

基于宏基因组学的猪群样本病毒探测方法的建立

韩文, 罗玉子, 赵碧波, 孙元, 李素, 仇华吉*

中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 兽医生物技术国家重点实验室, 哈尔滨 150001

摘要: 极其多样的病毒广泛存在于我们周围的环境和动物体内, 其中很多病毒是人类所未知的, 而发现未知病毒常常受制于病毒常规检测技术的局限性。【目的】构建未知病毒检测技术平台。【方法】应用病毒宏基因组学的理念, 结合新型分子诊断技术, 首先利用过滤和核酸酶处理去除样品宿主核酸干扰, 然后随机 PCR 扩增潜在的病毒宏基因组, 最后通过大规模测序及序列分析获取病毒核酸信息。【结果】利用此技术我们对猪瘟病毒 (CSFV) 细胞培养物和猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 感染猪病料进行了分析, 分别检测到序列总长度 1680 bp, 占基因组 13.7% 的 CSFV 序列和序列总长度 834 bp, 占基因组 47.2% 的 PCV2 序列; 利用此检测技术平台研究一未知病原细胞培养物, 通过测序和序列分析, 结果显示 56 条序列中有 26 条为副流感病毒 5 型 (PIV5) 同源序列, 覆盖了其基因组全长的 16.4%; 此外, 应用本研究建立的方法结合新一代高通量测序, 我们在混合的 7 份病原未知的病猪组织样品中检测到了 1.1% 的病毒序列, 包括 CSFV、PCV2、猪细小病毒 (TTSuV)、猪 bocavirus (PBoV) 和人腺病毒 6 型 (Ad6) 等的部分基因序列。【结论】本研究建立的基于病毒宏基因组学的未知病毒的检测方法突破了传统病毒研究方法的缺陷, 对于猪群样本中病毒的检测具有较高的敏感性, 有望为新发、突发感染性疾病的诊断和监测提供技术支持。

关键词: 病毒宏基因组学, 随机 PCR, 未知病毒, DNA 病毒, RNA 病毒

中图分类号: Q93-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 02-0197-07

随着自然环境和人文环境的大幅度改变, 生物多样性发生了很大的变化, 导致在全球范围内各种感染性疾病不断突发、流行, 不仅严重影响经济的发展, 同时给人类健康造成极大的威胁。新发感染性疾病 (Emerging infectious diseases, EIDs)^[1] 的发生和经典感染性疾病的重现昭示着人类与感染性疾病的这场没有硝烟的战争还远没有结束。

病毒是新发感染性疾病的主要病原之一, 可能是未知病毒也可能是已知病毒发生了未知的变异, 1997 年在香港爆发的 H5N1 禽流感 and 2003 年由冠

状病毒引发的 SARS (severe acute respiratory syndrome, SARS) 都是典型的例子。发现未知病毒常常受制于病毒常规检测技术的局限性。有很大一部分病毒很难通过细胞培养方法进行分离, 与宿主细胞相比, 病毒及其核酸的含量极低也是一大问题, 而且有些病毒基因组序列信息缺乏或不足。因此很多病毒通过常规病毒分离和 PCR 方法仍难以检测。2006 年我国发生的“猪高热综合征”和 2011 年出现的“新生仔猪腹泻”疫情, 由于缺乏快速有效的未知病原分析鉴定技术, 在很长一段时间里病因众说纷

基金项目: 引进国际先进农业科学技术计划 (948 计划) (2130106)

* 通信作者。Tel: +86-18946066041; Fax: +86-451-51997170; E-mail: huajiqiu@hvri.ac.cn

作者简介: 韩文 (1985-), 女, 黑龙江黑河人, 硕士, 主要从事猪瘟检测方法研究。E-mail: wencai911@163.com

收稿日期: 2012-09-06; 修回日期: 2012-11-11

纭,莫衷一是,疫情得不到及时有效的控制,造成疫情蔓延和巨大经济损失,甚至影响食品安全和国民经济健康发展。

以往的经验教训告诉我们,尽早地发现、鉴别未知或新出现的病毒,是疾病防控的关键,同时对疾病的临床治疗也具有重要的指导意义。因此,建立快速、高效的未知病毒的检测技术势在必行。

