

张晓霞,张琪,张皖静,等.猪圆环病毒2型荧光定量PCR检测试剂盒原材料研究[J].上海农业学报,2021,37(1):71-75.

猪圆环病毒2型荧光定量PCR检测试剂盒原材料研究

张晓霞¹,张琪¹,张皖静¹,赵悦琪²,吴文静¹,杨丹¹,许燕^{1*},赵凯^{3*}

(¹上海师范大学生命科学学院,上海200234;²上海博满生物科技有限公司,上海201106;

³上海市农业科学院生物技术研究所,上海201106)

摘要:通过对比3家公司生产的Taq酶、PCR反应缓冲液和UDG酶,对已建立的猪圆环病毒2型(PCV2)荧光定量PCR检测试剂盒中阳性参考品、最低检测限参考品、精密性参考品和阴性参考品进行制备。结果表明: Takara生物工程(上海)有限公司生产的Taq酶、PCR反应缓冲液和上海博彩生物科技有限公司生产的UDG酶的试剂组合扩增效率最高,荧光增长值的平均值达182464,各组合间Ct值无显著性差异。本试验可为相关荧光定量PCR检测试剂盒的药证申报提供参考。

关键词:猪圆环病毒2型;荧光定量PCR检测试剂盒;原材料研究;参考品制备

中图分类号:S852.651 文献标志码:A 文章编号:1000-3924(2021)01-071-05

Research on raw material of fluorescent quantitation PCR detection kit of porcine circovirus type 2

ZHANG Xiaoxia¹, ZHANG Qi¹, ZHANG Wanjing¹, ZHAO Yueqi², WU Wenjing¹,
YANG Dan¹, XU Yan^{1*}, ZHAO Kai^{3*}

(¹ College of Life Science, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China; ² Shanghai Bio-Full Biotech Company Limited, Shanghai 201106, China; ³ Biotechnology Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China)

Abstract: The Taq enzyme, PCR reaction buffer and UDG enzyme produced by the three companies were compared, and the positive reference, minimum detection limit reference, precision reference and negative reference in the established fluorescent quantitative PCR detection kit for porcine circovirus type 2 (PCV2) were prepared. The results showed that the combination of Taq enzyme, PCR reaction buffer solution produced by Takara Bio-engineering(Shanghai) Co., Ltd., and UDG enzyme produced by Shanghai Biocolor BioScience and Technology Co., Ltd., had the highest amplification efficiency, and the average fluorescence growth value was up to 182464, while there was no significant difference in Ct value among the combinations. It can provide reference for the application of other relevant quantitative PCR diagnostic kits.

Key words: Porcine circovirus type 2; Real-time fluorescent quantitation PCR detection kit; Raw material research; Preparation of reference

猪圆环病毒(Porcine circovirus type, PCV)为圆环病毒科(Circoviridae)圆环病毒属(*Circovirus genus*)的成员^[1-2]。该病毒有两个血清型,即猪圆环病毒1型(PCV1)和猪圆环病毒2型(PCV2)^[3]。通常认为,PCV1不具致病性,但PCV2具有致病性,是引起断奶仔猪多系统衰竭综合征(Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome, PMWS)的主要病原^[4]。PCV2主要破坏猪的免疫系统,造成机体免疫抑制,抵抗力降低,产生其他病原微生物的继发感染^[5-6]。PCV2也与猪的其他多种临床疾病密切相关^[7-8]。自1997年在加拿大首次报道PMWS以来,PCV2流行范围不断扩大,给养猪业造成了巨大的经济损失^[9-11]。PCV2感

收稿日期:2019-08-12

基金项目:上海市科学技术委员会科研计划项目(17391901800)

