

检测 PCV₂、PPV、PRV 疫苗株与野毒株的多重 PCR 方法*

潘群兴^{1,2}, 陈 德^{1,2}, 何孔旺^{2**}, 黄克和¹

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏南京 210095; 2. 江苏省农业科学院兽医研究所 农业部畜禽疫病诊断重点开放实验室, 江苏南京 210014)

Multiplex PCR for Rapid Detection of Pseudorabies Virus, Porcine Parvovirus and Porcine Circovirus Type 2

PAN Qun-xing¹, CHEN De^{1,2}, HE Kong-wang^{2**}, HUANG Ke-he¹

(1. College of Animal Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Key Laboratory of Animal & Poultry Disease diagnosis, Ministry of Agriculture, Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: A multiplex PCR (mPCR) assay was developed and evaluated for its effectiveness as a means to simultaneously detect multiple viral infection of swine. Specific primers for each of the three common DNA viruses, Pseudorabies virus (PRV), *Porcine parvovirus* (PPV) and *Porcine circovirus* type 2 (PCV₂) were used to test the procedure. Four specific bands of 269bp (PCV₂), 583 bp (PPV), 372 bp (PRV gB) and 147 bp (PRV gE) were amplified. The assay proved to be sensitive when a composite of all three viruses were amplified, including both field and gene-deleted permutations of PRV. No specific band was amplified from other pathogenic viruses and bacteria. As little as 10 pg PCV₂, 10^{-5.2} TCID₅₀ PPV, 10^{-3.8} TCID₅₀ PRV gB and 10^{-5.8} TCID₅₀ PRV gE were detected in this mPCR. This method could effectively detect infection of PCV₂, PPV, field and gene-deleted permutations of PRV from clinical samples.

Key words: Multiplex PCR; Pseudorabies virus (PRV); *Porcine parvovirus* (PPV); *Porcine circovirus* type 2 (PCV₂)

摘要: 本文建立了一种同时检测猪圆环病毒 2 型 (PCV₂)、细小病毒 (PPV)、及伪狂犬病毒 (PRV) 疫苗株与野毒株的多重 PCR 方法。根据 GenBank 上发表的 PCV₂、PPV 和 PRV gB、gE 基因序列, 针对各自保守区各设计一对特异性引物, 用这四对引物对同一样品中的 PCV₂、PPV 和 PRV gB、gE 进行检测, 结果可同时扩增出 269bp (PCV₂)、581bp (PPV)、372bp (PRV gB) 及 147bp (PRV gE) 四条特异性片段。对 JEV、PRRSRV、大肠杆菌和双蒸水的 PCR 扩增结果均为阴性; 敏感性测定结果表明, 该多重 PCR 能检出 10pg PCV₂、PPV 和 PRV gB、gE 检测敏感度分别为 10^{-5.2}、10^{-3.8}、10^{-5.8} TCID₅₀ 的模板。该方法的建立对临床上进行这三种疾病的鉴别诊断和混合感染的检测具有重要意义。

关键词: 多重聚合酶链式反应; 伪狂犬病毒 (PRV); 细小病毒 (PPV); 猪圆环病毒 2 型 (PCV₂)

中图分类号: S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2005)06-0603-04

近年来发现的猪 2 型圆环病毒 (*Porcine circovirus*, PCV) 以及猪细小病毒 (*Porcine Parvovirus*, PPV) 伪狂犬病毒 (Pseudorabies virus, PRV) 被认为是导致断奶仔猪多系统衰竭征及猪繁殖障碍一

类疾病的重要病原体^{6~8}。猪圆环病毒 (PCV) 属圆环病毒科圆环病毒属病毒。该病毒科是国际病毒分类学会第 6 次病毒分类报告的新增病毒科, 我国自郎洪武、王力分离到两株 PCV₂ 以来, 对猪感染

收稿日期: 2005-04-19, 修回日期: 2005-06-27

* 基金项目: 国家攻关课题资助 (2004BA514.A16-5); 国家“863”项目 (2001AA249012)

