吉林农业大学学报 2010, 32(6): 666~ 669
Journal of Jilin Agricultural University
http://xuebao.jlau.edu.cn
E-mail: jlndxb@vip.sina.com

应用 RT- PCR 方法快速诊断猪繁殖与呼吸综合征的研究*

王 鑫[1,2], 周铁忠[1**], 李 菲[2], 段晓波[2], 王 开[2], 高慎阳[1], 胡桂学[2**]
1. 辽宁医学院畜牧兽医学院, 锦州 121001; 2. 吉林农业大学动物科技学院, 长春 130118

摘 要: 参照国内外已发表的猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)的 ORF5 基因序列设计 1 对引物, 建立检测 PRRSV 的 RT- PCR 方法, 并对长春周边不同地区 10 个猪场送检的 20 份病料进行检测。特异性试验、敏感性试验和重复性试验结果表明, 此方法可以用于临床检测 PRRSV。应用该方法从 3 个猪场的 4 份病料检出 PRRSV, 证实长春周边地区存在 PRRSV 感染。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征病毒; ORF5 基因; 反转录—聚合酶链式反应
中图分类号: S858.28; S855.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-5684(2010)06-0666-04

Rapid Diagnosis of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome with the RT- PCR

WANG Xin[1,2], ZHOU Tie-zhong[1], LI Fei[2], DUAN Xiao-bo[2], WANG Kai[2], GAO Shen-yang[1], HU Gui-xue[2]
1. *College of Animal Science and Veterinary Medicine, Liaoning Medical University, Jinzhou* 121001, *China*; 2. *College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun* 130118, *China*

Abstract: This research has designed a pair of primers based on the ORF5 gene of the PRRSV sequences published to set up a RT- PCR method in order to detect PRRSV. We have detected 20 pathologic materials via this method from 10 different pig farms around Changchun. It has been indicated that the detecting method of RT- PCR can apply to clinical detection through specificity test, sensitivity test and repeatability test. The results of this research detected 4 pathologic materials PRRSV positive from 3 farms confirming that PRRSV infection does exist around Changchun.

Key words: porcine reproductive and respiratory syndrome virus; ORF5 gene; RT- PCR

猪繁殖与呼吸综合征(Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)引起的猪 RNA 病毒病, 以母猪发热、厌食与流产、死产、木乃伊胎和产弱仔猪等繁殖障碍以及仔猪的呼吸道症状和高死亡率为特征[1]。PRRSV 为动脉炎病毒科、动脉炎病毒属成员[2]。该科成员几经变化, 曾被列入披膜病毒科, 因为该病毒粒子外观与猪瘟病毒较相似, 但后经研究其内涵(基因组结构)与目前分类的黄病毒科中的瘟病毒属不同, 所以国际病毒分类委员会(ICTV)第 9 届会议的六次报告中将此类病毒特成立一个独立属, 称之为动脉炎病毒属, 并且在第

* 基金项目: 辽宁省财政厅农业技术推广项目(2008363), 辽宁省教育厅科学技术基金项目(L2010265), 吉林省科技发展计划项目(20090242)
作者简介: 王鑫, 男, 硕士, 主要从事动物病毒学研究。
收稿日期: 2009-12-02 修回日期: 2010-04-06
** 通讯作者

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

10 届国际病毒学会议上正式将该属提升为动脉炎病毒科[2]。

猪繁殖与呼吸综合征病毒存在 2 个基因型, 即以 Lelystad virus(LV) 为原型毒株的欧洲型(1 型) 和以 VR2332(VR) 为原型毒株的北美洲型(2 型)[3]。病毒基因组为大小约 15 kb 的单股正链 RNA, 至少包含 8 个彼此重叠的开放阅读框(ORF)。其中 ORF5 编码 PRRSV 最重要的蛋白 GP5, 它通过二硫键与 M 蛋白形成二聚体, 含有一个与中和病毒有关的重要区域[4]。研究证明[5], GP5 蛋白是变异性较高的糖蛋白, 含有 2~ 4 个糖基化位点, 其中有 2 个 N 糖基化位点是在美洲株和欧洲株中最保守区作为前导序列, 可能起膜锚定作用[6]。GP5 的生物学功能非常重要, 主要在病毒感染、细胞的结合及病毒吸附中起作用。

