

DOI:CNKI:61-1390/S.20120223.1726.024

网络出版时间:2012-02-23 17:26

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120223.1726.024.html>

4 种猪群常见病毒基因芯片检测方法的建立与应用

杨若松^{1,2}, 姜金庆¹, 张 志², 李晓成², 王建华¹, 任夫波³, 张丽丽³

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100;

2 中国动物卫生与流行病学中心, 山东 青岛 266032; 3 青岛农业大学 动物科技学院, 山东 青岛 266032)

[摘 要] **【目的】**建立猪瘟病毒(CSFV)、高致病性猪蓝耳病病毒(PRRSV)、猪圆环病毒 2 型(PCV-2)及猪细小病毒(PPV)的基因芯片检测方法, 为这 4 种病的实验室诊断和流行病学调查提供一种快速、高效的病原学诊断方法。**【方法】**根据 GenBank 中 CSFV、高致病性 PRRSV、PCV-2、PPV 的相关基因序列, 设计合成相关引物, 采用 PCR 方法得到具有荧光标记的 PCR 产物, 然后与含有特定检测探针的芯片进行杂交, 建立其基因芯片检测方法, 并对该方法的灵敏性和重复性进行检测。应用建立的基因芯片检测方法, 对 150 份临床样品进行检测。**【结果】**建立了针对 CSFV、PRRSV、PCV-2 和 PPV 4 种病毒的基因芯片检测方法, 该方法对临床 150 份样品的检测结果显示, CSFV 阳性样品有 25 份, 高致病性 PRRSV 阳性样品有 45 份, PCV-2 阳性样品有 70 份, PPV 的检测结果全部为阴性, 其中混合感染样品有 18 份。**【结论】**建立了对 CSFV、PRRSV、PCV-2、PPV 4 种猪群常见病毒的基因芯片检测方法, 该方法具有良好的特异性、敏感性和重复性。

[关键词] 猪病; 基因芯片; 猪瘟病毒; 高致病性猪蓝耳病病毒; 猪圆环病毒 2 型; 猪细小病毒

[中图分类号] S851.34⁺7.101

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2012)03-0034-05

Development of a genechip for detection of CSFV, PRRSV, PCV-2 and PPV

YANG Ruo-song^{1,2}, JIANG Jin-qing¹, ZHANG Zhi², LI Xiao-cheng²,
WANG Jian-hua¹, REN Fu-bo³, ZHANG Li-li³

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao, Shandong 266032, China;

3 College of Animal Science & Technology, Qingdao Agriculture University, Qingdao, Shandong 266032, China)

Abstract: **【Objective】**The detection method of CSFV, PRRSV, PCV-2 and PPV is designed by Genechip technique, which is a fast, highly active method for lab diagnosis and epidemiological investigation of the four diseases. **【Method】**According to the sequence of CSFV, PRRSV, PCV-2 and PPV reported from GenBank, the primers are designed. By PCR, the PCR products are obtained which have fluorescence labeling, then genechip cross, the genechip detection method is established, and its sensitivity and repeatability detected. **【Result】**The detection method of CSFV, PRRSV, PCV-2 and PPV by Genechip technique is established, and the result of detecting the samples from clinical shows that there are 25 CSFV, 45 PRRSV, 70 PCV-2, 0 PPV, and 18 mixed infections. **【Conclusion】**The detection method of CSFV, PRRSV, PCV-2 and PPV by Genechip technique is established. The detection method has better specificity, sensitivity and

* [收稿日期] 2011-10-12

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2007BAD86B05)

[作者简介] 杨若松(1980—), 男, 河北张家口人, 兽医师, 博士, 主要从事病毒分子生物学与动物流行病学研究。

E-mail: y15832339296@163.com

[通信作者] 王建华(1948—), 男, 河南南阳人, 教授, 博士生导师, 主要从事家畜毒理学与分子免疫学研究。

repeatability.