作者简介:张晓霞(1993—),女,在读硕士,主要从事诊断试剂盒研制。E-mail:zxaspark@163.com

*通信作者,E-mail:xuyan6@shnu.edu.cn;kzhaol18@163.com

染猪的初期诊断与病猪的淘汰是 PMWS 防治的关键,开发猪的 PCV2 的定性、定量快速检测方法很有必要。

目前,PCV2 的检测技术主要有免疫学检测技术和分子生物学检测技术。免疫学检测技术有酶联免疫吸附试验(ELISA)、间接免疫荧光试验(IFA)、单层过氧化物酶试验(IPMA)等。其中,ELISA、IFA 和 IPMA 主要用于 PCV2 血清的检测^[12-13]。PCV2 的分子生物学检测技术中最常见的是 PCR 技术,但常规 PCR 一般只能定性,不能定量。基因芯片通过荧光染料信号强度来推算每个探针对应的样品量,但是定量效果不好^[14]。实时荧光定量 PCR 技术(Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, FQ-PCR)是以定性 PCR 技术为基础发展起来的,是目前敏感性最高的核酸检测和定量技术。FQ-PCR 技术是根据荧光共振能量转移原理,在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,最后通过 Ct 值(Cycle threshold, 循环阈值)和标准曲线对未知模板的起始浓度进行定量^[15-16]。Ct 值是指每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。每个模板的 Ct 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系,且起始拷贝数越多,Ct 值越小^[17-19]。荧光定量 PCR 灵敏度高、特异性强、无污染、快速、准确,在临床检验及生命科学研究方面具有重要的意义^[20-22]。本实验室已建立了 PCV2 实时荧光定量 PCR 检测方法,该方法已被美国佐治亚疾控中心所采用,且已经研制出 PCV2 荧光定量 PCR 检测试剂盒。本研究通过荧光定量 PCR 技术对试剂盒主要原材料进行优化,以期为后续药证申报奠定基础。

1 材料与方法

1.1 病毒来源

PCV2 毒株,由本实验室保存。阳性参考品:PCV2 病毒培养液;阴性参考品:猪伪狂犬病病毒(PRV)、猪呼吸与繁殖障碍综合征病毒(PRRSV)和猪瘟病毒(SFV),均由上海市农业科学院畜牧兽医研究所惠赠。

1.2 主要试剂

荧光定量 PCR 试剂盒原材料用的 Taq 酶和 PCR 反应缓冲液两者为配套试剂,共购置 3 套,Group 1: Taq DNA Polymerase(with PCR Reaction Buffer)(上海博彩生物科技有限公司);Group 2: Ex Taq[®] HotStar version(with PCR Reaction Buffer)[Takara 宝生物工程(上海)有限公司];Group 3: Ex Taq[®](with PCR Reaction Buffer)[Takara 宝生物工程(上海)有限公司]。Uracil-DNA-Glycosylase(UDG)酶购置于 3 家公司,Group 1:上海博彩生物科技有限公司;Group 2:南京诺唯赞生物科技有限公司;Group 3:北京康为世纪生物科技有限公司。荧光定量 PCR 引物和 TaqMan 探针由上海生工生物技术有限公司合成;病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒和质粒提取试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司。

1.3 引物和探针设计

以 PCV2(BJ0804 株)ORF2 基因(GenBank 登录号为 EU921257.1)序列作为靶序列(全长 149 bp),使用 Primer Premier 5.0 软件设计引物和探针,使用 Oligo DNAMAN 4.0 和 Primer Analysis 进行序列比对分析。引物与探针信息见表 1。

表 1 PCV2 引物和探针序列
Table 1 Sequence of primers and probe of PCV2

引物和探针	序列
PCV2-Primer1	5'-CGGATATGTATTCCTGGTCGTA-3'
PCV2-Primer2	5'-CCTGTCTAGATTCCACTATGTGATT-3'
PCV2-Probe	FAM-5'-CTAGGCCTACGTGGTCTACATTTC-3'-TAMRA

1.4 PCV2 荧光定量 PCR 检测试剂盒使用方法

体系配置间:在此房间完成荧光定量 PCR 总体系的配置。具体如下:于 1.5 mL 离心管中加入 Premix(内含 10 × Buffer、dNTPs、MgCl₂、Taq 酶、UDG 酶和 Rox 矫正染料)11.9 μL,Primer1 和 Primer2 各 0.9 μL,Probe 0.4 μL,用灭菌双蒸水补至 20 μL。涡旋混匀,瞬时离心,然后将配置好的总体系分装到 8 连 PCR 排管中。所有的荧光定量 PCR 反应均平行重复 3 次。此房间不能放置阳性模板或 PCR 反应产物。

模板间:将配好的 PCR 体系在模板间加入模板 DNA/参考品/对照品/待检样品 5 μL,立即盖严管盖,瞬离,避免产生气泡。模板要按照拷贝数从低到高的顺序依次加入且此房间不能放置 PCR 体系配制的原料。

扩增间:荧光定量 PCR 反应的扩增程序为 37 ℃ 5 min;94 ℃ 预变性 10 min;94 ℃ 变性 30 s,54 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 31 s(此阶段收集荧光信号),45 个循环。反应结束后进行荧光定量 PCR 扩增结果分析。

1.5 试剂盒标准阳性对照的制备

阳性对照是含有 PCV2 靶基因片段的质粒,用分光光度计测定其含量,并根据病毒学方法计算出质粒浓度对应的拷贝数。质粒做 10 倍梯度稀释后作为模板进行荧光定量 PCR 扩增。

