

网络出版时间:2012-12-21 17:28

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20121221.1728.009.html>

猪圆环病毒 II 型 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用

曹伟伟, 郭抗抗, 许信刚, 宁蓬勃, 刘 伟, 程 敏, 董玲娟,
徐 磊, 高婉俊, 任 敏

(西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】建立一种能在临床上快速、准确检测猪圆环病毒 II 型(PCV-2)的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法。**【方法】**根据 GenBank 中已公布的 PCV-2 陕西分离株的全基因组序列,在 PCV-2 的 ORF2 核苷酸序列的保守区域,设计合成 1 条 TaqMan 探针和 1 对特异性引物;利用设计的引物扩增 ORF2 部分基因并鉴定后,回收 PCR 扩增产物,连接 pMD19-T 载体,转化 DH5 α 大肠杆菌,涂布 Amp⁺ 琼脂平板,挑取阳性克隆进行 PCR 及测序鉴定后提取质粒,作为荧光定量 PCR 的标准品;以标准品为模板建立检测 PCV-2 的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法,并对该方法的灵敏度、稳定性和特异性进行评价;用建立的荧光定量方法对 56 份临床样品进行检测,并将检测结果与传统 PCR 方法进行比较。**【结果】**建立了 PCV-2 的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法,其标准曲线的斜率为 -3.383, $R^2 = 0.998$,具有良好的线性关系;重复性试验结果表明,该方法循环数阈值 Ct 的变异系数(CV)为 0.86%~1.02%,具有良好的稳定性;敏感性检测结果表明,该方法的最低检测限度为 5.06 copies/ μ L;特异性检测结果显示,该方法对猪圆环病毒 I 型(PCV-1)、伪狂犬病病毒(PRV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)和猪瘟病毒(CSFV)的检测结果均为阴性,对 PCV-2 标准品的检测结果为阳性,说明该方法具有较好的特异性。临床样品的检测中,所建立的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的检出阳性率较传统 PCR 方法高 14.3%。**【结论】**成功建立了 PCV-2 的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法,该方法可用于临床上对 PCV-2 的检测。

【关键词】 猪圆环病毒 II 型; TaqMan 荧光定量 PCR; 病毒检测

【中图分类号】 S852.65⁺1

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2013)01-0013-06

Establishment and application of TaqMan real-time fluorescent quantitative PCR for detecting porcine circovirus type II

CAO Wei-wei, GUO Kang-kang, XU Xin-gang, NING Peng-bo, LIU Wei,
CHENG Min, DONG Ling-juan, XU Lei, GAO Wan-jun, REN Min

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The purpose of this study was to establish a TaqMan real-time fluorescence quantitative PCR method which can detect porcine circovirus type II quickly and accurately in clinic. **【Method】** According to the published complete genome sequence of PCV-2 isolate SX-1 in GenBank, a TaqMan probe and a pair of primers were designed and synthesized for the conversed open reading frame 2 (ORF2) of PCV-2. After the gene fragment was amplified using designed primers, the amplified product was identi-

【收稿日期】 2012-04-19

【基金项目】 陕西省“13115”科技创新工程重大科技专项(2010ZDKG-71);西北农林科技大学博士科研启动费项目(2010BSJJ010)

