

网络出版时间:2012-04-16 15:38

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120416.1538.013.html>

# PPV SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用

赵 丽<sup>1</sup>, 赵绪永<sup>1</sup>, 陈红英<sup>2</sup>, 崔保安<sup>2</sup>

(1 郑州牧业工程高等专科学校 药物工程系, 河南 郑州 450011;

2 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002)

**[摘要]** **【目的】**建立一种能够快速、灵敏地检测猪细小病毒(PPV)的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法。**【方法】**根据 GenBank 中的 PPV VP2 基因序列,设计并合成 1 对引物。通过常规 PCR,扩增猪细小病毒 VP2 基因,并将其纯化的 PCR 产物克隆入 pGEM-T Easy 载体中,构建重组质粒。对扩增程序中的荧光染料浓度、引物浓度和  $Mg^{2+}$  浓度条件进行优化,建立最佳的荧光定量 PCR 反应体系和标准曲线。以阳性重组质粒为模板,建立 SYBR Green I 荧光定量 PCR 方法,对其灵敏性、特异性和重复性进行检验。应用建立的 SYBR Green I 荧光定量 PCR 方法,对临床 60 份疑似 PPV 病料进行检测,同时与血凝试验(HA)和常规 PCR 方法的检测效果进行比较。**【结果】**在 25  $\mu$ L 扩增体系中, $Mg^{2+}$  终浓度为 4.5 mol/L、SYBR Green 染料浓度为 20  $\mu$ mol/L、引物浓度为 25  $\mu$ mol/L 时,本底反应最小、循环阈值最低、扩增效率最高。所建立的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法能够特异、定量地检测猪细小病毒,灵敏度达 20 TCID<sub>50</sub>/mL;在临床样品检测中,其检出率比常规 PCR 方法高 13.3%。**【结论】**成功建立了 PPV SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法,为临床猪细小病毒的早期诊断及定量分析病毒的感染程度奠定了基础。

**[关键词]** 猪细小病毒;SYBR Green I;实时荧光定量 PCR

**[中图分类号]** S852.65<sup>+</sup>9.2

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2012)05-0019-05

## Development and application of a SYBR Green I real-time fluorescent quantitative PCR method for detection of PPV

ZHAO Li<sup>1</sup>, ZHAO Xu-yong<sup>1</sup>, CHEN Hong-ying<sup>2</sup>, CUI Bao-an<sup>2</sup>

(1 Department of Pharmacy, Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering, Zhengzhou, Henan 450011, China;

2 College of Animal Husbandry and Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China)

**Abstract:** **【Objective】**The study developed a SYBR Green I real-time fluorescent quantitative PCR which can detect porcine parvovirus(PPV) quickly and specially. **【Method】**According to protein 2 (VP2) nucleotide sequences of porcine parvovirus (PPV) published in GenBank, a pair of primer was designed. The VP2 gene was amplified with traditional PCR. The PCR product was cloned into pGEM-T Easy vector and sequenced. A real-time fluorescent quantitative PCR was established by optimizing the SYBR Green I's concentration, primers concentration and  $Mg^{2+}$  concentration. The positive recombinant plasmid was used as quantitative template to generate standard curve and melt curve. Sensitivity assay, reproducibility of the assay and specificity assay were determined. Clinical 60 suspected PPV disease materials were detected by established SYBR Green I real-time fluorescent quantitative PCR method and compared with

\* [收稿日期] 2011-10-11

[基金项目] 国家“十五”食品安全重大攻关专项(2001BA804A30-11);河南省高校青年骨干教师资助项目(2011GGJS-194))

[作者简介] 赵 丽(1973—),女,河南商丘人,副教授,硕士,主要从事分子病毒学研究。

[通信作者] 崔保安(1948—),男,河南濮阳人,教授,博士生导师,主要从事分子病原学与分子免疫学研究。

HA and the result of the conventional PCR testing methods.【Result】The background response and  $C_t$  is minimum, the amplification efficiency is maximum when the  $Mg^{2+}$  concentration is 4.5 mol/L, SYBR Green I concentration is 20  $\mu$ mol/L, primer concentration is 25  $\mu$ mol/L in 25  $\mu$ L amplification system. The real-time fluorescent quantitative PCR method can specifically and quantitatively detect porcine parvovirus. The detection limit of real-time PCR for PPV was 20 TCID<sub>50</sub>/mL. The detection rate is 13.3% higher than the conventional PCR in the clinical.【Conclusion】A SYBR Green I real-time fluorescent quantitative PCR to detect VP2 gene of PPV was developed on the basis of early and rapid detection and analysis of the infect degree of PPV quantitatively.

