12 000 r/min 5 min。小心取上清液, 加2倍无水乙醇及1/10体积的NaAc, 混匀后, 置-20℃沉淀30 min以上, 12 000 r/min 15 min。弃去上清液, 然后加入200 μl 75%酒精洗涤数次, 37℃烘干。加入30 μl ddH₂O溶解, 作为PCR反应的模板或-20℃保存备用。

1.5 PCR 反应及条件的优化 PCR反应的基本步骤按照《分子克隆实验指南》^[4]进行, 对反应体系中的dNTP、酶、引物的浓度进行了优化。在25.00 μl体系中, 10× Buffer 2.50 μl, dNTP 2.00 μl, 模板1.00 μl, DNA聚合酶0.15 μl, 引物各1.00 μl, d₂H₂O 17.35 μl。PCR反应程序:94℃ 2 min; 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30个循环, 72℃ 10 min; 4℃保存。

1.6 电泳检测 在1%琼脂糖板在50V左右时, 加入3 μl染料GOODVIEW上加入DL2000及PCR产物, 电压为80 V。电泳结束后于紫外灯下观察、拍照。

1.7 PCR 的特异性实验 将上述提取的PCV-2 DNA和用Tizd试剂盒提取PRRSV、HCV、SIV的cDNA以及PPV的DNA进行PCR扩增, 引物为上述所设计的PCV-2 DNA的特异性引物, 鉴定该方法的特异性。

1.8 PCR 的敏感性实验 将所提取的DNA用紫外分光光度计在260 nm处进行快速测定, 核酸含量约为50 ng, 然后用灭菌双蒸水进行10、20、40、80、160倍的稀释, 用上述实验确

基金项目 河南科技学院大学生科技创新基金。

作者简介 杭柏林(1978-), 男, 江苏南通人, 硕士, 讲师, 从事动物微生物学与动物性食品卫生学的研究。* 通讯作者, 博士, 教授, E-mail: xxjianhe@yahoo.com.cn。

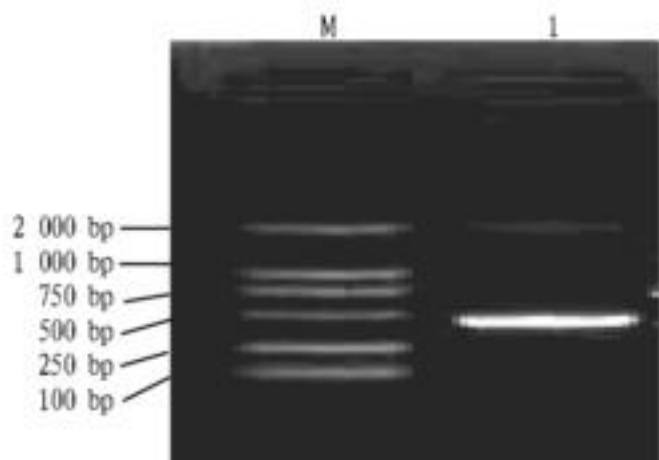
收稿日期 2008-03-31

定的PCR 最佳反应条件进行PCR 扩增。以出现阳性反应条带的模板用量为最高稀释倍数,推算可检出最低病毒含量。

2 结果与分析

2.1 PCR 条件的优化及电泳结果 通过对PCR 扩增条件的优化,得出各物质的最佳使用浓度:dNTP 的终浓度为220 pmol/ml, Taq 酶的终浓度为0.1 U/μl,引物的终浓度为20 pmol/μl。

用优化的条件对从阳性病料中提取的DNA 进行PCR 扩增。将PCR 反应后的产物在紫外灯下观察,结果见图1,在494 bp 处出现1 条特异性条带,与预期大小相符合。



