

猪圆环病毒 2 型 SYBR-Green 1 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立

贾艳艳^{1,2}, 李明凤¹, 王东方^{1,2}, 崔保安^{1,2}, 陈红英^{1,2},
魏战勇¹, 吕晓丽^{1,2}, 郭显坡^{1,2}

(1 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002; 2 河南省动物性食品安全重点实验室, 河南 郑州 450002)

【摘 要】 【目的】建立一种能够快速、灵敏地检测猪圆环病毒 2 型(PCV2)的 SYBR-Green 1 实时荧光定量 PCR 方法。【方法】根据已报道的 PCV2 ORF2 基因组序列,设计并合成 1 对引物。通过常规 PCR 扩增 PCV2 ORF2 基因,将鉴定正确的 ORF2 基因片段克隆入 pTG19-T 载体中,转化大肠杆菌 JM109,经 PCR 及测序鉴定后得到阳性重组质粒,作为标准品模板建立 SYBR-Green 1 荧光定量 PCR 标准曲线和溶解曲线,并做灵敏性、特异性和重复性试验。【结果】PCV2 荧光定量 PCR 标准曲线循环阈值与模板浓度呈良好的线性关系,溶解曲线特异,相关系数为 0.998 8,最低检测的拷贝数为 1 拷贝/25 μ L,特异性和重复性较好。【结论】建立了检测 PCV2 的 SYBR-Green 1 荧光定量 PCR 方法,为该病的早期诊断及定量分析 PCV2 感染程度奠定了基础。

【关键词】猪圆环病毒 2 型(PCV2); SYBR-Green1; 实时定量 PCR; PCR 检测方法

【中图分类号】S858.28

【文献标识码】A

【文章编号】1671-9387(2009)03-0082-05

Development of a SYBR-Green 1 real-time fluorescent quantitative PCR method for detection of type 2 porcine circovirus

JIA Yan-yan^{1,2}, LI Ming-feng¹, WANG Dong-fang^{1,2}, CUI Bao-an^{1,2}, CHEN Hong-ying^{1,2},
WEI Zhan-yong¹, Lü Xiao-li^{1,2}, GUO Xian-po^{1,2}

(1 The College of Animal Husbandry and Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China;

2 Henan Animal Food Safety Key Laboratory, Zhengzhou, Henan 450002, China)

Abstract: 【Objective】The study developed a SYBR-Green 1 real-time quantitative PCR which can detect porcine circovirus type 2 quickly and flexibly. 【Method】According to genome sequences within ORF2 of porcine circovirus type 2 (PCV-2) published in GenBank, a pair of primers was designed. The ORF2 gene was amplified with traditional PCR. The PCR product was cloned into pTG19-T vector and sequenced. The positive recombinant plasmid was used as quantitative template to generate standard curve and melt curve. Sensitivity assay, reproducibility of the assay and specificity assay were determined. 【Result】The results demonstrated that standard curve established by recombinant plasmid was shown a fine linear relationship between threshold cycle and template concentration. Melt curve was specific and the correlation coefficient was 0.998 8; the detection limit of real-time PCR for PCV2 was 1 copy per 25 μ L, and the quantitative PCR was more reproductire and specific than traditional PCR. 【Conclusion】A SYBR Green1 fluorescent quantitative PCR for detecting ORF2 gene of PCV2 was developed for the basis of the early and rapid detection and analysising the infect degree of PCV2 quantitatively.

* [收稿日期] 2008-05-13

[基金项目] 河南省杰出人才创新基金项目(0621002100)

[作者简介] 贾艳艳(1983—),女,河南洛阳人,在读硕士,主要从事分子免疫学和分子病毒学研究。

[通信作者] 崔保安(1948—),男,河南荥阳人,教授,博士生导师,主要从事分子病原学及分子免疫学研究。

Key words: Porcine circovirus 2(PCV2); SYBR-Green1; real-time quantitative PCR; PCR method for detection

