

应用RT-nested PCR 检测猪传染性胃肠炎病毒^{*}

王玉洁, 刘金龙, 彭树英, 杨瑞锋, 张 涌

(西北农林科技大学 生物工程研究所, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 根据GenBank 中已发表的猪传染性胃肠炎病毒(TGEV) 基因序列, 利用Primer 5.0 程序软件, 设计并合成了M 基因的2 对引物, 以mRNA 为模板, 通过RT-PCR, RT-nested PCR 方法, 成功扩增出长度为1 328 bp 和1 037 bp 的TGEV 目的片段, 但未扩增出猪传染性腹泻病毒(PEDV) 片段。在优化RT-PCR 反应条件的基础上, 建立了快速检测TGEV 的诊断方法。结果表明, RT-nested PCR 方法可用于检测猪传染性胃肠炎病毒, 而且此方法简单省时、灵敏性高, 可以作为检测RNA 病毒的一种分子生物学方法。

[关键词] 猪传染性胃肠炎病毒; RT-PCR; RT-nested PCR; M 基因

[中图分类号] Q 785

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)02-0023-04

猪传染性胃肠炎是由猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)引起的一种急性、高度接触性传染病, 各种年龄及品种猪对本病均易感, 其中2 周龄以下仔猪的致死率可达100%^[1~3]。此病与猪流行性腹泻症状极为相似, 仅从临床症状上难以作出诊断。目前仅可通过免疫电泳法来区分这2 种病毒, 但设备昂贵, 成本较高, 实际生产中不宜推广普及。1997 年, Woods^[4]和 Paton 等^[5]应用 RT-PCR 技术检测 TGEV, 证实RT-PCR 是一种特异敏感的诊断方法。本研究旨在通过优化RT-PCR 反应条件^[6], 建立快速灵敏的TGEV 的分子生物学检测方法, 为该病与猪流行性腹泻的正确诊断和流行病学研究提供更为敏感和可靠的检测手段。

1 材料与方法

1.1 毒株与试剂

试验用TGEV 和猪传染性腹泻病毒(PEDV) 乳猪的小肠组织毒, 由西北农林科技大学杨增歧教授惠赠; TR Izol 试剂、反转录酶、Rnase 抑制剂、dNTP 均购于Gibco 公司; Taq DNA 聚合酶为宝生物公司产品。限制性内切酶、DNA Marker 为MBI 公司产品。

1.2 RNA 的提取

采用TR Izol 法, 从猪小肠组织毒中直接提取总RNA。首先, 将组织研磨成粉末状, 研磨过程中要不

断添加液氮, 以防止RNA 降解; 然后加预冷的TR Izol 1 mL, 充分混匀, 室温静置5 min, 加200 μ L 氯仿, 剧烈震荡15 s, 室温静置3 min, 4 $^{\circ}$ C下15 000 r/min 离心15 min, 此时样品分3 层, 小心地将上清液转移至一个新的1.5 mL 离心管中, 加500 μ L 异丙醇, 沉淀RNA, 摇匀, 室温静置10 min, 4 $^{\circ}$ C下15 000 r/min 离心10 min, 可见管底或管壁有球状或胶状沉淀; 然后, 弃上清, 加体积分数75% 乙醇1 mL 洗涤RNA, 涡旋震荡RNA 沉淀, 4 $^{\circ}$ C下10 000 r/min 离心10 min; 最后, 重新溶解RNA, 弃上清, 风干5~10 min, 加入30 μ L 焦碳酸二乙酯(DEPC) 处理水溶解RNA, 60 $^{\circ}$ C水浴10 min, 此时样品可以直接反转录, 剩余RNA 于-70 $^{\circ}$ C冷冻保存, 1 个月内RNA 降解不明显。

1.3 引物设计与合成

根据GenBank 中报告的TGEV M 基因cDNA 序列^[7,8], 设计2 对引物, 外引物的扩增长度包括sM 基因和M 基因, 共1 328 bp。

上游引物(S1):

5' tgc acg tca att aag cgg ttc taa a 3'

下游引物(S2):

5' aac caa tca gcg gat ccc tgt tac ct 3'

内引物扩增M 基因, 长度1 037 bp。

上游引物(M1):

5' ccg atg aag aac tcc ttg ttt gaa 3'

* [收稿日期] 2004-01-06

[基金项目] 国家“863”高技术资助项目(2001AA 213081)

[作者简介] 王玉洁(1977-), 女, 山东淄博人, 在读硕士, 主要从事分子生物学研究。

[通讯作者] 张 涌(1956-), 男, 内蒙古和林格尔人, 教授, 博士生导师, 主要从事哺乳动物胚胎工程和发育生物学研究。

下游引物(M 2):

