

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.11.03

猪圆环病毒 3 型荧光定量 PCR 检测方法的建立及其在猪体中的组织分布研究

薛霜, 石宝兰, 徐松, 徐丹丹, 顾素云, 漆世华, 李婷婷, 冯钊, 谢红玲*

(国药集团动物保健股份有限公司, 武汉 430075)

[收稿日期] 2021-05-07 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021) 11-0016-06 [中图分类号] S852.65

[摘要] 为了解猪圆环病毒 3 型(PCV3)在猪体中的组织分布情况, 针对 PCV3 Cap 蛋白基因设计筛选出一对特异性引物和探针, 通过对荧光 PCR 引物、探针浓度进行优化, 建立了基于 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 技术的 PCV3 检测方法, 并应用该方法对人工感染 PCV3 猪的多种组织器官进行病毒含量检测。结果显示, 建立的 PCV3 实时荧光定量 PCR 检测方法特异性较好且灵敏度高, 可检测低至 1 copy/ μL 的 PCV3 病毒核酸量, 而对其他几种常见猪病毒病原的检测结果均为阴性。PCV3 主要存在于肺脏、淋巴结, 在扁桃体和脾脏中有少量存在。试验表明, 所建立的荧光定量 PCR 检测方法可用于 PCV3 的快速定量检测, 对 PCV3 在猪体中的组织分布情况的研究为进一步揭示 PCV3 的组织嗜性和致病机理提供理论依据。

[关键词] 猪圆环病毒 3 型; 荧光定量 PCR; 组织分布

Establishment of a Fluorescent Quantitative PCR Method for Detection of Porcine Circovirus Type 3 and Study on Its Tissue Distribution in Pigs

XUE Shuang, SHI Bao-lan, XU Song, XU Dan-dan, GU Su-yun,

QI Shi-hua, LI Ting-ting, FENG Zhao, XIE Hong-ling*

(Sinopharm Animal Health Corporation Ltd., Wuhan 430075, China)

Corresponding author: XIE Hong-ling, E-mail: 13419546263@163.com

Abstract: To explore the distribution of porcine circovirus type 3 (PCV3) in pigs, a pair of specific primers and probe were designed for PCV3 Cap gene. After optimizing the concentrations of PCR primers and probe, a TaqMan probe fluorescence quantitative real-time PCR technology was established, and the viral load of PCV3 in various tissues and organs of pigs artificially infected with PCV3 was studied by this method. The results showed that this method was specific and sensitive for the detection of PCV3, and could detect the amount of virus load as low as 1 copy/ μL , while other common porcine virus pathogens were negative. The results of the detection of the

作者简介: 薛霜, 硕士, 研发工程师, 从事兽用生物制品研发工作。

通讯作者: 谢红玲。E-mail: 13419546263@163.com

main immune organs and some visceral tissues of artificially infected pigs showed that PCV3 mainly existed in the lungs and lymph nodes, and a small amount of PCV3 existed in tonsils and spleen. This study results indicated that the TaqMan real-time PCR technology could be used for rapid quantitative detection of PCV3, and the study on the tissue distribution of PCV3 in pigs could provide theoretical basis for further revealing the tissue tropism and pathogenic mechanism of PCV3.

Key words: porcine circovirus type 3; fluorescent quantitative PCR; tissue distribution

猪圆环病毒 3 型 (Porcine circovirus type 3, PCV3) 是近几年发现的一种新型的猪圆环病毒, 基因组全长 2.0 kb, 为单链环状、无囊膜的 DNA 病毒, 形态呈正二十面体形, GC 含量 50%, 包含 3 个主要开放阅读框 (opening reading frame, ORF), 与其他圆环病毒科病毒具有类似的基因组结构, 但衣壳蛋白氨基酸序列同源性很低。PCV3 与 PCV2 的 Cap 蛋白同源性仅约 30%, 且二者在 Cap 蛋白抗原表位上无任何同源性, 表明这 2 种毒株之间不具有交叉免疫保护特性。PCV3 能引起猪的皮炎肾病综合征、繁殖障碍以及心脏和多系统的炎症反应^[1-2], 与 PCV2 引起的临床症状极其相似, 给临床确诊带来一定的难度。自 2016 年以来, PCV3 已在多个国家猪群中相继被检测到^[3-5]。我国研究人员通过大范围的检测发现, 该病原在来自我国多个省份的样品中也有检测到^[6-7]。

