

# 高致病性猪繁殖与呼吸系统综合症病毒荧光定量PCR检测方法的建立

刘园园<sup>1</sup>, 肖性龙<sup>1,2</sup>, 吴晖<sup>1</sup>, 余以刚<sup>1</sup>, 张经纬<sup>2</sup>, 程邦照<sup>2</sup>, 龚俊<sup>2</sup>, 杨晓泉<sup>1</sup>, 刘冬梅<sup>1</sup>

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640) (2. 深圳太太基因工程有限公司, 广东 深圳 518057)

**摘要:** 为了对当前爆发流行的高致病性猪繁殖与呼吸系统综合症病毒建立快速准确的检测方法, 根据该类病毒在 Nsp2 基因 1594-1680 处缺失 87 个碱基的特点, 设计了一对特异性引物和一个 Taqman 探针, 通过对反应条件的优化, 建立了荧光定量 PCR 检测方法。该方法特异性强, 灵敏度高, 能很好地区分高致病性猪繁殖与呼吸系统综合症病毒和其它病毒, 没有发现假阳性和假阴性现象, 检测病毒滴度达到 1TCID<sub>50</sub>。用该法对 38 份疑似样本进行检测, 阳性率 60.5%, 与常规 PCR 检测法符合率 100%。

**关键词:** 高致病性猪繁殖与呼吸系统综合症; 荧光定量 PCR; 检测

中图分类号: S851.34; 文献标识码: A; 文章篇号: 1673-9078(2008)07-0731-04

## Development of Fluorescence Quantitative PCR Assay for the virulent Porcine Reproductive and Respiratory syndrome virus

LIU Yuan-yuan<sup>1</sup>, XIAO Xing-long<sup>1,2</sup>, WU Hui<sup>1</sup>, YU Yi-gang<sup>1</sup>, ZHANG Jing-wei<sup>2</sup>, CHENG Bang-zhao<sup>2</sup>, GONG Jun<sup>2</sup>, YANG Xiao-quan<sup>1</sup>, LIU Dong-mei<sup>1</sup>

(1.College of Light Industry & Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)(2.Shenzhen Taitai Genomics, Inc., Shenzhen 518057, China)

**Abstract:** A method for rapid detection of the highly virulent Porcine Reproductive and Respiratory syndrome virus (H-PRRSV) was developed using fluorescence quantitative PCR assay (FQ-PCR). The Taqman probe and a pair of specific primers and were designed based on Nsp2 gene with 87-base-pairs sequence deletion. Then the FQ-PCR method was developed by optimization of the reaction conditions, which showed high specificity and sensitivity, and well differentiated H-PRRSV form other viruses. 1TCID<sub>50</sub>/ml of the H-PRRSV could be detected by this method. Besides, similar positive percentages of 38 tissue specimens (60.5%) were found using FQ-PCR assay or conventional PCR assay.

**Key words:** highly virulent Porcine Reproductive and Respiratory syndrome virus (H-PRRSV); fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR); detection

2006年6月以来,我国江西、湖南、四川等地爆发了猪高致病性繁殖与呼吸系统综合症(Highly Virulent Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, H-PRRS),又称高致病性猪蓝耳病<sup>[1]</sup>,其症状为猪体温升高,猪身呈紫色斑块,出现败血症,怀孕母猪流产、死胎,大量发病猪死亡,该疫情给猪养殖业造成了巨大的经济损失<sup>[2-3]</sup>。

H-PRRS由猪高致病性繁殖与呼吸系统综合症病毒(H-PRRSV)所引起,该病毒是猪繁殖与呼吸系统综合症病毒(PPRSV)的突变株,为正链RNA病毒,

收稿日期: 2008-03-24

作者简介: 刘园园(1984-),女,硕士研究生,研究方向为食品安全

通讯作者: 吴晖,教授,博士生导师

在 PRRSV Nsp2 基因片段的 1594~1680 处缺失 87 个碱基序列<sup>[3]</sup>。

对该病毒建立及时快速的检测方法,对预防和控制该疫情有着重要的作用。目前现有的血清学手段无法检测 H-PRRSV。传统的 PCR 法需要对 PCR 反应进行后处理且不能精确定量<sup>[4]</sup>。荧光定量 PCR 技术以重复性好、灵敏度高,操作简单、所需时间短、无污染等优点被广泛应用于病毒的快速检测<sup>[5]</sup>。本研究旨在根据 H-PRRSV 在 Nsp2 处基因缺失的特点,采用荧光定量 PCR 的方法,设计建立一种新的快速检测 H-PRRS 的方法。