5'cca atc tga aga tcc ctg tta cct att c 3'

引物由北京赛百胜生物公司合成,用高压灭菌水稀释成 $10\text{ }\mu\text{mol}/\mu\text{L}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.4 RT-PCR 反应

在DEPC水处理过的 0.5 mL PCR反应管中依次加入RNA($10\text{ pg}\sim 5\text{ }\mu\text{g}$) $5\text{ }\mu\text{L}$,下游引物S2($10\text{ }\mu\text{mol}$) $1\text{ }\mu\text{L}$ 和DEPC处理水 $4\text{ }\mu\text{L}$, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min 后立即放于冰上,使RNA和引物充分变性并解除RNA的二级结构,冰上再依次加入 $5\times\text{dDNA}$ Synthesis Buffer $4\text{ }\mu\text{L}$, DTT $1\text{ }\mu\text{L}$, Rnase out $1\text{ }\mu\text{L}$, DEPC处理水 $1\text{ }\mu\text{L}$, dNTP $2\text{ }\mu\text{L}$, ThermoScript RT $1\text{ }\mu\text{L}$, 反转录总体积 $20\text{ }\mu\text{L}$,轻轻摇匀并瞬时离心。然后, $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 50 min , $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 min ,反应结束后即完成反转录,生成cDNA。

取上述cDNA $2\text{ }\mu\text{L}$ 进行PCR反应,分别加引物S1和S2各 $1\text{ }\mu\text{L}$, dNTP $1\text{ }\mu\text{L}$, Taq Buffer $5\text{ }\mu\text{L}$, Taq DNA聚合酶 $0.5\text{ }\mu\text{L}$,加ddH₂O至 $50\text{ }\mu\text{L}$,混匀,瞬时离心,置PCR仪中, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min , $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min , $53\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min , 30个循环,最后再 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min , PCR反应结束后,取反应产物 $5\text{ }\mu\text{L}$ 进行琼脂糖凝胶电泳 1 h ,在凝胶成像仪中观察电泳

结果^[9]。

1.5 嵌套式反转录PCR(RT-nested PCR)

取上述RT-PCR产物 $2\text{ }\mu\text{L}$,加引物M1和M2各 $1\text{ }\mu\text{L}$, dNTP $1\text{ }\mu\text{L}$, Taq Buffer $5\text{ }\mu\text{L}$, Taq DNA聚合酶 $0.5\text{ }\mu\text{L}$,加ddH₂O至 $50\text{ }\mu\text{L}$,混匀,瞬时离心,置PCR仪中, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min , $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min , $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min , 30个循环,最后再 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min , PCR反应结束后,取反应产物 $5\text{ }\mu\text{L}$ 进行琼脂糖凝胶电泳 1 h ,在凝胶成像仪中观察电泳结果。

1.6 特异性试验

同样用TRIzol法提取PEDV的猪小肠组织毒的总RNA,然后分别用上述2对引物S1, S2和M1, M2进行RT-PCR, RT-nested PCR,检测该扩增反应的特异性。

2 结果与分析

2.1 总RNA提取结果

从TGEV和PEDV的猪小肠组织毒中,成功提取了较完整的总RNA,并进行甲醛变性琼脂糖凝胶电泳和普通琼脂糖凝胶电泳,检测总RNA的完整性,结果见图1和图2。从图1,2可清晰观察到28S RNA、18S RNA 2条主带以及较弱的5S RNA带。