【作者简介】 曹伟伟(1987—),男,河南平顶山人,在读硕士,主要从事分子病原学及分子免疫学研究。

【通信作者】 郭抗抗(1973—),男,陕西咸阳人,讲师,博士,主要从事分子病原学与免疫学研究。E-mail:Guokk2005@163.com

许信刚(1974—),男,陕西咸阳人,副教授,博士,主要从事分子病原学与免疫学研究。E-mail:286567031@qq.com

fied. Recovery of PCR amplified products, connection of pMD19-T vector, transformation of *E. coli* DH5 α , and coating of Amp+agar plates were conducted and the positive clones were picked for PCR and sequencing identification. Then the plasmids were extracted as the standard plasmid of fluorescent quantitative PCR. The standard plasmid was used as a quantitative template to establish the TaqMan real-time fluorescence quantitative PCR method for PCV-2 detecting, and sensitivity, stability and specificity of the method were evaluated. 56 clinical samples were detected with the established method and their results were compared with conventional PCR. 【Result】 The TaqMan real-time fluorescence quantitative PCR method was established and the correlation coefficient (R^2) and the slope of the standard curve were 0.998 and -3.383 respectively, which showed a good linear relationship. Repeatability tests showed that the threshold cycle of the method had very good stability with the coefficient of variations (CV) between assays within 0.86%—1.02%. Results of sensitivity tests showed that the detection limit was 5.06 copies/ μ L. Specificity tests showed that the detection results of porcine circovirus type I, pseudorabies virus, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, and class swine fever virus samples were negative while that of the standard PCV-2 sample was positive, indicating a good specificity. In clinical samples tests, detection rate of established fluorescence PCR was 14.3% higher than that of conventional PCR. 【Conclusion】 This study established a TaqMan real-time fluorescence quantitative PCR method which can detect PCV-2 and be used to detect the clinical PCV-2 samples.

Key words: porcine circovirus type II; TaqMan fluorescence quantitative PCR; virus detection

猪圆环病毒 (Porcine circovirus, PCV) 属于圆环病毒科 (Circoviridae) 圆环病毒属 (*Circovirus*), 为无囊膜的单股环状 DNA 病毒, 二十面体对称, 整个病毒粒子直径平均为 17 nm, 是目前发现的最小动物病毒。现已知 PCV 有 2 个血清型, 即 PCV-1 和 PCV-2, 其中 PCV-1 不具有致病性; PCV-2 是断奶仔猪多系统衰竭综合征 (Postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) 的病原, 并能引起多种猪圆环病毒疾病 (Porcine circovirus diseases, PCVDs), PCV-2 主要侵害的对象是断奶仔猪和肥育猪^[1]。自 1997 年 PMWS 在加拿大首次报道以来, 世界各养猪国家都有关于 PMWS 和 PCVDs 的报道^[2]。PMWS 通常感染 5~12 周龄的仔猪与肥育猪, 患病猪典型的临床症状表现为进行性消瘦、黄疸、苍白、腹泻、呼吸困难、淋巴结病变等^[3]。

在不同国家和地区的猪场, 由于防疫措施及饲养管理水平的不同, PCV-2 猪体带毒情况存在差异, 有的猪场带毒率甚至可以达 100%。PMWS 发病率一般为 4%~30% (个别高达 50%~60%), 死亡率在 4%~20%^[4]。虽然发病率及死亡率都不高, 但由于 PCV-2 能破坏猪体的免疫系统, 造成免疫抑制, 引起继发性免疫缺陷, 造成继发或混合感染, 如与猪繁殖与呼吸综合征病毒、细小病毒、伪狂犬病病毒及副猪嗜血杆菌、猪肺炎支原体、猪胸膜肺炎放线杆菌、多杀性巴氏杆菌和链球菌等混合或继

发感染, 能使死亡率极大地上升, 从而给养猪业带来严重的经济损失^[5-9]。

建立一种可靠的 PCV-2 检测方法, 及时发现和淘汰感染猪, 减少由 PCV 引发的疾病, 对降低养猪业的经济损失十分必要。本研究拟建立一种快速、简便、敏感、特异的 PCV-2 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法, 旨在为生产中 PCV-2 的检测和流行病学调查提供方法支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品的采集 2010-07—2011-03, 从无临床症状的正常猪群中采集 46 份全血样品和 10 份组织样品。46 份全血样品包括采自陕西杨凌某猪场育肥猪全血 16 份, 采自兴平市、大荔县和户县猪场全血样品各 10 份; 组织 (脾脏) 样品全部采自陕西凤县某猪场。所有样品经分装后, 于 -40℃ 保存。

1.1.2 毒株、菌株 猪圆环病毒 II 型 (PCV-2) 分离株、猪圆环病毒 I 型 (PCV-1)、伪狂犬病病毒 (PRV) 分离株、猪繁殖与呼吸综合征 (PRRSV) 分离株、猪瘟病毒 (CSFV) 分离株及大肠埃希菌 DH5 α 株, 均由西北农林科技大学动物医学院重大动物疫病防治与畜禽产品安全实验室保存。