病毒宏基因组学(viral metagenomics)是宏基因组学的一个分支,它是研究特定环境中的病毒群落的一项技术方法^[2]。利用病毒宏基因组学方法进行未知病毒的鉴定及研究已经得到了普遍认可。我国在这方面起步较晚,本研究的目的在于建立一套基于病毒宏基因组学的未知病毒鉴定技术平台,以便于对我国的突发动物疫情和未知病原做出及时诊断和快速响应,最大限度地减少经济损失。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、细胞和样品:猪瘟疫病毒石门系强毒株(Shimen)细胞培养物由本实验室制备;猪圆环病毒2型(PCV2)感染的组织样品为北京某猪场送检,用实验室常规的PCR方法对其进行常见猪病毒检测,

结果为PCV2阳性,其它病毒均为阴性;产生细胞病变但是经多种方法未能确定病原的PK-15细胞培养物由猪病研究室提供;来自黑龙江、吉林、天津、河北及北京五个省市的7份病猪组织样品,为本实验室保存,用实验室常规诊断方法均未能确定病原。

1.1.2 主要试剂:DNase I、RNase A、RNA酶抑制剂(RRI)、dNTP(2.5 mM)、MgCl₂、ExTaq HS酶购自TaKaRa公司;TRIzol Reagent、SuperScript III反转录试剂盒购自Invitrogen公司;DEPC处理水购自Solarbio公司;3'-5' exo-Klenow DNA Polymerase购自NEB公司;限制性内切酶EcoRV购自Fermentas公司;Tissue DNA Kit、Cycle-pure Kit和Plasmid Mini Kit购自OMEGA公司;Gel Extraction Mini Kit购自上海华舜生物技术有限公司;pSIMPLE18 EcoRV/BAP Vector购自TaKaRa公司;TOP10感受态细胞购自北京博迈德生物技术有限公司;0.22 μm滤膜购自Millipore公司。

1.1.3 引物:本研究中使用的反转录引物FR26RV-N、随机PCR单引物FR20RV^[3]、CSFV荧光定量RT-PCR引物和探针^[4]、PCV2 PCR引物^[5](表1)均由英骏生物技术有限公司合成,用DEPC处理水稀释至10 μM, -20℃保存备用。

表1 反转录和PCR引物

Table 1 Primers used for reverse transcription (RT) and PCR

Primers	Sequences (5'→3')	Endonuclease
FR26RV-N	GCCGGAGCTCTGCAGATATC NNNNNN	EcoRV
FR20RV	GCCGGAGCTCTGCAGATATC	EcoRV
CSFV86S	GAAGTGGGCTAGCCATG	
CSFV166R	ACTGTCCTGTACTCAGGAC	
ProbeCSFVv111	5'-FAM-AGGACTAGCAAACGGAGGGACTAGCCG-TAMRA-3'	
PCV-D1	CCCATGCCCTGAATTTCCATA	
PCV-D2	TAAACTACTCTGCCGCCATAC	

1.2 病原已知样品及病原未知的PK-15细胞培养物的检测

1.2.1 样品处理:将CSFV Shimen株细胞培养物、PCV2感染的猪组织样品及产生细胞病变但经多种常规方法未能确定病原的PK-15细胞培养物冰浴融化,组织样品研磨后离心,细胞培养物直接离心,12000 ×g离心5 min,取上清用0.22 μm滤膜过滤,此过程在超净工作台中完成。然后取357 μL滤液加入DNase I和RNase A各1.5 μL、10 ×DNase I

Buffer 40 μL,于37℃水浴3 h,以降解样品中宿主游离核酸,然后置75℃水浴10 min,灭活DNase I。

1.2.2 DNA和RNA的提取:处理后的样品均分成两份,200 μL样品用OMEGA DNA提取试剂盒提取DNA,另外200 μL样品用Invitrogen TRIzol提取RNA,具体操作参照说明书进行。

1.2.3 双链cDNA和双链DNA合成:样品RNA提取后立即用反转录试剂盒(SuperScript III Reverse Transcriptase)进行反转录,反转录引物为FR26RV-

