猪圆环病毒 PCR 检测方法的优化

董志强[1,2]，张　志[2**]，李晓成[2]，陈德坤[1]，张燕霞[2]，黄保续[2]

（1.西北农林科技大学，陕西杨凌 712100；2.农业部动物检疫所，山东青岛 266032）

Optimization of PCR for the Detection of Porcine Circovirus2

DONG Zhi-qiang[1,2]，ZHANG Zhi[2**]，LI Xiao-cheng[2]，CHEN De-kun[1]，
ZHANG Yan-xia[2]，HUANG Bao-xu[2]

(1.North-west Sci-Tech University of Agriculture and Forestry，Yangling 712100, China；2.National Animal Quarantine Institute of Ministry of Agriculture, Qingdao 266032, China)

Abstract：Three pairs of primers P1/P2, P3/P4 and P5/P6 of porcine circovirus 2 were designed and synthesized to compare the sensitivity and specialization to amplify products of 404bp, 647bp and 1773 bp. Optimum dilution of PK15 cell genome infected with PCV 2 was achieved with 10^{-6}ng, 10^{-5}ng to yield from the three pairs of primers. It was also confirmed that P1/P2 were 68.4% successful in detecting PCV2 in 57 swine samples from the province of Fujian, The other primers, P3/P4, P5/P6, were only 57.9% and 8.7% successful, respectively. We conclude that p1/p2 is the optimum primer pair for surveying incidents of PCV2 in pigs.

Key words：Porcine circovirus; PCR; Detection; Optimization

关键词：圆环病毒；PCR；检测方法；优化

中图分类号：S852.65　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1003-5125(2006)04-0405-03

猪圆环病毒 (*Porcine circovirus*， PCV)为无囊膜的单股负链 DNA 病毒，是目前发现的最小的动物病毒，大小约为 17nm[1]。PCV 根据抗原性及基因组的不同可以分为 PCV1 和 PCV2 两种基因型，PCV 1 分离自猪肾细胞系 PK15，它不致病，能够在 PK15 中稳定存在而不形成细胞病变；PCV 2 对猪有致病性，可引起猪断奶后多系统衰竭综合征(PMWS)、猪皮炎与肾病综合征(PDNS)、断奶猪和育肥猪的呼吸道疾病、猪的繁殖障碍等疾病。近年来已成为严重危害我国养猪业的主要疾病之一。但迄今为止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，所以做好该病的诊断显得尤为重要。

PCV 1 基因组全长 1759bp ，PCV 2 基因组全长 1767bp 或 1768bp [2, 3]。序列比较表明 PCV 1 与 PCV 2 之间的核酸同源性只有 68％，而不同 PCV 2 毒株之间的同源性均为 96％以上[3]。由于 PCV 1 和 PCV 2 均不产生细胞病变，因此迫切需要建立一种既敏感又特异的检测 PCV2 的方法。

为此，国内外开展了大量相关研究，建立了病毒分离、免疫荧光法、ELISA 方法、 免疫组化法等方法，以及多种检测 PCV2 的 PCR 方法，如竞争 PCR、套式 PCR 和实时荧光 PCR 等[4~10]。与传统方法相比，PCR 具有较高的敏感性和特异性。在这些 PCR 方法中，普通的 PCR 方法仍然是最常见和最普遍运用的诊断方法。然而，由于不同的引物之间差别较大，使得 PCR 方法的特异性和敏感性各不相同，因此用于诊断时往往容易出现假阴性的结果。本文针对最常见的三种扩增 PCV2 的引物区域设计和比较了 3 对引物的特异性和敏感性，优化了 PCV 2 的 PCR 诊断方法，这将有助于我国猪群 PCV2 疫情的监测，也能为控制该病的传播提供技术支持。

1　材料和方法

1.1　实验材料

试验所用的样品来自福建省57个猪场发病猪的肺脏和淋巴结。*E coli* DH5α 由本实验室保存，DNAZol

收稿日期：2005-11-19 修回日期：2006-02-16
作者简介：董志强（1980-），男，硕士研究生，研究方向为分子病原学与免疫学。
** 通讯作者. Corresponding anthor. Tel:0532-85628464; Email: zhizh2001@126.com

试剂盒购自 Invitrogen 公司，TaqDNA 聚合酶（5U/uL）、10×Buffer、dNTP (25mmol/L)、PCR 回收纯化试剂盒、pMD18-T 载体、各种限制性内切酶、DL-2000Marker 均购自 TakaRa 公司。其他常规试剂均为分析纯。

