

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2015.05.003

猪博卡病毒 NP1 基因特异性的 PCR 方法建立及应用^①

叶星宇^{1,2}, 聂奎¹, 聂福平³

1. 西南大学 动物科技学院, 重庆 400715; 2. 四川省广元市动物疫病预防控制中心, 四川 广元 628000;
3. 重庆市出入境检验检疫局, 重庆 400020

摘要: 该研究根据 Genbank 公布的猪博卡病毒 Porcine bocavirus, PBoV 的核苷酸序列, 在其 NP1 保守区域设计一对特异性引物, 建立一种能扩增多种猪博卡病毒亚型的 PCR 检测方法, 并进行特异性试验, 敏感性试验, 重复性试验及可靠性检测. 结果显示: 所建立的 PCR 检测方法对猪瘟病毒、猪细小病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪圆环病毒 2 型无交叉反应; 敏感度可以检测到 58 pg/ μ L; 经 3 次重复检测, 结果一致, 重复性好; 对阳性产物测序, 与 Genbank 公布的猪博卡病毒 NP1 序列同源性在 97.3% 以上, 可靠性强. 用建立的 PCR 方法对 2011 年重庆部分地区猪场的 266 份育肥猪血清样本进行检测, 结果 45 份为猪博卡病毒阳性, 证明了在重庆地区育肥猪中存在 PBoV 感染的情况.

关键词: 猪博卡病毒; NP1 基因; PCR 检测方法

中图分类号: S858.28

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2015)05-0018-05

猪博卡病毒隶属于细小病毒科 Parvovirus、细小病毒亚科 Parvovirus、博卡病毒属 Bocavirus. 2009 年, 瑞典科研人员 Blomström 等^[1]用随机多重置换扩增(Multiple displacement amplification, MDA)方法在患仔猪断奶多系统衰竭综合征(Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome, PMWS)猪的淋巴结中检测出了猪博卡病毒 Porcine Bocavirus, PBoV, 该病毒为单股线状 DNA, 其基因组大小为 5.2 kb 左右. PBoV 的 VP 蛋白及 NS 蛋白差异较大, 目前已报道的 4 个亚型猪博卡病毒主要是基于 VP 蛋白不同确定的, 目前, 关于 PBoV 的 PCR 方法只有很少的文献报道, 皆为基于 VP1/VP2 设计引物的 PCR 方法, 因此不能区分 PBoV 不同的基因型. NP1 基因为博卡病毒特有基因, 瑞典学者 Blomström 等^[1]于 2009 年从患 PMWS 的仔猪淋巴结中扩增到长度为 1 879 bp 的 PBoV 基因片段, 该片段包含部分 NS、VP 基因及完整的 NP1 基因, NP1 基因编码 218 个氨基酸, 与同属的猩猩博卡病毒、犬细小病毒、人博卡病毒、牛细小病毒的同源性为 44%~55%^[2]. PBoV 瑞典株与之后发现的 PBoV 中国株、香港株 NP1 基因的同源性达到了 90% 以上, 而 PBoV 与经典的 PPV 毒株之间没有亲缘关系^[3], 说明 PBoV 的 NP1 基因在同种间较为保守. 目前国内 PBoV 感染猪群的报道逐年增多, PBoV 对畜牧业生

① 收稿日期: 2013-12-17

基金项目: 国家自然科学基金(31172313); 国家质检总局公益基金项目(201310093); 国家质检总局计划项目(2011HK023).

作者简介: 叶星宇(1989-), 男, 四川广元人, 硕士, 助理兽医师, 主要从事人兽共患病研究.

通信作者: 聂奎, 教授, 博士.

产具有潜在的危害性,需要一种广泛、快速、便捷的 PBoV 检测方法,而根据 NP1 基因上述的特点,在 NP1 基因上设计引物建立 PCR 方法既可区分同属不同种的病毒,也可保证检测到多种亚型的 PBoV,可以满足现今猪群中 PBoV 检测的需求.

1 材料和方法

1.1 对照毒株

猪瘟病毒对照毒株、猪细小病毒对照毒株、猪繁殖与呼吸综合征病毒对照毒株、猪圆环病毒 2 型对照毒株由重庆出入境检验检疫局保存提供.

1.2 血清来源

从重庆市部分养殖场采集育肥猪的血液样本 266 份,离心后分离的血清置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存储备.

1.3 主要试剂

DNA 提取试剂盒、rTaq DNA 聚合酶、DNA 片段回收试剂盒、感受态细胞 JM109、pMD19-T 载体试剂盒均购于宝生物工程(大连)公司;UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒,购自 Omega 公司;氨苄青霉素(Amp)购自 Invitrogen 公司.

