

猪圆环病毒 2 型陕西株的分离鉴定

杨增岐¹, 田小艳¹, 张涌¹, 祝卫国¹, 王旭荣¹, 谢俊良¹, 杨永宁², 张锦俊³

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 陕西省畜牧兽医总站, 陕西 西安 710016;

3 榆林市榆阳区动物检疫站, 陕西 榆林 719000)

[摘要] 根据 GenBank 中猪圆环病毒 1 型(PCV1)和 2 型(PCV2)的序列,设计 2 对 PCR 引物,对疑似 PCV2 感染猪的血液、肺脏和淋巴结等病料进行套式 PCR 扩增检测,并对 PCR 检测为 PCV2 阳性的病料进行 PCV2 分离与鉴定。结果显示,PCV2 在 PK-15 细胞上生长良好,但增殖较慢且不产生细胞病变;在第 12 代细胞培养物中用间接免疫荧光试验(IFA)和 PCR 扩增反应均能检测到 PCV2,且特异性很强。表明试验分离的病毒为 PCV2。

[关键词] PCV2;PK-15;间接免疫荧光;PCR

[中图分类号] S855.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)07-0007-04

Isolation and identification of PCV2 in Shaanxi

YANG Zeng-qi¹, TIAN Xiao-yan¹, ZHANG Yong¹, ZHU Wei-guo¹,
WANG Xu-rong¹, XIE Jun-liang¹, YANG Yong-ning², ZHANG Jin-jun³

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Shaanxi Animal Husbandry and Veterinary Station, Xi'an, Shaanxi 710016, China;

3 Yuyang Inspection and Quarantine Bureau, Yulin, Shaanxi 719000, China)

Abstract : Two pairs of primers are designed according to the sequences of PCV1 and PCV2 in the GenBank to detect PCV2 in the blood, lungs and lymph nodes of borderline cases by nest PCR. Then the PCV2 positive samples are used to separate the virus. Results show that PCV2 are well cultivated on the PK-15 cell, but there is no CPE. PCV2 can be found on the twelfth generation of the cell by IFA and PCR, and the specificity is very high, which indicates the virus separated in this experiment is PCV2.

Key words : PCV2;PK-15;IFA;PCR

猪圆环病毒(Porcine circovirus, PCV)为圆环病毒科圆环病毒属成员,为无囊膜的单股环状 DNA 病毒,病毒粒子直径 14~25 nm,是迄今发现的最小的动物病毒之一^[1]。根据致病性及基因组序列,PCV 可分为 2 种血清型,即 PCV1 和 PCV2。PCV1 首先由 Tischer 等^[2]于 1974 年从 PK-15 猪肾传代细胞系中分离获得,无致病性,广泛存在于猪体内及猪源细胞中;PCV2 首先由 Clark^[3]报道,认为其是断奶仔猪多系统衰竭综合征的主要病原。随后研究

人员相继发现,PCV2 同猪皮炎与肾炎综合征、增生性坏死性肺炎、猪呼吸道综合征、繁殖障碍、先天性颤抖、肠炎等疾病亦有重要关系^[4-5],且常同猪繁殖与呼吸综合征病毒及猪细小病毒并发感染或继发细菌感染^[6]。我国自从 2000 年郎洪武等^[7]首次报道检测出 PCV 抗原以来,北京^[8-9]、浙江^[10]、四川^[11-12]、黑龙江^[13]等省也先后报道发现有 PCV2 的感染,并分离到各地 PCV2 流行毒株。但至今尚未见陕西省有关 PCV2 分离鉴定的报道,为此本研究

* [收稿日期] 2006-09-08

[基金项目] 陕西省农业攻关项目(2003 K02-G11-02)

[作者简介] 杨增岐(1963-),男,陕西岐山人,教授,主要从事动物传染病研究。E-mail: yzq1106@nswuaf.edu.cn.

[通讯作者] 张涌(1956-),男,内蒙古和林格尔人,教授,博士生导师,主要从事动物胚胎工程和发育生物学研究。

采集疑有 PCV2 感染的猪病料,并对其进行病原分离和鉴定,初步建立了 PCV2 的套式 PCR 诊断方法,以期为陕西省 PCV2 的流行病学研究及诊断和防治提供基础资料与科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料 2005-09~12 无菌采集陕西某规模化猪场疑有 PCV2 感染猪的血液、肺脏和淋巴结。

1.1.2 试剂与细胞系 PCR 试剂盒 Premix Taq、质粒提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒和 Marker2 购自 TaKaRa 公司;蛋白酶 K 和十二烷基磺酸钠(SDS)均购自鼎国生物技术有限公司;DMEM 培养液、新生牛血清、胰蛋白酶购自 Invitrogen 公司;D-氨基葡萄糖购自上海瑞星生物公司;荧光素标记兔抗猪 IgG 购自北京博奥森公司;PK-15 细胞由西北农林科技大学动物传染病实验室保存,经 PCR 检测 PCV1 和 PCV2 均为阴性。

