

猪瘟病毒 RT-nested PCR 检测方法的优化和应用

朱小甫^{1,2}, 张 志², 李晓成², 陈德坤¹, 吴旭锦¹

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 中国动物卫生与流行病学中心, 山东 青岛 266032)

[摘要] 为了优化猪瘟病毒的 RT-nested PCR 检测方法,对福建省猪瘟流行情况进行了调查。根据 GenBank 上发表的猪瘟病毒 Shimen 株基因序列设计并合成了 2 对引物,优化了猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)的 RT-nested PCR 检测方法,并对所优化的 RT-nested PCR 特异性进行了检验。结果表明,该方法检测 CSFV cDNA 含量的最低极限为 1×10^{-7} ng/mL,只有 CSFV 扩增出了 272 bp 的目的条带,从猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪流感病毒(SIV)、猪圆环病毒 2 型(PCV2)、猪伪狂犬病病毒(PRV)和猪细小病毒(PPV)阳性毒和健康猪脾、肝组织及阴性 PK-15 细胞均未扩增出特异性条带,说明该方法特异性强。应用此方法对福建省 133 份病料进行检测,结果有 60 份病料为阳性,阳性率为 45.1%。结果提示优化的检测方法灵敏度高,特异性强;福建省猪群 CSFV 感染率高,需要加强 CSF 预防控制工作。

[关键词] 猪瘟病毒;RT-nested PCR;检测方法

[中图分类号] S852.65⁺1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)06-0011-04

Optimization and application of RT-nested PCR detection for classical swine fever virus

ZHU Xiao-fu^{1,2}, ZHANG Zhi², LI Xiao-cheng², CHEN De-kun¹, WU Xu-jin¹

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

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

Abstract: In order to optimize of RT-nested PCR detection method for classical swine fever virus, the prevalence of classical swine fever in Fujian province was investigated. Two pairs of primers were designed and synthesized to test the sensitivity and specialization by referring to strain Shimen, and the method of detection for CSFV was optimized. The result of sensitivity showed that the most dilution cDNA of CSFV was 1×10^{-7} ng/mL, and the method could not amplify any band from PRRSV, SIV, PCV2, PRV, PPV spleen and liver of health pig and negative control PK-15 cell except CSFV, which indicated that the RT-nested PCR method was special for CSFV. When this method was applied to detect 133 samples swine tissue from Fujian Province, 60 samples were positive, and the positive ratio was 45.1%. The result showed that the RT-nested PCR method was of high sensitivity and specialness; the infection ratio of swine was high in Fujian Province, and it was needed to strengthen prevention and control of CSF work.

Key words: classical swine fever virus; RT-nested PCR; detection method

古典猪瘟(Classical swine fever, CSF)是严重危害养猪业的主要传染病之一,被世界动物卫生组

织(OIE)确定为 A 类传染病,也是我国农业部规定的出入境检疫的一类传染病。CSF 作为各国重点检

†收稿日期] 2006-05-11

[作者简介] 朱小甫(1977-),男,陕西眉县人,在读硕士,主要从事分子病原学与免疫学研究。E-mail:zhuxiaofu1996@163.com

[通讯作者] 陈德坤(1964-),男,陕西渭南人,教授,博士,主要从事动物免疫学研究。

疫对象,多年来建立了多种检测方法,其中血清学方法主要有荧光抗体试验(FAT)、间接血凝试验(IHA)、中和试验和酶联免疫吸附试验(ELISA)等^[1-3]。其中 ELISA 抗体检测技术在血清学调查、流行病学研究、疫苗免疫效果评估及疫病预防控制中发挥着重要作用。但由于 CSF 长期流行,以及弱毒疫苗的长时间大面积使用,抗体检测已不能反映当前动物个体及群体的感染、带毒状况,难以揭示疫病发生、发展、分布、流行规律。PCR 技术的建立带动了分子生物学的飞速发展,各国学者利用 RT-PCR 技术扩增古典猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)基因 cDNA 片段,对 CSF 进行诊断检测,测定序列后通过生物软件分析毒株间的遗传进化关系,追踪 CSFV 传播来源,这对 CSF 的防制和扑灭起到了不可替代的作用^[4-7]。

为了解当前我国猪群 CSF 的感染情况,本试验优化了 CSFV 的 RT-nested PCR 检测方法,以对我国 CSF 的流行状况调查提供技术支持。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒 CSFV、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪流感病毒(SIV)、猪圆环病毒 2 型