1.1.3 主要试剂与仪器 Premix Ex TaqTM (Probe qPCR)、DNA 凝胶回收试剂盒和高纯度质

粒小量提取试剂盒,均购自威格拉斯生物技术(北京)有限公司;基因组 DNA 提取试剂盒,购自爱思进生物技术(杭州)有限公司;pMD19-T 载体,购自宝生物工程(大连)有限公司。主要仪器有 Bio-Rad 公司的普通 PCR 仪、电泳仪、凝胶成像系统和 iQ5 实时定量 PCR 仪等。其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.1.4 引物的设计与合成 根据 GenBank 公布的 PCV-2 陕西分离株的全基因序列(GenBank 登录号:HM776451.1),用 Universal Probe Library 软件设计 PCR 引物和探针(Probe),扩增目的片段为 ORF2 序列中长度为 114 bp 的一段 PCV-2 特异性 DNA 片段。引物序列为:F,5'-GTATTCAAAGG-GCACAGAGC-3';R,5'-AAGCGAACCACAGTC-AAAAC-3';探针序列为:5'-CATCATGTCCAC-CGCCCAGGAG-3'。引物和探针均由北京六合华大基因服务有限公司合成。

1.2 PCV-2 病毒 DNA 的提取

取 PCV-2 分离株的细胞毒 100 μL ,加 PBS 液至总体积为 350 μL ,根据 DNA 提取试剂盒说明书提取病毒基因组 DNA。

1.3 PCV-2 目的基因片段的克隆

1.3.1 目的基因片段的扩增 以提取的 PCV-2 基因组 DNA 为模板,扩增目的基因片段,并以超纯水代替模板为阴性对照。PCR 反应体系为:Premix Ex Taq™(Loading dye mix)12.5 μL ,上、下游引物各 0.5 μL (10 $\mu\text{mol/L}$),DNA 模板 1 μL ,补超纯水至 25 μL 。反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 10 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s,40 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。取扩增产物,用 20 g/L 的琼脂糖凝胶进行电泳鉴定。鉴定正确后,按照 DNA 凝胶回收试剂盒说明书纯化回收 PCR 产物。

1.3.2 目的基因片段的克隆 将纯化回收的 PCR 产物,与 pMD19-T 载体连接,转化大肠埃希菌 DH5 α 后,涂布 Amp⁺ 琼脂平板,筛选阳性克隆扩大培养,并进行菌落的 PCR 鉴定。提取 PCR 鉴定呈阳性菌落的质粒,取 10 μL 质粒送北京六合华大基因服务有限公司进行测序,并用 DNASTar 软件将其与 PCV-2 全基因序列进行比对分析。

1.3.3 标准品稀释及质粒拷贝数的计算 以上述获得的质粒为标准品,对其依次进行 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , ..., 10^{-10} 倍梯度稀释, -40 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。用紫外分光光度计测定未稀释标准品质粒的质量浓度($\text{ng}/\mu\text{L}$)及 OD_{260}/OD_{280} 值,按照以下公式将质粒质

量浓度转换成质粒拷贝数(C):质粒拷贝数=质粒质量浓度 $\times$ 阿氏常数/(1 个碱基对的平均分子质量 $\times$ 质粒总长度),其中阿氏常数为 6.02×10^{23} ,1 个碱基对的平均分子质量为 648^[10],重组质粒的总长度为 2 806 bp。

1.4 TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法的建立

1.4.1 引物和探针浓度的优化 以 10^{-3} 倍稀释的标准品为模板,将引物和探针浓度分别配制成 5, 10, 15, 20 和 30 $\mu\text{mol/L}$,采用矩阵法选取最佳的引物和探针浓度。

1.4.2 循环条件的优化 为了获得较好的荧光增幅和扩增效率,对 TaqMan 实时荧光定量 PCR 循环(三温循环、双温循环)进行筛选。同时将退火温度从 55 $^{\circ}\text{C}$ 递增到 65 $^{\circ}\text{C}$,对退火温度进行筛选。

1.4.3 标准曲线的建立 以 1.3.3 中稀释的标准品为模板,用优化后的反应体系和程序进行 TaqMan 实时荧光定量 PCR,以循环数阈值为纵轴,以质粒拷贝数的常用对数($\lg C$)为横轴,绘制标准曲线。拟合其标准线性回归方程,用来定量临床样品中的 PCV-2 含量。

1.4.4 敏感性试验 以 1.3.3 中稀释的标准品为模板,用相应的引物、探针及优化后的条件进行 TaqMan 实时荧光定量 PCR 扩增,并以超纯水代替模板为空白对照,检测其灵敏性。

