

猪瘟兔化弱毒荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用

邓 力, 张彦明, 李维维, 杨幼聪, 谭晓妮

(西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】建立一种能够实际应用于猪瘟兔化弱毒疫苗中猪瘟病毒含量检测的荧光定量 PCR 方法。【方法】根据 GenBank 中登录号为 AF091507 的猪瘟病毒(CSFV)兔化弱毒株的全长基因组序列,在其 5'非编码区设计 2 对特异性引物(标准品引物、定量引物)和 1 条探针(qPCR-P),通过标准品引物进行 RT-PCR 扩增及 T7 RNA 聚合酶体外转录构建标准品 RNA。对荧光定量 PCR 方法的各项条件进行优化,建立猪瘟兔化弱毒荧光定量 PCR 检测方法,并采用该法对成品猪瘟兔化弱毒疫苗中的病毒含量进行检测。【结果】成功构建了体外转录的标准品 RNA,建立了检测猪瘟兔化弱毒的荧光定量 PCR 方法。该方法检测灵敏度可达 10 拷贝/ μL ,比 RT-nPCR 方法的灵敏度高出 1 个数量级;该法对标准品 RNA 检测的线性范围为 $1.0 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^2$ 拷贝/ μL 。对 1.0×10^8 , 1.0×10^6 , 1.0×10^3 拷贝/ μL 3 种稀释度的标准品 RNA 进行重复性试验,批内变异系数分别为 0.54%, 0.52% 和 0.39%;批间变异系数分别为 1.47%, 1.85% 和 1.01%,具有良好的可重复性。应用该方法对不同厂家猪瘟兔化弱毒疫苗中的病毒含量进行测定,可知同一厂家脾淋苗中的病毒含量比细胞苗高出 1~2 个数量级,而不同厂家同一类型疫苗中病毒含量也有差异,其中脾淋苗差异不大,而细胞苗间的差异较大,最高可达 27.2 倍。【结论】建立的猪瘟兔化弱毒荧光定量 PCR 方法,具有敏感性高、特异性强、重复性好的特点,为实际工作中对猪瘟兔化弱毒疫苗的质量监控提供了重要的技术支撑。

【关键词】 猪瘟兔化弱毒;荧光定量 PCR;体外转录;标准品 RNA

【中图分类号】 S852.65⁺1;Q78

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)02-0001-08

Development and preliminary application of real-time PCR assay for detection and quantitation of the lapinized Chinese strain of classical swine fever virus

DENG Li, ZHANG Yan-ming, LI Wei-wei, YANG You-cong, TAN Xiao-ni

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

Abstract: 【Objective】 The study was to develop a real-time assay for detecting and quantifying the virus loads of the lapinized Chinese strain vaccine against classical swine fever virus(CSFV). 【Method】 Two pairs of primes and a specific TaqMan probe were designed on the 5' untranslated region (UTR) of the CSFV genome whose accession number is AF091507 on Genbank. A standard RNA was constructed through RT-PCR with the Standard's Primes and then *in vitro* transcribed. The real-time PCR assay was developed by optimizing the variety of conditions. This assay was applied to quantify the virus loads of several lapinized virus vaccines against CSFV in order to obtain a preliminary evaluation. 【Result】 The real-time PCR assay for detecting and quantifying the virus loads of the lapinized Chinese strain vaccine against CS-

* [收稿日期] 2010-04-30

[基金项目] 国家“863”重大项目“家畜重要病毒病基因工程疫苗研究和创制”(2006AA10A204)

[作者简介] 邓 力(1985—),男,湖南长沙人,在读硕士,主要从事兽医公共卫生学研究。E-mail: dengli20003@163.com

[通信作者] 张彦明(1956—),男,陕西南郑人,教授,博士,博士生导师,主要从事分子病原学与免疫学研究。

E-mail: ylzhangyam@sohu.com

FV was developed successfully. The minimum detection limit was 10 copies/ μL , 10 times higher than that of the conventional RT-nPCR. The linear range was from 1.0×10^8 copies/ μL to 1.0×10^2 copies/ μL . Data of the repetitive tests showed good reproducibilities and the coefficients variations of 1.0×10^8 , 1.0×10^6 , 1.0×10^3 copies/ μL within and between batches were 0.54%, 0.52%, 0.39% and 1.47%, 1.85%, 1.01%, respectively. The results of clinical application showed that the virus load in the spleen vaccine was 10~100 fold higher than that of the cell-based vaccine compared with each manufacturer's products. However, compared with different manufacturers, the virus loads in spleen vaccine were similar, and that in the cell-based vaccine were discrepant. The maximum discrepancy was up to 27.2 folds. **【Conclusion】** The real-time PCR assay for detecting and quantifying the CSFV has high detection specificity and sensitivity, and good reproducibilities as well, which provides technical support for clinically monitoring the quality of the lapinized Chinese strain vaccine against CSFV.

