

检测猪圆环病毒 2 型的一种 PCR 方法

梁红虎, 罗满林, 刘镇明, 邬苏晓, 卜春玲

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要: 参照 genbank 已发表的猪圆环病毒 2 型的基因序列, 设计 1 对 2 型特异的引物, 对广东省 20 个猪场送检的患病断奶仔猪的病料进行 PCR 扩增, 并将 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体上, 对重组质粒进行 PCR、酶切鉴定及测序, 最后发现 PCR 检测均为阳性。

关键词: 检测; 圆环病毒 2 型; PCR 方法

中图分类号: Q781

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2003)03-0091-02

猪圆环病毒(PCV)分为 PCV1 和 PCV2 两种血清型。PCV1 普遍存在, 在 PK15 传代细胞中不产生细胞病变, 也不会导致猪发病。PCV2 也不引起 PK15 细胞病变, 但是可以导致猪群发病, 主要引起断奶仔猪多系统消瘦综合症(postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)、先天性震颤(CTA2)和猪皮炎肾炎综合症(porcine dermatitis and nephropathy syndrome, PDNS)^[1]。华南农业大学兽医学院传染病实验室用 PCR 方法对广东省 20 个猪场送检的患病断奶仔猪的病料进行 PCV2 检测, 结果发现 100% 的阳性。

1 材料与方法

1.1 材料

广东 20 个猪场送检的 20~30 日龄患病断奶仔猪的淋巴结、肺、脾等脏器; 引物、试剂等均购自大连宝生物工程有限公司。

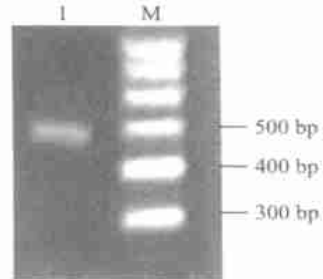
1.2 方法

模板的制备按文献[2]进行; PCR 扩增按 50 μ L 反应体系 (5 μ L 10 $\times$ Buffer, 2 mmol/L 的 dNTP 5 μ L、20 μ mol/L 的引物 1 和引物 2 各 2.5 μ L、*Taq* 0.5 μ L、模板 0.5 μ L、无菌双蒸水 34 μ L) 于 94 $^{\circ}$ C 变性 3 min, 然后进行 30 个循环 (94 $^{\circ}$ C 1 min, 50 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min), 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。所得 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体上, 然后再转化到大肠杆菌 DH5 α 中, 抽提重组质粒。以重组质粒为模板做 PCR, 并用 *Eco*RI 进行酶切鉴定。最后将重组质粒送至上海博亚生物工程有限公司测序。

2 结果

2.1 扩增产物经 0.012 g/mL 琼脂糖凝胶电泳观察, 在 500 bp 附近有 1 条很特异性的条带, 其大小与预期结果相一致。见图 1。以重组质粒为模板, 以引物

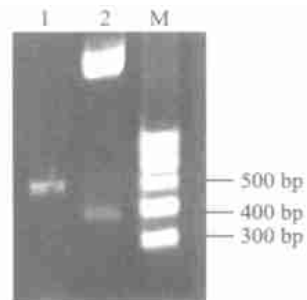
1、引物 2 为引物进行质粒 PCR, 结果在 500 bp 附近可以看到特异的条带。重组质粒用 *Eco*RI 酶切, 然后酶切产物经 0.012 g/mL 的琼脂糖凝胶电泳分析, 结果在 370 bp 附近得到 1 条与预期大小相同的片断。见图 2。



1. 494 bp 的 PCR 产物 M. DNA 分子量标准物
1. 494 bp PCR product of PCV M. 100 bp ladder marker

图 1 PCR 扩增结果

Fig. 1 The result of PCR



1. 质粒 PCR; 2. 重组质粒 *Eco*RI 酶切; M. DNA 分子量标准物
1. PCR of the PCVpMD18; 2. DNA of the PCVpMD18 cut with *Eco*RI; M. 100bp ladder marker