N(表1), 反应体系及具体操作参照说明书。反转录结束后, 将产物 94℃ 变性 3 min, 迅速置于冰上冷却 2 min, 加入 0.5 μL Klenow DNA Polymerase (NEB 公司) 合成 cDNA 第二链, 反应条件为 37℃ 延伸 1 h, 75℃ 条件下灭活 Klenow DNA Polymerase 10 min。

从样品中提取的 DNA (20 μL) 加入 2 μL 引物 FR26RV-N、4 μL dNTP、3 μL 10 × Klenow Buffer, 94℃ 变性 3 min, 冰上冷却 2 min, 加入 0.5 μL 3′-5′-exo-Klenow DNA Polymerase 后置于 37℃ 水浴 1 h, 重复一次此变性、退火及延伸过程, 将 DNA 补平。

1.2.4 随机 PCR 扩增: 从合成的双链 cDNA 和双链 DNA 中各取 5 μL 应用 FR20RV (表1) 单引物进行随机 PCR 扩增, 反应体系中包含 5 μL 10 × ExTaq Buffer、5 μL MgCl₂ (25 mM)、4 μL dNTP、4 μL FR20RV 引物、0.5 μL ExTaq HS 酶, 加去离子水至反应总体系 50 μL。反应程序为 94℃ 预变性 2 min, 然后 94℃ 变性 1 min, 65℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 扩增 40 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。

PCR 结束后, 将扩增产物用 PCR 产物纯化试剂盒纯化回收, 具体步骤参照说明书。PCR 扩增产物经纯化后, 用限制性内切酶 *EcoRV* 将引物切除。酶切反应体系为 25 μL, 其中纯化的 PCR 产物 20 μL, *EcoRV* 2.5 μL, Buffer R 2.5 μL。于 37℃ 水浴消化 3 h。

PCR 产物经限制性内切酶切除引物后, 在 130 V 电压, 1% 的琼脂糖凝胶的条件下进行琼脂糖凝胶电泳 15 min。切取 DNA 大小在 600 - 1500bp 的凝胶, 然后用胶回收试剂盒回收目的片段, 具体步骤参照说明书。

1.2.5 PCR 产物克隆: 将回收的 DNA 片段和 pSIMPLE18 *EcoRV*/BAP Vector 连接, 然后转化 TOP10 感受态细胞, 涂于氨苄青霉素抗性的固体 LB 平板上, 于 37℃ 培养箱中培养 12 h 后, 挑取单克隆进行菌液 PCR 鉴定, 选取片段大小不等的阳性克隆进行测序。

1.2.6 测序和序列分析: 将阳性克隆送至 Invitrogen 公司测序, 测得的序列拼接后去除载体序列, 应用 NCBI 数据库中 Blastn 和 Blastx 工具, 分别进行核苷酸序列和六框架阅读翻译的氨基酸序列比对。

1.3 临床病猪组织样品的宏基因组测序及结果分析

将来自 5 个省市经常规检测方法未能确定病原的 7 份临床病猪组织样品, 按照前面所述的方法进行样品处理、DNA 和 RNA 的提取、双链 cDNA 和双链 DNA 合成、随机 PCR 扩增, 回收 600 - 1500 bp 目的片段后, 测定回收的 DNA 浓度, 将各样品 DNA 等量混合, 保证 DNA 总量达 500 μg。将制备好的测序样品送上海翰宇生物科技有限公司进行宏基因组测序。测序的基本策略是利用试剂盒构建 DNA 文库, 然后通过 454GS 系统测序, 将测序结果在 NCBI 数据库中进行比对分析。