目前, 用于诊断 PRRSV 的方法很多, 郝晓芳等根据 NSP2 基因设计引物[7], 采用 RT- PCR 方法进行扩增, 诊断该病。但根据 ORF5 基因设计引物的报道很少。本试验在 ORF5 基因 2 端的保守区设计 1 对特异性引物, 建立了猪繁殖与呼吸综合征的 RT- PCR 诊断方法, 旨在为开展大规模流行病学调查提供技术检测方法, 同时为建立核酸疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料 在吉林省长春市净月开发区、朝阳区骆山、九台市、榆树市及公主岭市等地区养殖场采集病猪肺、脾、淋巴结、扁桃体等组织材料, 置- 20℃保存备用。

1.1.2 毒株 PRRSV 美洲型毒株、猪瘟病毒(CSFV)、伪狂犬病毒(PRV)、猪圆环病毒 2(PCV-2) 均由吉林农业大学预防兽医学实验室保存。

1.1.3 工具酶 反转录酶 AMV、RNA 酶抑制剂、*ExTaq* DNA 聚合酶、dNTPs、DL2000 DNA Marker 等均购自宝生物工程(大连) 有限公司。

1.1.4 主要试剂 Trizol 购自 TaKaRa 宝生物工程(大连) 有限公司, 氯仿、异丙醇、0.1% DEPC 处理的 75% 乙醇、琼脂糖为 Spanish 公司产品, 其他化学试剂均为国产分析纯。

1.1.5 主要仪器 DL- CJ- 2F 医用型洁净工作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司)、3- 18K 高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司)、超低温冰箱(日本三洋公司)、UNICAM UV300 型分光光度计、TC- 48/T PCR 仪、DY 300 型低压电泳仪、UVPGDS- 8000 凝胶成像系统等。

1.2 方法

1.2.1 病料的处理 将病料组织剪碎并用灭菌的研钵磨碎, 用灭菌 PBS 液 1∶4 倍稀释。取病毒悬液- 20℃反复冻融 3 次, 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液- 70℃保存备用。

1.2.2 组织中总 RNA 的提取 ①取 250 μL 病料处理的上清液, 加入 750 μL 的 Trizol, 剧烈振荡 15 s, 静止 5 min。

②加入 200 μL 氯仿, 用力摇匀, 静止 5 min, 4℃、12 000 r/min 离心 15 min。

③将上清液转移至另一离心管中, 加入等体积异丙醇, 静置 10 min, 4℃、12 000 r/min 离心 18 min。

④弃上清, 加入 1 mL 75% 乙醇洗涤沉淀, 4℃、12 000 r/min 离心 10 min。

⑤弃上清, 超净台风干 RNA 沉淀 5~ 10 min。

⑥用 10 μL 0.1% DEPC 水溶解沉淀 RNA, 5 μL/管分装,- 70℃冻存用作反转录模板。

以上物品均用 0.1% DEPC 水处理。

1.2.3 引物设计与合成 参考 VR-2332(AY-150564)、CH-1a(AY032626)、JXA1 (EF112445) 及 HUN4(EF635006) 等毒株的 ORF5 基因序列, 设计 1 对引物。P1: 5′-TCTTTTTGGCATACTGTTGGCA, P2: 5′-GCCGTGCTATCAAGACAGAAGT。在美洲株 VR2332 的位置分别为 13 750~ 13 772, 14 394~ 14 416跨越整个 ORF5 区域, 扩增片段长 666 bp。引物送长春联星生物制品公司合成。