1.4 引物的设计

根据 Genbank 已公布的 PBoV-NP1 基因序列,利用 DNASTar 和 Primer 5.0 软件在其保守序列设计一对特异性引物.上游引物 PBoV-F: 5'-AAGGACATCTCCGAAAC-3',下游引物 PBoV-R: 5'-ATGAAT-GCCAGTGAAA-3',预计扩增片段大小为 257 bp.引物由宝生物工程(大连)公司合成.

1.5 病原体 DNA 抽提和 PCR 扩增

按 TaKaRa 公司(大连)的病毒基因组提取试剂盒说明书,从猪血清提取病毒 DNA.以提取的 DNA 样品为模板,进行 PCR 扩增,反应条件为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 s,共 40 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min. PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测.

1.6 敏感性试验

用分光光度计测得 PBoVCQRC-1 的基因组 DNA 质量浓度,并进行 10 倍倍比稀释,分别作为 PCR 模板进行扩增.

1.7 特异性试验

常规提取 PPV,PRRSV,PCV2 以及 PboV 的核酸,以本试验设计引物进行 PCR 扩增.

1.8 重复性试验

对 7 份不同的 PBoV 阳性样品及 7 份 PboV 阴性样品重复检测 3 次,验证该方法的重复性.

1.9 可靠性检测

按说明书对部分 PCR 阳性产物进行克隆,并提取质粒送宝生物工程(大连)有限公司测序以验证 PCR 的可靠性,分别命名 CQRC 1-7.

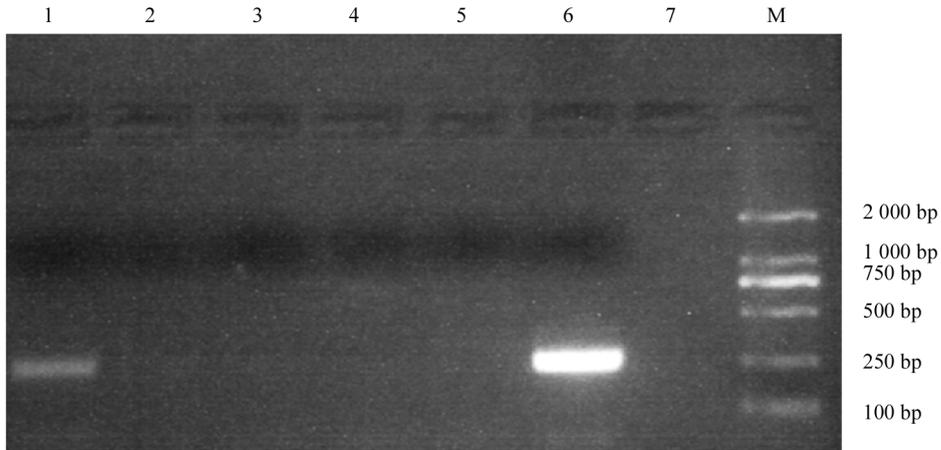
1.10 临床样品的 PCR 检测

为了评估该 PCR 方法在临床应用上的检测效果,对重庆地区育肥猪血清样本进行了检测.

2 结果

2.1 PBoV-NP1 部分基因的 PCR 扩增

用 PCR 方法扩增 PBoV-NP1 部分基因,获得了大小约为 257 bp 的特异性片段,与预期片段大小一致(图 1).

