

猪伪狂犬病毒野毒株 SYBR Green I 实时 荧光定量 PCR 诊断试剂盒的研制

余 波, 周思旋, 谭诗文*, 徐景峨, 史开志, 杨 莉

(贵州省畜牧兽医研究所, 贵州 贵阳 550005)

摘要: 根据 GenBank 中猪伪狂犬病毒(PRV)*gE* 基因序列设计特异性的引物, PCR 扩增获得 PRV *gE* 基因片段, 构建重组质粒 pMD18-T-*gE*, 作为阳性标准品。对 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 反应条件进行优化, 建立猪 PRV SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 诊断方法, 研制诊断试剂盒。扩增产物的熔解曲线分析结果显示只出现单特异峰, 无引物二聚体, 对猪圆环病毒(PCV-2)、猪细小病毒(PPV)、PRV(*gE* 基因缺失株)、猪源 *E. coli*、猪瘟病毒(CSFV)、猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒(PRRSV)均无阳性信号扩增, 且重复性好, 灵敏度可达 2.3×10^1 拷贝/ μL 。结果表明, 研制的 PRV 野毒株 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 试剂盒特异、灵敏、快速、重复性好, 适于伪狂犬病毒临床样品的检测。

关键词: 猪伪狂犬病毒; 野毒株; *gE* 基因; 荧光定量 PCR; 诊断试剂盒

中图分类号: S854.4⁺3 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)06-0128-05

Development of SYBR Green I Real-time Quantitative PCR Kit for Detection of PRV Wild-type Strains

YU Bo, ZHOU Si-xuan, TAN Shi-wen*, XU Jing-e, SHI Kai-zhi, YANG Li

(Guizhou Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Guiyang 550005, China)

Abstract: According to the gene sequences of *gE* gene of PRV in GenBank, one pairs of specific primer was designed for amplifying the specific fragments of *gE* gene. Then *gE* gene of PRV amplified by PCR was cloned into pMD18-T vector and it was used as positive standard. After optimization of annealing temperature and primers concentrations, a SYBR Green I real-time quantitative PCR kit was developed for detection of PRV wild-type strains. The melting curve analysis using SYBR Green I dye showed one specific peak, and primer-dimers peak was not observed. No fragment was amplified from PRV strains depleted of *gE* gene, PPV, PCV-2, *Escherichia coli*, CSFV, PRRSV by the SYBR Green I real-time quantitative PCR. The PCR kit was highly sensitive in 2.3×10^1 copies/ μL DNA. The results revealed that the PCR kit was sensitive, specific and it could be used to detect PRV wild-type strains in clinical samples.

Key words: PRV; wild-type strains; *gE*; real-time quantitative PCR; diagnostic kit

伪狂犬病毒(PRV)能引起猪、牛、羊、犬等多种家畜发病, 猪是该病毒的贮存宿主和传染源。猪伪狂犬病是由 PRV 引起的一种危害严重的传染病, 感染 PRV 后可造成妊娠母猪流产、死胎和

木乃伊胎, 仔猪出现神经症状, 并可导致仔猪免疫抑制, 耐过仔猪则生长缓慢, 成年猪多呈隐形感染^[1-5], 给养猪业造成了巨大的经济损失。对 PRV 的快速、准确诊断是防治该病的关键。目前, 猪伪

收稿日期: 2014-02-20

基金项目: 贵州省科技厅农业攻关项目([2010]3085); 贵州省畜禽健康养殖技术创新能力建设项目([2010]4004)

