

CSFV 和 PRRSV 二联 RT-PCR 检测方法的建立^{*}

王 开, 裴志花, 李 菲

吉林农业大学动物科学技术学院, 长春 130118

摘 要: 参照 GenBank 中猪瘟病毒(CSFV)和猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒(PRRSV)基因保守序列,设计2对特异引物,通过对最佳反应条件的优化,建立了 CSFV 和 PRRSV 的二联 RT-PCR 检测方法,该方法可同时扩增得到2条与试验设计相符的443 bp(CSFV)和246 bp(PRRSV)特异性条带。应用该二联 RT-PCR 方法检测猪细小病毒(PPV)、猪伪狂犬病毒(PRV)、牛病毒性腹泻病毒(BVDV)结果均为阴性,证明该方法有良好的特异性。将已知阳性病毒 PCR 模板最高稀释倍数作为 PCR 的敏感度,结果表明该二联 RT-PCR 体系扩增的敏感度为 10^{-3} ,可对 CSFV 和 PRRSV 单个或混合感染的临床样品进行快速鉴别诊断。

关键词: 猪瘟病毒; 猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒; 二联 RT-PCR

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 1009-5684(2011)01-0064-05

Establishment of Double RT-PCR for Detection of Classical Swine Fever and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus

WANG Kai, PEI Zhi-hua, LI Fei

College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: According to the gene sequences in GenBank of swine fever virus (CSFV) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), two pairs of specific primers were designed for amplifying the two specific fragments of CSFV and PRRSV. After optimization of annealing temperature and primers concentrations, a double RT-PCR was established for simultaneous detection of the two viruses, and two specific bands of CSFV 443 bp and PRRSV 246 bp were detected. Porcine parvovirus (PPV), porcine pseudorabies virus (PRV) and bovine viral diarrhea virus (BVDV) were detected by the double RT-PCR, and the results were all negative, showing that this method has good specificity. The maximum dilution of template of known viruses for positive PCR was defined as the sensitivity of PCR, and the results showed that the sensitivity of double RT-PCR was 10^{-3} . Positive samples were detected through double PCR, and the results showed that the method could be used to effectively detect and differentiate CSFV and PRRSV single or co-infection infected in clinical samples.

Key words: CSFV; PRRSV; double RT-PCR

猪瘟(CSF)和猪繁殖与呼吸障碍综合征(PRRS, 又称蓝耳病)对养猪业的危害很大,两者往往混合发生。猪瘟病毒(CSFV)为黄病毒科、瘟病毒属成员,是有囊膜的单股正链RNA病毒,基

因组大小约12.3 kb,仅含有一个大的开放阅读框,编码3898个氨基酸残基,其中包括衣壳蛋白C和高度糖基化的囊膜糖蛋白E2(gp51~55)、E1(gp44~48)和E3(gp33)4种结构蛋白,以及3~5

* 基金项目: 吉林农业大学科研启动基金项目(2009020)

作者简介: 王开,男,硕士,讲师,研究方向: 动物疫病诊断与防治新技术。

收稿日期: 2010-03-23 修回日期: 2010-06-13

种非结构蛋白(包括 5' 末端未表达的 P23 和 P125 等),其中 E2 是 3 种囊膜糖蛋白中最重要的保护性抗原,是产生 CSFV 的主要结构蛋白^[1],E2 在 CSFV 检测和新型疫苗的研究上发挥着重要的作用。猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒(PRRSV)为动脉炎病毒科、动脉炎病毒属成员,是不分节段的单股正链 RNA 病毒,含有 9 个开放的阅读框(ORFs),ORF1 包括 ORF1a 和 ORF1b,为病毒的非结构蛋白编码区,ORF1a 所编码的寡聚蛋白经加工后,成为 6 种非结构蛋白 Nsp1 α 、Nsp1 β 、Nsp2~5。ORF2~7 阅读框编码病毒的结构蛋白,其中糖基化囊膜蛋白 GP5 由 ORF5 编码,又称 E 蛋白,分子量约为 22.4 kD,有 4 个糖基化位点。GP5 含有 1 段 31 个氨基酸的信号肽及 3 个跨膜功能区,该蛋白内部有 1 段很大的内部疏水区,位于 N 末端第 28~201 位碱基处,可能起锚定作用,这个区域相当保守^[2]。