Key words: lapinized Chinese strain of CSFV; real-time PCR; *in vitro* transcription; standard RNA

猪瘟疫化弱毒疫苗是我国研制的国际公认的安全有效弱毒疫苗,亦是国内惟一应用的弱毒疫苗^[1]。目前,我国生产的猪瘟疫化弱毒疫苗主要有细胞苗和组织苗(包括猪瘟脾淋苗、乳兔苗)。然而经农业部批准的生产猪瘟疫疫苗的厂家众多,疫苗效价不尽一致,有的疫苗甚至达不到免疫预防的要求。而对各公司生产疫苗效价的测定一般沿用兔体定型热法,但该方法存在一些无法克服的问题,如不能准确定量,兔个体差异会造成测毒结果不准确,检测方法烦琐、费时费力,不适合大批量样品的检测等。因此,亟需建立一种新的猪瘟疫化弱毒疫苗病毒含量检测方法^[2]。

近年来发展起来的荧光定量 PCR (real-time PCR) 技术,以其灵敏度高、特异性好、高通量检测等优点,在基因表达水平分析、传染病诊断和病原体定量检测、医学及药物开发、转基因产品生产等方面得到了广泛应用^[3-6]。本研究拟建立一种以体外转录 RNA 为标准品、能准确定量猪瘟疫化弱毒病毒含量的荧光定量 PCR 方法,并探索将其应用于实际工作中检测猪瘟疫化弱毒疫苗病毒含量的可能性。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

主要仪器有普通 PCR 仪、Bio-Rad 公司 iQ5 荧

光定量 PCR 仪、NanoDrop ND-1000 型紫外分光光度计、凝胶成像系统等。RNAsimple 总 RNA 提取试剂盒和 DNA 胶回收试剂盒,购自天根生化科技(北京)有限公司;T7 RNA Polymerase、PrimeScript™ RT-PCR Kit、One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit,均购自宝生物工程(大连)有限公司;RQ1 RNase-Free Dnase,购自 Promega 公司。

1.2 病毒株及细胞系

猪瘟疫化弱毒标准毒株,购自中国兽药监察所;猪瘟疫病毒石门株血毒、永生化猪脐静脉血管内皮细胞系、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 阳性病料、牛病毒性腹泻病病毒 (BVDV) 阳性病料以及含有猪圆环病毒-2 型 (PCV-2) 全长基因组的质粒,均由西北农林科技大学预防兽医平台实验室保存;猪瘟疫化弱毒疫苗,分别购自山东齐鲁动物保健品有限公司(A)、中牧实业股份有限公司(B)以及哈药集团生物疫苗有限公司(C),其中均包括脾淋苗和细胞苗。

1.3 引物、探针的设计与合成

根据 GenBank 中公布的猪瘟疫病毒 (CSFV) 化弱毒株(登录号:AF091507)全长基因组序列的 5' 非编码区保守序列,设计 2 对特异性引物(标准品引物 BZP-F/ BZP-R、定量引物 qPCR-F/ qPCR-R)和 1 条特异性探针 qPCR-P,其序列及其参数见表 1 和表 2。

表 1 标准品引物的相关参数

Table 1 Parameters of the Standard Primer

名称 Name	序列(5'→3') Sequence	长度/bp Length	T _m 值/℃ T _m value	(G+C)/%
BZP-F	<u>ACTAATACGACGCACTATAGGGGTCTTTCACCAGGACTACAT</u>	42	70.1	45.2
BZP-R	<u>TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCAGGGTCTTGCTCAC</u>	42	64.0	23.8

注:BZP-F 下划线部分示 T7 启动子序列,BZP-R 下划线部分示引入的 23 个 T。
Note:The underlined part of BZP-F is the sequence of T7 promoter;The underlined part of BZP-R is the 23 T.
标准品引物上游 BZP-F 的 5' 端引入了 T7 启动子序列,扩增的双链 DNA 片段(242 bp)可以在 T7

RNA 聚合酶作用下经体外转录形成单链 RNA,纯化后用作标准品 RNA;标准品引物下游 BZP-R 的 5'端引入了 23 个 T,有助于形成 poly A 尾,提高反

转录的效率。定量引物和探针选在标准品引物扩增片段内部设计,定量引物扩增片段长度为 76 bp。引物和探针由宝生物工程(大连)有限公司合成。

表 2 定量引物和探针的相关参数

Table 2 Parameters of the Quantitive Primer and Probe

名称 Name	序列(5'→3') Sequence	长度/bp Length	T _m 值/℃ T _m value	(G+C)/%
qPCR-F	GTTCTGCGAGGTGACCAAAAG	21	58.0	52.4
qPCR-R	GATGCACACATAAGTATGGTAAAGC	25	57.7	40.0
qPCR-P	FAM-TCCGTCGCTACCTGTACCCTACCT-Eclipse	25	67.4	60.0

1.4 标准品体外转录 RNA 的制备

1.4.1 病毒 RNA 的提取 复苏猪血管内皮细胞系于直径 60 mm 的细胞培养皿中,至细胞铺满皿底的 80%时,用无血清、无抗生素的 DMEM 培养基冲洗 3 次,接入猪瘟疫病毒稀释液,37℃吸附 1 h。吸附结束后用含体积分数 2%胎牛血清的 DMEM 于 37℃培养 72 h,收取单层细胞,按 RNAsimple 总 RNA 提取试剂盒说明书提取 RNA。

