

类猪圆环病毒因子 P1 在自然感染仔猪体内的组织分布

温立斌,何孔旺,俞正玉,茅爱华,高晓静,倪艳秀,张雪寒,郭容利,李彬,王小敏,周俊明,吕立新
(江苏省农业科学院 兽医研究所 农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室 国家兽用生物制品工程技术研究中心,江苏 南京 210014)

摘要:选用3头自然感染仔猪和1头阴性对照猪,剖杀后采集心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、胰脏、脑、空肠、扁桃体、胸腺、淋巴结、膀胱、性腺等组织,用荧光定量PCR方法检测病毒在组织中的分布及病毒载量。结果显示,类猪圆环病毒因子P1分布在仔猪的心脏、肝脏、肺脏、胰脏、脑和膀胱等组织,病毒载量以胰脏、脑和膀胱为最高,可达 10^5 拷贝/g以上;对照猪脏器中没有检测到病毒核酸。该研究为P1的诊断及致病机制奠定了基础。

关键词:类猪圆环病毒因子P1;组织分布;病毒载量

中图分类号:S852.651

文献标志码:A

文章编号:1005-4545(2013)01-0001-03

Distribution of porcine circovirus-like agent P1 in a variety of tissues from naturally infected piglets

WEN Li-bin, HE Kong-wang, YU Zheng-yu, MAO Ai-hua, GAO Xiao-jing, NI Yan-xiu, ZHANG Xue-han, GUO Rong-li, LI Bin, WANG Xiao-min, ZHOU Jun-ming, LU Li-xin (Key Laboratory of Veterinary Biological Engineering and Technology of Ministry of Agriculture, National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: The objectives of this study were to investigate the distribution of porcine circovirus-like agent P1 in the tissues of piglets. Three naturally infected pigs and one negative-control pig were selected and sacrificed. The presence and viral load of P1 in collected tissue samples (including mesenteric and superficial inguinal lymph nodes, thymus, tonsil, heart, lung, kidney, liver, spleen, brain, pancreas, bladder, jejunum and gonad) were determined by real-time quantitative PCR. The results indicate that P1 may be distributed in heart, lung, liver, brain, pancreas and bladder. Across these tissues of naturally infected pigs, the brain, pancreas and bladder had the highest viral burdens with 10^5 copies/g. Results from this study lay the foundation for diagnosis and pathogenesis studies of P1.

Key words: porcine circovirus-like agent P1; tissue distribution; viral load

目前所知,类猪圆环病毒因子P1拥有最小的基因组,全长仅648个核苷酸,大部分与猪圆环病毒2型(PCV2)的核苷酸序列高度同源^[1-2],而后者被认为是引起目前危害世界养猪生产的重要疾病——猪断奶后多系统衰竭综合征(Post-weaning multi-systemic wasting syndrome, PMWS)的必要病原^[3]。PMWS临床表现包括进行性消瘦、皮肤苍

白、厌食、精神沉郁、被毛粗乱,出现以咳嗽、喷嚏、呼吸加快及呼吸困难为特征的呼吸器官障碍,使猪群的死亡率增加^[4-5]。我们用构建的P1双拷贝串联分子克隆接种猪,动物试验结果表明感染猪临床上出现类似PMWS症状,即部分感染猪出现消瘦和由于贫血引起的皮肤苍白等现象。此外,接种猪的扁桃体、脾以及淋巴结等免疫器官细胞发生凋亡^[6-8]。因此,P1感染有可能成为危害我国养猪业的又一重要疾病。前期流行病学调查结果表明P1已在我国猪群广泛存在,相比较而言,母猪和仔猪感染率更高一些^[9],为进一步阐明其致病性,我们以哺乳仔猪为实验对象,对其组织嗜性进行了研究,以期通过测定组

收稿日期:2011-11-18

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30972184);江苏省自然科学基金资助项目(BK2008351)

作者简介:温立斌(1967-),男,副研究员,博士。

织中病毒载量,为 P1 的诊断及致病机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 病毒基因组提取试剂盒为北京天恩泽基因科技有限公司产品(柱式病毒 DNAout);SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Perfect Real Time)为 TaKaRa 产品;ABI 7500 荧光定量 PCR 仪;美国 MP Biomedicals 公司的 FastPrep[®]-24 样品快速处理仪。

1.2 引物与质粒 按照参考文献[10]合成普通 PCR 扩增 PCV2 全基因组的引物,上游:5'-GAACCGCGGGCTGGCTGAACTTTTGAAAGT-3',下游:5'-GCACCGCGGAAATTTCTGACAAACGT-TACA-3'。