关于检测这 2 种病的报道很多,如单松华等^[3-5]用 RT-PCR 检测方法检测猪瘟病毒,王娟萍等^[6-8]用 RT-PCR 检测方法诊断猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒,均取得了较好的效果。本试验参考 GenBank 中发表的 CSFV 和 PRRSV 序列,设计引物,建立了检测 CSFV 和 PRRSV 的二联 RT-PCR 诊断方法,为检测临床疑似病例提供新的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒与细胞 猪瘟兔化弱毒疫苗株(HCLV)、猪繁殖与呼吸障碍综合征弱毒细胞毒(PRRSV)、猪细小病毒(PPV)、猪伪狂犬病毒(PRV)、牛病毒性腹泻病毒(BVDV)、Marc145 细胞均由吉林农业大学预防兽医学实验室保存。

1.1.2 主要试剂 琼脂糖、Taq 酶、dNTP、RNA 酶抑制剂等购自大连宝生物有限公司,反转录试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司,pMD18-T 载体构自上海今迈生物科技有限公司,0.1% DEPC、Trizol、氯仿、异丙醇、75% 乙醇(DEPC 处理)为 Spanish 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 根据已报道的猪瘟病原全基因序列(AF091507)和蓝耳病病毒全基因序列(AF066183),猪瘟病毒选择 E2 基因保守序列,

蓝耳病病毒选择开放阅读框 ORF5 编码序列,利用引物设计软件 Prime5.0 设计 2 对引物。CSFV P1: 5'-CGGCAATCTTGGGACGGAGGT-3', CSFV P2: 5'-CTACCCTTCCACTTGATGCCT-3', 扩增长度为 443 bp; PRRSV P1: 5'-GTCFFCAAACCTAAACTCCAA-3', PRRSV P2: 5'-GGGTAAGATCATCGCCCAACA-3', 扩增长度为 246 bp。引物由大连宝生物有限公司合成。

1.2.2 RT-PCR 方法 采用 Trizol 法提取病毒 RNA,-70℃ 冻存用作反转录模板。cDNA 合成,按照反转录试剂盒说明书进行操作。PCR 扩增,采用 25 μ L 反应体系:2 倍 Trans Taq HiFiPCR SuperMix II 12.5 μ L,cDNA 2 μ L,上下游引物各 1 μ L,双蒸去离子水 8.5 μ L。PCR 反应条件:94℃ 预变性 3 min;94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 1 min,35 个循环;72℃ 延伸 8 min。取 5 μ L PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测并拍照。

1.2.3 最佳反应条件的确立 ①引物浓度的优化。上、下游引物剂量范围设在 0.2~2.6 μ L,以每 0.4 μ L 递增,其他成分按本文“1.2.2”添加,产物以 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

②退火温度的优化。参照试剂盒推荐的 PCR 反应体系筛选退火温度。设置温度为 40~60℃,产物以 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 特异性试验 分别以 CSFV、PRRSV 以及二者的混合毒 RNA 为模板进行二联 RT-PCR,以猪细小病毒(PPV)、猪伪狂犬病毒(PRV)、牛病毒性腹泻病毒(BVDV)进行对比试验,双蒸水作为阴性对照。

1.2.5 敏感性试验 将提取的 CSFV、PRRSV RNA 经分光光度计测其含量,然后将已知的阳性病毒模板进行 10 倍系列稀释,按照本文“1.2.3”确定的最佳 PCR 反应条件进行检测,以其模板最高稀释倍数呈阳性为 PCR 反应的敏感度。

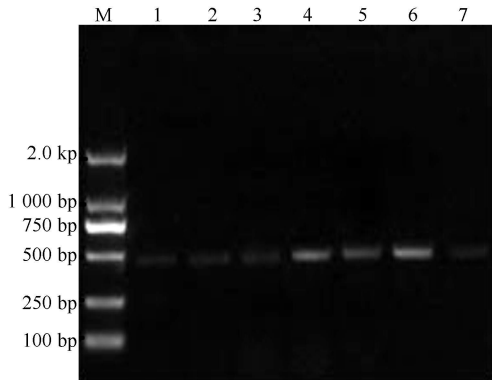
1.2.6 重复性试验 用建立的多重 PCR 方法,对 CSFV 和 PRRSV 进行多次重复检测,以验证检测结果的可靠性。