1.4.2 cDNA 的逆转录合成 按照宝生物工程(大连)有限公司生产的 PrimeScript™ RT reagent Kit 说明书进行。反应体系为:5×PrimeScript Buffer 2 μL,PrimeScript Buffer Enzyme Mix I 0.5 μL,Oligo dT Primer (50 μmol/L)0.5 μL,Random 6 mers (100 μmol/L) 2 μL,RNA template 5 μL。混匀,瞬时离心后在 PCR 仪上进行反转录。反应条件为:37℃ 20 min,85℃ 5 s。同时将 RNase-Free dH₂O 作为空白对照。

1.4.3 标准品目的片段的 PCR PCR 反应按 PrimeScript™ RT-PCR Kit 说明书进行。反应体系为:cDNA 模板 4 μL,10×PCR Buffer 2 μL,dNTP Mixture(10 mmol/L each)1 μL,Ex Taq™ HS 酶 0.5 μL,上、下游标准品引物(10 μmol/L)各 0.5 μL,RNase-Free dH₂O 补足至总体积为 20 μL。反应条件:95℃预变性 5 min;94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 15 s,35 个循环;最后 72℃延伸 3 min,4℃保存。扩增产物用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析,将目的片段按照天根生化科技(北京)有限公司的 DNA 胶回收试剂盒回收。

1.4.4 标准品 RNA 的体外转录合成与纯化 按照 T7 RNA Polymerase 说明书进行。由于 1.4.3 中所得到的目的片段中含有 T7 启动子,在 T7 RNA 聚合酶作用下,可以体外转录成单链 RNA。得到的产物经 RQ1 RNase-Free Dnase 处理,除去残留双链 DNA,并经酚/氯仿抽提纯化、乙醇沉淀后得到标准品单链 RNA。

1.4.5 标准品 RNA 纯度及含量的检测 为检测体外转录标准品 RNA 的纯度,进行相关鉴定试验,具体方法如下:将标准品 RNA 按 1.4.3 方法进行 PCR 扩增,同时将 1.4.3 节中胶回收产物作为阳性对照,RNase 处理后的标准品 RNA 作为阴性对照、RNase-Free H₂O 作为空白对照,若阴性不成立则说明标准品 RNA 不纯;用 NanoDrop ND-1000 型紫外分光光度计检测 RNA 在波长 260 和 280 nm 处的吸光值(OD₂₆₀、OD₂₈₀)。按以下公式计算标准品 RNA 的含量:

RNA 含量(拷贝/mL)=6.02×10²³(拷贝/mol)×RNA 质量浓度(g/mL)/MW(g/mol)。

式中:MW=碱基数×340 u/碱基。

将 1.4.4 中获得的标准品 RNA 纯化后置于-70℃保存备用。

1.5 荧光定量 PCR 方法的建立

1.5.1 引物和探针浓度的筛选 应用 1.4.5 所得到的标准品 RNA,将上、下游定量引物在体系中的最终浓度分别从 0.1 μmol/L 依次递增至 0.5 μmol/L,递增步长为 0.1 μmol/L,按矩阵法筛选定量引物的最佳浓度。将探针的最终浓度从 0.1 μmol/L 依次递增至 0.5 μmol/L,递增步长为 0.1 μmol/L,筛选探针的最佳浓度。

1.5.2 循环条件的优化 为了得到更高的荧光增幅并使反应有最小的循环数(Ct),对荧光定量 PCR 的循环条件分别进行三温循环和二温循环,对循环数进行优化。同时,将退火温度从 56℃依次递增至 60℃,递增步长为 0.5℃,对退火温度进行优化。

1.5.3 荧光定量 PCR 荧光定量 PCR 采用 One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit,在 Bio-Rad 公司的 iQ5 荧光定量 PCR 仪上进行,扩增反应总体系为 25 μL,其中 Buffer III 12.5 μL,Ex Taq™ HS 酶(5 U/μL)0.5 μL,RT Enzyme Mix II 0.5 μL,RNA Template 5 μL,经优化后的上、下游定量引物(10 μmol/L)各 0.5 μL,探针(10 μmol/L)0.5 μL,用

RNase-Free H_2O 补足 25 μL ,采用 1.5.2 中优化后的反应程序进行反应。

1.5.4 敏感性试验与标准曲线的建立 将标准品 RNA 按 10 倍梯度稀释成 $1.0\times 10^8\sim 1.0\times 10^1$ 拷贝/ μL ,进行荧光定量 PCR,每个稀释度 3 个重复。标准曲线由 iQ5 荧光定量 PCR 仪自动生成, X 轴代表每个浓度标准品模板中所含病毒起始含量以 10 为底的对数值, Y 轴代表各个梯度标准品 RNA 扩增时达到阈值所需的循环数。