**Key words:** PPV; SYBR Green I; real-time fluorescent quantitative PCR

猪细小病毒(Porcine parvovirus, PPV)为细小病毒科的一种自主复制病毒,是引起猪繁殖障碍病的主要病原之一,PPV可引起母猪感染,特别是可致初产母猪流产、产死胎、畸形胎、木乃伊胎及病弱仔猪,母猪本身无明显症状<sup>[1]</sup>。此外,PPV也能引起非化脓性心肌炎、皮炎、肠炎及病毒血症等<sup>[1-2]</sup>。该病广泛存在于世界各地,给全世界的养猪业造成了巨大的经济损失,因此建立快速有效的检测 PPV 的方法意义重大。

目前,国内诊断猪细小病毒病仍然采用病毒分离鉴定和血清学诊断等方法<sup>[1]</sup>。这些方法费时、费力,不适于临床快速、可靠检测。近些年发展起来的实时荧光定量 PCR 技术将常规 PCR 技术与荧光检测相结合,不仅操作简便、结果直观、敏感性高、特异性强、重复性好、污染少,而且可通过分析软件对数据进行自动分析整理,结果更为准确、客观,因此已成为检测病原体的重要方法<sup>[3-8]</sup>。实时荧光定量 PCR 中常用的荧光染料为 SYBR Green I。本研究根据猪细小病毒 VP2 基因序列设计 1 对引物,通过对引物浓度、荧光染料浓度和  $Mg^{2+}$  浓度等条件的优化,建立了猪细小病毒的 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测方法,以期 PPV 的早期诊断及 PPV 感染程度的定量分析提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试剂和仪器 pGEM-T Easy 质粒载体、T4 DNA 连接酶,均购自 Promega 公司;EX TaqDNA 聚合酶为宝生物工程(大连)有限公司产品;病毒 DNA 小量制备试剂盒,为 V-gene 公司产品;SYBR Green I,为 Biotium 公司产品。PTC 200PCR 仪, Bio2 Rad 实时荧光定量 PCR 仪,为美国 Corbett Research 公司生产。

1.1.2 病毒和细胞株 PPV 标准毒株、猪圆环病

毒 II 型(PCV-2)、猪伪狂犬病病毒(PRV)、猪繁殖呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪瘟病毒(CSFV)及 PK-15 细胞株,均购自中国兽药监察所。工程菌 JM109 感受态细胞为宝生物工程(大连)有限公司产品。

1.1.3 引物设计与合成 应用 Primer express 软件在 VP2 基因高度保守区设计 1 对特异引物,扩增片段位于 VP2 基因序列中。将扩增片段与从 GenBank 中下载的序列进行比对后发现,不同地区的 PPV 在该区域内高度保守,同源性达 100%,说明设计的引物有着较高的特异性。上游引物(P1):5'-CCAAAAATGCAAACCCCAATA-3';下游引物(P2):5'-TCTGGCGGTGTTGGAGTTAAG-3'。引物由上海生物工程技术有限公司合成,其预期扩增产物片段长度为 150 bp。

### 1.2 标准阳性模板的制备

1.2.1 PPV 核酸的提取及 VP2 基因的扩增 参照病毒 DNA 小量制备试剂盒说明书,从感染 PK-15 细胞的 PPV 病毒液中提取病毒 DNA。取 0.5  $\mu$ L 病毒 DNA,加入 10 $\times$  PCR buffer 5  $\mu$ L、2.5 mmol/L dNTP 混合物 4  $\mu$ L、P1 和 P2 (50 pmol/ $\mu$ L)各 1  $\mu$ L、灭菌双蒸水 35.5  $\mu$ L、5 U/ $\mu$ L Taq DNA 聚合酶 0.5  $\mu$ L,混匀后进行 PCR 扩增。扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 20 s,54 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,共 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min。同时设立无模板的阴性对照。反应结束后,取 5  $\mu$ L PCR 产物,用 30 g/L 琼脂糖凝胶(含 0.5  $\mu$ g/mL EB)电泳检测目的条带。