### 1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 毒株材料

猪高致病性繁殖与呼吸系统综合症病毒 (H-PRRSV) 5 株、猪蓝耳病病毒 (PRRSV) 7 株由重庆动物疫病预防控制中心提供; 猪瘟病毒 (CSFV) 2 株由湖南出入境检验检疫局技术中心提供; 猪细小病毒 (PPV) 2 株、猪圆环病毒 2 型 (PCV-2) 2 株、猪伪狂犬病毒 (PRV) 1 株、猪水泡病病毒 (SVDV) 2 株、猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV) 1 株由辽宁出入境检验检疫局技术中心提供; 牛病毒性腹泻病毒 (BVDV) 1 株由天津出入境检验检疫局技术中心提供链球菌 (*Streptococcus*)、沙门氏菌 (*Salmonella*) 各一株由太太基因公司提供。38 份疑似 H-PRRSV 阳性猪肺、脾及血清病料由重庆动物疫病预防控制中心提供。

1.1.2 仪器和试剂

ABI7500 荧光定量 PCR 仪, sigma 高速离心机。一步法 RT-PCR 试剂盒购于大连宝生物有限公司, 病毒 RNA 抽提试剂盒购于 Qiagen 公司。Genomic-tip

100/G 试剂盒。H-PRRSV PCR 检测试剂盒购于北京世纪元亨公司。

1.2 方法

1.2.1 核酸的提取

病毒细胞培养液和病猪血清样本用 QIAamp Viral RNA Mini Kit 提取纯化。对于其它猪病料样本, 先剪取 50~100 mg 组织样本, 加入装有 500  $\mu$ L Hanks 液的研钵中研成匀浆, 用 QIAamp Viral RNA Mini Kit 提取纯化, -20  $^{\circ}$ C 保存备用。细菌基因组 DNA 以 Genomic-tip 100/G 试剂盒提取纯化, -20  $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 引物设计及其特异性分析

根据 GenBank 数据库中已有的 PRRSV 基因序列以及 H-PRRSV Nsp<sub>2</sub> 基因碱基序列的特点<sup>[2]</sup>, 在碱基缺失位点附近, 利用 Primer Express V2.0 和 Premier 5.0 软件设计一对引物和一个 Taqman 探针 (见表 1), 与 GenBank 数据库中所有生物核苷酸序列进行 BLAST 比较分析, 证实设计的引物和探针具有高度特异。引物探针由上海超世生物技术有限公司合成、标记。

表 1 引物和探针的序列

Table 1 Nucleotide Sequences of primers and probe for FQ-PCR

Name	Sequence	Length/bp	% GC	Tm value
Prime HP-pr	5'-CCCAAGCTGATGACACCTTTG-3'	21	52.4	59.2
Prime HP-pr	5'-AATCCAGAGGCTCATCCTGGT-3'	21	52.4	58.6
Probe	FAM-5'-CGCGTAGAACTGTGACAACAACGCTGA-3'-TAMRA	27	51.9	68.8

1.2.3 H-PRRSV 实时定量荧光 PCR 的建立及优化

参照一步法 FQ-PCR 试剂盒操作说明书, 将上述阳性病毒提取物以及上、下游引物和探针同时加到 25  $\mu$ L 反应体系中, 于 ABI7500 荧光 PCR 仪上进行实时荧光 RT-PCR 扩增。反应条件为: 50  $^{\circ}$ C 30 min, 95  $^{\circ}$ C 3 min; 95  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 40 s, 在 60  $^{\circ}$ C 时设定检测 FAM 荧光信号, 40 个循环。初步确定反应体系可行后, 采用正交实验法对上下游引物浓度、探针浓度、Mg<sup>2+</sup> 浓度进行优化, 确定最佳反应体系。

1.2.4 灵敏度检测

将 H-PRRSV 在 Marc-145 细胞上培养增殖, 待 CPE 达 80% 以上时收集细胞液, -20  $^{\circ}$ C 冻融三次, 采用 Karber 法测定其 TCID<sub>50</sub>/mL, 取滴度为 10<sup>-1</sup>~10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/mL 的培养液, 提取 RNA, 进行 FQ-PCR 反应, 以检测其灵敏度。

1.2.5 特异性检测

考虑到 H-PRRSV 并发性感染的病毒和细菌<sup>[2]</sup>, 选用 PRRSV、CSFV、PPV、PCV-2、PRV、SVDV、TGEV、链球菌和沙门氏菌进行检测, 以验证检测方法的特异性。