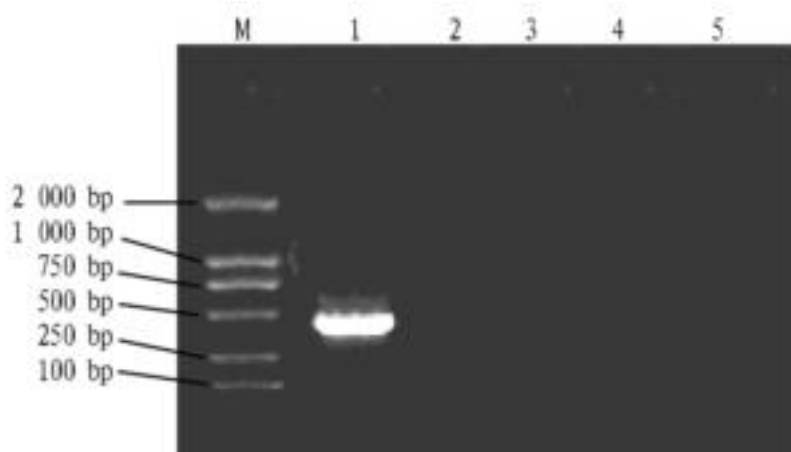
注:M 为 DL2000;1 为PCR 产物。

Note: M. DL2000; 1. Product of PCR.

图1 PCR 检测结果

Fig.1 The results of PCR detection

2.2 PCR 检测 PCV-2 的特异性 应用所建立的方法同时检测 PCV-2、PRRSV、HCV、SIV、PPV, 其中 PCV-2 检测为阳性, PRRSV、HCV、SIV、PPV 检测均为阴性, 未出现交叉反应, 证明该方法具有良好的特异性, 结果见图2。



注:M 为 DL2000;1 为 PCV-2;2 为 PRRSV;3 为 HCV;4 为 SIV;5 为 PPV。

Note: M. DL2000; 1. PCV-2; 2. PRRSV; 3. HCV; 4. SIV; 5. PPV.

图2 特异性检测结果

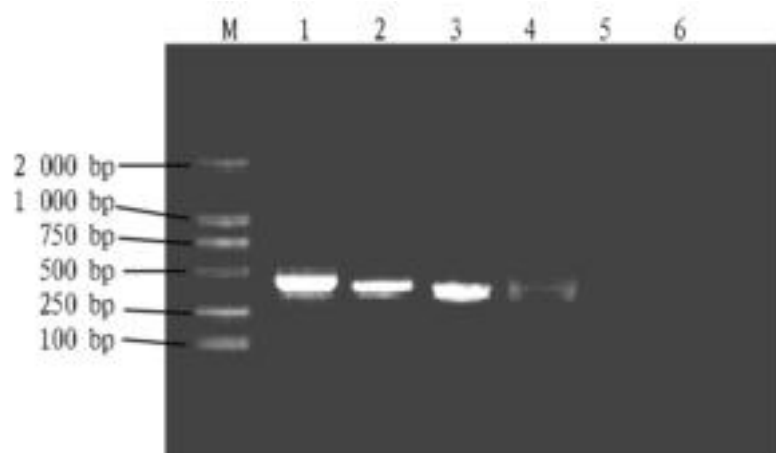
Fig.2 The results of specific detection by PCR

2.3 PCR 检测 PCV-2 的敏感性 将提取的DNA 稀释后用上述PCR 反应条件进行扩增,结果见图3,表明该PCR 方法可检出1.25 ng 的模板 DNA, 具备较高的敏感性。

3 小结与讨论

3.1 猪圆环病毒防治 自1991 年加拿大首次报道PMWS 以来,许多国家相继报道此病,并开展了广泛深入的研究,证实PMWS 的发生与PCV-2 感染密切相关^[5-6]。PCV-2 感染可导致猪发生先天性震颤及猪皮炎肾病综合征^[1,3]。鉴于国内养猪规模的不断扩大及与国际养猪业交流日益加强,很难保证猪群中没有PCV-2 感染及其相关疾病的传入。因此,正确

诊断是预防猪圆环病毒病的关键。



注:M 为 DL2000;1 为 50.000 ng DNA;2 为 5.000 ng DNA;3 为 2.500 ng DNA;4 为 1.250 ng DNA;5 为 0.625 ng DNA;6 为 0.375 ng DNA。

Note: M. DL2000; 1. 50.000 ng DNA; 2. 5.000 ng DNA; 3. 2.500 ng DNA; 4. 1.250 ng DNA; 5. 0.625 ng DNA; 6. 0.375 ng DNA.

