

一种鉴别猪瘟 C-株和其他毒株的分子生物学方法^{*}

胡建和¹, 陈永耀¹, 魏刚才¹, 王三虎¹, 张彦明², 谢庆阁³

(1 河南职业技术学院 动物科学系, 河南 新乡 453003; 2 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

3 中国农业科学院 兰州兽医研究所, 甘肃 兰州 730046)

[摘 要] 根据已发表的猪瘟病毒(CSFV)核苷酸序列, 筛选出 C-株与其他毒株的核苷酸序列差异标记 CTTTTTCTTTT, 并设计包含此标记序列的 CSFV 特异性 PCR 引物对及 nested-PCR 引物对。从待检猪脾脏或淋巴组织中提取总 RNA, 用 AMV 逆转录酶进行逆转录后, 进行 PCR 和 nested-PCR。将扩增片段纯化回收并克隆到 pMD18-T 载体进行测序。对测序结果进行分析, 含有此标记序列的即为 C-株, 不含此标记序列的则为其他毒株。

[关键词] 猪瘟; RT-PCR; nested-PCR; 标记序列; 鉴别诊断

[中图分类号] S852.65⁺1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)02-0095-04

猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)属黄病毒科(Flaviridae)瘟病毒属(Pestivirus), 能导致猪的高度接触性传染病。其病理特征是小血管壁变性, 引起内脏器官多发性出血、梗塞和坏死, 以出血和发热为主要特征, 发病过程呈急性或慢性。因该病每年给养猪业造成巨大的经济损失, 故被国际兽疫局(OIE)列为 A 类动物传染病^[1]。猪瘟病毒 C-株是我国 1954 年发现的猪瘟兔化弱毒疫苗株, 直到现在仍被认为是最安全、最有效的活疫苗株, 为我国乃至世界许多国家猪瘟的防制做出了巨大的贡献。然而, 用 C-株疫苗免疫的猪群目前在血清学上无法区别于自然感染猪群, 这成为该疫苗在西欧等国家推广的巨大障碍。如果采取捕杀感染猪群和可疑发病猪群的措施预防该病, 则会给养猪业带来巨大损失^[2]。随着分子生物学技术的发展, 对猪瘟病毒许多毒株的基因组进行了测定, 通过比较猪瘟病毒 C-株和其他毒株的核苷酸序列可以发现, 猪瘟病毒的 C-株和其他毒株核苷酸序列在 3'UTR 区域存在一个明显的不同点。以此为依据, 本试验尝试了一种简便、准确的鉴别猪瘟 C-株和其他强毒株的分子生物学方法, 为猪瘟的预防提供了可靠的检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料

无菌采集健康免疫猪、可疑猪瘟病猪的脾脏或淋巴结。

1.2 CSFV C-株与其他毒株差异标记序列的筛选及引物合成

根据已发表的 CSFV 不同毒株的核苷酸序列, 采用 DNA star 软件比较分析, 筛选出明显的 C-株和其他毒株之间的差异序列, 以此为依据, 设计具有区别作用的特异性 PCR 和 nested-PCR 引物对。

1.3 组织总 RNA 的提取

采用 TRIzol Reagent 提取试剂盒, 所用器皿及试剂均须进行无 RNA 酶处理。剪取 50 mg 组织, 研磨后加 750 μ L TRIzol Reagent, 匀浆, 室温孵育 5 min; 4 $^{\circ}$ C, 11 500 g 离心 15 min, 取上层水相, 加 0.5 mL 异丙醇, 混匀, 室温 10 min, -20 $^{\circ}$ C 过夜; 4 $^{\circ}$ C, 11 500 g 离心 10 min, 弃上清液, 加 1 mL 750 mL/L 乙醇洗沉淀 1 次, 吸去残余乙醇, 室温干燥 5~10 min 至无色透明。加 30 μ L 无 RNA 酶水和 0.5 μ L RNA 酶抑制剂(40 U/ μ L)适量, -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.4 RT-PCR