1.2.2 PPV VP2 基因的克隆与鉴定 将纯化回收的 PCR 产物与 pGEM-T Easy 载体连接,构建重组质粒。用重组质粒转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,在含 Amp 的 LB 平板上可见有蓝色和白色菌落生长,挑取单个白色菌落接种于 LB 液体培养基中,振荡培养过夜,提取质粒,进行 PCR 鉴定。将鉴定正确的重组质粒送宝生物工程(大连)有限公司进行序

列测定,并将测序结果与 GenBank 上的 PPV VP2 基因(NADL-2)进行比对。

1.2.3 反应条件的优化及标准曲线的建立 用紫外分光光度计分别测定阳性重组质粒在 260 和 280 nm 处的吸光度,并计算重组质粒的 DNA 含量与纯度<sup>[8]</sup>,将重组质粒进行 10 倍梯度稀释,备用。在 25  $\mu$ L 反应体系中依次加入以下成分,10 $\times$  buffer 2.5  $\mu$ L,2 mmol/L dNTP 混合物 3  $\mu$ L,上、下游引物各 0.5  $\mu$ L,Taq DNA 聚合酶 1  $\mu$ L,重组质粒 1  $\mu$ L( $10^4$  倍稀释),SYBR Green I 染料 0.2,0.4,0.6,0.8  $\mu$ L,以去离子水补足 25  $\mu$ L。将上述反应体系混匀后进行 PCR 扩增,反应条件为:94  $^{\circ}$ C 5 min;94  $^{\circ}$ C 5 s,60  $^{\circ}$ C 15 s,40 个循环。同时设立无模板的阴性对照,比较不同 SYBR Green I 染料浓度对扩增产物量及本底信号的影响。将上述体系中加入 SYBR Green I 染料的量定为 0.6  $\mu$ L,上、下游引物的用量设 0.3,0.5,0.7,1.0  $\mu$ L 4 个梯度,运行相同的扩增程序,同时设立无模板的阴性对照,比较不同引物浓度对扩增产物量的影响。向 25  $\mu$ L 反应体系中加入 25 mol/L  $Mg^{2+}$ ,使其终浓度分别为 3.0,3.5,4.0,4.5,5.0,5.5 和 6.0 mol/L,其他成分不变,运行相同的扩增程序,比较不同  $Mg^{2+}$  浓度下的 PCR 扩增效率,选择最佳  $Mg^{2+}$  浓度。以  $10^2,10^3,10^4,10^5,10^6,10^7,10^8$  拷贝/ $\mu$ L 重组质粒作为标准阳性模板,在以上优化的最佳条件下建立荧光定量 PCR 标准曲线并对样品进行检测。

1.3 PPV SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法的评价

1.3.1 灵敏性 取阳性重组质粒为标准品,经  $10^0\sim10^9$  倍梯度稀释后,进行 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测,并进行普通 PCR 检测,比较 2 种检测方法的敏感性。

1.3.2 特异性 取 6 支试管,分别加入 PPV 细胞毒 DNA 1  $\mu$ L(约 100 ng)、PRRSV 细胞毒 cDNA 1  $\mu$ L(约 100 ng)、PRV 细胞毒 DNA 1  $\mu$ L(约 100 ng)、PCV-2 细胞毒 DNA 1  $\mu$ L(约 100 ng)、CSFV 细胞毒 cDNA 1  $\mu$ L(约 100 ng)和 1  $\mu$ L 去离子水(阴性对照),按照 SYBR Green I 荧光定量 PCR 的优化试验条件,结果经溶解曲线分析,验证其特异性。

1.3.3 重复性 选取  $10^2,10^3,10^4,10^5,10^6,10^7$  拷贝/ $\mu$ L 的重组质粒为样本,分别进行 SYBR Green I 荧光定量 PCR 反应(反应体系均为 25  $\mu$ L),反应重

复 3 次,验证 SYBR Green I 荧光定量 PCR 方法的稳定性。

1.4 临床样品检测

从河南周边不同地区的 60 头猪流产胎儿体内采集心、肝、脾、肾、结肠、十二指肠、空肠等组织,提取其 DNA,分别用血凝试验(HA)、常规 PCR 和荧光定量 PCR 对这 60 份临床样品进行检测,比较其检测结果。

