

猪流行性腹泻病毒 RT-PCR 检测方法的建立与应用

徐引弟,鲁智远,王治方,李海利,张青娴,朱文豪,焦文强,郎利敏,王克领
(河南省农业科学院 畜牧兽医研究所,河南 郑州 450002)

摘要:为了建立猪流行性腹泻病毒(PEDV)快速、特异的检测方法,减少猪流行性腹泻(PED)给养猪业带来的损失,根据 PEDV 的 S 基因序列设计 1 对引物,优化扩增条件,建立了针对 PEDV 的 RT-PCR 检测方法。结果显示,建立的检测方法可特异地检测出 PEDV。应用建立的检测方法对 2016 年河南地区 38 家发生腹泻的猪场的 256 份病料进行检测,结果表明,阳性猪场为 30 家,阳性样本为 157 份,检出率高于试纸条检测方法。可见,建立的检测方法特异性强,可用于 PEDV 感染疑似病例的诊断及流行病学调查。

关键词:猪流行性腹泻; RT-PCR; 检测

中图分类号: S855.3 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2017)09-0149-03

Development of RT-PCR to Detect Porcine Epidemic Diarrhea

XU Yindi, LU Zhiyuan, WANG Zhifang, LI Haili, ZHANG Qingxian, ZHU Wenhao,
JIAO Wenqiang, LANG Limin, WANG Keling

(Institute of Animal Husbandry and Veterinary Research, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In order to develop a rapid and specific test method for porcine epidemic diarrhea, reducing the losses to the pig industry caused by PEDV, a pair of primers were designed according to PEDV S gene sequence. Amplification conditions were optimized, RT-PCR method to detect PEDV was established. The method could specifically detect the RNA of PEDV. The method was used to test 256 samples of 38 Henan farms in 2016. The results showed that 157 samples were positive, 30 farms were positive, and the detection rate was higher than that of strip method. It indicated that the specificity of RT-PCR method to detect PEDV was good and could be used to diagnosis of suspected cases of infection and epidemiological investigation of PEDV.

Key words: PED; RT-PCR; detection

猪流行性腹泻 (porcine epidemic diarrhea, PED) 是由猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 引起的以腹泻、呕吐、脱水为主要特征的一种高度接触性肠道传染病,各年龄段的猪均可发生,哺乳仔猪发病率可达 100%,1 周以内出生仔猪死亡率高达 80%~100%。1971 年首次在英国发现 PED,2010 年韩国首次报道 PEDV 的 S 基因发生变异。我国自 2010 年 10 月流行并暴发 PED,给中国东南省份的养猪场带来了毁灭性的经济损失。从 2010 年 10 月开始,由变异 PEDV 引起的 PED 给世界养猪业

造成了巨大的经济损失。在一些接种过经典弱毒株 CV777 疫苗的猪场也报道发生 PED^[1-3]。我国 2010 年 10 月暴发 PED,2011—2013 年疫情从蔓延到有所缓和,2015—2016 年疫情有所反弹,并且预计未来 PED 会继续流行,呈常态化,PEDV 将继续变异和演化,不可避免会出现新毒株^[4-5]。快速诊断 PEDV 引起的腹泻,对减少 PEDV 造成的损失意义重大。鉴于此,建立 PEDV 的快速、特异、敏感的 RT-PCR 检测方法,旨在为 PED 的防制提供保障。

收稿日期:2017-03-22

基金项目:河南省科技攻关计划项目(162102110042);河南省农业科学院自主创新基金项目(2016ZC51)

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。E-mail:445177674@qq.com

1 材料和方法

1.1 病料

临床病料为 2016 年河南地区发生腹泻的 38 家猪场的猪肠道内容物、粪便。猪圆环病毒 (PCV)、猪瘟病毒 (CSFV)、繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV)、猪伪狂犬病毒 (PRV) 阳性病料均由河南省农业科学院畜牧兽医研究所兽医研究室鉴定并保存。

1.2 主要试剂

M - MLV 反转录酶、dNTPs、DL2000 DNA Marker、 $2 \times Taq$ Mix Master、TaKaRa MiniBEST 病毒 RNA/DNA 提取试剂盒等均购自宝生物 (大连) 有限公司。PEDV 快速检测试剂条购自韩国安捷公司。

1.3 引物设计

参照 GenBank 中 PEDV 的 S 基因设计引物, 上游引物 PED1: 5' - TTCTGAGTCACGAACAGCCA - 3', 下游引物 PED2: 5' - CATATGCAGCCCTGCTCT-GAA - 3', 预期扩增目的片段 651 bp。

1.4 病毒基因组 RNA 的提取与 cDNA 的合成

按照试剂盒说明书进行操作, 提取的 RNA 立即使用或保存在 -80 °C。离心管中加入上述提取的 RNA 5 μL、5 × M - MLV Buffer 2 μL、dNTP Mixture 0.5 μL、RNase Inhibitor (40 U/μL) 0.25 μL、M - MLV 反转录酶 0.25 μL、RNase free ddH₂O 2 μL, 混匀后 37 °C 水浴 1 h, 用于 PCR 扩增。

