

猪繁殖障碍病毒性疫病六重 PCR 检测方法 的建立及应用

刘志杰¹, 曾智勇^{1,2*}, 汤德元^{1*}, 周 莉¹, 梁海英³, 肖超能¹

(1. 贵州大学动物科学学院, 贵阳 550025; 2. 贵州省动物疫病与兽医公共卫生重点实验室, 贵阳 550025; 3. 贵州大学教学实验场, 贵阳 550025)

摘要: 参照 GenBank 中相关的基因序列, 设计了 6 对引物分别用于扩增 PRV *gE*、PPV NS1、PCV ORF2、PRRSV ORF7、CSFV E2、JEV E 基因的部分片段。敏感性和特异性试验结果表明, 该 mPCR 对 6 种病毒的最低核酸检测量分别为 PRV 6.6 pg、PPV 96 pg、PCV 12.9 pg、PRRSV 10.5 pg、CSFV 51 pg、JEV 46 pg, 对猪流感病毒 (SIV)、大肠杆菌 (*E. coli*) 的扩增结果均为阴性。103 份临床病料检测结果表明, 上述 6 种猪病毒性疫病在贵州省猪群中普遍存在且混合感染情况严重。该六重 PCR 方法不仅实现了上述 6 种病毒的同时检测, 更实现了 DNA 病毒及 RNA 病毒的同时检测, 能够对 PRV、PPV、PCV、PRRSV、CSFV、JEV 单个或混合感染的临床病料进行快速鉴别诊断。

关键词: PRV; PPV; PCV2; PRRSV; CSFV; JEV; 多重 PCR

中图分类号: S854.43

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)09-1429-08

Establishment and Application of a Multiplex PCR Method for Single-step Simultaneous Detection of Six Viral Pathogens of Porcine Reproductive Disorder

LIU Zhi-jie¹, ZENG Zhi-yong^{1,2*}, TANG De-yuan^{1*}, ZHOU Li¹, LIANG Hai-ying³,
XIAO Chao-neng¹

(1. College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang, 550025, China; 2. Guizhou Province Key Laboratory of Animal Epidemic Disease and Veterinary Public Health, Guiyang 550025, China; 3. Teaching Experiment Farms, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: According to the gene sequences in GenBank, six pairs of specific primers were designed to amplify part fragments of the specific genes of PRV *gE*, PPV NS1, PCV ORF2, PRRSV ORF7, CSFV E2 and JEV E, respectively. The results of sensitivity and specificity tests showed that the minimum amounts of nucleic acid detection by the mPCR were as follows: PRV 6.6 pg, PPV 96 pg, PCV2 12.9 pg, PRRSV 10.5 pg, CSFV 51 pg, and JEV 46 pg respectively, and the amplification results of Swine Influenza Virus (SIV) and *Escherichia coli* (*E. coli*) were both negative. The results of 103 clinical samples from Guizhou province revealed the six viral diseases exist universally in pig farms of Guizhou province, and the mixed infection was much serious. The Six-plex PCR method could detect the infection of PRV, PPV, PCV, PRRSV, CSFV and JEV simultaneously, could detect DNA and RNA virus synchronously, and could differentiate and diagnose the clinical samples of single infection or mixed infection infected by the six viruses quickly.

Key words: PRV; PPV; PCV2; PRRSV; CSFV; JEV; multiplex PCR

收稿日期: 2011-12-26

基金项目: 贵州省农业科技攻关项目(黔科合 NY 字[2010]3042 号; 黔科合 NY 字[2011]3103 号)

作者简介: 刘志杰(1986-), 男, 安徽合肥人, 硕士, 主要从事动物传染病及病原分子生物学研究, E-mail: zhijie5566@126.com

* 通讯作者: 曾智勇(1978-), 副教授, 博士, 硕士生导师, E-mail: as.zyzeng@gzu.edu.cn; 汤德元(1964-), 教授, 博士, 硕士生导师, E-mail: tdyuan@

随着现代养猪业规模化和集约化的发展,猪群发生多病原混合感染和继发感染的情况越来越普遍^[1-2]。在猪场常发生的各类病毒性疾病中,以猪瘟病毒(CSFV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪圆环病毒(PCV2)、猪乙型脑炎病毒(JEV)、猪伪狂犬病毒(PRV)、猪细小病毒(PPV)等 6 种病原最为多见,是猪繁殖障碍性疾病的重要病原^[3];其中 PRRSV、PCV2、CSFV、PPV、PRV 还可以不同程度地损伤免疫系统^[4],降低机体对外界的抵抗能力,为继发或并发其它病原创造了条件,是混合感染多发的主要原因之一。自 Chaberlain 等^[5]1988 年首先报道用 PCR 技术诊断杜式肌营养不良症(DMD)以来,在诸多领域,尤其是核酸诊断领域,得到了广泛深入的研究及应用。多重 PCR 不仅具有特异性强、灵敏度高、检测时间短、成本低等优点^[6],而且能够同时检测多种病原,利于对疾病作出快速、准确的诊断,适合大量临床病料中病原体的快速检测。本研究拟建立一种能够同时并同步检测上述 6 种病原体单一或混合感染的 PCR 方法,以期对临床病料进行快速、准确的诊断。