作者简介: 潘群兴 (1979-), 女, 安徽怀宁人, 南京农业大学在读硕士研究生, 从事临床病理与分子诊断学研究。

** 通讯作者: 何孔旺 (1963-), 研究员, 从事兽医分子微生物学研究。

Corresponding author. Tel: 025-84390748; E-mail: kwh2003@263.net

PCV的报道也越来越多^[5,10]。近年来PCV₂与世界各国广泛发生断奶仔猪多系统衰竭综合征(Postweaning multisystemic wasting syndrome PMWS)密切相关^[4];PPV一直以来就是猪繁殖障碍的重要病原;随着规模化和集约化养猪业的发展和改革开放的不断深化,从国外引进的种猪相应增多,PRV随之传入,并不断蔓延扩大,造成严重的经济损失。自70年代中期以来,PRV人工筛选的自然弱毒苗及基因工程缺失苗的广泛应用,可以使猪免于发病,但不能阻止野毒的潜伏感染。所以需要一种快速有效的方法来鉴别诊断这三种病毒感染并区分伪狂犬弱毒疫苗免疫动物和野毒自然感染动物。目前关于PRV、PCV₂、PPV的病原学检测方法有病毒分离鉴定、ELISA、琼脂扩散、血细胞凝集和免疫荧光等常规技术。这些技术发挥了一定作用,但也有各自的不足之处。随着现代分子生物学技术的发展,分子诊断已被广泛研究和应用。实践证明,多重PCR用于PRV、PCV₂、PPV感染的实验室诊断方法具有快速、敏感性高、特异性强等特点。该方法的建立对临床上进行这三种疾病的鉴别诊断和混合感染的检测具有重要意义,在某种程度上还可以为这3种病毒之间在猪群中的感染关系提供一定的研究数据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

圆环病毒毒株:由江苏省农科院兽医所分离并测序鉴定保存;猪细小病毒毒株由中国兽药监察所提供;猪伪狂犬病毒强弱毒株由江苏省农科院兽医所提供。PK-15细胞、BHK₂₁细胞、ST细胞由该所提供,用于病毒的增殖。PCR试剂(包括10×PCR buffer、25mmol/L MgCl₂、10mmol/L dNTPs和Taq酶)、胰酶、氨苄青霉素(Amp)购自上海生工生物技术公司;DNA分子量标准、EcoR I、AccI I、HpaI I内切酶、pMD18-T-Vector、T4 DNA连接酶及碱性磷酸酶(CIAP)、蛋白酶K均购自大连TaKaRa有限公司;DNA快速纯化回收试剂盒购自上海华舜公司;其它试剂均为分析纯产品。

1.2 引物设计

根据GenBank已发表PPV基因核苷酸序列^[2],针对其保守区,利用软件Premier5.0设计一对引物,扩增581bp的特异性片段;根据GenBank发表PCV₁和PCV₂核苷酸序列^[1],选择ORF2同源性低(31%)的序列,设计一对引物只能扩增PCV₂269bp的特异性片段。PRV引物设计参考冉智光等^[3]设计的引物,扩增PRVgB 372bp和PRV

gE147 bp的特异性片段。引物序列如下:

PPV₁: 5'-aggtggacgcatggggagt-3',
 PPV₂: 5'-tgttcctagtggtgtctc-3',
 PCV₂₁: 5'-tggtgattggttgaagt-3',
 PCV₂₂: 5'-ctctgtgcccttgtata-3',
 PRVgB₁: 5'-agtactcgcaggggctggact-3',
 PRVgB₂: 5'-cgccgatetgcatgtaggtgt-3',
 PRVgE₁: 5'-aggacgagttcagcagcgacg-3',
 PRVgE₂: 5'-aacagggcggttggcggtcac-3'.