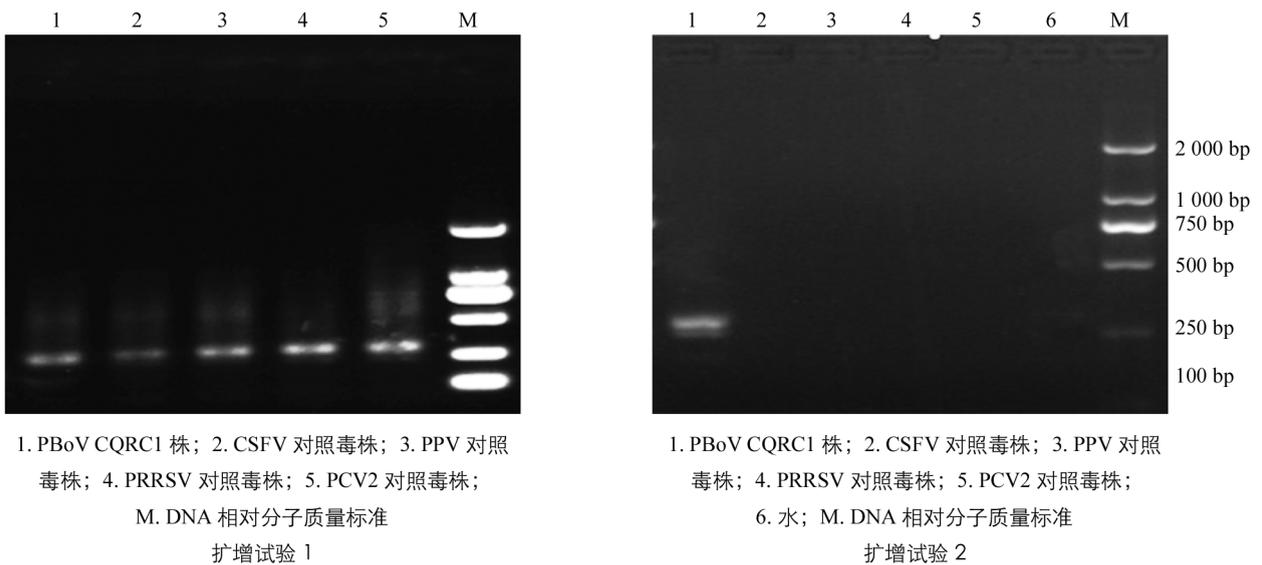


1. PCR 扩增产物; 1~6. Product of PCR; M. 2×10^3 DNA Marker.

图 1 猪博卡病毒 NP1 部分基因 PCR 产物电泳结果

2.2 PCR 方法的特异性试验

为鉴定所建立的 PCR 检测方法的特异性, 选用 CSFV, PPV, PRRSV, PCV2 标准毒株及 PBoV1 (SX), PBoV2 (JS), PBoV3 (ZJD), PBoV4 (6V) 作为对照毒株, 在同样 PCR 反应条件下进行扩增. 结果显示, PBoV (CQRC-1), PBoV1 (SX), PBoV2 (JS), PBoV3 (ZJD), PBoV4 (6V) 能扩增出大小约为 257 bp 的目的片段 (图 2), 而其他病毒没有扩增出片段 (图 3), 表明该 PCR 方法特异性较好, 并能检测出 4 种亚型的猪博卡病毒.



1. PBoV CQRC1 株; 2. CSFV 对照毒株; 3. PPV 对照毒株; 4. PRRSV 对照毒株; 5. PCV2 对照毒株;

M. DNA 相对分子质量标准

扩增试验 1

1. PBoV CQRC1 株; 2. CSFV 对照毒株; 3. PPV 对照毒株; 4. PRRSV 对照毒株; 5. PCV2 对照毒株;

6. 水; M. DNA 相对分子质量标准

扩增试验 2

图 2 猪博卡病毒 NP1 基因特异性扩增试验

2.3 PCR 方法的敏感性试验

用分光光度计测得 PBoV CQRC-1 的基因组 DNA 质量浓度为 $58 \text{ ng}/\mu\text{L}$, 将 PBoV 依次进行 10 倍倍比稀释, 按建立的 PCR 方法进行检测, 结果显示该 PCR 方法的敏感性最低可达 $58 \text{ pg}/\mu\text{L}$ (图 3).

2.4 PCR 方法的重复性试验

对 7 份阳性样品及 7 份阴性样品重复检测 3 次, 检测结果一致, 表明本试验建立的 PCR 检测方法具有良好的重复性.

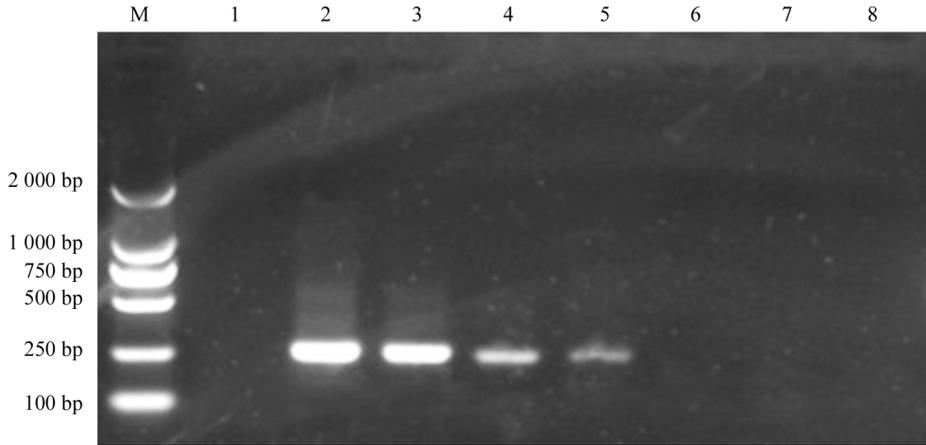
2.5 PCR 方法的可靠性检测

共测得 7 株 PBoV (CQRC 1-7) NP1 部分基因片段序列, 经 Blast 分析, 7 段序列与 NCBI 公布的 PBoV-

NP1 序列同源性均在 97.3% 以上, 充分验证了该 PCR 方法的可靠性, 证实了在重庆地区猪群中存在猪博卡病毒的感染, 同时也再次证明猪博卡病毒 NP1 的保守性.