Key word: swine disease; genechip; CSFV; PRRSV; PCV-2; PPV

猪瘟、高致病性猪蓝耳病、猪圆环病和猪细小病毒病,是当前影响我国养猪业正常发展的最主要的 4 种传染性疾病,且现在多呈现混合感染,每年均会给我国养猪业造成巨大的损失,其病原为猪瘟病毒(CSFV)、高致病性猪蓝耳病病毒(PRRSV)、猪圆环病毒 2 型(PCV-2)和猪细小病毒(PPV)。当前,我国对这 4 种猪病的诊断方法主要分为 ELISA 检测方法和 PCR 检测方法。ELISA 检测方法是一种准确的血清学检测方法,但其敏感性不够理想,耗时费力,尤其不适合用于混合感染样品的检测。PCR 方法是兽医实验室用于动物病原学诊断的常用方法,具有省时、准确、敏感等优点,然而在混合感染的检测上,单纯 PCR 方法费时费力,多重 PCR 方法虽然能够同时检测 2 种以上疾病,但是由于引物的互相干扰作用以及退火温度的差异,结果往往不尽人意,因此并不是最佳检测混合感染的实验室手段^[1]。

基因芯片技术是近年来兴起的一种基因诊断技术^[2-5],其原理是在固相支持物上原位合成寡核苷酸,或者直接将探针以显微打印的方式有序地固定于支持物表面,然后与标记的样品杂交,再检测分析杂交信号,最终得到样品的预定结果。该技术具有快速、敏感、高效、平行化、自动化等特点,既可以应用许多不同的探针来检测同一靶分子以降低假阳性率,还可以通过集成多种病原的基因探针来对病原体进行快速的诊断、鉴别诊断与基因分型^[6]。自从 Schena 等^[7]1995 年在《科学》杂志发表第 1 篇有关基因表达芯片的论文以来,以基因芯片为代表的生物芯片技术得到了迅猛发展,在生命科学领域发挥了重要作用,作为一个技术平台,已广泛应用于基因图谱绘制、基因表达分析、疾病诊断、药物筛选、疫苗研制、环境监测等多个领域^[8-12]。基因芯片方法是

一种新兴的实验室快速诊断技术,具有良好的敏感性、特异性、可重复性等优点,并且由于该法可以同时多种疾病进行检测,节约了疾病诊断时间,因而具有良好的实用性^[13-17]。

本试验运用基因芯片技术,拟建立一种针对 CSFV、PRRSV、PCV-2 和 PPV 的诊断方法,以期进一步提高实验室诊断效率,为这 4 种病的防控和分子流行病学调查工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 病毒与质粒 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪瘟病毒(CSFV)、猪圆环病毒 2 型(PCV-2)、猪细小病毒(PPV)考毒株,均由中国动物卫生与流行病学中心监测室提供。猪瘟 E2 基因质粒、圆环病毒全基因质粒、高致病性猪蓝耳病 GP5 基因质粒、细小病毒 VP2 基因质粒,均保存于中国动物卫生与流行病学中心。

1.1.2 主要试剂 TRIzol LS[®] Regent 购自 Invitrogen 公司,AMV 反转录酶、Rnase-Inhibitor、rTaq DNA 聚合酶、dNTPs、DNA Marker DL 2000 等,均购自宝生物(大连)工程有限公司。

1.1.3 引物的设计与合成 根据 Genbank 中收录的高致病性猪蓝耳病病毒的 GP5 基因序列(Genbank 登录号:FJ151490)、猪瘟病毒的 E2 基因序列(Genbank 登录号:GU592790)、猪圆环病毒 2 型的全基因序列(Genbank 登录号:EU647557)、猪细小病毒的 VP2 基因序列(Genbank 登录号:AY788086),通过 Primer5.0 软件设计相应的靶物扩增引物与探针序列,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

