

猪圆环病毒 2 型 Taqman 荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用

郑 敏^{1,2}, 黄梅清^{1,2}, 吴南洋^{1,2}, 陈少莺^{1,2}

(1. 福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福建 福州 350013;

2. 福建省畜禽疫病防治工程技术研究中心, 福建 福州 350013)

摘 要: 参照 GenBank 收录的 PCV2 ORF2 基因设计合成引物和 Taqman 探针, 建立 PCV2 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法, 对临床确诊 PCV2 的病料和 30 份临床疑似感染 PCV2 的病料进行检测, 同时与常规 PCR 检测方法进行比较。结果显示, TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法灵敏度可达 4.5×10^3 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$, 比普通 PCR 检测方法高 10 倍; 对 30 份疑似感染 PCV2 病料的检测表明, TaqMan 荧光定量 PCR 和普通 PCR 检测阳性率分别为 66.7% 和 56.7%, 两者符合率 90%。应用 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法检测 PRV、CSFV、PRRSV 结果均为阴性, 无交叉反应; 表明该方法具有灵敏度高、特异性强、重复性好等优点, 可用于 PCV2 的流行病学调查和临床诊断。

关键词: 猪圆环病毒 2 型 (PCV2); 水解探针; 荧光定量 PCR

中图分类号: Q 786

文献标识码: A

Establishment and Application of TaqMan Fluorescence Quantitative PCR for Detection of Porcine Circovirus Type 2

ZHENG min^{1,2}, HUANG Mei-qing^{1,2}, WU Nan-yang^{1,2}, CHEN Shao-ying^{1,2}

(1. *Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China*; 2. *Fujian Animal Diseases Control Technology Development Center, Fuzhou, Fujian 350013, China*)

Abstract: The probes and primers were designed according to the nucleotide sequence of porcine circovirus type 2 (PCV2) available in GenBank, and real-time TaqMan fluorescence quantitative PCR for detection of PCV2 was established successfully. Clinical diagnosis of PCV2 samples and the 30 suspected samples were detected by using the established quantitative PCR which was compared with that of routine PCR. The results indicated that the established quantitative PCR assay could detect 4.5×10^3 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ of plasmid DNA. Sensitivity and positive rate for clinical samples of TaqMan fluorescent quantitative PCR were higher than routine PCR, and its sensitivity was 10 times higher than that of the routine PCR. The 30 suspected samples were detected by TaqMan fluorescence quantitative PCR and routine PCR, respectively, the positive detection rate were 66.7% and 56.7%, the coincidence rate was 90%. Classical swine fever virus (CSFV), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and pseudorabies virus (PRV) were detected by using the established quantitative PCR and the result indicated that CSFV, PRRS and PRV were negative, and had no cross reaction. The real-time TaqMan fluorescence quantitative PCR assay which is specific, sensitive and accurate can be used for the clinical diagnosis and epidemiological investigation of PCV2.

Key words: porcine circovirus type 2 (PCV2); TaqMan; real-time PCR

猪圆环病毒 (Porcine circovirus, PCV) 为无囊膜单股环状 20 面体对称的 DNA 病毒, 属圆环病毒科圆环病毒属, 病毒粒子直径 17~20 nm, 是目前已知的最小动物病毒之一。PCV 根据其抗原型及基因组成不同, 分为 PCV1 及 PCV2。PCV2 与断奶仔猪多系统衰竭综合征 (Post-weaning multisystemic

Wasting Syndrome, PMWS) 密切相关, 还可引起猪皮炎与肾炎综合征、猪呼吸道综合征、A2 型先天性震颤、猪增生性和坏死性肺炎、繁殖障碍等疾病, 给养猪业造成巨大的经济损失^[1-3]。

PCV2 相关的各种疾病给猪场造成的危害日渐加剧, 且 PCV2 具有很强的免疫抑制作用^[4], 临床

收稿日期: 2011-06-29 初稿; 2011-10-10 修改稿

作者简介: 郑敏 (1983-), 助理研究员, 主要从事分子病毒学研究 (E-mail: conne8328@sina.com)

通讯作者: 吴南洋 (1963-), 男, 高级兽医师, 主要从事畜禽健康养殖与疫病控制 (E-mail: wunanyang@vip.sina.com)

