

技术与方法

套式 RT-PCR 检测猪繁殖和呼吸综合征病毒的研究

赵 耘 张广川 秦玉明 宁宜宝 王 琴

(中国兽医药品监察所 北京 100081)

摘要: 参照 ATCC VR-2332 株及 LV 株保守区段设计了 3 条引物, 以此建立了检测猪繁殖和呼吸综合征病毒的套式 RT-PCR 方法。利用其分别对 ATCC VR-2332 株、LV 株及 B13 株进行套式 RT-PCR, 结果从 3 个不同地区分离的毒株中均能特异性的扩增出相应的片段, 大小分别约为 430bp (预期片段为 430bp)、410bp (预期片段为 413bp) 及 410bp (预期片段为 413bp), 而 3 个非 PRRSV 的病毒 (猪瘟病毒、细小病毒及伪狂犬病毒) 均未扩增出相应的片段。其敏感性可达到 10^{-2} TCID₅₀, 比一步法 RT-PCR 方法敏感性提高了 10000 倍。本方法的建立使猪繁殖和呼吸综合征病毒的检测更为敏感、快捷及准确。

关键词: 套式 RT-PCR, 特异性, 敏感性, 一步法 RT-PCR

中图分类号: Q852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 06-0077-04

RESEARCH ON THE TESTING OF PORCINE REPRODUCTIVE
AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS BY NESTRT-PCR

ZHAO Yun ZHANG Guang-Chuan QIN Yu-Ming NING Yi-Bao WANG Qin

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081)

Abstract: Three primer were designed based on the conservered area of the genetic of the ATCC VR-2332 strain and LV strain. And the nest RT-PCR of testing porcine reproductive and respiratory syndrome virus were developed. The nest RT-PCR against ATCC VR-2332 strain, LV strain and B13 strain were done by this method. The DNA fragment were obtained specially from the three strains isolated from different region. The size were 430bp (430bp), 410bp (413bp) and 410 bp (413bp) separately. But the DNA fragment were not obtained from HCV, PPV and PRV. Its sensitivity was 10^{-2} TCID₅₀. It's sensitivity increased 10000 times than one step RT-PCR. It should make the method of testing porcine reproductive and respiratory syndrome virus more sensitive, fast and accurate.

Key words: Nest RT-PCR, Speciality, Sensitivity, One Step RT-PCR

猪繁殖和呼吸综合征 (Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 1987 年首先爆发于美国, 随后迅速传播到世界许多国家, 其主要特征是各种年龄的猪均可感染发病, 同时出现繁殖障碍和呼吸道症状, 经济损失严重, 对养猪业影响很大^[1]。PRRS 的病原是猪繁殖和呼吸综合征病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRSV), 属于动脉炎病毒科、动脉炎病毒属^[2]。不同地区的 PRRSV 分离株其抗原性、基因组结构等均存在差异, 目前将 PRRSV 分为两个不同的亚群: 欧洲亚群、美洲亚群^[3]。我国已于 1996 年分离到 PRRSV, 近年来所分离的病毒株大多属于美洲亚群, 但目前已发现我国亦存在欧洲亚群的病毒^[4]。

* 国家 973 计划资助项目 (NO.G1999011905)

收稿日期: 2002-12-04, 修回日期: 2003-02-15

随着分子生物学的发展, 分子生物学的诊断技术也更多的应用于 PRRS 的诊断。据报道反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 可以检测到 $6.7 \sim 100 \text{ TCID}_{50}$ 的病毒, 而且利用特异引物可以区别 PRRSV 不同亚群的分离株^[5]。随着 PRRSV 的分子生物学研究的不断深入, 用分子生物学技术检测 PRRSV 的方法将会进一步完善。

1 材料与方法

1.1 病毒和细胞

ATCC VR-2332 株 (美洲分离株)、LV 株 (欧洲分离株) 及 HS2H 猴肾传代细胞 (Marc145 的克隆株) 由美国明尼苏达大学 Dr. Han. Soo. Joo 惠赠, B13 株为国内分离株, 由前大连动植物检疫局惠赠。

1.2 病毒的增殖及病毒毒价的测定

将 ATCC VR-2332 株、LV 株及 B13 株分别接种于 HS2H 细胞上, 营养液为含 10% 犊牛血清、1% 谷氨酰胺和 0.15% 的 NaHCO_3 的 MEM 液, 37°C 5% CO_2 培养 48 ~ 72h, 当细胞出现 70% ~ 80% CPE 时, 收毒, -20°C 保存。毒价测定参照动物病毒学 TCID_{50} 测定, ATCC VR-2332 株、LV 株及 B13 株的 $\text{TCID}_{50}/0.1\text{mL}$ 分别为 $10^{6.2}$ 、 $10^{5.5}$ 和 $10^{5.8}$ 。

1.3 引物

参照 ATCC VR-2332 株^[6] 及 LV 株^[7] ORF7 基因保守区段设计 3 条引物, 引物序列及位置见表 1, 引物合成由上海博雅生物工程公司合成。