本研究以临床分离的 PCV3 阳性组织毒感染断奶仔猪, 并通过建立的荧光定量 PCR 检测方法研究 PCV3 在猪不同组织脏器中的感染情况, 以期 PCV3 感染的诊断、预防和控制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 PCV3 阳性组织毒悬液, 采自湖北某猪场一 PCV3 阳性猪, 由国药集团动物保健股份有限公司制备并鉴定; PCV1、PCV2、猪细小病毒 (PPV)、猪伪狂犬病病毒 (PRV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV)、猪瘟病毒 (CSFV)、猪流行性腹泻病毒 (PEDV)、猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV), 均由国药集团动物保健股份有限公司鉴定和保存; 大肠杆菌 Trans5 α 感受态细胞, 购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2 主要试剂 Taq DNA 聚合酶、DNA 片段回收

纯化试剂盒、质粒小量快速提取试剂盒、病毒核酸小量提取试剂盒、pMD18-T 载体和 Premix Ex Taq 试剂盒 (探针法) 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

1.3 荧光定量 PCR 检测方法的建立

1.3.1 引物及探针设计 从 GenBank 中下载多条具有代表性的 PCV3 基因全序列, 利用 DNASTar 生物软件分析选出基因高度保守的核苷酸区域, 然后应用 Beacon Design 软件设计筛选出最佳引物和探针组合, 确定为本方法中所使用的引物和探针。同时设计一对扩增 PCV3 Cap 蛋白基因的引物。

1.3.2 定量标准品的制备 取 PCV3 阳性组织毒 200 μ L, 按病毒核酸小量提取试剂盒说明书提取病毒核酸, 用所设计的 PCV3 Cap 蛋白基因引物对提取的病毒 DNA 进行 PCR 扩增, PCR 体系为 10 $\times$ PCR Buffer 5 μ L, dNTPs 4 μ L, 上、下游引物终浓度均为 0.5 μ mol/L, Taq 酶 0.5 μ L, 模板 5 μ L, 补加无菌无核酸酶水至 50 μ L。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s (35 cycles); 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经胶回收试剂盒纯化, 连接至 pMD18-T 载体上, 转化 Trans5 α 感受态细胞, 37 $^{\circ}$ C 培养 12 ~ 16 h。随机挑取若干单菌落接种于 5 mL LB/Amp^r 培养液中, 37 $^{\circ}$ C 振荡过夜, 提取质粒。按上述 PCR 体系和条件进行鉴定, 将初步鉴定为阳性的重组质粒送生物公司测序。测序鉴定正确后作为 PCV3 荧光定量 PCR 阳性质粒, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。经紫外分光光度计测定质粒浓度 (连续测定 3 次取平均值), 计算出每微升所含的 DNA 拷贝数并进行 10 倍梯度稀释, 取其中 10¹ ~ 10⁷ copies/ μ L 的阳性质粒作为定量标准品。

1.3.3 反应体系的建立 参考宝生物 Premix Ex

Taq 试剂盒说明书,用所构建的阳性重组质粒为模板对荧光 PCR 引物、探针浓度进行优化后确定反应体系。

1.3.4 标准曲线的建立 以 1.3.2 中制备的定量标准品为模板,利用 1.3.3 中确定的反应体系进行荧光定量 PCR 检测,得到相关标准曲线。

1.3.5 荧光定量 PCR 检测方法的特异性 按照 1.3.3 中确定的反应体系检测 PCV1、PCV2、PCV3、PPV、PRV、PRRSV、CSFV、PEDV、TGEV 等猪体常见病原的核酸,并设阴性水对照组,从而确定该方法的特异性。

1.3.6 荧光定量 PCR 检测方法的灵敏度 将已计算出拷贝数的阳性质粒梯度稀释至 1 copy/μL,按照 1.3.3 确定的反应体系对所稀释的不同浓度阳性质粒进行检测,以此确定该方法的检测灵敏度。

1.4 PCV3 在猪体中的组织分布研究

1.4.1 动物分组 将 5 头 28 日龄健康易感仔猪随机分为两组,分别为 PCV3 攻毒组和空白对照组,1#、2#、3#猪为攻毒组,4#、5#猪为空白对照组。