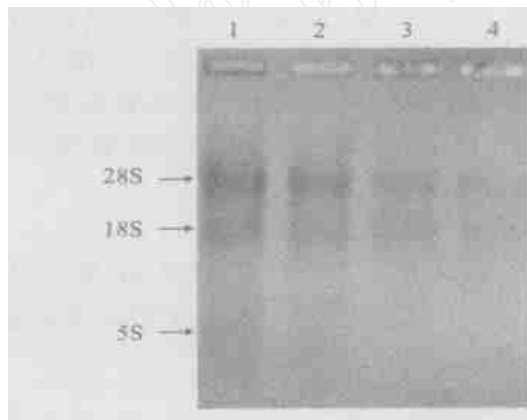


图1 RNA 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳
1~4 提取的RNA 病毒

Fig 1 Results of formaldehyde gel electrophoresis
1- 4 Extracts of RNA virus

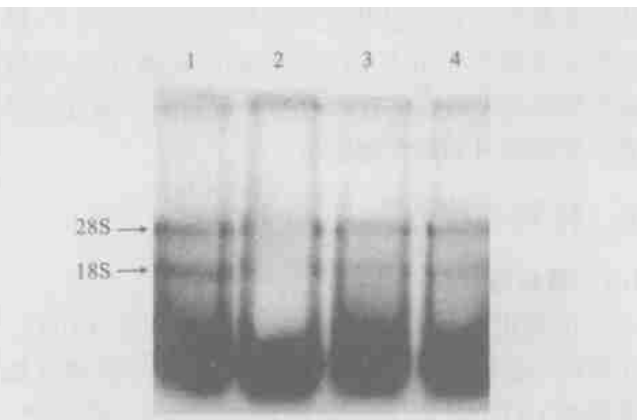


图2 RNA 普通琼脂糖凝胶电泳
1~4 提取的RNA 病毒

Fig 2 Results of agarose gel electrophoresis
1- 4 Extracts of RNA virus

2.2 RT-PCR 扩增结果

从猪小肠组织毒中提取总RNA,通过RT-PCR方法成功地扩增出了1条长度为 $1\text{ }328\text{ bp}$ 的特异性条带(图3),与预期的扩增片段大小一致,而且无非特异性条带干扰,目的带清晰明亮,表明扩增结果特

异性较强。

2.3 RT-nested PCR 扩增结果

以RT-PCR产物($1\text{ }328\text{ bp}$)为模板,进行RT-nested PCR反应,也成功地扩增出1条特异性带,大小为 $1\text{ }037\text{ bp}$,与目的片段的理论值相符(图3)。

2.4 特异性试验

从 PEDV 的猪小肠组织毒中提取总 RNA, 通过

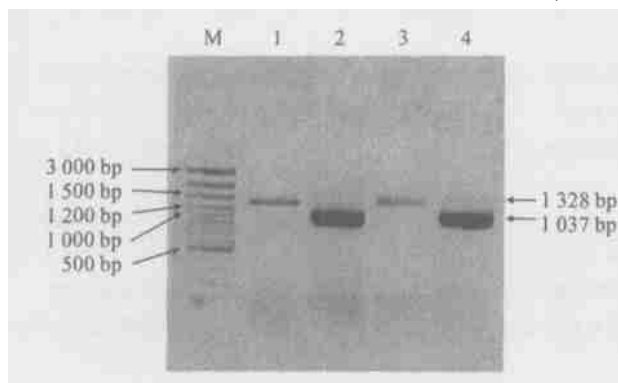


图3 RT-PCR (RT-nested PCR) 电泳结果

M. DNA marker; 1, 2 LA Taq 酶结果; 3 4 Pymobest 酶结果

Fig 3 Results of RT-PCR (RT-nested PCR)

M. DNA marker; 1, 2 Results of LA Taq;
3 4 Results of pymobest

RT-PCR 方法扩增后, 凝胶电泳未见扩增产物(图4)。

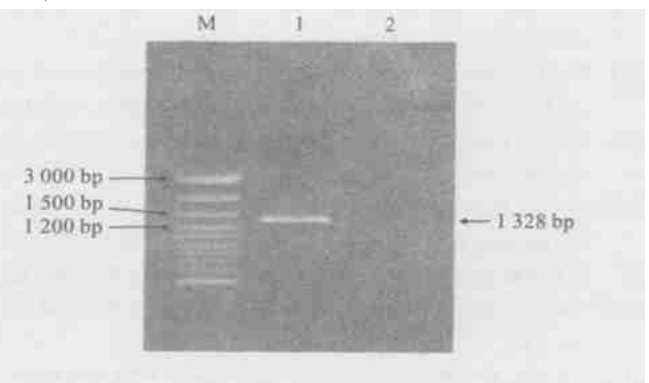


图4 RT-PCR 检测结果

M. DNA marker; 1 TGEV 检测结果; 2 PEDV 检测结果

Fig 4 Results of RT-PCR

M. DNA marker; 1 Results of TGEV;
2 Results of PEDV

3 讨论

目前, 主要采用电泳技术、免疫荧光技术、ELISA 法等传统方法检测病毒的存在, 这些方法都需要对病毒进行分离, 而病毒的分离过程繁琐, 操作难度大, 鉴定时还必须经过大量的前期处理, 需要时间较长^[10]。电泳法无法正确区别诸如 PEDV 和 TGEV 这类形态很相似的病毒; 免疫荧光技术非特异性强, 敏感性低; ELISA 方法所用抗体较难制备, 价格昂贵, 繁琐费时^[11]。因此, 急需建立一种快速、简单、省时、敏感、特异性强的检测方法。