表 1 探针制备和靶物扩增引物
Table 1 Preparation of probe and target amplification primers

病毒名称 Virus	引物位置 Location	引物序列 Sequence
猪瘟病毒 CSFV	上游引物 Sense	5'-GGAAGGAATACAACCACGAT-3'
	下游引物 Antisense	5'-CAAATACCTCCTACTGACCA-3'
高致病性猪蓝耳病病毒 PRRSV	上游引物 Sense	5'-CCGCCGGGTATTTTCA-3'
	下游引物 Antisense	5'-AAGAGTAGCGCCAGGACAT-3'
猪细小病毒 PPV	上游引物 Sense	5'-GGTGGACCATTTCTA-3'
	下游引物 Antisense	5'-GGTAACCCATTGT-3'
猪圆环病毒 2 型 PCV-2	上游引物 Sense	5'-GCGGGCTGGCTGAAC TT-3'
	下游引物 Antisense	5'-GCCCATTTGCTTTACCACA-3'

1.2 病毒总 RNA 或 DNA 的提取

取-80℃保存的各病毒液,按 Invitrogen 公司的 TRIzol LS® Reagent 试剂盒操作说明书,分别提取其基因组 RNA 或 DNA,用适量的 DEPC 水溶解病毒基因组 RNA,用 NaOH 溶解病毒基因组 DNA,-20℃冻存储备用。

1.3 CSFV、高致病性猪 PRRSV 和 PPV RNA 的 RT-PCR 扩增

取病毒基因组 RNA 3 μL 作模板,加入反转录引物(20 pmol/μL) 1 μL、2.5 mmol/L dNTP Mixture 4 μL、Rnase-Inhibitor 0.5 μL、AMV 0.5 μL、5×AMV Buffer 4 μL,加 DEPC 水至 20 μL,42℃反应 1 h,即得 cDNA 模板。以反转录合成的 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 20 μL: 10×PCR Buffer 2 μL、2.5 mmol/L dNTP Mixture 0.4 μL、上游引物(20 pmol/μL)0.5 μL、下游引物(1 nmol/μL)0.5 μL(其中猪瘟引物各 0.5 μL,高致病性猪蓝耳病引物各 0.5 μL,猪细小病毒引物各 0.5 μL,共计 3 μL)、rTaq 0.2 μL、cDNA 2 μL,加无菌水至 20 μL,进行不对称 PCR 反应。PCR 反应程序为:94℃变性 5 min;94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 1 min,共 30 个循环;最后 72℃延伸 7 min。

1.4 PCV-2 DNA 的 PCR 扩增

PCR 反应体系为 20 μL:PCV-2 DNA 模板 2 μL,10×PCR Buffer 2 μL,2.5 mmol/L dNTP Mixture 0.4 μL,上游引物(20 pmol/μL)0.5 μL,下游引物(1 nmol/μL)0.5 μL,rTaq 0.2 μL,cDNA 2 μL,加无菌水至 20 μL,进行不对称 PCR 反应。PCR 反应程序为:94℃变性 5 min;94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 1 min,共 30 个循环;最后 72℃延伸 7 min。

1.5 PCR 产物的荧光标记

取 PCR 产物 20 μL,加入 0.022 mg Cy3 荧光染料,避光孵育 1 h,加入终浓度为 1 mol/L 的羟胺 12 μL,避光孵育 15 min 后终止反应。

1.6 探针的制备、稀释与固定

分别以中国动物卫生与流行病学中心监测室构建的猪瘟 E2 基因质粒、圆环病毒全基因质粒、高致病性猪蓝耳病 GP5 基因质粒、细小病毒 VP2 基因质粒为模板,进行探针扩增。PCR 反应体系共 20 μL:10×PCR Buffer 2 μL,2.5 mmol/L dNTP Mixture 0.4 μL,上游引物(20 pmol/μL) 0.5 μL,下游引物(20 pmol/μL) 0.5 μL,rTaq 0.2 μL,模板 0.2 μL,加无菌水至 20 μL。PCR 反应程序为:94℃变

性 5 min;94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 1 min,共 30 个循环;最后 72℃延伸 7 min。可得到 4 种病毒的探针。

