

## 猪圆环病毒 2 型 TaqMan 实时 PCR 检测方法的建立\*

冯志新, 姜平\*\*, 王先炜, 李玉峰, 许家荣

(南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 江苏南京, 210095)

### Development of a Real-time PCR Method for Detection of Type 2 Porcine Circovirus

FENG Zhi-xin, JIANG Ping\*\*, WANG Xian-wei, LI Yu-feng, XU Jia-rong

(Key Laboratory of Animal Disease Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** One set of primers and a TaqMan probe were designed based on the nucleotide sequence within ORF2 of *Porcine circovirus type 2* (PCV2). A quantitative TaqMan real-time PCR was developed for detecting PCV2 with highly specificity, reproducibility and more sensitivity than conventional PCR. Standard dilutions allowed absolute quantification of the amount of viral DNA to 1 copy/ $\mu$ L, which is  $10^6$  times more sensitive than conventional PCR. The result of detecting PCV2 from tissues and sera of pigs with PMWS also confirms the high sensitivity and specificity of this method. This method is probably a powerful enough tool for early diagnosis of PMWS.

**Key words:** PCV2; TaqMan; Real-time PCR.

**摘要:** 设计合成了一套引物和TaqMan探针, 特异性扩增猪圆环病毒2型(PCV2) ORF2基因, 在国内首次建立了快速定量检测PCV2的实时PCR方法, 且该方法具有较好的特异性和重复性, 对PCV2DNA检测下限为1copy/ $\mu$ L, 敏感性比常规PCR高 $10^6$ 倍; 分别用该法和普通PCR方法对PMWS人工发病猪的10份组织及30份血清样品检测, 结果表明该方法具有更快速、灵敏、准确、低污染等优点, 并且可以对PMWS的早期检测、预防起到指示作用。

**关键词:** 猪圆环病毒 2 型 (PCV2); TaqMan; 实时 PCR

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)04-0371-04

断奶仔猪多系统消耗综合征(Postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)是一种新的猪传染病, 主要侵害 6~8 周龄仔猪, 引起淋巴系统疾病、渐进性体重下降、呼吸道症状及黄疸, 造成患猪免疫机能下降、生产性能降低、给养猪业带来很大的经济损失。该病 1991 年首次报道于加拿大<sup>[1]</sup>, 而后在全球许多国家都有该病的发生<sup>[2-5]</sup>。郎洪武和曹胜波分别证实 PMWS 在我国存在<sup>[6,7]</sup>。研究表明 PMWS 与猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 感染有关<sup>[12]</sup>。PCV 最初于 1974 年从猪肾传代细胞系 PK15 分离到, 称为 PCV1, 动物感染实验证明 PCV1 无致病

性<sup>[9]</sup>。1995 年在北爱尔兰, 从 PMWS 感染小猪的组织中分离到一种 2 型圆环病毒(PCV2)<sup>[10]</sup>。PCV2 在猪群中已普遍存在, 但 PMWS 猪群中 PCV2 的含量要明显高于隐性感染的猪群<sup>[11]</sup>。

PMWS 的确诊必须依靠实验室方法检测出 PCV2 抗原或核酸。由于 PCV2 在 PK15 细胞上不产生病变, 病毒分离难度较大且耗时又长。原位杂交虽然有很高的灵敏度, 但操作烦琐, 成本较高, 周期较长, 并且对病料的要求较高。目前广泛应用的常规 PCR 检测方法简单、方便、快速, 敏感, 但仍然存在假阳性和 PCR 污染等弊端, 而且由于 PCV2

收稿日期: 2006-01-13, 修回日期: 2006-03-22

\* 基金项目: 江苏省自然科学基金(BK2005093); 教育部新世纪优秀人才计划(NCET-04-0502); 国家自然科学基金(30471288)