取总 RNA 11 μ L, RT-PCR 下游引物(0.2 μ g/ μ L)1 μ L, 65 $^{\circ}$ C, 水浴 10 min, 然后立即冰浴 5 min。加 5 $\times$ RT-buffer 4 μ L, dNTP(2.5 mmol/L)2 μ L, AMV(5 U/ μ L)2 μ L, 42 $^{\circ}$ C 水浴 60 min, 得到 cDNA 第一链逆转录产物。取逆转录产物 10 μ L, 10 $\times$ PCR buffer(无 Mg^{2+})5 μ L, Mg^{2+} (25 mmol/L)3

^{*} [收稿日期] 2003-06-12

[基金项目] 国家重大基础研究发展规划项目(G19990119)

[作者简介] 胡建和(1968-), 男, 河南辉县市人, 博士, 主要从事动物微生物学、免疫学和分子生物学研究。

μL, dNTP (2.5 mmol/L) 4 μL, RT-PCR 上游引物和下游引物各 1 μL, 加纯水至 49.5 μL。短时离心混匀, 进行 PCR 扩增, 反应体系为 50 μL。设定解链 98.0℃, 8 min; 95.0℃ 50 s, 48.0℃ 1 min, 72.0℃ 100 s 为 1 次循环, 共循环 35 次, 第 1 次变性后, 温度降至 72℃ 时, 加入 Taq 酶 (5 U/μL) 0.5 μL, 72℃ 延伸 10 min。

1.5 nested-PCR

取 2 μL RT-PCR 产物作 nested-PCR 模板, 进行套式扩增, 方法同 1.4。设定解链 98.0℃, 8 min; 以 98.0℃ 10 s, 55.0℃ 30 s, 72.0℃ 100 s 为 1 次循环, 第 1 次变性后, 温度降至 72℃ 时加入 Taq 酶 (5 U/μL) 0.5 μL; 72.0℃ 延伸 10 min^[3]。

1.6 PCR 产物的纯化回收

在 1×TAE 配制的 1% 琼脂糖中加入溴化乙锭 (0.5 μg/mL) 进行凝胶电泳, 切取目的条带, 按照 DNA 琼脂糖纯化回收试剂盒 (Roche) 说明书进行纯化回收。

1.7 重组质粒的构建、提取和鉴定

取回收 DNA 片段 4 μL, pMD18-T 载体 (大连

宝生物工程公司) 1 μL, 与连接溶液 I 5 μL 混匀后, 于 16℃ 恒温循环水浴箱中反应 1~3 h, 4℃ 过夜后, 全量转化新鲜制备的感受态细菌 JM109, 挑选白色阳性克隆, 于 Amp^r LB 中, 37℃, 220 r/min 摇瓶培养过夜。采用碱裂解小量质粒制备法, 提取重组质粒^[3], 采用 *Xba*I 和 *Sal*I 进行双酶切鉴定和套式引物 PCR 扩增鉴定。

1.8 扩增片段的序列测定及分析

将鉴定出的阳性重组质粒送大连宝生物工程公司, 采用 ABI PRISMTM 377XL DNA Sequencer 进行序列测定。用 DNA star 软件分析其是否含有标记序列, 以确定其是否为 C-株。

2 结果与分析

2.1 猪瘟病毒 C-株和其他毒株 3'UTR 核苷酸差异标记序列筛选

如表 1 所示, 阴影部分为只有猪瘟病毒 C-株存在的一个明显的富含 T 的插入序列 CTTTTTCTTTT, 设计含有此标记序列的 CSFV 特异 PCR 和 nested-PCR 引物对。

表 1 用于筛选标记序列的 CSFV 3'UTR 核苷酸序列差异分析 (DNA star)

Table 1 Nucleotide sequence comparing of CSFV 3'UTR used to select marker sequence (by DNA star)

毒株	3'UTR 序列 Sequences of 3'UTR							
Strains	10	20	30	40	50	60	70	80
Majority	GCGCGGTAA	CCCGGGATCT	GGACCCGCCA	GTAGGACCT	ATTGTAGATA	ACACTAATTT	---T---	-----T
ALD.seq							-----	-----
Alfort(187).seq	A.....C..						-----	-----
CAP.seq					A..		-----	-----
Brescia.seq							---A---	-----
F114.seq		A..					-----	-----
Bystrop.seq			A..	G.....		TTTT.	-----	-----
GPE-.seq	C..						-----	-----
Riems.seq	A.....C..						-----	-----
Shimen.seq		A..					-----	-----
LZSYCS.seq		A..					---CTTTT TT---CTTTT	---
HorlandCS.seq		A..					---CTTTT TTTCTTTT	---
WHDXCS.seq		A..			C..		---CTTTT TT---CTTTT	---

