

## II 型猪圆环病毒检测试剂盒的研制\*

姜焱<sup>1</sup>, 侯玉峰<sup>2</sup>, 王凯民<sup>1</sup>, 张常印<sup>1\*\*</sup>

(1. 江苏出入境检验检疫局, 江苏南京 210001; 2. 南京出入境检验检疫局, 江苏南京 210001)

### Detection Kit for the Porcine Circovirus

JIANG Yan<sup>1</sup>, HOU Yu-feng<sup>2</sup>, WANG Kai-min<sup>1</sup>, ZHANG Chang-yin<sup>1</sup>

(1. Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau; 2. Nanjing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001, China)

**Abstract:** On the basis of genomic sequence of PCV-2 in the GenBank, two primers for amplification of PCV-2 specified fragments were designed and PCR assay for the detection of PCV-2 was established, the kit was used to detect PCV-2. The kit's sensitivity, specificity and expiration date were tested. The result suggested the kit had high sensitivity and specificity. It could be stored at least for one year at -20 .

**Key words:** Porcine circovirus 2; Polymerase chain reaction; Kit; Sensitivity; Specificity

关键词: PCV-2; PCR; 试剂盒; 特异性; 敏感性

中图分类号: S 852.65 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2005)01-0089-03

猪圆环病毒(Porcine circovirus, PCV)属圆环病毒科圆环病毒属成员<sup>[1]</sup>。PCV 分两种血清型,即 PCV-1 和 PCV-2,其中 PCV-1 由 Tischer 等<sup>[2]</sup>于 1974 年检测到,对猪没有致病性;PCV-2 可引起部分断奶仔猪和育肥猪的断奶仔猪多系统综合征(postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)<sup>[3]</sup>。目前,该病呈世界分布,给养猪业造成巨大的经济损失。本研究通过分析已发表的 PCV-2 的基因序列,找出 PCV-2 的特异性片段,研制了检测 PCV-2 的试剂盒。检测临床疑似病料,结果表明该试剂盒使用方便、快速、敏感、特异,符合国内的养殖场及进出口的需要。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

PK-15 细胞(无 PCV-1 污染),PCV-2、PCV-1 标准毒、猪伪狂犬病病毒(PRV)、猪细小病毒(PPV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)由南京农业大学传染病组赠送。PCR 试剂、蛋白酶 K 购自大连 Takara 公司,其它试剂购于南京生兴生物技术

公司。

### 1.2 引物设计和合成

根据 PCV-2 的基因序列,利用 Primer 程序设计一对引物,由上海博亚公司合成。

PCV-2. S:5'-CACGGATA TTGTA GTCCTGGT-3

PCV-2. AS:5'-CCGCACCTTCGGATATACTGTC-3

### 1.3 病毒培养及其 DNA 模板的制备

按参考文献<sup>[1]</sup>培养 PCV-1、PCV-2、PPV、PRV、PRRSV 后并提取病毒基因组,将提取物溶解于 30 $\mu$ L 超纯水,取 10 $\mu$ L 用作 PCR 模板。

### 1.4 PCR 扩增及其条件的优化

对 PCR 反应体系中 dNTP、Mg<sup>2+</sup>、Taq 酶、引物的浓度进行了优化。PCR 反应过程:95 5min; 94 1min,51 1min,72 1min,30 个循环;72 10min;4 保存。

### 1.5 PCV-2 试剂盒特异性、敏感性和稳定性的检测

试剂盒包括试剂 A、试剂 B,阴性和阳性对照。试剂盒使用时,每份样品的 50 $\mu$ L 反应体系取试剂 A 39.5 $\mu$ L,试剂 B 0.5 $\mu$ L,检测模板 10 $\mu$ L。然后进行 PCR 反应即可。

收稿日期:2004-08-23,修回日期:2004-10-08

\* 基金项目:江苏出入境检验检疫局科研项目(2002 KJ16)