1.5.5 特异性、准确性和重复性试验 对猪瘟病毒石门株病毒,感染了 PRRSV、BVDV 的阳性病料所提 RNA 以及含 PCV-2 全长基因组的质粒,进行荧光定量 PCR 反应,并以 1.0×10^3 拷贝/ μL 标准品 RNA 作为阳性对照,*RNase*-Free H_2O 作为空白对照,每个样品重复 2 次,检测该方法的特异性。按高、中、低 3 种稀释度,分别选取 1.0×10^8 , 1.0×10^6 和 1.0×10^3 拷贝/ μL 的标准品 RNA,分别在同一批次中重复 8 次,计算批内变异系数;并在不同时期将这 3 种稀释度标准品 RNA 分别再重复 8 个批次,每次 3 个重复,取平均值,计算批间变异系数,评价该方法的准确性和重

复性。

1.6 荧光定量 PCR 方法与 RT-nPCR 的比较

将标准品 RNA 按 10 倍梯度系列从 1.0×10^8 拷贝/ μL 稀释至 1.0×10^1 拷贝/ μL ,分别进行常规 RT-nPCR 和荧光定量 PCR 检测,对比其灵敏度。RT-nPCR 使用标准品引物和定量引物。

1.7 荧光定量 PCR 方法对疫苗样品的检测

选 3 个不同厂家生产的猪瘟兔化弱毒细胞苗和脾淋苗各 3 个样品,按照说明书用无菌的 PBS 溶液溶解其粉末,将所得溶液按每头份稀释 100 倍后,提取病毒 RNA,进行荧光定量 PCR 试验,检测疫苗中病毒的含量。

2 结果与分析

2.1 标准品引物的扩增结果

用标准品引物对抽提的总 RNA 进行 RT-PCR 扩增,经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳后,扩增出 1 条大小约为 242 bp 的特异性片段(图 1),与预期结果相符。同时对胶回收产物进行测序,结果表明,T7 启动子序列已成功连入扩增产物,可以用来进行体外转录。

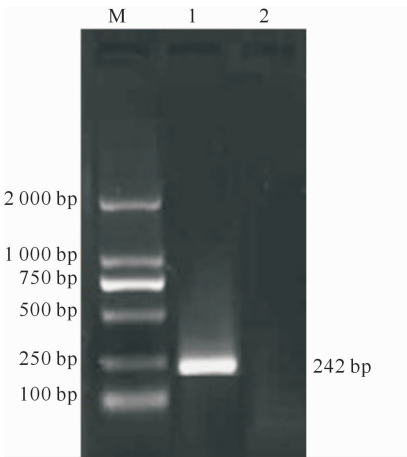


图 1 标准品目的片段 PCR 产物的电泳结果
M. DNA 标准 DL2000;1. cDNA PCR 扩增产物; 2. 空白对照
Fig.1 Amplification results of standard fragment
M. DNA Marker DL2000;1. Standard fragment;
2. No template control

2.2 标准品 RNA 纯度及含量的检测结果

经 NanoDrop ND-1000 型紫外分光光度计检测,标准品 RNA 原液的 OD_{260} 值为 9.730, OD_{260}/OD_{280} 值为 2.05,质量浓度为 389.2 ng/ μL ;此外,经质量检测鉴定可见,标准品 RNA 和阳性对照均扩增出了 1 条 242 bp 的特异性片段,而经 *RNase* 处理后的标准品 RNA 不能扩增出该目的片段(图 2),说明阴性对照成

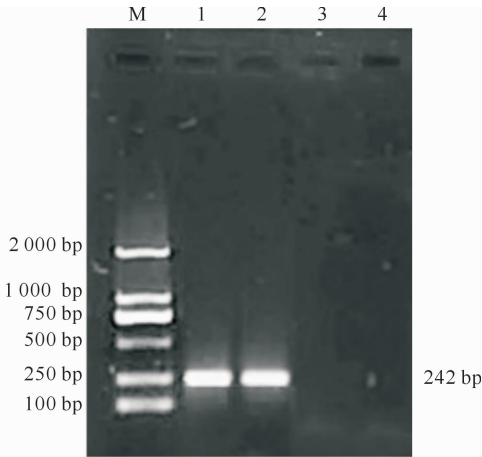


图 2 标准品 RNA 纯度鉴定的电泳结果
M. DNA 标准 DL2000;1. 阳性对照;2. 标准品 RNA
3. 阴性对照 (*RNase* 酶处理后的标准品 RNA);4. 空白对照
Fig.2 Purity identification results of the standard RNA
M. DNA Marker DL2000;1. Positive control;2. Standard RNA;
3. Negative control;4. No Template control

立,证明其没有 DNA 模板残留,纯度很好。经计算,标准品 RNA 原液中 RNA 含量为 2.93×10^{12} 拷贝/ μL ,于 $-70\text{ }^{\circ}C$ 下分装保存,可长期使用。

2.3 荧光定量 PCR 方法的建立

2.3.1 引物、探针浓度及循环条件的确定 采用矩阵法优选定量引物和探针的最佳浓度,结果表明,当上、下游定量引物终浓度均为 0.2 $\mu mol/L$ 、探针终

浓度为 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 时,能检测到最大的荧光增幅和最小的 C_t 值;循环条件优化结果表明,三温循环及退火温度为 57 $^{\circ}\text{C}$ 时,为最佳循环条件,故优化后的反应程序为:42 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s 进行反转录反应;95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s,57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s 并采集荧光,40 个循环。