毒株	3'UTR 序列 Sequences of 3'UTR							
Strains	90	100	110	120	130	140	150	160
Majority	TATTTATTTA	GATATTATTA	TTTAT---T	TATTTATTTA	TTTATTTGAAT	GAGTAAGAAC	TGGTACAAC	TACCTCAAGT
ALD.seq		C..	-----					
Alfort(187).seq			-----					
CAP.seq	C.....	C..	-----CTAT.		-----			
Brescia.seq	-----	C..	-----					
F114.seq		G.....C..	-----					
Bystrop.seq	-----	C..	-----					
GPE-.seq	-----		-----				C..	
Riems.seq			-----					
Shimen.seq		G.....C..	-----					
LZSYCS.seq			-----				T.....	
HorlandCS.seq			-----				T.....	
WHDXCS.seq			-----				T.....	

续表 1 Continue table 1

毒株 Strains	3'UTR 序列 Sequences of 3'UTR									
	170	180	190	200	210	220	230	240	250	
Majority	TACCACACTA	CACTCATT	TTT TAACAGCACT	TTAGCTGGAA	GGAAAATTCC	TGACGTCCAC	AGTTGGACTA	AGGTAATTTC	CTAACGGCCC	
ALD.seq										229
Alfort (187).seq										229
CAP.seq		-C.....				T				228
Brescia.seq										228
F114.seq									-.....	228
Eystrup.seq										232
GPE-.seq										229
Riems.seq						T..				229
Shimen.seq										229
LZSYCS.seq									-.....	240
HorlandCS.seq									-.....	242
WHDXCS.seq									-.....	240

2 2 设计合成的引物

表 2 中引物对 F-R 用于对 CSFV 待测毒株的 RT-PCR, F⁺N 用于相应片段的 nested-PCR。

表 2 设计合成的 PCR 和 nested-PCR 引物对(GOLDkey)

Table 2 PCR and nested-PCR primer pairs (by GOLDkey)

引物 Primer	核苷酸序列 Nucleotide sequence
F	5 'CTGAACTGCAAGTGAAACCA GGG-3 '
F'	5 'TCTGCCTACAA GGAA GTCA TCGG-3 '
R'	5 'CCTTA GTCCAACTGTGGACGTCA GG-3 '
R	5 'GGCCGTTA GAAAT TACCTTA GTCC-3 '

2 3 RT-PCR 和 nested-PCR 扩增产物

由图 1 知,从可疑发病猪及健康免疫猪样品中,均成功扩增出了包含遗传标记相应序列的片段,以健康非免疫猪为阴性对照,C-株阳性样品为对照。

2 4 测定结果分析

采用 DNA star 软件进行分析,结果表明,可疑

发病猪所测片段不含 C-株标记序列(表 3 中阴影部分),故可以判定,该猪为猪瘟其他毒株感染。

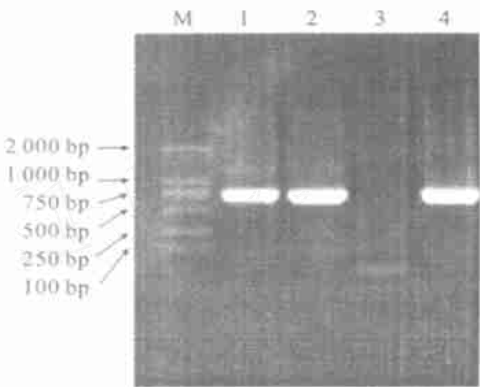


图 1 RT-PCR 和套氏 PCR 目的片段
M. 标准分子量 DL 2000; 1 可疑发病猪; 2 健康免疫猪;
3 健康非免疫猪对照; 4 C-株阳性对照
Fig 1 Target fragments by RT-PCR and nested-PCR
M. DNA Marker DL 2000; 1 Suspicious ill pig;
2 Health vaccinated pig; 3 Control of health unvaccinated pig; 4 Positive control of C-strain