图3 敏感性检测结果

Fig.3 The results of sensitivity detection by PCR

到目前为止,虽然众多国外科研工作者对PCV 及其所导致的各种疾病进行了大量的研究,并取得了不小的进展,但是,国内对PCV 研究还处于起始阶段^[10]。迄今为止,该病的疫苗正处于实验阶段,市场上还没有商品化疫苗和特效药物防治该病,并且该病有时呈亚临床感染^[7]。

由于该病原具有特殊性(动物携带病毒但不一定会发病),它主要侵害动物的免疫系统,导致其机体的免疫力下降,进而造成许多病原的继发感染。目前主要采取的措施是加强饲养管理,定期消毒,严防PPV、PRRSV 等引起疾病,降低饲养密度,坚持自繁自养,全进全出,引种猪时应慎重,加强早期疑似感染猪的诊断与淘汰^[8]。除此之外,应建立一种快速、特异、简便的检测方法,为控制PCV 所致疾病的发生与流行提供技术保障。

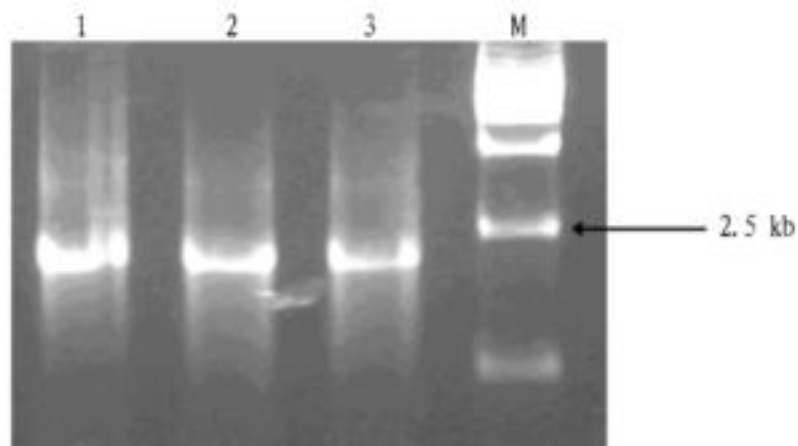
3.2 猪圆环病毒的实验室诊断 实验室诊断PCV 的方法有很多种。酶联免疫吸附实验(ELISA)具有重复性、特异性和敏感性较好的特点,适合于大规模的PCV-2 抗体的快速诊断,同时可用于进出口检验检疫的初筛,但往往存在假阳性偏高的问题^[9]。通常用来诊断PCV-2 的ELISA 方法包括间接ELISA、竞争ELISA 和抗原捕获ELISA 等。间接免疫荧光实验(IFA)可用于猪圆环病毒感染的血清学普查^[9],宜于检测细胞培养物中的PCV。原位核酸杂交(ISH)具有群特异性,灵敏度较高,可以精确定位PCV 在组织器官及其细胞中的部位,可用于检测临床病料和病理分析,但不能区分PCV-1 和PCV-2。免疫组化实验(IHC)适合于病毒抗原在组织培养和机体细胞内生长定位的观察。来源于不同地区的PCV-2 分离株,其基因组序列有差异,这种差异对PCV-2 的诊断和研究有重要意义。已有学者利用此差异建立了PCV-RFLP 方法,以此来诊断PCV 感染^[10]。

3.3 PCR 检测 PCV-2 通常情况下,病毒病的确诊均需进行病毒分离。但由于PCV 的病毒粒子很小(只有17 nm),在细胞上不产生细胞病变,且需将PCV 盲传多代才能使病毒有效增殖^[2]。因此,病毒分离费力、耗时,不适于此病的快速诊断。国外已有多种市售诊断试剂盒,如ELISA、间接免疫荧光