1 材料与方法

1.1 病毒、细胞、质粒及菌株

PRV^[7]、PRRSV^[8]、CSFV^[9]、JEV^[10]系贵州省动物疫病研究室鉴定并传代保存;PCV2 系贵州省

动物疫病研究室分离鉴定并传代保存,GenBank 登录号分别为 JQ809462、JQ809464;PPV 系四川大学动物生物技术中心惠赠^[11];PK-15 细胞、Vero 细胞、BHK-21 细胞、Mark-145 细胞均购自上海拜力生物科技有限公司;pMD18-T Vector 购自大连宝生物公司;大肠杆菌感受态 *Top10* 由贵州省动物疫病研究室制备和保存。

1.2 主要试剂及仪器

MEM 培养基、新生牛血清(NCS)均系 Hy-Close 公司产品;分子量标准物 DL2000 购自大连宝生物公司;2×Taq PCR MasterMix Kit 购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司;E. Z. N. A. TM Gel Extraction Kit(50)胶回收试剂盒系 OMEGA 公司产品;普通质粒小提试剂盒为 TIANGEN 公司产品;氯仿、异丙醇、无水乙醇等为国产分析纯试剂。Icycler Thermal cycler 型 PCR 仪为 BIO-RAD 公司产品。

1.3 引物设计

参照 NCBI 中 PRV *gE*(NC_006151)、PPV NS1(NC_001718)、PCV2 ORF2(NC_005148)、PRRSV ORF7(NC_001961)、CSFV E2((X87939)、JEV E(M55506)等基因序列,应用 DNASTar、Oligo、Mpprimer、MFEprimer 设计^[12]多重 PCR 引物,用于扩增目的基因片段,引物序列详见表 1。

表 1 扩增目的片段的引物

Table 1 Specific primers used to amplify target genes

病毒 Viruses	目的基因 Target genes	引物序列(5'-3') Primer sequences(5'-3')	片段大小/bp Product length
PRV	<i>gE</i>	PRV1: ATGGGCATCGGCGACTACCT PRV2: CCACCGCCACAAAGAACACG	178
PPV	NS1	PPV1: GAATAGGATGCGAGGAAAG PPV2: GTGGAAATCTGAGAGTCTGT	271
PCV2	ORF2	PCV1:AAGGGCTGGGTTATGGTATG PCV2:CGCTGGAGAAGGAAAAATGG	353
PRRSV	ORF7	PRRSV1:GCCAGTTCAGCCAGTCAATCA PRRSV2:GCCCCGATTGAATAGGTGAC	433
CSFV	ORF2	CSFV1:GCTCCTGGTTGGTAACCTCGG CSFV2:TGATGCTGTCACACAGGTGAA	508
JEV	<i>E</i>	JEV1:TGTGGACTTTTCGGGAAGGG JEV2:GGTGAACGGCTCTTCCTATG	1 015

1.4 临床病料

对收集来自贵州省内的流产胎儿样品 20 份(编号:LT 1~20),哺乳仔猪样品 22 份(编号:BR 1~22),保育猪样品 33 份(编号:BY 1~33),育肥猪样品 28 份(编号:YF 1~25),取其脾、淋巴结、肝、肾、肺和脑组织适量混合研磨匀浆后,提取核酸做多重 PCR 和单个病毒 PCR 临床病料检测,另备一份匀浆样品经 0.22 μm 滤器过滤后,根据检测结果,分别接种于 PK-15 细胞、Vero 细胞、BHK-21 细胞、Mark-145 细胞,传代后备检。

1.5 样品核酸的提取

分别将接毒细胞悬液及临床匀浆样品反复冻融 3 次后,按照 RNA/DNA 提取试剂盒操作步骤,各取 200 μL 用于病毒核酸的提取,-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.6 PCR 反应

单一 DNA 病毒 PCR 反应。反应体系为 25 μL , $2\times\text{Taq PCR Mastermix}$ 12.5 μL ,上下游引物各 1 μL ,模板各 3 μL ,ddH₂O 7.5 μL 。反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 5min;95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ (PRV)、53 $^{\circ}\text{C}$ (PPV)、57 $^{\circ}\text{C}$ (PCV2) 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。取 5 μL PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳测定。