表 3 待测样品和 C-株所测序列比较(DNA star)

Table 3 Comparing of fragments of unknown sample and C-strain (by DNA star)

毒株 strains	核苷酸序列 Nucleotide Sequence									
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
C-strain.seq	TCTGCTACA	AGGAAGTCAT	CGGCCACAAT	CTTTTGTATC	TTAAGAGAAC	AAGCTTTGAG	AAGCTGGCCA	AGTTAAATCT	TAGCATGTCT	
Unknown.seq		...T.....		...C.....	..C.....	C...				
毒株 strains	核苷酸序列 Nucleotide Sequence									
	100	110	120	130	140	150	160	170	180	
C-strain.seq	GTACTCGGG	CCTGGACTAG	ACACACCAGT	AAAAGACTAC	TACAAGACTG	TGTCAATATA	GGTGTAAAG	AGGGCAACTG	GCTTGTCAAT	
Unknown.seq					G			A..T...		
毒株 strains	核苷酸序列 Nucleotide Sequence									
	190	200	210	220	230	240	250	260	270	
C-strain.seq	GCAGACAGAC	TAGTAAGTAG	CAAGACCGGG	AATAGGTACA	TACCCGGAGA	GGGTCACACC	CTGCAAGGAA	GACATTATGA	AGAAGTGGTG	
Unknown.seq			T.....	..C.....	C.....	G.				
毒株 strains	核苷酸序列 Nucleotide Sequence									
	280	290	300	310	320	330	340	350	360	
C-strain.seq	TTGGCAAGAA	AACAGATCAA	CAACTTTCAA	GGGACAGACA	GGTACAACCT	AGGCCCAATA	GTCAACATGG	TGTTAAGGAG	GCTGAGAGTC	
Unknown.seq		T.....	G.....	T..	G.....					

续表 3 Continue table 3

毒株	核苷酸序列 Nucleotide Sequence								
strains	370	380	390	400	410	420	430	440	450
C-strain.seq	ATGATGATGA	CGCTGATAGG	GAGAGGGGCA	TGAGCGCGGG	TAACCCGGA	TCTGAACCG	CCAGTAGGAC	CCTATTGTAG	ATAACACTAA
Unknown.seq			T.						

毒株	核苷酸序列 Nucleotide Sequence								
strains	460	470	480	490	500	510	520	530	540
C-strain.seq	TTTTCTTTT	TCTTTTTTAT	TTATTTAGAT	ATTATTATTT	ATTTATTAT	TTATTATTG	AATGAGTAAG	AACTGGTATA	AACTACCTCA
Unknown.seq			G.	C.....	T.....				

毒株	核苷酸序列 Nucleotide Sequence						
strains	550	560	570	580	590	600	610
C-strain.seq	AGTTACCACA	CTACACTCAT	TTTTAACAGC	ACTTTAGCTG	GAAGGAAAAT	TCCTGACGTC	CACAGTTGGA
Unknown.seq							

3 讨 论

在进行 RT-PCR 时, 由于组织材料中病毒含量很低, 逆转录产物 cDNA 第一链直接用于 RT-PCR 扩增, 很难获得目的片段^[4]。故采用 nested-PCR 技术进行二次扩增, 既能解决病毒含量低的问题, 又可增强 PCR 扩增过程中的特异性, 避免非特异性条带的干扰, 提高检测的灵敏度。有资料表明^[5], 采用 nested-PCR 技术, 检测灵敏度可比原来提高 1 000 倍。在设计引物时, 本试验扩增了大于 3 U TR 的片段, 长约 600 bp, 这主要是方便 PCR 操作和检测, 1 次设计合成的引物可用于众多样品的检测。

