

同时监测 8 种牛常见病原体的 GeXP 高通量快速检测技术

范 晴, 谢芝勋*, 谢志勤, 谢丽基, 黄 莉, 黄娇玲, 张艳芳,
曾婷婷, 王 盛, 罗思思, 邓显文, 刘加波, 庞耀珊
(广西兽医研究所 广西兽医生物技术重点实验室, 南宁 530001)

摘 要: 本研究旨在建立一种可同时检测 8 种常见牛传染病病原体(口蹄疫病毒、蓝舌病病毒、水疱性口炎病毒、牛病毒性腹泻病毒、牛轮状病毒、产肠毒大肠杆菌、牛传染性鼻气管炎病毒和小反刍兽疫病毒)的 GeXP 高通量快速检测方法。将多重 PCR 技术和毛细管电泳技术有效地结合, 根据上述 8 种病原体的基因保守序列, 设计并合成了 8 对特异性引物, 在每对特异性引物的 5' 端加上一段通用引物, 形成特异性嵌合引物。优化反应体系和反应条件, 用单一病毒和混合病毒样品来验证所建立的 GeXP 方法的特异性, 用克隆质粒稀释液来测试 GeXP 方法的灵敏度, 检测 305 份临床样品, 进一步验证该方法的可靠性。结果: 优化后的 GeXP 检测体系, 可扩增出各病原体对应的特异片段, 能在 100 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 水平同时并特异地检测出 8 种牛病病原体核酸。305 份临床样品的检测结果与荧光 PCR 检测结果一致, 阳性样品测序结果表明无非特异性扩增的假阳性。结果显示, 所建立的 GeXP 方法具有高通量、特异性好、灵敏度高、方便快捷等优点, 可用于临床鉴别诊断和流行病学调查, 具有较高的临床应用价值。

关键词: 牛传染病; GeXP; 高通量检测

中图分类号: S858.235

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)10-1920-12

Development of a GeXP Assay for Simultaneous Differentiation of 8 Pathogens of Bovine Infectious Diseases

FAN Qing, XIE Zhi-xun*, XIE Zhi-qin, XIE Li-ji, HUANG Li, HUANG Jiao-ling, ZHANG Yan-fang,
ZENG Ting-ting, WANG Sheng, LUO Si-si, DENG Xian-wen, LIU Jia-bo, PANG Yao-shan
(*Guangxi Key Laboratory of Veterinary Biotechnology,*
Guangxi Veterinary Research Institute, Nanning 530001, China)

Abstract: The aim of this study was to develop a multiple PCR assay on a basis of Genome Lab Genetic Expression Analysis System (GeXP) for simultaneous detection of 8 pathogens of bovine infectious diseases, including food-and-mouth disease virus (FMDV), bluetongue virus (BTV), vesicular stomatitis virus (VSV), bovine viral diarrheal virus (BVDV), bovine rotavirus (BRV), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), bovine herpesvirus 1 (IBRV), Peste des petits ruminants virus (PPRV). The GeXP profiler utilizes gene-specific primers containing 5'-universal adaptor sequences. Eight gene-specific primers consist of a universal sequence fused to the 5'-end and a gene-specific sequence were designed according to the conserved sequence of each pathogen and used for amplification. The reaction system and condition were optimized. The specificity of GeXP were examined with samples of the single and mixture of 8 viruses' co-infection. The sensitivity was evaluated by performing the assay on serial 10-fold dilutions of cloned plasmids. And 305 clinical samples were detected by GeXP to further evaluate the reliability. The results showed

收稿日期: 2017-04-07

基金项目: 广西自然科学基金(2016GXNSFCA380003; 2014GXNSFBA118105); 桂科(AB16380003)

作者简介: 范 晴(1982-), 女, 云南红河人, 副研究员, 主要从事牛病防治与病原分子生物学研究, Tel: 0771-3120371, E-mail: fanqing1224@126.com

* 通信作者: 谢芝勋, E-mail: xiezhi-xun@126.com

that the corresponding specific fragments of genes were amplified respectively. The detection limit of GeXP was $100 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ when all of 8 pre-mixed plasmids containing target genes of 8 bovine pathogens. In detection of 305 clinical samples, the results of GeXP were consistent with real-time PCR completely. Analysis of positive samples by sequencing demonstrated that the GeXP assay had no false positive samples of nonspecific amplification. In conclusion, this GeXP assay is a high throughput, specific, sensitive, rapid and simple method for the detection of 8 pathogens of bovine infectious diseases. It is an effective tool applied to differential diagnosis rapidly for clinical samples and epidemiological investigation.

Key words: bovine infectious disease; GeXP assay; high throughput detection

目前我国现有牛存栏数 1.38 亿头,牛肉产量达到 675.9 万 t,是世界第四大牛肉生产国^[1-2]。随着养牛业的发展,牛传染病的发病率也在逐年升高,已经成为制约养牛业发展的一大重要因素。具体表现为:老病仍在流行,新病陆续出现,病原出现了新的血清型或变异株,给牛病的防控带来困难^[3]。每年因疾病死亡造成了严重的经济损失,据统计 2015 年全年国内肉牛因传染病全程死亡率高达 5%,导致的直接经济损失高达 90 亿~150 亿元^[4]。口蹄疫病毒(food-and-mouth disease virus, FMDV)、蓝舌病病毒(bluetongue virus, BTV)、水疱性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)、牛病毒性腹泻病毒(bovine viral diarrheal virus, BVDV)、牛轮状病毒(bovine rotavirus, BRV)、产肠毒大肠杆菌(enterotoxigenic *E. coli*, ETEC)、牛传染性鼻气管炎病毒(infectious bovine rhinotracheitis virus, IBRV, 又名 bovine herpesvirus 1)和小反刍兽疫病毒(Peste des petits ruminants virus, PPRV)是严重危害养牛业的 8 种主要传染病病原,这些病原的存在,时时刻刻危害着养牛业的发展。FMDV、VSV 和 BTV 是牛的高度急性传染病,一般呈暴发性流行,临床上在口腔、蹄部及乳房出现病变,症状十分相似,难以区分,死亡率高,被世界动物卫生组织(OIE)列为必须报告的传染病^[5-8]。BVDV、BRV 和 ETEC 是引起牛腹泻的主要病原体。BVDV 以持续性感染无症状形式存在,牛群中相当一部分牛是 BVDV 携带者,BVDV 降低机体抵抗力,常伴随着其他疾病暴发,症状为急性水样腹泻,急速消瘦^[9-11]。IBR 属于免疫抑制性疾病,病毒感染机体后还可继发细菌感染,据调查不仅各品种的牛均有感染的报道,而且感染地区遍布全国各省市,感染率居高^[12]。PPR 是近年来出现的外来新病,OIE 将其列为必须报告的动物疫病,在我国被列为一类动物疫病^[13]。这些疾病是养牛业的巨大隐患,一旦暴发,将会造成巨大的经