(PCV2)、猪伪狂犬病病毒(PRV)和猪细小病毒(PPV)的细胞毒,均由中国动物卫生与流行病学中心保存。

1.1.2 组织病料 由福建省畜牧兽医总站按照中国动物卫生与流行病学中心的要求,采集不同地区不同猪场的疑似 CSF 病猪的脾、肝、肾、扁桃体和淋巴结等组织病料并送检。将组织病料用灭菌 PBS 稀释研磨后离心,取上清液 -70℃ 保存备用。

1.1.3 试剂和仪器 TRIzol LS Reagent、DNAzol Reagent,为 Invitrogen 公司产品;AMV 反转录酶(5 U/μL)、HPR I RNA 酶抑制剂(40 U/μL)、DEPC 处理水、*rTaq* DNA 聚合酶(5 U/μL)、dNTP(各成分均为 2.5 mmol/L),均为 TaKaRa 公司产品;高速冷冻离心机为 Sigma 公司产品;PCR 仪为新加坡 GenAmp 公司产品;Gene Genius 凝胶成像系统为 SYNGENE 公司产品;Tip 枪头、微量离心管、PCR 反应管购自 Axygen 公司。

1.1.4 引物的设计与合成 根据 GenBank 上发表的 CSFV Shimen 株基因序列(GenBank 登录号 AF092448),设计了 2 对引物 P1/P2 和 PED1/PED2,由上海生工生物工程有限公司合成,预计扩增片段长度为 272 bp(表 1)。

表 1 引物名称、序列、位置及长度

Table 1 Name, sequence, position and length of the primers

引物 Primer	核苷酸序列(5' - 3') Sequence	相对 Shimen 株位置 Position	扩增长度/ bp Length
P1	GTAAGTGGGGCACAAGG	2 423 ~ 2 439	1 102
P2	TTATCACTA TCA GCCACA GGACAT	3 524 ~ 3 504	
PED1	TCGACAACCAATGAGATAGGG	2 467 ~ 2 487	272
PED2	CACAGCCCAAATCCAAAGTCAATC	2 738 ~ 2 716	

1.2 方法

1.2.1 CSFV RNA 的提取和第一链 cDNA 的合成

取 CSFV 细胞毒 250.0 μL,按照 TRIzol LS Reagent 试剂说明提取总 RNA,空气中自然干燥后用 10.0 μL 无 RNA 酶的 DEPC 处理水溶解,加入下游引物 P2(25 μmol/L) 1.0 μL,65℃ 水浴 5 min 后立即冰浴,再加入 dNTP 4.0 μL,5 ×AMV Buffer 4.0 μL,AMV 反转录酶 0.5 μL,HPR I RNA 酶抑制剂 0.5 μL 至总体积 20.0 μL,42℃ 水浴反转录 90 min,取出后沸水浴 5 min,在核酸测定仪上测定 cDNA 含量。

1.2.2 CSFV RT-nested PCR 检测方法灵敏性试验 将已知含量的 CSFV cDNA 溶液 $10^{-1} \sim 10^{-11}$

10 倍梯度稀释,PCR 第 1 次扩增按照以下反应体系进行:取各梯度 cDNA 2.0 μL 作为模板,超纯水 17.0 μL,10 ×PCR Buffer (Mg²⁺ plus) 2.5 μL,dNTP 2.0 μL,P1/P2 各 0.5 μL,*rTaq* DNA 聚合酶 0.5 μL,总体积 25.0 μL。反应条件为:95℃ 预变性 5 min;94℃ 50 s,54℃ 90 s,72℃ 90 s,35 个循环;最后 72℃ 充分延伸 10 min。将第 1 次扩增产物 10 倍稀释,取 2.0 μL 作为模板进行第 2 次扩增,反应体系同第 1 次扩增,引物为 PED1/PED2。反应条件为:95℃ 预变性 5 min;94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 45 s,共 35 个循环;最后 72℃ 充分延伸 10 min。取 5.0 μL 第 2 次扩增产物,10 g/L 琼脂糖凝胶中电泳,凝胶成像系统中照相观察。

1.2.3 CSFV RT-nested PCR 检测方法特异性试验 提取 CSFV、PRRSV 和 SIV 等 RNA 病毒的 PK-15 阳性细胞毒核酸并反转录获得 cDNA;按照 DNAzol Reagent 试剂说明提取 PCV2、PRV 和 PPV 等 DNA 病毒 PK-15 阳性细胞毒 DNA 模板,用 P1/ P2、PED1/ PED2 引物对分别进行第 1 次和第 2 次扩增,同时用健康猪脾、肝组织和阴性 PK-15 细胞为阴性对照。PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 病料中 CSFV 的检测 用以上建立的检测方法对福建省送检的 133 份组织病料进行检测,同