作者简介:姜焱(1972-),女,江苏泗阳,博士,主要从事动物检验检疫。E-mail:jingyan\_1029@yahoo.com.cn

\*\* 通讯作者:张常印(1960-),男,研究员,研究方向为动物检疫。

Corresponding author. Tel:025-52345231, E-mail:zhangcy@jsci.gov.cn

按参考文献<sup>[1]</sup>提取 PPV、PRV、PRRSV、PCV-1、PCV-2 的 DNA,并以此为模板,用试剂盒进行 PCR 扩增,并将 PCV-2 的 PCR 产物测序,对该试剂盒的特异性进行检测。同时将 PCV-2 的模板进行 10 倍递增稀释,对其敏感性进行检测。

试剂盒保存于-20℃,对经过反复冻融、保存时间进行了研究。

### 1.6 PCV-2 检测试剂盒的应用

将疑似病料(肝、肺、脾、肾等)研磨后,冻融 3 次,10000r/min 离心 10min,取上清-20℃保存备用。按参考文献<sup>[1]</sup>提取病料中 DNA 作模板。用该试剂盒对来自福建、上海、江苏、浙江、安徽、山东等地的养殖场的疑似病料进行检测,并与芦银华等<sup>[4]</sup>建立的方法进行了比较。

## 2 结果

### 2.1 PCR 条件优化及扩增结果

通过对 PCR 反应体系中 dNTP、Mg<sup>2+</sup>、Taq 酶、引物的浓度进行了优化,得出的最佳浓度分别为:dNTP 的终浓度为 200μmol/mL,Mg<sup>2+</sup> 的终浓度为 1.5mmol/mL,Taq 酶的终浓度为 0.05U/μL,引物的终浓度为 20μmol/μL。用优化的条件对标准 PCV-2 进行 PCR 扩增,1.4%琼脂糖凝胶电泳,结果扩增出一条大小为 500bp 的片段,大小与预期相符。

### 2.2 试剂盒特异性、敏感性和稳定性鉴定

对试剂盒的特异性、敏感性和稳定性进行了研究,结果表明该试剂盒具有较好的特异性(图 1);它可检测出 0.5pg 的模板 DNA,具有较高的敏感性(图 2)。将试剂 A 和试剂 B 保存于-20℃。经过一年的保存和反复冻融后,对 PCV-2 模板进行检测,结果表明,该试剂盒的稳定性较好。

### 2.3 PCV-2 检测试剂盒的应用

用该试剂盒对来自福建、上海、江苏、浙江、安徽、山东等地的养殖场的疑似病料(表 1)进行检测,

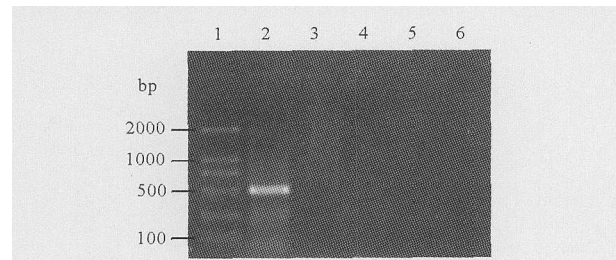


图 1 PCR 方法检测 PCV-2 的特异性鉴定

Fig.1 Specificity Analysis of PCR Products to Inspect PCV-2  
1,Marker DL-2000; 2,PCV-2; 3,PCV-1; 4,PPV; 5,PRRSV; 6,PRV.

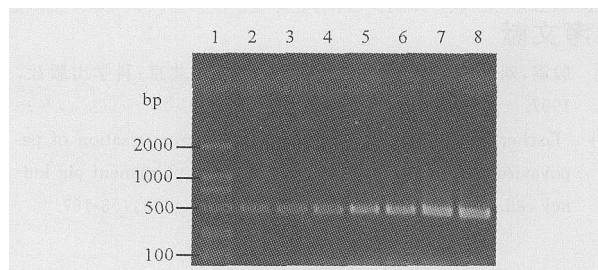


图 2 应用引物 PCV-2. S 和 PCV-2. AS 进行 PCR 敏感性试验

Fig.2 Sensitivity of PCR amplification using primers PCV-2. S and PCV-2. AS

1,Marker DL-2000; 2-8,The template concentration is 0.5pg, 5pg, 50pg, 500pg, 5ng, 50ng and 500ng, respectively

