

猪瘟强弱毒鉴别多重 RT-PCR 方法的建立及应用

胡建和, 杭柏林, 王 青, 李任峰, 刘兴友, 王三虎

(河南科技学院 动物科学学院, 河南 新乡 453003)

【摘 要】 【目的】 建立一种能够应用于临床样本猪瘟病毒(CSFV)检测的快速、简便且标准化程度高的检测技术,以满足畜牧业生产和兽药市场的需求。【方法】 根据 GenBank 中猪瘟病毒及近源病毒的基因组全序列,选择特异保守区域设计了 2 对猪瘟病毒引物,借助 3'端引物碱基错配对 PCR 扩增效率的影响,优化筛选了能够鉴别猪瘟兔化弱毒疫苗和强毒疫苗的 PCR 退火温度,经多重试验组合建立了一套鉴别猪瘟强毒和弱毒的多重 RT-PCR 鉴别诊断方法。【结果】 扩增反应条件的确定试验表明,退火温度为 55 ℃;特异性分析表明,从弱毒 C 株和石门强毒株的基因组中分别扩增出 1 条大小为 492 和 178 bp 的特异性片段,从强弱毒株混合物中 1 次扩增出 2 条大小为 492 和 178 bp 的特异性片段,检测不到伪狂犬病病毒的 RNA;敏感性分析表明,该方法能检测出 0.8 pg 的猪瘟病毒 RNA;应用试验表明,8 份疑似猪瘟病料中 5 份为强毒感染,2 份为弱毒感染,1 份为弱毒和强毒的混合感染。【结论】 研究建立的多重 RT-PCR 方法具有敏感性、特异性强、重复性好的特点,对养猪业的发展具有十分重要的意义。

【关键词】 猪瘟病毒;多重反转录聚合酶链式反应;鉴别诊断

【中图分类号】 S852.65⁺1 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2008)11-0047-05

Foundation and application of multi-RT-PCR method for the differentiation of wild-type and vaccine viruses of classic swine fever virus

HU Jian-he, HANG Bo-lin, WANG Qing, LI Ren-feng, LIU Xing-you, WANG San-hu

(College of Animal Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003, China)

Abstract: 【Objective】 This study established a rapid, simple, high standardized technique for the clinical detection of classic swine fever virus (CSFV) to meet the development of animal husbandry and the demand of veterinary drugs market. 【Method】 Two pairs of primers were designed and synthesized according to the highly conserved regions of CSFV and near origin virus genome sequence in Genabank. The anneal temperature of polymerase chain reaction (PCR) was optimized with the effect of the mismatch of 3' basic group of primers on the amplification efficiency of PCR. Then the multiplex RT-PCR method for the differentiation of wild-type and vaccine viruses of CSFV was established after tests. 【Result】 The confirmed test of reacting condition showed that the anneal temperature was 55 ℃. The specificity test showed that a fragment of 492 bp or 178 bp was respectively amplified from genomic RNA of C-strain or Shimen strain, two fragments of 492 bp and 178 bp were simultaneously amplified from the mixed RNA sample of C-strain and Shimen strain, and no amplification was achieved from Pseudorabies virus RNA. The sensitivity test showed that the RT-PCR could detect 0.8 pg of CSFV RNA. The amplification test showed that five of

* 【收稿日期】 2007-12-06
【基金项目】 河南省高等学校青年骨干教师资助计划项目(2005461)
【作者简介】 胡建和(1968—),男,河南辉县人,副教授,博士,主要从事动物微生物学和病毒分子生物学研究。
E-mail: hujianhe@hist.edu.cn

eight field samples suspected of CSF were found to be Shimen-like,2 to be C-strain-like,and 1 to be Shimen-like and C-strain-like mixture by this method.【Conclusion】The result indicated RT-PCR method had specificity,sensitive, repetitive characteristics,and was significant for the development of pig industry.