1.5 RT - PCR 扩增条件优化

1.5.1 RT - PCR 反应条件的优化

1.5.1.1 最适模板用量 分别取 1、2、3、4、5、6 μL cDNA 进行 PCR 反应, 以确定最适的模板用量。

1.5.1.2 最适引物用量 在 25 μL 的反应体系中, 分别加入 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 μL 上下游引物进行 PCR 扩增反应。

1.5.1.3 最适退火温度 分别采用 53、54、55、56、57、58 °C 作为退火温度进行 PCR 扩增反应。

1.5.1.4 RT - PCR 扩增反应 PCR 反应在 25 μL 反应体系中进行, $2 \times Taq$ Mix Master 12.5 μL, 上下游引物各 1 μL, cDNA 模板 1 μL, 加 ddH₂O 至 25 μL。反应条件为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。取 5 μL PCR 扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳中进行电泳, 观察结果。

1.5.2 RT - PCR 特异性与敏感性试验 从阳性病料 PCV2、PRRSV、CSFV 和 PRV 中提取 DNA 或 RNA, 用实验室已经建立的方法分别进行扩增。将

提取的 PEDV cDNA 经紫外分光光度计测定质量浓度, 用无菌去离子水按 10 倍梯度分别稀释调整至 100 ~ 0.001 μg/μL, 分别进行扩增。

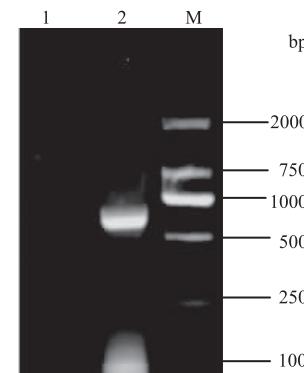
1.6 河南省 2016 年猪流行性腹泻疑似病料检测

用建立的 RT - PCR 检测方法对河南省 2016 年发生腹泻的 38 家猪场共 256 份病料进行检测, 同时用韩国安捷公司生产的 PEDV 快速检测试纸条进行检测。

2 结果与分析

2.1 RT - PCR 反应条件的优化结果

通过 PCR 反应条件的优化, 确定最适模板量为 5 μL、最适引物用量为 1.0 μL、最适退火温度为 57 °C。PCR 扩增结果显示, 可以扩增出 1 条约为 651 bp 的 PEDV 的基因片段 (图 1), 与预期大小相符合。将扩增产物进行测序分析, 结果显示, 与 2014 年河南分离株 CH/HNYF/14 株 (GenBank 登录号 KP890336) S 基因同源性为 99.2%。

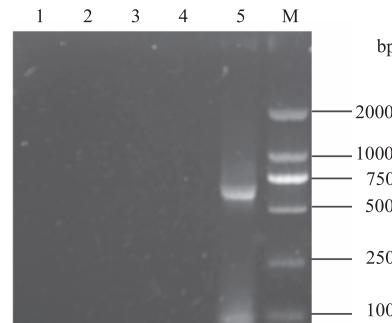


M. DL2000 DNA Marker; 1. 空白对照; 2. PEDV

图 1 RT - PCR 扩增结果

2.2 RT - PCR 特异性试验结果

建立的 PCR 方法对 PEDV 可扩增出 651 bp 的目的基因片段, 而对 PCV2、PRRSV、CSFV 和 PRV 均未扩增出目的片段 (图 2)。

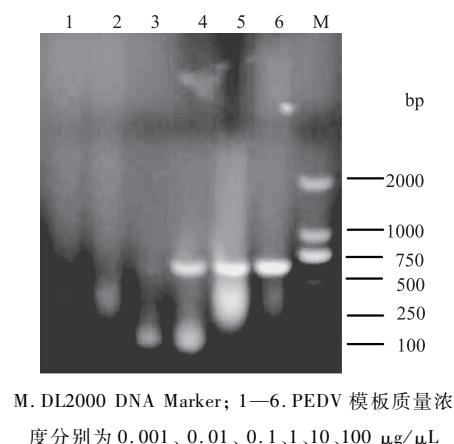


M. DL2000 DNA Marker; 1. PRV; 2. PCV2; 3. PRRSV; 4. CSFV; 5. PEDV

图 2 RT - PCR 特异性试验结果

2.3 RT-PCR 敏感性试验结果

从图 3 可以看出, PCR 检测的灵敏度可达 $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ cDNA。优化的反应体系在 PEDV 模板质量浓度为 $0.1 \sim 100 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时能扩增出特异性条带, 在模板质量浓度为 $0.01 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 和 $0.001 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时均无扩增, 说明优化的反应体系对 PEDV 模板的扩增下限质量浓度为 $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。