作者简介: 冯志新 (1979-), 男, 江苏省籍, 博士研究生, 研究方向为动物传染病防制

\*\* 通讯作者. Correspondence Author. Tel: 025-84395504, E-mail: jiangp@njau.edu.cn

的广泛存在,而临床发病与亚临床感染的猪群中病毒量又存在明显的不同,常规 PCR 很难起到疾病发展的指示作用。国外报道了一种基于 TaqMan 技术的实时 PCR 方法对 PCV2 进行定量检测<sup>[11]</sup>;国内崔尚金等<sup>[8]</sup>运用了竞争定量 PCR 方法,但该方法不能够对反应过程进行实时监控,所以定量仅是相对的。而国内尚无用实时 PCR 检测 PCV2 的研究报道。

本文旨在运用 TaqMan 技术来建立一种实时 PCR 方法,用于 PCV2 的定量检测。通过特异性、敏感性、重复性试验,并与常规 PCR 方法进行比较,证明该法快速、灵敏、准确,从而为 PMWS 病毒血症及早期快速诊断提供了有力的工具。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

猪圆环病毒 2 型 (PCV2) PCVSH 株、猪圆环病毒 1 型 (PCV1)、猪伪狂犬病毒 (PRV)、猪细小病毒 (PPV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV)

S1 株和副猪嗜血杆菌 (HPS) 均由本实验室保存。10 份待检病料与 30 份待检血清均采集于 PMWS 人工发病的猪群。

TaqMan Universal PCR Master Mix 购自 ABI 生物公司。

### 1.2 引物和 TaqMan 探针的设计与合成

对 GenBank 中的 PCV1 及 PCV2 全基因序列进行同源性分析,设计合成一对引物和一条 TaqMan 探针,能有效鉴别 PCV1,而特异性扩增 PCV2 序列(表 1)。引物所扩增的目的片段大小为 99bp。引物和探针的序列如下: F:5'-CCAGGAGGGCGTTC TGA CT-3', R: 5'-CGTTACCGCTGGAGAAGGAA-3', TaqMan-probe: 5'FAM-AATGGCATCTTCAAC ACCCGCCTC -TARAM 3'。常规 PCR 引物参照王先炜等<sup>[13]</sup>,扩增 PCV2 基因片段大小为 416bp,引物序列如下,PCV2.1: GGTTTGTAGCCTCAGCC AAAGC 和 PCV2.2 GCACCTTCGGATATACTGTC AAGG。引物和探针均由 TaKaRa 生物公司合成。

图 1 实时 PCR 引物与探针序列在几株 PCV 相对应区域序列的比较

Primer/Probe	TAMRA		FAM	
	CCAGGAGGGCGTTCGACT	TGTGGT	GAGGCGGGTGTGAAGATGCCATT	TTTCCTTCTCCAGCGGTAACG
AF109398	.....	.....	.....	.....
AY510375	.....	.....	.....C.....	.....
AY536756	.....T.....T.....	.....	.....	.....
AY596022	.....T.....	.....	.....	.....
AY322004	.....G.....	.....	.....C.....	.....
AF147751	.....T.....	.....	.....	.....A.....G.....
AF201308	.....	.....	.....	.....
AF305532	.....	.....	.....	.....
AF408635	.....	.....	.....	.....A.....G.....
AY181946	.....	.....	.....C.....	.....
AY217743	.....T.....	.....	.....	.....
AY596822	.....T.....	.....	.....	.....
NC001792(PCV1)	.....A.....T.....G.....C.....G.....	A.....C.....	A.....A.....A.....A.....C.....G.....C.....	T.....G.....G.....G.....T.....T.....

Fig.1 Alignment of several sequences of Porcine circovirus (PCV) in the primer/probe region of the TaqMan assay

All the sequences are from the GenBank, and are chosen to visualize the sequence variations in the primer/probe region. All but NC\_001792 are PCV2 sequences. All PCV1 sequences available in the GenBank are identical in this region. The probe is matched to sense sequence of PCV2 and its orientation is indicated with FAM and TAMRA.