时用灭菌水和疫苗毒作为阴性和阳性对照。

2 结果与分析

2.1 CSFV RT-nested PCR 检测方法灵敏性试验结果

CSFV RNA 反转录第一链 cDNA 含量为 100 ng/ mL,将其按照 10 倍梯度进行稀释至 10^{-11} 。从图 1 可见,所建立的方法能够扩增出可见目的条带的最大稀释度为 10^{-9} ,即检测的 cDNA 含量最低为 1×10^{-7} ng/ mL。表明此方法灵敏度高,可以作为 CSFV 检测方法。

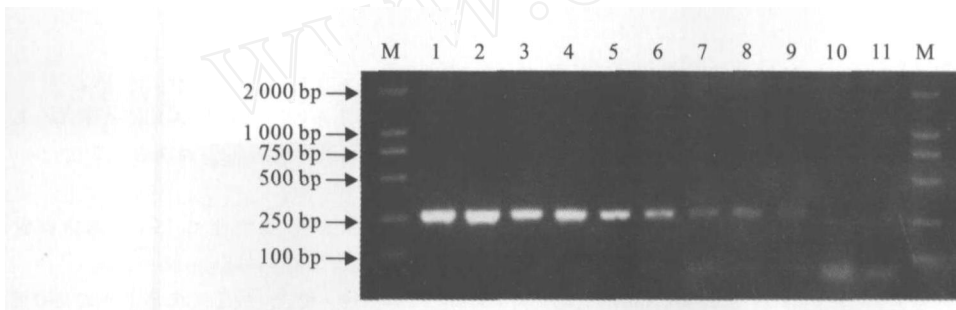


图 1 CSFV RT-nested PCR 检测方法灵敏性试验结果

M. DL2000 DNA 分子质量标准;1~11. 依次为 cDNA $10^{-1} \sim 10^{-11}$ ng / mL 10 倍梯度稀释 PCR 结果

Fig. 1 Result of sensitivity test for CSFV RT-nested PCR

M. DL2000 Marker;1 - 11. $10^{-1} \sim 10^{-11}$ ng / mL of CSFV cDNA

2.2 CSFV RT-nested PCR 检测方法特异性试验结果

用所建立的方法对 CSFV、PRRSV、SIV、PCV2、PRV 和 PPV 阳性细胞毒进行扩增,结果见

图 2。由图 2 可见,只有 CSFV 扩增出了 272 bp 的目的条带,与预期条带大小一致,其他 5 种毒和健康猪脾、肝组织及阴性 PK-15 细胞未扩增出条带,阴性和阳性对照均成立,说明所建立的方法是特异的。

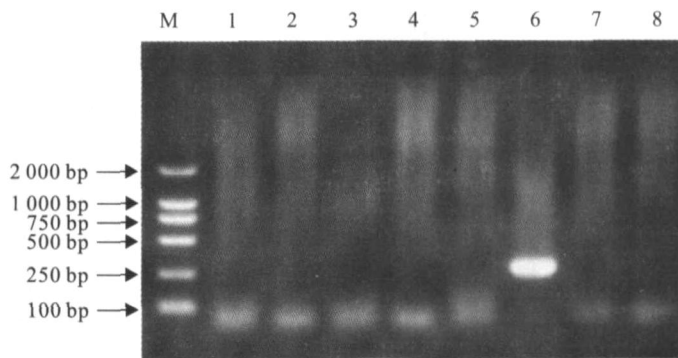


图 2 CSFV RT-nested PCR 检测方法特异性试验结果

M. DL2000 DNA 分子质量标准;1. PRRSV;2. SIV; 3. PCV2; 4. PRV; 5. PPV;6. CSFV;7. 健康猪脾、肝组织;8. 阴性 PK-15 细胞

Fig. 2 Result of specialization test for CSFV RT-nested PCR

M. DL2000 Marker;1. PRRSV;2. SIV;3. PCV2;4. PRV;5. PPV;6. CSFV;7. Spleen and liver of health pig;8. Negative control PK-15 cell