1.2.4 反转录(RT) 合成 cDNA 取抽提的总 RNA 样品进行反转录, 30 μL 反转录体系, 其中含 2 μL(25 nmol/L) Oligo (dT), 6 μL 5 倍 RT 缓冲液, 12 μL(10 mmol/L) dNTP, 1 μL(50 U/L) AMV 酶, 5 μL RNA 模版, 1.5 μL RNA 酶抑制剂, 0.1% DEPC 水 2.5 μL。室温作用 10 min, 42℃水浴 1 h, 冰浴 2 min, 产物置- 20℃备用。

1.2.5 PRRSV RT- PCR 检测 PCR 反应体系为 10 倍 Ex *Taq* 缓冲液 2.5 μL、dNTPs (2.5 mmol/L) 2.0 μL、P1(25 pm/L) 1.0 μL、P2(25 pm/L) 1.0 μL、Ex *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μL、cDNA 3.0 μL、ddH_2O 15.0 μL, 总体积为 25.0 μL。

加完样品后, 做瞬时离心混匀, 置于 PCR 仪

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

上扩增。反应参数为 95 ℃预变性 5 min; 94 ℃变性 1 min, 57 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 30 s, 35 个循环后 72 ℃延伸 10 min。反应结束后, 取 5 μL 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.6 RT- PCR 的特异性、敏感性、重复性试验

①特异性试验: 分别取 250 μL 的 PRRSV、PRV、PCV- 2、CSFV 病毒细胞培养物进行总 RNA 的提取, 用本文“1.2.5”方法对其进行 PCR 扩增, 1% 琼脂糖电泳检测, 验证该试验方法的特异性。

②敏感性试验: 将提取的 PRRS 病毒的 RNA 经分光光度计测其含量, 然后用 0.1% DEPC 灭菌水进行 10 倍梯度稀释, 使用本文“1.2.5”中 PCR 扩增体系和反应条件进行 RT- PCR 扩增, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

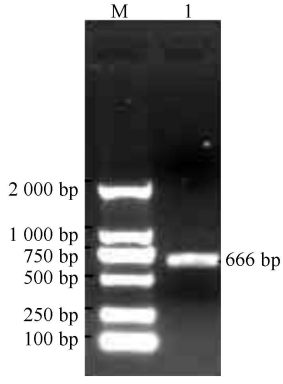
③重复性试验: 使用同样的 PCR 反应条件进行 5 次重复 RT- PCR, 验证试验的重复性。

1.2.7 临床样品检测 取处理的临床病料上清液, 反转录后, 分别按照本文“1.2.2, 1.2.4, 1.2.5”方法进行细胞总 RNA 的提取、反转录和 PCR 扩增, 电泳检测, 观察结果。

2 结 果

2.1 RT- PCR 扩增结果

利用合成的特异性引物, 采用 RT- PCR 方法, 从 PRRSV ORF5 基因中扩增出目的片段, 大小为 666 bp, 与预期目的片段相符, 结果见图 1。



M. DL2000 Marker; 1. 目的片段 Purpose fragment

图 1 RT- PCR 扩增结果

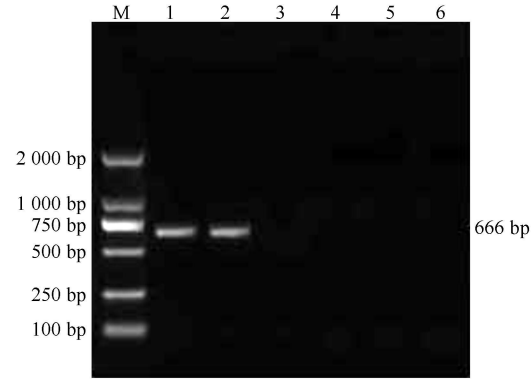
Fig. 1. Result of amplification by RT- PCR