1.4.5 特异性试验 分别以 CSFV、PRRSV、PRV、PCV-1 基因组的 DNA 或 cDNA 为模板进行 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测,并以超纯水代替模板作为阴性对照,以 10^2 倍稀释的标准品为模板作为阳性对照,观察是否有非特异性扩增。

1.4.6 重复性试验 用 1.4.1 建立的反应条件及体系,以 10^3 倍稀释的标准品为模板,进行 PCR 反应,1 次试验平行 8 个重复,间隔 2 个月后再进行 1 次试验,计算 2 次试验 C_t 值的变异系数,即:变异系数(β)=标准偏差(SD)/平均数($\bar{x}$)。

1.5 TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法对临床样品的检测

取采集的组织样品 15 mg 于冰水浴预冷的研钵中,快速、用力研磨成匀浆;取全血样品 100 μL ,加入 PBS 液至总体积为 350 μL ,备用。根据 DNA 提取试剂盒说明书提取病毒基因组 DNA,用试验建立的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法和本实验室汤智慧等^[11]建立的 PCV-2 传统 PCR 检测方法,对样品进行检测,比较 2 种方法的阳性检出率。

2 结果与分析

2.1 PCV-2 目的基因片段的克隆

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后,在约 114 bp 处有 1 条特异性条带,扩增结果与设计的目的片段长度相符(图 1)。将标准品目的片段克隆后,提取质粒送北京六合华大基因服务有限公司测序,结果表明,扩增的 PCR 产物序列与参考序列的同源性为 100%。获得的阳性质粒的 OD_{260}/OD_{280} 为 1.90,说明以该质粒作为荧光定量的标准品是合格的;阳性质粒的质量浓度为 153 ng/ μL ,拷贝数为 5.06×10^{13} copies/ μL 。

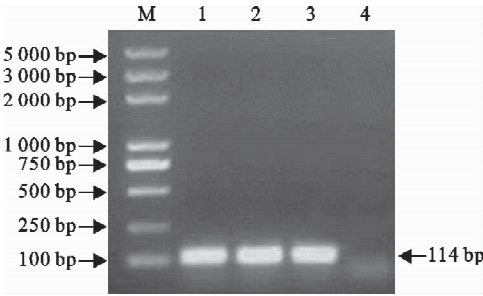


图 1 PCV-2 基因组目的片段的扩增
M. DNA marker DL 2000 plus;1~3. PCR 扩增产物;
4. 阴性对照

Fig. 1 Amplification of the PCV-2 genome of the target fragment
M. DNA marker DL 2000 plus;1~3. PCR amplification product;4. Negative control

2.2 PCV-2 TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法的建立

试验表明,当引物、探针浓度均为 10 $\mu\text{mol/L}$,退火温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 时,进行双温循环能获得最佳检测结果。故确定的 PCR 反应总体积为 25 μL ,其中 Premix Ex TaqTM(Probe qPCR)12.5 μL ,上、下游引物各 0.5 μL ,探针 0.5 μL ,质粒模板 1 μL ,补超纯水至 25 μL 。反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,40 个循环。

2.3 PCV-2 TapMan 实时荧光定量 PCR 方法标准曲线的建立

以 $10^{-2} \sim 10^{-8}$ 倍稀释的标准品建立的标准曲线见图 2,其扩增效率为 97.5%, R^2 为 0.998,表明建立的标准曲线具有良好的线性关系,各个稀释度相关性好,误差较小;循环阈值(y)与质粒拷贝数的常用对数($\lg C$)的关系式为: $y = -3.383 \times \lg C + 38.892$ 。因待测样品的 C_t 值可以从仪器读取,故将待测样品的 C_t 值代入该关系式就能计算其初始拷

贝数,可用于临床样品拷贝数的检测。

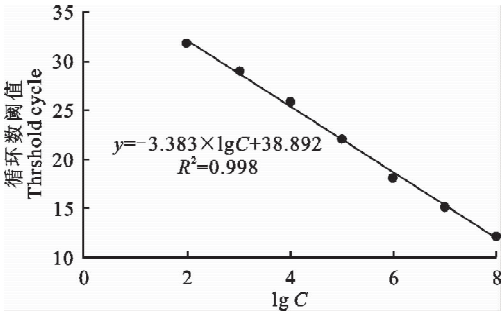


图 2 PCV-2 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的标准曲线

Fig. 2 Standard curve for PCV-2 TaqMan real-time fluorescent quantitative PCR detecting method