基金项目: 福建省科技计划重大专项 (2006NZ003-2); 福建省科技计划项目 (2008N0113)

上常表现为多病原混合感染,因此 PCV2 感染的早期诊断显得尤为重要。实时荧光定量 PCR 技术(real-time fluorescence quantitative PCR, RTFQ PCR)是近年来发展起来的一种新的核酸定量检测技术。与常规 PCR 相比,RTFQ PCR 技术具有灵敏度高、特异性强等特点,已经越来越多地应用于人类和畜禽等动物传染病的诊断中,尤其对那些不产生细胞病变的病原,如猪瘟病毒(CSFV、PCV2 等)定量检测将具有重要意义^[5-7]。

本试验应用 Real-time PCR 技术,建立了 PCV2 荧光定量 PCR 检测方法,可用于 PCV2 临床病例的定量检测,为 PCV2 的早期诊断提供了快速、灵敏、特异的方法,也为进一步开展疫苗研究、诊断试剂研发等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 病毒株和细胞

PCV2 分离毒株、猪伪狂犬病毒(PRV)株、猪繁殖与呼吸综合征病毒(美洲型 PRRS 经典株和变异株)均由本项目组分离鉴定保存;猪瘟病毒(CSFV)株(CSFV)为猪瘟兔化弱毒疫苗购自福州大北农;PK-15 细胞引自中国兽药监察所;PCV2 阳性病料采集自福建省莆田、龙岩、闽侯等地区部分猪场疑似猪群。

1.2 主要试剂

dNTPs、Taq DNA 聚合酶、Premix Ex Taq 酶、限制性内切酶 *Bam*H I、*Hind* III、克隆载体 pMD18-T 连接试剂盒,购于宝生物(大连)工程有限公司;大肠杆菌(*Escherichia Coli*)*DH5 α* 由福建省农业科学院畜牧兽医研究所动物病毒室提供。

1.3 TaqMan 荧光定量 PCR 方法的建立

1.3.1 探针和引物的设计 参照 GenBank 收录的 PCV2 ORF2 基因组,应用生物学软件选择其保守区,设计 1 对 TaqMan 探针及其引物;上游引物序列 F1: 5'-ATAGTGGAATCTAGGACAGGTTTGG-3';下游引物序列 R1: 5'-AACTACTCCTCCCGCC ATACC-3',探针序列 5'-(FAM) CCAGCCCTTC TCCTACCACTCCCGC (Eclipse) -3',探针的荧光标记选择 FAM 作为报告发光基团, TAMRA 为淬灭基团,扩增目的片段长度为 86 bp。探针和引物由大连宝生物公司合成并标记。

1.3.2 标准阳性质控品的制备 设计 1 对扩增 PCV2-ORF2 引物,上游为 5'-TCT ACA TTT CCA GCA GTT TG-3',下游为 5'-AAT ACT TAC AGC GCA CTT C-3',扩增片段长为 614 bp,包含了探针以及所要扩增的片段。将该引物扩增的

产物纯化后连接到 PMD-18T 载体,并进行克隆,培养含 pMD-ORF2 的工程菌并提取质粒,用核酸蛋白分析仪测定质粒 DNA 的浓度,测定 OD_{260 nm} 值并计算单位体积中质粒的拷贝数为 4.5×10^9 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$, -20°C 保存质粒。

1.3.3 探针浓度的筛选 应用质粒 PMD-ORF2 作为检测样品,选择探针的浓度。向体系中加入不同体积的 TaqMan 探针,记录不同 TaqMan 探针浓度对 TaqMan 荧光 PCR 检测的 *Ct* 值,选取检测最小的 *Ct* 值和荧光值最高的 TaqMan 探针浓度作为 TaqMan 荧光 PCR 检测 PCV2 的最佳浓度。

1.3.4 荧光定量 PCR 反应体系和反应条件的建立

建立荧光定量 PCR 反应总体积为 25 μL ,其中 Premix Ex Taq 12.5 μL 、上下游引物各 0.5 μL 、荧光探针 0.8 μL 、DEPC 水 8.7 μL 、模板 2 μL 。反应条件为 95°C 30 s; 95°C 5 s, 60°C 30 s, 40 个循环; 4°C 保存。