1.7 RT-PCR 反应

单一 RNA 病毒 PCR 反应。反应体系为 25 μL , $2\times 1\text{ Step Buffer}$ 12.5 μL ,PrimeScript One Step Enzyme Mix 1 μL ,上下游引物各 1 μL ,核酸模板各 2.5 μL ,RNase Free H₂O 7 μL 。反应程序:50 $^{\circ}\text{C}$ 40 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,57 $^{\circ}\text{C}$ (PRRSV)、56 $^{\circ}\text{C}$ (CSFV)、58 $^{\circ}\text{C}$ (JEV) 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。取 5 μL PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳测定。

1.8 多重 PCR 反应

1.8.1 阳性样品的多重 PCR 检测 将细胞毒混合后,提取病毒核酸,分别进行 PRV、PPV、PCV2、PRRSV、CSFV 和 JEV 的单一 PCR 反应;进行 JEV、PRRSV、JEV、CSFV、JEV、PRV、PPV、PCV2、PRRSV 的多重反应;进行 PRV、PPV、PCV2、PRRSV、CSFV、JEV 的六重 PCR 反应,每个反应进行 2 次。

1.8.2 多重 PCR 反应体系的建立 通过对阳性样品的验证,逐步确定 6 种病毒上、下游引物及模板量,以确定最佳反应体系。

1.8.3 多重 PCR 反应条件的优化 对多重

PCR 反应的退火温度(50~60 $^{\circ}\text{C}$),引物浓度(5~20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),反应循环数(30~35 个循环)进行优化,以确定最佳反应条件。

1.9 多重 PCR 敏感性试验

多重 PCR 反应及单一病毒 PCR 反应的敏感性参照文献的方法^[13-14]进行。将提取的病毒核酸用蛋白质核酸仪测定浓度后,多重 PCR 敏感性用灭菌三蒸水做 5 倍系列稀释,单一 PCR 反应敏感性用灭菌三蒸水做 10 倍系列稀释,然后取每个稀释度的病毒模板进行 PCR 反应。

1.10 特异性试验

分别以正常组织、猪流感病毒(SIV)、大肠杆菌(*E. coli*)、PRV、PPV、PCV2、PRRSV、CSFV、JEV 核酸为模板进行多重 PCR 反应,并将扩增片段克隆测序。

1.11 PCR 产物的鉴定

将上述 6 种病毒的 PCR 扩增片段经胶回收连接到 pMD18-T 载体上,经 DH5 α 转化后,送上海生物工程技术有限公司测序。

1.12 多重 PCR 对临床病料的检测

对收集来自于贵州省内的共 103 份临床病料进行 mPCR 检测,同时,利用建立的单一病毒 PCR 对这些样品进行复检。

2 结果

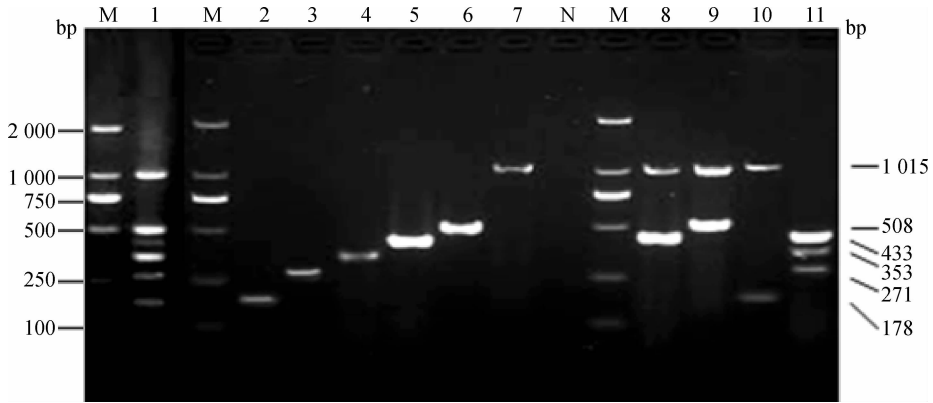
2.1 多重 PCR 反应

2.1.1 阳性样品 PCR 检测 取已知病毒液,分别进行单一和多重 PCR 检测。取单一病毒液或按一定比例的混合液 200 μL ,按照 RNA/DNA 提取试剂盒说明书进行核酸的提取,分别进行 PRV、PPV、PCV2、PRRSV、CSFV、JEV 单一 PCR 反应;进行 JEV、PRRSV、JEV、CSFV、JEV、PRV、PPV、PCV2、PRRSV 的多重反应;进行 PRV、PPV、PCV2、PRRSV、CSFV、JEV 的六重 PCR 反应。结果显示,各病毒的特异性引物均能很好地扩增出各自病毒的特异性目的条带(图 1)。