Key words: classical swine fever virus;multiplex RT-PCR;detection and differentiation

猪瘟(Classical swine fever,CSF)是一种由猪瘟病毒(Classical swine fever virus,CSFV)引起的严重危害养猪业的高度接触性传染病。CSFV 属于黄病毒科(Flaviviridac)瘟病毒属(Pestivirus),为单股正链 RNA 病毒。CSFV RNA 基因组全长 12.3 kb,含有单一的开放阅读框(ORF),可顺次翻译衣壳蛋白 C 和囊膜糖蛋白 E1、E2、E3 等 4 种结构蛋白以及 3~5 种非结构蛋白。其中,E2(gp55)是最具免疫活性的囊膜糖蛋白,可诱导动物产生有效的免疫保护^[1]。近些年来,古典猪瘟的流行病学特点发生了明显变化,出现了非典型、温和型和隐性古典猪瘟^[2],在病理剖检上也常常不同于典型猪瘟的病理变化,给兽医临床诊断带来了很大困难。

猪瘟弱毒疫苗在中国的大规模应用,使猪瘟野毒感染和疫苗接种的区分变得非常困难但又十分必要^[3],因此亟待建立一种可以准确诊断猪瘟野毒感染的敏感而特异的检测方法。Zaberezhny 等^[4]采用 RT-PCR 和 RFLP 分析来区分猪瘟野毒株和疫苗株,但操作步骤较为复杂。罗廷荣等^[5]以 3 对猪瘟病毒特异性引物对病料进行多次 RT-PCR 检测,并结合 RFLP 分析,用以区分猪瘟野毒株、石门株与兔化弱毒株,但是程序复杂、技术繁琐、耗时较长。李艳等^[6]建立了鉴别猪瘟强毒和弱毒的反转录-复合

套式聚合酶链式反应检测方法,但是该方法进行的是套式 PCR,虽然敏感性很强,但是必须进行 2 次 PCR 反应,比较繁琐。国外也曾有几个实验室对猪瘟兔化弱毒株和当地强毒株的特异性单抗进行了研制,但其仅限于科学研究,并未应用于实验室检测和临床诊断。为此,本研究旨在建立一种能快速区分猪瘟强毒和弱毒的特异而敏感的 RT-PCR 分子鉴别诊断方法,以期对猪瘟病毒感染的早期、快速、准确诊断及猪瘟防制策略的制定提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 引物的设计与合成 对 GenBank 中公布的 F114 株、Alfort 株、Shimen 株、HCLV 株和武汉大学株等 25 株 CSFV 的基因组序列进行比较分析,利用 Primer 5.0 引物分析软件,设计了 P1/P2 和 P3/P4 2 对引物(表 1),P1、P2 分别为猪瘟强毒株特异性上、下游引物;P3、P4 分别为兔化弱毒疫苗 C 株特异性上、下游引物。P1/P2 预期扩增产物为 178 bp;P3/P4 预期扩增产物分别为 492 bp。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物在 CSFV F114 株和 C 株基因组中的位置见图 1。

表 1 PCR 引物的序列、位置及参考毒株
Table 1 Sequences, location and reference strains of PCR primers

引物 Primer	序列 Sequence	位置/bp Location	参考毒株 Reference strain
P1	5'-ATCAGTCTGGAATGTTGGCA-3'	2 195~2 213	F114 株
P2	5'-CAAGCAGATGAGGAATGCCG-3'	2 353~2 371	F114 strain
P3	5'-CACACACCAAGGTGGCATC-3'	5 315~5 334	C 株
P4	5'-TGAATTCTCCCCTGCTCATG-3'	5 786~5 805	C strain

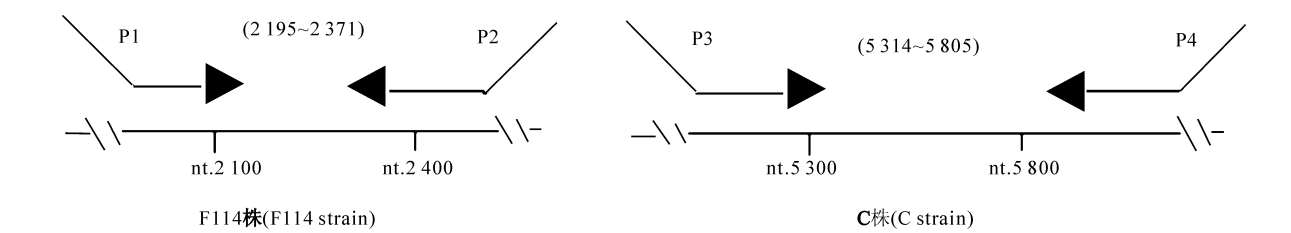


图 1 引物在猪瘟病毒 F114 株和 C 株基因组中的位置
Fig. 1 Location of primers in the genome of CSFV F114 and C strain