对 CSFV 已发表的基因组核苷酸序列比较分析发现, CSFV C-株在基因组的 3 U TR 区域较其他毒株均多了 1 个明显的富含 T 的短片段差异序

列 CTTTTTTCTTTT。有人认为, 该序列可能是 CSFV 强毒在免化致弱时产生的一个遗传标记^[6], 因当时分子生物学水平的限制, 现在已无法确证我国 C-株免化致弱的前身究竟是哪一强毒株。但是, 利用这一差异明显的标记序列, 可以有效区别 CSFV C-株和其他毒株。由于我国所用猪瘟弱毒苗全部为猪瘟 C-株疫苗株, 一旦在可疑猪群中检测到不含该标记序列的猪瘟病毒, 即可视为被猪瘟的其他毒株感染。

本法虽然在实际应用中代价较高, 但其具有检出率高、精确等优点, 并且能有效检出毒株, 从而防止 CSFV 的大面积流行, 而且对于 CSFV 新毒株的发现以及猪瘟的分子流行病学的研究具有重要意义。

[参考文献]

[1] 刘湘涛, 赵启祖, 李忠润, 等. 猪瘟病毒和猪瘟的防制[A]. 谢庆阁, 翟中和. 畜禽重大疫病免疫研究进展[C]. 北京: 中国农业科技出版社, 1996 321- 338

[2] Fritzeneier J, Teuffert J, Greiser-Wilke I, et al. Epidemiology of classical swine fever in Germany in the 1990s[J]. Vet Microbiol, 2000, 77(1- 2): 29- 41.

[3] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1995 19- 22

[4] Liu Shitong, Li Shu'nin, Wang Ding-cheng, et al. Rapid detection of hog cholera virus in tissues by the polymerase chain reaction[J]. Journal of Virological Methods, 1991, 35: 227- 234

[5] Barlic-Maganja D, Grom J. Highly sensitive one-tube RT-PCR and microplate hybridization assay for the detection and for the discrimination of classical swine fever virus from other pestiviruses[J]. J Virol Methods, 2001, 95(1- 2): 101- 110

[6] Wu H X, Wang J F, Zhang C Y, et al. A attenuated lapinized chinese strain of classical swine fever virus: complete nucleotide sequence and character of 3' noncoding region[J]. Virus Genes, 2001, 23 (1): 69- 76

Molecular cloning and sequence analysis of bovine beta-casein gene 5' , 3' control region

L IU J in-long, ZHENG Yue-mao, WANG Yu-jie, ZHANG Yong

(Institute of Bio-Engineering, Northw est Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 5' and 3' control region of bovine CSN 2 were partially cloned by normal and recombinant PCR. The former consisted in all of the 5' upstream sequence, the first exon and part of first intron, while the later included the last exon and 3' flanking fragment. The purified PCR products were sub-cloned to pMD 18-T Vector, then sequenced correspondently and analysed by bio-soft. The results indicated that the two cloned fragments have the homology of 99.0% and 98.0% respectively with the comparable region of bovine CSN 2. Moreover, all the vital regulatory elements and many factors binding sites were found in the two fragments. The above suggested that the expressing vector, constructed by the two cloned fragments and work under the control model of endogenous CSN 2, could direct the target gene to express specifically and efficiently in mammary gland.

Key words: cow; CSN 2; control region; PCR; sequence analysis

(上接第 98 页)

A molecular biology method to differentiate C-strain from other strains of CSFV

HU Jian-he¹, CHEN Yong-yao¹, Wei Gang-cai¹,

Wang San-hu¹, ZHANG Yan-ming², XIE Qing-ge³

(1 Animal Science Department of Henan Vocational-technical Teacher's College, Xinxiang, Henan 453003, China;

2 College of Animal Science and Technology, Northw est Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

3 Lanzhou Veterinary Research Institute, Lanzhou, Gansu 730046, China)

Abstract: A difference marker sequence CTTTTTCTTTT was selected from C-strain and other strains of CSFV, and specific PCR primer pair and nested-PCR primer pair were designed at the basis of previously published sequences of CSFV. Total RNA was extracted from spleens or lymph nodes of suspicious ill pigs. Target fragments were amplified utilizing RT-PCR and nested-PCR techniques. After purification and recovery, the target fragments were cloned into pMD18-T vectors and further sequenced. According to sequence analysis, sequence containing the marker sequence belongs to C-strain and others belongs to other strains of CSFV.

Key words: classical swine fever; RT-PCR; nested-PCR; marker sequence; differentiation diagnosis