按照 20×SSC(组分浓度为 3.0 mol/L NaCl,0.3 mol/L 柠檬酸钠)3 mL、10%SDS 0.1 mL、灭菌水 6.9 mL 的比例配制点样缓冲液,总体积为 10 mL。将探针溶解在点样缓冲液(20 μmol/L)中,然后固定在经过醛基修饰处理的玻片上,存储备用。基因芯片设计为 10×10 阵列,第 1 排、第 2 排前 5 个点及最后 1 排为阳性质控点,其余各点按照不同的检测要求进行相应设计。

1.7 杂交反应

杂交反应体系总体积为 15 μL:20×SSC 2.25 μL,10%SDS 0.3 μL,甲酰胺 3.75 μL,50×Denhardt's 1.5 μL,无菌水 0.2 μL,荧光标记后的 PCR 产物 7 μL。将杂交反应体系用移液器混匀后 3 000 r/min 离心 30 s,95℃热变性 3 min(在 PCR 仪中),冰浴骤冷 1 min,用移液器将杂交液注入固定有探针的杂交板上,42℃杂交 2 h 以上。将杂交板通过芯片洗涤机(SlideWasher)进行洗涤,洗完后,将板子放入干燥离心室,用扫描仪进行扫描。

1.8 基因芯片检测方法的灵敏性和重复性试验

以实验室保存的 4 种病毒的质粒为模板进行梯度稀释,梯度稀释后的猪瘟 E2 基因质粒、圆环病毒全基因质粒、高致病性猪蓝耳病 GP5 基因质粒、细小病毒 VP2 基因质粒模板含量分别为:10⁵,10⁴,10³,10²,10¹拷贝/μL,以此进行灵敏度检测试验。同时进行重复性试验来验证本试验方法的可重复性。

1.9 基因芯片检测方法的实际应用

采用建立的基因芯片检测方法,对河北某猪场送检的 150 份样品进行检测。

2 结果与分析

2.1 4 种猪群常见病的基因芯片检测结果

CSFV、高致病性 PRRSV、PCV-2 和 PPV 的单一病毒感染结果见图 1。由试验设计可知,第 1 排、第 2 排前 5 个点及最下面 1 排出现荧光,表示反应顺利进行;第 3 排出现荧光,表示检测样品中有 PRRSV;第 4 排后 5 个点出现荧光,表示检测样品中有 CSFV;第 6 排后 5 个点和第 7 排前 5 个点出现荧光,表示检测样品中有 PCV-2;第 9 排后 5 个点出现荧光,表示检测样品中含有 PPV。

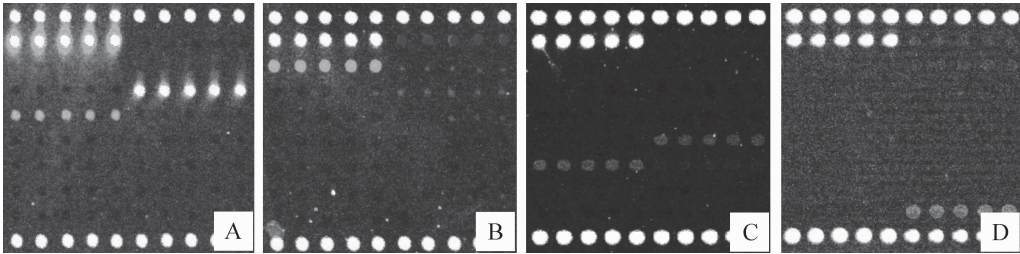


图 1 CSFV、PRRSV、PCV-2 和 PPV 在基因芯片试验中的检测结果
A. CSFV;B. PRRSV;C. PCV-2;D. PPV

Fig.1 Targets from CSFV,PRRSV,PCV-2,PPV hybridizing with the special probes

2.2 建立的基因芯片检测方法的灵敏性和重复性

以 PPV 为模板,基因芯片方法灵敏度的检测结果见图 2。由图 2 可知,芯片对 PPV 的检测灵敏度为 10^3 拷贝/ μL 。另外,芯片对 PCV-2 的检测灵敏