2.4 PCV-2 TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法的敏感性、特异性和重复性

2.4.1 敏感性 敏感性检测中,以 $10^6 \sim 10^{11}$ 倍稀释的标准品为模板进行 TaqMan 实时荧光定量 PCR 扩增,结果见图 3。从图 3 可以看出,当标准品拷贝数为 5.06 copies/ μL 时,才有扩增曲线出现,空白对照无扩增,表明该检测方法的最低检测限度可达 5.06 copies/ μL 。

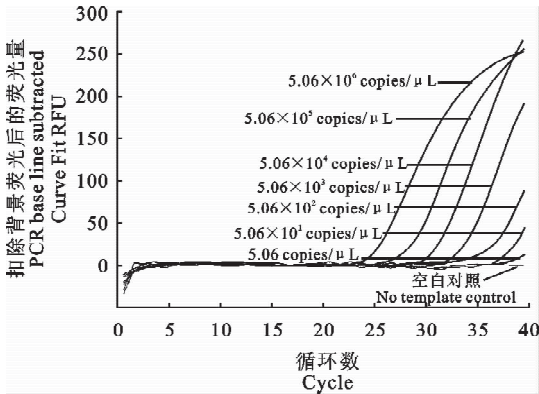


图 3 PCV-2 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的敏感性

Fig. 3 Sensitive of PCV-2 TaqMan real-time fluorescent quantitative PCR detecting method

2.4.2 特异性 试验结果(图 4)显示,在 40 个循环内,除了以 5.06×10^8 copies/ μL 标准品为定量模板的 PCR 反应起峰外,以其他猪源性病原的 DNA 或者 cDNA 为模板的 PCR 反应均无扩增曲线出现。说明建立的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法具有良好的特异性。

2.4.3 重复性 从表 1 可以看出,2 次测定循环阈值(C_t)的平均值基本一致,其变异系数分别为 0.86% 和 1.02%,表明建立的 PCV-2 TaqMan 荧光

定量 PCR 检测方法具有良好的重复性,扩增结果稳定可靠。

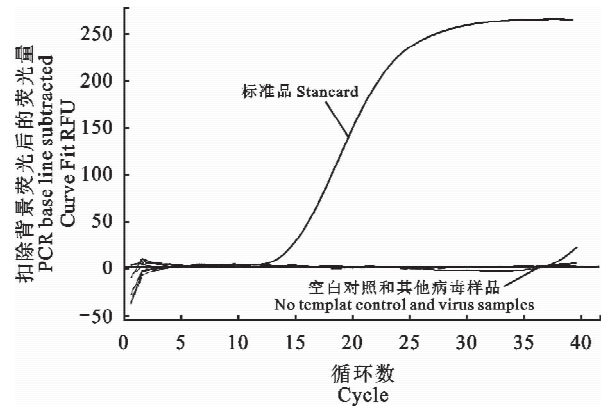


图 4 PCV-2 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的特异性

Fig. 4 Specificity of PCV-2 TaqMan real-time fluorescent quantitative PCR detecting method

表 2 PCV-2 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法对临床样品的检测结果

Table 2 Results of clinical sample detection by PCV-2 TaqMan real-time fluorescent quantitative PCR detecting method

样品采集地 Sample site	数量 Amount	阳性样品数量 Amount of positive sample	
		传统 PCR Conventional PCR	TapMan 实时荧光定量 PCR FQ-PCR
杨凌 Yangling	16	0	1
兴平 Xingping	10	5	7
大荔 Dali	10	10	10
户县 Huxian	10	7	10
凤县 Fengxian	10	4	6

3 讨 论

PCVDs 传统的诊断方法,采用将流行病学、临床表现、病理剖解及实验室诊断结合进而确诊,该方法虽然诊断结果较为准确,但由于其耗费时间长、工作量大,在实际生产中难以推广应用。目前,有多种 PCV-2 感染的实验室检测方法,其中间接免疫荧光试验主要用于检测细胞培养物中的 PCV-2;ELISA 则用于对大规模 PCV-2 抗体的检测,但存在假阳性偏高的缺点;PCR 检测具有快速、简便、特异性强的特点,特别是近年来发展起来的实时荧光定量 PCR 方法,在具备传统 PCR 方法优势前提下进一步提高了检测灵敏度,缩短了检测时间^[12-14]。