1.3.5 标准曲线的建立 用含有目的片段的质粒作标准品,按 1 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 浓度进行 10 倍系列梯度稀释,相对应的质粒模板浓度为 4.5×10^9 、 4.5×10^8 、 4.5×10^7 、 4.5×10^6 、 4.5×10^5 、 4.5×10^4 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$,再将每种浓度质粒做 3 个重复进行荧光定量 PCR。以起始模板数的对数为 *X* 轴。*Ct* 值为 *Y* 轴作回归曲线,建立 PCV2 检测的标准曲线。

1.4 敏感性试验

将标准阳性质控品作 10 倍梯度稀释,测定荧光定量 PCR 仪所能检出的最低模板拷贝数,并对检测结果与常规 PCR 检测方法进行比较。

1.5 特异性试验

提取 CSFV、PRRSV、PRV 的 DNA (其中 CSFV 和 PRRSV 系提取 RNA 后经反转录为 cDNA),以及 PCV2 阳性 DNA 按上述方法进行荧光定量 PCR 检测,并设空白对照。

1.6 重复性试验

分别重复 5 次用荧光定量 PCR 仪对所采集的 3 份不同的临床 PCV2 阳性病料进行检测,观察标准模板 *Ct* 值,并计算其变异系数。

1.7 临床检测

将建立的荧光定量 PCR 检测方法对临床采集的可疑 PMWS 发病猪组织样品 30 份进行检测,并与常规 PCR 检测方法进行比较。

2 结果与分析

2.1 探针浓度的筛选

在反应体系中分别加入 0.2、0.4、0.6、0.8、

1.0、1.2、1.4、1.6 μL 探针 (8 个梯度), 经过反复试验, 结果表明加入 0.8 μL 探针的反应体系扩增出的 C_t 值最小, 荧光值最高, 为 TaqMan 荧光 PCR 检测 PCV2 的最佳浓度 (图 1)。

2.2 标准曲线的建立

2.2.1 动力学曲线 如图 2 所示, 曲线组 1 为 4.5×10^9 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 浓度的 3 个重复质粒样品, 曲线组 2 为 4.5×10^8 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 浓度的 3 个重复, 曲线组 3 为 4.5×10^7 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 浓度的 3 个重复, 曲线

组 4 为 4.5×10^6 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 浓度的 3 个重复, 曲线组 5 为 4.5×10^5 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 浓度的 3 个重复, 曲线组 6 为 4.5×10^4 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 浓度的 3 个重复。

2.2.2 标准曲线 如图 3 所示, 经计算, 标准曲线的斜率为 -3.946 , 截距为 50.78 , 相关系数为 0.989 。直线方程为: $y = -3.946 \lg x + 50.78$, 其中 y 为循环阈值, x 为质粒模板拷贝数。根据此标准曲线方程, 将待检样品的循环阈值 (C_t 值) 代入方程, 即可计算出样品初始拷贝数, 以达到定量。