1.4.2 攻毒方法 肌肉注射 PCV3 阳性组织毒悬液 2 mL、滴鼻 8 mL,对照组按同样方法接种无菌生理盐水,将两组试验动物隔离饲养,逐日观察。

1.4.3 采样和检测 如试验猪攻毒后 28 d 内死亡,试验猪发现死亡的第一时间进行解剖。攻毒后第 28 d,剖杀其余仔猪。采集仔猪的脑、心脏、脾脏、肺脏、扁桃体、肠系膜淋巴结、肺门淋巴结、腹股沟淋巴结和颌下淋巴结的部分组织用于荧光定量 PCR 检测。

2 结果与分析

2.1 荧光定量 PCR 检测方法的建立

2.1.1 引物及探针设计 本方法中所使用的引物和探针序列信息见表 1。

表 1 PCV3 荧光定量 PCR 引物及探针序列信息

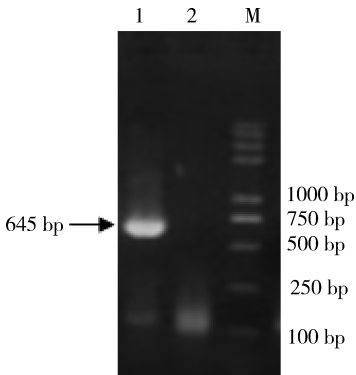
Tab 1 Fluorescent quantitative PCR primers and probe of PCV3

名称	序列(5' - 3')	扩增片段大小/bp
上游引物 PCV3 - F	TGGGCTCCTAATGAATAGTTTT	
下游引物 PCV3 - R	GAGACACAGAGCTATATTCAGAAG	98
荧光探针 PCV3 - Pb	FAM - CCAAGGAGACGACGACGC - BHQ1	

2.1.2 定量标准品的制备 鉴定正确的阳性质粒(图 1)经紫外分光光度计测定核酸浓度,按公式换算成 DNA 拷贝数为 2×10^{10} copies/μL。1:10 倍比稀释后取 $2 \times 10^7 \sim 2 \times 10^1$ copies/μL 的阳性质粒作为荧光 PCR 定量标准品。

2.1.3 反应体系的建立 优化后的最佳反应体系为:上下游引物、荧光探针终浓度均为 0.2 μmol/L, Premix Ex Taq™ (2 ×) 10 μL, DNA 模板 2 μL, 补加灭菌蒸馏水至总体积 20 μL。反应程序为:95 ℃ 预变性 30 s;95 ℃ 变性 5 s,60 ℃ 35 s(收集荧光信号 FAM),40 个循环。

2.1.4 标准曲线的建立 本研究建立的 PCV3 荧光定量 PCR 检测方法在 $2 \times 10^1 \sim 2 \times 10^7$ copies/μL



M;Trans2K plus II DNA Marker;
1:PCV3 Cap 蛋白基因 PCR 产物;2:阴性对照

图 1 PCV3 Cap 蛋白基因 PCR 鉴定

Fig 1 Identification of PCV3 Cap protein gene by PCR

的线性范围内可以得到良好的动力学曲线(图 2),且标准曲线较理想(图 3)。标准曲线方程为 $Y = -3.257\lg X + 36.388$ (X 代表核酸拷贝