M. DL2000 DNA Marker; 1—6. PEDV 模板质量浓

度分别为 0.001 、 0.01 、 0.1 、 1 、 10 、 $100 \mu\text{g}/\mu\text{L}$

图 3 RT-PCR 敏感性试验结果

2.4 建立检测方法的应用

应用建立的 RT-PCR 方法检测河南省 2016 年发生腹泻的 38 家猪场的 256 份病料。结果显示, 阳性猪场 30 家, 阳性样品 157 份, 表明河南省 2016 年猪场发生腹泻的 PEDV 阳性率较高。

同时用韩国的 PEDV 快速检测试纸条检测出阳性样品 132 份, 阳性率为 51.56%。

3 结论与讨论

PEDV 是引起新生仔猪腹泻的主要病原, 是制约养猪业发展的瓶颈。PEDV 的病原检测方法有病毒的分离鉴定、抗原捕获 ELISA、PCR、荧光定量 PCR、免疫层析试纸条检测方法等, PEDV 很难通过细胞培养来鉴定, 而 PCR 检测方法比抗原捕获 ELISA 检测方法更敏感, 荧光定量 PCR 检测方法由于设备要求和费用昂贵, 应用具有一定的局限性。因此, PCR 检测方法是应用最为广泛且较简便的检测方法^[6]。血清学方法是另外一种有效检测猪群中 PEDV 抗体的手段, 包括间接 ELISA、间接免疫荧光试验(IFA)和中和试验(SN)等, 是常用的血清学方法^[7]。

本试验建立的 RT-PCR 检测方法相对于试纸条检测方法更加特异敏感, 由于试纸条检测方法应用的是免疫层析的原理, 对病料中抗原的量有一定的要求, 抗原含量不足时, 常出现假阴性; 当病料过多, 会出现假阳性和跑带缓慢, 而 PCR 方法能检测

出病料中非常微量的病毒核酸, 因此, RT-PCR 方法敏感性高于试纸条方法。但由于 RT-PCR 方法需要 RNA 提取、反转录、PCR 扩增、电泳等步骤, 较试纸条检测费时, 而试纸条检测只需几分钟。因此, 在临床应用时, 需要结合 2 种方法才能又快又准确地做出诊断^[8-14]。

参考文献:

- [1] 张艳,周庆民,冯万宇,等.当前猪病流行现状及趋势展望[J].畜牧兽医科技信息,2016(7):97.
- [2] Wang D,Fang L,Xiao S.Porcine epidemic diarrhea in China[J].Virus Research,2016,226:7-13.
- [3] 张曼丽,徐博文,舒蕾,等.四川某规模化猪场仔猪腹泻病的诊疗体会[J].河南农业科学,2012,41(6):155-157.
- [4] 杨汉春.主要猪病流行态势与防控对策[J].兽医导刊,2016(15):10-12.
- [5] 杨汉春,周磊.2016 年猪病流行情况与 2017 年流行趋势及防控对策[J].猪业科学,2017(2):36-37.
- [6] 李子祥,邵春艳,徐琦,等.猪传染性胃肠炎病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J].河南农业科学,2017,46(3):129-133.
- [7] 邓祖丽颖.基于 S 蛋白检测猪流行性腹泻抗体间接 ELISA 方法的建立[J].河南农业科学,2013,42(8):119-123.
- [8] Lee C.Porcine epidemic diarrhea virus:An emerging and re-emerging epizootic swine virus[J].Virol J,2015,13:19-20.
- [9] 王飞,陈小芬,苏丹萍,等.2014—2015 年我国部分省份猪流行性腹泻病毒 S 基因的遗传变异分析[J].中国兽医学报,2016,36(9):1484-1488.
- [10] 吴美洲,陈芳洲,周春陵,等.新型猪流行性腹泻的诊断控制及其病原分子特征[J].中国兽医科学,2016,46(2):149-156.
- [11] Li R,Qiao S,Yang Y,*et al*.Genome sequencing and analysis of a novel recombinant porcine epidemic diarrhea virus strain from Henan[J].China Virus Genes,2016,52(1):91-98.
- [12] Chen F,Ku X,Li Z,*et al*.Genetic characteristics of porcine epidemic diarrhea virus in Chinese mainland,revealing genetic markers of classical and variant virulent parental/attenuated strains[J].Gene,2016,588(1):95-102.
- [13] Hao J,Xue C,He L,*et al*.Bioinformatics insight into the spike glycoprotein gene of field porcine epidemic diarrhea strains during 2011—2013 in Guangdong, China [J].Virus Genes,2014,49(1):58-67.
- [14] Yang X,Huo J,Chen L,*et al*.Genetic variation analysis of reemerging porcine epidemic diarrhea virus prevailing in central China from 2010 to 2011 [J].Virus Genes,2013,46(2):337-344.