1.2.7 临床样品的检测 采集临床疑似 CSFV、PRRSV 病料,将病料组织剪碎放于灭菌的研钵中磨碎,用无菌 PBS 液 4 倍稀释,取病毒悬液-20℃ 反复冻融 3 次,8 000 r/min 离心 10 min,取上清液于-70℃ 保存备用。

2 结果

2.1 二联 RT-PCR 最佳反应条件的确定

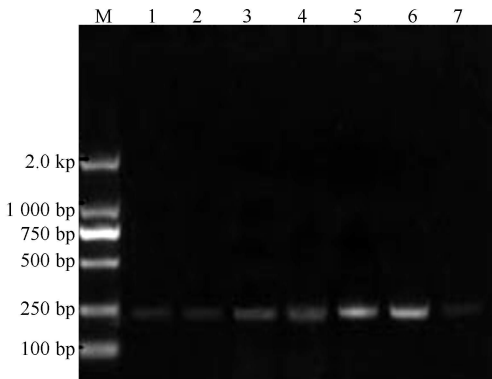
2.1.1 最佳引物浓度的确定 由图 1、图 2 可见,在 25 μL 反应体系中,CSFV 引物以 1.4 μL 最佳,PRRSV 引物以 1.8 μL 最佳。



M. DL2000 Marker; 1~ 7. 上下游引物的梯度用量,依次为 0, 0.2, 0.6, 1.0, 1.4, 1.8, 2.2, 2.6 μL. Concentration of primers respectively: 0, 0.2, 0.6, 1.0, 1.4, 1.8, 2.2, 2.6 μL.

图 1 PCR 引物浓度优化结果(CSFV)

Fig. 1. Result of primers' concentration screened for PCR(CSFV)



M. DL2000 Marker; 1~ 7. 上下游引物的梯度用量,依次为 0, 0.2, 0.6, 1.0, 1.4, 1.8, 2.2, 2.6 μL. Concentration of primers respectively: 0, 0.2, 0.6, 1.0, 1.4, 1.8, 2.2, 2.6 μL.

图 2 PCR 引物浓度优化结果(PRRSV)

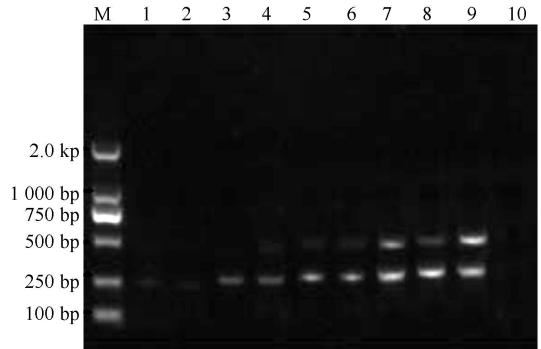
Fig. 2. Result of primers' concentration screened for PCR(PRRSV)

2.1.2 最佳退火温度的确定 由图 3 可见,二联 RT-PCR 退火温度为 55~ 58 °C 皆可,以 57.2 °C 为最佳。

2.1.3 PCR 最终反应体系 2 倍 Trans Taq Hi FiPCR SuperMix II 12.5 μL, cDNA 2 μL, CSFV 上游 Primer 1.4 μL(PRRSV 上游 Primer 1.8 μL), CSFV 下游 Primer 1.4 μL(PRRSV 下游 Primer 1.8 μL), 用双

蒸去离子水补充至 25 μL。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 8 min。

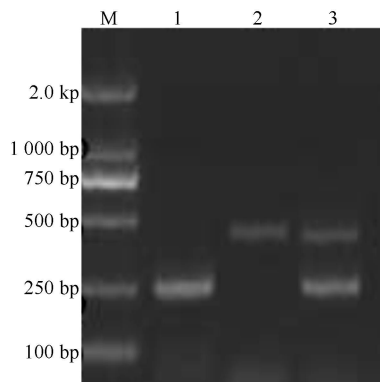
在最佳反应条件下成功扩增出大小分别为 443 bp(CSFV) 和 246 bp(PRRSV) 的目的条带(图 4), 基因片段回收后, 送大连宝生物工程有限公司测序, 结果表明扩增片段分别为 CSFV 和 PRRSV 的特异性条带, 与预期结果相符。