2.2 RT- PCR 特异性试验结果

利用合成的特异性引物对 PRV、PCV-2、CSFV、PRRSV 进行 RT- PCR 扩增, 仅 PRRSV 能扩增出 666 bp 的特异性片段, 其它 3 种病毒均未扩增出片段。表明建立的 RT- PCR 反应体系具有特异性, 结果见图 2。

2.3 RT- PCR 敏感性试验结果

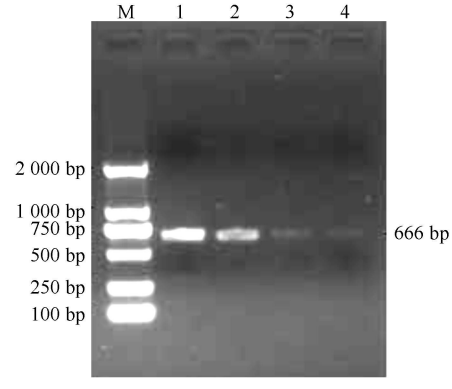
经分光光度计检测, PRRSV 株 RNA 含量为 3.8×10^{-3} μg/mL。用 0.1% DEPC 灭菌水进行 10 倍梯度稀释, 使其浓度分别为 3.8×10^{-4}, 3.8×10^{-5}, 3.8×10^{-6}, 3.8×10^{-7} μg/mL。RT- PCR 可以检测到最小浓度为 3.8×10^{-7} μg/mL 的病毒 RNA, 结果见图 3。



M. DL2000 Marker; 1. PRRSV 阳性对照 Positive control; 2. PRRSV; 3. CSFV; 4. PRV; 5. PCV- 2; 6. 阴性对照 Negative control

图 2 RT- PCR 特异性试验结果

Fig. 2. Result of specificity test by RT- PCR



M. DL2000 Marker; 1~4 病毒 RNA 浓度分别为 3.8×10^{-4}, 3.8×10^{-5}, 3.8×10^{-6}, 3.8×10^{-7} μg/mL the different dilutions of PRRSV's RNA 3.8×10^{-4}, 3.8×10^{-5}, 3.8×10^{-6}, 3.8×10^{-7} μg/mL

图 3 RT- PCR 敏感性试验结果

Fig. 3. Result of sensitivity test by RT- PCR

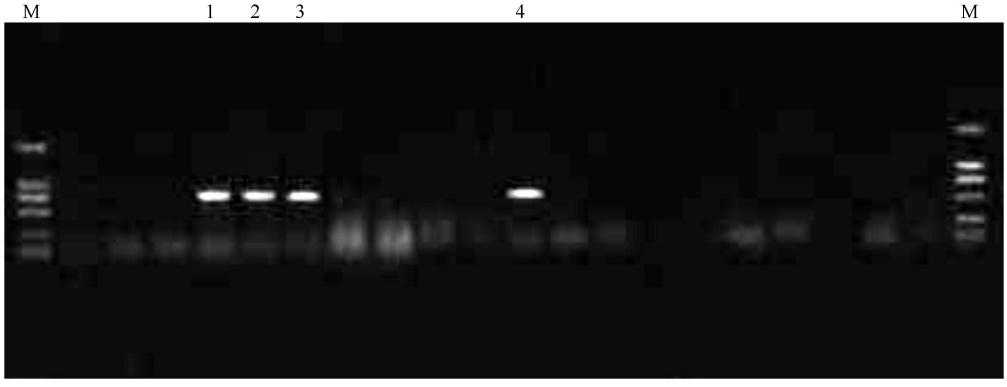
2.4 重复性试验结果

利用已经优化好的 PCR 反应条件, 进行 5 次重复性试验, 验证条件的稳定性, 结果 5 次均能扩增出目的片段。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.5　病料检测结果

对长春不同地区 10 个养猪场送检的 20 份病猪材料进行 RT- PCR 扩增, 结果在朝阳骆山、九台、榆树地区 3 个猪场 4 份病料中扩增出666 bp长的特异性片段, 与 PRRSV 美洲株阳性对照扩增的片段大小一致, 结果见图 4。