荧光定量 PCR 技术是在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号随着 PCR 反应的积累来实时监控 PCR 反应的进程,并通过分析软件对 PCR 的反应进行检测分析的技术。与传统 PCR 方法相比,实时定量 PCR 最大的优点是能实时检测反应早期到终点过程中 PCR 的扩增情况,同时还具有敏感

表 1 PCV-2 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的重复性

Table 1 Repeatability of PCV-2 TaqMan real-time fluorescentquantitative PCR detecting method

检测次数 Test times	重复数 Repeat number	Ct 平均值 Ct mean	Ct 标准差 Ct std. dev	变异系数/% C.V
1	8	15.57	0.134	0.86
2	8	15.41	0.157	1.02

2.5 TapMan 实时荧光定量 PCR 方法对临床样品的检测结果

从表 2 可以看出,临床正常的猪群中也有很多隐性感染的猪个体,但感染量不高,说明该方法可用于 PCV-2 的早期检测及流行病学调查。在 56 份供检样品中,传统 PCR 方法检测出 26 份阳性样品,阳性率为 46.4%;TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法检测出 34 份为阳性样品,阳性率为 60.7%,比传统 PCR 方法的检出率高 14.3%,说明所建立的 Tap-Man 实时荧光定量 PCR 检测方法的敏感性更好。

性高、需要样品量少、特异性优良、能精确定量等特点^[15],已经被广泛地应用到疾病的诊断和致病机理的研究中。目前,常见的荧光定量 PCR 根据荧光物质的不同可分为 SYBR Green 染料类和 TaqMan 探针类。前者染料本身价格便宜,适合于基因含量及基因表达变化的粗略分析或初筛,但对引物设计及 Taq 酶要求较高,操作时需要严格的冷启动,且要在冰上操作,否则引物二聚体及非特异性扩增会严重干扰结果的准确性,尤其在模板含量较低时更易发生。TaqMan 探针法是使用 5'端带有荧光物质(如 FAM 等)、3'端带有荧光淬灭物质(如 TAMRA 等)的 TaqMan 探针进行荧光检测的方法,常被用作基因含量的精确检测及基因表达变化的精确分析,该方法对引物及试剂要求不高,配套的普通引物就可以使用,普通的 Taq 酶就能满足试验的要求^[16-18]。

由于 PCV-1 和 PCV-2 的同源性较高,且 PCV-1 为无致病性,故在建立 PCV-2 TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法时,如果引物设计不当,则容易造成误检,同时由于需要在上、下游引物中间设计一段探

针,更增加了引物设计的难度。本试验经过比对近百株 PCV-1、PCV-2a 和 PCV-2b 的序列后,设计了能特异检出 PCV-2 的引物,成功建立了检测 PCV-2 的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法,该方法不仅能准确、特异地检测样品中的 PCV-2 含量,而且能方便地用于临床样品的检测,帮助养殖户更好地监控猪群的 PCV-2 感染状况,及早采取相应的预防控制措施,避免由于 PCV-2 的免疫抑制作用造成的免疫失败及与其他疾病的混合感染。

[参考文献]