1.1.2 毒株 猪瘟兔化弱毒疫苗株(HCLV)和 猪瘟石门强毒株(Shimen),购于中国兽药监察所;

伪狂犬病病毒(PRV),由河南科技学院动物科学学院预防兽医学实验室分离鉴定并保存。

1.1.3 待检病料 待检病料(脾脏或扁桃体)采自河南省不同地区养猪场的疑似猪瘟病猪,共 8 份,编号为 HN1~HN8,直接用于检测。另外采取健康猪扁桃体作为阴性对照。

1.1.4 主要试剂 RNA 提取采用 GIBCOBRL 公司的 TRIzol LS Reagent 试剂盒,反转录酶(AMV)及反转录试剂、*Taq* DNA 聚合酶及 PCR 试剂、RNA 酶抑制剂、pGEM-T 载体,均为大连宝生物工程(大连)有限公司产品;纯化试剂盒,为 BOEHRINGER MANNHEIM 公司产品;酵母浸出物、水解酪蛋白,为 Oxoid 产品;DH5 α 工程菌株,由河南科技学院动物科学学院预防兽医学实验室保存。

1.2 CSFV RNA 的提取

CSFV RNA 的提取按 GIBCOBRL 公司的 TRIzol LS Reagent 试剂盒说明进行操作。

1.3 CSFV 的 RT-PCR

1.3.1 cDNA 的反转录合成 在一新的 Eppendorf 管中加入总 RNA 提取液 11 μ L、P2 和 P4 引物(50 pmol/ μ L)各 1 μ L,将其混匀后于 65 $^{\circ}$ C 孵育 10 min,立即冰浴 5 min,然后加入 5 $\times$ RT Buffer 4 μ L, dNTP(25 mmol/ μ L) 2 μ L, RNasin (20 U/ μ L) 1 μ L, AMV(10 U/ μ L)1 μ L。在 42 $^{\circ}$ C 下水浴 1 h,然后煮沸 5 min, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3.2 PCR 在一新的 Eppendorf 管中加入反转录 cDNA 液 5 μ L, 10 $\times$ PCR 缓冲液 5 μ L, MgCl₂ (25 mmol/ μ L) 4 μ L, dNTP(25 mmol/ μ L) 3 μ L, P1 和 P2 (50 pmol/ μ L) 各 0.5 μ L, P3 和 P4 (50 pmol/ μ L) 各 0.5 μ L, 灭菌双蒸水 30.5 μ L。配好反应液后,将 PCR 反应管置于 PCR 仪内。其反应程序如下:98 $^{\circ}$ C 4 min,再加入 *Taq* DNA polymerase (5 U/mL)0.5 μ L,反应总体积 50 μ L;然后 95 $^{\circ}$ C 30 s,在不同的退火温度下作用 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环;最后在 72 $^{\circ}$ C 下延伸 10 min。扩增完毕后,取 3 μ L 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳观察。

1.4 特异性试验

以引物 P1/P2、P3/P4 扩增猪瘟兔化弱毒株、石门强毒株和二者混合感染样品,以及 8 份河南省各地送检疑似猪瘟病料、伪狂犬病病毒(PRV)、正常猪瘟扁桃体阴性对照的基因组。

1.5 敏感性试验

将猪瘟病毒石门株基因组 RNA 经紫外分光光

度法定量后,取 8 μ g 进行 10 倍系列稀释,分别取 8×10^5 , 8×10^4 , 8×10^3 , 8×10^2 , 80, 8, 0.8, 8×10^{-2} , 8×10^{-3} , 8×10^{-4} 和 8×10^{-5} pg RNA 进行 RT-PCR 扩增,以检测该方法的敏感性。

1.6 重复性试验

用建立的复合 RT-PCR 法,分别对猪瘟兔化弱毒株、石门株及二者混合感染样品、河南省各地送检疑似猪瘟病料和伪狂犬病病毒(PRV)等细胞培养物和正常细胞对照样品重复检测 2 次,以验证试验的稳定性。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 扩增反应条件的确定及 RT-PCR 检测结果

以引物 P1/P2、P3/P4 在不同退火温度分别扩增兔化弱毒株、石门株 cDNA,结果发现,退火温度在 52~57 $^{\circ}$ C 时,均只出现 1 条特异的目的条带,但以 55 $^{\circ}$ C 扩增的条带最亮,故选用 55 $^{\circ}$ C 作为试验扩增时的退火温度。