数, Y 代表 C_t 值),线性相关系数 R^2 为 1,扩增效率为 102.8%,说明本方法的检测误差较小,可信度较高。

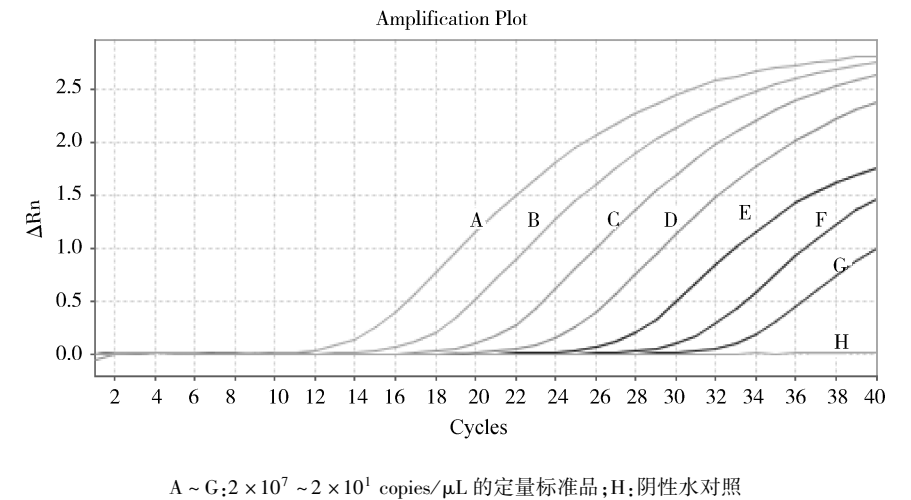


图 2 PCV3 荧光定量标准品扩增曲线图

Fig 2 Fluorescent quantitative PCR amplification curves of PCV3 standard plasmid

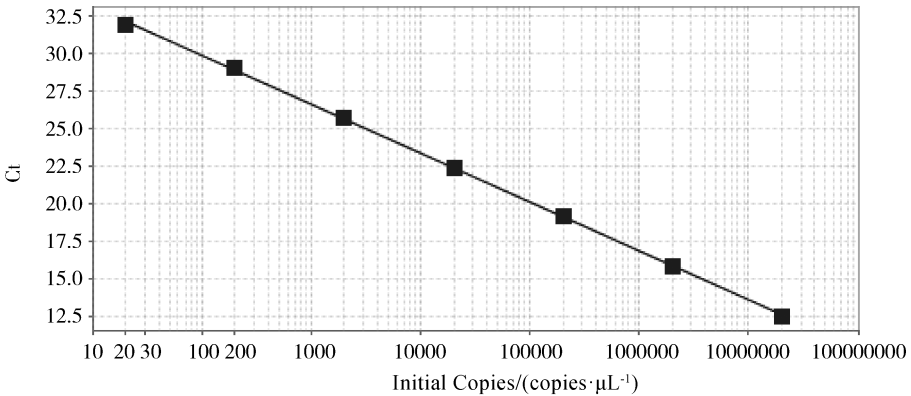


图 3 PCV3 荧光定量标准曲线

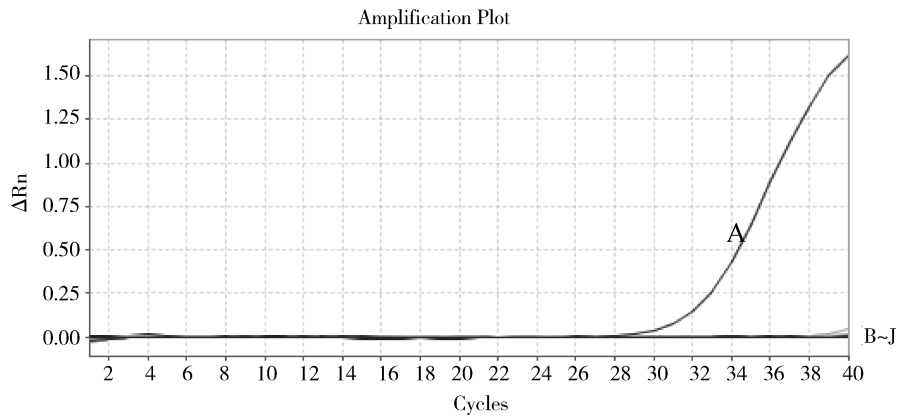
Fig 3 Fluorescent quantitative standard curve of PCV3

2.1.5 荧光定量 PCR 检测方法的特异性 图 4 检测结果显示,除 PCV3 外,对 PCV1、PCV2 及其他几种常见猪病毒病原的检测结果均为阴性。

2.1.6 荧光定量 PCR 检测方法的灵敏度 荧光定量 PCR 检测到的最小病毒核酸量为 1 copy/ μ L, C_t 值为 36.94。检测结果见图 5。