1.2 引物设计与合成

根据 GenBank 中 PCV1 核酸序列(GenBank 登陆号:U49186)和 PCV2 核酸序列(GenBank 登陆号:AF027217)设计 P1/P2、P3/P4 和 P5/P6 3 对引物:

P1:5'-CAACTGCTGTCCCA GCTGTA G-3',

P2:5'-A GGA GGC GTT ACC GCA GAA G-3';

P3:5'-TA GGT TA GGG CT GT GGC CTT-3',

P4:5'-CCGCACCTTCGGATA TACTG-3';

P5:5'-AATGGTACCA TGACGTA TCCAA G-
GA G-3',

P6:5'-AATAAGCTTTTAA GTGGGGGGTCTT-
TA -3'。

P1/P2 可扩增 PCV1 和 PCV2, P3/P4 只扩增 PCV2, P5/P6 用于扩增 PCV2 ORF2 的 702 bp 片段。引物由上海博亚生物有限公司合成,为冻干品,用时加适量灭菌超纯水溶解,分装(20 μ L/管),-20 保存备用。

1.3 猪病料中 PCV2 基因的套式 PCR 扩增

1.3.1 PCV2 基因组 DNA 的提取 取疑患 PCV2 的病猪血清 400 μ L,加 100 g/L SDS 溶液 75 μ L 和 20 mg/mL 蛋白酶 K 25 μ L,混匀后 55 $^{\circ}$ C 水浴 2 h;加入 800 μ L Tris-饱和酚,混匀,12 000 r/min 离心 5 min;取上清,加 Tris-饱和酚和氯仿各 300 μ L,混匀,12 000 r/min 离心 5 min;取上清,加等体积氯仿,12 000 r/min 离心 5 min。小心吸取上清(避免

将杂物吸入),加 2 倍体积的无水乙醇和 1/10 体积 pH 5.2 的醋酸钠,混匀,-20 $^{\circ}$ C 冰浴 30 min 以上。4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 15 min,轻轻弃去上清。加入体积分数 75%酒精(4 $^{\circ}$ C 保存)400 μ L 洗涤 2~3 次;37 $^{\circ}$ C 烘干(最好不超过 10 min),加入 20 μ L ddH₂O 溶解沉淀,取适量做 PCR 模板,其余置 -20 保存。

1.3.2 套式 PCR 扩增 第 1 次 PCR 反应体系为 25 μ L:Premix Taq(DNA 聚合酶,MgCl₂,缓冲液,dNTP 混合物)12.5 μ L,10 pmol/L 上、下游引物各 1 μ L,模板 DNA 5 μ L,加去离子水至 25 μ L,混合均匀。第 1 次 PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 变性 2 min;94 $^{\circ}$ C 变性 70 s,65 $^{\circ}$ C 退火 70 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 70 s,30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。第 2 次 PCR 反应体系为 25 μ L:Premix Taq(DNA 聚合酶,MgCl₂,缓冲液,dNTP 混合物)12.5 μ L,10 pmol/L 上、下游引物各 1 μ L,模板 DNA(第 1 次 PCR 产物)5 μ L,加去离子水至 25 μ L,混合均匀。第 2 次 PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 变性 1 min;94 $^{\circ}$ C 变性 50 s,65 $^{\circ}$ C 退火 50 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s,30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应结束后取 5 μ L PCR 产物用 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 PCV2 的分离、培养与鉴定

1.4.1 PCV2 的分离与培养 (1)病料处理。用无菌 PBS 液将 PCR 检测为阳性的猪肺脏和淋巴结等病料研磨制成 1:5(病料与 PBS 液体积比)的悬液,反复冻融 3 次,4 000 r/min 离心 30 min,取上清过 0.22 μ m 滤器除菌,加入青霉素 1 000 U/mL,链霉素 1 000 μ g/mL,4 $^{\circ}$ C 作用 6 h,保存备用。

(2)分离培养。取上述处理好的组织样品,接种到已长成单层的 PK-15 细胞,同时设不接种病毒的 PK-15 细胞作空白对照,37 $^{\circ}$ C 吸附 1 h,然后加入含体积分数 2%胎牛血清的 DMEM 细胞维持液,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h。倒掉细胞培养液,用 300 mmol/L D-氨基葡萄糖处理 30 min,弃去 D-氨基葡萄糖,用 pH 为 7.4 的 10 mmol/L 无菌 PBS 洗涤 2 次,然后加入含体积分数 2%胎牛血清的细胞维持液,37 $^{\circ}$ C 继续孵育 48~72 h,在细胞进入对数生长期时进行传代培养。12 h 后用 300 mmol/L D-氨基葡萄糖溶液处理 30 min,弃去 D-氨基葡萄糖,用 pH 为 7.4 的 10 mmol/L 无菌 PBS 洗涤 2 次,然后加入含体积分数 10%胎牛血清的细胞培养液培养,连续盲传 12 代,按常规方法收获病毒液。