表 1 引物的序列及位置

引物	引物序列	位置 (VR-2332/LV)
1011PCS	GCGAATTCGGTAAACCTTGTTAAATATC	14571-14590/2884-2903
1009PCS	CCCAATTCATGCCAGCCAGTCAATCA	14643-14661/2944-2962
1010PCR	TTCTGCAGTCGCCCTAAATGAATAGGTC	15021-15040/3356-3376

1.4 病毒 RNA 的提取

参照 GIBCO 公司 TRIZOL RNA 提取试剂说明书进行。

1.5 套式 RT-PCR

反转录按照 Gibco 公司的说明书进行。套式 PCR 第一步的引物为 1011PCS 和 1010PCR, 反应条件为: 94°C 5min 预变性, 94°C 60s, 50°C 45s, 72°C 60s, 30 个循环, 然后 72°C 10min。以此 PCR 产物适量为模板进行套式 PCR 的第二步, 引物为 1009PCS 和 1010PCR, 第二步的反应条件同第一步反应条件。取 5-8 μL PCR 产物进行电泳检测。

2 结果

2.1 特异性测定

所设计的 3 条引物是参照 ATCC VR-2332 株及 LV 株保守区段设计而成, 利用其分别对 ATCC VR-2332 株、LV 株及 B13 株进行套式 RT-PCR, 结果从 3 个不同地区分离的毒株中均能扩增出相应的片段, 大小分别约为 430bp (预期片段为 430bp)、410bp (预期片段为 413bp) 及 410bp (预期片段为 413bp) 结果见图 1, 而 3 个非 PRRSV 的病毒 (猪瘟病毒、细小病毒及伪狂犬病毒) 均未扩增出相应的片段 (图片略)。

2.2 敏感性测定

将 VR-2332 株做系列稀释, 使其浓度为 10^6 、 10^4 、 10^2 、 10^0 、 10^{-2} 、 10^{-4} TCID₅₀, 结果套式 RT-PCR 可以检测到 10^{-2} TCID₅₀ 的病毒样品, 大小均约为 430bp (预期片段为 432bp) 结果见图 2, 而只用 1 对引物的 RT-PCR 方法其可以检测到 10^2 TCID₅₀ 的病毒样品, 大小均约为 500bp (预期片段为 508bp) 结果见图 3。

2.3 膜板量测定

分别取第一步 PCR 产物 2 μ L、1 μ L、0.5 μ L、0.1 μ L 进行第二步 PCR, 结果 4 个膜板量均能扩增出相应片段, 大小均

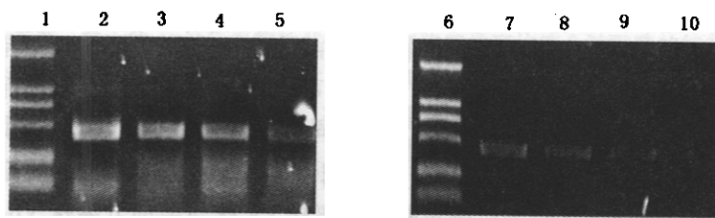


图 2 套式 RT-PCR 敏感性测定

1 6 DL2000 标准分子量, 2、3 10^6 TCID₅₀, 4、5 10^4 TCID₅₀, 6 10^2 TCID₅₀, 7 10^0 TCID₅₀, 8 10^6 TCID₅₀, 9 10^4 TCID₅₀, 10 10^{-2} TCID₅₀

约为 430bp (预期片段为 432bp), 但以 0.5 μ L 膜板量为最适量, 其 PCR 产物最亮结果见图 4。

2.4 循环次数测定

取第一步 PCR 产物 0.5 μ L 分别以 25、30、35 个循环进行第二步 PCR, 结果 3 个循环次数均能扩增出相应的片段, 大小均约为 430bp (预期片段为 432bp), 而 PCR 产物的量基本无差别 (图片略)。

2.5 套式 RT-PCR 的应用

利用本方法分别对 9 份采自江西、福建 2 地的野外样品进行了检测, 结果 9 份样品中有 2 份利用一步 RT-PCR 呈现阳性, 利用套式 RT-PCR 7 份呈现阳性结果见表 2。

3 讨论

PRRSV 基因组为不分段的单股正链 RNA, 通过 cDNA 克隆序列测定, PRRSV 基因全序列长约 15kb (含 poly (A) 尾), 包括 8 个开放读码框 (ORFs), 各基因定位的顺序是: 5'-ORF_{1a}-ORF_{1b}-ORF₂-ORF₃-ORF₄-ORF₅-ORF₆-ORF₇-3'^[6,7]。ORF_{1a} 和 ORF_{1b} 编码病毒的 RNA 聚合酶, ORF₂ 编码病毒的膜蛋白, ORF₃ 编码病

