

RT-PCR 技术检测河南省猪瘟疫病毒的研究

臧金灿¹, 樊国燕¹, 乔宏兴¹, 丁明星^{2*} (1. 郑州牧业工程高等专科学校, 河南郑州 450011; 2. 华中农业大学动物医学院, 湖北武汉 430070)

摘要 对 25 个猪场进行流行病学调查, 对 191 只疑似猪瘟疫发病猪进行 RT-PCR 检测, 结果表明, 猪瘟疫阳性检出率平均为 77.4%。

关键词 猪瘟疫病毒; RT-PCR

中图分类号 S852.65¹ 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)24-6398-02

Investigation of Classical Swine Fever with RT-PCR Technology in Henan Province
ZANG Jin-can et al (Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering, Zhengzhou, Henan 450011)

Abstract There were a large numbers of pigs in Henan province and the prevalence of swine fever was very severe. High incidence of swine fever in some farms threatened pig industry because it resulted in a high rate of mortality, and abortions, died and mummified fetuses and resulted in abortion, dead fetus and mummily for pregnancy pig. To control the epidemic spread of the disease in the province, the clinical investigation, pathological examination and RT-PCR assay were conducted with 191 suspected pigs of swine fever from 25 farms. The results showed that the positive rate of swine fever averaged 77.4%.

Key words Swine Fever virus; RT-PCR

猪瘟疫 (Swine Fever, SF) 又称猪霍乱 (Hog cholera, HC), 是由猪瘟疫病毒引起猪的一种急性、热性高度接触性传染病。主要特征为急性经过、高热稽留、死亡率高和小血管壁变性引起广泛出血、梗塞和坏死等。自从 1833 年美国俄亥俄州首先发现猪瘟疫以来, 世界各地有关猪瘟疫的报道逐渐增多。近些年来, 虽然采取各种措施对猪瘟疫进行了一定的控制, 但其流行和发病又出现了新的特点, 危害仍然十分严重。

诊断猪瘟疫的实验室方法主要有猪瘟疫间接血凝试验, 但该方法不能区分强弱毒, 应用受到限制^[1]。因此, 建立一种快速、简便、特异灵敏的实验室方法显得尤为重要。笔者利用反转录 PCR 技术建立了临床发病猪的病料快速诊断猪瘟疫的方法^[2,3], 对来自河南省 5 个不同地区 25 个猪场的 191 头发病猪进行了检测, 以期了解河南省猪瘟疫的发生流行情况。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 待检样品。被检样品来源于河南省 5 个不同地区, 共计 25 个猪场, 191 头发病猪。无菌采取猪的扁桃腺、脾脏、肾脏、淋巴结等组织, 置于冰柜中保存备用。

1.1.2 试剂。RNA 提取试剂盒, 胶回收试剂盒, 购自华舜生物公司; T/A 克隆试剂盒, PCR 扩增试剂, 购自 Takara 公司。

1.1.3 主要仪器设备。Biometra PCR 仪, 由德国 Whatman 公司生产; TGL-16G 高速冷冻离心机, 由上海安亭科学仪器厂生产; 电热恒温水浴锅, 由北京长风仪器仪表公司生产; DYY-III-8B 稳压稳流型电泳仪, 由北京六一仪器厂生产。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的制备。取 1 ml 血清, 12 000 r/min 离心 5 min。取 1 ml RNA 提取试剂, 加入血清沉淀物, 吹打, 振荡 2 min。加入 200 μl 氯仿, 混匀, 静置 2 min, 12 000 r/min 离心 5 min。取上清液 600 μl, 加入等体积的异丙醇, 混匀, 静置 3 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液。在含 RNA 沉淀的离心管中加入 1 ml 浓度为 75% 乙醇, 振荡 30 s, 12 000 r/min 离心 1 min, 弃去上清液, 2 次清洗、离心, 95℃ 干燥 5 min。