猪圆环病毒(Porcine circovirus, PCV)是1974年德国学者 Tischer 等^[1]从猪传代肾细胞系 PK-15 中首次分离出来的。最早发现的 PCV 不引起猪发病,称其为 PCV1,而以后发现的能引起猪发病的 PCV,称其为 PCV2^[2-3]。断奶后仔猪多系统衰竭综合征(Postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS),是由 PCV2 引起的猪的一种多系统功能障碍性疾病,以5~8周龄的仔猪最易感,主要症状为猪体质下降、消瘦腹泻、呼吸困难、咳喘、贫血和黄疸等^[2]。自1991年加拿大首先暴发该病以来,其已在美国及欧洲、亚洲许多国家的猪群中广泛存在,给世界养猪业造成了巨大的经济损失,已成为国内外学者关注的焦点之一。

目前,普遍应用的 PCV2 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 的广泛存在,临床发病与亚临床感染的猪群中病毒量又存在明显不同,常规 PCR 容易造成漏检^[4]。国内姚鑫等^[5]报道,用原位杂交技术检测 PCV2 特异性好,但该方法不能定量,也不能对反应过程进行实时监控。SYBR-Green 1 是结合于双链 DNA 的荧光染料,可在定量 PCR 反应时与双链 PCR 产物结合放出荧光信号,被仪器系统实时监控并检测^[6-7]。该方法具有操作简便、敏感性高、重复性好、污染少、用时短和可自动定量分析等优点,已成为病原检测的重要方法。为此,本研究应用 SYBR-Green 1 实时荧光定量 PCR,对 PCV2 进行定性和定量检测,以期为断奶后仔猪多系统衰竭综合征的早期诊断、药物疗效监测、病情判断和预后及遗传疾病的诊断提供可靠依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂和仪器 TaqTM酶、sybr 荧光 PCR 反应液、DNA marker DL2000 等,购自大连宝生物工程有限公司;Protein K,购自华美生物工程公司;pTG19-T 载体、T₄ DNA 连接酶,为 Promega 公司产品;1640 培养液、新生牛血清,为 GIBCO 公司产品;B 型小量质粒快速提取试剂盒,购自北京博大泰克生物基因技术有限责任公司;Rotor-Gene 2000 型实时定量 PCR 扩增仪,由美国 Corbett Research 公司生产。

1.1.2 病毒和细胞株 猪圆环病毒 II 型(PCV2)和 PK-15 细胞株,购自中国兽药监察所;猪伪狂犬病毒(PRV)、猪细小病毒(PPV)7909 标准毒株和猪蓝耳病病毒(PRRSV),由河南农业大学兽医微生物室保存;工程菌 JM109 感受态细胞,为宝生物工程(大连)有限公司产品。

1.1.3 引物设计与合成 根据已发表的 PCV2-ORF2 基因序列(AF027217),利用 Premier express 软件设计 1 对特异性引物,扩增片段位于 ORF2 基因的 1 415~1 586 bp,长度为 171 bp,引物序列为:

上游引物 P1:5'-GGG CCA CAA TTG AAC CTT ACC C-3';

下游引物 P2:5'-CGC AGC ATC CGA TAT ACT GTC A-3'。

引物由上海生物工程技术有限公司合成。

1.2 PCV2 的增殖

将长成单层的 PK-15 细胞用胰酶消化吹散后传代,取培养液体积 1/10 的 PCV2 种毒同步接种 PK-15 细胞,培养至 96 h 收获病毒,反复冻融 2~3 次,收集病毒液,-20℃贮存备用。

1.3 标准阳性模板的制备

1.3.1 PCV2 核酸的提取 按常规的蛋白酶 K 法^[8]抽提病毒核酸,最后加入 20 μL 超纯水溶解,贮存于-20℃备用。

1.3.2 PCV2 ORF2 基因的 PCR 扩增 对 PCR 反应条件和试剂进行优化。反应体系为:10×PCR buffer 5.0 μL, dNTP(2.5 pmol/μL)4.0 μL,上、下游引物(50 pmol/μL)各 1.0 μL, MgCl₂(25 mmol/mL)4.0 μL, DNA 模板 10 μL, Taq DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.5 μL,补超纯水至 50 μL。反应程序为:95℃预变性 5 min;94℃变性 1 min,55℃退火 50 s,72℃延伸 50 s,扩增 30 个循环;最后 72℃延伸 10 min。反应结束后,取 5 μL PCR 产物用 20 g/L 的琼脂糖凝胶进行电泳检测。按 DNA 凝胶回收试剂盒说明书回收 PCR 产物。