作者简介: 余 波(1981-), 男, 四川邻水人, 副研究员, 硕士, 主要从事兽医分子生物学研究。E-mail: yubonky@163.com

* 通讯作者: 谭诗文(1956-), 男, 贵州天柱人, 研究员, 本科, 主要从事兽医分子生物学研究。E-mail: tswleiden@sina.com

狂犬病病毒 *gE* 基因缺失的 PRV 弱毒株使用广泛,大多数的商业化基因缺失疫苗缺失了 *gE* 基因^[6]。*gE* 基因是 PRV 的主要毒力相关基因,在所有 PRV 野毒株中均含有该基因,野毒株感染后,在猪血清中均能够检测到 *gE* 糖蛋白的抗体,因此,*gE* 基因可作为目的基因,用以区分疫苗免疫和野毒株感染^[7-9]。朱淑芬等^[10]根据 PRV *gB* 基因建立了 TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 检测方法,每个反应最低可检测 1.5×10^2 拷贝,但由于目前缺失 *gB* 基因的疫苗株较少,因此无法区分疫苗株和野毒株。郑敏等^[11]根据 PRV *gE* 基因序列,设计了 1 对特异引物和探针,建立了可区分 PRV 野毒株和基因缺失疫苗株的 TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 检测方法,灵敏度可达 2.23×10^1 拷贝/ μL ,比常规 PCR 检测方法高 100 倍。陈世界等^[12]建立了区别 PRV 野毒株和 *gE*-疫苗株的 TaqMan-MGB 方法,最低可检测到 43 个基因拷贝数的 *gE* 基因,但以上报道均未对猪血清样品进行荧光定量检测。

与常规 PCR 比较,实时荧光定量 PCR 具有重复性好、灵敏度高、能够定量等优点,已被广泛应用于多种疾病病原的检测^[13-14]。鉴于此,本研究根据 GenBank 中 PRV 特异性的 *gE* 基因序列设计引物,对 SYBR Green I 荧光定量 PCR 反应条件进行优化,旨在建立猪组织样品和血清样品同时适用的 PRV 实时荧光定量 PCR 诊断试剂盒,为 PRV 的快速诊断奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

菌株:PRV、猪圆环病毒(PCV-2)、猪细小病毒(PPV)、PRV(*gE* 基因缺失株)、猪源大肠杆菌(*E. coli*)、猪瘟病毒(CSFV)、猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒(PRRSV)均由贵州省畜禽疫病研究实验室保存,PRV(*gE* 基因缺失 Bartha-k61 株)购自山东绿都生物科技有限公司。

主要试剂及仪器:核酸染料 Goldview、DNA maker DL2000、*Taq* DNA Polymerase($5 \text{ U}/\mu\text{L}$)及相应 $10 \times$ *Taq* Buffer、dNTPs、pMD18-T、SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 酶、TAE 电泳缓冲液、微量病毒基因组 DNA 提取试剂盒、GenClean 柱式琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、细菌基因组 DNA 提取试剂盒等均购自宝生物(大连)工程有限公司。实时荧光定量 PCR 仪购自 Eppendorf 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计

根据 GenBank 中 PRV *gE* 基因

序列,应用 Oligo 6.0 软件设计特异性的引物,上游引物:5'-GACGAGGACGACGGGCTGTA-3',下游引物:5'-GCGGTCACTCCATAGTTGGG-3',引物由宝生物(大连)工程有限公司合成。

1.2.2 DNA 提取 (1)组织样品:取待检样品淋巴结、脑组织样品共约 1.0 g,加入 800 μL PBS 缓冲液,待检样品用液氮研磨后, -70°C 反复冻融 3 次, 12 000 r/min 离心取上清。应用微量病毒基因组 DNA 提取试剂盒提取病毒 DNA。*E. coli* DNA 参照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行。(2)血清样品:取 50 μL 血清加入等体积的血清裂解缓冲液(pH 值为 8.0 的 50 $\mu\text{mol/L}$ Tris-HCl、150 $\mu\text{mol/L}$ NaCl、2 $\mu\text{mol/L}$ EDTA、1% Triton X-100、5% SDS)、混匀后煮沸 5 min, 12 000 r/min 离心取上清 2 μL 用于实时荧光定量 PCR 和普通 PCR。