2 结果

2.1 猪瘟病毒细胞培养物的检测

选用本实验室制备的猪瘟病毒石门株细胞培养物用 0.22 μm 的滤膜过滤, 又经 DNase I、RNase A 消化, 获取总 RNA 后用荧光定量 RT-PCR 检测猪瘟病毒含量, 同时做未经过滤和核酸酶消化的样品对照。结果, 未经过滤及核酸酶处理的样品中 CSFV 病毒载量为 2.503×10^5 copies/μL, 经处理的样品中 CSFV 病毒载量为 2.485×10^5 copies/μL。此结果表明此猪瘟病毒样品经过滤和核酸酶消化处理后病毒核酸含量未受影响。

用本研究建立的检测方法对处理后的样品进行检测, 选取 15 个插入片段大小不同的克隆进行测序。在 NCBI 中 BLAST 比对分析测得的 15 条基因序列, 结果显示, 其中有 4 条猪瘟病毒同源序列, 约占猪瘟病毒基因组全长 13.7%, 同源性为 99% - 100%。另有 2 条猪染色体 mRNA 同源序列、4 条细菌相关同源序列、3 条线粒体同源序列、2 条猪 18S rRNA 同源序列, 序列同源性在 78% - 100% 之间, 此结果与常规的猪瘟病毒检测方法结果一致。

2.2 PCV2 感染猪的组织样品的检测

某猪场送检的猪组织病料研磨后经过滤和核酸酶消化, 提取基因组 DNA 后用常规 PCR 方法^[5]检测为 PCV2 感染, 同时做未经过滤和核酸酶消化的样品对照, 结果表明, 此感染 PCV2 的猪组织样品经过滤和核酸酶处理后病毒核酸含量未受影响 (图 1)。

用本研究建立的检测方法对处理后的样品进行

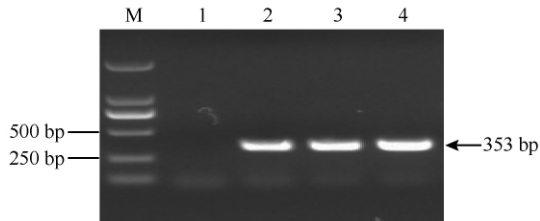


图1 PCV2 常规 PCR 检测

Fig. 1 Detection of PCV2 DNA by PCR. M: DL2000 DNA Marker; 1: PCR negative control; 2: PCR positive control; 3: PCV2-infected sample filtered and treated with nuclease; 4: PCV2-infected sample unfiltered and untreated with nucleases.

检测,从中选取 20 个插入片段大小不同的克隆进行测序。在 NCBI 中将测得的 20 条基因序列进行 BLAST 比对分析,结果显示其中有 12 条 PCV2 同源序列,覆盖 PCV2 基因组全长的 47.2%, 同源性为 99% - 100%。另有 3 条猪染色体 DNA、4 条线粒体 DNA 和 1 条猪内源性逆转录病毒 (porcine endogenous retrovirus, PERV) 同源序列,同源性在 84% - 100% 之间。此结果与 PCV2 常规 PCR 检测方法结果一致。

2.3 未确定病原的 PK-15 细胞分离培养物的检测

猪病研究室相关课题组从腹泻病料中分离病毒时得到了此未知病原细胞培养物,该病原在 PK-15 细胞中培养产生 CPE,但是用实验室常用的血清学和分子生物学诊断方法均未检测到病原。电镜观察

到疑似病毒粒子呈不规则形状,并有囊膜包被,病毒粒子直径大小约为 300 nm (图 2)。

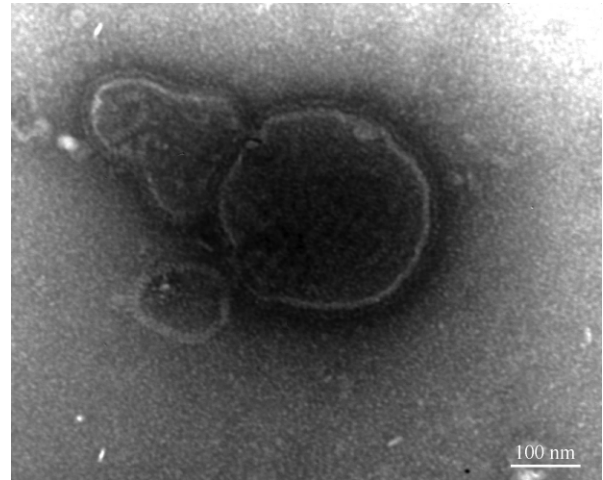


图2 疑似病毒电镜观察结果

Fig. 2 Unknown suspicious virus observed by electron microscopy.