2.1.2 细胞毒 PCR 检测 PRV、PPV、PCV2、PRRSV、CSFV、JEV 的细胞毒 PCR 检测结果见图 2。

2.1.3 多重 PCR 反应体系的建立 通过对固定阳性样品模板改变引物浓度的系列试验,确定最佳引物量。结果表明(表 2、图 3)在 6 对引物中,PPV、PCV2、PRRSV、JEV 上下游引物各 1 μL (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),PRV、CSFV 上下游引物各 1.5 μL (15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$);

模板 PPV、PCV2、PRRSV、JEV 各 1 μL ，PRV、CSFV 各 2 μL ；反应体系为 50 μL 最佳(图 4)。



M. DL2000 DNA 相对分子质量标准；N. 阴性对照；1. PRV、PPV、PCV2、PRRSV、CSFV、JEV 多重 PCR 产物；2. PRV PCR 产物；3. PPV PCR 产物；4. PCV2 PCR 产物；5. PRRSV PCR 产物；6. CSFV PCR 产物；7. JEV PCR 产物；8. JEV、PRRSV 多重 PCR 产物；9. JEV、CSFV 多重 PCR 产物；10. JEV、PRV 多重 PCR 产物；11. PCV2、PRRSV、CSFV 多重 PCR 产物

M. DL2000 DNA marker; N. Negative samples; 1. mPCR products of PRV, PPV, PCV2, PRRSV, CSFV and JEV; 2. PCR products of PRV; 3. PCR products of PPV; 4. PCR products of PCV2; 5. PCR products of PRRSV; 6. PCR products of CSFV; 7. PCR products of JEV; 8. mPCR products of JEV and PRRSV; 9. mPCR products of JEV and CSFV; 10. mPCR products of JEV and PRV; 11. mPCR products of PCV2, PRRSV and CSFV

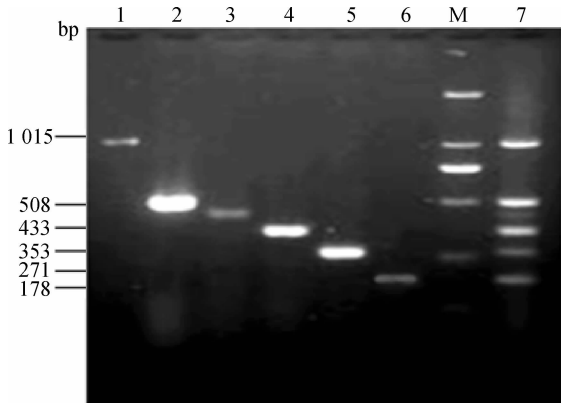
图 1 PRV、PPV、PCV2、PRRSV、CSFV、JEV 多重 PCR 方法阳性样品的检测结果

Fig. 1 Detection results of the mPCR for PRV, PPV, PCV2, PRRSV, CSFV and JEV in positive samples

表 2 6 种引物浓度量

Table 2 The amount of six kinds of primer concentration

样品/ μL	引物浓度 Primer concentration						
	1	2	3	4	5	6	7
PRV	5	10	10	15	15	15	20
PPV	5	5	5	5	15	10	15
PCV2	5	5	5	5	5	10	15
PRRSV	5	5	5	5	5	10	20
CSFV	5	5	10	10	10	15	15
JEV	5	10	10	10	10	10	20

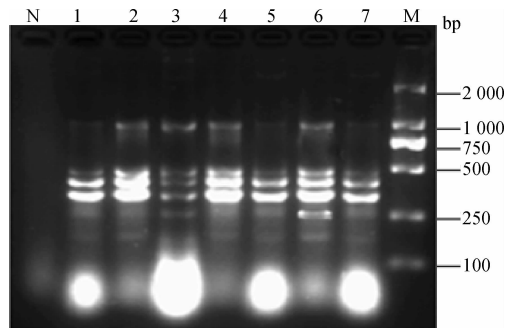


M. DL2000 DNA 相对分子质量标准；1. JEV PCR 产物；2. CSFV PCR 产物；3. PRRSV PCR 产物；4. PCV2 PCR 产物；5. PPV PCR 产物；6. PRV PCR 产物；7. PRV、PPV、PCV2、PRRSV、CSFV、JEV 多重 PCR 产物