济损失。因此开展牛传染病快速检测技术的研究势在必行。

快速准确地检测诊断传染病是进行有效防控的前提和基础^[14]。目前用于鉴别诊断这些牛传染病的检测方法有很多种,如病毒分离、荧光抗体染色技术、ELISA 方法、PCR 方法、荧光 PCR 和 LAMP 等。但这些方法在临床实际应用中仍然存在着不足之处:病毒分离培养技术特异性强,但是其耗时长,敏感性不高;荧光抗体检测技术检测速度快,但对病料的新鲜度和抗体的特异性要求较高;ELISA 方法特异性好,但只能检测单一病毒;PCR、荧光 PCR 和 LAMP,特异性好,但只能对单一或 2~4 种病原体进行检测,无法实现真正意义上的同时对多种病原体实行高通量检测。

GeXP 多基因表达分析系统是一种新型的高通量的基因检测技术,将多重 PCR 技术和毛细管电泳技术有效地结合起来,采用荧光标记通用引物和特异性嵌合引物(即基因特异性引物 5'端连接通用引物)相结合从而引发多重 PCR 体系的扩增,可同时对多达 30 个目的基因进行有效检测分析,实现真正意义上的高通量检测鉴别多种病原体的目的^[15-19]。因此针对以上问题,本研究旨在建立一种同时鉴别 FMDV、BTV、VSV、BVDV、BRV、ETEC、IBRV 和 PPRV 的 GeXP 高通量检测方法。开展这种高通量检测和新型快速检测技术的研究,为 8 种牛常见病原体的检测提供技术支撑,可用于牛病流行病学的监测和突发疫情的鉴别诊断,保障养牛业的健康发展。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

Genome Lab GeXP Starter 试剂盒、DNA size standard kit-400 Base Pairs、分离缓冲液、分离胶、液体石蜡、上样板和毛细管购自美国贝克曼公司,JumpStart Taq DNA 聚合酶, Mg^{2+} 购自美国 SIG-

MA 公司, pEASY-T1 载体、DNA/RNA 共提试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司, 反转录、premixTaq PCR 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司, MidiPlasmidkid 质粒提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司, T7 体外转录试剂盒购自 Fermentas 公司。PCR 仪购自美国 Thermo 公司, NanoDrop ND-2000 紫外分光光度计购自美国 NanoDrop 公司, GeXP 多基因表达分析系统购自美国贝克曼公司。

1.2 样品的准备

O 型、A 型、Asia I 型口蹄疫灭活疫苗购自兰州兽医研究所, O 型、A 型、Asia I 型口蹄疫灭活病毒, 新泽西型(NJ 型)和印第安型(IND 型)水疱性口炎灭活病毒, 蓝舌病灭活病毒(4 型、8 型、9 型、15 型、17 型、18 型), 小反刍兽疫灭活病毒由云南出入境检验检疫局惠赠。3 株牛病毒性腹泻病毒参考毒株, 2

株牛轮状病毒参考毒株, 1 株牛传染性鼻气管炎病毒参考毒株购自中国兽医药品监察所, 14 株 BVDV 广西分离株, 8 株 BRV 广西分离株和 3 株 ETEC 由本实验室分离、保存。参照全式金 RNA/DNA 共提试剂盒说明书, 抽提毒株的 RNA/DNA, RNA 病毒需反转录成 cDNA, 将 cDNA 和 DNA 模板于 -20°C 保存, 备用。

1.3 引物的设计

从 GenBank 数据库中下载 8 种病原体的基因序列, 将序列经过 MegAlign 软件进行比对分析, 选择保守和特异的区域, 用 Primer premier 5.0 软件设计特异性引物。分别在各对特异性引物的正、反向 5' 端加通用引物标签: Tag-F: 5'-AGGTGACAC-TATAGAATA 和 Tag-R: 5'-GTACGACTCAC-TATAGGGA, 构成 8 对特异性嵌合引物, 引物由北京华大公司合成, PAGE 纯化, 引物信息见表 1。

表 1 引物信息

Table 1 Primer Sequences

病原 Pathogen	上游引物(5'-3') Forward primer sequence	下游引物(5'-3') Reverse primer sequence	扩增片段/bp Amplicon size	基因 Target region	引物浓度/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) Primer concentration
BTV	<u>AGGTGACACTATAGAATAA</u> GGGTA ^{ACTCACAGCAA} ACTCAA	<u>GTACGACTCACTATAGGGA</u> GAGCAGCCTGTCCATCCC	136	VP7	0.2
FMDV	<u>AGGTGACACTATAGAATA</u> GCCGTGGGACCATACAGG	<u>GTACGACTCACTATAGGGA</u> AAGTGATCTGTAGCTTGG AATCTC	166	3D	0.2
IBRV	<u>AGGTGACACTATAGAATA</u> GCGTCATTTACAAGGAG AACATC	<u>GTACGACTCACTATAGGGA</u> ATCTCGCCCATGCCAC	188	gB	0.2
BRV	<u>AGGTGACACTATAGAATA</u> CAGTGGCTTCCATTAG AAGCAT	<u>GTACGACTCACTATAGGGA</u> GGTCACATCCTCTCACTA	211	VP6	0.2
ETEC	<u>AGGTGACACTATAGAATA</u> CTCAGGTGCGAAAGCGTG	<u>GTACGACTCACTATAGGGA</u> CGTTGCATCGAATTA ACCAC	253	16S RNA	0.2
VSV	<u>AGGTGACACTATAGAATA</u> AAACTACTGGACGGG CTTGA	<u>GTACGACTCACTATAGGGA</u> TGAGATGCCCAAATGTTGC	278	N	0.2
BVDV	<u>AGGTGACACTATAGAATA</u> GTGAGTTCGTTGGATGGC	<u>GTACGACTCACTATAGGGA</u> TATGTTTTGTATAAGAG TTCATTTG	308	5'-UTR	2
PPRV	<u>AGGTGACACTATAGAATA</u> TGGTTTGAACAGAGAA ATAATAGA	<u>GTACGACTCACTATAGGGA</u> GCTTGTGCGGGGGTGC	344	N	2