图 2 重组质粒的酶切、PCR 鉴定

Fig. 2 Identifying the PCVpMD18 recombination plasmid by digestion with *Eco*RI and PCR

2.2 测序结果

将测序结果输入 genbank 与已发表的序列进行

比较,结果发现同源性达到 90%以上,最高的同源性 为 98%。测序结果如下:

CACGGATATTGTATTCCTGGTCGTATATACTGTTTTTCGAACGCAGTGCCGAGGCCTACGTGGTCTACATTTCCAGCAGT
TTGTAGTCTCAGCCACAGCTGATTTCTTTTGTGTTTGGTTGGAAGTAATCAATAGTGGAATCTAGGACAGGTTTGGGG
GTAAAGTAGCGGGAGTGTTAGGAGAAGGGCTGGGTTATGGTATGGCGGGAGGAGTAGTTTACATAGGGGTCATAGGTGA
GGGCTGTGGCCTTTGTTACAAAGTTATCATCTAGAATAACAGCACTGGAGCCCACTCCCCTGTACCCTGGGTGATCGG
GGAGCAGGGCCAGAATTCAACCTTAACCTTTCTTATCTGTAGTATTCAAAGGGCACAGAGCGGGGGTTTGAGCCCCCT
CCTGGGGGAAGAAAGTCATTAATATTGAATCTCATCATGTCCACCGCCAGGAGGGCGTTTTGACTGTGGTTCGCTTGA
TAGTATATCCGAAGGTGCGG.

3 讨论

猪圆环病毒 2 型是最近几年才发现的 1 种新病毒,它主要造成机体的免疫抑制,机体抵抗力下降.继发感染其他病原体会导致仔猪大批死亡,给养猪业造成巨大的损失.本次检测发现所检测的 20 个猪场 PCV2 均为阳性(100%),由此可见本病毒已严重影响了广东省养猪业的发展.本方法的建立,为流行病学及疫苗的研究打下了基础.

参考文献:

[1] JOHNSON C S, JOO H S, DIREKSIN K. Experimental in utero inoculation of late-term swine fetuses with porcine circovirus type 2[J] . J Vet Diagn Invest, 2002, 14(6): 507—512.
[2] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿迪斯 T. 分子克隆实验指南[M] . 第 2 版. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 北京: 科学技术出版社, 1992. 53— 54.

A PCR Method for Testing Porcine Circovirus 2

LIANG Hong-hu, LUO Man-lin, LIU Zhen-ming, WU Su-xiao, BU Chun-ling
(College of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: According to the published gene sequence of PCV2, two primers were designed. The sequence was amplified from suffering piglets sample got from 20 farms in Guangdong using PCR. The PCR products were cloned into pMD18-T easy vector, and the recombinant plasmid identified by PCR, restriction enzyme analysis and sequencing. It was found that all of the samples were positive.

Key words: testing; PCV2; PCR method

【责任编辑 柴 焰】

(上接第 88 页)

多种植物提取物对小菜蛾产卵的驱避作用

Tajwer Sultana SYED, 陆永跃, 梁广文
(华南农业大学 昆虫学系, 广东 广州 510642)

摘要: 小菜蛾仅取食为害十字花科植物. 其他非嗜食植物的提取物对小菜蛾可能有好的控制作用. 在温室试验研究了 14 种常见植物的提取物对小菜蛾雌虫的产卵驱避作用. 绝大部分供试植物的提取物可减少小菜蛾的落卵量 40% 以上, 作用最强的是尾叶桉的抽提物, 喷施 24 h 后卵降低率达 65.52%. 植物提取物对小菜蛾雌虫的产卵驱避作用 48 h 后下降, 卵减少率最高为飞机草的抽提物, 达 52.91%. 非嗜食植物次生物质在小菜蛾的控制中会有良好的前景.

关键词: 小菜蛾; 植物提取物; 产卵驱避

【责任编辑 周志红】