

# 猪圆环病毒 II 型可视化 LAMP 检测方法的应用

许宗丽 黄溢泓\* 李志源 周师师 覃艳然 邱洁 盘美妮 刘针伶  
广西柳州市动物疫病预防控制中心, 广西柳州 545000

**摘要** 根据猪圆环病毒 II 型(PCV2) Rep 基因的保守序列,设计一套特异性环介导等温扩增引物,经过各种条件的优化,建立了 PCV2 的可视化 LAMP 检测方法。结果表明,所建立的方法敏感性高达 1 fg;无需昂贵仪器,只要在常规水浴锅 63 ℃ 50 min 就可以通过肉眼观察颜色直接判定;特异性强,与其他病原无交叉反应。此方法简便、特异、快速、灵敏,适合养殖场或县级及以下基层兽医用于猪圆环病毒 II 型感染的快速检测与诊断。

**关键词** 猪圆环病毒 II 型;可视化;环介导等温扩增(LAMP);临床应用

猪圆环病毒(Porcine circovirus, PCV)是已知的能在哺乳动物细胞中复制的动物 DNA 病毒。PCV 被分为无致病性的 I 型(PCV1)和有致病性的 II 型(PCV2)2 种类型。PCV2 是猪的免疫抑制病之一,主要引起淋巴肿大、淋巴细胞减少等病变,造成免疫系统的损伤,临床上表现为断奶仔猪多系统衰竭综合征、怀孕母猪繁殖障碍、断奶猪和育肥猪呼吸道疾病、幼龄仔猪先天性震颤、猪皮炎和肾炎综合征等,给养猪业造成巨大的经济损失<sup>[1-3]</sup>。郎洪武等<sup>[4]</sup>对 2000 年收集的来自山东、北京等 7 个省市 22 个猪场的 559 份血清进行血清学检测,结果 PCV2 病原阳性率为 42.9%;曹胜波等<sup>[5]</sup>对来自我国 4 个省的病料进行 PCR 检测,PCV2 病原阳性率为 27.9%;王

忠田等<sup>[6]</sup>对北京、天津、广东、山东、山西等规模场进行临床调查和病原检测,发现 11 个猪场发生由 PCV2 感染造成的 PMWS,表明我国规模化猪场也存在 PCV2 感染;陈义祥等<sup>[7]</sup>对广西 14 个市送检的 197 份组织病料进行检测,PCV2 阳性率为 54.82%,混合感染为 42.13%;杨槐<sup>[8]</sup>对广西某屠宰场采集的 640 份淋巴结进行病原检测,PCV2 阳性率为 43.88%;李莹莹<sup>[9]</sup>对广西陆川县送检的 131 份组织样品进行 PCR 检测,PCV2 阳性率高达 50.38%。因此,建立一种便捷快速、特异及适合基层的检测方法对于及早发现并采取有效方法控制本病显得十分重要。本试验根据 PCV2 Rep 基因的保守序列设计引物,优化反应体系,建立猪圆环病毒 LAMP 可视化

收稿日期:2017-08-31

基金项目:柳州科技项目(2015E040501)

\* 通讯作者

许宗丽,女,1984 年生,硕士,兽医师。

持。同时,对于工作的难点,依托三大平台直接给各县市区人民政府下达整改通知书或成立联合督导组等形式,破解了畜牧兽医部门自身难于解决的难题。针对“三区”划定不够科学准确、对畜禽养殖场简单“一关了之”等问题,相关工作人员积极争取市委市政府的高度重视和支持,已由市畜牧兽医局牵头,联合国土、水利、环保等部门,在县市区“三区”

划定规划基础上重新科学制定宜昌市畜禽养殖三区划定规划。目前,已完成招投标工作,华中农业大学中标编制全市“三区”划定规划,此项工作 11 月底前可以完成。同时,相关工作人员紧紧围绕绿色发展,大力开展招商引资,积极引进温氏、正大、襄大等知名企业,分别到宜昌建设 100 万头生猪全产业链,推动全市畜牧产业绿色发展,转型升级。

检测方法,并对临床样品进行检测。

## 1 材料与方法

1)主要试剂。TIANamp 血液 / 细胞 / 组织 - 基因 DNA 提取试剂盒和 TIANamp 血液 / 细胞 / 组织 - 病毒 RNA 提取试剂盒购自天根公司;dNTP、Bst3.0 DNAPolymerase 购自 New England Biolabs 公司。

2)病毒株。猪蓝耳病毒(PRRV)、猪瘟病毒(CS-

FV)、猪圆环病毒 II 型(PCV2)和猪伪狂犬病毒(PRV)等由笔者所在实验室保存,猪 O 型口蹄疫病毒(FMDV-O)灭活疫苗由本单位疫苗室保管。

3)引物设计和合成。利用 Lasergene 软件进行 PCV2 Rep 基因的序列比对,在保守区运用在线软件 Primer Explorer V4 设计 3 对 LAMP 引物。将引物序列发送到上海 Invitrogen 公司合成,引物序列见表 1。