应用本研究建立的方法对此不明病原细胞培养物进行检测,选取 56 个插入片段大小不同的克隆进行测序,在 NCBI 中将测得的 56 条基因序列进行 BLAST 比对分析,结果显示其中有 26 条副流感病毒 5 型 (parainfluenza virus 5, PIV5) 同源序列,同源性为 97% - 100%,覆盖基因组全长的 16.4% (图 3)。另有猪染色体 DNA 同源序列、线粒体同源序列、细菌相关同源序列及克隆载体相关序列,同源性

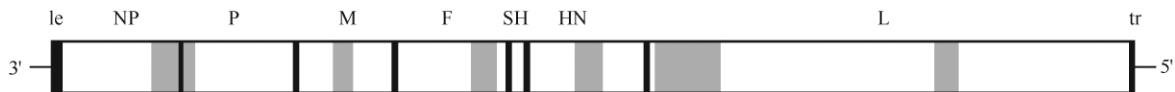


图3 副流感病毒 5 型同源序列覆盖基因组的范围^[6]

Fig. 3 Coverage of homologous sequences in PIV5 genome. Gray regions represent coverage of PIV5 homologous sequence, and schematic representation of PIV5 genome quoted from Wu et al^[6].

在 78% - 97% 之间。此外还有 6 条序列在 GenBank 中未找到与其同源的序列。

2.4 临床病猪组织样品的检测

应用本研究所建立的基于宏基因组学的动物病毒检测方法,对来自 5 个省市的 7 份未查明病因的病猪组织样品进行检测,宏基因组测序结果在 NCBI 数据库中进行比对,结果检测出 CSFV、PCV2、猪细小病毒 (TTSuV)、猪 bocavirus (PBoV) 和人腺病毒 6 型 (Ad6) 等的同源序列 (表 2)。

表2 混合样品宏基因组测序结果的比对与分析

Table 2 Classification of metagenome sequence reads of the pooled samples by BLAST searches.

Category	No. of reads / %
Human	1858 (20)
Pig	3787 (40)
Bacterial and phage	895 (9)
Unknown	2859 (30)
Virus	100 (1.1)
Classical swine fever virus	7
Porcine circovirus 2	15
Torque teno sus virus	68
Porcine bocavirus	8
Human adenovirus 6	10
Total	9507

3 讨论

我国是世界农业大国,也是养猪大国,养猪业已经成为我国畜牧业的主导产业^[7],是农业与农村经济增长的关键,养猪业的健康发展对于国计民生有举足轻重的影响。近几年,传染病对于我国养猪业的威胁依然很严重,这些疫病的发生造成了巨大的经济损失,严重影响我国养猪业的健康发展,继而给国家宏观经济调控带来困难,形势不容乐观,这些现实问题时刻驱使着兽医研究人员不断思考解决方案。

在疫病的防控过程中,诊断是关键,快速、高效、准确的诊断方法能为防控和临床治疗提供指导。目前病毒性传染病临床诊断常用的方法是病毒分离培养与抗原检测技术相结合,但是这些传统的诊断方法都存在很大的局限性。首先病毒在细胞中分离培养需要一段时间才能产生细胞病变(CPE),另一方面,有些病毒在细胞中培养时不产生CPE,甚至很多病毒根本不能在体外情况下生长,这种情况下,无法利用病毒分离培养进行病毒的鉴定;相比之下,分子诊断技术能弥补这方面的不足,对可培养和不可培养的病毒同样适用,而且有较高的特异性和灵敏性,但是也有其自身的不足:传统的分子诊断方法主要依赖病毒基因序列的特异性引物进行PCR扩增,由于病毒之间缺少保守的基因标记,对于未知病毒的检测无能为力。特异性PCR检测难以系统研究样品中的所有病毒(病毒宏基因组, viral metagenome),而病毒核酸序列的随机扩增(sequence-independent amplification)结合高通量测序技术(high-throughput sequencing)可以全面研究某一生态群落的病毒宏基因组。随机PCR技术的关键在于其特殊的引物设计:在反转录用的6-9个碱基的随机引物的5'端加上一段含有一个限制性酶切位点的通用序列,此通用序列即用作随后的PCR反应的扩增引物。本文选用的随机引物引自Allander等^[3],该研究利用随机PCR方法成功分析了人类呼吸道病毒群落,并从中鉴别出一种人细小病毒(human parvovirus)。Ge等应用随机PCR结合高通量测序对我国蝙蝠肠道病毒首次进行了系统研究,成功发现多种新型病毒^[8]。