2.3.2 敏感性试验及标准曲线 从图 3 可以看出,

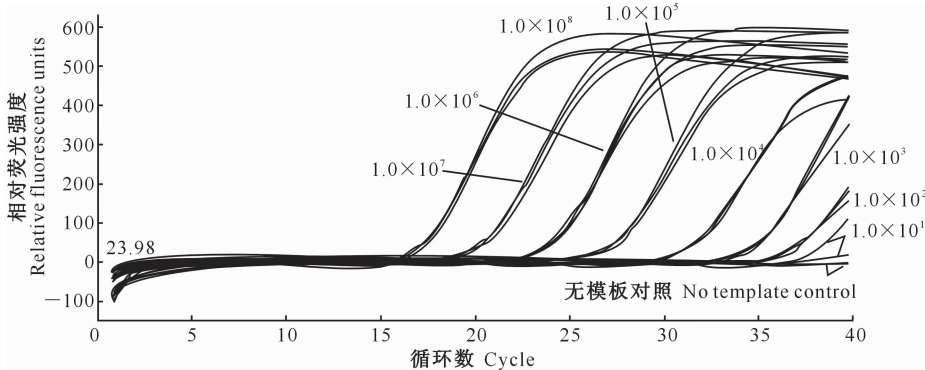


图 3 CSFV 荧光定量 PCR 方法的敏感性试验结果

Fig. 3 Sensitivity test of real-time PCR for CSFV detection

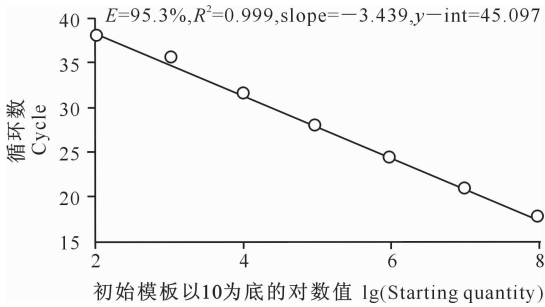


图 4 10 倍梯度标准品 RNA 的荧光定量 PCR 方法的标准曲线

Fig. 4 Standerd curve for serial 10 fold dilutions of Standard RNA

本研究建立的荧光定量 PCR 方法的检测灵敏度可达 1.0×10^1 拷贝/ μL 。经 iQ5 荧光定量 PCR 仪软件自动分析得到了荧光定量 PCR 方法的标准曲线(图 4),可知该方法的线性范围为 $1.0 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^2$ 拷贝/ μL ,扩增效率 $E=95.3\%$, $R^2=0.999$,在各个稀释度之间有很好的相关性。

2.3.3 特异性试验 由图 5 可知,在 40 个循环内,除猪瘟病毒石门株血毒和标准品 RNA 外,其他样品均未出现有效扩增荧光信号,表明本研究建立的荧光定量 PCR 方法对猪瘟病毒有良好的特异性。

2.3.4 准确性和重复性试验 选取高、中、低 3 种稀释度的标准品 RNA 进行重复 8 次的批内试验,从扩增曲线(图 6)以及对应的 C_t 值(表 3)可以看出,3 种稀释度的批内变异系数均小于 1%;将其分不同时期测定 8 次,每次 3 个重复,结果(表 4)显示,3 种稀释度的批间变异系数均小于 2%,说明本研究建立的荧光定量 PCR 方法具有良好的准确性和重复性。

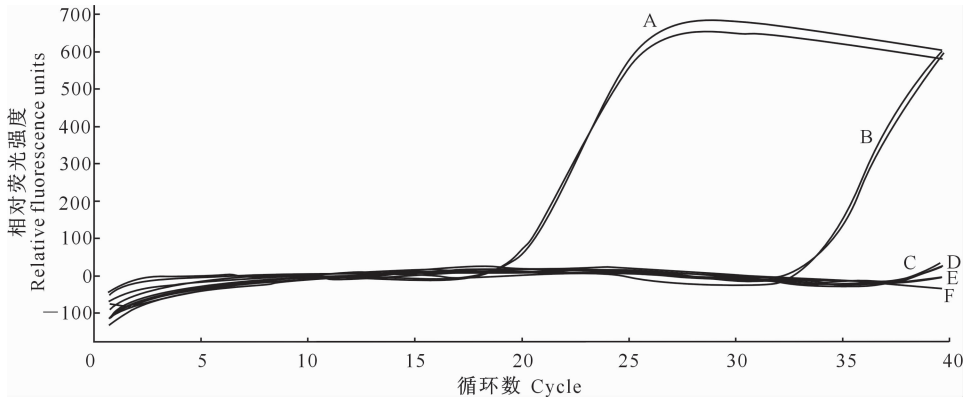


图 5 CSFV 荧光定量 PCR 方法的特异性试验结果

A. 猪瘟病毒石门株血毒;B. 标准品 RNA(阳性对照);C. PRRSV 阳性病料;D. BVDV 阳性病料;E. 含 PCV-2 全长基因组质粒;F 空白对照

Fig. 5 Speciality test of real-time PCR for CSFV detection

A. Blood poisoning of the CSFV shimen strain;B. Standard RNA for positive control;C. Positive sample of PRRSV; D. Positive sample for BVDV;E. Full-length genome plasmid with PCV-2;F. Negative control