M. DL2000 DNA marker; N. Negative samples; 1. PCR products of JEV; 2. PCR products of CSFV; 3. PCR products of PRRSV; 4. PCR products of PCV2; 5. PCR products of PPV; 6. PCR products of PRV; 7. mPCR products of PRV, PPV, PCV2, PRRSV, CSFV and JEV

图 2 PRV、PPV、PCV2、PRRSV、CSFV、JEV 的细胞毒 PCR 检测结果

Fig. 2 Detection results of the PCR for PRV, PPV, PCV2, PRRSV, CSFV and JEV propagated in cells

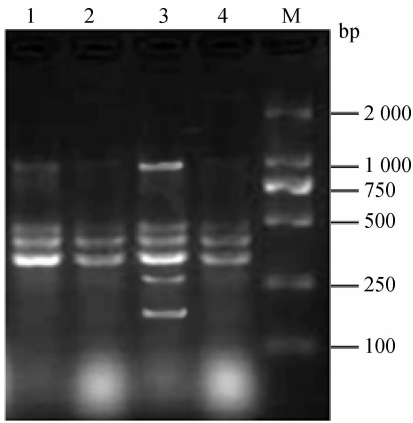


M. DL2000 DNA 相对分子质量标准；N. 阴性对照；1~7. 不同引物浓度 mPCR 检测结果

M. DL2000 DNA marker; N. Negative samples; 1-7. Detection result of the mPCR of different primer concentration

图 3 引物浓度优化

Fig. 3 The optimization of primer concentration

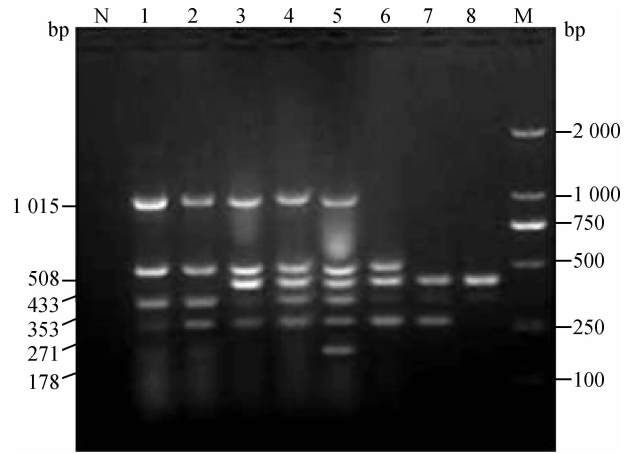


M. DL2000 DNA 相对分子质量标准;N. 阴性对照;1. 25 μL 反应体系;2. 30 μL 反应体系;3. 50 μL 反应体系;4. 100 μL 反应体系

M. DL2000 DNA marker;N. Negative samples;1. Reaction system of 25 μL ;2. Reaction system of 30 μL ;3. Reaction system of 50 μL ;4. Reaction system of 100 μL

图 4 反应体系优化

Fig. 4 The optimization of reaction system



M. DL2000 DNA 相对分子质量标准;N. 阴性对照;1. 50.0 $^{\circ}\text{C}$;2. 50.8 $^{\circ}\text{C}$;3. 52.1 $^{\circ}\text{C}$;4. 53.9 $^{\circ}\text{C}$;5. 56.4 $^{\circ}\text{C}$;6. 58.3 $^{\circ}\text{C}$;7. 59.5 $^{\circ}\text{C}$;8. 60.0 $^{\circ}\text{C}$

M. DL2000 DNA marker;N. Negative samples;1. 50.0 $^{\circ}\text{C}$;2. 50.8 $^{\circ}\text{C}$;3. 52.1 $^{\circ}\text{C}$;4. 53.9 $^{\circ}\text{C}$;5. 56.4 $^{\circ}\text{C}$;6. 58.3 $^{\circ}\text{C}$;7. 59.5 $^{\circ}\text{C}$;8. 60.0 $^{\circ}\text{C}$