表 1 LAMP 引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')
F3	GTCTGGTGACCGTTGCAGA
B3	GGTGGTTCCAGTATGTGCT
FIP	CGCTTCTGCATTTTCCCGCTCA-AGCACCTGTAACGTTTCTC
BIP	ATGTACACGTCATTGTGGGGCC-CCGGGTCTGCAAAATTAGCA
LF	CCAGCCC GCGGAAATTTCT
LB	ACCTGGGTGTGGTAAAAGCA

4)核酸的提取和模板的制备。猪圆环病毒 2 型和猪伪狂犬病毒的 DNA 参照天根公司的 TIANamp 血液 / 细胞 / 组织 - 基因 DNA 提取试剂盒说明书进行提取;猪蓝耳病毒、猪 O 型口蹄疫病毒和猪瘟病毒的 RNA 参照天根公司的 TIANamp 血液 / 细胞 / 组织 - 基因 RNA 提取试剂盒说明书进行提取,并进行反转录制备 cDNA,-70 °C 保存备用。PCV2 模板标准品的制备:用试剂盒回收 B3、F3 引物扩增 PCV2 PCR 产物,与 pGM18-T 载体链接,构建标准品重组质粒 pGM-PCV2,提取质粒,通过紫外分光光度计测定 DNA 浓度。

5)LAMP 反应体系的优化。对反应体系在如下范围内进行优化:将温度按 60、61、62、63、64、65 °C 依次递增,多次重复试验后确定最佳退火温度;MgSO<sub>4</sub> (100 mmol/L) 的量分别为:1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 μL,多次重复试验后确定最佳反应用量;反应时间按 30~70 min 进行优化,确定最佳反应时间。

6)特异性和灵敏度试验。利用优化好的 LAMP 反应体系,同时对猪瘟病毒、猪蓝耳病毒、猪圆环病毒 2 型和猪 O 型口蹄疫疫苗毒株进行检测,检验 LAMP 方法的特异性。使用上海天美 UV-1800 紫外分光光度计测定猪圆环病毒 2 型的 DNA 浓度,并按 10 倍递增稀释。对各浓度 DNA 用 LAMP 方法进行检测,设阴性对照管,与 PCR 方法进行比较,验证该方法的灵敏度。

7)临床样品的检测。对 2016 年柳州市各养殖场送来的 35 份猪病料进行 LAMP 和 PCR 检测,同

时验证建立的检测方法临床运用效果。

## 2 结果与分析

1)LAMP 反应条件的优化。通过对各反应条件的优化,最终确定 LAMP 反应体系为 25 μL:10 × Isothermal Amplification Buffer 1 × /L、dNTPs (10 mmol/L)1.4 mmol/L、FIP/BIP 引物终浓度 1.6 μmol/L、LF/LB0.8 μmol/L、B3/F3 引物 0.2 μmol/L、MgSO<sub>4</sub> (100 mmol/L)6 mmol/L、Bst3.0 DNA 聚合酶(8 U/μL)1 μL、MnCl<sub>2</sub> (12.5 mmol/L)0.5 mmol/L、Calcein (625 μmol/L)25 umol/L、模板 DNA 1 μL,加水至 25 μL。充分混匀后,在水浴锅中 63 °C 反应 50 min,12 °C 冷却 4 min。反应后直接观察结果,阴性对照为桔红色,阳性由桔红色变绿,如图 1A 所示;反应液通过琼脂糖凝胶电泳验证扩增效果,结果见图 1B,阳性呈特征性梯形条带。

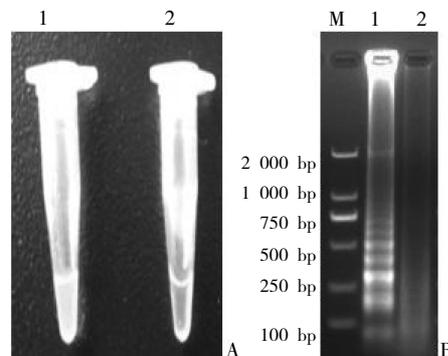


图 1 LAMP 方法的优化结果

注:A,日光下肉眼观察;B,15 g/L 琼脂糖凝胶电泳;M,2 000 bp DNA ladder;1,猪圆环病毒 II 型;2,阴性对照。

2)特异性检验。用本研究建立的 LAMP 方法进行检测,进行检测只有 PCV2 为阳性结果(肉眼观察可见翠绿色),而对猪瘟病毒、猪蓝耳病毒、猪 O 型口蹄疫病毒疫苗和猪伪狂犬病毒的检测均为阴性(图 2)。