M. DL2000 Marker; 1~ 10. 退火温度依次为 40.4, 41.6, 43.3, 45.5, 48.0, 50.6, 53.1, 55.3, 57.2, 58.5 °C. Annealing temperature respectively: 40.4, 41.6, 43.3, 45.5, 48.0, 50.6, 53.1, 55.3, 57.2, 58.5 °C.

图 3 PCR 退火温度优化结果

Fig. 3. Result for PCR at different annealing temperature



M. DL2000 Marker; 1. PRRSV; 2. CSFV; 3. CSFV 和 PRRSV 混合 CSFV and PRRSV mixed

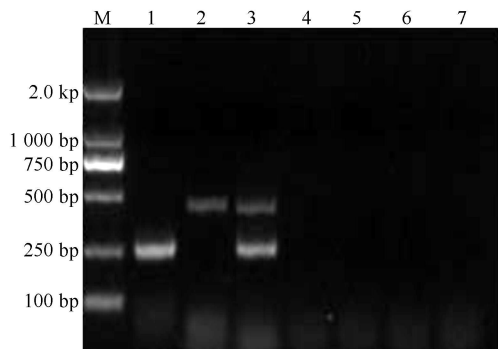
图 4 检测 CSFV 和 PRRSV 的二联 RT-PCR 产物电泳

Fig. 4. Double RT-PCR results amplified of CSFV and PRRSV

2.2 特异性试验

分别以 CSFV、PRRSV 以及二者的混合总毒 RNA 为模板进行复合 RT-PCR, 并以 PPV、PRV、BVDV 进行对比, 双蒸水作为阴性对照。结果扩增到与预期大小相符的 443 bp CSFV 和 246 bp

PRRSV 的特异性目的片段, 而 PPV、PRV、BVDV 及双蒸水检测为阴性, 无交叉反应(图 5)。

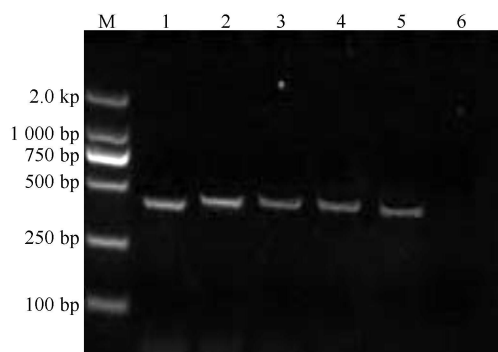


M. DL2000 Marker; 1. PRRSV; 2. CSFV; 3. CSFV 和 PRRSV 混合 CSFV and PRRSV mixed; 4. PPV; 5. PRV; 6. BVDV; 7. 双蒸水 Double distilled water

图 5 CSFV 和 PRRSV 的二联 RT-PCR 敏感性试验
Fig. 5. Specificity test of the double RT-PCR of CSFV and PRRSV

2.3 敏感性试验

经分光光度计检测, CSFV 和 PRRSV 的 RNA 含量分别为 $3.96 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$ 和 $2.98 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$, 图 6、图 7 结果表明, 将已知的 CSFV 和 PRRSV 稀释至 10^{-3} 仍然能扩增出目的片段, 说明该多重 PCR 扩增的敏感度为 10^{-3} 。



M. DL2000 Marker; 1~6. 病毒核酸浓度依次为 3.96×10^2 , 39.6, 3.96, 3.96×10^{-1} , 3.96×10^{-2} , $3.96 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$ Viral nucleic acid concentration respectively: 3.96×10^2 , 39.6, 3.96, 3.96×10^{-1} , 3.96×10^{-2} , $3.96 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$