1.3.3 PCV2 ORF2 基因的克隆与鉴定 将回收纯化的 PCR 产物与 pTG19-T 载体相连,构建重组质粒 pTG19-T-ORF2,将其转化到大肠杆菌 JM109 感受态细胞中,然后在氨苄青霉素抗性平板上筛选阳性克隆子。采用 B 型小量质粒快速提取试剂盒法提取重组质粒,进行 PCR 鉴定,并送宝生物工程

(大连)有限公司进行序列测定。

1.3.4 标准品模板的制备 提取阳性重组质粒,在紫外分光光度计中分别测定 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀,并根据段廷云等^[9]给出的公式,计算出质粒中的 DNA 拷贝数为 $8.7 \times 10^{13} \text{ mL}^{-1}$ 。对阳性重组质粒进行 10 的倍比稀释,取 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} 等 6 个稀释度的重组质粒作为标准品模板,用于荧光定量 PCR 反应条件的优化、标准曲线的建立和样品的检测。

1.4 PCV2 SYBR-Green 1 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立

反应总体积为 25 μL ,其中 sybr 荧光 PCR 反应液(包含 DNA 聚合酶、dNTP、SYBR-Green 1 等) 12.5 μL ,上、下游引物(50 pmol/ μL)各 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 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 10 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s,扩增 25 个循环。同时设不加质粒模板的阴性对照。

1.5 PCV2 SYBR-Green 1 实时荧光定量 PCR 标准曲线的建立

分别以经梯度稀释的质粒为模板,进行荧光定量 PCR 扩增,并利用随机软件进行分析,建立标准

曲线和溶解曲线。

1.6 PCV2 SYBR-Green 1 实时荧光定量 PCR 检测方法的评价

1.6.1 灵敏性 阳性重组质粒经 10 的倍比稀释后,进行 SRBY-Green 1 荧光定量 PCR 检测,并与普通 PCR 比较。

1.6.2 特异性 分别提取 PCV2、PRV、PPV、PRRSV 的基因组,进行荧光 PCR 扩增,观察该反应体系的特异性,同时设阳性和阴性对照。

1.6.3 重复性 为了验证荧光 PCR 检测结果的可重复性,选取稀释度为 10^{-5} 的重组质粒为模板,连续扩增 6 次,评价该方法的准确性和稳定性。

1.7 临床样本检测

取 16 份来自河南不同地区的疑似 PMWS 病料,分别进行荧光定量 PCR 和常规 PCR 检测,以比较 2 种方法的灵敏度。

2 结果与分析

2.1 PCV2 ORF2 基因的 PCR 扩增

取 PCV2 ORF2 基因的 PCR 产物 5 μL ,于 20 g/L 琼脂糖凝胶上电泳,结果出现 1 条 171 bp 左右的 DNA 带(图 1),与预期大小一致。

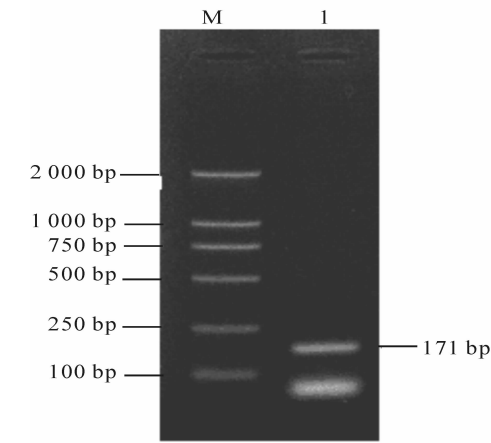


图 1 PCV2 ORF2 基因的 PCR 扩增产物电泳结果
M, DL 2000 Marker;1. PCV2 ORF2 基因 PCR 扩增产物
Fig.1 PCR amplification result of PCV2 ORF2 gene
M, DL 2000 Marker;1. PCR product of PCV2 ORF2 gene