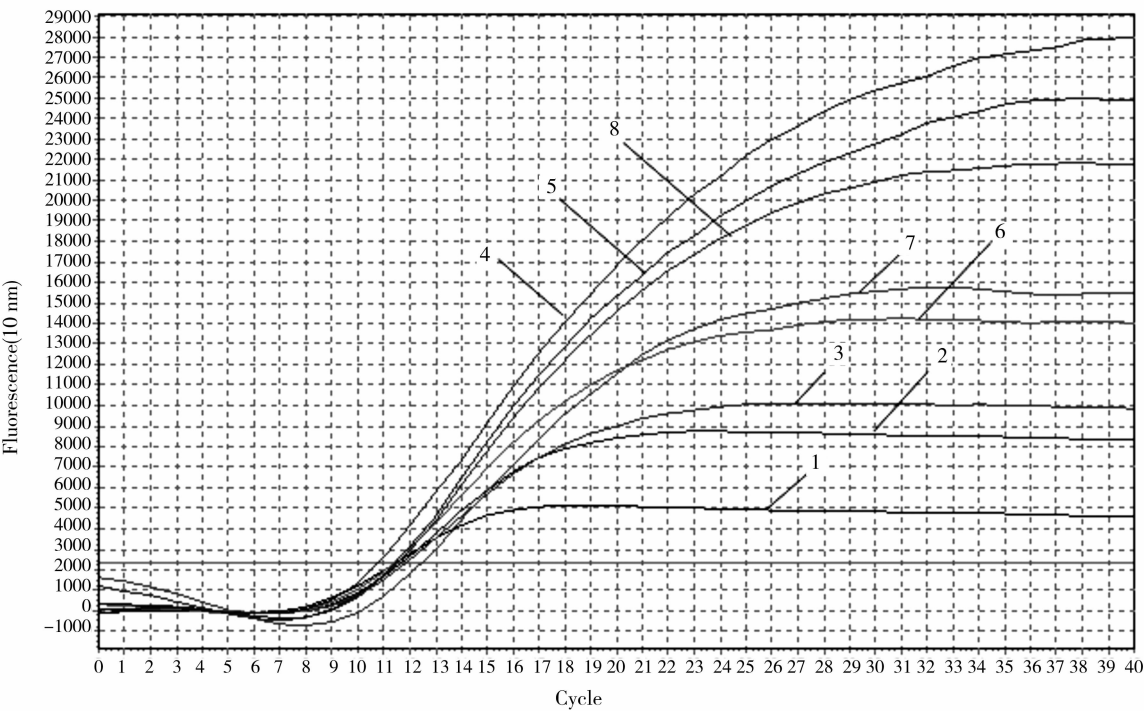


图 1 探针浓度对荧光定量反应体系的影响

Fig. 1 Effect of fluorescence probe concentrations on the reaction system

注: 1-0.2 μL ; 2-0.4 μL ; 3-0.6 μL ; 4-0.8 μL ; 5-1.0 μL ; 6-1.2 μL ; 7-1.4 μL ; 8-1.6 μL

2.3 敏感性试验

将标准阳性质控品作 10 倍梯度稀释, 稀释至用荧光定量 PCR 仪不能检出, 以此计算出荧光定量 PCR 仪所能检出的最低模板拷贝数。并同时检测结果与常规 PCR 检测方法进行比较, 结果可见荧光定量 PCR 灵敏度比常规 PCR 高 10 倍。

2.4 特异性试验

将 CSFV、PRRSV、PRV 提取的 DNA (其中 CSFV 和 PRRSV 系提取 RNA 后经反转录为 cDNA), 以及 PCV2 阳性 DNA 按上述方法进行荧光定量 PCR 检测, 并设空白对照, 结果显示只有 PCV2 病料 DNA 呈阳性, 其他病毒核酸均无荧光信号, 表明 TaqMan 荧光 PCR 对 PCV2 的检测有

较好的特异性 (图 4)。

表 1 荧光定量 PCR 与常规 PCR 方法检测灵敏度比较
Table 1 Sensitivity comparison between real-time PCR and routine PCR

标准阳性质控品拷贝数	荧光定量 PCR 循环阈值	普通 PCR 检测结果
4.5×10^8	17.99	+
4.5×10^7	22.75	+
4.5×10^5	24.95	+
4.5×10^5	30.44	+
4.5×10^4	32.77	+
4.5×10^3	34.02	-
阴性对照	37.63	-