作者简介 臧金灿 (1968-), 男, 河南淇县人, 硕士, 讲师, 从事动物生理的教学与科研工作。* 通讯作者。

收稿日期 2006-09-21

表 1 发病猪各地分布结果

地区	猪场	检测数	日龄	阳性数	阴性数	阳性率//%
豫东地区	开封	5	7	4	1	80.1
	项城	8	5	6	2	75.0
	柘城	15	9	11	4	83.3
豫西地区	商丘	8	10	6	2	75.0
	洛阳	7	5	5	2	71.4
	汝阳	5	7	4	1	80.0
	偃师	12	11	9	3	75.0
	灵宝	8	6	6	2	75.0
豫南地区	三门峡	10	10	8	2	80.0
	孟州	8	6	7	1	87.8
	西平	11	8	9	2	81.8
	汝南	7	8	6	1	85.7
	明港	7	4	6	1	85.7
	上蔡	8	3	6	2	75.0
	遂平	8	12	7	1	87.8
豫北地区	正阳	5	10	4	1	80.0
	安阳	4	14	3	1	75.0
	新乡	11	8	8	3	72.7
	修武	6	9	4	2	66.6
	林州	5	10	3	2	60.0
	巩义	8	5	7	1	87.8
	荥阳	4	7	3	1	75.0
郑州地区	密县	7	15	5	2	71.4
	中牟	9	9	7	2	77.7
	新郑	5	6	4	1	80.0
总计		191		148	43	77.4

用 DEPC 处理的双蒸水溶解^[2,3]。

1.2.2 PCR 引物的设计与合成。引物的设计。根据 Genebank 数据库猪瘟疫经典毒株基因组序列, 进行多序列比对, 从而找出高度保守区, 以这些高度保守区作为模板设计引物。

P5': 5'- ACGAGGTTAGTTCATTCTCG -3'

P3': 3'- TTCAGTGTGATTGTGGGTG -5'

引物由上海生工生物工程公司合成。

1.2.3 cDNA 合成 (RT 反应)。反应体系为 M-MLV 5× Reaction Buffer 5 μl; dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μl; p3' (20 mmol/L) 2 μl; M-MLV (200 u/μl) 1 μl; RNA 提取液 13 μl; 总体积为 25 μl。反应条件为: 37℃, 60 min。

1.2.4 PCR 扩增。PCR 反应体系: 10×Buffer 5 μl; dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μl; MgCl₂ (25 mmol/L) 4 μl; P5' (20 mmol/L) 2 μl; P3' (20 mmol/L) 2 μl; 模板 RT 反应液) 5 μl; Taq0.25 μl; DH₂O:

27.75 μl ; 总体积为 50 μl 。反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$, 延伸 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

1.2.5 电泳。将扩增的产物进行 1% 的凝胶电泳, DNA Mark 为 DL-2000, 电压 100 V, 电泳 30 min, 在凝胶成像系统下观察扩增情况。

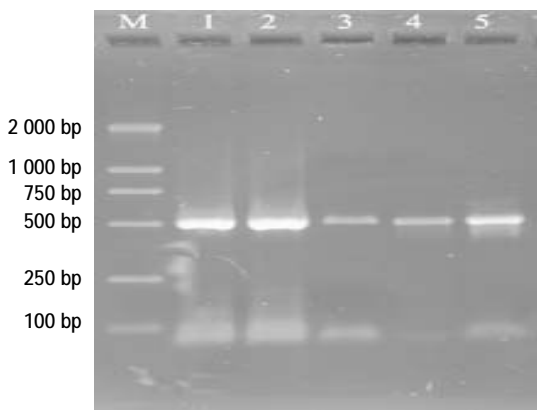
1.2.6 胶回收。切下含 DNA 的琼脂糖块放入 1.5 ml 离心管中, 按试剂盒说明进行操作。

1.2.7 T/A 克隆。在微量离心管中配制 DNA 溶液, 全量为 5 μl 。Pmd18-T Vector 1 μl , Control Insert 1 μl , DH_2O 3 μl ; 加入 5 μl (等量) 的 Ligation Mix, 16 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min; 全量 (10 μl) 加入至 100 μl JM109 感受态细胞中, 冰中放置 30 min; 42 $^{\circ}\text{C}$ 加热 45 s 后, 再在冰中放置 1 min; 加入 890 μl SOC 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 60 min。在含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 L-琼脂平板培养基上培养, 形成单菌落; 计数白色、蓝色菌落; 挑选白色菌落, 使用 PCR 法确认载体中插入片断的长度大小。

1.2.8 测序。将 PCR 产物送上海生工生物工程公司进行序列测定。然后利用 DNASTar 软件进行核苷酸序列分析。

2 结果与分析

2.1 琼脂糖凝胶电泳结果 (图 1) 由图 1 可见清晰条带, 1、2、3、4、5 泳道分别为 5 个猪场病料扩增产物, 大小与预定结果一致, 为 500 bp。