2.3 病料中 CSFV 的检测结果

用优化的 RT-nested PCR 方法,检测了福建省 133 份疑似感染 CSFV 的淋巴结、脾脏和扁桃体材

料,结果有 60 份病料为阳性,阳性率为 45.1%,所设阳、阴性对照均成立(图 3)。

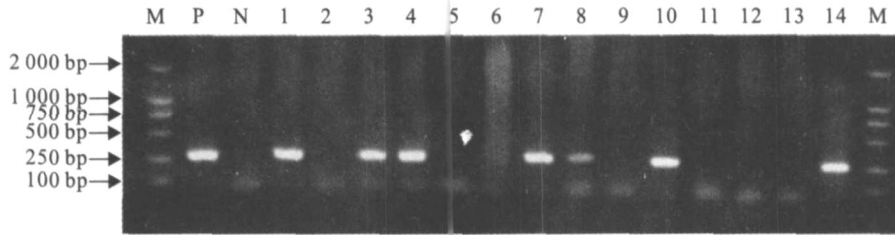


图 3 部分病料中 CSFV 的检测结果

M. DL2000 DNA 分子质量标准;P. 阳性对照;N. 阴性对照;1~14. 部分病料

Fig. 3 Result of detection CSFV from some dubitable affected CSFV tissue

M. DL2000 Marker;P. Positive control;N. Negative control;1-14. Detection result of some tissue

3 讨论

目前,对 CSFV 进行诊断和分子流行病学研究主要集中在 5'-UTR 约 150 bp 区域和 E2 基因内约 190 bp 区域。本试验第 2 次扩增采用的引物即在 E2 基因内,并被广泛用来进行 CSF 流行病学研究和调查^[4-6]。Wirz 等^[7]根据 CSFV 基因组的高保守区域序列合成引物,进行 RT-PCR,与组织培养和免疫荧光染色方法进行了对比,结果发现 RT-PCR 可更快地区分 CSFV。Liu 等^[8]提取 CSFV 感染组织中总 RNA 进行 RT-PCR 反应,扩增产物用琼脂糖凝胶电泳检测表明,其灵敏性可检测到 10^4 TCID₅₀ 的病毒。Sand-Vik 等^[9]和 Goldrick 等^[10]分别利用套式 PCR 对 CSFV 进行检测,结果证实扩增灵敏性较普通 RT-PCR 可提高 1 000 倍,具有检出率高、特异性强的优点。本试验 CSFV 检测方法经灵敏度和特异性试验也充分证明了这一点,检测的 cDNA 浓度最大稀释倍数为 10^{-9} ,能检出 cDNA 含量最低为 1×10^{-7} ng/mL,对福建省送检的 133 份疑似 CSF 病料进行检测,阳性率为 45.1%,验证了这一方法的可行性;这一结果也表明,福建省养猪场 CSFV 感染比较普遍,提示这些猪场要加强 CSFV 的预防控制工作。

我国当前猪病流行复杂,CSF 仍是我国猪群主要疫病之一。分子生物学方法高度灵敏特异,检测迅速,适合大面积检测,并且获得的基因序列能够用来追踪猪瘟的流行过程研究 CSFV 的进化变异情况,有着不可替代的优势。本试验优化的检测方法对下一步进行我国猪群 CSF 感染及分布情况调查

奠定了技术基础。

[参考文献]

- [1] 杨晓梅,林毅,邓小东,等.猪瘟 PPA-ELISA 和 Dot-ELISA 检测猪瘟抗体的比较及其应用[J].西南农业学报,2000,13:128-130.
- [2] 张富强,李志华,张念祖.竞争性 ELISA 检测猪瘟病毒抗原[J].中国兽医杂志,2005,41(11):9-12.
- [3] 高华峰,单于乃纯,姚俊,等.抗原捕获 ELISA 对猪瘟的诊断效果[J].中国兽医科技,2003,33(7):48-50.
- [4] Lowings P, Ibalta G, Needham J, et al. Classical swine fever virus diversity and evolution[J]. J Gen Virol, 1996, 77: 1311-1321.
- [5] Tu C, Lu Z, Li H, et al. Phylogenetic comparison of classical swine fever virus in China[J]. Virus Res, 2001, 81: 29-37.
- [6] Stuart D B, Syseng K, David B B, et al. Phylogenetic analysis of the E2 gene of classical swine fever viruses from Lao PDR[J]. Virus Res, 2004, 104: 87-92.
- [7] Wirz B, Trascbin J D, Muler H. Detection hog cholera virus by polymerase chain reaction[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1993, 31: 1148-1154.
- [8] Liu S T, Li S N, Wang D C. Rapid detection of hog cholera virus in tissues by the poly-merase chain reaction[J]. Journal of Virological Methods, 1991, 35: 227-236.
- [9] Sand-Vik T, Paton D J, Lowings P J. Detection and identification of ruminant and porcine pestiviruses by nested amplification 5' untranslated coding regions[J]. Journal of Virological Methods, 1997, 64: 43-56.
- [10] Goldrick M A, Lowings J P, Ibalta G. A novel approach to the detection of classical swine fever virus by RT-PCR with a fluorogenic probe(Tagman)[J]. Journal of Virological Methods, 1998, 72: 125-135.