### 1.3 实时 PCR 反应

实时 PCR 反应体系 25 $\mu$ L: DNA 1 $\mu$ L, 10 $\times$ Taq Man Universal PCR Master Mix 2.5 $\mu$ L 引物 F/R 浓度均为 400nmol/L, 探针浓度为 100nmol/L。反应在 ABI7300 荧光定量 PCR 仪(ABI 公司)上进行,反应条件为: 50 $^{\circ}$ C 2min; 预变性 95 $^{\circ}$ C 10min; 95 $^{\circ}$ C 15s, 60 $^{\circ}$ C 1min; 共进行 40 个循环。同时设定不加 DNA 的阴性对照。

### 1.4 实时 PCR 敏感性测定

以含有 PCV2 全基因序列的质粒 pTSH (本实验室保存)为标准样品。纯化后经紫外分光光度计定量。将质粒 pTSH 10 倍倍比稀释,使拷贝数分别

为 1~10<sup>10</sup> 个/ $\mu$ L,进行实时 PCR 反应,根据各稀释度 Ct 值得出检测范围,并绘制标准曲线。

### 1.5 实时 PCR 重复性与特异性测定

将相同含量的质粒 pTSH 分 4 管同时进行实时 PCR 反应,重复 3 次,观察该反应体系重复性。

分别提取 PCV2、PCV1、PRRSV、PRV、PPV、PCV2 阴性猪血清和 HPS 的基因组,进行实时 PCR 反应,观察该反应体系特异性。

### 1.6 常规 PCR

反应体系 25 $\mu$ L: DNA 1 $\mu$ L, Mg<sup>2+</sup> 1.5mmol/L, dNTP 200 $\mu$ mol/L, 10 $\times$ PCR Buffer 2.5 $\mu$ L, P<sub>1</sub>/P<sub>2</sub> 浓度均为 400nmol/L, TaqDNA 聚合酶 1U。反应条件为:

预变性 95°C 5min; 95°C 30s, 56°C 30s, 72°C 1min; 共进行 40 个循环, 然后 72°C 延伸 10min, 取出产物在 10g/L 的琼脂糖凝胶上电泳。

### 1.7 临床样品的定量检测

按照 DNAzol (Invitrogen 生物公司) 说明书, 提取临床样品 (采集于 PMWS 人工发病猪群的肺、血清和淋巴结) 中病毒 DNA, 用紫外分光光度法测定 DNA 含量, 然后分别应用普通 PCR 与实时定量 PCR 进行扩增, 阳性对照质粒 DNA 拷贝数为  $10^{10}/\mu\text{L}$ 、 $10^8/\mu\text{L}$ 、 $10^6/\mu\text{L}$ 、 $10^4/\mu\text{L}$ 、 $10^2/\mu\text{L}$  和  $10^1/\mu\text{L}$  浓度梯度。

## 2 结果

### 2.1 敏感性

由标准曲线 (图 2) 可以看出, 本法能检测到 1copy/ $\mu\text{L}$  的质粒。不同梯度定量模板数的对数值与循环阈值 (Ct) 间的相关系数为 0.991675。

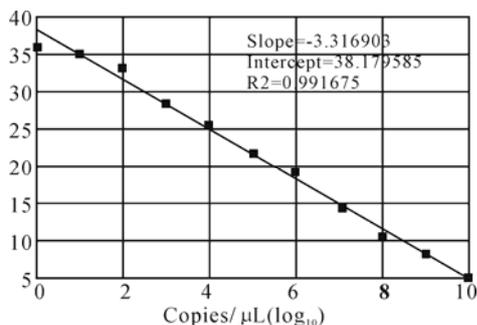


图 2 实时 PCR 的标准曲线

Fig.2 Standard curve of real-time PCR

### 2.2 特异性

分别提取 PCV1、PCV2、PPV、PRV、PRRSV、HPS 和 SPF 猪血清的基因组, 进行实时 PCR 反应, 仅有 PCV2 为阳性 (图 3), 说明该方法有很好的特异性。

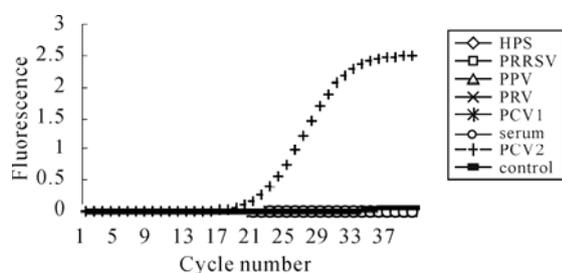


图 3 实时 PCR 的特异性

Fig.3 Specificity of real-time PCR

### 2.3 重复性

将相同含量的质粒 pTSH 分 4 管同时进行实时 PCR 反应, 共重复 3 次。结果为所有反应管 CT 值相似, 差异均不显著 ( $p > 0.05$ ), 说明该反应体系重复