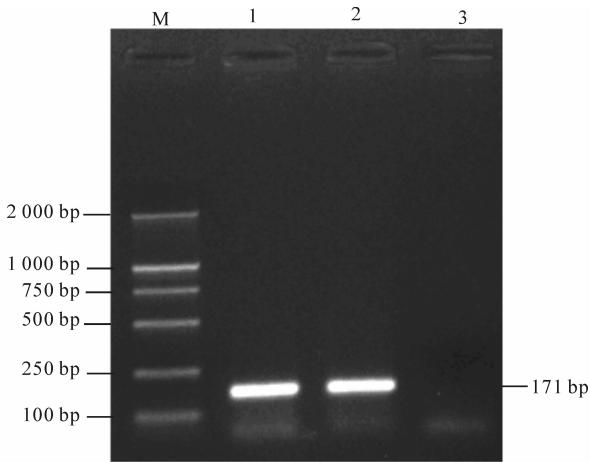


图 2 重组质粒 pTG19-T-ORF2 的 PCR 扩增产物电泳结果
M, DL 2000 Marker;1~2. 重组质粒 pTG19-T-ORF2 的 PCR 扩增产物;3. 阴性对照
Fig.2 PCR amplification result of recombinant plasmid pTG19-T-ORF2
M, DL 2000 Marker;1~2. PCR product of recombinant plasmid pTG19-T-ORF2;3. Negative control

2.2 重组质粒 pTG19-T-ORF2 的鉴定

对重组质粒进行 PCR 鉴定,可扩增到 1 条约 171 bp 的片段,与连接前的 PCR 产物大小一致,命

名为 pTG19-T-ORF2(图 2)。对 PCR 鉴定后的阳性重组质粒进行序列测定,结果与 GenBank 上已发表的序列完全一致。

2.3 PCV2 SYBR-Green 1 实时荧光定量 PCR 标准曲线的建立

按优化的反应条件,取 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} ,

10^{-8} , 10^{-9} 等 6 个稀释度的重组质粒为模板,分别加入到 PCR 反应体系中进行扩增,得到 PCV2 荧光定量 PCR 扩增动力学曲线,见图 3。

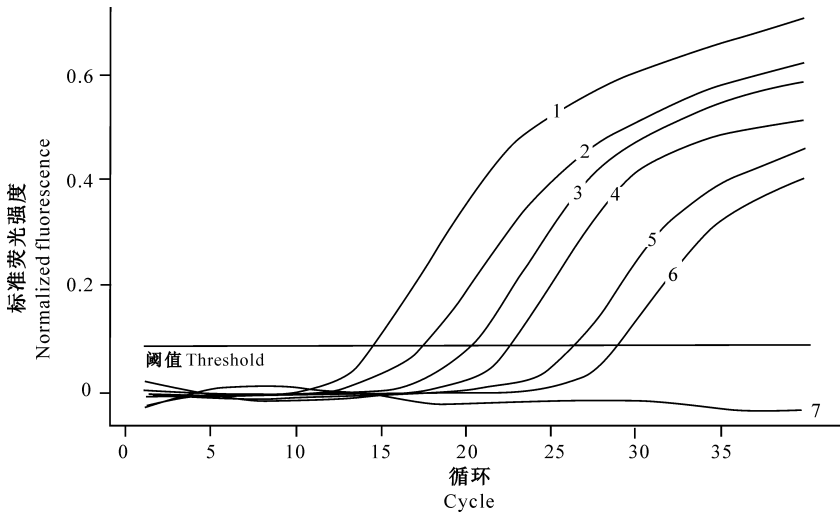


图 3 PCV2 荧光定量 PCR 扩增动力学曲线
1~6. 每 25 μL 中依次含模板 8.7×10^9 , 8.7×10^8 , 8.7×10^7 , 8.7×10^6 , 8.7×10^5 和 8.7×10^4 个拷贝的 ORF2 基因克隆阳性质粒;7. 阴性对照