1.2.3 pMD18-T-*gE* 阳性标准品的制备 应用合成的引物,对 PRV 进行 PCR 扩增,反应条件为: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 57°C 30 s, 72°C 30 s, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。将扩增的 PCR 产物用 GenClean 柱式琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收 DNA 片段,并与 pMD18-T 克隆载体连接,转化感受态细胞 DH5 α ,应用 Amp 抗性平板进行阳性菌筛选,用质粒抽提试剂盒提取重组菌质粒,重组质粒命名为 pMD18-T-*gE*,同时将该质粒送宝生物工程(大连)有限公司测序。用核酸蛋白检测仪测定重组质粒的浓度和纯度,进行 10 倍梯度倍比稀释,作为阳性标准品。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 反应条件的优化 实时荧光定量 PCR 采用 25 μL 反应体系,上、下游引物各 1 μL , Premix Ex *Taq* 12.5 μL , 模板 1 μL , 用超纯水补足至 25 μL , 对反应条件进行优化,退火温度分别采用 52、57、63 $^\circ\text{C}$, 引物浓度分别为 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$, 以确定最佳反应条件。同时以超纯水作为空白对照。反应条件为: 94°C 10 s; 94°C 5 s, 退火 10 s, 72°C 10 s, 40 个循环。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 反应标准曲线的建立 用核酸蛋白检测仪测定重组质粒 pMD18-T-*gE* 的浓度和纯度,计算 DNA 拷贝数,进行连续 10 倍系列稀释,以 1.2.4 优化好的条件进行荧光定量 PCR 扩增,每个稀释倍数 3 个重复,以拷贝数为横坐标,以 C_t 值为纵坐标,建立 PRV SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 标准曲线。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 敏感性试验 对重组质粒 pMD18-T-*gE* 计算 DNA 拷贝数后,进行 10 倍倍比稀释,应用建立的荧光定量 PCR 进行反应,每个

稀释倍数 3 个重复,以确定 PRV SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 的敏感性。

1.2.7 实时荧光定量 PCR 特异性试验 应用建立的 PRV SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 对 PRV、PRV(*gE* 基因缺失株)、PCV-2、PPV、*E. coli* DNA 及 CSFV、PRRSV cDNA(贵州省畜禽疫病研究实验室保存)进行荧光定量 PCR 反应,每个样品 3 个重复,以确定建立的 PRV 野毒株 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 的特异性。

1.2.8 实时荧光定量 PCR 重复性试验 应用建立的 PRV SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 3 次重复检测 PRV DNA 样品,以确定建立的 PRV SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 的重复性。

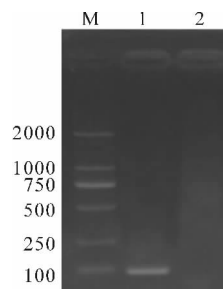
1.2.9 实时荧光定量 PCR 试剂盒的研制组装及稳定性检测 试剂盒组成:实时荧光定量 PCR 反应混合液(Premix Ex Taq)250 μ L、引物 40 μ L、阴性对照(*gE* 基因缺失株的 PRV DNA)20 μ L、阳性对照(PRV DNA)20 μ L、超纯水 500 μ L、裂解液 800 μ L。将试剂盒各组分分别保存于 4 $^{\circ}$ C、20 $^{\circ}$ C、-20 $^{\circ}$ C,设置 1 周、6 个月、1 a 3 个保存时间梯度,对阳性菌株进行检测。

1.2.10 临床样品检测 应用试剂盒对 2012—2013 年贵州省贵阳市、黔南州、铜仁地区几个规模化的生猪养殖场和养殖专业户送检的 57 份疑似病料(组织)、185 头份发病猪场未发病猪血清,应用建立的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法进行检测,同时参照文献[15]的方法进行普通 PCR。

2 结果与分析

2.1 pMD18-T-*gE* 阳性标准品的制备

对 PRV 进行 PCR 扩增,扩增出 101 bp 的目的片段,且无非特异性片段扩增(图 1)。将测序结果与 GenBank 中的 PRV *gE* 基因序列比对,核苷酸相似度为 98.9%~100%。



M, DL2000; 1. PRV *gE* 基因 PCR 产物; 2. 阴性对照

图 1 PRV *gE* 基因 PCR 扩增结果

2.2 实时荧光定量 PCR 反应条件的优化

建立的 PRV 野毒株 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 最佳反应条件为:退火温度 57 $^{\circ}$ C,引物浓度 10 μ mol/L,在此反应条件下出现最高的荧光值和最小的 C_t 值,并且熔解曲线无非特异性峰值。