度为 10^2 拷贝/ μL ,对 CSFV 和 PRRSV 的检测灵敏度为 10^3 拷贝/ μL 。重复性试验结果显示,本方法 2 次检测结果相同,表明该方法具有良好的可重复性。

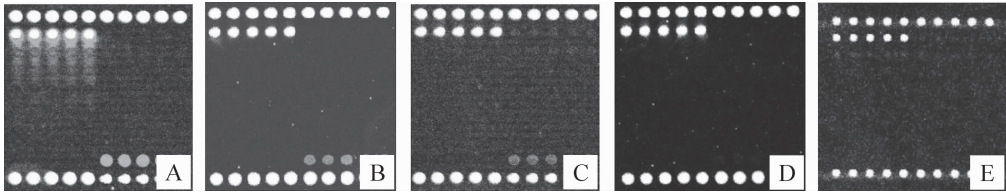


图 2 以 PPV 为模板的基因芯片诊断方法的灵敏度检测结果
A—E. 质粒含量分别为 $10^5, 10^4, 10^3, 10^2$ 和 10^1 拷贝/ μL

Fig.2 The sensitive detection of Genechip technique diagnose method by PPV
A—E. Plasmid cope number are $10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10^1/\mu\text{L}$

2.3 部分猪病混合感染样品的检测结果

应用本诊断方法对送检的 150 份猪病普检病料进行检测,结果(图 3)显示,CSFV 阳性样品有 25 份,高致病性 PRRSV 阳性样品有 45 份,PCV-2 型

阳性样品有 70 份,PPV 的检测结果全部为阴性。混合感染样品有 18 份,其中 CSFV、PCV-2 混合感染 12 份,其检测结果见图 3A;CSFV、高致病性 PRRSV 混合感染 6 份,其检测结果见图 3B。

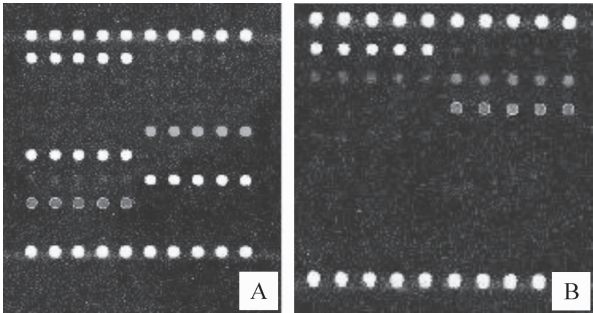


图 3 临床样品的基因芯片检测结果
A. CSFV、PCV-2 阳性,PRRSV、PPV 阴性;B. CSFV、PRRSV 阳性,PCV-2、PPV 阴性

Fig.3 Detection result of Genechip for clinical samples

A. CSFV and PCV-2 positive,PRRSV and PPV negative;B. CSFV and PRRSV positive,PCV-2 and PPV negative

3 讨 论

目前,检测低含量病原体的方法较多,但在灵敏度、特异性、耗资和耗时等方面存在差异。本研究在

PCR 方法的基础上结合基因芯片技术,建立了 CSFV、高致病性 PRRSV、PCV-2 及 PPV 的基因芯片检测方法,该方法提高了检测的灵敏度,具有很好的稳定性和可重复性,可以在早期准确地检测病原,这

对于动物流行病学调查和动物疫病的防控具有一定的现实意义。同时,通过分子杂交的方法,有效克服了 PCR 易污染及血清学试验方法敏感性较低的缺点,提高了检测的灵敏度。

应用本试验建立的诊断方法对送检病料进行病原学检测,可以直观地了解猪病的感染情况,减少由于实验室操作引起的诊断误差。试验结果表明,本试验建立的基因芯片诊断方法具有高敏感性、稳定性、可重复性、快速性和高特异性,能够快速、准确地鉴定及区分 CSFV、PPV、PRRSV 和 PCV-2 4 种病毒,可用于检测临床样品中以上 4 种疾病的单独或混合感染。