带下划线的为通用引物, 嵌合引物由通用引物和特异性引物构成

Universal tag sequences are underlined. Chimeric primers were synthesized using tags and specific primers

1.4 GeXP 多重 PCR 反应体系和程序

反应体系为 20 μL :cDNA/DNA 模板 1 μL (含 cDNA/DNA $10^6 \sim 10 \text{ ng}$),Genome Lab GeXP Starter Kit $5 \times$ buffer 4 μL (buffer 内含通用引物,工作浓度为 $0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), MgCl_2 ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 4 μL , 嵌合引物混合物 1 μL (各引物浓度见表 1), Thermo-Start DNA polymerase 10 U, 超纯水补足体积。

反应程序:95 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^\circ\text{C}$ 30 s,55 $^\circ\text{C}$ 30 s,72 $^\circ\text{C}$ 30 s,10 个循环;94 $^\circ\text{C}$ 30 s,68 $^\circ\text{C}$ 30 s,72 $^\circ\text{C}$ 30 s,10 个循环;94 $^\circ\text{C}$ 30 s,50 $^\circ\text{C}$ 30 s,72 $^\circ\text{C}$ 30 s,10 个循环;72 $^\circ\text{C}$ 延伸 5 min,结束反应。

毛细管电泳检测结果:取 3 μL PCR 产物和 36.75 μL 样品缓冲液,0.25 μL DNA size standard kit-400 Base Pairs 漩涡振荡混匀,加入上样板中,每孔滴加 1 滴石蜡封闭液面,避免甲酰胺氧化和样品蒸发。在缓冲液板上每孔加入 4/5 的缓冲液,进行毛细管电泳。毛细管电泳条件:90 $^\circ\text{C}$ 120 s,变性;2.0 kV 30 s,吸入样品;6.0 kV 35 min,分离样品。不同大小片段的 PCR 产物在电泳中分离,仪器通过检测 PCR 产物携带的荧光基团辨认其片段大小和信号强度。电泳完成后,使用仪器自带软件 Express Profiler software 分析结果,横坐标表示片段大小,纵坐标表示荧光信号强度,即 PCR 产物的含量。

1.5 质粒标准品的准备

用特异性引物扩增各毒株的目的片段,与 pEASY-T1 载体连接后构建 GeXP 各目的片段的重组质粒(pEASY-T1-BTV、pEASY-T1-FMDV、pEASY-T1-IBRV、pEASY-T1-BRV、pEASY-T1-ETEC、pEASY-T1-VSV、pEASY-T1-BVDV 和 pEASY-T1-PPRV),提取阳性克隆质粒。用 Nano-Drop 紫外分光光度计测定 pEASY-T1-IBRV 和 pEASY-T1-ETEC 质粒浓度。参照 T7 体外转录试剂盒说明书将提取的阳性克隆质粒(pEASY-T1-BTV、pEASY-T1-FMDV、pEASY-T1-BRV、pEASY-T1-VSV、pEASY-T1-BVDV 和 pEASY-T1-PPRV)体外转录为 RNA,用 NanoDrop 测定 RNA 浓度,根据相对分子量及浓度计算各质粒拷贝数为拷贝数制备标准品,将各质粒浓度稀释到 $10^8 \sim 1$ 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$, $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

1.6 特异性试验

将 8 对特异嵌合引物参照表 1 浓度混合,配制

成 GeXP 多重 PCR 反应的引物工作液,参照“1.4”的反应体系和程序,进行多引物单一模板和多引物多模板的试验,验证 GeXP 多重 PCR 体系中引物的特异性。多引物单一模板:在 8 对引物同时存在的多重反应体系中,逐一与每个病原体核酸模板反应;多引物多模板:在 8 对引物同时存在的多重反应体系中,将 8 种牛传染病 cDNA/DNA 全部混合作为模板,进行 GeXP 多重 PCR 特异性分析。

1.7 敏感性试验

将 8 种质粒等量混合,保证每种质粒浓度为 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10 、1 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$,将所制备的标准样品参照“1.4”的反应体系和程序,进行 GeXP 多重 PCR 灵敏性分析。

1.8 模拟混合感染干扰性试验

为了测试不同模板之间浓度差异较大时,高浓度模板是否抑制低浓度模板的扩增,是否仍能敏感的检测到低浓度的模板,使用不同浓度的核酸组合为模板进行 GeXP 多重 PCR。制备 2 组不同模板浓度的模拟混合感染样品(最高模板浓度至少是最低模板浓度的 10^4 倍),样品 A: BTV(10^8 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) + FMDV(10^4 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) + IBRV(10^4 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) + BRV(10^4 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) + ETEC(10^6 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$), 样品 B: IBRV(10^3 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) + BRV(10^5 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) + ETEC(10^5 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) + BVDV(10^5 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) + PPRV(10^7 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$),进行 GeXP 多重 PCR 干扰性分析。