2.2 PCV3 在猪体中的组织分布研究 试验猪攻毒后 28 d 内均无死亡、无明显发病症状。剖杀各

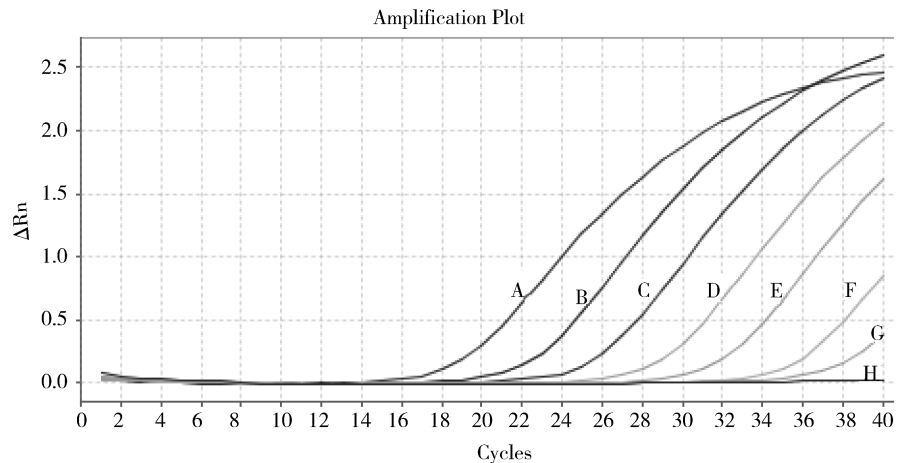
试验猪,采集脑、心脏、脾脏、肺脏、扁桃体、肠系膜淋巴结、肺门淋巴结、腹股沟淋巴结和颌下淋巴结的部分组织用于荧光定量 PCR 检测。结果显示,空白对照组试验猪各组织检测均为阴性,攻毒组试验猪部分组织检出 PCV3 阳性,病毒主要存在于肺脏、淋巴结和脾脏中,在扁桃体中有少量存在,在心脏和脑组织中均未检测到 PCV3 病毒核酸(表 2)。



A:PCV3 扩增曲线;B~J:PCV1、PCV2、PPV、PRV、PRRSV、CSFV、PEDV、TGEV 及阴性水对照扩增曲线

图 4 荧光定量 PCR 特异性检测结果

Fig 4 The specific detection result of fluorescent quantitative PCR



A~G:1×10⁶~1 copy/μL;H:阴性水对照

图 5 荧光定量 PCR 灵敏度检测结果

Fig 5 The sensitivity detection result of fluorescent quantitative PCR

表 2 PCV3 在猪体主要免疫器官及部分内脏组织的分布情况

Tab 2 Distribution of PCV3 in the main immune organs and some visceral tissues of pigs

脏器	各脏器质量/g					Ct 值					核酸拷贝数/(copies·g ⁻¹)				
	1#	2#	3#	4#	5#	1#	2#	3#	4#	5#	1#	2#	3#	4#	5#
肺脏	0.48	0.49	0.49	0.5	0.41	26.35	—	36.76	—	—	3.71×10 ⁶	0	1.30×10 ³	0	0
脾脏	0.53	0.56	0.42	0.56	0.69	26.46	36	37.58	—	—	3.08×10 ⁶	2.04×10 ³	8.12×10 ²	0	0
颌下淋巴结	0.51	0.45	0.38	0.34	0.34	29.79	—	—	—	—	2.54×10 ⁵	0	0	0	0
肺门淋巴结	0.39	0.54	0.45	0.55	0.55	26.83	31.37	29.25	—	—	3.15×10 ⁶	7.18×10 ⁴	4.33×10 ⁵	0	0
腹股沟淋巴结	0.4	0.41	0.38	0.48	0.55	29.27	32.05	29.65	—	—	4.79×10 ⁵	5.64×10 ⁴	3.78×10 ⁵	0	0
肠系膜淋巴结	0.49	0.61	0.59	0.41	0.43	29.23	—	—	—	—	4.03×10 ⁵	0	0	0	0
扁桃体	0.55	0.58	0.63	0.53	0.45	32.51	—	37.18	—	—	2.97×10 ⁴	0	7.33×10 ²	0	0
心脏	0.53	0.51	0.56	0.58	0.63	—	—	—	—	—	0	0	0	0	0
脑	0.41	0.44	0.35	0.46	0.56	—	—	—	—	—	0	0	0	0	0

