

多重实时定量 PCR 快速检测 PRRSV、CSFV 和 PCV2 混合感染方法的建立

赵绪永, 宁豫昌, 赵 丽, 马 辉
(郑州牧业工程高等专科学校, 河南 郑州 450011)

摘要: 根据 TaqMan 复合荧光探针设计原则, 应用 Primer 5.0 和 Oligo 6.0 软件设计检测猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV)、猪瘟病毒 (CSFV) 和猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 的特异性引物和探针, 优化反应条件, 建立了检测 PRRSV、CSFV 和 PCV2 的单项和多重 Real-time PCR 方法。结果表明, 建立的方法具有高度特异性, 与其他病原检测无明显交叉反应; 对阳性质粒和病毒的最低检测量分别为 $<10^1$ 个拷贝和 <1 TCID₅₀/反应, 检测灵敏度比常规 PCR 检测高 100 倍。通过对 20 份临床样本进行检测, 多重 Real-time PCR 检测结果和单项 Real-time PCR 检测结果一致。建立的多重 Real-time PCR 方法可用于同时快速检测 PRRSV、CSFV 和 PCV2 的混合感染, 具有灵敏、特异、重复性好并能对样品进行定量检测等优点。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征病毒; 猪瘟病毒; 猪圆环病毒 2 型; 多重实时定量 PCR

中图分类号: S828 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2013)02-0123-05

Detection of Mixed Infection of PRRSV, CSFV and PCV2 in Swine by Multiplex Real-time PCR Assay

ZHAO Xu-yong, NING Yu-chang, ZHAO Li, MA Hui
(Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering, Zhengzhou 450011, China)

Abstract: According to the reported nucleotide sequences of PRRSV, CSFV and PCV2, three pairs of specific probes were designed. By optimizing the primers and probes' concentration, a multiplex real-time quantitative PCR assay for detection of these viruses was established. The specificity and sensitivity of the multiplex real-time quantitative PCR assay were analyzed for multiple viruses. The results showed that the specificity was high and no non-specific amplification was achieved from other pathogens. Both multiplex and singleplex assays were consistently able to detect $<10^1$ copies of plasmid templates or <1 TCID₅₀ virus/reaction. A total of 20 clinical samples were comparatively detected using the multiplex and singleplex assays. The data showed that the results of multiplex assay were in accordance with that of singleplex assay. Conclusively, a multiplex real-time PCR assay was developed, which is rapid, sensitive, specific and accurate to discriminate the PRRSV, CSFV and PCV2 infection in a single test tube.

Key words: PRRSV; CSFV; PCV2; multiplex real-time PCR

近年来, 猪繁殖障碍性疾病和猪高热病疫情给我
国养猪业造成了巨大的经济损失, 严重影响我国养猪
业的发展。猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine repro-
ductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)、猪瘟

病毒 (classical swine fever virus, CSFV)、猪圆环病毒
2 型 (porcine circovirus type 2, PCV2) 是造成猪繁
殖障碍病的主要病原, 这几种病原又常常发生混合
感染^[1-3]。PRRSV、PCV2 都会引起猪的免疫抑制,

收稿日期: 2012-09-19

基金项目: 河南省教育厅自然科学研究计划项目 (2011A230016)

作者简介: 赵绪永 (1973-), 男, 河南新野人, 讲师, 博士, 主要从事动物疫病分子病原学研究。E-mail: Zhaoxy6868@163.com

不同程度地损伤机体的免疫功能,降低机体抵抗能力,为继发或并发其他病原微生物创造了条件,这可能也是混合感染多发的原因^[4]。PRRSV 和 CSFV 均能引起猪繁殖障碍和高热,而且临床症状和解剖症状极为相似。常规的检测方法如病毒分离、血清学检测等^[5-9],很难区别这几种病毒,且程序繁琐,成本高,具有易污染和假阳性等缺点。国内学者也建立了 PRRSV、CSFV 和 PCV2 的 Real-time PCR 检测方法^[10-13],可以相对定量判定初始模板量,而且具有敏感度高、特异性强、重复性好、用时短和可自动定量分析的优点。目前尚未见利用多重 Real-time PCR 技术同时检测 PRRSV、CSFV 和 PCV2 的报道。为了更快捷地对这 3 种病毒进行检测,本研究拟在单项实时荧光定量 PCR 的基础上,建立一种可快速、准确实时检测 PRRSV、CSFV 和 PCV2 混合感染的多重 Real-time PCR 方法,为了解掌握这 3 种病毒实际感染情况及为猪病的预防和控制提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 毒株与菌种