1.9 临床样品的检测

305 份临床样品包括:156 份粪便拭子,30 份眼拭子,30 份鼻黏液拭子,70 份抗凝血,2 份 OP 液(食道-咽部分泌物),2 份水疱液,15 份组织样品(10 份直肠黏膜,2 份水疱皮,3 份淋巴结)。临床样品 2012—2014 采集于年广西各地,263 份样品来源于各地奶牛场无症状奶牛,28 份样品来源于具有腹泻、消瘦、流鼻涕等临床症状的牛,14 份样品来源于具有“精神不振,吞咽困难,发烧,口腔糜烂出现水疱,口鼻白沫”等症状的牛。拭子样品用 1 mL PBS 洗脱,离心取上清抽提总 RNA/DNA;组织样品混合匀浆后抽提总 RNA/DNA,按照建立的 GeXP 多重 PCR 方法进行检测,同时以本研究设计的特异性引物进行 SYBR Green I 荧光 PCR,并将阳性 PCR 产物克隆至 pEASY-T1 载体,送深圳华大公司测序,以验证阳性样品结果。

2 结果

2.1 引物验证

GeXP 多重 PCR 多引物单模板扩增毛细管电泳结果显示,8 种牛病原体目的基因的扩增片段大小分别如下,BTV:135~137 bp,FMDV:165~167 bp,IBRV:187~189 bp,BRV:211~214 bp,ETEC:252~254 bp,VSV:278~281 bp,BVDV:308~310 bp,PPRV:342~345 bp。由于 GeXP 本身系统的误差,扩增片段大小与理论值存在 ± 2 bp 偏差,属于正确结果,与试验相符。

表 2 毒株和菌株来源

Table 2 Sources of Pathogens

病原 Pathogen	GeXP 结果 GeXP Result							
	FMDV	BTV	VSV	BVDV	BRV	ETEC	IBRV	PPRV
FMDV								
FMDV A 型灭活病毒 FMDV A inactivated virus	+	-	-	-	-	-	-	-
FMDV O 型灭活病毒 FMDV O inactivated virus	+	-	-	-	-	-	-	-
FMDV Asia I 型灭活病毒 FMDV Asia I inactivated virus	+	-	-	-	-	-	-	-
FMDV A 型灭活疫苗 FMDV A inactivated vaccine	+	-	-	-	-	-	-	-
FMDV O 型灭活疫苗 FMDV O inactivated vaccine	+	-	-	-	-	-	-	-
FMDV Asia I 型灭活疫苗 FMDV Asia I inactivated vaccine	+	-	-	-	-	-	-	-
BTV								
BTV 4 型灭活病毒 BTV 4 inactivated virus	-	+	-	-	-	-	-	-
BTV 8 型灭活病毒 BTV 8 inactivated virus	-	+	-	-	-	-	-	-
BTV 9 型灭活病毒 BTV 9 inactivated virus	-	+	-	-	-	-	-	-
BTV 15 型灭活病毒 BTV 15 inactivated virus	-	+	-	-	-	-	-	-
BTV 17 型灭活病毒 BTV 17 inactivated virus	-	+	-	-	-	-	-	-
BTV 18 型灭活病毒 BTV 18 inactivated virus	-	+	-	-	-	-	-	-
VSV								
VSV NJ 型灭活病毒 VSV NJ inactivated virus	-	-	+	-	-	-	-	-

2.2 特异性试验分析

经过体系优化,最终嵌合引物的比例和浓度见表 1。应用建立的 GeXP 多重 PCR 方法,以表 2 中所列毒株为模板进行多引物单一模板特异性试验,每个反应只出现特异性单峰,无其他信号峰,且片段大小与引物设计预期相符: BTV、FMDV、IBRV、BRV、ETEC、VSV、BVDV 和 PPRV 分别出现 136.72、165.03、188.21、211.71、252.24、278.04、309.58 和 344.20 bp 特异性单峰。阴性对照均无扩增,无目的信号峰值,仅有 DNA 标准的信号峰,结果见图 1。