M. DL2000 Marker; 1~ 4. 阳性结果 The positive result by RT- PCR

图 4　RT- PCR 检测结果

Fig. 4. Result of detection by RT- PCR

3　讨　论

用于诊断 PRRS 的方法有很多种, 如抗体检测的免疫过氧化物单层试验(IPMA)、间接免疫荧光试验(IFA)、血清中和试验(SVN)、酶联免疫吸附试验(ELISA) 等。这些方法一般都比较繁琐, 而且准确度不高。而 RT- PCR 具有高敏感度、高特异性、快速简便等优点, 已广泛应用于 RNA 病毒病的诊断, 在 PRRS 的诊断上也取得了很大进展[8-9]。本试验根据 PRRSV 的 ORF5(GP5) 基因保守序列设计 1 对引物, 从阳性对照和临床病料中扩增出目的片段, 而猪瘟病毒、伪狂犬病毒、圆环病毒都未扩增出片段, 证明设计的引物具有特异性。通过敏感性和重复性试验, 表明该方法具有高敏感性、高稳定性, 可以用于临床诊断。

本试验通过对长春周边送检的病猪病料的检测, 在朝阳骆山、九台、榆树的 3 个猪场中检出 PRRSV 阳性, 证实了在长春周边地区存在 PRRS 病毒, 由于检测样品的分布和数量还不充分, PRRS 在长春的流行状况无法统计。但从 PRRS 病毒的流行特点看, 其已经对长春养猪业带来较大的威胁。特别是自 2006 年全国各大省市都爆发无名高热后, PRRS 病毒的防治更应引起有关部门的高度重视。

GP5 蛋白具有很好的抗原表位, 研究证明美洲和欧洲 2 种基因型都能识别该抗原表位, 提示该抗原表位可以作为诊断 PRRSV 的靶位, 同时 GP5 的免疫原性得到了 Pirzadeh 等[4]的试验证实, 即以带 PRRSV-ORF5 基因的质粒 DNA 接种猪, 发现该质粒在猪体内能诱导产生抗 GP5 的中和抗体, 并引起细胞免疫反应, 阻止病毒血症的发展。本试验为进一步研究核酸疫苗奠定了基础。

参考文献:

[1] Collins J E, Benfield D A, et al. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs[J]. Vet Diagn Investig, 1992, 4: 117-126.

[2] 谷守林, 夏长友. 脊椎动物病毒分类的新进展[J]. 预防兽医学进展, 1999, 1(3): 4-7.

[3] 娄高明, 李雪梅, 震殷. 猪繁殖与呼吸综合征诊断方法的研究进展[J]. 中国兽医杂志, 1998, 24(2): 40-43.

[4] Pirzadeh B, Dea S. Immunce response in pigs vaccinated withplasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproduetive and respiratorysyndrome virus [J]. Journal of General Virology, 1998, 79: 989-999.

[5] Murtaugh M P, Elan M R. Comparision of the structural protein coding sequence of the VR2332 and Lelystad virus strain of the PRRS virus[J]. Archives of Virology, 1995, 140: 1451-1460.

[6] 童光志, 周艳君, 郝晓芳. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒的分离鉴定及其分子流行病学分析[J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(5): 323-326.

[7] 郝晓芳, 周艳君, 田志军. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒 RT-PCR 鉴别诊断方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(9): 704-709.

[8] 蒋小红, 黄伟坚, 连慧香. 应用 RT-PCR 技术快速诊断广西猪繁殖与呼吸综合征病毒研究[J]. 广西畜牧兽医, 2003, 19(2): 53-55.

[9] 孙艳永, 刘智俊, 王泽, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒Ⅱ型圆环病毒混合感染的诊断[J]. 吉林农业大学学报, 2009, 31(6): 755-758.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net