CSFV、猪流感病毒(SIV)、伪狂犬病毒(PRV)、猪细小病毒(PPV)、猪乙型脑炎病毒(JEV)等病毒标准毒株和产肠毒素大肠杆菌(ETEC)、副猪嗜血

杆菌(HPS)购自中国兽药监察所;PRRSV 和 PCV2 均为郑州牧业工程高等专科学校生物技术实验室分离鉴定并保存;20 份病料收集自周边猪场。PRRSV 阳性参考为郑州牧业工程高等专科学校生物技术实验室已鉴定的毒株,CSFV 阳性参考为市售猪瘟兔化弱毒疫苗。

1.2 主要试剂和仪器

Taq DNA 聚合酶、质粒 DNA 小量快速制备试剂盒、DL2000 Marker、TRIzol 试剂盒、反转录试剂盒等购自大连宝生物有限公司;2×TaqMan Universal Master Mix 购自美国 ABI 公司;大肠杆菌(*E. coli*)JM109、DH5α 均由郑州牧业工程高等专科学校生物技术实验室保存;PRRSV、CSFV 和 PCV2 等 3 种病毒的 PCR 检测试剂盒购自北京世纪元亨动物防疫技术有限公司。荧光定量 PCR 仪为 Rotor Gene 公司产品,型号为 RG-3000;紫外分光光度计 ND-1000 型为 Nanodrop 公司产品。

1.3 引物的设计与合成

根据 GenBank 已发表的 PRRSV、CSFV 和 PCV2 基因序列,应用 DNASTar 软件对序列进行同源性分析,选择其保守区。根据 TaqMan 复合荧光探针设计原则,应用 Primer 5.0 和 Oligo 6.0 软件设计 3 组探针和引物,并通过 BLAST 对其特异性进行鉴定。引物和探针由大连宝生物公司合成,详见表 1。

表 1 引物和荧光探针核酸序列

引物或探针	序列(5'→3')	产物长度/bp	基因序列号
PRRSV-F	TCAGCTGTGCCAGATGCTGG	77	AB546125
PRRSV-R	AAATGGGGCTTCTCCGGGTTTT		
PRRSV-Probe	FAM-TCCCGGTCCCTTGCCCTCTGGA-ECLIPSE	93	AH012834
CSFV-F	AGCTCCCTGGGTGGTCTAAGT		
CSFV-R	CCCTCGTCCACATAGCATCT		
CSFV-Probe	ROX-AGTTCGACGTGAGCAGAAGCCCACC-ECLIPSE	131	AB246193
PCV2-F	GGATATTGTAGTTCTGGTTCG		
PCV2-R	CCACTATTGATTACTTCCAACC		
PCV2-Probe	HEX-TCGAACGCAGTGCCGAGGCC-ECLIPSE		

1.4 标准阳性模板的制备

采用异硫氰酸胍一步裂解法提取 PCV2 的 DNA。参照 TRIzol 试剂盒操作说明书分别提取 PRRSV 和 CSFV 总 RNA,以 Oligo dT Primer 为引物,参照 PrimeScript RTase 说明书的操作步骤进行逆转录合成病毒 cDNA。再分别以 PCV2 的 DNA 以及 CSFV、PRRSV 的 cDNA 为模板,按常规 PCR 反应进行扩增。将回收纯化的 PCR 产物分别与 pGEM-T Easy 载体连接,转化 *E. coli* JM109,用试剂盒提取重组质粒,并进行测序鉴定。用紫外

分光光度计分别测定各重组质粒的紫外吸光值,并计算出重组质粒 DNA 的量。将其进行 $0.5 \times 10^7 \sim 0.5 \times 10^1$ 拷贝/ μL 的梯度稀释,分装并保存于 -20°C 冰箱中备用。