2.5 重复性试验

用所建立的 TaqMan 荧光定量 PCR 方法对所采集的 3 份临床 PCV2 阳性病料分别进行 5 次重复

检测,观察标准模板 Ct 值,并计算其变异系数。变异系数(p) = 标准偏差(SD)/平均数(X),结果如表 2,表明此方法具有良好的准确性和重复性。

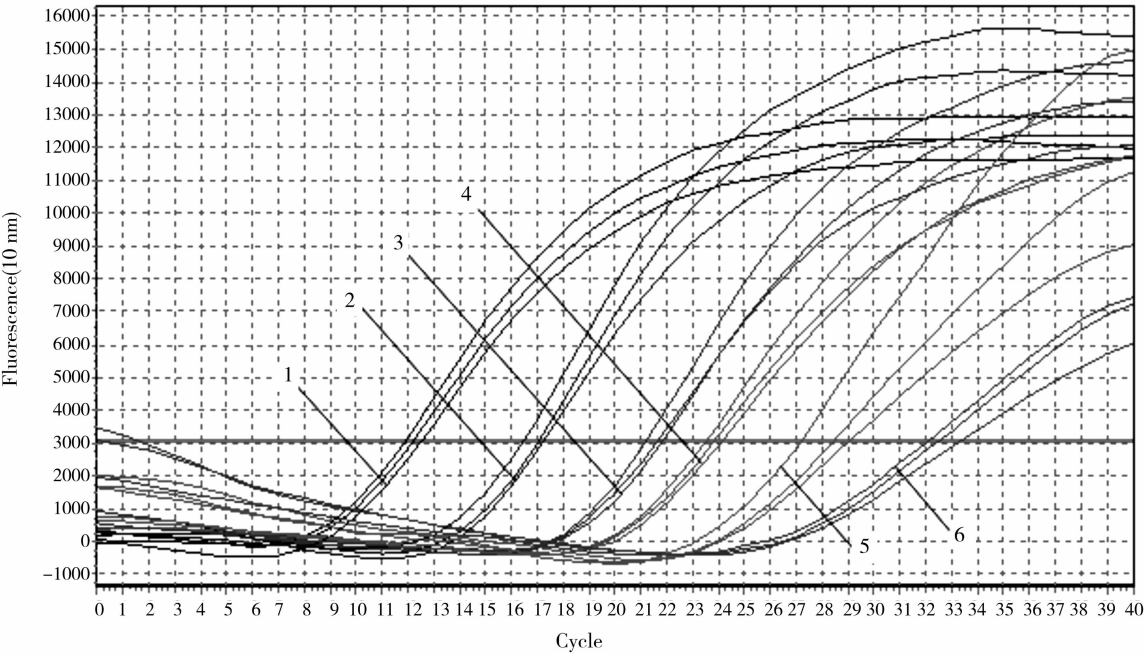


图 2 荧光定量 PCR 法对 10 倍梯度稀释质粒的检测结果

Fig. 2 Results of the plasmid with 10 fold serial dilutions by the real-time PCR assay

注: 1- 4.5×10^9 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$; 2- 4.5×10^8 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$; 3- 4.5×10^7 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$; 4- 4.5×10^6 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$; 5- 4.5×10^5 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$; 6- 4.5×10^4 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$