图 6 CSFV RT-PCR 检测灵敏度试验

Fig. 6. Sensitivity of RT-PCR test of CSFV

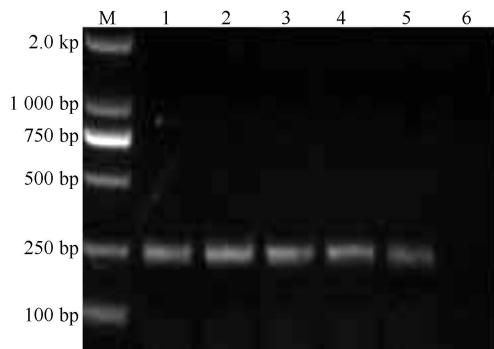
2.4 重复性试验

应用建立的二联 PCR 方法, 在不同时间重复 3 次检测 CSFV 和 PRRSV, 检测结果均一致, 证明建立的方法是稳定可靠的。

2.5 临床样品的检测结果

共采集 35 份临床疑似病料, 采用已建立的二

联 PCR 方法检测出猪瘟 3 例 (8.6%), 蓝耳病 7 例 (20%), 其中混合感染 2 例 (5.6%)。



M. DL2000 Marker; 1~6. 病毒核酸浓度依次为 2.98×10^2 , 29.8, 2.98, 2.98×10^{-1} , 2.98×10^{-2} , $2.98 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$ Viral nucleic acid concentration respectively: 2.98×10^2 , 29.8, 2.98, 2.98×10^{-1} , 2.98×10^{-2} , $2.98 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$

图 7 PRRSV RT-PCR 检测灵敏度试验

Fig. 7. Sensitivity of RT-PCR test of PRRSV

3 讨论

自从 1988 年 Chamberlain^[9] 首先报道用多重 PCR 诊断 DMD (Duchenne 型肌营养不良症) 以来, 多重 RT-PCR 的诊断方法不断被应用。常规的病毒分离诊断方法虽然准确, 但费时费力, 并且需要专门的技术人员操作, 而多重 PCR 诊断方法是在普通 PCR 的基础上加以改进, 在一个 PCR 体系中加入多对特异性引物, 针对多个 DNA 模板或同一模板的不同区域扩增多个目的片段的 PCR 诊断技术。多重 PCR 不仅保持了普通 PCR 特异性强、灵敏度高的优点, 而且能在同一 PCR 反应管中同时扩增多个目的片段, 因此具有节约时间、人力和物力的优点, 能够对疾病做到快速、准确的诊断, 适合大量样品 (特别是混合感染样品) 中病原体的检测。本研究建立的二联 PCR 方法, 比单一 PCR 减少 1/2 的时间和试剂; 使用本方法同时对 PPV、PRV、BVDV 进行 RT-PCR 检测, 结果均为阴性, 证明本试验有较好的特异性; 将已知浓度的 CSFV 和 PRRSV 进行 10^{-3} 稀释仍然能扩增出目的片段, 说明此方法敏感性高, 微量的病毒核酸也能扩增出目的片段。重复 3 次均能扩增出目的片段, 表明该试验方法有很好的稳定性。综上, 该方法可以用于 CSF 和 PRRS 的临床检测。

一般来讲 PCR 扩增带数目多、加样量大, 在进行电泳时有滞后现象^[10], 导致多重 PCR 检测临

床样品扩增出的特异性条带与单项 PCR 扩增带有细小差异。因此本试验 PCR 扩增时采用 25 μL 反应体系,并建立了 CSFV 和 PRRSV 的二联 PCR 检测方法,防止了特异性扩增产物量过多,电泳时出现特异性条带过宽、亮度太强,而影响其他病毒的鉴定。

近年来,随着规模化养猪业的发展,猪瘟和猪繁殖与呼吸障碍综合征对养猪业的危害日益加重。本试验建立的 CSFV 和 PRRSV 二联 PCR 检测方法,能够快速准确地对 CSFV 和 PRRSV 的临床感染样品进行检测,为病原体的诊断提供了一种新方法。

参考文献:

[1] 胡仁莉. 猪瘟分离毒 E2 基因序列分析和强弱毒检测方法的探讨[D]. 扬州:扬州大学,2007.
 [2] Chueh L L, Lee K H, Wang F I, et al. Sequence analysis of the nucleocapsid protein of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus Taiwan MD-001 strain[J]. Adv Exp Med Biol, 1998,

440: 795-799.