Fig. 3 Dymatic curve for real-time PCR of PCV2

1—6. Mplification curve of cloned ORF2 gene positive plasmid was shown in 8.7×10^9 , 8.7×10^8 , 8.7×10^7 , 8.7×10^6 , 8.7×10^5 , 8.7×10^4 copy per 25 μL of template;7. Negative control

根据 PCV2 荧光定量 PCR 扩增动力学曲线,电脑自动生成标准曲线(图 4),其斜率为 -2.86 ,截距为 28.90 ,相关系数为 0.9988 ,从而可以得出拷贝数(x)与循环阈值(C_t)之间的线性关系曲线表达式:

$C_t = -2.86 \times \lg x + 28.90$,而待测样品的 C_t 值可以从仪器读取;将待测样品的 C_t 值代入表达式就可以计算出其初始拷贝数。

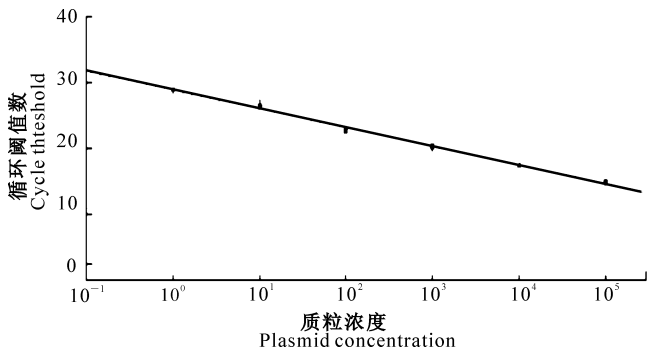


图 4 PCV2 荧光定量 PCR 标准曲线

Fig. 4 Standard curve for real-time PCR of PCV2

2.4 PCV2 PCR 扩增产物的溶解曲线

由图 5 可以看出,标准品 DNA 各个稀释度的溶解温度均为 $86.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右,波峰高度与 DNA 浓度呈正相关。

2.5 PCV2 SYBR-Green 1 实时荧光定量 PCR 检测方法评价

2.5.1 灵敏性 将已计算出拷贝数的重组质粒作

10 倍梯度稀释,在荧光定量 PCR 仪上得出所能检出的最低拷贝数为 1 拷贝/ $25\text{ }\mu\text{L}$ (反应体系浓度),比常规 PCR 结果高 100 倍。