2.3 实时荧光定量 PCR 反应标准曲线的建立

将重组质粒 pMD18-T-*gE* 进行 10 倍倍比稀释,分别取 2.3×10^6 、 2.3×10^5 、 2.3×10^4 、 2.3×10^3 、 2.3×10^2 、 2.3×10^1 拷贝/ μ L 6 种不同浓度的重组质粒作为标准阳性模板,应用建立的 PRV SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 进行扩增,得到标准曲线(图 2),线性回归方程为 $C_t = -2.904 \times \lg A + 33.93$ ($R^2 = 0.994$), A 为拷贝数。

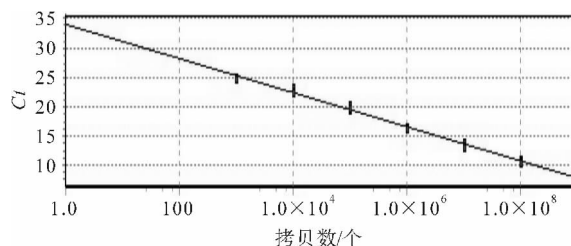


图 2 PRV SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 标准曲线

2.4 实时荧光定量 PCR 熔解曲线分析

熔解曲线分析结果显示,扩增产物的溶解温度 T_m 值为 83.6~84.2 $^{\circ}$ C,没有引物二聚体,也未出现非特异性的其他峰值(图 3)。

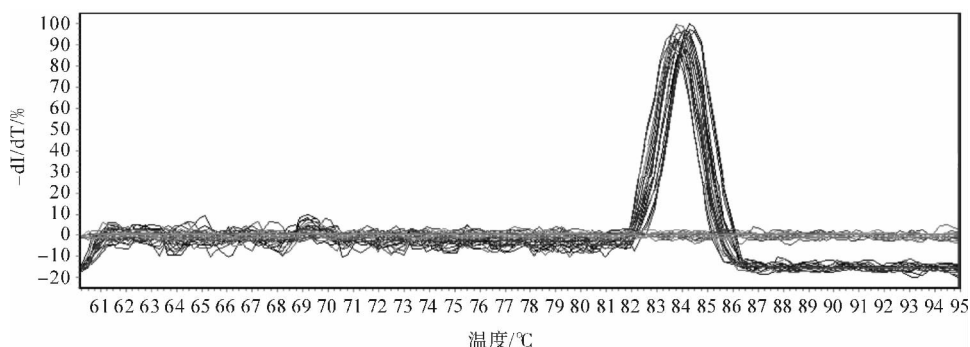
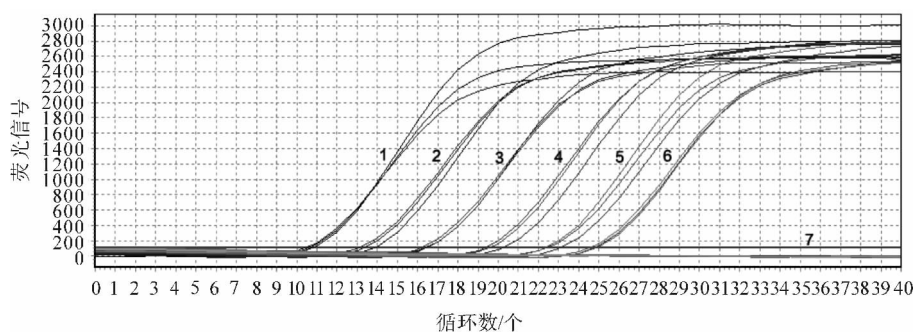


图 3 PRV SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 熔解曲线

2.5 实时荧光定量 PCR 敏感性

将制备的质粒模板 10 倍倍比稀释为 2.3×10^6 、 2.3×10^5 、 2.3×10^4 、 2.3×10^3 、 2.3×10^2 、 2.3×10^1 、 2.3×10^0 拷贝/ μL 7 种不同浓度进行扩增,结果显示,其最低检测量为 2.3×10^1 拷贝/ μL ,灵敏度高(图 4)。