- [1] 郭春艳,葛俊伟,李一经. 猪圆环病毒 2 型 ORF2 基因的原核表达 [J]. 东北农业大学学报,2009,40(6):79-84.
Guo C Y,Ge J W,Li Y J. Expression of PCV2 ORF2 gene in prokaryotic cells [J]. Journal of Northeast Agricultural University,2009,40(6):79-84. (in Chinese)
- [2] 苗丽娟. 猪圆环病毒检测方法研究进展 [J]. 饲料博览,2011(2):49-51.
Miao L J. Research progress on detection method of porcine circovirus [J]. Feed Review,2011(2):49-51. (in Chinese)
- [3] Tischer I, Mields W, Wolff D, et al. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus [J]. Archives of Virology,1986,91(3/4):271-276.
- [4] Segales J, Allan G M, Domingo M. Porcine circovirus diseases [J]. Animal Health Research Reviews,2005,6(2):119-142.
- [5] Chae C. Postweaning multisystemic wasting syndrome: A review of aetiology, diagnosis and pathology [J]. Veterinary Journal,2004,168(1):41-49.
- [6] Chang H W, Jeng C R, Lin C M, et al. The involvement of Fas/FasL interaction in porcine circovirus type 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus co-inoculation-associated lymphocyte apoptosis *in vitro* [J]. Veterinary Microbiology,2007,122(1/2):72-82.
- [7] Chang H W, Jeng C R, Lin T L, et al. Immunopathological effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) on swine alveolar macrophages by *in vitro* inoculation [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology,2006,110(3/4):207-219.
- [8] Darwich L, Segales J, Mateu E. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome causes by porcine circovirus 2: An immune riddle [J]. Archives of Virology,2004,149:857-874.
- [9] 韩庆功,崔艳红,张智勇. 我国猪圆环病毒 2 型感染的危害 [J]. 黑龙江畜牧兽医:综合指导版,2010(22):84-85.
Han Q G,Cui Y H,Zhang Z Y. The hazards of porcine circovirus 2 infection in china [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine: Comprehensive Guide Version,2010(22):84-85. (in Chinese)
- [10] 罗玉均,张桂红,陈建红,等. TaqMan 探针荧光定量 PCR 快速检测猪圆环病毒 2 型 [J]. 中国兽医杂志,2007,43(1):77-79.
Luo Y J,Zhang G H,Chen J H,et al. Rapid detection of porcine circovirus type 2 by TaqMan fluorescence quantitative PCR [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine,2007,43(1):77-79. (in Chinese)
- [11] 汤智慧,郭抗抗,张彦明,等. 猪圆环病毒 2 型陕西分离株的分离鉴定及全基因组分析 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2011,39(4):7-13.
Tang Z H,Guo K K,Zhang Y M,et al. Isolation and identification of porcine circovirus type 2 Yangling isolate and sequence analysis of the whole genomes [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition,2011,39(4):7-13. (in Chinese)
- [12] 蒋成砚,李开明,谢 昆,等. 猪圆环病毒 2 型检测技术进展 [J]. 中国畜牧兽医,2012,39(1):188-190.
Jiang C Y,Li K M,Xie K,et al. Porcine circovirus type 2 advances in detection technology [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine,2012,39(1):188-190. (in Chinese)
- [13] 贾德宏,冯秉福. 猪圆环病毒检测技术进展 [J]. 养殖与饲料,2011(7):37-39.
Jia D H,Feng B F. The research progress of porcine circovirus detection technology [J]. Animals Breeding and Feed,2011(7):37-39. (in Chinese)
- [14] 魏 娟,李文刚,郑宝亮,等. 猪圆环病毒 2 型诊断方法的研究进展 [J]. 中国畜牧兽医,2008,35(4):71-74.
Wei J,Li W G,Zheng B L,et al. Advancement of diagnostic technology in porcine circovirus type 2 [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine,2008,35(4):71-74. (in Chinese)
- [15] Larochele R, Bielanski A, Müller et al. PCR Detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen [J]. Journal of Clinical Microbiology,2000,38(12):29-32.
- [16] Sarrazin C, Sizmann D, Babel R, et al. Comparison of conventional PCR with real-time PCR and branched DNA-based assays for hepatitis C virus RNA quantification and clinical significance for genotypes 1 to 5 [J]. Journal of Clinical Microbiology,2006,44(7):29-37.
- [17] 倪红霞,刘志辉,郑学星,等. TaqMan 探针荧光定量 PCR 支原体快速检测方法的建立及应用 [J]. 吉林大学学报:医学版,2010,36(4):797-801.
Ni H X,Liu Z H,Zheng X X,et al. Establishment of rapid detection method of major Mycoplasma contaminants in cell cultures using real-time PCR with TaqMan probe [J]. Journal of Jilin University: Medical Edition,2010,36(4):797-801. (in Chinese)
- [18] 陈红英,李新生,崔保安,等. 基于 TaqMan 探针的猪细小病毒实时荧光定量 PCR 方法的建立 [J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2008,34(6):686-689.
Chen H Y,Li X S,Cui B A,et al. Development of real-time fluorescent quantitative PCR assay based on TaqMan probe for detection of porcine circovirus [J]. Journal of Hunan Agricultural University: Natural Sciences Edition,2008,34(6):686-689. (in Chinese)