2 结果与分析

2.1 PPV VP2 基因的 PCR 扩增、克隆及鉴定

取 PCR 产物 5  $\mu$ L 于 30 g/L 琼脂糖上电泳,结果表明,扩增产物为 150 bp 左右的 DNA 片段(图 1),与预期的片段长度相一致。经鉴定,该片段与连接前的 PCR 产物片段长度一致。测序结果显示,所获序列与 GenBank 上 PPV 的 VP2 基因序列完全一致,表明重组质粒中含有 PPV 的 VP2 基因核苷酸序列。

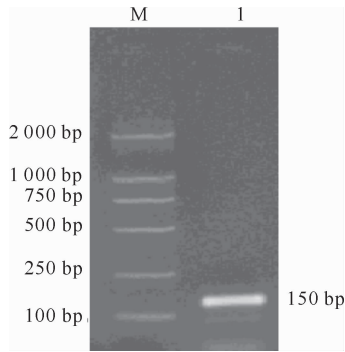


图 1 PPV VP2 基因的 PCR 扩增  
M, DL 2000 Marker;1. PPV 扩增产物

Fig.1 PCR product of PPV VP2

M, DL 2000 Marker;1. PCR product of PPV

2.2 PPV SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测标准曲线的建立

通过多次重复试验,最终选取在 25  $\mu$ L 反应体系中, $Mg^{2+}$  终浓度为 4.5 mol/L,SYBR Green I 染料为 20  $\mu$ mol/L,引物为 25  $\mu$ mol/L 时,本底反应最小、循环阈值( $C_t$ )最低、扩增效率最高。

按上述优化的反应条件,取  $10^2,10^3,10^4,10^5,10^6,10^7,10^8$  拷贝/ $\mu$ L 的重组质粒作为标准阳性模板,分别加入到 PCR 反应体系中进行扩增,系统自动分析软件可以显示  $C_t$  与标准阳性模板含量对数( $\lg C$ )之间的关系(图 2)。

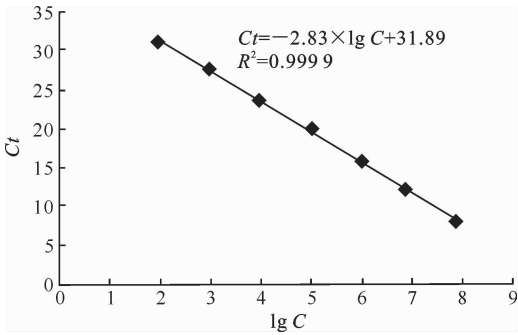


图 2 PPV SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测标准曲线的建立

Fig. 2 Standard curve for SYBR Green I real-time fluorescent quantitative PCR of PPV

由图 2 可知,  $C_t$  值与  $\lg C$  的线性关系良好, 相关系数( $R^2$ )为 0.999 9。从仪器中读取待测样品的  $C_t$  值后, 就可以算出其初始含量。

2.3 PPV SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法的灵敏性、特异性及重复性

将已计算出拷贝数的重组质粒作 10 倍梯度稀释, 当样品稀释到  $10^7$ , 扩增到 35 次循环时仍没有达到起跳阈值; 而当样品稀释到  $10^6$  时, 可以检测到阈值信号, 据此按文献[8]计算灵敏度为 20 TCID<sub>50</sub>/mL, 比常规 PCR 高 100 倍。

特异性试验结果显示, 该检测方法仅 PPV 有强荧光信号, PRV、PCV-2、PRRSV、CSFV 和阴性对照均无明显荧光信号显现, 说明该方法有很好的特异性。

重复性结果表明, 每个样本的 3 条 S 型曲线之间的误差均不到 1 个循环(图 3), 可见建立的 PPV SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测方法具有较高的可重复性, 从而保证了不同样品间检测结果的可靠性和稳定性。