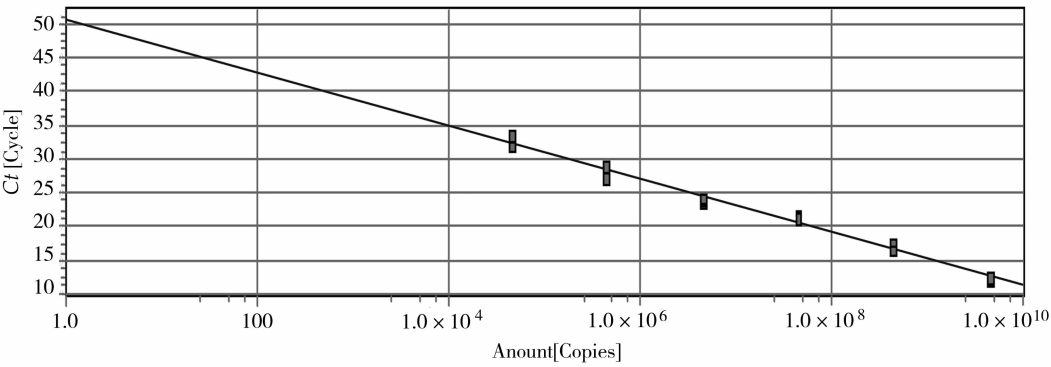


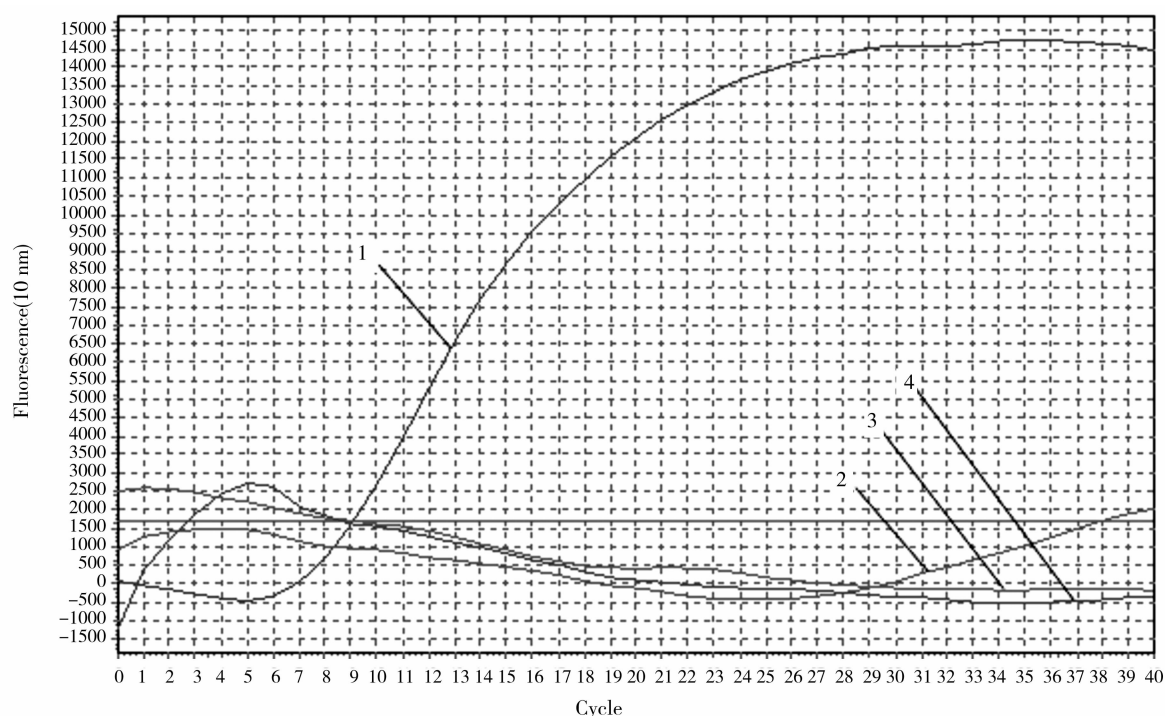
图 3 TaqMan 荧光 PCR 检测 PCV2 的标准曲线

Fig. 3 Standard curve of PCV2 determination by TaqMan fluorescent PCR

表 2 临床 PCV2 阳性组织品进行重复性检测结果

Table 2 Results of determination of PCV2 positive tissue samples by TaqMan fluorescent PCR

组织样品	循环阈值					平均值	变异系数 (%)
	1	2	3	4	5		
样品 1	18.19	17.98	18.37	18.35	18.25	18.228	0.7699
样品 2	22.65	22.47	22.89	22.69	22.20	22.58	1.0284
样品 3	25.33	25.78	25.50	25.06	25.56	25.446	0.9463



1: PCV2; 2: PRV; 3: HCV cDNA; 4: PRRSV cDNA

图4 荧光定量PCR对PCV2特异性检测结果

Fig. 4 Results of the specific detection of PCV2 by the real-time PCR assay

2.6 临床检测

将建立的荧光定量PCR检测方法对临床采集的疑似PMWS发病生猪组织样品30份进行检测,并与常规PCR检测方法进行比较。Taqman荧光定量PCR结果显示30份病料中有20份为PCV2阳性;而普通PCR结果显示30份病料中有17份为PCV2阳性,两者符合率为90%。而Taqman荧光定量PCR检测的阳性率要高于普通PCR。

3 讨论与结论

病原学和血清学调查证实PCV2呈世界性分布,它的发生和蔓延已给世界养猪业带来了巨大的经济损失。血清学调查表明,PCV2在断乳猪和育肥猪中广泛存在,临床上易与其他病原混合感染,出现各种临床症状^[8-10]。PCV2具有很强的免疫抑制作用,临床上常表现为多病原混合感染,增加了疾病的复杂性和诊断的难度。

目前PCV2常用的检测方法主要有PCR、间接免疫荧光(IFA)、ELISA、免疫组织化学法(IHC)和原位核酸杂交等,但这些技术在操作程序、检测时间、特异性检测等方面尚不理想^[11]。由于PCV2病毒细胞培养不出现细胞病变,为病毒分离以及病毒含量测定等带来困难;原位杂交虽然有很高的灵敏度,但操作繁琐,成本较高,周期