1.5 多重实时荧光定量 PCR 反应条件及参数设定

分别以每种病毒的重组质粒为阳性模板做单项 Real-time PCR 反应,然后逐渐增加反应重数,并用矩阵法优化引物和探针浓度,建立 Real-time PCR 最佳反应体系。PCR 扩增反应体系均为 $25 \mu\text{L}$,单项 Real-time PCR 反应体系包含 $12.5 \mu\text{L}$ 2×TaqMan Uni-

versal Master Mix、0.1~0.5 $\mu\text{mol/L}$ 探针、上下游引物各 0.2~0.6 $\mu\text{mol/L}$, 2 μL 模板, 加纯水至 25 μL 。多重 Real-time PCR 反应体系, 即加入 3 组引物和探针, 其余条件与单项法相同。反应条件为: 50 $^{\circ}\text{C}$ 作用 2 min(激活 UNG 酶, 消除 PCR 产物的残留污染), 95 $^{\circ}\text{C}$ 作用 10 min(灭活 UNG 酶, 激活 Ampli Taq Gold polymerase); 循环扩增条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 55~60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 40 个循环, 并进行退火温度的优化, 建立多重 Real-time PCR 的最佳方法。

1.6 灵敏度和重复性试验

以梯度稀释的重组质粒作为标准品模板, 利用优化的荧光定量 PCR 反应条件进行检测, 绘制标准曲线并确定最小检测量。将 3 种纯化的病毒细胞毒定量(计算其 TCID_{50})后, 用不含待测病毒的阴性猪的基因组 DNA 提取液进行稀释, 然后进行 Real-time PCR 和常规 RT-PCR 或 PCR 分析测定, 每个样品重复 3 次, 以验证灵敏性和可靠性。

1.7 特异性试验

分别对 JEV、SIV、PRRSV、CSFV 的 cDNA 和 ETEC、HPS、PPV、PRV、PCV2 的 DNA 溶液进行单项和多重 Real-time PCR 检测, 以判定检测方法的特异性。

1.8 临床样本的检测

用试剂盒分别提取了 20 份临床疑似病料样品的 DNA 和 RNA, 并将 RNA 逆转录生成 cDNA。用上述建立的单项和多重 Real-time PCR 方法进行检测, 比较检测结果的符合率。

2 结果与分析

2.1 多重 Real-time PCR 反应条件的优化

经矩阵法对 Real-time PCR 的引物和探针浓度及反应条件进行优化, 引物和探针的最佳浓度为: 上下游引物浓度各为 0.4 $\mu\text{mol/L}$, 探针浓度各为 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 。最佳扩增条件确定为 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 40 个循环。

2.2 多重 Real-time PCR 标准曲线的建立

以梯度稀释的重组质粒为阳性标准模板, 利用优化的反应条件进行单项和多重 Real-time PCR 检测, 得到各病毒的扩增动力学曲线, 并生成了这 3 种病毒的单项(实线表示)和多重 Real-time PCR 扩增标准曲线(虚线表示), 如图 1 所示。每种病毒的单项和多重分析 2 条标准曲线的斜率均接近 -3.32, 相关系数(R^2)均大于 0.99, 表明标准曲线的线性度较好, PCR 的扩增效率高, 2 种方法扩增效率基本一致, 可信度好。

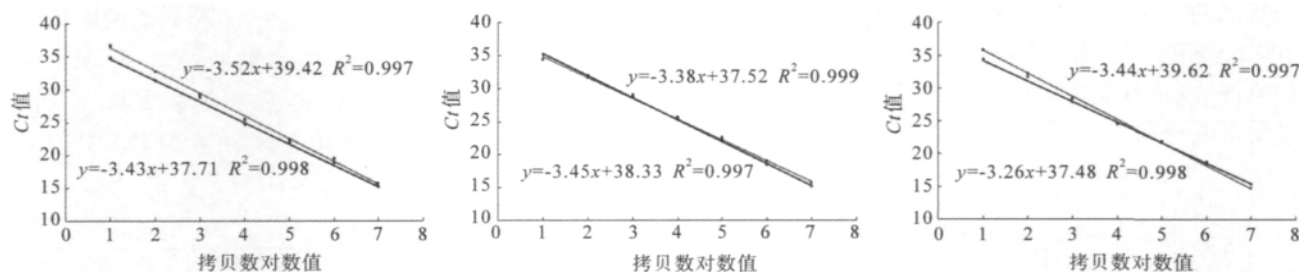


图1 PRRSV、CSFV 和 PCV2 的 Real-time PCR 标准曲线

2.3 敏感性试验结果

通过对系列稀释的标准质粒进行检验, 单重或多重 Real-time PCR 的最低检测量为 10^1 个拷贝/反应, 结果见表 2。将纯化的 3 种病毒 PRRSV ($10^{-4.45}$ $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$)、CSFV ($10^{-3.78}$ $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$)