图 5 多重 PCR 退火温度优化

Fig. 5 The optimization of annealing temperature of mPCR

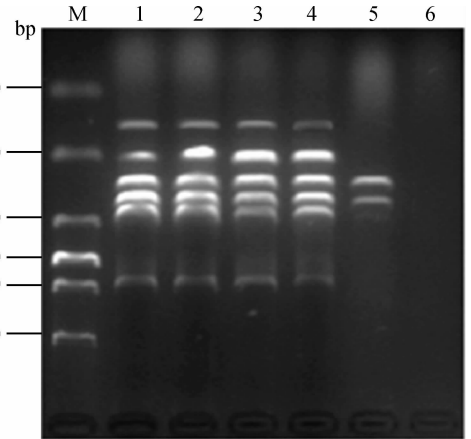
2.1.4 多重 PCR 反应条件的优化 通过固定引物及模板量,逐步优化退火温度、循环次数,最终确定多重 PCR 最佳循环次数和退火温度。试验结果显示:当反应循环次数为 35;退火温度为 56.4 $^{\circ}\text{C}$ (图 5),多重 PCR 扩增效果最佳。最佳反应程序:反应体系为 50 μL , 2×1 Step Buffer 25 μL ;Prime-Script One Step Enzyme Mix 2 μL ;上下游引物 PPV、PCV2、PRRSV、JEV 各 1 μL ,PRV、CSFV 各 1.5 μL ;模板 PPV、PCV2、PRRSV、JEV 各 1 μL ,PRV、CSFV 各 2 μL ;RNase Free H_2O 3 μL 。反应程序:50 $^{\circ}\text{C}$ 40 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,56.4 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

2.2 敏感性试验

在多重 PCR 反应中,各种病毒的最低检测量分别为 PRV 6.6 pg、PPV 96 pg、PCV 12.9 pg、PRRSV 10.5 pg、CSFV 51 pg、JEV 46 pg(图 6)。在单一病毒的 PCR 反应中,各病毒的最低检测量分别为 PRV 2.5 pg、PPV 7.3 pg、PCV2 4.8 pg、PRRSV 3.9 pg、CSFV 3.8 pg、JEV 0.4 pg(图 7)。

2.3 特异性试验

用已确定的六重 PCR 反应条件进行特异性试验,结果表明,正常组织、SIV、*E. coli* 模板均未扩增出条带,而 PRV、PPV、PCV2、PRRSV、CSFV、JEV 模板均扩增出与目的片段大小符合的特异性条带,且测序结果显示即为目的基因序列。



M. DL2000 DNA 相对分子质量标准;1. 5^{-1} 稀释;2. 5^{-2} 稀释;3. 5^{-3} 稀释;4. 5^{-4} 稀释;5. 5^{-5} 稀释;6. 5^{-6} 稀释

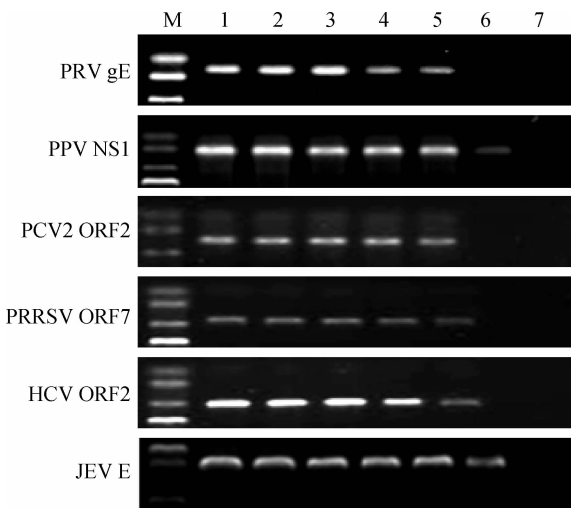
M. DL2000 DNA marker;1. 5^{-1} dilution;2. 5^{-2} dilution;3. 5^{-3} dilution;4. 5^{-4} dilution;5. 5^{-5} dilution;6. 5^{-6} dilution

图 6 PRV、PPV、PCV2、PRRSV、CSFV、JEV 多重 PCR 的敏感性试验

Fig. 6 Sensitivity test of the mPCR for PRV, PPV, PCV2, PRRSV, CSFV and JEV

2.4 PCR 产物的鉴定

PRV、PPV、PCV2、PRRSV、CSFV、JEV 阳性样品的 PCR 扩增片段经胶回收连接至 pMD18-T 载体后,送上海生工生物工程有限公司测序。结果表明,扩增片段分别为各自病毒的特异性基因片段。



M. DL2000 DNA 相对分子质量标准; 1. 10^0 稀释; 2. 10^{-1} 稀释; 3. 10^{-2} 稀释; 4. 10^{-3} 稀释; 5. 10^{-4} 稀释; 6. 10^{-5} 稀释; 7. 10^{-6} 稀释

M. DL2000 DNA marker; 1. 10^0 dilution; 2. 10^{-1} dilution; 3. 10^{-2} dilution; 4. 10^{-3} dilution; 5. 10^{-4} dilution; 6. 10^{-5} dilution; 7. 10^{-6} dilution