本研究中应用随机PCR扩增技术,后续要通过

大量的序列测定寻找目的基因,然而宿主自身庞大的基因组以及环境中无关的微生物基因会将低丰度的病毒核酸淹没,为了更加高效的检测病毒,样品处理是十分关键的步骤。首先,病毒颗粒较小,因此利用过滤的手段能够去除宿主细胞和环境中的细菌;另外,病毒核酸包裹在核衣壳中,因此在裂解病毒之前用核酸酶对样品进行消化,能够很大程度的消除宿主内源核酸的影响,减少后续测序和序列分析的工作量,使得检测更加高效。

我们建立的基于病毒宏基因组学的未知病原检测方法,是以宏基因组学研究思路为主线,利用随机PCR扩增的优势,结合大规模测序的方法,高效的检测未知病原的核酸的技术。通过对CSFV细胞培养物和PCV2感染病料的检测,证明此检测方法的样品要求相当宽泛,对于病毒培养物、血清、组织样品的检测普遍适用;同时又是同样适用于RNA病毒和DNA病毒的检测平台。

本研究中,我们从PCV2感染的猪组织样品宏基因组中扩增检测到了一条PERV序列。作为一种内源性病毒,PERV在猪体内广泛存在^[9],病毒整合进宿主基因组进而能够垂直传播,但不引起猪群发病。PERV在体外条件下表现出对人源细胞系的感染趋向性,但是未见有PERV感染人类的报道,即便是这样,仍然引起了学术界对PERV的高度重视。鉴于我国小型猪具有遗传背景清晰、个体差异小、器官大小匹配等优点^[10],目前在治疗人类疾病的异种器官移植的应用研究中已经将小型猪作为潜在的器官捐赠者,因此,异种器官移植研究中必须考虑到PERV对人类的潜在威胁,筛选PERV阴性的猪繁育种系将成为迫切的要求。

随后我们应用该方法对病毒分离过程中产生明显CPE的PK-15细胞进行研究,结果通过序列测定及BLAST比对分析,我们扩增到了副流感病毒5型(PIV5)的NP、M、F、HN和L基因序列,覆盖基因组全长16.4%的序列。因此可以确定PK-15细胞感染了副流感病毒导致细胞病变的产生。

副流感病毒是副粘病毒科成员,为单股负链、不分节段的RNA病毒,有囊膜,囊膜上有两种刺突,即HN蛋白和F蛋白,病毒粒子直径约150 nm - 300 nm。其基因组全长为15246 nt,由7段连续性基因组成,分别是NP、P、M、F、SH、HN和L基因。根据血清学特征,可将副流感病毒分为5个血清型,人类

副流感病毒包含 4 个血清型,其中 I 型和 III 型属于副粘病毒属,而 II 型和 IV 型属于腮腺炎病毒属^[11]。PIV5 属于副粘病毒属,在自然界中分布较广泛,许多动物可感染此病毒,如猴、牛、犬等。从猪体内也曾分离到副流感病毒,但是未引起显著的临床症状^[12]。