1#、2#、3#为攻毒组猪,4#、5#为空白对照组猪;“—”代表检测结果为阴性

3 讨论与结论

病毒分离是实验室确诊特定病原体感染的经典方法,但由于 PCV3 在 PK15 细胞、ST 细胞、Vero 细胞等细胞上均不产生细胞病变,目前仍未有研究资料报道能够成功通过体外细胞培养分离到 PCV3,而仅仅只是使用分子生物学检测方法检测到 PCV3 病毒核酸的存在,并进行测序鉴定。目前对该病的研究还处于起始阶段,针对 PCV3 的预防和控制还处于探索阶段。常规 PCR 检测方法简单快速,但容易出现交叉污染,容易产生假阳性,而隐性感染和混合感染的猪群中病毒含量可能并不高。实时荧光 PCR 方法操作简便、快速高效、具有较高的敏感度和特异性,而且封闭性好、不需要后续处理,大大降低了污染的可能性。显著的优越性使得该方法不仅在生物技术方面应用广泛,现今更作为一种诊断方法应用于临床。本研究结果表明所建立的荧光定量 PCR 检测方法特异性好、敏感性高,可用于 PCV3 的快速定量检测。

在本次研究中,虽然在 PCV3 人工感染猪体多种组织器官中检测到了 PCV3 病毒的存在,但并未引起明显的临床症状,这可能与攻毒病毒剂量较低和该毒株毒力较弱有关。同时,检测结果显示 1#猪的阳性组织中病毒含量较其余猪只高,而在临床观察中 1#猪曾有链球菌感染情况,说明当猪体状态较弱或存在其他病原混合感染时可能更容易受 PCV3 感染。本研究人工感染 PCV3 猪体中,病毒主要存在于肺脏、淋巴结,在扁桃体和脾脏中有少量存在,显示出 PCV3 对猪体呼吸器官和免疫器官具有较高的组织嗜性。多项调查研究提示 PCV3 可能与母猪繁殖障碍、猪皮炎肾病综合征 (PDNS)、发热、呼吸系统疾病以及多系统炎症相关,且还可能引起新生仔猪先天性震颤和心肌炎等^[8]。因此对 PCV3

在猪体中的组织分布情况的研究可为进一步揭示 PCV3 的感染途径、组织嗜性和致病机理等提供理论依据。

参考文献:

- [1] Shen H, Liu X, Zhang P, *et al.* Genome characterization of a porcine circovirus type 3 in South China [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2018, 65(1): 264 – 266.
 - [2] Zhai S L, Zhou X, Zhang H, *et al.* Comparative epidemiology of porcine circovirus type 3 in pigs with different clinical presentations [J]. *Virology*, 2017, 14(1): 222.
 - [3] Palinski R, Pineyro P, Shang P, *et al.* A novel porcine circovirus distantly related to known circoviruses is associated with porcine dermatitis and nephropathy syndrome and reproductive failure [J]. *J Virol*, 2016, 91(1): e01879.
 - [4] Kwon T, Yoo S J, Park C K, *et al.* Prevalence of novel porcine circovirus 3 in Korean pig populations [J]. *Vet Microbiol*, 2017, 207: 178 – 180.
 - [5] Franzo G, Legnardi M, Hjulsgaard C K, *et al.* Full – genome sequencing of porcine circovirus 3 field strains from Denmark, Italy and Spain demonstrates a high within – Europe genetic heterogeneity [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2018, 65(3): 602 – 606.
 - [6] Ku X, Chen F, Li P, *et al.* Identification and genetic characterization of porcine circovirus type 3 in China [J]. *Transboundary & Emerging Diseases*, 2017, 64(3): 703.
 - [7] Zheng S, Wu X, Zhang L, *et al.* The occurrence of porcine circovirus 3 without clinical infection signs in Shandong Province [J]. *Transboundary & Emerging Diseases*, 2017, 64(5): 1337 – 1341.
 - [8] 蒋一凡, 张南乡子, 李周勉, 等. 猪圆环病毒 3 型检测和致病性的研究进展 [J]. *经济动物学报*, 2019, 23(3): 181 – 186.
- Jiang Y F, Zhang N X Z, Li Z M, *et al.* Advance of detection and pathogenicity of porcine circovirus type 3 [J]. *Journal of Economic Animal*, 2019, 23(3): 181 – 186.

(编辑:李文平)