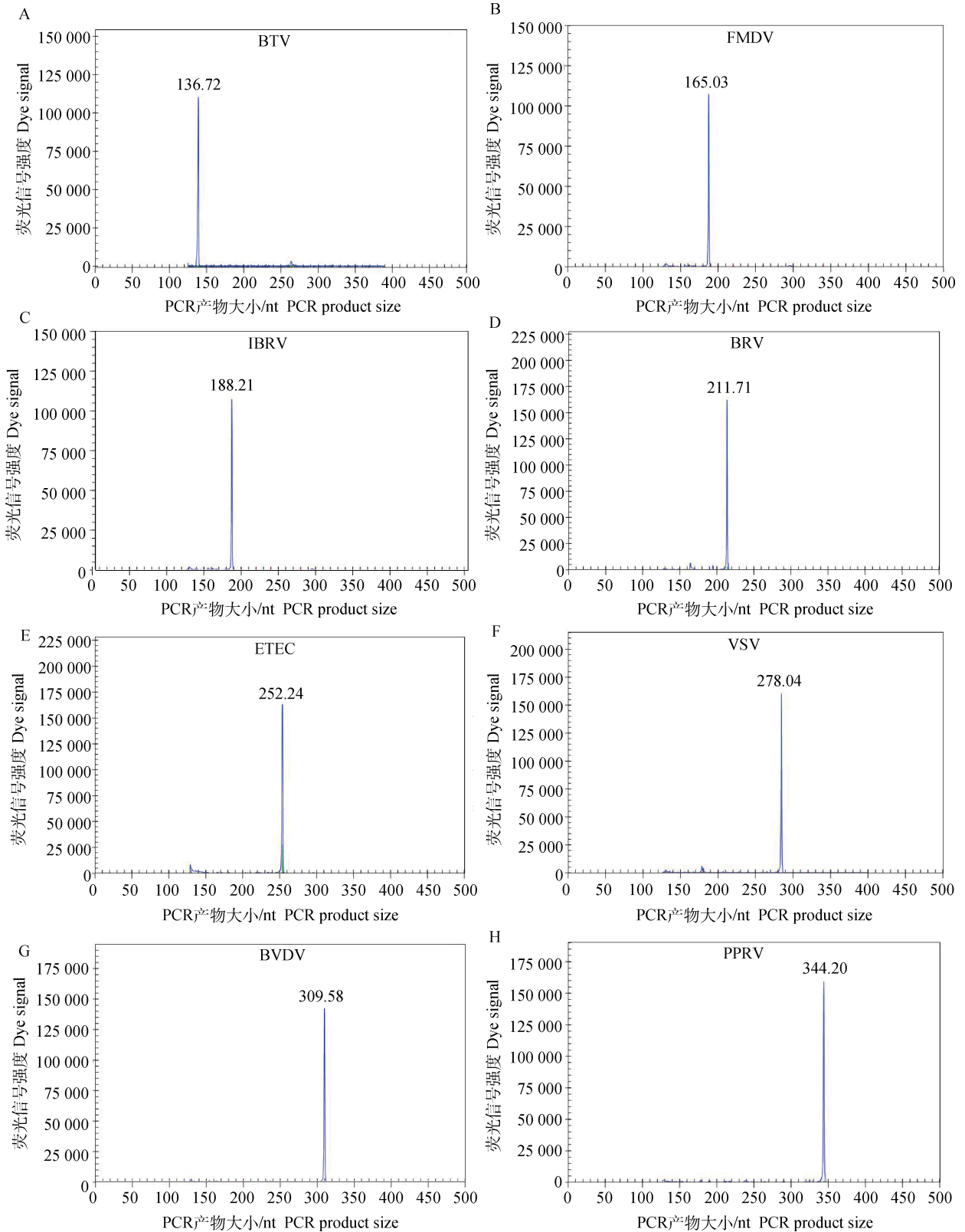


图 1 GeXP 多重 PCR 多引物单一模板多引物结果

Fig. 1 Specificity results of the GeXP-mono PCR assay

进行多引物多模板特异性试验, 8 种病原混合模板检测, 可同时检出 8 个目的信号峰。136.17、

166.39、187.25、213.71、253.23、280.40、309.59、342.16 bp 分别为 BTV、FMDV、IBRV、BRV、

EPEC、VSV、BVDV 和 PPRV 的信号峰,无其他杂峰,表明样品中同时含有 8 种牛病原体,与试验设计符合,结果见图 2。

2.3 敏感性试验分析

在 8 对引物同时存在的 GeXP 多重体系中,检测 10 倍梯度稀释的混合模板标准品,结果显示(图 3),均可在 100 拷贝· μL^{-1} 反应信号水平上同时特异性检测出 8 种牛病原体,可见该方法灵敏性高。

2.4 模拟混合感染和干扰性试验分析

将 2 组不同模板浓度组合的模拟混合感染样品用建立的 GeXP 多重 PCR 方法进行检测,得到与预期相符合特异性峰。图 4 所示为不同模板浓度组合

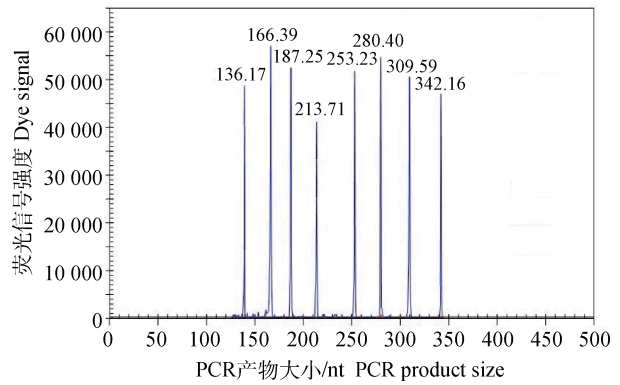


图 2 GeXP 多重 PCR 多引物多模板结果

Fig. 2 Specificity results of the GeXP-multiplex PCR assay with mixed template of 8 cattle infectious pathogens

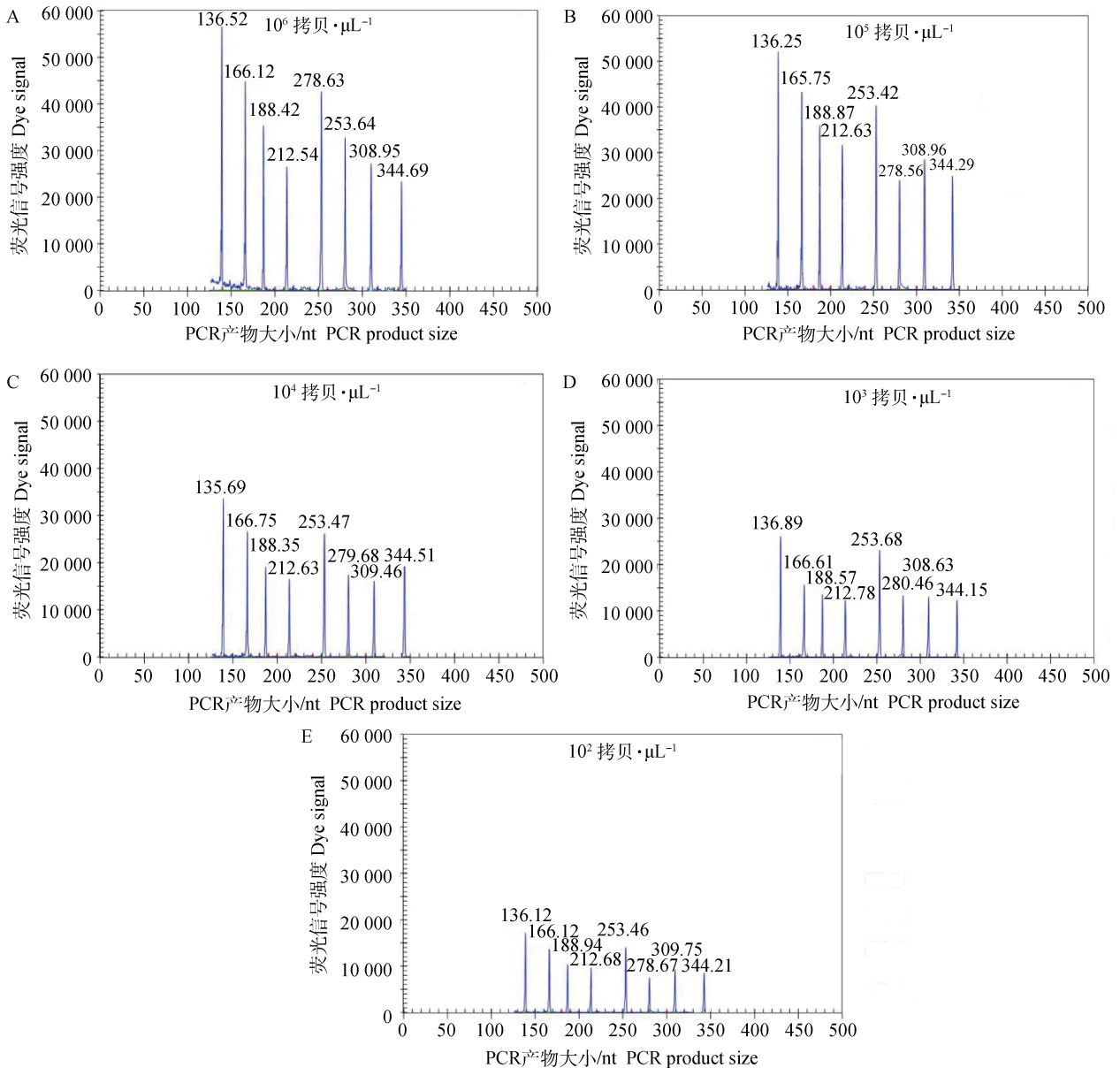
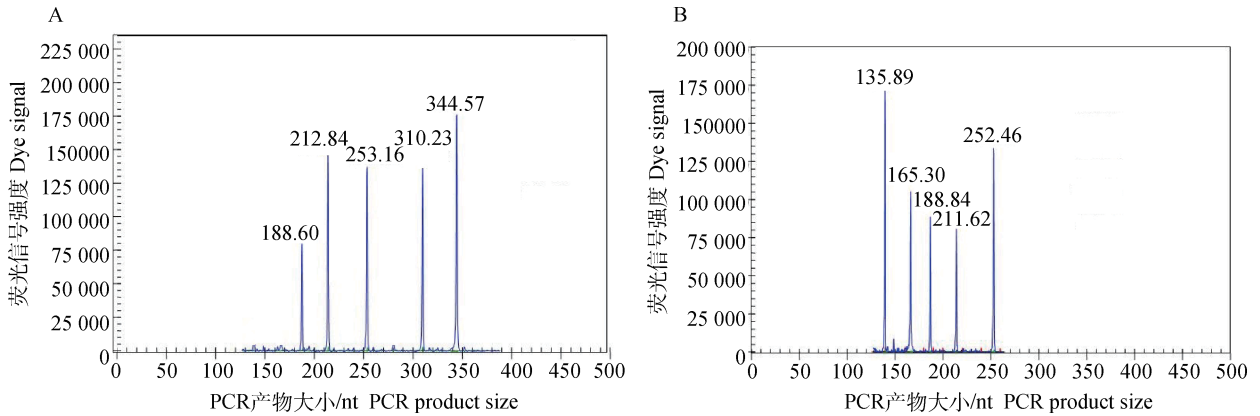