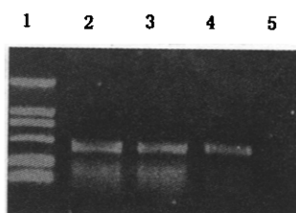


图 1 套式 RT-PCR 特异性测定

1 DL2000 标准分子量, 2 ATCC VR-2332 株, 3 LV 株, 4 B13 株, 5 空白对照

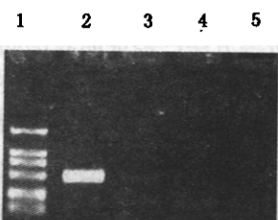


图 3 一步法 RT-PCR 敏感性测定

1 DL2000 标准分子量, 2 10^6 TCID₅₀, 3 10^4 TCID₅₀, 4 10^2 TCID₅₀

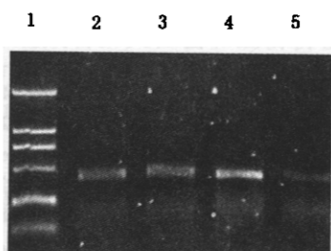


图 4 套式 RT-PCR 膜板量测定

1 DL2000 标准分子量, 2 膜板量 2 μ L, 3 膜板量 1 μ L, 4 膜板量 0.5 μ L, 5 膜板量 0.1 μ L

表2 套式 RT-PCR 及一步 RT-PCR 对野
外样品检测结果

样品	一步 RT-PCR 结果	套式 RT-PCR 结果
江西 1	-	-
2	-	+
3	+	+
4	-	+
福建 1	-	+
2	-	-
3	+	+
4	-	+
5	-	+

毒的核衣壳蛋白(N蛋白)。N蛋白是非糖基化的蛋白,分子量为15kD,由123~128个氨基酸组成,呈现较强的亲水性及碱性。N端26%的氨基酸由Arg、His、Lys组成,此区可能是与基因RNA相互作用的位点^[6]。已证明在N蛋白上至少有3个不同的表位抗原,目前已制备出了针对这些抗原表位的单克隆抗体。在N蛋白的50~90位氨基酸是一亲水的高保守区,此区含有N蛋白的一个抗原表位,且此抗原表位是大多数

欧洲亚群分离株和美洲亚群分离株所共有的。N蛋白不能刺激机体产生中和抗体,但它是优势结构蛋白,能激发强的免疫应答^[8]。在PRRSV感染早期产生的抗体主要是针对N蛋白,且持续时间长达137d,提示N蛋白可能是将来PRRS诊断的新型抗原的首选蛋白^[8]。故而本研究设计引物是参照2个不同亚群标准毒株的ORF₇基因设计而成。自1996年我国首次分离到PRRSV以来^[3],我国许多省市发现有PRRS的流行,对我国养猪业造成了严重的危害。目前已确定欧洲分离株LV株与美洲分离株VR-2332株属于两个不同的亚群。据报道PRRSV两个亚群中ORF₅、ORF₇基因所编码的蛋白质GP₃、N蛋白氨基酸序列同源性均不超过60%^[9]。不同的PRRSV欧洲分离株之间其抗原性、核苷酸序列及氨基酸序列呈现较大的相似性,其N蛋白的氨基酸同源性可达99%~100%^[10]。杨汉春、仇华吉及赵耘等人通过中和试验、RT-PCR以及ORF7基因的序列分析等方法已经证明我国同时存在2种不同的PRRSV亚群^[2,10]。故而,本研究所使用的3条引物1009PCS、1011PCS及1010PCR的设计是根据报道的LV株^[7]、VR-2332株^[6]序列ORF₇基因保守区段设计而成,目的是能够检测2种亚群的病毒。结果如图1所示,以这3条引物建立的套式RT-PCR能够检测2种不同亚群的PRRSV。PRRSV为RNA病毒,RNA容易降解,这为实际操作带来很多困难,使检测中的假阴性增多。本研究中所采用的RT-PCR方法为套式RT-PCR,能够极大的提高检测的敏感度,套式法比一步法敏感度提高了10000倍,套式法能检测到0.01TCID₅₀的病毒,而一步法只能检测到100TCID₅₀的病毒。

参考文献

- [1] Collins J E, Benfield D A, Christianson M T, *et al.* J Vet Diagn Invest, 1992, 4: 117~126.
- [2] Cavanaugh D. Arch Virol, 1997, 142: 629~633.
- [3] Nelson E A, Christopher-Hennings J, Drew T, *et al.* J Clin Microbiol, 1993, 34: 3184~3189.
- [4] 赵 耘, 罗长宝, 陈 茹, 等. 病毒学报, 2001, (17) 1: 75~80.
- [5] ChriHennings J, Nelson E A, Nelson J K, *et al.* J Clin Microbiol, 1995, 33 (7): 1730~1734.
- [6] Conzelmann K K, Visser N, Thiel H J, *et al.* Virology, 1993, 193: 329~339.
- [7] Meulenber J J M, Den Besten A P, De Kluyver E P, *et al.* Virology, 1993, 192: 62~72.
- [8] Nelson E A, Christopher-Hennings J, Drew T, *et al.* J Vet Diagn Invest, 1994, 6: 410~415.
- [9] Murtaugh M P, Elam M R, Kakach I T, *et al.* Arch Virol, 1995, 140: 1451~1460.
- [10] 杨汉春, 黄芳芳, 张 旭, 等. 中国兽医杂志, 1997, 23 (4): 3~5.