PIV5 能够在猴、牛、犬、仓鼠和豚鼠等多种动物的原代肾细胞以及 BHK-21、Vero 等细胞上增殖,其中原代猴肾细胞最为易感,并可产生嗜酸性胞浆内包涵体^[6]。本研究从病原不明的细胞分离培养物中检测到 PIV5,然而根据测得序列设计 PIV5 的特异性引物对原始病料样品进行检测,却显示 PIV5 阴性。究其原因,有两种可能:(1)原始病料中只含有微量的 PIV5,常规的 PCR 方法检测不到;(2)实验室分离病毒使用的 PK-15 细胞系在连续传代的过程中被 PIV5 污染。关于 PIV5 持续感染实验室培养的细胞系的情况也早已有报道^[10-11,13]。分析污染的来源,可能有以下几个途径:细胞本身带毒;培养细胞用的牛血清带毒;细胞培养操作人员自身带毒。基于这种情况,我们对实验室保存的 PK-15、ST、HEK293、BHK-21 和 Vero 细胞系进行了检测,发现只有分离病毒使用的连续传代的 PK-15 细胞污染了 PIV5。此现象提示我们定期检测实验室常用细胞系的必要性。此外,由于该病毒会对许多动物和细胞系产生隐性感染^[12],在实验动物和生物制品的质量控制中应加强对该病毒的监测。在对样品核酸序列进行 BLAST 比对时,我们总能发现一些与猪染色体基因、线粒体 DNA 以及细菌相关基因高度同源的序列,这种结果表明,过滤和核酸酶消化未能完全消除样品中的背景核酸,这些背景核酸的存在会影响病毒核酸的检出率,因此有必要进一步优化样品处理的条件。

由于受传统测序方法的限制,只对样品少部分克隆进行测序有可能导致两方面问题:一是测得的病毒核酸序列信息不完整,仅能覆盖病毒基因组的一小部分;二是如果不能对样品中的病毒宏基因组进行测序,我们极有可能丢失重要的病毒信息,从而对样品中病毒感染情况掌握不详。为了避免这种情况,在检测未知病原感染的临床样品时我们选择使用新一代高通量测序方法,这种测序方法不需要进行亚克隆,能够尽可能详细地了解样品中的核酸信息,对于新发感染性疾病和混合感染的临床样品检

测具有重要意义。应用本研究中建立的方法结合新一代高通量测序技术,我们从来自 5 个省市的 7 份病原未知的病猪组织样品中检测到 1.1% 的病毒序列,包括与 CSFV、PCV2、TTSuV、PBoV 和 Ad6 高度同源的序列。病毒序列占总序列数的比例表明,在组织样品中病毒载量极低,而且此前我们应用常规 PCR 的方法未检测到这些病毒,说明本研究建立的基于宏基因组学的动物病毒侦测方法其敏感性高于常规 PCR 方法。

本研究建立的基于病毒宏基因组学的未知病毒检测技术不依赖于病毒分离培养和已知核酸序列,弥补了传统的分子诊断技术的不足,为未知病毒的检测提供了一种可行的思路。当新发感染性疾病袭击我国养猪业时,利用这种检测技术平台,我们能够快速、准确的做出响应,确定病原、指导疫病防控和临床治疗。此外,我们设想:利用此平台系统探测能够感染猪群的病毒群落,开展“猪群病毒组”研究,这对世界养猪业、畜牧业都将具有极其重要的意义。

参考文献

- [1] Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, Daszak P. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 2008, 451 (7181): 990-993.
- [2] Edwards RA, Rohwer F. Viral metagenomics. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3 (6): 504-510.
- [3] Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America*, 2005, 102 (36): 12891-12896.
- [4] Zhao JJ, Cheng D, Li N, Sun Y, Shi Z, Zhu QH, Tu C, Tong GZ, Qiu HJ. Evaluation of a multiplex real-time RT-PCR for quantitative and differential detection of wild-type viruses and C-strain vaccine of classical swine fever virus. *Veterinary Microbiology*, 2008, 126: 1-10.
- [5] Huang LP, Lu YH, Wei YW, Guo LJ, Wu HL, Zhang FY, Fu YJ, Liu CM. Construction and biological characterisation of recombinant porcine circovirus type 2 expressing the V5 epitope tag. *Virus Research*, 2011, 161 (2): 115-123.
- [6] Wu F, He Z, Xing R. The progress of study on simian virus 5 (SV5). *Laboratory Animal Science and Management*. 2006, 23 (2): 54-57. (in Chinese)
吴凡, 贺争鸣, 邢瑞昌. 猴副流感病毒 (SV5) 研究进