图 7 单一病毒模板 PCR 反应敏感性试验

Fig. 7 PCR sensitivity test for single viral nucleic acid

2.5 多重 PCR 对临床病料的检测

103 份临床病料检测结果表明, PCV2 感染

表 3 103 份猪不同阶段临床病料的感染情况

Table 3 Detection results of 103 clinical samples from different Phases by mPCR

样品 Samples	编号 Number	样品数 Counts of samples	感染类型 Infection types	混合感染率/% Co-infection rates
流产胎儿 Aborted fetuses	LT 1-20	20	PCV2+JEV(5)	13.6 (14/103)
			PCV2+PRRSV(9)	
哺乳仔猪 Suckling piglets	BR 1-22	22	PCV2(6)	11.7 (12/103)
			PCV2+PRRSV(12)	
			PRRSV(6)	
保育猪 Nursery pigs	BY 1-33	33	PCV2+PRRSV(20)	29.1 (30/103)
			PCV2+PPV(9)	
			PCV2+PRV(1)	
			PCV2(2)	
育肥猪 Fattening pigs	YF 1-28	28	PRV(1)	17.5 (18/103)
			PPV+PCV2+PRRSV+CSFV(5)	
			PCV2+PRRSV(13)	
			PCV2(6)	
			PRRSV(3)	

在多重 PCR 反应中, 引物设计至关重要, 它是决定多重 PCR 成败的关键。本研究针对 6 种猪病

阳性率为 85.4%(88/103), PCV2 和 PRRSV 为混合感染类型, 阳性率达 52.4%(54/103); 另有 5 份样品为 PPV、PCV2、PRRSV、CSFV 混合感染, 阳性率为 4.8%(5/103)(表 3)。经 6 重 PCR 检测阳性的病料, 再经单一病毒 PCR 方法进行, 两者结果符合率为 100%。

3 讨论

近年来, 猪病毒性疾病已成为危害现代养猪业发展的主要疫病, 且多呈混合感染并继发副猪嗜血杆菌等细菌感染, 给临床病原学诊断造成较大困难^[15]。目前, 国内外发生的动物病毒病或一个症候群的疫病多同时涉及 DNA 和 RNA 两类病毒^[16]。笔者针对 PRV、PPV、PCV2、PRRSV、CSFV 和 JEV 等 6 种常见 DNA/RNA 病毒的相关保守基因设计特异性引物, 通过对其条件的优化, 实现了上述 6 种病毒的同时并同步检测, 建立了猪繁殖障碍性病毒性疫病的六重 PCR 检测方法, 该方法可在一个反应体系中同时并同步检测上述 DNA 和 RNA 病毒, 能快速、准确地对临床病料进行检测, 是一种实用、快速的检测方法, 具有广阔的应用前景。

病毒保守基因序列设计引物, 以扩增 PRV gE、PPV NS1、PCV ORF2、PRRSV ORF7、CSFV ORF2、

JEV E 等部分基因片段,应用 Primer Premier 6.0、Oligo 7.4、MFEprimer 和 MPprimer 软件进行综合分析,充分考虑 PRV G+C 含量较高和 PPV G+C 含量较低的问题,Tm 值应该控制在 50~60 °C,确保在某一温度都能进行很好的 PCR 反应,尽量避免引物间非特异性扩增。笔者通过大量前期试验先确定单一 PCR 反应的最佳条件范围,为多重 PCR 反应选取了各自最佳反应条件的交集,最后获得最佳反应条件。前期工作保证了多重 PCR 常见的因引物之间交叉干扰而导致敏感性降低的缺点^[17]。敏感性试验结果表明,该多重 PCR 具有很强的敏感性,检测含量达到了 pg 级。

通过六重 PCR 方法的筛选,进而对检测出相关病原阳性的病料进行病毒分离,避免了因病料背景不清楚而盲目分离的弊端,大大提高了病毒分离的成功率^[18]。本试验参考相关研究将 PRV 接种于 Vero 细胞,PRRSV 接种于 Marc-145 细胞,PPV、PCV2、CSFV 均分别接种于 PK-15 细胞、JEV 接种于 BHK-21 细胞进行病毒分离^[18-20]。笔者在进行 PPV 和 PRRSV 接毒时,均采用同步接种方法^[20-21],结果表明 PPV、PRRSV 均能较好的增殖。

临床病料检测结果表明,规模化猪场所发生的疾病多为混合感染;其中 PCV2 在猪场中普遍存在,感染率高达 85.4%,与岳丰雄等报道 PCV2 感染阳性率 100% 稍低^[4]。尽管 PCV2 抗体阳性率较高,在猪场中亦普遍存在,但通常多为隐性感染,致使在生产中常被忽视。PCV2 感染猪淋巴器官,使 T、B 淋巴细胞数量减少,外周血和淋巴组织中的巨噬细胞单核细胞数量升高^[22],导致感染猪群免疫功能的下降或存在短暂的不能激发有效的免疫应答现象,对其它病原体的抵抗力大大降低^[23]。在对继发有副猪嗜血杆菌等细菌感染的临床病料中,通常都检测有 PCV2 的存在,这可能与 PCV2 感染后造成机体免疫抑制有关。