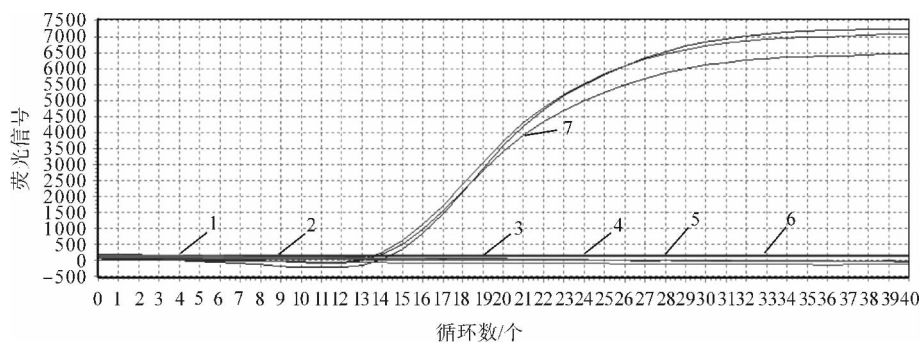
1—7 为重组质粒 DNA 2.3×10^6 — 2.3×10^0 拷贝/ μL 稀释的荧光定量 PCR 结果

图 4 PRV SYBR Green I 荧光定量 PCR 敏感性

2.6 实时荧光定量 PCR 特异性

以 PCV-2、PPV、PRV、PRV(*gE* 基因缺失株)、*E. coli* DNA 及 CSFV、PRRSV cDNA 进行 PCR 反

应,结果显示,PRV 为阳性,PCV-2、PPV、PRV(*gE* 基因缺失株)、*E. coli* 及 CSFV、PRRSV 均为阴性(图 5)。



1—7 分别为 PCV-2、PPV、PRV(*gE* 基因缺失株)、*E. coli*、CSFV、PRRSV、PRV

图 5 PRV SYBR Green I 荧光定量 PCR 特异性

2.7 实时荧光定量 PCR 重复性试验结果

应用建立的 PRV 野毒株 SYBR Green I 荧光定量 PCR 方法,3 次检测 PRV DNA 样品的拷贝数基本一致。

2.8 试剂盒的稳定性检测结果

将组装的试剂盒 4°C 保存 1 a 阳性拷贝数较首次检测降低 100 倍, -20°C 保存 1 a 阳性拷贝数检测的偏差在 10 个拷贝数以内。

2.9 临床样品的检测结果

57 份疑似病料(组织)荧光定量 PCR 阳性率为 24.6%(14/57),普通 PCR 阳性率也为 24.6%(14/57)。185 头份猪场猪血清荧光定量 PCR 阳性率为 13.5%(25/185),而普通 PCR 阳性率为 0(0/185)。

3 讨论

本研究结果表明,建立的伪狂犬病病毒野毒株 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 具有特异、灵敏、

快速、重复性好等优点,适于伪狂犬病病毒野毒株临床样品的检测。

普通 PCR 在伪狂犬病的净化中发挥了重要作用,但其检测的灵敏度相对较低,不能有效检出猪群中 PRV 的早期感染和隐形感染^[16-17]。本研究中 57 份疑似病死猪病料(组织)中病毒含量较高,实时荧光定量 PCR 和普通 PCR 符合率为 100%,而发病猪场未发病猪血清 PRV 病毒含量较低,只有应用实时荧光定量 PCR 才能检测到阳性。本研究研制的 PRV 野毒株 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 试剂盒可应用于 PRV 野毒株早期感染和隐形感染检测,有利于猪伪狂犬病的净化。

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,1997:998-1009. (下转第 144 页)