1.6 空白对照的制备

空白对照为无 RNA 酶的无菌水。用移液器量取 1 mL 的 DEPC,补纯化水至 1 000 mL,混匀,121 ℃、20 min 灭菌,室温保存。

1.7 阳性参考品、最低检测限参考品和精密性参考品的制备

分取 200 μL 已灭活的 PCV2 病毒培养液的母液,按照病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒说明书进行核酸提取。按 10 倍系列梯度稀释,梯度为 10^{-1} 至 10^{-9} ,稀释后分别进行荧光定量 PCR 检测。

1.8 Taq 酶和荧光定量 PCR 反应缓冲液的优选试验

将 3 家公司生产的 Taq 酶和荧光定量 PCR 反应缓冲液,与 UDG 酶按照供应商说明书进行配制,分别加入浓度为 1×10^7 拷贝/mL 和 1×10^4 拷贝/mL PCV2 病毒 DNA,按照设定程序进行荧光定量 PCR 检测,重复 3 次。评价 3 家公司的 Taq 酶和 PCR 反应缓冲液对 PCR 反应的影响。

1.9 UDG 酶的优选试验

将 3 家公司生产的 UDG 酶与 Taq 酶和 PCR 反应缓冲液按照供应商说明书进行配制,分别加入含 dUTP 的 PCV2 DNA 扩增产物(浓度分别为 1×10^7 拷贝/mL、 1×10^6 拷贝/mL、 1×10^5 拷贝/mL、 1×10^4 拷贝/mL 和 1×10^3 拷贝/mL)或阳性对照,按照说明书设定程序进行荧光 PCR 检测,重复 3 次。

1.10 阳性对照

将 PCV2 的质粒按 10 倍系列梯度稀释,梯度为 10^{-1} 至 10^{-9} ,稀释后分别进行荧光定量 PCR 检测。检测结果中 Ct 值范围为 25—30 对应的浓度梯度的 PCV2 病毒质粒等体积混合后为阳性对照。置于 -20 ℃ 条件下保存,长期保存则置于 -70 ℃ 条件下。

1.11 阳性参考品、最低检测限参考品和精密性参考品试验

将 PCV2 的核酸 DNA 按 10 倍系列梯度稀释,梯度为 10^{-1} 至 10^{-9} ,稀释后分别进行荧光定量 PCR 扩增检测,重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 Taq 酶和荧光定量 PCR 反应缓冲液的优选试验

如表 2 所示,当样本浓度为 10^6 拷贝/μL 时,Group 1、Group 2 和 Group 3 的 Ct 值没有显著性差异,Group 2 的荧光增长值高于 Group 1 和 Group 3;样本浓度为 10^2 拷贝/μL 时,Group 1、Group 2 的 Ct 值没有显著性差异,Group 2 的荧光增长值高于 Group 1,Group 3 未获得 Ct 值且无荧光增长值。综上,Group 2 的产品试剂效果最佳。

表 2 3 家公司 Taq 酶和 PCR 反应缓冲液的优选
Table 2 Optimization of Taq enzyme and PCR reaction buffer from three companies

PCV2 DNA		Group 1		Group 2		Group 3	
		Ct 值	荧光增长值	Ct 值	荧光增长值	Ct 值	荧光增长值
10^6 拷贝/μL	重复 1	20.70	168 267	20.01	181 771	20.40	89 545
	重复 2	20.88	170 627	20.53	179 472	20.18	84 984
	重复 3	20.02	170 403	20.43	186 150	20.17	83 648
	平均值	20.53	169 765	20.32	182 464	20.25	86 059
10^2 拷贝/μL	重复 1	30.77	94 960	30.91	178 352	-	-
	重复 2	30.71	99 657	30.42	174 067	-	-
	重复 3	30.85	94 392	30.48	174 096	-	-
	平均值	30.78	96 336	30.60	175 505	-	-

注: - 表示无典型的 S 型扩增曲线、无 Ct 值、无荧光增长值。

2.2 UDG 酶的优选试验

PCR 产物受污染会造成假阳性。如表 3 所示,根据荧光定量 PCR 扩增结果的 Ct 值判断,无论是含有

dUTP 的高浓度 PCR 产物还是低浓度 PCR 产物, Group 1、Group 2 和 Group 3 均能有效消除污染, 之间没有显著性变化, 综合考虑质量和价格因素, 选择 Group 1。

表 3 3 家公司 UDG 酶的比对优选
Table 3 Comparison and optimization of UDG enzymes from three companies