按照参考文献[1-2]合成普通 PCR 扩增 P1 全基因组的引物,上游:5'-TTAAAGACCCCCACT-TAAACCCTAAATGA-3',下游:5'-AGTGGGGG-GTCTTTAAGATTAAATTCTCTG-3'。

按照参考文献[11]合成荧光定量 PCR 扩增 P1 基因组的引物,上游:5'-CACCGCTACCGTTG-GAGAAG-3',下游:5'-CAGGAGGGCGTTCTGA-CTGT-3',扩增产物为 101 bp。

上述引物由大连宝生物工程有限公司合成。

定量 PCR 扩增 P1 的标准质粒由江苏省农科院兽医所人兽共患病研究室构建、保存。

1.3 试验动物的筛选 从南京六合某养猪场选取 10 日龄哺乳仔猪,前腔静脉采血,分离血清,用 DNA 提取试剂盒,按说明提取病毒基因组。DNA 模板用来进行常规 PCR,同时扩增 PCV2 与 P1。其中扩增 PCV2 全基因组的程序参考文献[4],即 95℃ 9 min 预变性,然后 94℃ 1 min 变性;48℃ 1 min 退火;72℃ 3 min 延伸,进行 35 个循环,最后 72℃ 再延伸 7 min。

扩增 P1 全基因组的程序为:95℃ 5 min 预变性,然后 94℃ 45 s 变性;56℃ 45 s 退火;72℃ 45 s 延伸,进行 35 个循环,最后 72℃ 再延伸 7 min。

选取 P1 扩增阳性而 PCV2 扩增阴性仔猪 3 头(分别编为 1 号、2 号和 3 号),用来进行 P1 在感染猪体内分布的研究;同时选取 P1、PCV2 扩增皆为阴性的仔猪 1 头,用作对照。

1.4 定量 PCR 检测 P1 在猪体内各组织中的分布

将选取的 4 头猪剖杀,分别采集心、肝、脾、肺、肾、胰、脑、膀胱、肠系膜淋巴结、腹股沟淋巴结、扁桃体、胸腺、空肠、性腺(睾丸/卵巢)等组织,经样品快速处理仪研磨,同样用上述 DNA 提取试剂盒,抽提基因

组 DNA。采用 SYBR Green I 方法在 ABI7500 仪上进行 PCR 扩增,扩增体系为 25 μ L,扩增程序为:95℃ 30 s,95℃ 5 s,62℃ 30 s,40 个循环。通过融解曲线分析结合测序验证扩增片段的特异性。

2 结果

对试验猪组织样品的检测结果表明,P1 在自然感染仔猪心、肝、肺、胰、脑、膀胱等组织中有分布。检出率以胰脏、脑的为最高(3/3),其次为心、肺脏(2/3)。具体来说,P1 分布于 1 号猪的心、肝、胰、脑等组织,2 号猪的肺、胰、脑、膀胱等组织,以及 3 号猪的心、肺、胰、脑等组织中。其中以胰、脑和膀胱等组织中的病毒载量为较高,可达 10^5 拷贝/g 以上。而对照猪的体内各组织中未检测到 P1 核酸(表 1)。

表 1 试验猪组织中 P1 基因组的拷贝数

组织	拷贝/g			
	1 号猪	2 号猪	3 号猪	对照猪
心	7.50×10^4	—	8.72×10^4	—
肝	6.03×10^4	—	—	—
脾	—	—	—	—
肺	—	6.25×10^4	6.25×10^4	—
肾	—	—	—	—
胰	2.88×10^3	4.90×10^5	3.65×10^5	—
脑	1.70×10^4	3.67×10^5	2.35×10^5	—
性腺	—	—	—	—
膀胱	—	2.93×10^5	—	—
扁桃体	—	—	—	—
胸腺	—	—	—	—
空肠	—	—	—	—
肠系膜淋巴结	—	—	—	—
腹股沟淋巴结	—	—	—	—

注:“—”为未测到

3 讨论

荧光定量 PCR 技术可对靶基因进行准确地定量,特异性强,灵敏度高,操作简单,无须后处理和电泳检测,因此是目前分子检测方法中较为实用的技术,尤其是对于样品中靶基因较低时更加显出其优越性。本试验在前期建立的检测 P1 的荧光定量 PCR 基础上,对自然感染 P1 的仔猪进行了 P1 在其体内的分布检测。