RT-PCR 和 RT-nested PCR 是近几年发展起来的较为理想、可靠的检测方法。本研究运用 TRIzol 法直接从组织病料中提取 RNA, 不仅保证了 RNA 的完整性, 而且大大缩短了样品处理时间, 更免除了分离病毒、细胞繁毒的繁琐过程。通过引物设计软件 Primer 5.0 设计高特异性引物, 应用 RT-nested PCR 方法成功地扩增出 TGEV 的 2 段基因序列, 序列测定结果与 GenBank 中发表的基因序列同源性达 96%, 而且无假阳性出现。RT-nested PCR

所需仪器设备简单, 方法较易掌握, 发展渐趋成熟, 并且结果易观察判断, 在生产上可用于病毒检测。本研究结果也表明, RT-nested PCR 方法简单易行、灵敏度高、特异性强, 是一种快速诊断 TGEV 的有效方法, 可在生产实践上推广普及。

但是, 应用 RT-nested PCR 也要注意一些问题。首先, 应注意环境中 RNase 对 RNA 的降解, 保证所提取 RNA 的完整性; 其次, 引物设计时要遵循引物设计的原则, 找出合适的、扩增特异性强的引物; 再次, 要优化 PCR 反应条件, 使微量模板存在时就可以扩增出特异性产物; 最后, 在试验中要严格设计好阴性和阳性对照, 对试验结果应该辩证分析, 防止假阳性和假阴性结果。一般假阳性结果多为操作过程中交叉污染、RNA 降解所致; 而假阴性比较难以判断, 有可能是操作的原因(比较容易排除), 也有可能是引物设置在比较容易变异的区域, 目的基因已经发生变异, 这需要对照其他试验^[10]。因此, 设计特异性高的引物在一定程度上可避免假阴性和假阳性的出现。

[参考文献]

- [1] Simanuram itr T, Siddell S, Grahare F, et al Porcine transmissible gastroenteritis virus induced apoptosis in swine testes cell cultures[J]. Archives of Virology, 1998, 143(12): 2471- 2485
- [2] Jones T, Shenk T. Transmissible gastroenteritis virus of pigs[J]. Veterinary Record, 1997, 141(16): 427- 428
- [3] 殷震, 刘景华 动物病毒学[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1997. 671- 704

- [4] Woods R D. Development of PCR-based techniques to identify porcine transmissible gastroenteritis coronavirus isolated[J]. Can J Vet Res, 1997, 61(3): 167- 172
- [5] Paton D, Iyata G, Sands J, et al Detection of transmissible gastroenteritis virus by RT-PCR and differentiation from porcine respiratory coronavirus[J]. J Virol Methods, 1997, 66(2): 303- 309
- [6] Kim O, Chol C, Kim B, et al Detection and differentiation of porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus in clinical sample by multiplex RT-PCR[J]. Vet Res, 2000, 146(22): 637- 640
- [7] Eleouet J, Bett A, Koolen M, et al Complete sequence of the polyprotein-encoding gene 1 of transmissible gastroenteritis virus[J]. Journal of Virology, 1995, 206: 817- 822
- [8] Wesley R, Woods R, Cheuny A. Nucleotide sequence of the E2-peplomer protein gene and partial nucleotide sequence of upstream polymerase gene of transmissible gastroenteritis virus[J]. Adv Exp Med Bio, 1990, 276: 301- 306
- [9] 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 金冬雁, 黎孟枫, 译 北京: 科学出版社, 1993 674- 683
- [10] 邹勇, 钱永清, 唐永兰, 等 猪流行性腹泻、猪传染性胃肠炎和猪轮状病毒RT-PCR 鉴别诊断技术研究[J]. 上海农业学报, 2003, 19(2): 82- 84
- [11] 吴凌, 李一经, 田志军, 等 应用RT-nested PCR 检测猪流行性腹泻病毒的研究[J]. 中国兽医科技, 2003, 33(3): 27- 30

Study on detecting transmissible gastroenteritis virus by reverse transcription-nested polymerase chain reaction

WANG Yu-jie, LIU Jin-long, PENG Shu-ying, YANG Rui-feng, ZHANG Yong

(Institute of Bio-Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Two pairs of oligonucleotide primers appropriate for PCR amplification were selected based on the gene encoding of the M protein of TGEV. The amplified products of TGEV were 1 328 bp, 1 037 bp respectively, but as to PEDV nothing was amplified. By a reverse transcription-nested polymerase chain reaction (RT-nested PCR) assay, a quick detection of TGEV after optimization of the reaction conditions was developed. The results showed that RT-PCR assay can be used to detect the virus of RNA.

Key words: TGEV; RT-PCR; RT-nested PCR; M gene