1.4.2 鉴定 (1)间接免疫荧光检测。将上述盲

传 12 代的 PK-15 细胞消化,悬浮于生长液中(细胞密度为 4×10^5 / mL),接种于 96 孔板(100 μ L / 孔),37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后用 300 mmol/L D-氨基葡萄糖溶液处理 30 min,用 pH 为 7.4 的 10 mmol/L 无菌 PBS 洗涤 2 次后用维持液继续培养,同时设不接种病毒的细胞为空白对照组。将上述 2 组细胞培养 48 h 后弃去细胞维持液,PBS 洗涤后用 -20 $^{\circ}$ C 的体积分数 80%冷丙酮固定 10 min,弃去固定液,将 96 孔细胞板自然晾干。将已固定的 96 孔板用 PBS 洗 3 次,每次 5 min,自然干燥。向试验和空白对照孔中均分别滴 100 μ L PCV2 阴性血清和阳性血清,并设 PRV、PPV 和 PRRSV 抗体对照孔,置 37 $^{\circ}$ C 湿盒中作用 1 h,PBS 洗涤 3 次(5 min/次)。向试验和空白对照孔均滴加用 PBS 作 1:100(体积比)倍稀释的荧光素标记兔抗猪 IgG,100 μ L / 孔,37 $^{\circ}$ C 作用 30 min,PBS 洗涤 3 次。最后用 1:9(磷酸与甘油的体积比)的磷酸甘油封底,在倒置显微镜下观察结果。

(2) PCR 及测序鉴定。收集盲传 12 代的 PK-15 细胞悬液,反复冻融 3 次后,12 000 r/min 离心 5 min,收集上清液,提取核酸,进行 PCR 检测(操作同 1.3)。回收 PCR 扩增的约 702 bp 的片段,与载体连接,构建 pMD-ORF2 重组质粒,连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,菌液涂布在含 100 μ g/L Amp 的 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 培养 16~18 h,挑取白色菌落培养后抽提质粒,进行 PCR 及 *Hind* III 和 *Kpn* I 双酶切鉴定后,送上海博雅公司进行测序。利用 DNASTAR 软件对测序结果进行分析。

2 结果与分析

2.1 猪病料中 PCV2 基因的 PCR 扩增结果

以直接从病猪血清提取的 DNA 进行套式 PCR 效果较好,琼脂糖凝胶电泳结果(图 1)表明,获得了约 220 bp 的扩增产物,与预期结果一致。

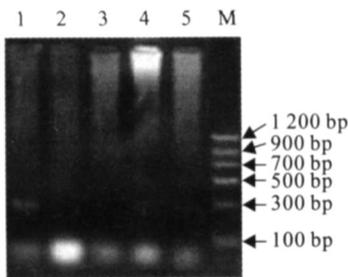


图 1 疑似 PCV2 猪病料 DNA 扩增产物电泳结果
1,4,5. 阳性病料;2,3. 阴性病料;M. DNA 分子质量标准

Fig. 1 Electrophoresis of sample DNA amplification product
1,4,5. Positive;2,3. Negative;M. DNA Marker

2.2 PCV2 间接免疫荧光检测结果

在荧光显微镜下,接种 PCV2 的 PK-15 细胞在用 PCV2 抗体处理后,胞浆呈特异性亮绿色荧光(图 2);而 PCV2 阴性血清 PRV、PPV 和 PRRSV 孔没有特异性荧光。

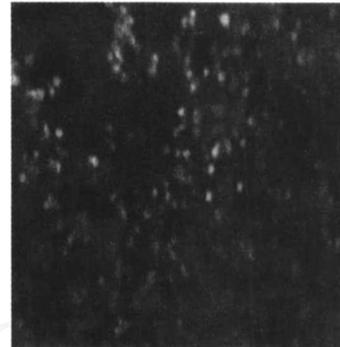


图 2 PCV2 感染的 PK-15 细胞间接免疫荧光试验检测结果(160 \times)

Fig. 2 Results of IFA detecting PK15 cells inoculated with PCV2(160 \times)

2.3 PCV2 PCR 及测序鉴定结果

由图 3 可知,将重组质粒经 *Hind* III 和 *Kpn* I 双酶切后,释放出长度约 720 bp 和 2.7 kb 的片段,同时 PCR 也扩增出 720 bp 的目的片段,证明重组质粒 pMD-ORF2 构建成功。利用 DNASTAR 对 ORF2 基因核苷酸和氨基酸序列进行同源性比较,发现上述 PCV2 分离株 ORF2 基因的核苷酸与 Hangzhou 分离株(EF197987)的同源性最高,为 99.4%。