应用确定的反应条件,对正常扁桃体细胞基因组、猪瘟兔化弱毒疫苗 RNA、石门株 RNA 及猪瘟兔化弱毒疫苗和石门株基因组 RNA 的混合物进行 RT-PCR 扩增,其结果如图 2 所示。

电泳结果(图 2)显示,利用本研究建立的 RT-PCR 方法并不能从正常扁桃体细胞基因组中扩增出任何条带,但可从猪瘟兔化弱毒疫苗 RNA 中扩增出 1 条 492 bp 的特异目的条带,可从石门株 RNA 中扩增出 1 条 178 bp 的特异目的条带,从猪瘟兔化弱毒疫苗和石门株基因组 RNA 的混合物可同时扩增出 492 和 178 bp 2 条条带。

2.2 RT-PCR 方法的特异性分析

由图 3 可见,应用建立的 RT-PCR 只能扩增兔化弱毒株以及石门强毒株基因组,而不能扩增出伪狂犬病病毒(PRV)感染细胞和正常对照细胞的基因组。用该方法对河南省送检的 HN1~HN8 8 份疑似猪瘟病料细胞培养物进行检测,结果显示,HN1~HN4、HN6 为强毒感染;HN5、HN7 为弱毒感染;HN8 为疫苗毒和强毒混合感染。

2.3 RT-PCR 的敏感性分析

由图 4 可知,猪瘟病毒石门株总 RNA 经定量后取 8 μ g 做 10 倍系列稀释,分别取不同含量的 RNA 进行 RT-PCR 扩增,结果显示,0.8 pg 的总 RNA 即能得到特异性扩增。

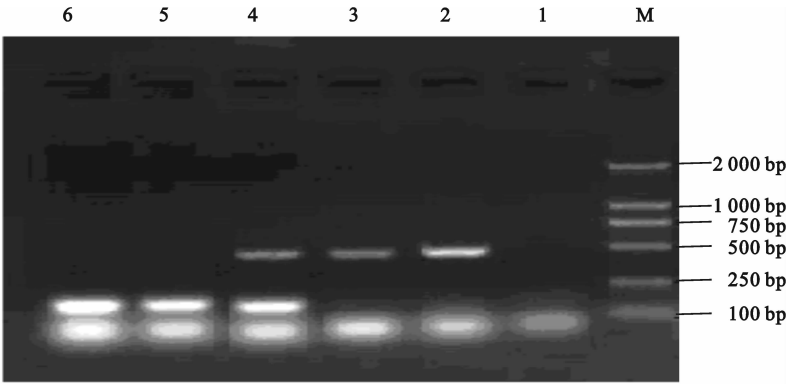


图 2 猪瘟疫化弱毒株 RNA 和石门株 RNA 及其基因组混合物的 RT-PCR
M. DL2000 DNA Marker;1. 正常对照细胞;2~3. 猪瘟疫化弱毒疫苗 RNA;4. 猪瘟疫化弱毒疫苗和石门株基因组 RNA 混合物;5~6. 石门株 RNA

Fig. 2 Amplification of genomic RNA of different CSFV strains by multiplex RT-PCR
M. DL2000 DNA Marker;1. Control tissue from health pig;2-3. HCLV genomic RNA;
4. Mixture of HCLV and Shimen genomic RNA;5-6. Shimen genomic RNA

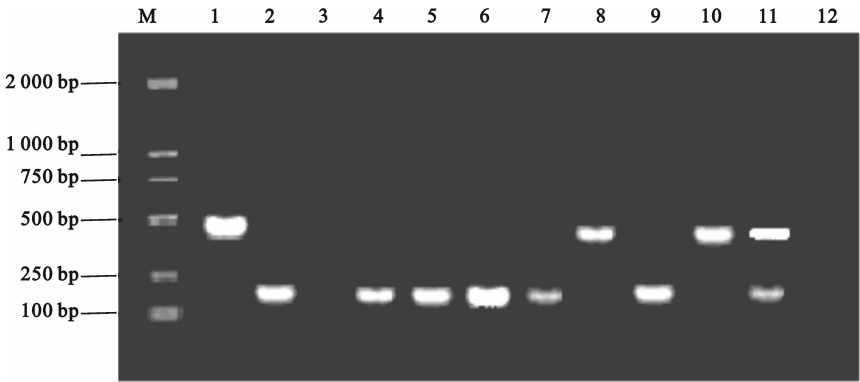


图 3 RT-PCR 方法的特异性分析
M. DL2000 DNA Marker;1. 猪瘟疫化弱毒疫苗 C 株;2. 石门株;3. 正常对照细胞;4~11. HN1~HN8;12. PRV
Fig. 3 The results of RT-PCR specificity