性较好。

### 2.4 与常规 PCR 的比较

为了比较实时 PCR 与常规 PCR 的敏感性, 将质粒 pTSH10 倍倍比稀释, 再分别进行实时 PCR 和普通 PCR 反应。常规 PCR 反应结果用 10g/L 琼脂糖电泳观察 (图 4)。结果表明常规 PCR 的敏感性为  $10^6$ copies/ $\mu\text{L}$ , 实时 PCR 的敏感性为 1copy/ $\mu\text{L}$ , 大大高于常规 PCR 的敏感性。

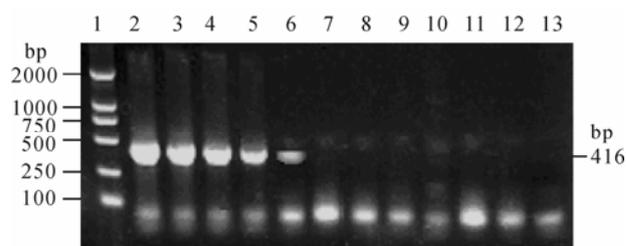


图 4 常规 PCR 的敏感性

Fig.4 Sensitivity of conventional PCR

1, DL-2000 Marker; 2~12,  $10^{10}$ copies/ $\mu\text{L}$ ,  $10^9$ copies/ $\mu\text{L}$ ,  $10^8$ copies/ $\mu\text{L}$ ,  $10^7$ copies/ $\mu\text{L}$ ,  $10^6$ copies/ $\mu\text{L}$ ,  $10^5$ copies/ $\mu\text{L}$ ,  $10^4$ copies/ $\mu\text{L}$ ,  $10^3$ copies/ $\mu\text{L}$ ,  $10^2$ copies/ $\mu\text{L}$ ,  $10^1$ copies/ $\mu\text{L}$ , and 1copy/ $\mu\text{L}$ , respectively; 13, Negative control;

### 2.5 PMWS 临床样品的检测

对 PMWS 人工发病猪群的 10 份组织病料及 30 份血清分别用普通 PCR 与实时定量 PCR 作了 PCV2 抗原的检测。普通 PCR 结果显示, 10 份组织病料中有 4 份检测为 PCV2 阳性, 30 份血清中只有 2 份为 PCV2 阳性; 而实时 PCR 检测结果显示, 10 份组织病料均为 PCV2 阳性, PCV2 DNA 量平均为  $1.59 \times 10^8$ copies/g 组织, 30 份血清也均为 PCV2 阳性, PCV2 DNA 量平均为  $1.95 \times 10^5$ copies/mL。

## 3 讨论

TaqMan 实时 PCR 具有快速, 可靠, 敏感, 特异, 实时动态检测和自动结果分析等优点, 已被广泛应用于病毒性疾病的研究和临床诊断上<sup>[14]</sup>。本研究在 PCV1、PCV2 基因序列同源性分析的基础上设计合成了一对以确保与 PCV1 有效鉴别, 但又适合多种 PCV2 分离株检测的定量 PCR 引物和探针, 试验结果也证明, 该引物和探针只能和 PCV2 基因特异性结合, 具有很好的特异性。

PMWS 是一种主要引起断奶仔猪多系统衰竭的综合症, 目前认为 PCV2 是其主要致病病原<sup>[12]</sup>, 但是轻度感染 PCV2 并不引起 PMWS, 只有当感染一定量以上的 PCV2 时, 才会表现出 PMWS 的临床症状<sup>[11]</sup>。因此, 对猪体内 PCV2 抗原定量为 PMWS 的预警与诊断起很大作用。而一般普通的检测方法