1.3 病毒培养

BHK₂₁、ST细胞分别常规接种已复壮的PRV、PPV,再分别加含小牛血清(2%)的Hank's维持液和PRMI1640维持液,37℃静置培养,当细胞出现75%以上的CPE时收毒;PK-15细胞接种已复壮的PCV₂,12h后弃去培养液,经Hank's液洗后,加含小牛血清(10%)MEM培养基继续培养48h,由于PCV₂在细胞中增殖但不产生病变,连续传四代,收毒。均设正常未接毒细胞对照。

1.4 样品处理及模板制备

组织样品:被检样品(肺、脑、肾等)研磨后,反复冻融3次,然后以8000r/min离心10min取上清待检;血清样品与细胞增殖毒液:反复冻融3次待检。病毒DNA的提取参照文献方法进行^[9]。

1.5 复合PCR的建立与优化

30mL反应体系中加入2.5mL 10×buffer,2.0μL 25mmol/L MgCl₂,PCV₂、PPV、PRVgB和PRVgE引物分别为0.4mL、0.5mL 0.35和0.15mL,循环参数为95℃预变性5min、95℃/50s、58℃/1min、72℃/1.5min,30个循环后,72℃延伸10min。

1.6 PCR扩增的特异性

以PCV₂、PPV和PRV及JEV、PRRSRV、大肠杆菌和双蒸水为模板进行PCR扩增,检验其特异性。扩增后的PCR产物采用常规琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

1.7 PCR产物的鉴定

对PPV、PRVgB、gE的扩增产物分别用EcoR I、HpaI I、AccI I进行酶切;因为PCV₂的扩增片段内没有常见的酶切位点,所以将其扩增产物回收,克隆到T载体中,转化JM109菌,提取质粒后,由宝生物工程(大连)有限公司测序。

1.8 扩增的敏感性

按文献^[9]方法进行PPV、PRV强弱毒TCID₅₀测定后,用双蒸水作10倍系列稀释,使PPV和PRV的最低含量分别为10⁻¹² TCID₅₀,因为PCV在细胞中增殖不产生病变,所以用蛋白核酸测定仪检测核酸浓

度,使 PCV 最低含量为 1fg 进行 PCR 扩增。并以 ddH₂O 做阴性对照。取每个稀释度的细胞培养物作模板进行 PCR 检测确定 PCR 的敏感性。

1.9 多重 PCR 与其他方法的比较

实验中随机选取了 10 份样品进行多重 PCR 检测,同时对 PPV 进行 HA 检测,具体方法参照文献^[9];对 PRV、PCV₂ 在病毒分离后进行 IFA 检测,具体操作参照文献方法^[12]。

1.10 对临床样品进行检测

利用该诊断方法对临床表现 PMWS 的 80 份样品进行检测,其中 56 份组织样品和 24 份血清。

2 结果

2.1 多重 PCR 产物的电泳分析

以 PCV₂、PPV 和 PRV 混合模板做单重和多重 PCR,并以 ddH₂O 做对照,分别扩增出 PCV₂ 269bp, PPV 581bp, PRV gB/gE 372bp/147bp 特异性条带;多重 PCR 可同时扩增出四条相应的特异性条带,双蒸水未扩出条带(图 1)。

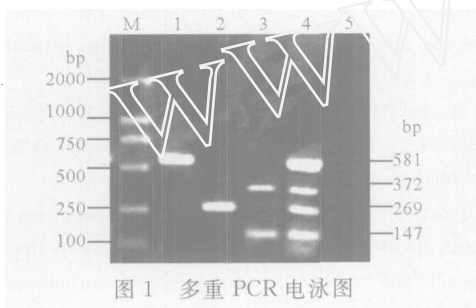


图 1 多重 PCR 电泳图

Fig. 1 mPCR products of infected sample

M, DNA marks; 1, PCV₂; 2, PPV; 3, PRV gB, gE; 4, PPV, PRV gB, gE and PCV₂; 5, ddH₂O

2.2 PCR 扩增的敏感性

用双蒸水将模板梯度稀释,在扩增体系中最低检出 PPV、PRVgE、PRVgB 分别为 $10^{6.2}$ 、 $10^{5.8}$ 、 $10^{3.8}$ TCID₅₀, PCV₂ 可检测到 10pg。