(下转第6700 页)

键基因的功能发挥从而阻断雄配子的正常发育,是实现植物基因工程雄性不育的一条重要途径。

在植物基因工程雄性不育研究中,经常应用来自于烟草的TA29花药特异性启动子构建表达载体。但有研究表明,用该启动子构建的表达载体有可能受温度的影响^[10-11]。因此该研究选用来自于水稻的花药特异性 $\alpha g6B$ 启动子,因为

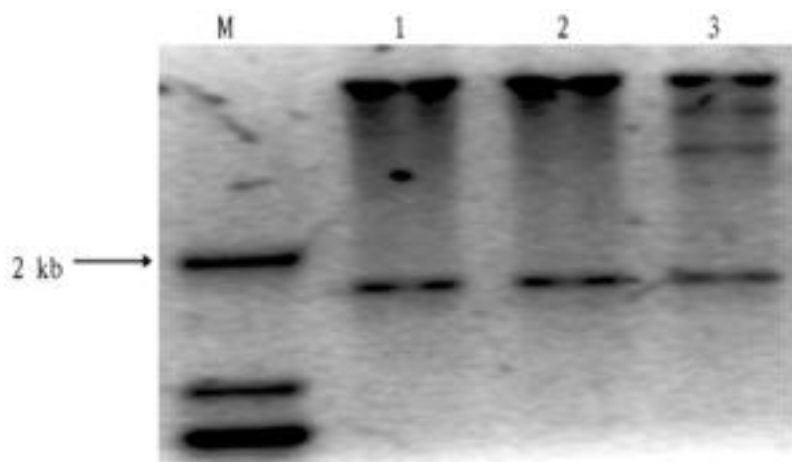


注:1~3:单克隆菌斑;M:DNA Marker(500~15 000)。

Note:1,2 and 3 were done colony;M was DNA marker(500-15 000)。

图3 表达载体菌落PCR鉴定

Fig.3 PCR identification of expression vector colony



注:1~3:单克隆表达质粒;M:DNA Marker DL2000。

Note:1,2 and 3 were monoclonal expression plasmids;M was DNA Marker DL2000。

图4 表达载体质粒的酶切鉴定

Fig.4 Enzyme digestion identification of expression vector plasmids

(上接第6679页)

实验(IFA)等^[1],但其非特异性较高,且价格昂贵。

PCV-2是DNA病毒,基因组很小,仅有1768 bp(部分为1767 bp)^[2],便于从核酸水平对病毒进行检测和研究。PCR技术以其敏感、特异、快速、准确的优点成为目前病毒学诊断、分子生物学实验最常用的技术之一。PCR方法可以快速准确检测感染病例组织样品中的PCV-2核酸,其敏感性和特异性与IFA方法一致,是检测PCV-2和实验室诊断猪圆环病毒病的有效手段。

在该实验中,笔者设计并合成了1对引物,用此引物对病毒全基因进行扩增,得到了494 bp的目的片段,与预期大小相符。用该方法同时扩增猪瘟病毒、猪流感病毒、猪细小病毒、猪繁殖与呼吸综合症病毒均无条带产生,证明该PCR检测方法的可行性及具有较高的特异性。

从核酸的制备到检测出结果约需3 h,大大缩短了检测时间。用该实验所建立的PCR方法诊断PCV具有快速、准确、特异的特点,为PCV的检测提供依据,以便及时检出隐

目前尚未有该启动子受环境温度影响的报道,并且由于禾本科植物的亲缘关系比较近,可以推测 $\alpha g6B$ 启动子在其他禾本科粮食作物中的活性也比较强。

基于HSP70热激蛋白与高粱的雄性不育有密切关系,及其在生物体内的重要性和进化上的保守性,选择HSP70基因作为基因工程雄性不育的靶标基因,构建了由 $\alpha g6B$ 启动子驱动的HSP70反义表达载体。该反义表达载体所含有的HSP70基因片段位于翻译起始密码子区,可以很好地实现对目标基因翻译起始的抑制。另外,该基因片段的长度较短,转录后,不会形成RNA二级结构,可以更有效的实现对目标基因表达的抑制作用。该反义表达载体的构建不仅对于阐明植物雄性不育基因表达调控的分子机理具有重要意义,同时将为植物基因工程雄性不育,特别是在重要禾本科粮食作物上的应用奠定坚实的基础。