图 3 GeXP 多重 PCR 敏感性试验结果

Fig. 3 Sensitivity results of GeXP-multiplex PCR assay

的模拟混合感染样品的毛细管电泳结果。结果显示,当起始模板的浓度悬殊较大时,仍能准确敏感地

检测出低浓度的模板,干扰性小,如图 4 所示。



样品 A. BTV (10^8 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) + FMDV (10^4 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) + IBRV (10^4 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) + BRV (10^4 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) + ETEC (10^6 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$); 样品 B. IBRV (10^3 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) + BRV (10^5 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) + ETEC (10^5 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) + BVDV (10^5 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) + PPRV (10^7 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$)

Sample A. BTV (10^8 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) + FMDV (10^4 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) + IBRV (10^4 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) + BRV (10^4 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) + ETEC (10^6 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$); Sample B. IBRV (10^3 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) + BRV (10^5 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) + ETEC (10^5 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) + BVDV (10^5 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) + PPRV (10^7 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$)

图 4 GeXP 多重 PCR 敏感性试验结果

Fig. 4 Interference results of GeXP-multiplex PCR assay

2.5 临床样品检测分析

305 份临床样品的检测结果见表 3。结果显示,应用建立的 GeXP 多重 PCR 结果与荧光 PCR 结果相符,并且测序结果显示阳性结果均为对应的病原体,无非特异性扩增的假阳性。305 份样品中,146 份检测结果为阳性,其中单重感染为 90 份(29.5%),混合感染 28 份(9.2%),混合感染样品中,BVDV + ETEC 混合感染 23 份(7.5%),BRV + ETEC 混合感染 5 份(1.6%)。

3 讨论

FMDV、BTV、VSV、BVDV、BRV、ETEC、IBRV 和 PPRV 是养牛业常见的 8 种传染病病原,相关疾病感染率高,广泛地存在全国各地,一旦暴发流行,将造成巨大的经济损失。准确地诊断监测是传染病防控的有效手段,目前中国动物疾病预防控中心每年需对全国各地 FMDV、PPRV 和 BTV 进行流行病学监测。因此,有必要建立一种特异、敏感、高通量的检测诊断方法,为牛传染病的防控提供技术支持。

GeXP 多基因表达分析系统是目前最方便、快速的高通量检测技术。目前最常见多种病原体的检测技术是常规多重 PCR 和荧光多重 PCR,但它们

检测目的基因数量有限,常规多重 PCR 受 PCR 产物条带的大小和琼脂糖凝胶电泳的限制最多只能检测到 4 重,荧光多重 PCR 受激发光和吸收光的限制最多检测 3 重,都达不到真正的高通量、快速检测和分析多种病原的目的。本研究借助的 GeXP 多基因表达分析系统是一种新型高通量的基因检测技术,将多重 PCR 技术和毛细管电泳技术有效地结合起来,荧光基团标记的 PCR 产物最终通过毛细管电泳进行区分,可区分相差大于 7 bp 以上的 PCR 产物。引物合成时,在基因特异性引物 5' 端加上通用引物序列,形成特异性嵌合引物。PCR 扩增时,目的基因与特异性嵌合引物相结合进行第一次扩增,随后荧光标记通用引物和特异性嵌合引物相结合进行第二次扩增,因此把多对引物的扩增转化为 1 对通用引物的扩增,使各模板的扩增效率趋于一致,而大大减少各引物间的干扰抑制作用,从而达到真正的高通量检测鉴别多个病原体的目的。设计引物时,每对引物扩增的 PCR 产物之间至少相差 7 bp 即可区分,通过毛细管电泳辨认扩增片段大小从而判定检测结果。这项技术目前已经应用于多种动物疾病的诊断:如 9 种鸡呼吸道病,11 种鸭病,8 种猪呼吸道和繁殖障碍病原体,8 种鸡免疫抑制病,H5 亚型禽流感等^[20-24]。目前常见的另一种高通量检测技术是