和 PCV2 ($10^{-4.83}$ $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$) 用猪的基因组 DNA 稀释进行分析, 荧光定量 PCR 检测方法检测极限可分别达到 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-5} , 而普通常规 PCR 检测方法仅可达到 10^{-3} , 即荧光 PCR 检测下限小于 1 个 TCID_{50} , 比常规 PCR 的灵敏度高 100 倍。

表2 不同病毒与猪基因组 DNA 混合后通过多重 Real-time PCR 测定结果

序号	不同病毒混合时的拷贝数/个			通过多重 Real-time PCR 测定的拷贝数(变异系数/%)		
	PRRSV	CSFV	PCV2	PRRSV	CSFV	PCV2
1	0	10^2	10^5	No Ct	1.2×10^2 (13)	8.4×10^1 (7)
2	0	10^1	10^7	No Ct	4.0×10^0 (11)	1.5×10^6 (6)
3	0	10^7	10^2	No Ct	8.5×10^6 (6)	7.0×10^1 (9)
4	10^4	0	10^1	7.5×10^3 (8)	No Ct	1.2×10^1 (12)

续表 2 不同病毒与猪基因组 DNA 混合后通过多重 Real-time PCR 测定结果

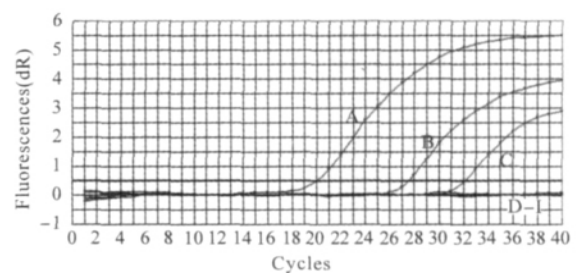
序号	不同病毒混合时的拷贝数/个			通过多重 Real-time PCR 测定的拷贝数(变异系数/%)		
	PRRSV	CSFV	PCV2	PRRSV	CSFV	PCV2
5	10^2	0	10^4	5.8×10^1 (24)	No Ct	8.2×10^3 (9)
6	10^5	0	10^2	7.4×10^4 (15)	No Ct	7.8×10^1 (13)
7	10^3	10^1	0	8.0×10^2 (10)	7.8×10^0 (8)	No Ct
8	10^6	10^3	0	1.2×10^6 (15)	8.8×10^2 (5)	No Ct
9	10^1	10^4	0	6.0×10^0 (18)	7.4×10^3 (8)	No Ct
10	10^1	10^6	10^3	7.0×10^0 (18)	9.2×10^5 (7)	3.5×10^3 (38)
11	10^2	10^6	10^6	7.5×10^1 (20)	7.0×10^5 (25)	7.5×10^5 (20)
12	10^5	10^3	10^1	7.8×10^4 (9)	9.0×10^2 (3)	1.1×10^1 (15)
13	10^2	10^1	10^4	7.0×10^1 (13)	9.0×10^0 (23)	8.8×10^3 (4)
14	10^1	10^6	10^1	5.0×10^0 (28)	6.8×10^5 (7)	7.0×10^0 (16)

2.4 重复性试验结果

用上述方法检测系列稀释质粒,对每一个浓度的样本均作 3 个重复,进行 3 批重复性试验,并进行批内和批间重复性试验分析。结果显示,仅在对低浓度样品(10^1 个拷贝/反应)进行分析时,有较大的批内和批间差异,变异系数(CV)均值为 16% 和 22%,而随着样品浓度增加变异系数降低,平均批内和批间变异系数小于 10%,表明重复性好,保证了不同样品间检测结果的可靠性和稳定性。

2.5 特异性试验结果

用优化后的 Real-time PCR 检测方法对不同的样品进行检测,结果如图 2 所示。除了 PCV2 DNA、CSFV 及 PRRSV 的 cDNA 样品检测出荧光信号外,其他样品在 40 个 PCR 循环内都没检测出明显的荧光值增加,说明该方法有很好的特异性。