参考文献

- [1] HENDRICK J P, HARIL F U. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1993, 62: 349-384.
- [2] BOORSTEIN WR, ZIEGLHOFFERT, CRAIG EA. Molecular evolution of the HSP70 multigene family[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1994, 38(1): 1-17.
- [3] BUKAU B, WEISSMAN J, HORWICH A. Molecular chaperones and protein quality control[J]. *Cell*, 2006, 125(3): 443-451.
- [4] PARSELL D A, LINDQUIST S. The function of heat shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins[J]. *Annual Review of Genetics*, 1993, 27: 437-496.
- [5] DIX DJ, ALLEN J W, COLLINS B W, et al. Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93(8): 3264-3268.
- [6] 张孔恬, 李京京. 雄性不育高粱(3197A)的热激蛋白与育性的关系[J]. *遗传学报*, 1992, 19(4): 327-335.
- [7] 陈建南, 傅鸿仪, 刘根齐, 等. HSP70基因探针与高粱DNA和mRNA杂交的初步分析[C]. *植物遗传理论与应用研讨会论文集*, 1994: 143-147.
- [8] 陈建南, 傅鸿仪, 秦环英, 等. HSP(70)反义RNA对高粱花粉的正常形成的影响[J]. *科学通报*, 1997(18): 1993-1997.
- [9] TSUCHIYA T, TORIYAMA K, EIIRI S, et al. Molecular characterization of rice genes specifically expressed in the anther tapetum[J]. *Plant Molecular Biology*, 1994, 26(6): 1737-1746.
- [10] 李胜国, 刘玉乐, 朱峰, 等. 基因工程雄性不育烟草及其温度敏感性[J]. *植物学报: 英文版*, 1997(3): 231-235.
- [11] 李胜国, 刘玉乐, 朱峰, 等. 基因工程雄性不育烟草的获得[J]. *植物学报*, 1995(8): 659-660.

性感染猪和对临床发病猪进行原发性病原的确定,及时对该病进行综合防治,以减少该病所带来的经济损失,从而保障畜牧业可持续发展。

参考文献

- [1] 陈溥言. 兽医传染病学[M]. 5版. 北京: 中国农业出版社, 2006: 231-234.
- [2] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 1997: 1175-1183.
- [3] 潘饶霖, 单松华, 刘洪云, 等. 猪圆环病毒2型的分离与鉴定[J]. *上海农业学报*, 2006, 22(3): 4-7.
- [4] J 萨姆布鲁克, D W 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 3版. 黄培堂, 等译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [5] 郎洪武, 张广川, 吴发权, 等. 断奶猪多系统衰竭综合症血清抗体检测[J]. *中国兽医科技*, 2000, 30(3): 3-5.
- [6] KENNEDY S, MOFITT D, MCENUY F. Reproduction of lesions of Postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with Porcine circovirus type 2 alone or in combination with Porcine parvovirus[J]. *Journal of Comparative Pathology*, 2000, 122(1): 9-24.
- [7] 伊卫卫, 孙继国, 宋洁, 等. 猪圆环病毒研究进展[J]. *畜禽业*, 2006, 194(3): 13-15.
- [8] 王海花, 李艳铃, 王得刚, 等. 猪圆环病毒研究进展[J]. *家畜生态学报*, 2006, 27(4): 24-27.
- [9] 刘守媛. 猪圆环病毒2型分子生物学及诊断方法研究进展[J]. *中国动物检疫*, 2006, 23(9): 45-47.
- [10] 崔克, 梁源祥, 李布勇, 等. 猪圆环病毒病诊断技术研究进展[J]. *海南大学学报: 自然科学版*, 2006, 24(4): 418-423.