- [3] 李如焱. 四君子汤在兽医临床上的应用[J]. 中兽医学杂志, 2007(6): 17-18.
- [4] 张殿新, 钟秀全, 程晶晶, 等. 芪蓝四君子汤对雏鸡部分免疫指标的影响[J]. 动物医学进展, 2010, 31(5): 75-78.
- [5] 王自然. 四君子汤及加味四君子汤对商品肉鸡免疫功能的影响[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2008, 36(2): 72-76.
- [6] 弓素梅, 郭红斌, 刘占民. 四君子汤对赛鸽抗氧化机能的影响[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(7): 1410-1412.
- [7] 蒋培红. 黄芪组方对肉鸡免疫功能影响的研究[J]. 中国畜牧兽医, 2007, 34(4): 87-90.
- [8] 王慧, 李福宝, 司梅霞, 等. 复方中草药对淮南麻鸡生长性能及免疫器官指数的影响[J]. 现代农业科技, 2008(8): 173-174.
- [9] 董淑珍, 沈萍, 杨彩然, 等. 中草药对鸡法氏囊和胸腺淋巴细胞的组织学观察[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(1): 9728-9729.
- [10] 王自然. 加减四君子汤对商品肉鸡免疫功能的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(2): 145-148.
- [11] 李亚杰, 赵献军. 益生菌黄芪多糖微胶囊制剂对肉仔鸡生长性能、免疫器官指数及血液生化指标的影响[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(1): 100-103.
- [12] 司昌德, 闵亚宏. 黄芪多糖对肉仔鸡免疫功能的影响[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(12): 978-980.

(上接第 131 页)

- [2] Straw B E, Zimmerman J J, D'Allaire S, *et al.* Diseases of swine[M]. 9th edition. Iowa: Blackwell publishing, 2006: 299-308.
- [3] 刘季清, 郭鑫, 赵荣茂, 等. 猪伪狂犬病毒感染的血清学调查[J]. 中国兽医杂志, 2006, 42(7): 27-28.
- [4] 樊振华, 姚敬明, 孟帆, 等. 山西部分种猪场猪伪狂犬病分子流行病学调研[J]. 山西农业科学, 2012, 40(9): 989-992.
- [5] 杨庆芳, 宁官保, 李俊达. 猪伪狂犬病病毒的分离鉴定[J]. 山西农业科学, 2011, 39(8): 886-889.
- [6] 姚敬明, 王娟萍, 韩一超, 等. 猪伪狂犬病病毒 *gE* 基因缺失苗免疫试验[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(2): 184-187.
- [7] 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.
- [8] Yong T, Huan-chun C, Shao-bo X, *et al.* Development of a latex agglutination test using the major epitope domain of glycoprotein E of pseudorabies virus expressed in *E. coli* to differentiate between immune responses in pigs naturally infected or vaccinated with pseudorabies virus[J]. Vet Res Commun, 2005, 29: 487-497.
- [9] 张莉, 丁伯良, 王英珍, 等. 区分猪伪狂犬病病毒 *gE* 基因缺失疫苗株和野毒株的 *gE*-PCR 方法的建立[J]. 动物医学进展, 2008, 29(8): 5-8.
- [10] 朱淑芬, 朱瑞良, 乔彩霞, 等. 检测伪狂犬病毒 *gB* 基因荧光定量 PCR 方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2012, 32(10): 1413-1417.
- [11] 郑敏, 毛凝, 黄梅清, 等. 猪伪狂犬病毒 Taqman-MGB 荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 中国农学通报, 2013, 29(17): 37-41.
- [12] 陈世界, 李绿, 张焕容, 等. 区别伪狂犬病病毒野毒株和 *gE*-疫苗株的 *gE*-TaqMan-MGB 方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(7): 550-554.
- [13] 袁亚男, 刘文忠. 实时荧光定量 PCR 技术的类型、特点与应用[J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35(3): 27-30.
- [14] 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): 73-77.
- [15] 余波, 谭诗文, 冉懋韬, 等. 检测 PRV 野毒株、PCV-2 及 PPV 多重 PCR 方法的建立及初步应用[J]. 畜牧与兽医, 2010, 42(5): 15-18.
- [16] 娄高明. 检测伪狂犬病 PCR 方法的建立及其在临床诊断中的应用[J]. 病毒学报, 2002, 18(2): 171-176.
- [17] 张雪寒, 何孔旺, 缪文凯, 等. Taqman 探针实时定量 PCR 检测猪伪狂犬病毒[J]. 江苏农业学报, 2008, 24(4): 440-443.