- 展. 实验动物科学与管理, 2006, 23 (2): 54-57.
- [7] Huang W, Xu S. Current situation and prospect of swine industry of China. *Livestock and Poultry Industry*. 2011, 269:4-8. (in Chinese)
- 黄微, 徐顺来. 中国养猪业现状与发展方向. 畜禽业, 2011, 269: 4-8.
- [8] Ge X, Li Y, Yang X, Zhang H, Zhou P, Zhang Y, Shi Z. Metagenomic analysis of viruses from bat fecal samples reveals many novel viruses in insectivorous bats in China. *Journal of Virology*, 2012, 86 (8) :4620-4630.
- [9] Jin H, Inoshima Y, Wu D, Morooka A, Sentsui H. Expression of porcine endogenous retrovirus in peripheral blood leukocytes from ten different breeds. *Transplant Infectious Disease*, 2000, 2 (1) : 11-14.
- [10] Wu JM, Ma YY, Lv MM, Yang YB, Guo YR, Yu XL, Tian KG, Zhang JG. Large-scale survey of porcine endogenous retrovirus in Chinese miniature pigs. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2008, 31: 367-371.
- [11] Heinen E, Herbst W, Schmeer N. Isolation of a cytopathogenic virus from a case of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) and its characterization as parainfluenza virus type 2. *Archives Virology*, 1998, 143: 2233-2239.
- [12] Chatziandreou N, Stock N, Young D, Andrejeva J, Hagmaier K, McGeoch DJ, Randall RE. Relationships and host range of human, canine, simian and porcine isolates of simian virus 5 (parainfluenza virus 5). *Journal of General Virology*, 2004, 85: 3007-3016.
- [13] Young DF, Carlos TS, Hagmaier K, Fan L, Randall RE. AGS and other tissue culture cells can unknowingly be persistently infected with PIV5; A virus that blocks interferon signalling by degrading STAT1. *Virology*, 2007, 365: 238-240.

Metagenomics-based detection of swine viruses

Wen Han, Yuzi Luo, Bibo Zhao, Yuan Sun, Su Li, Huaji Qiu*

State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China

Abstract: Extreme varieties of viruses exist in the environment and animals, some of which are unknown. However, many unknown viruses are barely detected by means of conventional virus isolation and PCR assay. **[Objective]** To develop a technology platform for detecting unknown viruses. **[Methods]** We established the technology based on viral metagenomics in combination with novel molecular diagnostics. The technology is consisted of removal of host nucleic acid, random PCR amplification, large-scale sequencing, and bioinformatics. **[Results]** The technology was applied to detect classical swine fever virus (CSFV)-infected cells and a tissue sample of a pig infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). We amplified 13.7% sequences of CSFV genome and 47.2% those of PCV2 genome, respectively. Moreover, we amplified 16.4% sequences of the simian parainfluenza virus type 5 genome from an unknown virus cell culture using the developed method. In addition, using the developed method combined with the high-throughput sequencing, we detected 1.1% virus sequences, including CSFV, PCV2, torque teno sus virus (TTSuV), porcine bocavirus (PBoV) and human adenovirus type 6 (Ad6) from 7 clinical swine samples of unknown causative agents. **[Conclusion]** The developed metagenomics-based method showed good sensitivity for detection of both DNA and RNA viruses from diverse swine samples, and has potential for universal detection of known and unknown viruses. It might facilitate the diagnosis of emerging viral diseases.

Keywords: viral metagenomics, random PCR, unknown virus, DNA virus, RNA virus

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Introduction of International Advanced Agricultural Science and Technology Program (2130106)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-451-51997170; E-mail: huajiqiu@hvri.ac.cn

Received: 6 September 2012/Revised: 11 November 2012