2.3 PCR 扩增的特异性

分别以 PCV₂、PPV 和 PRV 的模板做单重和多重 PCR,同时以 JEV、PRRSV 大肠杆菌和双蒸水作阴性对照。结果分别扩增 PPV 581bp; PCV₂ 269bp; PRVgB/gE 372bp/147bp 特异性条带;多重 PCR 同时扩增出四条特异性条带;JEV、PRRSV、大肠杆菌和双蒸水未扩增出条带(图 2)。

2.4 多重 PCR 与其他方法的比较

随机选取 10 份样品,利用多重 PCR 检测出阳性数:PPV(0/10)、PRVgB(5/10)、PRVgE(2/10)、PCV₂(4/10)其中 PRVgB/PCV₂ 混合感染 2 份;同时 PPV HA 检出阳性数(0/10);PCV₂ 病毒分离检



图 2 多重 PCR 扩增的特异性

Fig. 2 mPCR products of samples

M, DNA marks; 1, PPV; 2, PCV₂; 3, PRV gB, gE; 4, The infected sample of PRV, PPV and PCV₂; 5, JEV; 6, PRRSV; 7, Escherichia coli; 8, ddH₂O

测出阳性数(2/10); PRVIFA 检测出阳性数(3/10),其中 PRV/PCV₂ 混合感染 1 份,而且,这 4 份经病毒分离、IFA 检测的阳性样品经多重 PCR 检测全部为阳性。说明利用该多重 PCR 检测不但快速、特异性强、敏感性高,而且能区分伪狂犬弱疫苗免疫动物和野毒自然感染动物。

2.5 扩增产物的鉴定

对 PPV 扩增产物用 *EcoR* I 进行酶切,得到 445bp、136bp;对 PRV 的 gE 和 gB 分别用 *AccI* I、*HaPI* I 酶切,得到 86bp、61bp 和 251bp、121bp;与预期片段完全一致。酶切图谱见图 3。

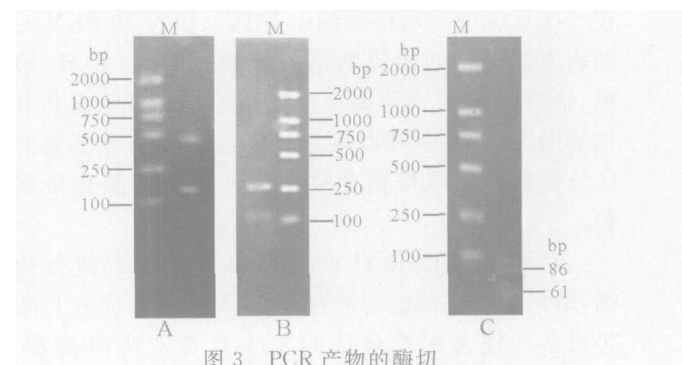


图 3 PCR 产物的酶切

Fig. 4 PCR products digested with restriction enzymes

M, DNA marks; A, PPV/*EcoR* I; B, PRVgB/*HaPI* I; C, PRVgE/*AccI* I

将 PCV₂ 测序结果与 GenBank 收录的序列进行比较,发现与收录的 AY732494, AY691679, AY641542 等 PCV₂ 基因序列的同源性在 99.5%~100%之间,说明其为 PCV₂ 的特异性条带。

2.6 临床检测结果

利用多重 PCR 对临床上的 80 份以前进行过 PCV₂ 和 PRRS 检测的样品进行检测,PCV₂ 与以前检测结果相符合,其中 PCV₂ 与 PRV 混合感染 30 份(其中野毒感染 14 份),PCV₂、PRV 和 PRRS 混合感染 8 份,PCV₂ 单独感染 12 份(表 1)。

3 讨论

多重 PCR 方法近年来已被很多学者用于疾病

表 1 临床样品多重 PCR 检测结果
Table 1 Detection Result of clinical samples by mPCR

Infection types	Tissue samples			Serum		
	Detected number	Positive	Positive probability(%)	Detected number	Positive	Positive probability(%)
PPV	56	0	0	24	0	0
PCV2	56	30	53.5	24	12	50
PRV gB	56	23	41	24	8	33.3
PRV gE	56	10	17.8	24	4	16.7