A—C. PCV2、PRRSV、CSFV; D—I. SIV、JEV、HPS、ETEC、PPV、PRV

图 2 多重荧光定量 PCR 特异性试验结果

2.6 临床样本的检测结果

对 20 份临床样本分别进行 3 种病毒的单项和多重 Real-time PCR 检测,结果见表 3。从表 3 可以看出,多重 Real-time PCR 和单项 Real-time PCR 检测结果一致。PRRSV、CSFV 和 PCV2 的阳

表 3 临床样本检测结果

样品	多重 Real-time PCR 结果/(拷贝/ μ L)			单项 Real-time PCR 结果/(拷贝/ μ L)			结果
	PRRSV	CSFV	PCV2	PRRSV	CSFV	PCV2	
1	1.2×10^3	—	2.4×10^5	1.4×10^5	—	2.6×10^5	+/-/+
2	—	—	3.4×10^6	—	—	4.0×10^6	-/-/+
3	7.6×10^4	—	—	7.1×10^4	—	—	+/-/-
4	—	3.1×10^5	6.2×10^2	—	3.6×10^5	6.8×10^2	-/+/+
5	2.8×10^1	—	7.5×10^5	4.0×10^1	—	7.9×10^5	+/-/+
6	—	—	5.2×10^4	—	—	5.1×10^4	-/-/+
7	4.7×10^5	—	6.4×10^1	5.6×10^5	—	1.1×10^2	+/-/+
8	6.3×10^3	—	—	3.4×10^3	—	—	+/-/-
9	—	5.7×10^4	2.1×10^2	—	7.5×10^4	4.7×10^2	-/+/+
10	5.3×10^3	4.5×10^4	6.5×10^2	6.3×10^3	4.6×10^4	6.8×10^2	+/+/+
11	—	7.4×10^3	—	—	8.3×10^3	—	-/+/-
12	5.9×10^3	6.4×10^5	—	5.6×10^3	7.4×10^5	—	+/+/-
13	—	—	9.7×10^4	—	—	1.1×10^5	-/-/+
14	1.8×10^4	—	7.7×10^3	2.2×10^4	—	6.9×10^3	+/-/+
15	—	2.4×10^3	—	—	3.1×10^3	—	-/+/-
16	—	—	—	—	—	—	-/-/-
17	5.7×10^3	7.4×10^3	5.5×10^2	6.8×10^3	5.7×10^3	6.1×10^2	+/+/+
18	1.0×10^1	—	8.5×10^4	2.5×10^1	—	7.9×10^4	+/-/+
19	—	3.8×10^4	2.6×10^2	—	4.6×10^4	3.3×10^2	-/+/+
20	—	—	8.4×10^3	—	—	1.1×10^4	-/-/+

性率分别为50%、40%、70%;存在混合感染现象,其中,PCV2与PRRSV、PCV2与CSFV、PRRSV与CSFV混合感染份数分别为7份、5份、3份,其中,PCV2、PRRSV和CSFV3种病毒混合感染2份;仅有1份样本3种病毒检测全阴性。从病毒感染量来看,单病毒感染病毒拷贝数多在 $10^3 \sim 10^5$ 拷贝/反应;混合感染的病毒拷贝数,有的相当,有的差别比较大($10^1 - 10^5$)。

3 讨论

近年来,我国的养猪生产中疫病问题十分突出,原因之一是由于多种病原体共同感染或继发感染,造成高发病率和死亡率高,从而造成巨大的经济损失。其中PCV2、CSFV和PRRSV混合感染最为常见,如何防控是中国养猪业必须面临的实际问题。目前,针对上述猪病进行诊断的主要方法仍然是常规PCR和ELISA等,然而这些方法都在敏感性和特异性方面存在一定程度的不足。

Real-time PCR具有敏感性高、特异性强、操作简便、重复性好、可实时定量的特点,可实施多样品的自动化检测,且检测时污染少。目前,多重荧光定量PCR已成为实验室检测病原体的主要手段之一。在多重检测体系中,关键是要解决多对引物和探针之间的相互干扰问题。本试验通过软件评估了大量相关的引物和探针,选择相互之间 ΔG 最大并且 T_m 值相同的3组引物和探针,优化反应体系,把干扰降到最低。设计探针时,每种病原体探针的报告基因荧光发射波长应处于不同的光谱范围,以确保荧光定量PCR仪的检测通道能区分不同病原体的探针的荧光信号。本试验选用的FAM、HEX和ROX3种荧光染料,其波长处于不同的光谱范围,相互干扰少,具有明显的区分效果和信号强度。