M. DL2000 DNA Marker;1. HCLV;2. Shimen;3. Control tissue from health pig;4-11. HN1-HN8;12. PRV

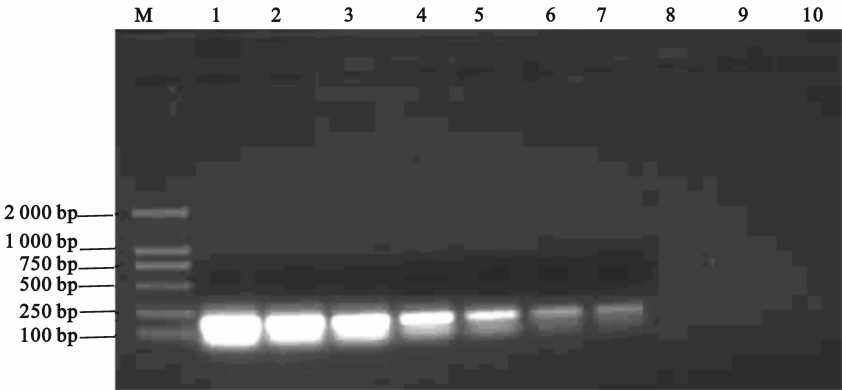


图 4 RT-PCR 方法的敏感性分析
M. DL2000 DNA Marker;1~10. 猪瘟疫石门株 RNA(分别为 8×10^5 , 8×10^4 , 8×10^3 , 8×10^2 , 80, 8, 0.8, 8×10^{-2} , 8×10^{-3} 和 8×10^{-4} pg)
Fig. 4 The results of RT-PCR sensitivity
M. DL2000 DNA Marker;1-10. HCLV genomic RNA (8×10^5 , 8×10^4 , 8×10^3 , 8×10^2 , 80, 8, 0.8, 8×10^{-2} , 8×10^{-3} , 8×10^{-4} pg, respectively)

2. 4 RT-PCR 的重复性分析

用建立的 RT-PCR 方法对每份样品进行 2 次

重复检测,结果表明,2 次的检测结果一致,说明该方法重复性良好。

3 讨论与结论

3.1 RT-PCR 方法的建立与逐步成熟

近几年来,随着分子生物学的发展,RT-PCR 技术已在猪瘟病毒检测中得到了应用,RT-PCR 具有简便、快速、特异、灵敏的特点,国内外许多学者和专家先后进行了 RT-PCR 快速检测感染组织中猪瘟病毒的报道。Barlic-Maganja 等^[7]建立了检测并鉴别牛病毒性腹泻病毒(BVDV)和 CSFV 的单管单酶 RT-PCR 诊断方法,缩短了检测时间,提高了病毒的检出率。周绪斌等^[8]建立了检测 BVDV 和 CSFV 的复合 RT-PCR 方法,其最小检出量达 10^{-1} TCID₅₀。Risatti 等^[9]开发了一种用于检测鼻拭子中猪瘟病毒的实时 RT-PCR,其敏感性超过了病毒分离结果(100% 比 72.4%),而其特异性略低于病毒分离结果(98.9% 比 100%)。Aguero 等^[10]报道了一种高度敏感而特异的一步复合 RT-PCR,可以同时检测并鉴别猪瘟病毒和非洲猪瘟病毒。Dewul 等^[11]对 CSFV 感染猪进行了病毒分离、抗原 ELISA 和 RT-nPCR 试验,结果发现,RT-nPCR 的检出率(98.9%)最高,表明 RT-nPCR 是 CSFV 感染早期诊断的最好方法。RT-nPCR 方法应用如此广泛,说明其对猪瘟病毒的病原学和流行病学研究非常适用,但上述这些方法均不能将猪瘟野毒感染猪从众多的疫苗接种猪中筛查出来。本研究根据 3'端引物碱基错配对 PCR 扩增效率的影响,优化筛选出了能够鉴别猪瘟兔化弱毒疫苗和强毒株的 PCR 退火温度,经多重试验组合建立了一套鉴别猪瘟强毒和弱毒的多重 RT-PCR 鉴别诊断方法。该方法具有特异性强、重复性好、敏感性高的优点,对猪瘟的诊断和防治具有非常重要的意义。