的混合感染和鉴别诊断。本研究在引物设计上利用扩增片段长度的不同直接判定扩增结果,使该多重 PCR 在结果判定时更简便、直观和实用。在进行多重 PCR 扩增时,反应体系中各组份的浓度及扩增条件直接影响试验效果。因此,试验中有必要对各种条件进行优化。采用优化后的条件,进行多重 PCR,可分别得到与试验设计大小相符的扩增带,而未出现其他的非特异性条带,说明具有特异性,而且它对 PCV₂、PPV、PRV 不同毒株具有广泛的适用性。敏感性检测结果表明,该多重 PCR 可以检测出微量的核酸模板。因此,本试验所建立的多重 PCR 方法能在一次反应中对所怀疑的由 PCV₂、PPV 和 PRV 三种病原体引起的传染病进行核酸诊断,且特异、敏感、快速、简便,而不需要进行繁琐的病毒分离和其他辅助性试验,就可以鉴别诊断这三种病毒感染并区分伪狂犬弱毒疫苗免疫动物和野毒自然感染动物。

利用多重 PCR 对 80 份临床送检样品进行检测,结果表明我国已普遍存在 PCV₂ 感染,而且与断奶猪多功能衰竭综合征的发生有着密切的关系。PCV₂ 经常与猪呼吸繁殖综合征病毒(PRRSV)或猪细小病毒(PPV)并发感染或继发细菌感染^[11]。本试验结果显示在 PCV₂ 高感染率的情况下,存在 PCV₂ 与 PRV 混合感染,与 PRRS(在进行多重 PCR 检测的同时进行 PRRS 的 RT-PCR 检测)和 PRV 混合感染,但与 PPV 的混合感染几乎不存在。该方法的建立对临床上进行这三种疾病的鉴别诊断和混合感染的检测具有重要意义,在某种程度上还可以为这 3 种病毒之间在猪群中的感染关系提供一定的研究数据。

参考文献

[1] Hamel A L, Lin L L, G Nayar P S. Nucleotide sequence of por-

cine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs[J]. J Virol, 1998, 72: 5262-5267.

- [2] Vasudevacharya J, Basak S, Srinivas R V, *et al.* Nucleotide sequence analysis of the capsid genes and the right-hand terminal palindrome of porcine parvovirus, strain NADL-2[J]. J Virol, 1989, 173(2):, 368-377.
- [3] 冉智光, 童光志, 孔令达, 等. 伪狂犬病弱毒疫苗与野毒株 PCR 鉴别诊断方法的建立. [J]. 中国畜禽传染病, 1998, 20(2): 108-111.
- [4] Krakowak S, Ellis J A, Meehan B, *et al.* Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. [J]. Vet. Pathol, 2000, 37: 254-263.
- [5] Larochelle R, Antaya, Mmorin, M, Magar, R. Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR[J]. Virol Methods, 2000, 80: 69-75
- [6] Gretxhwn L, Amanda D, Randall A, *et al.* Insertion in the gG gene of psedurabies virus reduce expression of the upstream protein and inhibit cell to cell spread of virusinfection [J]. J Virol. 2001, 75: 10856-10869.
- [7] Allan G M, Ellis J A. Porcine circoviruses: areview[J]. Vet Diagn Invest, 2000, 12(1): 3-14.
- [8] Ellis J A, Bratanich A, Clark E G, *et al.* Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome [J]. Vet Diagn Invest, 2000, 12(1): 21-27.
- [9] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997: 1148-1150.
- [10] Stevenson G W, Kiupel M, Mittal S K, *et al.* Tissue distribution and genetic typing of porcine circoviruses in pigs with naturally occurring congenital tremors[J]. Vet Diagn Invest, 2001, 13(1): 57-62.
- [11] Ellis J A, Bratanich A, Clark E G, *et al.* Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome [J]. Vet Diagn Invest, 2000, 12(1): 21-27.
- [12] 吕艳丽, 杨汉春, 郭鑫, 等. 猪圆环病毒 2 型的分离与鉴定. [J]. 中国兽医杂志, 2004, 40(2): 14-18.