表 3 GeXP 多重 PCR 对 305 份临床样品的检测结果

Table 3 Clinical detection results of 305 samples

样品背景 Background of clinical samples	样品类型 Clinical sample	数量 Number	阳性样品结果(GeXP 多重 PCR 结果/荧光 PCR 结果/测序结果) No. of positive results (GeXP-multiplex PCR/real-time PCR/sequencing)							
			BTV	FMDV	IBRV	BRV	VSV	BVDV	ETEC	PPRV
无症状奶牛 Cattle without any morbid symptoms and signs	粪便拭子 Fecal swab	141				3/3/3		18/18/18	27/27/27	
	抗凝血 Blood sample	70	32/32/32							
	眼拭子 Conjunctival swab	30								
	鼻黏液拭子 Nasal mucus swab	22								
	食道-咽分泌物 Oesophageal- pharyngeal fluid	2		2/2/2						
病症奶牛 Cattle showed typical symptoms of disease	水疱皮 Vesicular skins	2		2/2/2						
	水疱液 Vesicular fluid	2		2/2/2						
	直肠黏膜 Mucous membrane	10					10/10/10	10/10/10		
	粪便拭子 Fecal sample	15				5/5/5	10/10/10	15/15/15		
	淋巴结 Lymph node	3					3/3/3	3/3/3		
	鼻黏液拭子 Nasal mucus swab	8			4/4/4					
合计 Total		305	32	6	4	8	0	41	55	0
阳性检出率/% Positive detection rate			10.5%	2.0%	1.3%	2.6%	0	13.4%	18.0%	0

基因芯片,朱晓光等应用基因芯片技术检测 6 种麻疹病毒属病毒,史茜等建立了牛新孢子虫基因芯片检测方法^[25-26]。基因芯片技术虽然灵敏度和特异性均好,但芯片影响因素较多,标签确认困难,结果不能直接读取,一次需检测多个样品,成本高。GeXP 多基因表达分析系统低成本,操作简便,可直接读取结果,可灵活选择检测样品数量,适用于临床样品的检测。

临床检测结果中,BVDV 与 ETEC, BRV 与 ETEC 混合感染率高,分别是 7.5% 和 1.6%,没有检出 BVDV 和 BRV 混合感染结果。我们推测 BVDV 感染牛时,引起机体免疫力下降,使其他病原体容易入侵机体,因此常伴有 ETEC 的共感染。BRV 主要感染 1 月龄内的犊牛,虽然有些轮状病毒

感染犊牛没有特征性临床症状表现,但仍能从其粪便中检测到 BRV 的病毒粒子,BR 急性腹泻通常是由于 BRV 与 ETEC 混合感染造成的,破坏绒毛肠细胞,使肠绒毛吸收功能失去平衡,分泌强于吸收而导致腹泄。由于感染 BVDV 和 BRV 的牛发病年龄有相差,因此很少见 BVDV 与 BRV 共感染。这些混合感染的样品均采集自腹泻重症表现的牛,这些牛吸吮反应下降,水样腹泻带血,部分粪伴有黏膜脱落,脱水严重,犊牛同时伴有右下腹部鼓胀,小肠积水。由这些临床症状看来,混合感染加剧了疾病的发生,非常严重。在临床样品的检测中,没有检测到 VSV。有 263 份样品采集自没有任何症状的牛,但仍能检测到病原,其中以 BVDV 感染最多,再次证明了这些病毒在牛群中间广泛存在,是养牛业的安

全隐患,必须准确检测并淘汰才能保障养牛业的健康发展。

在实际操作中,由于每种疾病病原富集的部位不同,所以需采集不同的样品进行检测。可从同一机体采集不同样品,进行混合,对混合样品统一处理后抽提 RNA/DNA 进行检测。除 ETEC 和 IBRV 外,其他都是 RNA 病毒,故使用 RNA/DNA 共提试剂盒进行核酸抽提,再进行反转录,使用的反转录试剂盒对核酸中的 DNA 成分无影响,全程只需一次抽提,一次 PCR,一次电泳,即可得到 8 种牛病的检测结果。一次 GeXP 最多可检测 96 份样品,其高通量的优势非常适合大规模检测或流行病学调查。

4 结 论

成功建立同时监测 8 种牛常见病原体的 GeXP 多重 PCR 方法,能够特异、敏感、高通量地鉴别检测 8 种牛常见传染病,可以成为临床鉴别诊断和流行病学调查的有用工具。

参考文献(References):