不能进行定量,而实时定量 PCR 在这方面成为主要的手段。同时,实时定量 PCR 在病毒血症检测方面起了很重要的作用,比起以往的巢式 PCR 更为方便、敏感。

本试验分别运用普通 PCR 方法和实时定量 PCR 方法对 PMWS 人工发病猪群的组织及血清进行 PCV2 的检测。由于 PMWS 人工发病猪体内 PCV2 含量要大大低于自然感染后发病的猪<sup>[11]</sup>,如果使用普通 PCR 方法检测,将可能会有假阴性的结果出现,本试验结果证实这种推测。尤其是对病毒血症的检测,实时定量 PCR 方法更是发挥了无可替代的作用。而且,由于病毒血症的检测可以直接对活体动物进行,检测的前期处理更简单,所以运用实时定量 PCR 方法检测血清中病毒含量同样可以用来作为 PMWS 的指示。

综上所述,本研究建立的 PCV2 实时 PCR 方法敏感性高,特异性强,操作方便快捷,具可定量自动分析,从而为 PMWS 的诊断和 PCV2 致病机理等基础研究提供了有效手段。

## References

- [1] Clark E G. Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome [A]. Proceedings of the American Association of Swine Practitioners [C]. 27th Annu. Meet, 1997. 499-501.
- [2] Allan G M, Mc Neilly F, Meehan B M, *et al.* Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland [J]. *Vet Microbiol*, 1999, 66 (2): 115-123.
- [3] Choi C, Kim J, Kang I J, *et al.* Concurrent outbreak of PMWS and PDNS in a herd of pigs in Korea [J]. *Vet Rec*, 2002, 151 (16): 484-485.
- [4] Drolet R, Laroche R, Morin M, *et al.* Detection rates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, and swine influenza virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia [J]. *Vet Pathol*, 2003, 40 (2): 143-148.
- [5] WANG C, HUANG T S, HUANG C C. Characterization of porcine circovirus type 2 in Taiwan [J]. *J Vet Med Sci*, 2004, 66(5): 469-475.
- [6] Lang H W, Zhang G C, Wu F Q, (郎洪武, 张广川, 吴发权) *et al.* Detection of Serum Antibody against Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome in Pigs [J]. *Chin J Veter Sci Technol* (中国兽医科技), 2000, 30 (3): 3-5.
- [7] Cao S B, Cheng H C, Shao S B, (曹胜波, 陈焕春, 肖少波) *et al.* The Establishment And Application of PCR to Diagnosis Porcine Circovirus Type 2 [J]. *J Huazhong Agriculuniv* (华中农业大学学报), 2001, 1: 53-56.
- [8] Cui S J, Cai Y, Cheng X (崔尚金, 蔡阳, 陈欣). Development and application of a competitive quantitative assay for monitoring porcine circovirus DNA [J]. *Chin J Prevent Veter Med* (中国预防兽医学报), 2004, 26 (5): 347-351.
- [9] Tischer I, Rasch R, Tochtermann G. Characterization of papovavirus- and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines [A]. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene-Erste Abteilung Originale-Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie* [C]. 1974, 226, 153-167.
- [10] Allan G M, McNeilly F, Kennedy S, *et al.* 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.
- [11] Inger Marit Brunborg, Torfinn Moldal, Christine Monceyron Jonassen. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemicwasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR [J]. *J Virol Meth*, 2004, 122: 171-178.
- [12] Stevenson G W, Kiupe I M, Mittal S K, *et al.* Ultra structure of porcine circovirus in persistently infected PK-15 cells [J]. *Vetpathology*, 1999, 36: 368-378.
- [13] Wang X W, Jiang P, Li Y F, (王先炜, 姜平, 李玉峰) *et al.* Detection and Genetic Characterization of Porcine Circovirus (PCV-2) from Pigs with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome in Mid-east of China [J]. *Chin J Veter* (中国兽医学报), 2004, 24 (3): 240-242.
- [14] Zhang Z D, Soren A. Detection of carrier cattle and sheep persistently infected with foot-and-mouth disease virus by a rapid real-time RT-PCR assay [J]. *J Virol Meth*, 2003, 111: 95-100.