2.5.2 特异性 荧光 PCR 扩增结果显示,只有 PCV2 有荧光信号,其他如 PRV、PPV、PRRSV 均无荧光信号,说明该方法有很好的特异性。

2.5.3 重复性 重复性试验结果表明,每次扩增的

误差不到 1 个循环,可见荧光 PCR 检测方法具有较高的可重复性,从而保证了不同样品间检测结果的

可靠性和稳定性。

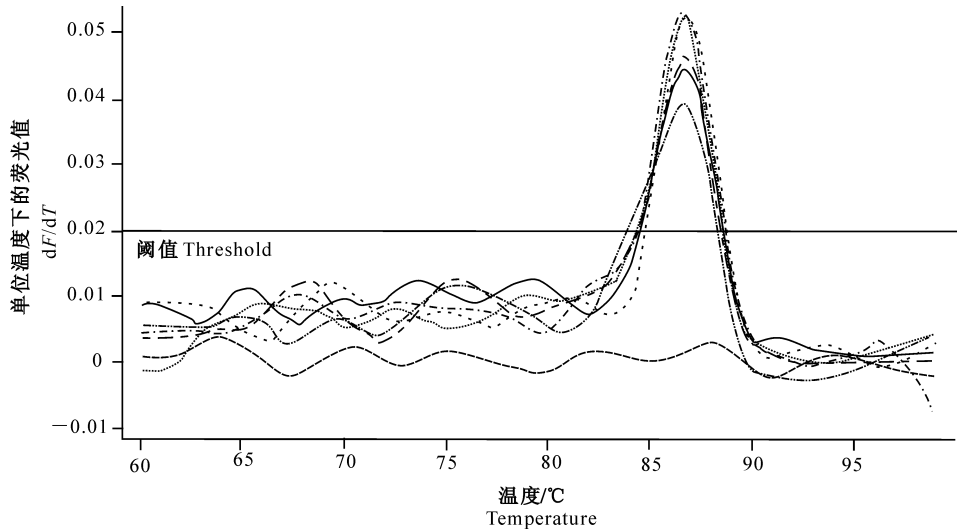


图 5 PCV2 PCR 扩增产物的溶解曲线

Fig. 5 Melt curve of PCV2 PCR amplification product

2.6 临床样本检测

对 16 份疑似 PMWS 的病料进行 SYBR-Green 1 荧光定量 PCR 检测,16 份完全阳性;而采用常规 PCR 扩增,可检测到 13 份阳性;说明荧光定量 PCR 比常规 PCR 灵敏度高。

3 讨 论

为了满足当前猪圆环病毒病的临床快速诊断和检疫要求,本试验建立了一种猪圆环病毒 2 型的 SYBR-Green 1 实时荧光定量 PCR 检测方法。与普通 PCR 相比,该方法具备许多优点:灵敏度高,可检测到 1 拷贝/25 μ L(反应体系浓度)的模板量;特异性强,与其他猪源性病毒无交叉反应;线性范围宽,标准曲线循环阈值与模板浓度呈良好的线性关系,相关系数达 0.998 8;所需时间短,从核酸提取至检测完成,仅需 3 h 左右,且该方法实行完全闭管式操作,从根本上杜绝了常规 PCR 方法存在的扩增产物污染和假阳性的问题。

SYBR-Green 1 是结合于 DNA 双链的一种荧光染料,所以 SYBR-Green 1 实时荧光定量 PCR 检测方法对引物要求较高^[6-7,10]。本试验结果显示,标准品 DNA 各个稀释度的溶解温度均为 86.8 $^{\circ}$ C 左右,反应过程中未出现非特异性扩增和明显的引物二聚体,从而说明本试验的引物特异性很好。

PCV2 是引起 PMWS 的主要病原体,但是轻度感染 PCV2 并不能引起 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^[11]。因此,对猪体内 PCV2 抗原进行定量检测,对 PMWS 的预警与诊断具有重要作用,而普通检测方法不能进行定量测定。

本研究建立的 SYBR-Green 1 实时荧光定量 PCR 检测 PCV2 的方法,为早期诊断 PCV2 起到了很好的指示作用,也为下一步研究 PCV2 在猪体内的分布、致病机理及组织嗜性的研究奠定了基础^[12]。

[参考文献]

[1] Tischer I, Miels W, Wollf D, et al. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus [J]. Arch Virol, 1986, 91(3/4): 271-276.

[2] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1997: 1175-1182.

Yin Z, Liu J H. Animal virology [M]. 2nd edition. Beijing: Science Press, 1997: 1175-1182. (in Chinese)

[3] 杨晓农, 郭万柱. 猪圆环病毒的分子生物学特性及诊断方法 [J]. 西南民族大学学报: 自然科学版, 2007, 33(2): 319-323.

Yang X N, Guo W Z. Molecularbiologic characteristics and diagnostic methods of porcine circovirus [J]. Journal of Southwest University for Nationalities: Natural Science Edition, 2007, 33(2): 319-323. (in Chinese)

[4] 董志强, 张 志, 李晓成, 等. 猪圆环病毒 PCR 检测方法的优化 [J]. 中国病毒学, 2006, 21(4): 405-407.

Dong Z Q, Zhang Z, Li X C, et al. Optimization of PCR for the detection of porcine circovirus 2 [J]. Virology Sinica, 2006, 21(4): 405-407. (in Chinese)