本研究建立的单项和多重Real-time PCR方法,标准曲线线性关系良好,相关系数均大于0.99,PCR效率均在98%以上,表明试验过程和数据是可信的。具有高度的特异性和敏感性,对阳性质粒和纯化病毒的最低检测量可分别达到 $< 10^1$ 拷贝和 < 1 TCID₅₀/反应。批内和批间重复性试验的平均变异系数小于10%,表明试验结果重复性好。通过对20份临床样品进行检测,建立的多重Real-time PCR检测结果和单项Real-time PCR检测结果一致。从检测结果可以看出,PCV2在猪场中感染率高,可达70%,这与血清学、流行病学调查结果相一致^[14-15]。此外,不同病毒之间混合感染率也很高,说明当前猪病的感染越来越复杂。混合感染会导致死亡率升高,危害较大,这应成为今后猪病防制的重点,在预防上应综合考虑,研制高效的多联疫苗很有必要。

总之,本研究建立的多重实时荧光定量PCR反应体系可以用于PRRSV、CSFV和PCV2混合感染的快速临床诊断,为猪病毒性传染病的病原筛查和治疗提供理论和临床依据,该技术的建立也将为研究其他致病因子的分子诊断方法提供有益的借鉴。

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,1997:538-548.
- [2] Joaquim S, Gordon M, Allan G M. Porcine circovirus diseases[J]. Anim Health Res Rev, 2005, 6(2): 119-142.
- [3] 许立华,王玲,芦银华,等. 三种猪繁殖障碍性病毒混合感染的分子生物学调查[J]. 中国兽医科技, 2004, 34(7): 40-43.
- [4] Drolet R, Larochelle R, Morin M, et al. Detection rates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2 and swine influenza virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia[J]. Vet Pathol, 2003, 40(2): 143-148.
- [5] 丛晓燕,吴家强,李俊,等. 重组N蛋白抗原检测美洲型PRRSV抗体间接ELISA方法的建立[J]. 中国动物检疫, 2010, 27(12): 40-44.
- [6] 孔繁德,王荣,陈琼,等. 多重RT-PCR一步法技术同时检测猪瘟病毒和蓝耳病病毒方法的建立以及初步应用[J]. 生物技术通报, 2009(1): 112-116.
- [7] 范晓娟,李刚,史利军,等. 检测猪圆环病毒2型抗体SPA胶体金免疫层析方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(7): 158-161.
- [8] 蒋大良,余兴龙,李润成,等. 猪瘟病毒NS3基因克隆、原核表达及间接ELISA方法初步建立[J]. 微生物学通报, 2010, 37(1): 78-84.
- [9] 何后军,陆承平,罗咏梅. PCR检测临床病例中PCV2、PRRSV和CSFV的混合感染[J]. 中国兽医学报, 2010, 30(2): 177-179.
- [10] 杨宗照,母安雄,方维焕. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒实时荧光定量PCR方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2009, 31(4): 288-291.
- [11] 吴晓燕,刘涛,李俊,等. 猪圆环病毒2型特异性荧光定量PCR检测方法的建立与应用[J]. 家畜生态学报, 2011, 32(2): 41-46.
- [12] 王小武,符芳,柴政,等. PRRSV和PCV2以及PRV多重SYBR Green-I实时荧光PCR检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2008, 38(6): 494-499.
- [13] Tian H, Wu J Y, Shang Y J, et al. The development of a rapid SYBR one step real-time RT-PCR for detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Virology Journal, 2010, 7: 90.
- [14] Kleiboeker S B, Schommer S K, Lee S M, et al. Simultaneous detection of North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome virus using real-time quantitative reverse transcriptase-PCR[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2005, 17: 165-170.
- [15] 刘秀清,宁金友,赵荣茂,等. 西宁市猪圆环病毒2型感染的流行病学调查[J]. 中国兽医科学, 2006, 36(2): 162-165.