[参考文献]

- [1] Der S D, Zhou A, Williams B R, et al. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 15623-15628.
- [2] 李 勇, 马峙英. 基因芯片技术及其应用 [J]. *河北农业大学学报*, 2002(1): 8-10.
Li Y, Ma Z Y. Gene chip technology and application [J]. *Journal of Agriculture of Hebei*, 2002(1): 8-10. (in Chinese)
- [3] 马立人, 蒋中华. 生物芯片 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.
Ma L R, Jiang Z H. Gene chip [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2000. (in Chinese)
- [4] 彭俊平, 金 奇. 基因芯片技术在病毒学研究中的应用现状 [J]. *病毒学报*, 2003(3): 281-283.
Peng J P, Jin Q. Study on gene chip for virology [J]. *Virology*, 2003(3): 281-283. (in Chinese)
- [5] Numata K, Yoshida R, Nagasaki M, et al. Exonminer: Web service for analysis of GeneChip Exon array data [J]. *BMC Bioinformatics*, 2008, 9: 494.
- [6] 高淑霞, 吴时友, 庄文忠, 等. 猪病毒性繁殖障碍病低密度基因芯片诊断方法的建立 [J]. *西北农业学报*, 2006, 15(4): 39-42.
Gao S X, Wu S Y, Zhuang W Z, et al. Low density DNA array for diagnosing swine viral reproductive disease [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2006, 15(4): 39-42. (in Chinese)
- [7] Schena M, Shalon D, Davis R W, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray [J]. *Science*, 1995, 270(5235): 467-470.
- [8] Pan W A. Comparative review of statistical methods for discovering differentially expressed genes in replicated microarray experiments [J]. *Bioinformatics*, 2002, 18(4): 546-554.
- [9] Grifantini R. Previously unrecognized vaccine candidates against group B meningococcus identified by DNA microarrays [J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(9): 914-921.
- [10] Lobenhofer E K, Bushel P R, Afshari C A, et al. Progress in the application of DNA microarrays [J]. *Environ Health Perspect*, 2001, 109(9): 881-891.
- [11] 符 芳, 杨玉菊, 陈微晶, 等. 五种重要猪病病毒基因芯片探针的建立及其应用 [J]. *中国兽医科学*, 2010, 40(5): 501-505.
Fu F, Yang Y J, Chen W J, et al. Development and application of gene chip for detection of five swine disease viruses [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2010, 40(5): 501-505. (in Chinese)
- [12] 郭焕成. 猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪瘟病毒寡核苷酸芯片的研究与应用 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2010.
Guo H C. Research and application of oligonucleotide microarray for classical swine fever virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus [D]. Beijing: Academy of Military Medical Sciences of PLA, 2010. (in Chinese)
- [13] Chizhikov V, Wager M, Ivshina A, et al. Detection and genotyping of group A rotaviruses by oligonucleotide microarray hybridization [J]. *Clinical Microbiology*, 2002, 40: 2398-2407.
- [14] 杨 林. 猪瘟病毒基因芯片诊断技术的研究及应用 [D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
Yang L. Research and application of classical swine fever virus diagnostic technology by gene chip [D]. Beijing: China Agriculture University, 2005. (in Chinese)
- [15] Bigger C B, Brasky K M, Lanford R E. DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection [J]. *Virology*, 2001, 75: 7059-7066.
- [16] Lipshutz R J, Morris D, Chee M, et al. Using oligonucleotide probe arrays to access genetic diversity [J]. *Biotechniques*, 1995, 19(3): 442-447.
- [17] Liu L N, Liu Z F, Ruan L, et al. Microarray-based detection and differentiation of virulent and attenuated pseudorabies virus [J]. *Agricultural Sciences in China*, 2007, 6(2): 234-243.