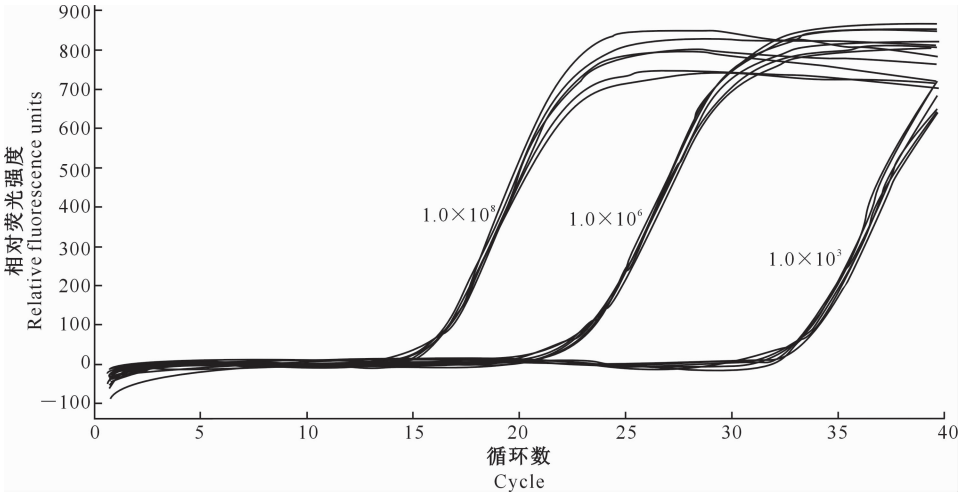


图 6 CSFV 荧光定量 PCR 方法的重复性试验结果

Fig. 6 Repeatability test of real-time PCR for CSFV detection

表 3 同一批次中 3 种稀释度标准品 RNA 重复测定 8 次的 Ct 值及批内变异系数

Table 3 Ct value and intra-coefficient variation(CV) of standard RNA of high,medium,low dilution

稀释度/ (拷贝·μL ⁻¹) Concentration	Ct ₁	Ct ₂	Ct ₃	Ct ₄	Ct ₅	Ct ₆	Ct ₇	Ct ₈	Ct 平均值 Ct mean	标准方差 Ct std. dev	批内变异系数/% CV
1.0×10 ⁸	16.37	16.45	16.21	16.35	16.27	16.34	16.20	16.23	16.302 5	0.088 4	0.54
1.0×10 ⁶	22.65	22.91	22.68	22.90	22.58	22.81	22.75	22.70	22.747 5	0.117 7	0.52
1.0×10 ³	33.59	33.33	33.35	33.20	33.47	33.20	33.36	33.40	33.362 5	0.131 2	0.39

表 4 3 种稀释度标准品 RNA 不同时期重复测定 8 次的 Ct 值及批间变异系数

Table 4 Ct value and inter-coefficient variation(CV) of standard RNA of high,medium and low dilution

稀释度/ (拷贝·μL ⁻¹) Concentration	Ct ₁	Ct ₂	Ct ₃	Ct ₄	Ct ₅	Ct ₆	Ct ₇	Ct ₈	Ct 平均值 Ct mean	标准方差 Ct std. dev	批内变异系数/% CV
1.0×10 ⁸	16.30	16.55	16.80	16.35	16.23	16.74	16.88	16.52	16.546 3	0.243 0	1.47
1.0×10 ⁶	22.75	22.94	23.61	23.45	22.78	23.31	23.80	22.70	23.167 5	0.429 4	1.85
1.0×10 ³	33.36	33.86	34.23	34.05	33.57	33.80	34.36	33.64	33.858 8	0.340 0	1.01

2.4 荧光定量 PCR 方法与 RT-nPCR 的比较

将标准品 RNA 从 1.0×10⁸ 拷贝/μL 按 10 倍梯度稀释至 1.0×10¹ 拷贝/μL,进行 RT-nPCR 扩增,将产物用 40 g/L 琼脂糖凝胶电泳,结果见图 7。由图 7 可知,RT-nPCR 方法的灵敏度为 1.0×10² 拷贝/μL,比本研究建立的荧光定量 PCR 方法低 1 个数量级。

2.5 荧光定量 PCR 方法对疫苗样品的检测

对 3 个不同厂家的猪瘟疫化弱毒疫苗脾淋苗和细胞苗的病毒含量进行检测,结果见表 5。由表 5 可知,3 个厂家的脾淋苗中所含病毒量均高于细胞苗,分别是细胞苗的 85,33,460 倍;不同厂家生产的脾淋苗中病毒含量处于同一数量级,差异不大,但是细胞苗中猪瘟病毒含量最高值(B 厂家)是最低值(C 厂家)的 27.2 倍,差异较大。