2.6 临床样品的 PCR 检测

为了评估该 PCR 方法在临床应用上的检测效果, 对重庆地区的 266 份猪血清样本进行了检测, 检出 PBoV 阳性样本有 45 份, 阳性检出率为 16.9%.



2—8. 倍比稀释依次为 $100, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}$.

图 3 猪博卡病毒 NP1 基因敏感性扩增试验

3 讨论

基于 ORF2 编码的 VP 基因序列分类, 目前猪博卡病毒可分为 4 种亚型, 4 种亚型通常存在混合感染. 目前所报道的 PCR 方法都是基于 VP1\VP2 基因设计引物建立的, 本试验在 PBoV-NP1 保守区域设计一对特异性引物, 建立了能够检测多种亚型 PBoV 的 PCR 方法, 该 PCR 检测方法对猪瘟病毒、猪呼吸与繁殖综合征病毒、猪细小病毒、猪圆环病毒进行检测, 均无交叉反应, 对 PBoV1, PBoV2, PBoV3, PBoV4 进行检测, 均能扩增出目的片段; 该方法对 PBoV 可以检测到质量浓度为 $58 \text{ pg}/\mu\text{L}$; 并对阳性样本进行多次重复检测, 结果一致; 对阳性产物测序, 与 Genbank 公布的猪博卡病毒 NP1 序列同源性在 97.3% 以上, 可靠性强.

本次试验用所建立的 PCR 方法对重庆地区育肥猪血清进行 PBoV 检测, 共检测血清样本 266 份, 阳性样本 45 份, 阳性检出率为 16.9%, 首次在重庆地区猪群中检测出猪博卡病毒感染存在, 这与江苏省农业科学院兽医研究所在国内健康猪群中较低水平的阳性检出率(16.7%, 13/78)^[4] 较为接近.

到目前为止, 除少数已报道 PBoV 流行的国家以外, 大部分国家及地区 PBoV 的流行情况尚不清楚. 该 PCR 方法在 NP1 保守区域设计引物, 能检测多种亚型的 PBoV, 为 PBoV 的进一步流行病学调查提供了一个更可靠、更便利的快速检测方法.

参考文献:

- [1] BLOMSTROM A, BELAK S, FOSSUM C, et al. Detection of a Novel Porcine Bocavirus in the Background of Porcine Circovirus Type 2 Induced Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome [J]. *Virus Research*, 2009, 146(1-2): 125-129.
- [2] 曾松林. 猪新型细小病毒 PHoV 和 PBoV 诊断方法的建立、分子流行病学调查及基因组序列分析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2010: 4-5.

- [3] ZENG S, WANG D, FANG L, et al. Complete Coding Sequences and Phylogenetic Analysis of Porcine Bocavirus [J]. *J Gen Virol*, 2011, 92(4): 784–788.
- [4] LI B, XIAO S, MA J, et al. Development of a Novel TaqMan-Based Real-Time PCR Assay for the Detection of Porcine Boca-Like Virus (Pbo-LikeV) [J]. *Virology*, 2011, 428(1): 357.

Establishment of a PCR Assay Specifically for PBoV Based on NP1 and Its Preliminary Application

YE Xing-yu^{1,2}, NIE Kui¹, NIE Fu-ping³

1. *School of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400715, China;*

2. *Guangyuan Animal Disease Control Centre, Guangyuan Sichuan 628000, China;*

3. *Chongqing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Chongqing 400020, China*

Abstract: According to the published PBoV nucleotide sequence in GenBank, we designed a pair of specific primers in the conserved region of NP1 to establish a PCR method that can amplify a variety of PBoV subtypes and tested its specificity, sensibility, repeatability and reliability. The results showed that the method had no cross reaction for classical swine fever virus, porcine parvovirus, porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type II, indicating that its specificity is high. Its sensibility was high, with 58 ng, and its repeatability was good, as the results were consistent in 3 repetitive tests. We sequenced the positive products and the similarity with PBoV-NP1 published by GenBank was more than 97.3%, suggesting that the method was reliable. We applied the established method to test 266 pig serum samples collected in Chongqing area in 2011. Forty-five samples were shown to contain PBoV, proving that the infection of PBoV existed among fattening pigs in Chongqing area.

Key words: Porcine bocavirus (PBoV); NP1 gene; PCR method

责任编辑 夏娟