[3] 单松华,夏懿,黄忠荣,等. 猪瘟病毒荧光 RT-PCR 快速检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2007, 37(11): 950-954.
 [4] 杨利峰,杨建民,周向梅. 猪瘟 RT-PCR ELISA 诊断方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2007, 27(3): 292-295.
 [5] 吴鑫,王军,张以芳. 猪瘟病毒一步法 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35(2): 64-66.
 [6] 王娟萍,李敬明,高英杰,等. 多重 PCR/RT-PCR 技术检测 PRRSV、PPV、PRV 和 PCV-2[J]. 中国兽医学报, 2009, 29(3): 258-262.
 [7] 赵志权,王福广,郝环颖,等. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒的 RT-PCR 鉴别诊断方法[J]. 华南农业大学学报, 2008, 29(3): 85-87.
 [8] 王鑫,周铁忠,李菲,等. 应用 RT-PCR 方法快速诊断猪繁殖与呼吸综合征的研究[J]. 吉林农业大学学报, 2010, 32(6): 666-669.
 [9] Chamberlain J S, Gibbs R A, Ranier J E, et al. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification[J]. Nucleic Acids Res, 1988, 16: 1114-11156.
 [10] 赫晓芳,周艳君,田志军,等. 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.

(上接第 63 页)

[4] 魏岳. GH 基因、IGF-I 基因多态性及其与京海黄鸡生产性能的相关性研究[D]. 扬州:扬州大学, 2009.
 [5] 杨凤萍,沈华,戴国俊,等. 四种黄羽肉鸡 IGF-I 多态性与生产性能相关分析[J]. 中国家禽, 2009, 31(13): 20-23
 [6] Beccavin C, Chevalier B, Coghurn L A, et al. Insulin-like growth factors and body growth in chickens divergently selected for high or low growth rate [J]. Journal of Endocrinology, 2001, 168(2): 297-

306.

[7] 肖翠红,籽鹅 IGF-I 基因的克隆表达及其与生长性能的关系[D]. 哈尔滨:黑龙江八一农垦大学, 2006.
 [8] 高萍,傅伟龙,朱晓彤,等. 蓝塘仔猪 IGF-1 水平与组织 IGF-1、GHR 基因的表达[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(1): 38-42.
 [9] 黄治国,谢庄. 绵羊肌肉 IGF-I 基因表达的发育性变化研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(14): 6375-6377, 6415.

欢迎投稿、订阅《吉林农业大学学报》

《吉林农业大学学报》是吉林农业大学主办的综合性农业学术期刊,国内外公开发行,面向国内外专家学者征集稿件。本刊设有遗传育种、作物栽培、植物保护、园艺科学、动物科学、水产科学、食品科学、农业生物工程、药用植物与中药学、植物资源开发利用、农业资源与环境、农业化学、农业工程、农业经济管理(实证分析)等栏目,以研究论文、研究简报、研究快报等形式集中报道以上学科所开展的基础研究、应用研究和重大开发研究所取得的最新成果。

本刊为中国科学引文数据库来源期刊、中国科技论文统计源期刊、中文核心期刊,已连续多年被英国《国际农业与生物科学研究中心文摘》(CABI)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、美国《化学文摘》(CA)、英国《动物学记录》(ZR)、联合国粮农组织国际农业科技情报系统数据库(AGRIS)、中国期刊全文数据库、《中国农业文摘》等 20 余种国内外重要检索系统列为文献信息源期刊。

本刊现为双月刊, A4 开本, 每期 120 页, 定价 20.00 元, 全年 120.00 元(邮资免付)。订阅可通过全国非邮发报刊联合发行部(地址:天津市大寺泉集北里别墅 17 号联合征订服务部, 邮编:300385), 也可直接向本刊编辑部订阅。

编辑部地址:吉林省长春市新城大街 2888 号《吉林农业大学学报》编辑部

邮编:130118 电话:0431-84532914 传真:0431-84533129

网址: <http://xuebao.jlau.edu.cn> E-mail: jlncbb@vip.sina.com