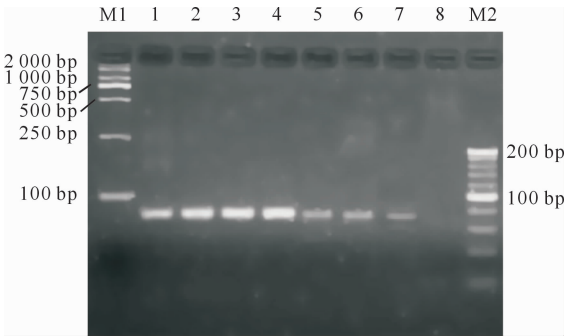


图 7 10 倍梯度稀释标准品 RNA 的 RT-nPCR 扩增结果
M1. DNA 标准 DL2000;1~8. 分别为 10 倍梯度稀释的
1.0×10⁸~1.0×10¹ 拷贝/μL 标准品 RNA;M2. 20 bp DNA 标准

Fig. 7 Amplification results of Standard RNA of
10 fold's serial dilution through RT-nPCR

M1. DNA Marker DL2000;1-8. 1.0×10⁸-1.0×10¹copies/μL
standard RNA;M2. 20 bp DNA Ladder Marker

表 5 3 个不同厂家猪瘟兔化弱毒疫苗脾淋苗和细胞苗中猪瘟病毒含量的检测结果
Table 5 Results of real-time PCR of vaccine samples from 3 different manufacturers

厂家 Manufacturer	类型 Vaccine Type	Ct 值 Ct Value	初始猪瘟病毒含量/(拷贝·μL ⁻¹) Start CSFV loads
A	脾淋苗 Spleen vaccine	18.36	2.41×10 ⁷
	细胞苗 Cell-based vaccines	24.98	2.84×10 ⁵
B	脾淋苗 Spleen vaccine	16.86	8.86×10 ⁷
	细胞苗 Cell-based vaccines	21.83	2.67×10 ⁶
C	脾淋苗 Spleen vaccine	17.44	4.52×10 ⁷
	细胞苗 Cell-based vaccines	27.17	9.81×10 ⁴

3 讨 论

近年来,荧光定量 PCR 技术以其灵敏度高、特异性强、线性关系好、操作简单等优点已被广泛应用于分子生物学领域^[3-6]。国内外针对运用荧光定量 PCR 技术定量检测 CSFV 的报道也越来越多^[7-10]。本研究成功地建立了一种特异性强、灵敏度高、重复性好的定量检测猪瘟兔化弱毒的荧光定量 PCR 方法。本试验所用引物和探针均参照 GenBank 中公布的 CSFV 兔化弱毒株(登录号:AF091507)全长基因组序列 5'端非编码区设计,并将该 CSFV 兔化弱毒株与 GenBank 中公布的其他 34 株 CSFV 毒株全基因组序列进行了比对分析,结果显示,其与 29 株 CSFV 毒株同源性达 95.8%~100%,与另外 5 株同源性为 87.3%~91.5%。

荧光定量 PCR 技术中标准品的选用及其质量是最关键的影响因素。一般而言,为了最大限度地保证各步骤之间的效率一致,标准品需用与被检测样本相同或相似的材料^[11]。然而对于 CSFV 而言,完整的病毒粒子或者 mRNA 均具有感染性,因此不适宜用作标准品^[12]。国内有些学者,如陆永干等^[13]、王云龙等^[14]均采用包含了扩增片段的质粒作为标准品,但是其并不能反映 CSFV 在反转录过程中的效率,并且质粒标准品和 cDNA 在荧光定量 PCR 过程中的扩增效率也不尽一致;此外,也有学者,如史子学等^[15]采用 cDNA 作为标准品,但是该方法需要在每次荧光定量 PCR 之前单独反转录,使操作步骤趋于复杂,也增大了多次开盖导致污染的几率,不适合高通量样品的检测;国外学者 Hoffmann 等^[16]、Dimna 等^[17]以体外转录的 RNA 作为标准品,很好地保证了样品分析时各步骤之间效率的一致性,效果较好。本研究用体外转录的方法构建了标准品 RNA,经检测,其纯度高、质量好,体外转录 1 次即可获得高浓度的溶液,可供长期使用。将标准品 RNA 按 10 倍梯度稀释进行荧光定量 PCR 检测,40 个循环内,所得标准曲线在 10⁸~10²

拷贝/μL 呈现出很好的线性关系,并且最低能检测到 10 拷贝/μL 的 RNA 模板,与 Hoffmann 等^[16]的研究结果(8 拷贝/μL)基本一致。

此外,本研究采用了一步法荧光定量 PCR 方法检测猪瘟兔化弱毒,与常规的两步法相比,该法操作方便,显著简化了操作步骤,缩短了检测时间,从 RNA 提取到结果分析只要 3 h(两步法一般为 4 h^[2]),故更适合大规模样品的分析检测;此外,还避免了样本间的交叉污染或反复开管时带入的污染源,减小了污染对检测结果的影响。

本研究采用建立的荧光定量 PCR 方法,对 3 个厂家生产的猪瘟兔化弱毒细胞苗和脾淋苗分别进行了检测,结果显示,同一厂家脾淋苗中包含的病毒含量比细胞苗中要高 1~2 个数量级;不同厂家的脾淋苗中病毒含量差异不大,但是细胞苗中病毒含量有 1 个数量级的差异。此外,由于本研究建立的荧光定量 PCR 方法同样可以定量猪瘟病毒石门株,因此可以用其来检测猪瘟病毒在细胞中的增殖情况,这为研究猪瘟病毒在不同细胞中的增殖情况提供了技术支撑。

[参考文献]

[1] Qiu H J, Shen R X, Tong G Z. The lapinized Chinese strain vaccine against classical swine fever virus: A retrospective review spanning half a century [J]. Agricultural Sciences in China, 2006, 5(1): 1-14.