1.2.6 对临床样本的检测

将提取的 38 份疑似 H-PRRSV 阳性猪肺、脾及血清病料核酸, 分别用建立 FQ-PCR 方法和 PCR 试剂盒进行检测, 以验证检测方法的实用性。

2 结果

2.1 荧光定量 PCR 反应体系的优化

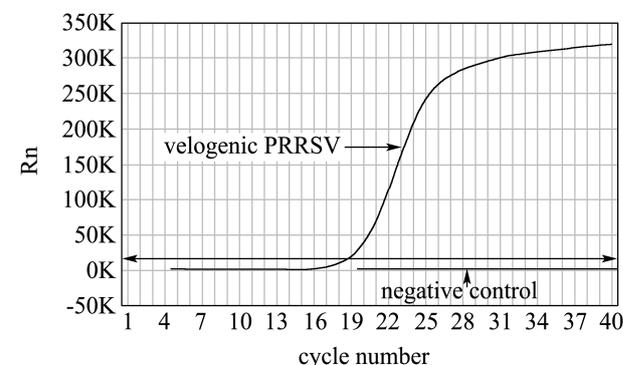


图 1 高致病性猪蓝耳病病毒实时荧光 RT-PCR 检测

Fig.1 The detection of velogenic PRRSV by FQ-PCR

采用正交实验法对上下游引物浓度、探针浓度、Mg<sup>2+</sup> 浓度进行优化, 确定最佳反应体系为: 上游引物

浓度为 350 nmol/L, 下游引物浓度 500 nmol/L, 探针浓度 180 nmol/L, Mg<sup>2+</sup>浓度 6 mmol/L; 其他试剂浓度均按 TaKaRa 一步法 RT-PCR 试剂盒说明书确定。用优化好的反应体系对高致病性猪蓝耳病毒进行检测, 并设不加模板的阴性对照 (NTC), 扩增结果(图 1)初步说明该检测方法的建立成功。

2.2 敏感性试验

将滴度为 10<sup>-1</sup>~10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/mL 的病毒液提取

RNA, 进行荧光定量 PCR 检测, 结果(如图 2)所示, 该方法可以检测到滴度为 1 TCID<sub>50</sub>/mL 的病毒液, 具有很高的敏感性。

2.3 荧光定量 PCR 的特异性试验

在反应体系中, 加入不同种病毒的 RNA 作为模板, 其扩增结果(见表 2, 图 3)。只有加入了 H-PRRSV RNA 的反应管才能得到阳性曲线, 说明所设计的引物和探针具有很强的特异性, 没有出现非特异性扩增。

表 2 荧光定量 PCR 特异性实验

Table 2 Specificity experiment of FQ-PCR for PRRSV detection

Strain <sup>b</sup> (source, No.)	Result <sup>c</sup>	Strain <sup>b</sup> (source, No.)	Result <sup>c</sup>
Highly virulent Chinese type PRRSV-1	+	bovine viral diarrhea virus(BVDV)-3	-
Highly virulent Chinese type PRRSV-2	+	porcine parvovirus(PPV)-1	-
Highly virulent Chinese type PRRSV-3	+	porcine parvovirus(PPV)-2	-
Highly virulent Chinese type PRRSV-4	+	porcine pseudorabies virus(PRV)-1	-
Highly virulent Chinese type PRRSV-5	+	porcine pseudorabies virus(PRV)-2	-
Normal PRRSV-1	-	porcine pseudorabies virus(PRV)-3	-
Normal PRRSV-2	-	Transmissible gastroenteritis virus(TGEV)-1	-
Normal PRRSV-3	-	transmissible gastroenteritis virus(TGEV)-2	-
Normal PRRSV-4	-	transmissible gastroenteritis virus(TGEV)-3	-
Normal PRRSV-5	-	Porcine circovirus 2 (PCV -2)-1	-
Normal PRRSV-6	-	Porcine circovirus 2 (PCV -2)-2	-
Normal PRRSV-7	-	Swine Vesicular Disease Virus (SVDV)-1	-
Classical Swine Fever Virus(CSFV) -1	-	Swine Vesicular Disease Virus (SVDV)-2	-
Classical Swine Fever Virus(CSFV)-2	-	Streptococcus	-
bovine viral diarrhea virus(BVDV)-1	-	Salmonella	-
bovine viral diarrhea virus(BVDV)-2	-		

Note: <sup>c</sup>results of FQ-PCR; +, positive result; -, negative result.