1.2 引物设计

根据 GenBank 中发表的 PCV2 全基因序列 AY556473，选择不同的位置设计三对不同引物 P1/P2、P3/P4 和 P5/P6，对应于第 401-383/1717-1736，92-113/717-738h 和 441-467/447-420 位碱基，分别扩增 404bp、647bp 和 1773bp 等 3 条大小不同的 PCV 2 特异性序列。引物由上海生物工程公司合成。

1.3 模板的制备

猪的肺脏和淋巴结，取 50mg 剪碎后加入 4 倍体积的 10%PBS 研磨匀浆。匀浆液转移至 1.5mL 离心管中，反复冻融 3 次后，10 000×g 离心 5min，取 100μL 上清液（细胞毒）于 1.5mL 的离心管中，加入 1mLDNAZol，倒置混匀，室温放置 3min，10 000×g 离心 10min；上清转移至另一离心管中，加入 500mL 无水乙醇，颠倒混匀，室温放置 5min，6 000×g 离心 5min；沉淀用 1mL75%的酒精洗涤两次；最后用 40μL 的 8mmol/L NaOH 溶解，－20℃保存备用。

1.4 病料的 PCR 扩增

PCR 反应体系为 25μL 体积，反应体系中含 10×Buffer2.5μL，dNTP 2μL，上游引物、下游引物各 0.5μL，rTaq 酶 0.2μL，模板 3μL，用灭菌超纯水补足 25μL。PCR 扩增条件为：95℃变性 3min 后，按 95℃ 1min，58℃30s，72℃1min，共进行 30 个循环。然后 72℃延伸 10min，结束后用 1%琼脂糖凝胶电泳电泳观察结果。

1.5 特异性试验、敏感性试验及样品检测

分别调整上述 PCR 反应中的 PCR 扩增条件，寻找每对引物的最合适条件，然后以我国福建省 57 份病料为例进行特异性和敏感性试验。

2 结果与讨论

2.1 PCR 扩增条件的筛选

为获得三对引物最佳的扩增效果和最高的敏感性，我们分别对三对引物的扩增条件进行了摸索和调整，即运用正交法，梯度性地改变变性温度和时间、退火温度和时间、延伸时间以及循环数等条件，最终确定了 P1/P2、P3/P4 和 P5/P6 的最佳循环扩增条件，分别为 95℃ 1min，58℃30s，72℃ 1min，30 个循环；94℃ 45s，53℃1min，72℃1min，30 个循环；94℃ 5min；94℃1min，56℃min，72℃2min，35 个循环。在后续试验中均采用该相应条件。

2.2 特异性试验

以 PCV2、PCV1、猪瘟（CSFV）、猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）、猪伪狂犬病病毒（PRV）和猪细小病毒（PPV）感染的 PK15 细胞提取的阳性细胞毒 DNA 为模板，分别用三对 PCV2 的引物进行 PCR 扩增。同时用正常健康猪和阴性 PK15 细胞提取的 DNA 基因组作为阴性对照。结果发现用三对 PCV2 引物均可以从 PCV 2 感染的细胞 DNA 中扩增出 404bp、647bp 和 1 773bp 大小的特异性条带（图略），与预期条带大小一致，而 CSFV、PCV1、PRRS、PRV、PPV、正常健康猪和阴性对照都没有条带。这表明本研究所建立的 PCR 方法对 PCV 2 是特异的。

2.3 敏感性试验

以 PCV 2 感染的 PK15 细胞提取的 DNA 为模板，用核酸测定仪确定其浓度为 100ng/mL, 然后从 100ng DNA 开始按 10 倍递增稀释至 10^{-9}， 再分别用三对引物进行 PCR 扩增，结果发现，引物对 P1/P2 和 P3/P4 可以检测出目的基因的最低 DNA 模板量分别为 10^{-6}ng 和 10^{-5}ng，引物对 P5/P6 的检测下限也可以达到 10^{-5}ng，但已经非常难以分辨。所以引物对 P1/P2 的效果最好。详见图 1。