3.2 引物的特异性

本研究所用的引物 P1/P2 和引物 P3/P4 是分别根据 CSFV 强毒株和弱毒疫苗株的特异且高度保守区设计的,用引物 P1/P2 和引物 P3/P4 能分别从石门株 CSFV 基因组和兔化弱毒基因组中扩增出 178 和 492 bp 的特异性片段;而用 P1/P2、P3/P4 引物以复合 PCR 法分别扩增兔化弱毒株、石门强毒株以及二者混合物的基因组,则对兔化弱毒株只能扩增出 1 条 492 bp 的特异条带,对石门强毒株只扩增出 1 条 178 bp 的特异条带,而对兔化弱毒株和石门强毒株混合模板则能同时扩增出 492 和 178 bp 2 条特异条带。与此同时,用伪狂犬病病毒(PRV)细胞培养物以及正常细胞为模板均无扩增条带,表明本

试验具有特异性。本方法能从 0.8 pg 的猪瘟病毒石门株总 RNA 中扩增得到特异性片段,表明试验具有较高的敏感性。对 8 份疑似猪瘟样品进行 RT-PCR 检测,结果显示,有 5 份属于强毒感染,2 份属于弱毒感染,1 份属于强毒和弱毒疫苗混合感染。

3.3 试验的敏感性

若病料中病毒含量很低,将反转录产物直接用于 PCR 扩增则很难获得成功。据报道^[11],RT-PCR 对猪瘟病毒 RNA 的最低检出量为 0.04~0.4 pg。而本试验所需病毒 RNA 量必须大于此值,否则会因无法用肉眼从试验结果中观察到特异性核酸片段而被误判为阴性。李艳等^[6]建立的区分猪瘟强弱毒的 RT-nPCR 方法,能检测出 0.04 pg 的 CSFV RNA。李红卫等^[12]应用套式 PCR 从低丰度模板中扩增出了 CSFV 的某个基因。因此,采用套式 PCR 技术可以增加 PCR 扩增的特异性和敏感性。本方法能从 0.8 pg 的 CSFV 石门株总 RNA 中扩增到特异性片段,表明该方法具有一定的敏感性,但敏感性尚不够高。所以,利用套式 PCR 方法来提高本方法的敏感性,将是下一步研究的重点。

[参考文献]

- [1] 韩雪清,刘湘涛,张涌,等.猪瘟病毒 E2 基因在 *Pichia pastoris* 中的表达及其免疫活性的初步研究[J].生物工程学报,2002,18(2):208-221.
Han X Q, Liu X T, Zhang Y, et al. Study on the expression of E2 gene of classical swine fever virus in *Pichia pastoris* and the immunological activity of its expression product[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2002, 18(2):208-221. (in Chinese)
- [2] 乔军,陈创夫,贾桂珍.用 RT-PCR 法对猪瘟病毒检测的研究[J].塔里木农垦大学学报,2001,13(4):25-27.
Qiao J, Chen C F, Jia G Z. Detection of classical swine fever virus by reverse transcription polymerase chain reaction[J]. Journal of Tarim University of Agricultural Reclamation, 2001, 13(4):25-27. (in Chinese)
- [3] Paton D J, Simpson V, Done H. Infection of pigs and cattle with neon bovine viral diarrhoea virus on a farm in England[J]. Veterinary Record, 1992, 131:185-188.
- [4] Zaberezhny A D, Grebennikova T V, Kurinnov V V, et al. Differentiation between vaccine strain and field isolates of classical swine fever virus using polymerase chain reaction and restriction test[J]. Dtsch Tierarztl Wochenschr, 1999, 106(9):394-397.
- [5] 罗廷荣,波丹,黄宪高,等. RT-PCR 检测猪瘟病毒病料初探[J].广西农业生物科学,2001,20(1):17-20.
Luo Y R, Bo D, Huang X G, et al. Preliminary study on detection of hog cholera virus using reverse transcription polymerase chain reaction[J]. Journal of Guangxi Agriculture and Biological Science, 2001, 20(1):17-20. (in Chinese)