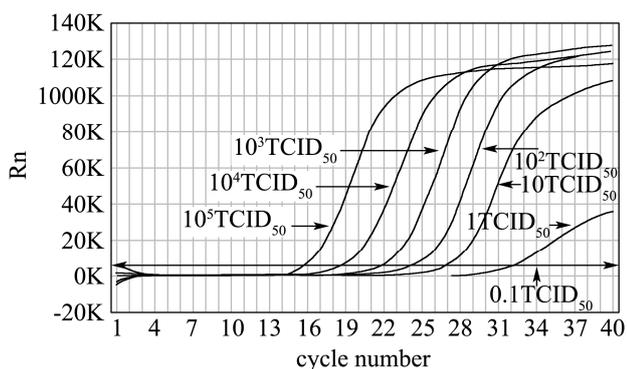


图 2 实时荧光 RT-PCR 检测高致病性猪蓝耳病毒的敏感性试验

Fig.2 Sensitivity of FQ-PCR assay for H-PRRSV detection

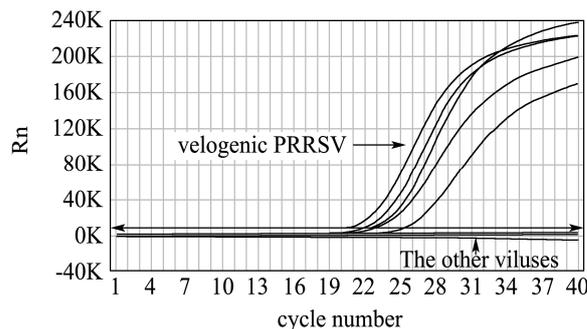


图 3 实时荧光 RT-PCR 的特异性试验结果图

Fig.3 Specificity test of FQ-PCR for H-PRRSV detection

2.4 临床样本的检测结果

对 38 份疑似 H-PRRSV 阳性猪肺、脾以及血清病

料采用荧光定量 PCR 方法进行检测,并与普通 PCR 检测(北京世纪元亨公司试剂)结果进行比较,结果(表3)所示,阳性率均为60.5%,符合率为100%。

表3 疑似阳性样本的检测结果

Table 3 Comparison of FQ-PCR and conversational PCR for H-PRRSV detection in 38 suspected positive samples

FQ-PCR/PCR	Lung (17)	Spleen (11)	Serum (10)
Positive/Positive	11/11	5/5	7/7
Negative/Negative	6/6	6/6	3/3
Positive ratio	64.7%	45.5%	70.0%

### 3 讨论

2006年以来爆发的H-PRRS给我国的养殖业造成了巨大的经济损失,建立一套快速可靠的检测方法,准确及时的确诊该疫情,对预防和控制该疫情有着重要的作用。普通PCR检测需要进行电泳后处理,容易造成交叉污染,影响检测的时效性<sup>[6]</sup>。而基于Taqman探针的FQ-PCR是在普通PCR基础上,加入一条特异性荧光标记的Taqman探针,能对PCR扩增产物进行实时动态检测,并且能够自动分析结果,不需要后处理过程,从根本上解决了PCR扩增产物检测时的污染问题,同时通过引物、探针和目标序列的特异性结合进一步提高检测的特异性<sup>[7-8]</sup>。

本研究根据H-PRRSV Nsp2基因序列在1594-1680处固定缺失87个碱基的特点,在缺失序列处设计一对引物和一条特异性Taqman探针,探针横跨缺失序列两端。并与GenBank数据库中所有生物核酸序列进行Blast比较分析,设计引物和探针有高度特异性,有效避免了假阳结果出现的可能性,通过特异性实验也证实引物和探针的高度特异性,完全可以满足H-PRRSV检测的要求。

对38份疑似H-PRRSV阳性猪肺、脾以及血清病料采用FQ-PCR方法进行了检测,用北京世纪元亨公司生产的普通PCR试剂盒进行平行比较,结果阳性率高达60.5%,两种检测方法在所检测的样本范围内符合率100%,说明建立的检测方法有很强的实用性。

### 参考文献

- [1] 冉隆权,郑晓刚.猪高致病性蓝耳病的防治[J].动物疾病防治,2007,7:32-34
- [2] 赵凤玲,袁焕清.当前高致病性猪蓝耳病的防治措施[J].兽医导刊,2007,6:22-23
- [3] Tian K, Yu X, Zhao T, Feng Y, Cao Z, et al (2007) Emergence of Fatal PRRSV Variants: Unparalleled Outbreaks of Atypical PRRS in China and Molecular Dissection of the Unique Hallmark. PLoS ONE 2(6):e526. doi:10.1371/journal.pone.0000526
- [4] 杨爱萍,黄金林.单抗酶联试剂盒与PCR方法快速检测沙门氏菌的比较[J].畜牧与兽医,2003,35(12):21-22
- [5] Zhang Zh D, Soren A. Detection of carrier cattle and sheep persistently infected with foot and mouth disease virus by a rapid real time RT-PCR assay [J]. J Virol Meth, 2003, 111:95-100
- [6] 杨素,吴小伦,花群义.口蹄疫病毒群特异性荧光PCR检测方法研究[J].中国畜牧兽医,2004,31(11):44-45
- [7] Kuboniwa M, Amano A, Kimura KR, et al. Quantitative detection of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes[J]. Oral Microbiol Immunol, 2004, 19(3):168-176
- [8] Suzuki N, Nakano Y, Yoshida A, et al. Real-time TaqMan PCR for quantifying oral bacteria during biofilm formation[J]. Clin Microbiol, 2004, 42(8):3827-3830