并将部分 PCR 产物回收进行测序,并将测序结果与 GenBank 中已发表的基因序列进行比较,与 PCV-2 的同源性达 98%~99%,这表明该试剂盒的特异性较好。

表 1 病料试剂盒检测结果

| Origin of tissue samples | Number of tissue samples (case) | Number of positive samples (case) | Positive rate of tissue samples (%) |
|--------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| Fujian                   | 27                              | 2                                 | 7.4                                 |
| Shanghai                 | 16                              | 3                                 | 18.6                                |
| Jiangsu                  | 18                              | 2                                 | 11.1                                |
| Zhejiang                 | 23                              | 5                                 | 21.7                                |
| Shandong                 | 28                              | 4                                 | 14.3                                |
| Total                    | 112                             | 16                                | 14.3                                |

## 3 讨论

通常情况下,病毒病的确诊均需进行病毒分离。但由于 PCV 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,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、间接免疫荧光试验(IFA)等,但其非特异性较高,且价格昂贵。目前,用分子生物学技术检测 PCV-2 的方法很多,但将这些方法研制成试剂盒来诊断 PCV-2,至今未见报道。

本研究研制的试剂盒具有快速、简便、灵敏度高、特异性强、稳定性好等优点。比一般 PCR 方法可最大限度减少取样错误和交叉污染,如大批量检测,按常规 PCR 加样,工作量大,且人为出错几率大。该试剂盒的推出,可以大大减低了劳动强度和出错几率。该试剂盒内的试剂在 -20℃条件下可以

保存一年以上,即使多次冻融,也不会影响活性。

### 参考文献

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 第二版. 北京:科学出版社, 1997.
- [2] Tischer I, Rasch R, Tochtermann G. Characterization of papovavirus and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines[J]. Zentralbl Bakteriol. 1974, 226:153-167.
- [3] Allan G M, McNeilly F, Kennedy S. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe[J]. J Vet Diagn Invest, 1998, 10:3-10.
- [4] 芦银华,谈国蕾,陈德胜,等. 猪圆环病毒复合 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 农业生物技术学报, 2002, 10(4):415-416.

## 2004年《中国病毒学》审稿专家名单

2004年下列专家在百忙之中为本刊审阅过稿件,谨致衷心感谢!

(按姓名汉语拼音排序)

白雪帆 毕英佐 常国权 常维山 陈 涛 陈集双 陈建国 陈剑平 陈金顶 陈溥言  
 陈士云 陈绳亮 陈新文 成 军 崔言顺 崔治中 邓宏魁 邓教宇 丁明孝 丁清泉  
 董长垣 范伟兴 范在丰 方 勤 方呈祥 高光侠 耿运琪 龚祖坝 郭福生 郭元吉  
 杭长寿 何孔旺 洪 健 洪华珠 扈荣良 胡远扬 胡志红 姜 平 姜世金 江丽芳  
 金宁一 金梅林 李德富 李琦涵 李天宪 李晓眠 梁国栋 刘 虹 刘德立 刘金华  
 刘胜旺 刘筱娴 刘秀梵 龙紫新 卢亦愚 陆 苹 陆承平 孟继鸿 孟小林 牛钟相  
 潘 卫 彭建新 戚中田 乔文涛 秦爱建 邱德新 石正丽 宋文芹 苏德明 孙修炼  
 唐祖明 王汉中 王华林 王健伟 王珣章 王佑春 王永山 王增珍 吴淑勤 吴祥甫  
 吴移谋 伍欣星 徐葛林 徐志凯 严家新 杨东亮 杨汉春 杨继红 杨占秋 叶林柏  
 尤永进 俞永新 余泽华 袁玉华 袁正宏 詹美云 张传溪 张楚瑜 张富强 张奇亚  
 张以芳 赵以军 张忠信 郑从义 钟 江 周雪平 周亚凤 朱关福 朱函坪 朱振宇  
 祝庆余