- [1] 目前我国肉牛养殖的现状以及前景分析[N]. 2015-10-29. <http://www.ar114.com.cn/news/show.php?itemid=78926>. Current situation and prospect analysis on breeding cattle in China [N]. 2015-10-29. <http://www.ar114.com.cn/news/show.php?itemid=78926>. (in Chinese)
- [2] 周作集,刘克俊,李芳芳,等. 广西肉牛的发展现状和对策[J]. 广西畜牧兽医, 2014, 30(5): 233-236. ZHOU Z J, LIU K J, LI F F, et al. The present situation and strategies of cattle industry in Guangxi province[J]. *Guangxi Journal of Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2014, 30(5): 233-236. (in Chinese)
- [3] SIERRA S, DÁVILA M, LOWENSTEIN P R, et al. Response of foot-and-mouth disease virus to increased mutagenesis: influence of viral load and fitness in loss of infectivity[J]. *J Virol*, 2000, 74(18): 8316-8323.
- [4] CERNICCHIARO N, WHITE B J, RENTER D G, et al. Evaluation of economic and performance outcomes associated with the number of treatments after an initial diagnosis of bovine respiratory disease in commercial feeder cattle[J]. *Am J Vet Res*, 2013, 74(2): 300-309.
- [5] BRITO B P, RODRIGUEZ L L, HAMMOND J M, et al. Review of the global distribution of foot-and-mouth disease virus from 2007 to 2014[J]. *Trans-bound Emerg Dis*, 2017, 64(2): 316-332.
- [6] MARTÍN-ACEBES M A, GONZÁLEZ-MAGALDI M, ROSAS M F, et al. Subcellular distribution of swine vesicular disease virus proteins and alterations induced in infected cells: a comparative study with foot-and-mouth disease virus and vesicular stomatitis virus[J]. *Virology*, 2008, 374(2): 432-443.
- [7] NAYDUCH D, COHNSTAEDT L W, SASKI C, et al. Studying *Culicoides* vectors of BTV in the post-genomic era: resources, bottlenecks to progress and future directions[J]. *Virus Res*, 2014, 182: 43-49.
- [8] WERNERY U, KINNE J. Foot and mouth disease and similar virus infections in camelids: a review[J]. *Rev Sci Tech*, 2012, 31(3): 907-918.
- [9] SANTMAN-BERENDS I M G A, MARS M H, VAN DUIJN L, et al. Evaluation of the epidemiological and economic consequences of control scenarios for bovine viral diarrhoea virus in dairy herds[J]. *J Dairy Sci*, 2015, 98(11): 7699-7716.
- [10] KHATIB L A, TSAI Y L, OLSON B H. A biomarker for the identification of cattle fecal pollution in water using the LTIIa toxin gene from enterotoxigenic *Escherichia coli* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 59(1): 97-104.
- [11] 谢金鑫,段招军,李丹地,等. 中国大庆奶牛中发现轮状病毒 G10P[11][J]. 病毒学报, 2010, 26(5): 407-409. XIE J X, DUAN Z J, LI D D, et al. Detection of bovine rotavirus G10P[11] in a dairy farm in Daqing, China[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2010, 26(5): 407-409. (in Chinese)
- [12] 甘瑜萍,余祖琼,黄恒,等. 我国牛传染性鼻气管炎的流行与防控现状[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016(2): 113-114. GAN Y P, YU Z Q, HUANG H, et al. Epidemic and control of infectious bovine rhinotracheitis[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2016(2): 113-114. (in Chinese)
- [13] WU X, LI L, LI J, et al. Peste des petits ruminants viruses re-emerging in China, 2013-2014[J]. *Trans-bound Emerg Dis*, 2016, 63(5): e441-e446.
- [14] 胡长敏,郭爱珍,潘志明,等. 发达国家重大牛病防控历史和经验[J]. 中国兽医学报, 2011, 31(3): 453-456.

- HU C M, GUO A Z, PAN Z M, et al. Lessons from the history of cattle major epidemic disease control in developed countries[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2011, 31(3): 453-456. (in Chinese)
- [15] DREW J E, MAYER C D, FARQUHARSON A J, et al. Custom design of a GeXP multiplexed assay used to assess expression profiles of inflammatory gene targets in normal colon, polyp, and tumor tissue [J]. *J Mol Diagn*, 2011, 13(2): 233-242.
- [16] YANG M J, LUO L, NIE K, et al. Genotyping of 11 human papillomaviruses by multiplex PCR with a GeXP analyzer [J]. *J Med Virol*, 2012, 84 (6): 957-963.
- [17] HU X M, ZHANG Y, ZHOU X M, et al. Simultaneously typing nine serotypes of enteroviruses associated with hand, foot, and mouth disease by a GeXP analyzer-based multiplex reverse transcription-PCR assay[J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(2): 288-293.
- [18] RAI A J, KAMATH R M, GERALD W, et al. Analytical validation of the GeXP analyzer and design of a workflow for cancer-biomarker discovery using multiplexed gene-expression profiling[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 393(5): 1505-1511.
- [19] QIN M, WANG D Y, HUANG F, et al. Detection of pandemic influenza A H1N1 virus by multiplex reverse transcription-PCR with a GeXP analyzer[J]. *J Virol Methods*, 2010, 168(1-2): 255-258.
- [20] XIE Z X, LUO S S, XIE L J, et al. Simultaneous typing of nine avian respiratory pathogens using a novel GeXP analyzer-based multiplex PCR assay[J]. *J Virol Methods*, 2014, 207: 188-195.
- [21] ZHANG Y F, XIE Z X, XIE L J, et al. GeXP analyzer-based multiplex reverse-transcription PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of eleven duck viruses [J]. *BMC Microbiol*, 2015, 15: 247.
- [22] ZHANG M X, XIE Z X, XIE L J, et al. Simultaneous detection of eight reproductive and respiratory swine pathogens using a novel GeXP analyser-based multiplex PCR Assay[J]. *J Virol Methods*, 2015, 224: 9-15.
- [23] ZENG T T, XIE Z X, XIE L J, et al. Simultaneous detection of eight immunosuppressive chicken viruses using a GeXP analyser-based multiplex PCR assay [J]. *Virol J*, 2015, 12: 226.
- [24] LI M, XIE Z X, XIE Z Q, et al. Simultaneous detection of four different neuraminidase types of avian influenza A H5 viruses by multiplex reverse transcription-PCR using a GeXP analyser[J]. *Influenza Other Respir Viruses*, 2016, 10(2): 141-149.
- [25] 朱晓光, 李 斌, 刘 冰, 等. 麻疹病毒属病毒检测基因芯片的建立[J]. *中国病原生物学杂志*, 2010, 5 (5): 329-331, 405.
- ZHU X G, LI B, LIU B, et al. Microarray for species-specific detection of Morbillivirus[J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2010, 5(5): 329-331, 405. (in Chinese)
- [26] 史 茜, 唐慧芬, 牛国辉, 等. 牛新孢子虫基因芯片检测方法的建立[J]. *中国预防兽医学报*, 2014, 36 (9): 715-719.
- SHI Q, TANG H F, NIU G H, et al. Development gene microarray method for the detection of bovine *Neospora caninum* [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2014, 36 (9): 715-719. (in Chinese)

(编辑 白永平)