长,并且对病料的要求较高;ELISA灵敏度高,但结果判断易受主观因素的影响,目前广泛应用的常规PCR检测方法简单快速,可对特定基因进行扩增,但不能进行定量分析,对低拷贝数的靶片段DNA的有效扩增不理想,而且因交叉污染容易出现假阳性等缺点,正越来越引起学者们的注意^[12-13]。实时荧光定量PCR技术是在PCR反应体系中加入荧光基团,利用荧光积累实时监测整个PCR进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法^[14]。该技术结合了实时定量PCR仪、实时荧光定量试剂、通用电脑和自动分析软件,构成PCR-DNA、RNA实时荧光定量检测系统,它不仅实现了PCR从定性到定量的飞跃,而且与常规PCR相比,具有灵敏度高、特异性强、有效解决PCR交叉污染问题、自动化程度高等特点^[15]。

本研究设计TaqMan探针成功建立了荧光PCR对PCV2检测的方法,确定了该方法检测的最佳条件,验证了该方法的敏感性、特异性和重复性,并成功应用于临床样品的检测。本研究所建立的荧光定量PCR检测PCV2的灵敏度达到 4.5×10^3 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$,灵敏度高出常规PCR的10倍;在特异性检测中,分别检测了PCV2、CSFV、PRRSV、PRV毒株,结果只有PCV2检出阳性,

其余病毒均为阴性,表明该方法检测 PCV2 有很好特异性。荧光 PCR 扩增和产物分析的全过程均在单管封闭条件下进行,实现了扩增产物的实时动态检测和结果自动分析,避免了对扩增产物的后序处理,有效地避免了实验室交叉污染,可在较短的时间内得到结果,可有效应用于 PCV2 的临床感染病例的病原检测。

参考文献:

- [1] SPILLANE P, KENNEDY S, MEEHAN B, et al. Porcine circovirus infection in the Republic of Ireland [J]. Veterinary Record, 1998, 143: 511—512.
- [2] ELLIS, HASSARD L, CLARR E, et al. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome [J]. Can Vet, 1998, 39 (1): 44—51.
- [3] WELLENBERG G J, PESCH S, BERNDSEN F W. Isolation and characterization of porcine circovirus type 2 from pigs showing signs of postweaning multisystemic wasting syndrome in the Netherlands [J]. Veterinary Quarterly, 2000, 22 (3): 167—172.
- [4] 杨汉春. 猪免疫抑制性疾病的流行特点与控制对策 [J]. 中国畜牧兽医, 2004, 31 (5): 41—43.
- [5] 蔡霞. 定量 PCR 技术及其应用现状 [J]. 现代诊断与治疗, 2005, 16 (2): 112—115.
- [6] JOHN M K, BERNT H, ANDRENA M, et al. Molecular beacon real-time PCR detection of swine viruses [J]. Journal of Virological Methods, 2007, 140 (1—2): 155—165.
- [7] 韩俊英, 曾瑞萍. 荧光定量 PCR 技术及其应用 [J]. 国外医学: 遗传学分册, 2000, 23 (3): 117—120.
- [8] ALLAN G, MEEHAN B, TODD D, et al. Novel porcine circovirus from pigs with wasting disease syndrome [J]. Vet Rec, 1998, 142: 467—468.
- [9] WEST K H, BYSTROM J M, WOJNAROWICZ C, et al. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2 [J]. J Vet Diagn Invest, 1999, 11: 530—532.
- [10] ROSELL C, SEGAL S J, RAMOS- VARA J A, et al. Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome [J]. Vet Rec, 2000, 146 (2): 40—43.
- [11] 张锦秀, 晁生玉, 丁敏, 等. 检测猪圆环病毒 2 型 SYBR Green I 荧光定量 PCR 方法的建立 [J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35 (9): 30—34.
- [12] CHOIC, CHAE C, CLARK E G. Porcine postweaning multisystemic wasting syndrome in Korean pig: detection of porcine circovirus 2 infection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction [J]. J Vet Diagn Invest, 2000, 12 (2): 151—153.
- [13] CHOIC, CHAE C. Distribution of porcine parvovirus in porcine circovirus 2-infected pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome as shown by in-situ hybridization [J]. J Comp Pathol, 2000, 123 (4): 302—305.
- [14] 蒋春燕, 王泰健, 王琴, 等. 实时荧光定量 PCR 技术 [J]. 动物医学进展, 2005, 26 (12): 97—101.
- [15] 袁亚男, 刘文忠. 实时荧光定量 PCR 技术的类型、特点与应 [J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35 (3):

(责任编辑: 柯文辉)