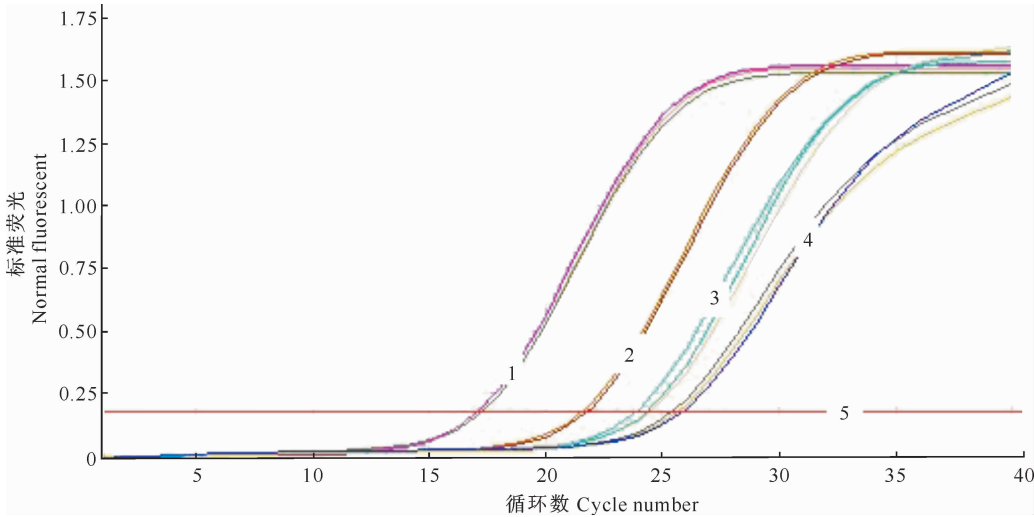


图 3 PPV SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法的重复性检测

1, 2, 3, 4 分别为  $10^4, 10^5, 10^6, 10^7$  拷贝/ $\mu\text{L}$  重复性扩增; 5 为阴性对照

Fig. 3 Repeatability of SYBR Green I real-time fluorescent quantitative PCR method to detect PPV

The plasmid concentrations of curve 1, 2, 3, 4 were  $10^4, 10^5, 10^6, 10^7$  copy/ $\mu\text{L}$  respectively reproducibility; Curve 5 was the negative control

2.4 临床样品检测结果

用 HA 法和常规 PCR 法从供试 60 份临床样品中分别检测出 20 和 32 份阳性样品; 经 HA 法检测为阳性的样品, 用本研究所建方法和常规 PCR 检测也均为阳性; 经常规 PCR 检测为阳性的样品, 用本研究所建方法检测也为阳性。而在经常规 PCR 检测为阴性的 28 份样品中, 用本研究建立的方法检测出了 8 份阳性样品, 检出率提高了 13.3%(8/60)。

3 讨论

目前, 常用的实时定量 PCR 技术主要有染料法

和荧光探针法 2 种。目前国内常用的染料为 SYBR Green I, 该染料与双链 DNA 有很高的亲和力, 当它与双链 DNA 结合后, 在激发光照射下产生荧光, 通过对荧光强度的检测, 可以实时检测 PCR 的产物量<sup>[9-10]</sup>。随着 PCR 反应的进行, 荧光信号与不断生成的 PCR 产物呈正比, 并形成荧光扩增曲线, 荧光强度的增加与反应液中原模板的浓度呈正相关, 因此, 可实时对靶核酸进行定量检测<sup>[11]</sup>。与荧光探针法相比, 染料法避免了设计、标记荧光探针和使用价格昂贵、复杂的试剂, 不仅降低了成本, 而且使检测方法操作更为简便。但因为荧光染料能与所有双

链 DNA 结合,所以容易产生假阳性信号。在检测过程中,可以通过调整引物浓度,设计对照和优化反应条件来解决这一问题<sup>[12-14]</sup>。本试验结果显示,标准品 DNA 各个稀释度的溶解温度接近,反应过程中未出现非特异性扩增和明显引物二聚体,说明本试验的引物设计合理、特异性好,反应体系和反应条件得到了很好地优化。鉴于临床样品和病毒细胞培养液等的检测受到多种因素的影响,本试验灵敏度的检测用标准品作为荧光定量 PCR 和普通 PCR 模板进行比较更能说明问题。

本研究所建立的 PPV SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法特异性强、灵敏度高,且有良好的准确性和重现性;在 60 份临床样品中,用此方法检出了 40 份阳性样品,较常规 PCR 方法多检出 8 份,检出率提高 13.3%,表明该方法能够用于猪细小病毒的早期诊断。在临床样品检测中,经常规 PCR 和本研究所建方法检测为阳性的 12 份样品,用 HA 方法检测显示为阴性,其主要原因可能是,HA 方法只能检测到活病毒,而 PPV 在病料的采集、保存过程中可能已经失活,但这些失活的病毒仍然能被高度特异、敏感的常规 PCR 和荧光定量 PCR 方法检测到,因此后 2 种方法的阳性检出率较高。

[参考文献]

[1] 殷 震,刘景华. 动物病毒学 [M]. 2 版. 北京:科学出版社,1997.  
Yin Z,Liu J H. Animal virology [M]. 2nd ed. Beijing: Science Press,1997. (in Chinese)

[2] Straw B E,Zimmerman J J,Allaire S D,et al. Disease of swine [M]. 9 th ed. Ames:USA Blackwell Publishing,2006:373-385.