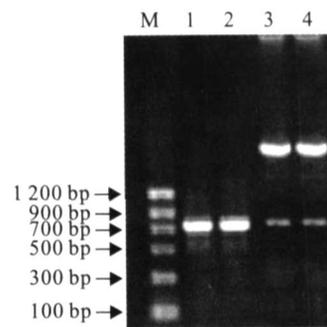


图 3 重组质粒 pMD-ORF2 的酶切及 PCR 鉴定结果
M. DNA 分子质量标准;1,2. 重组质粒 PCR 鉴定;
3,4. *Hind* III 和 *Kpn* I 酶切鉴定;

Fig. 3 Identified results of the recombinant plasmid pMD-ORF2 by restriction endonuclease and PCR
M. DNA Marker;1,2. Identification of the recombinant plasmid by PCR.3,4. Digestion of recombinant plasmid by *Hind* III and *Kpn* I

3 讨 论

自从郎洪武等^[7] 2000 年报道,我国北京、河北、山东、天津、江西、吉林和河南等 7 省市存在猪圆环病毒 2 型感染以来,全国各地已有 10 多个省、市、自治区分离到 PCV2。本试验对陕西疑似 PCV2 感染的病死猪进行了 PCV2 的分离与鉴定,首次从病原学方面证实陕西省已有 PCV2 的发生与流行,为陕西省做好该病的防治工作提供了科学依据。

由于 PCV2 在细胞培养过程中不产生细胞病变,也没有血凝活性,所以直接以病料接种细胞进行病毒的分离具有很大的盲目性。PCV2 是 DNA 病毒,基因组较短,可通过对疑似感染的病例组织样品进行 PCV2 核酸检测,确定该病料是否有 PCV2 感染,这样可减少工作量,提高病毒的分离率。本试验用 PCR 检测得到的 PCV2 阳性病料,经过处理后接种 PK-15 细胞,然后用 D-氨基葡萄糖处理,连续盲传后进行 PCR 检测,结果分离到了 PCV2 陕西株,为进一步从分子水平研究 PCV2 在陕西省的流行、变异规律以及主要结构基因的特性等奠定了基础,也为 PCV2 的诊断及预防奠定了良好基础。

[参考文献]

- [1] 殷 震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京:科学出版社, 1997.
- [2] Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, et al. A very small porcine circovirus with circular single-stranded DNA[J]. Nature, 1982, 295(7): 64-66.
- [3] Clark E G. Postweaning multisystemic wasting syndrome proceedings of the Americans Association of Swine Practitioners [J]. Vet Rec, 1997, 28(6): 499-501.
- [4] Meehan B M, McNeilly F, Mcnair I, et al. Isolation and characterization of porcine circovirus 2 from cases of sow abortion and porcine dermatitis and nephropathy syndrome [J]. Arch Virol, 2001, 146(4): 835-842.
- [5] 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.
- [6] Ellis J A, Wiseman B M, Allan G, et al. Analysis of seroconversion to porcine circovirus 2 among veterinarians from the United States and Canada [J]. Am Vet Med Assoc, 2000, 217(11): 1645-1646.
- [7] 郎洪武,张广川,吴发权,等. 断奶猪多系统衰弱综合征血清抗体检测[J]. 中国兽医科技, 2000, 30(3): 35.
- [8] 郎洪武,王 力,张广川,等. 猪圆环病毒分离鉴定及猪断奶多系统衰弱综合征的诊断[J]. 中国兽医科技, 2001, 31(3): 3-5.
- [9] 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.
- [10] 陈庆新,叶菊秀,陈婷飞,等. 猪圆环病毒 2 型浙江株的鉴定 [C]. 中国畜牧兽医学会家畜传染病学分会成立 20 周年庆典暨第十次学术研讨会论文集(上). 吉林长春:中国人民解放军军医大学, 2003.
- [11] 王 新,郭万柱,朱 玲,等. 猪 2 型圆环病毒四川分离株鉴定及其 ORF2 基因序列分析[J]. 中国病毒学, 2005, 20(4): 438-440.
- [12] 黄 勇,王红宁,郑连军,等. 猪圆环病毒 2 型的分离鉴定及其 DNA 疫苗的初步研究 [C]. 第六届全国会员代表大会暨第 11 次学术研讨会论文集(上). 四川雅安:四川农业大学, 2005.
- [13] 崔尚金,李 媛,全艳平,等. 检测与诊断猪圆环病毒 PCR 技术的建立及病毒的分离鉴定[J]. 畜禽业, 2006(1): 14-17.