注: 上样量为 5 μl ; 1~5 泳道为扩增产物; M 泳道为 DL-2000 Marker。

图 1 琼脂糖凝胶电泳结果

2.2 测序结果及序列分析 ACGAGGTTAGTTCATTCTCGT ATACACGATTGGACAAATCAATATTATACAATGGTTCAGG GCCTCCCTCCAGCGACGGCCGAAGTGGGCTAGCCATGCC ATAGTAGGACTAGCAAAACGGAGGACTAGCCATAGTGGC GAGCTCCCTGGGTGGTCTAAGTCTGAGTACAGGACAGTC GTCAGTTGTTGACGCGAGCAGAAGCCCACCTCGAGATGC TACGTGGACGAGGCATGCCAAGACACACCTTAACCCTA

GCGGGGGTCGCTAGGGTCAAATCACGCCACGTGATGGGAG TACGACCTGATAGGGCGCCGAGAGGCCCACTATTAGGCT AGTATAAAAATCTCTGCTGTACATGGCACATGGAGTTGAA TCGCTTTGAACTTTTATACAAAACAAACAAACAAAACCA ATGGGAGTGGAGGAACCGGTGTACGATGCCACGGGGAGA CCATTGTTTGGAGACGCGAGTGAGGTACACCCACAATCAA CACTGAA

对扩增产物测序的结果以及推导的氨基酸序列进行同源性比较分析, 结果同源性均为 97.3%。序列分析证明该扩增产物确为猪瘟疫毒, 确诊为 SFV 感染。

2.3 各地发病猪分布结果 见表 1。

3 结论与讨论

(1) 利用 DNA star 软件将扩增的 SFV TK 基因进行比较发现同源性均为 97.3%, 证明为猪瘟疫毒感染。与传统的实验室诊断方法相比, 此方法快速、简便、准确, 可以在较短的时间内完成大量样品的诊断^[4-7], 在临床上可广泛应用。

(2) 通过对河南 5 个地区 25 个猪场的病料检测, 阳性率较高, 说明在河南地区猪瘟疫的发病率仍然很高, 流行情况严重。虽然各个猪场进行了猪瘟疫免疫, 但仍然出现免疫失败的情况。经调查分析, 主要原因是: 猪瘟疫免疫程序不合理; 疫苗质量太差或者在进行操作时未按规定和说明进行操作; 猪场内免疫抑制性疾病的存在; 疫苗使用量过大造成免疫麻痹; 技术人员的文化素质较低或者根本没有专业的兽医人员等^[8]。因此, 猪瘟疫发病率高的猪场, 应该适时科学的进行免疫监测, 了解猪群抗体水平, 及时进行防疫, 确保猪场安全。

(3) 要尽快淘汰带毒猪^[9-11], 因为带毒猪污染环境, 会感染其他健康猪。

参考文献

- [1] 高华峰, 宋建领. 猪瘟疫的诊断与新出现的诊断技术[J]. 动物科学与动物医学, 2003, 20 (8): 56-57.
- [2] 萨姆布卢克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 636-643.
- [3] 罗廷荣, 莫扬, 吴文德, 等. RT-PCR 技术检测猪瘟疫毒的应用研究[J]. 中国预防兽医学报, 2004, 26 (4): 307-309.
- [4] 孙世琪, 郭慧琛, 尚佑军, 等. 猪瘟疫 RT-PCR ELISA 诊断方法的建立及其初步应用[J]. 中国兽医科技, 2003, 33 (9): 3-5.
- [5] 谢志勤, 谢芝勋, 廖敏, 等. RT-PCR 检测猪瘟疫毒方法的建立与应用[J]. 畜牧与兽医, 2002, 34 (11): 11-14.
- [6] 焦莉, 崔玉东, 王春明, 等. 一步法 RT-PCR 快速检测猪瘟疫毒[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2006, 18 (1): 57-60.
- [7] 李春阳, 单松华. 应用 RT-PCR 技术快速检测鉴定猪瘟疫毒[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2003, 21 (1): 34-39.
- [8] 李连任. 当前我国猪瘟疫免疫失败的原因及对策[J]. 当代畜牧, 2005 (2): 14-16.
- [9] 褚小冬, 沈丽玲. 规模猪场猪瘟疫的净化[J]. 畜禽业, 2004 (12): 47.
- [10] 甘孟侯, 杨汉春. 中国猪病学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 149-168.
- [11] 朱庆虎. 猪瘟疫及其防治措施[J]. 农业科技与信息, 2005 (3): 31.