DOI:10.15933/j.cnki.1004-3268.2009.09.049

PRRSV 变异株与普通株二重 RT-PCR 鉴别方法的建立与应用

徐引弟，王治方，朱文豪，张青娴，焦海燕，郭成留
（河南省农业科学院 畜牧兽医研究所，河南 郑州 450002）

摘要：参考 GenBank 发表的猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）的 *nsp2* 基因序列，在 *nsp2* 大缺失区下游的保守区设计了 1 条下游引物，在小缺失区设计 1 条上游引物，用于变异株的扩增。在大缺失区内部设计 1 条上游引物，与变异株共用下游引物，用于普通株的扩增，建立了 PRRSV 变异株与普通株二重 RT—PCR 鉴别方法。建立的 RT-PCR 方法用于临床病料的检测，部分阳性结果测序，变异株序列与报道的序列同源性在 97%以上。结果表明，该方法特异、快速、简便，可以用于 PRRSV 变异株和普通株的鉴别。

关键词：猪繁殖与呼吸综合征病毒；二重 RT-PCR；鉴别方法
中图分类号：S852.65　　文献标识码：A　　文章编号：1004-3268(2009)09-0184-03

Development and Application of A Duplex RT-PCR Method to Differentiate the PRRSV Variant and Common Strains

XU Yin-di, WANG Zhi-fang, ZHU Wen-hao, ZHANG Qing-xian, JIAO Hai-yan, GUO Cheng-liu
(Institute of Animal Husbandry and Veterinary Research, Henan Acadmy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: According to the *nsp2* gene sequence of PRRSVs in GenBank, a downstream primer was designed in the conserved region of the downstream of large deletion of *nsp2* and a upstream primer in the short deletion to amplify the variant strain. Common strain was amplified using a upstream primer within the large deletion and the same downstream primer to variant strain. A duplex RT-PCR distinguish method to differentiate the PRRSV variant and common strains was development. This method was applied to test clinic samples. Part positive results were sequenced and showed more than 97% homologous with the reported sequences. These results showed that this method was specific, rapid and simple. This method could be applied to differentiate the PRRSV variant and common strains.

Key words: PRRSV; Duplex RT-PCR; Differential method

2006 年 5 月以来，我国南方地区部分猪场暴发一种以高热、呼吸困难、高发病率和高死亡率为主要特征的猪病，被称为高热综合征，随后逐渐扩散和蔓延到北方各省，给我国养猪业造成了巨大经济损失[1,2]。经病原分离及分子流行病学分析，高热综合征主要是由一种带有 *nsp2* 基因部分缺失的、对猪呈高致病性的猪繁殖与呼吸综合征病毒 PRRSV）引起的，同时有圆环病毒 2 型、猪瘟病毒、猪流感病毒、伪狂犬病毒等混合感染，并继发猪链球菌、大肠杆菌、副猪嗜血杆菌、沙门氏菌、巴氏杆菌、胸膜肺炎放线杆菌、附红细胞体、弓形体等多病原混合感染和继发感染而引起的一种急性热性传染性疾病[3~6]。本试验建立了一种快速、特异、简便的检测 PRRSV 变异株与普通株的二重 RT-PCR 方法，并应用于河南和

收稿日期：2009-06-09
基金项目：河南省科技攻关计划项目（072102140004）；河南省农科院高技术产品孵化项目（200712）
作者简介：徐引弟（1974-），女，湖北浠水人，副研究员，博士，主要从事动物病原微生物研究。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

山西疑似高热综合征猪场的检测，旨在为高热综合征的研究和防治提供依据。

1 材料和方法

1.1 试验毒株

PRRSV 活疫苗（CH-1R 株）购自哈尔滨维科生物技术公司。

1.2 病料

主要为采自河南和山西发病猪场患猪的新鲜肺、脾、腹股沟淋巴结、脑及血清。

1.3 工具酶及试剂

Total RNA 提取试剂盒 RNAiso Reagent、反转录酶 M-MLV、RNA 酶抑制剂、r*Taq* DNA 酶、dNTPs、DL2000 DNA Marker、DEPC 等均购自宝生物工程（大连）有限公司。

1.4 病料的处理

所有接触 RNA 的耗材，如剪刀、镊子、注射器、EP 管、吸头、匀浆器等均经 0.1%DEPC 水处理后灭菌烘干。取病猪的肺、脾和淋巴结等组织约0.5g，剪碎，加 1mL 无菌 PBS 匀浆，倒入 1.5mL EP 管，-70 ℃反复冻融 3 次，8 000r/min 离心 5min，取上清液。