[2] 陈玉栋, 张楚瑜, 邹俊煊, 等. 建立快速定量检测猪瘟兔化弱毒疫苗的荧光定量 PCR 技术 [J]. 中国病毒学报, 2003, 18(2): 124-128.

Chen Y D, Zhang C Y, Zou J X, et al. Development of a real-time PCR assay for rapidly quantifying the Lapinized Chinese Strain Vaccine Against CSFV [J]. Chinese Journal of Virology, 2003, 18(2): 124-128. (in Chinese)

[3] Heid C A, Stevens J, Livak K J, et al. Real time quantitative PCR [J]. Genome Research, 1996, 6: 986-994.

[4] Mackay I M, Arden K E, Nitsche A. Real-time PCR in virology [J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(6): 1292-1305.

[5] 李 安, 谢金文, 魏加贵, 等. 荧光定量 PCR 技术在分子检测上的研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(4): 73-76.

- Li A, Xie J W, Wei J G, et al. The application of real-time PCR on molecular detections [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2009, 36(4): 73-76. (in Chinese)
- [6] 宋勇涛, 王 勇, 刘 勤, 等. FQ-PCR 在转基因产品检测中的应用研究进展 [J]. 动物医学进展, 2008, 29 (11): 55-59.
- Song Y T, Wang Y, Liu Q, et al. The application of real-time PCR on detections of genetically modified product [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2008, 29 (11): 55-59.
- [7] Risatti G R, Callahan J D, Nelson W M, et al. Rapid detection of classical swine fever virus by a portable real-time reverse transcriptase PCR assay [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41: 500-505.
- [8] 温国元, 万 超, 潘兹书, 等. 应用荧光定量 PCR 技术快速定量检测猪瘟疫病毒 [J]. 武汉大学学报: 理学版, 2004, 50(6): 746-750.
- Wen G Y, Wan C, Pan Z S, et al. Detection of classical swine fever virus with a real-time PCR assay [J]. Journal of Wuhan University: Science Edition, 2004, 50(6): 746-750. (in Chinese)
- [9] Urzka J C, Jože G, Ivan T, et al. Real-time RT-PCR assay for rapid and specific detection of classical swine fever virus—Comparison of SYBR Green and TaqMan MGB detection methods using novel MGB probes [J]. Journal of Virological Methods, 2008, 147(2): 257-264.
- [10] Ralph J A, Oude O, Morrissy C J, et al. Detection and quantitative pathogenesis study of classical swine fever virus using a real-time RT-PCR assay [J]. Journal of Virological Methods, 2006, 131: 78-85.
- [11] Fronhoffs S, Totzke G, Stier S, et al. A method for the rapid construction of cRNA standard curves in quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction [J]. Molecular and Cellular Probes, 2002, 16: 99-110.
- [12] Hofmann M. Construction of an infectious chimeric classical swine fever virus containing the 5'UTR of bovine viral diarrhoea virus, and its application as a universal internal positive control in real-time RT-PCR [J]. Journal of Virological Methods, 2003, 114: 77-90.
- [13] 陆永干, 戴贤君, 姚建红, 等. 猪瘟疫病毒荧光定量 PCR 标准阳性模板的构建 [J]. 浙江农业学报, 2009, 21(1): 35-38.
- Lu Y G, Dai X J, Yao J H, et al. Construction of a positive standard of the real-time PCR assay for detecting classical swine fever virus [J]. Zhejiang Journal of Agriculture Sciences, 2009, 21(1): 35-38. (in Chinese)
- [14] 王云龙, 刘建营, 韩 洁, 等. 猪瘟疫病毒荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. 动物医学进展, 2009, 30(5): 36-40.
- Wang Y L, Liu J Y, Han J, et al. Development of a real-time PCR assay for detecting the classical swine fever virus [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2009, 30(5): 36-40. (in Chinese)
- [15] 史子学, 徐兴然, 涂长春. 用荧光定量 RT-PCR 方法检测猪瘟疫病毒 [J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(6): 467-470.
- Shi Z X, Xu X R, Tu C C. A real-time PCR assay for detecting classical swine fever virus [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2007, 29(6): 467-470. (in Chinese)
- [16] Hoffmann B, Beer M, Schelp C, et al. Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever [J]. Journal of Virological Methods, 2005, 130(1/2): 36-44.
- [17] Dimna M L, Vrancken R, Koenen F, et al. Validation of two commercial real-time RT-PCR kits for rapid and specific diagnosis of classical swine fever virus [J]. Journal of Virological Methods, 2008, 147(1): 136-142.