[3] 漆艳香,朱水芳,赵文军,等. 玉米细菌性枯萎病菌 TaqMan 探针实时荧光 PCR 检测方法的建立 [J]. 植物保护学报,2004,31 (1):183-187.  
Qi Y X,Zhu S F,Zhao W J,et al. Detection and identification of *Pantoea stewartii stewartii* using TaqMan probe [J]. Acta Phytophylacica Sinica,2004,31(1):183-187. (in Chinese)

[4] Stram Y,Kuznetzova L,Guini M,et al. Detection and quantitation of akabane and aino viruses by multiplex real-time reverse-transcriptase PCR [J]. Virol,2004,116(2):147-154.

[5] Ke L D,Chen Z,Yung W K. A reliability test of standard-based quantitative PCR: Exogenous vs endo genous standards [J]. Mol Cell Probes,2000,14(2):127-135.

[6] Becker K,Pan D,Whitley C B. Real-time quantitative polymerase chain reaction to assess gene transfer [J]. Hum Gene T-

her,1999,10(15):2559-2566.

[7] Walker N J. Real time and quantitative PCR: Applications to mechanism-based toxicology [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2001,15(3):121-127.

[8] 赵 丽,崔保安,陈红英,等. 鉴别伪狂犬病病毒野毒与疫苗毒荧光定量 PCR 方法的建立 [J]. 生物工程学报,2008,24(7): 1149-1154.  
Zhao L,Cui B A,Chen H Y,et al. Diagonsis establishment of fluorescen quantitativ PCR assay for pseudorabies wild-type virus and vaccine virus [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2008,24(7):1149-1154. (in Chinese)

[9] 胡玉洋. 实时定量 PCR 技术在病毒学研究中的应用 [J]. 国际病毒学杂志,2006,13(5):158-161.  
Hu Y Y. Real-time quantitative PCR and its applications in virology [J]. International Journal of Virology,2006,13(5):158-161. (in Chinese)

[10] 段廷云,陈红英,崔保安,等. 实时荧光定量 PCR 检测 H1N1 亚型猪流感病毒 [J]. 畜牧兽医学报,2008,39(6):752-756.  
Duan T Y,Chen H Y,Cui B A,et al. Development of real-time fluorescent quantitative PCR assay to detect H1N1 subtype swine influenza virus [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica,2008,39(6):752-756. (in Chinese)

[11] 温立斌,何孔旺,杨汉春,等. SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测类猪圆环病毒因子 P1 [J]. 华北农学报,2009,24(4):31-35.  
Wen L B,He K W,Yang H C,et al. Detection of porcine circovirus like agent P1 using SYBR Green I fluorescent quantitative PCR assay [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica,2009, 24(4):31-35. (in Chinese)

[12] 王小武,符 芳,柴 政,等. PRRSV 和 PCV-2 以及 PRV 多重 SYBR Green I 实时荧光 PCR 检测方法的建立 [J]. 中国兽医科学,2008,38(6):494-499.  
Wang X W,Fu F,Chai Z,et al. Establishment of a multiplex SYBR Green I real time PCR assay for simultaneous detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2 and porcine pseudorabies virus [J]. Chinese Veterinary Science, 2008, 38 (6): 494-499. (in Chinese)

[13] 张弛宇,张高红,杨 敏,等. 四步法消除 SYBR Green I 实时定量 RT-PCR 中引物二聚体的影响 [J]. 中国生物化学与分子生物学报,2004,20(3):387-392.  
Zhang C Y,Zhang G H,Yang M,et al. Elimination of primer-dimer effect in SYBR Green I real-time RT-PCR using 4-step program [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology,2004,20(3):387-392. (in Chinese)

[14] Gardner S N,Kuczmarski T A,Vitali E A,et al. Limitations of TaqMan PCR for detecting divergent viral pathogens illustrated by hepatitis A,B,C and E viruses and human immunodeficiency virus [J]. Clin Microbiol,2003,41:2417-2427.