PCV2 DNA	Group 1		Group 2		Group 3	
	Ct 值	荧光增长值	Ct 值	荧光增长值	Ct 值	荧光增长值
1×10^7 拷贝/mL	-	-	-	-	-	-
1×10^6 拷贝/mL	-	-	-	-	-	-
1×10^5 拷贝/mL	-	-	-	-	-	-
1×10^4 拷贝/mL	-	-	-	-	-	-
1×10^3 拷贝/mL	-	-	-	-	-	-
阳性对照	+	+	+	+	+	+

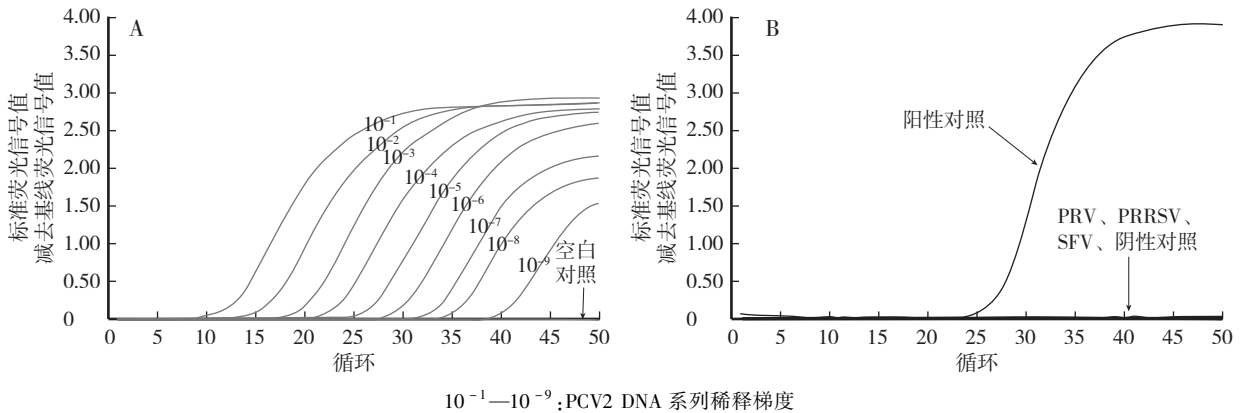
注: + 表示有典型的 S 型扩增曲线、有荧光增长值、有 Ct 值; - 表示无典型的 S 型扩增曲线、无荧光增长值、无 Ct 值。

2.3 阳性参考品、最低检测限参考品和精密性参考品试验

如图 1A 所示, 检测结果中 Ct 值范围为 20—25 对应的浓度梯度的 PCV2 病毒核酸提取液等体积混合后作为阳性参考品。检测结果中 Ct 值范围为 30—35 对应的浓度梯度的 PCV2 病毒核酸提取液等体积混合后作为最低检测限参考品。检测结果中 Ct 值范围为 20—25 对应的浓度梯度的 PCV2 的病毒培养液(工作液)等体积混合后作为精密性参考品。以上参考品置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 长期保存置于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

2.4 阴性参考品试验

对阴性参考品、阳性对照和阴性对照进行荧光定量 PCR 检测, 结果如图 1B 所示, 阳性对照有典型的 S 型扩增曲线、阴性参考品和阴性对照均无扩增, 说明 PRV、PRRSV、SFV 病毒与 PCV2 病毒均无交叉反应。



10⁻¹—10⁻⁹: PCV2 DNA 系列稀释梯度
A: 参考品的荧光定量 PCR 扩增; B: 阴性参考品和阳性对照的荧光定量 PCR 扩增
图 1 阳性参考品、最低检测限参考品、精密性参考品和阴性参考品的荧光定量 PCR 扩增

Fig. 1 Fluorescent quantitation PCR amplification of positive reference, the lowest detection limit reference, precision reference and negative reference

3 结论与讨论

本试验选择不同的靶序列并设计了不同的引物和探针来检测 PCV2, 发现已建立的荧光定量 PCR 检测方法 PCV2 的检测率比普通 PCR 高 18%。这不仅提供了一种快速定量检测 PCV2 的方法, 也可应用于评价 PCV2 疫苗。

本研究对比了 3 家公司生产的 Taq 酶、PCR 反应缓冲液试剂, 结果表明 Takara 宝生物工程(上海)有限公司生产的 Taq 酶、PCR 反应缓冲液的试剂扩增效果最佳; 在 3 家公司生产的 UDG 酶试剂的比对研究中, 上海博彩生物科技有限公司所生产的 UDG 酶的质量和价格最优, 能够有效消除污染; 在试剂盒参考品研究中, 对阳性参考品、最低检测限参考品、精密性参考品进行制备和定值, 保证试剂盒在检测应用中的参照标准和灵敏度, 使这种检测方法更加标准和规范化; 在试剂盒阴性参考品研究中, 设置了 PRV、PRRSV、SFV 3 个病毒和阳性对照进行荧光定量 PCR 试验, 结果显示阴性参考品无交叉反应, 说明阴性参考品具有优良的特异性; 在试剂盒的质控品研究中设置了阳性对照和空白对照, 保证试剂盒的质量控制。