1.5 病料组织总 RNA 的提取

取上述上清液（或血清）100μL，按照 RNA 提取试剂盒操作说明提取总 RNA，最后病料 RNA 融于 30μL DEPC 灭菌水，血清 RNA 融于 10μL DEPC 灭菌水。]]

1.6 引物设计

参考 GenBank 公布的变异株及普通株的 *nsp2* 基因序列以及文献[7～11]的报道，变异株上游引物 P_1 位于第 1 个 3 个核苷酸的小的缺失突变区（2780～2782bp），下游引物 P_3 位于整个缺失区下游，普通株上游引物 P_2 位于第 2 个 87 个核苷酸的大的缺失区（2933～3019bp）内部，与变异株共用下游引物。变异株和普通株预期扩增产物长度分别为 400bp 和 283bp。引物序列 P_1：5′-GGTTCG-GAAGAAACTGTCGGTGGT-3′；P_2：5′-GCAC-CGCGGCGTAAGTTTCAGCAGGTG-3′；P_3：5′-GAGCTGAGTATTTTGGGCGTGT-3′，引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.7 反转录（RT）反应

10μL 反转录体系：5× M-MLV Buffer 2μL、dNTP（10mmol/L）0.5μL、P_3（10μmol/L）1μL、RNase 抑制剂（40U/μL）0.25μL、M-MLV 反转录酶（5U/μL）0.25μL、总 RNA5μL，加 DEPC 灭菌水至 10μL，37 ℃水浴 1h，即用或-70 ℃备用。

1.8 *nsp2* 基因的 PCR 扩增

25μL PCR 反应体系：10× PCR Buffer2.5μL、dNTP（10mmol/L）0.5μL、P_1、P_2、P_3（10μmol/L）各 0.5μL、r*Taq* 酶 0.5μL、cDNA 2μL，加灭菌水至 25μL。PCR 循环体系：95 ℃预变性 5min；94 ℃ 30s，55 ℃ 30s，72 ℃ 30s，35 个循环；72 ℃延伸 5min。同时以猪瘟疫苗株和伪狂犬疫苗株为对照，取 10μL 进行 1.0%琼脂糖凝胶电泳。

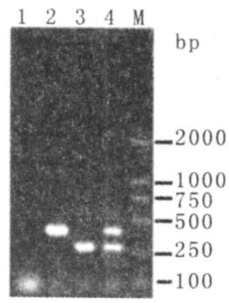
1.9 二重 RT-PCR 的应用

将所建立的二重 RT-PCR 用于临床发病猪病料及血清，部分阳性结果回收测序，并同 GenBank 公布序列比对。

2 结果与分析

2.1 二重 RT-PCR 方法的建立

以 P_3 进行反转录，以 P_1、P_2、P_3 进行二重 PCR，结果从疑似病料中同时扩增出约 400bp 和 2832bp 片段，PRRSV 活疫苗株扩出 283bp 片段，疑似病料扩出 400 bp 片段（图 1）。



M：DL2000 DNA 分子量标准；1：H_2O；
2：变异株；3：普通株；4：变异株＋普通株

图 1 PRRSV 变异株、普通株的二重 RT-PCR

2.2 二重 RT-PCR 的应用

共采集来自 13 个猪场的 79 头猪的样品，共采集样品 110 份，其中血样 78 份，病料 32 份，包括肺 9 份，脾 14 份，淋巴结 8 份，脑 1 份。结果 110 份样品中单一 PRRSV 变异株阳性有 36 份，PRRSV 变异株、普通株双阳性 2 份，单一 PRRSV 普通株阳性有 3 份（表 1）。将其中 5 株变异株，1 株普通株 PCR 阳性测序，结果表明，变异株序列与 GenBank 公布的变异株序列同源性均在 97%以上。普通株序列与 GenBank 公布的普通株序列同源性均在 91%以上（序列略）。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　样品来源及 RT-PCR 扩增结果