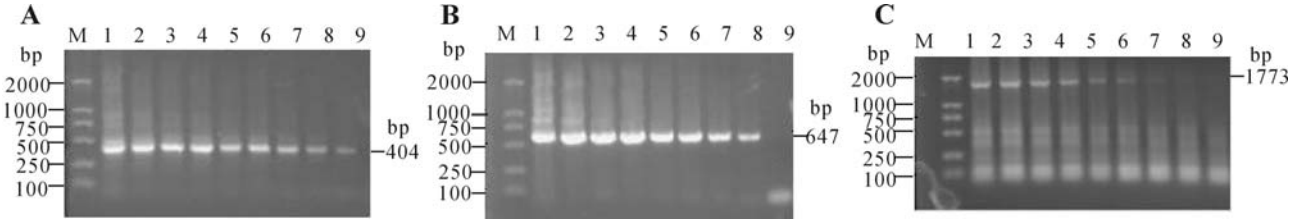

图 1 不同引物的 PCR 敏感性试验

Fig.1 Sensitivity test of PCR by different primers

A: P1/P2 primers. B: P3/P4 primers. C: P5/P6 primers. M, Marker; 1-9, 100ng to 10^{-6}ng of PK 15 Cell DNA infected with PCV2

2.4 PCR 引物对在样品检测中的应用和分析

分别用三对引物对我国福建省的 57 份猪淋巴结等病料进行 PCV 2 的检测，结果用引物对 p1/p2 检测的阳性率为 68.4%，用引物对 p3/p4 检测的阳性率为 57.9%，用引物对 p5/p6 检测的阳性率为 8.7%。这表明引物对 P1/P2 是这三对引物中敏感性最高的一对引物，这一结果与我们 2.3 中的结果差别较大。这可能与敏感性试验中样品的纯度较高有关，而实际检测样品中的影响因素较多，所以扩增片段越大的引物越难以扩增相应片段，导致扩增的敏感性下降，以致引物对 P5/P6 的检出率只有 8.7%。从这个结果可以看出，引物对 P1/P2 确实是三者中最优化的引物对，非常适用于生产实践。由于条件所限，优化得到的这对引物可能不是最好的扩增 PCV 2 的引物，但该引物对确实能大大提高了 PCR 的诊断能力，为大规模的进行 PCV 2 的流行病学调查和监测提供了理论依据和技术支持。

同时对福建省猪样品的监测结果也表明，PCV2 在该省流行非常严重，阳性率至少高达 68.4%，各养猪场都应做好 PCV2 的预防和控制。

References

[1] Tischer I, Mields W, Wolff D, *et al*. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus [J]. Arch Virol, 1991 (3-4): 271-276.

[2] Allan G M, Mc Neilly F, Kennedy S, *et al*. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pig with a wasting disease in the United states of American and Europe [J]. J Vet Diagen Invest, 1998, 10: 3-10.

[3] Hamel A L, Lin L L, Nayar G P. Nucleotide sequence of the porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs [J]. J Virol, 1998, 72: 5262-5267.

[4] Larochelle R, Bielanski A, Midler P, *et al*. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen [J]. J Clin M icrobiol, 2000, 38: 4629-4632.

[5] Larochelle R, Antaya M, Morin M, *et al*. 1999. Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR [J]. J Virol Methods, 80: 69-75.

[6] McNeillv F, McNairI, 0' Connor M, *et al*. Evaluation of a porcine circovirus type 2-specific antigen-capture enzyme-linked immun-osorbent assay for the diagnosis of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs: comparison with virus isolation, immuno-histochemistry, and the polymerase chain reaction [J]. J Vet Diagn Tnvest, 2002, 14 (2): l06-112.

[7] Nawagitgul P, Harms P A, Morozov I, *et al*. Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked innmunosorbent assays for detection of antibodies to PCV [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2002, 9 (1): 33-40.

[8] Liu Q, Wang L, Willson P, *et al*. Quantitative, competitive PCR analysis of porcine circovirus DNA in serum from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome [J]. J Clin Micro, 2000, 38 (9): 3474-3477.

[9] Kim J, Chae C. A comparison of virus isolation, polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and in situ hybridization for the detection of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in experimentally and naturally coinfected pigs [J]. J Vet Diagn Invest, 2004, 16(1): 45-50.

[10] Huang C, Hung J J, Wu C Y, *et al*. Multiplex PCR for rapid detection of pseudorabies virus, porcine parvovirus and porcine circoviruses [J]. Vet Microbiol, 2004, 14; 101 (3): 209-14.