由于类猪圆环病毒因子 P1 具有与 PCV2 高度同源的序列,同源性低的仅为十余个核苷酸,所以已

建立的用来检测 P1 的定量 PCR 所扩增的片段并不能区分两者。为此,研究 P1 在感染猪体内各组织脏器中的分布,需要事先排除 PCV2 的感染。目前用于诊断 PCV2 的 PCR 经常把其 ORF2 作为靶基因来进行扩增,PCV2 ORF2 全长 702 个核苷酸,与 P1 的 600 多个核苷酸高度同源,如果扩增部分 PCV2 ORF2 片段,得到的扩增结果很难将二者区别开来。为此,本试验参考已发表文献通过常规 PCR 扩增 P1 与 PCV2 的全基因组,对试验猪进行了筛选。

类圆环病毒因子 P1 的核苷酸序列大部分与 PCV2 的高度同源,但由于基因组长度大大减小,所以其推测的衣壳蛋白氨基酸数目比 PCV2 的少;此外,类圆环病毒因子 P1 在预测的编码衣壳蛋白基因中缺失 1 个核苷酸,所以其 C 端的序列与 PCV2 的同源性很低。虽然人工接种 P1 分子克隆后,猪出现类似 PMWS 的临床症状,但自然感染仔猪体内 P1 的分布检测结果表明,P1 与 PCV2 是 2 个不同的、能引起各自独立疾病的病原。PCV2 主要分布在淋巴结等组织器官中^[12],而 P1 则以胰、脑等为主要嗜性组织,具体生物学意义有待阐明。

本次试验对象为幼龄哺乳仔猪,有理由怀疑仔猪感染是由垂直传播引起的。从肺脏和膀胱等组织中检测到 P1,提示该病有可能通过呼吸道和尿道排毒而进行传播。先期我们从河北某猪场患流行性腹泻病猪的空肠中检测到了 P1,而本次所用的 3 头感染猪的空肠中并未检测到 P1,可能原因一则为本次样本数少,不能完全代表其真实的分布规律;更有可能的是该病原的分布可能与机体的状况有关系,如有无其他病原感染、饲养管理水平等。当然单独感染和共感染是否引起 P1 分布的不同以及病毒在组织中的动态分布都有待于进一步研究。

本试验初步探讨了 P1 自然感染仔猪后猪体内病毒分布规律,表明胰脏、脑等组织为病毒的主要定殖场所,并可能通过呼吸道、尿液等途径向体外排毒,为继续深入了解 P1 的组织嗜性及致病机理奠定了基础。

参考文献:

- [1] 温立斌,何孔旺,杨汉春. 一株类猪圆环病毒 2 型因子 P1 的全基因组序列测定与分析[J]. 中国农业科学, 2010,43(2):411-416.
- [2] Wen L B, He K W, Yu Z Y, et al. Complete genome sequence of a novel porcine circovirus-like agent[J]. J Virol, 2012,86(1):639.
- [3] 韩雪,蔡林,倪建强,等. 2009 年我国猪群中猪圆环病毒 2 型感染情况调查[J]. 中国兽医学报, 2012,32(7):941-944.
- [4] Allan G M, Ellis J A. Porcine circoviruses: a review[J]. J Vet Diagn Invest, 2000(12):3-14.
- [5] 杨汉春. 猪免疫抑制性疾病的流行特点与控制对策[J]. 中国畜牧兽医, 2004,31(5):41-43.
- [6] 温立斌,何孔旺,杨汉春,等. 类猪圆环病毒因子 P1 感染对猪红细胞的影响[J]. 内蒙古农业科技, 2009(2):46-48.
- [7] 温立斌,何孔旺,杨汉春,等. TUNEL 法检测类猪圆环病毒 2 型因子 P1 诱导猪免疫器官细胞凋亡研究[J]. 华北农学报, 2008,23(增刊):88-91.
- [8] Wen L B, He K W, Xiao Q, et al. A novel porcine circovirus-like agent P1 is associated with wasting syndromes in pigs[J]. PLoS One, 2012,7(8):41565.
- [9] Wen L B, He K W, Yang H C, et al. Prevalence of porcine circovirus-like agent P1 in Jiangsu, China[J]. Viriol J, 2011(8):543-547.
- [10] Fenaux M, Halbur P G, Haqshenas G, et al. Cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus is infectious when injected directly into the liver and lymph nodes of pigs: characterization of clinical disease, virus distribution, and pathologic lesions[J]. J Virol, 2002,76(2):541-551.
- [11] 温立斌,何孔旺,杨汉春,等. SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测类猪圆环病毒因子 P1[J]. 华北农学报, 2009,24(4):31-35.
- [12] McIntosh K A, Tumber A, Harding J C S, et al. Development and validation of a SYBR green real-time PCR for the quantification of porcine circovirus type 2 in serum, buffy coat, feces, and multiple tissues[J]. Vet Microbiol, 2009,133:23-33.