参考文献:

[1] CHEN H Y, WEI Z Y, ZHANG H Y, et al. Use of a multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of the North American genotype porcine reproductive and respiratory syndrome virus, swine influenza virus and Japanese encephalitis virus[J]. *Agr Sci China*, 2010, 9(7):1050-1057.

[2] OGAWA H, TAIRAA O, HIRAI T, et al. Multiplex PCR and multiplex RT-PCR for inclusive detec-

tion of major swine DNA and RNA viruses in pigs with multiple infections [J]. *J Virol Methods*, 2009, 160:210-214.

- [3] 曹洪志. 多重 PCR 诊断猪 5 种繁殖障碍性疾病的方法研究[D]. 雅安:四川农业大学,2007.
- [4] YUE F X, CUI S J, ZHANG C F, et al. A multiplex PCR for rapid and simultaneous detection of porcine circovirus type 2, porcine parvovirus, porcine pseudorabies virus, and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in clinical specimens [J]. *Virus Genes*, 2009, 38(3):392-397.
- [5] CHABERLAIN 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(23): 11141-11156.
- [6] BELLAU-PUJOL S, VABRET A, LEGRAND L, et al. Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses[J]. *J Virol Methods*, 2005, 126: 53-63.
- [7] 曾智勇,周 莉,汤德元,等. 猪伪狂犬病病毒 GZ-Z1 株的分离鉴定[J]. 中国兽医科学, 2011, 41(05): 459-463.
- [8] 刘 霞,汤德元,黄 涛,等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒贵州分离株 ORF5 基因的克隆及其表达载体的构建[J]. 黑龙江畜牧兽医,2010,(2):102-104.
- [9] 黄 涛,汤德元,嵇辛勤,等. 猪瘟病毒 E2 基因的克隆及原核和真核表达载体的构建[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2009,(10):70-72.
- [10] 徐 健,汤德元,黄 涛,等. 日本乙型脑炎病毒的分离与鉴定[J]. 畜牧与兽医,2009,41(12):10-12.
- [11] 殷华平,郭万柱,徐志文,等. 猪细小病毒(PPV)SC1 株的分离鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医,2006,(7): 63-65.
- [12] 王 稳,屈武斌,申志勇,等. 利用 MPprimer 设计引物并优化扩增条件以提高多重 PCR 效率的试验研究[J]. 生物化学与生物物理进展,2010,37(3):342-346.
- [13] 殷 震,刘景华. 动物病毒学[M]. 北京:科学出版社,1997.
- [14] ELNIFRO E M, ASHSHI A M, COOPER R J, et al. Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2000, 4 (13):559-570.
- [15] LIU S S, ZHAO Y R, HUA Q B, et al. A multiplex RT-PCR for rapid and simultaneous detection of porcine teschovirus, classical swine fever virus, and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in clinical specimens [J]. *J Virol Methods*, 2011, 172

- (1-2):88-92.
- [16] 方立,徐辉,陈伟杰,等.猪圆环病毒2型猪伪狂犬病病毒和猪细小病毒三重PCR检测方法的建立[J].中国兽医科技,2005,35(12):954-958.
- [17] MURDOCH D R. Molecular genetic methods in the diagnosis of lower respiratory tract infections [J]. *APMIS*, 2004, 112(11-12):713-727.
- [18] 刘志杰,李如举,周莉,等.猪繁殖障碍性疾病的病原鉴定[J].贵州农业科学,2011,39(8):136-137.
- [19] 李昌文,仇华吉,童光志,等.一株内源性猪细小病毒的分离与鉴定[J].中国预防兽医学报,2000,22(9):90-93.
- [20] JOO H S, DONALDSON-WOOD C R, JOHNSON R H. A standardised haemagglutination inhibition test for porcine parvovirus antibody [J]. *Aust Vet J*, 1976, 52(9):422-424.
- [21] 刘志杰,李如举,周莉,等.猪伪狂犬病毒病与圆环病毒病2型混合感染的诊断[J].贵州农业科学,2011,39(11):153-154.
- [22] OPRIESSNIG T, MADSON D M, PRICKETT J R, et al. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and PCV2 coinfection [J]. *Vet Microbiol*, 2008, 18:103-114.

(编辑 白永平)