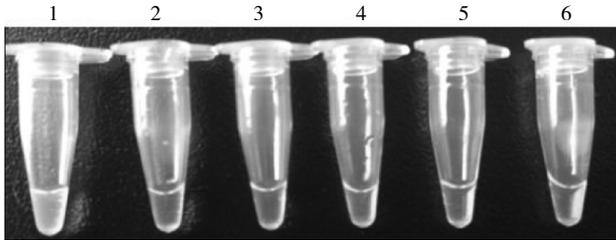


图 2 LAMP 方法检测特异性

注:1、2、3、4、5、6 分别代表 PCV2、CSFV、PRRSV、PRV、FMDV-O、阴性对照。

3)灵敏度检验。建立的 LAMP 检测方法对 PCV2 的最小检测限为 1 fg(图 3),最小检测量是常规 PCR 方法(图 4)的 1/10。

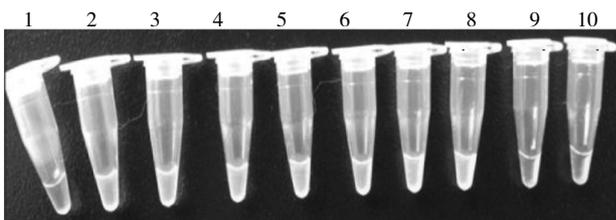


图 3 LAMP 方法检测的灵敏度

注:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 分别代表阴性对照、1 ng、100 pg、10 pg、1 pg、100 f、10 fg、1 fg、0.1 fg、0.01 fg。

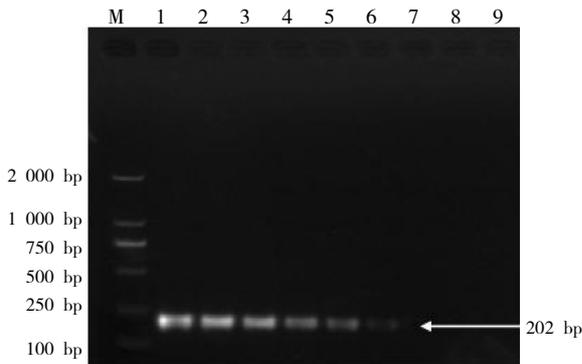


图 4 PCR 方法检测的灵敏度

注:M:2 000 bp DNA ladder;1:1 ng;2:100 pg;3:10 pg;4:1 pg;5:100 fg;6:10 fg;7:1 fg;8:0.1 fg;9:阴性对照。

4)临床样品的检测。对 2016 年柳州市各养殖场送来的 35 份样品,用所建立的方法检测到 13 份阳性,与普通 PCR 的结果一致,说明 LAMP 方法可以用于临床检测。

### 3 讨论

目前检测猪圆环病毒 II 型的方法很多,如病毒

分离、电镜观察、传统 PCR、荧光 PCR 等,这些方法存在费时费力、检测成本高或需要昂贵的仪器设备,无法满足基层的需要。目前我国县级动物疫病预防控制中心或畜牧兽医站普遍都还没有 PCR 检测仪器,所以县级及以下基层很难开展快速检测诊断。环介导等温扩增技术只需要 1 台水浴锅即可进行扩增,扩增的结果可以通过添加荧光显色液条件下,有大量的核酸扩增反应液转变为翠绿色,如没有扩增反应则反应液为桔红色,肉眼可见。本试验建立的猪圆环病毒 II 型 LAMP 检测方法,具有较高的灵敏性,DNA 的最小检测量为 1 fg;整个反应过程在 63 ℃等温条件下只需 50 min 即可完成。同时本试验还选择在配制 LAMP 反应液时加入 Calcein+MnCl<sub>2</sub> 显色染料,反应结束后就直接观察结果,也避免了在反应后开盖加入染料极易引起气溶胶污染所造成的假阳性问题。对 35 份病猪样品的检测结果表明,该 LAMP 方法检测结果与 PCR 检测结果 100%相符。综上所述,本试验建立的猪圆环病毒 II 型 LAMP 的检测方法,简单快速、特异性好、成本低、灵敏性高等特点,尤其适用于基层兽医及养殖场技术人员现场对 PCV2 进行检测。

### 参 考 文 献

- [1] 殷震,刘景华.动物病毒学[M].第 2 版.北京:科学出版社,1997:1175-1182.
- [2] 吕艳丽,杨汉春,郭鑫,等.猪圆环病毒 2 型的分离与鉴定[J].中国兽医杂志,2004,40(2):14-18.
- [3] HARMS P A, HALBUR P G, SORDEN S D. Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection [J]. Swine Health and Production, 2002, 10(1):27-30.
- [4] 郎洪武,张广川,吴发权,等.断奶猪多系统衰弱综合征血清抗体检测[J].中国兽医科技,2000,30(3):3-5.
- [5] 曹胜波,陈焕春,肖少波,等.猪环状病毒 2 型的 PCR 检测方法的建立及应用[J].华中农业大学学报,2001(1):53-56.
- [6] 王忠田,杨汉春,郭鑫.规模化猪场猪圆环病毒 2 型感染的流行病学调查[J].中国兽医杂志,2002,38(10):3-6.
- [7] 陈义祥,刘翠权,何丹,等.广西猪圆环病毒 2 型感染的流行病学调查[J].中国兽医科技,2005,35(10):827-831.
- [8] 杨槐.广西某市屠宰猪淋巴结三种病原检测及 PCV2 分子流行病学调查[D].广西:广西大学,2013.
- [9] 李莹莹.广西陆川猪呼吸道疾病综合征的流行病学调查及猪圆环病毒 2 型的分离鉴定[D].广西:广西大学,2014.