序号	来源	样品	结果	
			变异株	普通株
1	山西长治	5 份血样(母猪)	全部-	全部-
2	河南南阳	3 份血样(仔猪)	全部+	全部-
3	河南南阳	3 份血样(仔猪)	全部-	全部+
4	山西长治	13 份血样(1-8 仔猪+9-13 母猪)	全部-	全部-
5	河南淇县	12 份血样(1-10 母猪, 11, 12 剖检仔猪)	7, 9, 10+	全部-
		6 份病料(11, 12 号肺脾淋巴结)	全部-	全部-
6	河南方城	10 份血样(1-2, 10 仔猪, 3-9 母猪)	1, 5+	全部-
		3 份病料(10 号肺脾淋巴结)	全部-	全部-
7	河南长垣	3 份血样(公猪)	2+	2+
8	河南新乡	10 份血样(1-7 仔猪, 8-10 剖检仔猪)	1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10+	全部-
		9 份病料(8, 9, 10 号肺脾淋巴结)	全部+	全部-
9	河南林州	1 份血样(剖检活肥猪)	-	-
		3 份病料(剖检死肥猪肺脾, 活猪脑)	全部+	全部-
10	山西长治	1 份血样(剖检活保育公猪)	-	-
		3 份病料(剖检活保育公猪肺脾淋巴结)	全部-	全部-
11	河南上蔡	2 份血样(剖检肥猪)	全部-	全部-
		3 份病料(剖检 1 号活肥猪肺脾淋巴结)	全部-	全部-
12	河南孟州	5 份血样(1-5 号剖检肥猪)	全部-	全部-
		5 份病料(1-5 号剖检肥猪脾)	2, 3, 4, 5+	全部-
13	山西沁水	10 份血样(1-2 仔猪, 3-10 母猪)	1, 4, 5, 6+	全部-

注:“+”为阳性,“-”为阴性

3　讨论

由于高致病性 PRRSV 的变异较大,引物设计十分困难,大多在 *nsp2* 缺失区的两端设计引物,由电泳图或测序结果来判断是否是普通株或变异株。但由于缺失片段较小,共 90bp,因此仅从电泳图上较难区分,必须通过测序来确定,这对于临床大量检测样品及对结果快速的需要难以满足[9~11]。本试验在分析大量的序列后,变异株上游引物选择第 1 个缺失突变区,下游引物选择第 2 个缺失区下游保守的区域,普通株上游引物选择在第 2 个缺失区内保守的区域,与变异株共用下游引物。这样反转录时只需用一条下游引物,而在 PCR 扩增时,由于变异株上游引物的特异性,只能扩增出变异株,不能扩增出普通株,而普通株的上游引物在大缺失区的内部,因此只能扩增出普通株而不能扩增出变异株。3 条引物同时区分 2 种毒株,可简化 RT-PCR 操作条件,减少干扰,而且变异株为 400bp,普通株为 283bp,从电泳图上容易区分。因此本试验设计的引物是合理的,建立的二重 RT-PCR 鉴别方法能满足临床快速、特异、简便的要求。

从样品检测的结果看,变异株阳性比例远远高于普通株,表明在高热综合征中,PRRSV 变异株占主导作用。血清样品阳性率低于病料阳性率,在感染后几天内,病毒血症仅维持几天,而组织中特别是肺、脾、淋巴结中病毒含量高且维持时间长,因此组织检测比血清检测病毒更为准确、可靠。

参考文献:

[1] 杨汉春. 猪高热综合征的发生与流行概况[J]. 猪业科学, 2007(1): 78－80.

[2] 郑杰, 宁宜宝, 赵启祖, 等. 高致病性变异株引起的猪繁殖与呼吸综合征在我国的发生与流行[J]. 中国兽医杂志, 2007, 43(6): 48－50.

[3] 万遂如. 猪高热病的流行特点、发病原因及防控对策[J]. 畜牧市场, 2007(4): 63－66.

[4] 宁宜宝, 郑杰, 张纯萍, 等. 我国南方猪高热病的研究(II)——猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒的分离、鉴定和致病性测定[J]. 中国兽药杂志, 2007, 41(1): 14－18.

[5] 刘智明, 陈建军, 柴少征, 等. 猪“无名高热病”的原因分析及防控措施[J]. 河南畜牧兽医, 2007, 28(1): 24－25.

[6] 徐辉, 李晓成, 陈伟杰, 等. “猪高热病”的流行病学调查与主要病因分析[J]. 中国动物检疫, 2007, 24(6): 19－21.

[7] Tian K, Yu X, Zhao T, *et al*. Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of a typical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark[J]. PLoS ONE, 2007, 13(6): e526.

[8] Tong G Z, Zhou Y J, Hao X F, *et al*. Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome, China[J]. Emerg Infect Dis, 2007, 13(9): 1434－1436.

[9] 郝晓芳, 周艳君, 田志军, 等. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒 RT-PCR 鉴别诊断方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(9): 704－709.

[10] 童光志, 周艳君, 都晓芳, 等. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒的分离鉴定及其分子流行病学分析[J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(5): 323－327.

[11] 刘业兵, 郑杰, 宁宜宝. 高致病性 PRRSV(HuN 株) *NSP2* 基因的扩增与分析[J]. 中国兽药杂志, 2007, 41(10): 10－12.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net