下一步将会继续进行该试剂盒稳定性、生产工艺及反应体系、参考值、分析性能评估、临床考核等等方面的研究。该研究可为业内同行药证申报提供参考。

参 考 文 献

- [1] TISCHER I,RASCH R,TOCHTERMANN G. Characterization of papovavirus and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines [J]. Zentralbl Bakteriol,1974,226:153-167.
- [2] 姜焱,侯玉峰,王凯民,等. II 型猪圆环病毒检测试剂盒的研制[J]. 中国病毒学,2005(1):95-97.
- [3] 冯华,刘运超,陈玉梅,等. 猪圆环病毒 2 型 SYBR Green Real-time qPCR 检测方法的建立[J]. 华北农学报,2018,33(4):98-103.
- [4] ALLAN G M,MCNEILLY F,ELLIS J,et al. PMWS;experimental model and co-infections[J]. Vet Microbiol,2004,98(2):165-168.
- [5] 李然,阳玥玲,吴萌萌,等. PCV2 感染猪各组织病毒载量与细胞内质网应激和自噬相关性[J]. 中国兽医学报,2019,39(3):387-392.
- [6] 夏春香,肖啸,李志敏. 猪圆环病毒病研究进展[J]. 动物医学进展,2005,26(1):35-38.
- [7] WANG X, LV C, JI X, et al. Ivermectin treatment inhibits the replication of Porcine circovirus 2 (PCV2) *in vitro* and mitigates the impact of viral infection in piglets[J]. Virus Research,2019,263:80-86.
- [8] 姜辰龙,严秀文,张日腾,等. 猪圆环病毒 3 型 LAMP 检测方法的建立与应用[J]. 畜牧兽医学报,2018,49(6):1314-1319.
- [9] 程方明,张焕容,岳华. 猪圆环病毒 2 型 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 黑龙江畜牧兽医,2013(21):13-17.
- [10] FINSTERBUSCH T, MANKERTZ A. Porcine circoviruses-small but powerful[J]. Virus Research,2009,143:177-183.
- [11] RAMAMOORTHY S, MENG X J. Porcine circoviruses;a minuscule yet mammoth paradox[J]. Animal Health Res Rev,2008,10(1):1-20.
- [12] BLANCHARD P, MAHE D, CARIOLET R, et al. An ORF2 protein-based ELISA for porcine type 2 antibodies in post-weaning multisystemic wasting syndrome[J]. Veterinary Microbiology,2003,94(3):183-194.
- [13] 张志慧,刘长明,危艳武,等. 猪圆环病毒 2 型几种 ELISA 抗体检测试剂盒的比较与应用[J]. 中国预防兽医学报,2014,36(2):129-133.
- [14] 向华,文翼平,杨国淋,等. 基因芯片检测技术在禽类病原检测方面的研究进展[J]. 中国兽医学报,2019,39(1):188-192.
- [15] 郑伟峰,蒋琳,雷清. 实时定量 PCR 发展概述[J]. 微生物学免疫学进展,2018,46(2):83-88.
- [16] 汪畅. 实时荧光定量 PCR 技术原理及在食品检测中的应用[J]. 中国科技投资,2018(23):233.
- [17] 郑沁春. 实时荧光定量 PCR 仪原理与技术关键点分析[J]. 中国医疗器械信息,2012(6):55-58.
- [18] 安钢力. 实时荧光定量 PCR 技术的原理及其应用[J]. 中国现代教育装备,2018(21):19-21.
- [19] 王玉倩,薛秀花. 实时荧光定量 PCR 技术研究进展及其应用[J]. 生物学通报,2016,51(2):1-6.
- [20] 于新友,李天芝. 猪腹泻性病毒病荧光定量 PCR 鉴别诊断方法研究进展[J]. 饲料与畜牧,2017(8):45-49.
- [21] 惠永华,王路. 影响实时荧光定量 PCR 技术的因素及对策[J]. 黑龙江畜牧兽医,2017(13):289-290.
- [22] 兰静,李秋根. 实时荧光定量 PCR 技术理论研究及其在医学方面的应用[J]. 南昌大学学报(医学版),2011,51(10):97-100.

(责任编辑:郭娇)