

# 应用 RT-PCR 技术检测动物组织中的口蹄疫病毒\*

娄高明 杜伟贤 杨傲冰 周秀蓉 谢明权

(广东省兽医生物技术实验室 广州 510640)

**摘要:**通过对影响 RT-PCR 检出率的条件和试剂进行了筛选,确定了提取 FMDV RNA 的最佳方法和试剂,优选出 RT-PCR 反应的试剂和最佳反应条件,建立了检测口蹄疫病毒核酸的 RT-PCR 方法。应用所建立的方法检测送检的鲜牛奶、淋巴结、脊髓、牛鼻咽拭子,结果阳性率分别为 41.4% (24/58)、13.33% (2/15)、20% (1/5)、37.5% (12/32);检测 4 个屠宰场送检的组织样品 40 份,结果阳性率为 10%~70%;检测送检的奶粉(1份)、水泡皮(1份)、老鼠(2份)、患儿口腔棉拭子(4份),阳性率均为 100%;而检测送检的蟑螂 4 份,阳性率为 0。研究表明检测 FMDV 的 RT-PCR 技术能准确快速地检测肉类、奶类、分泌物、排泄物的带毒、排毒情况,可用于口蹄疫的诊断和流行病学调查。

**关键词:**口蹄疫病毒, 核酸检测, RT-PCR, 动物组织

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 04-0009-05

## THE DETECTION OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS IN ANIMAL TISSUE BY RT-PCR TECHNIQUE

LOU Gao-Ming DU Wei-Xian YANG Ao-Bin

ZHOU Xiu-Rong XIE Ming-Qian

(The Guangdong Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Guangzhou 510640)

**Abstract:** A set of primers amplified the VP1 gene of foot-and-mouth disease virus (FMDV) was designed and synthesized. A reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique detected the RNA of FMDV was established after selecting the best purification method, reagents and reaction conditions. Samples of fresh milk, lymph node,

\* 国家“十五”科技攻关项目 (No. 2002 BA514A-18-1)

广东省科技攻关项目 (No. 99B05601G)

收稿日期: 2001-04-20, 修回日期: 2001-08-08

spinal cord, vesicular skin, milk powder, cotton swab, mouse and meat in slaughter-house were detected by RT-PCR, positive rates were 41.4% (24/58), 13.33% (2/15), 20% (1/5), 100% (1/1), 100% (1/1), 37.5% (12/32), 100% (2/2) and 10% ~ 70%, respectively. However, positive rate of cockroach detected by RT-PCR was 0. The results showed that the established FMDV RT-PCR technique provided a more sensitive, specific and reliable method for diagnosis and epizootic study of the foot-and-mouth disease.

**Key words:** Foot-and-mouth disease virus, RNA detection, RT-PCR, Animal tissue

口蹄疫(FMD)是由口蹄疫病毒(FMDV)引起偶蹄动物的一种急性、热性、高度接触性传染病,被国际兽医局列为A类传染病的头号疫病。该病对畜牧业生产危害极大,是各国检疫和防疫的重点对象。康复和亚临床感染动物及畜产品(主要是肉类、奶等)带毒而引发FMD暴发和流行的情况屡见不鲜,因此该病一经检出,相应的家畜及畜产品就禁止移动和出口,造成巨大的经济和政治损失,故各国政府对口蹄疫的检验检疫非常严格。目前检测FMD常用的技术有动物接种、病毒分离和血清学试验等,这些方法有的费时、费力,有的存在非特异性反应和敏感性低等缺点,因此迫切需要一种快速、敏感、特异的方法来解决生产实际中的问题<sup>[1-3]</sup>。PCR技术克服了上述方法的某些缺点,具有敏感、特异、快速的优点,国内外许多学者将PCR技术应用于FMD的检测,取得了十分可喜的成绩<sup>[4-6]</sup>。本课题组在初步建立RT-PCR技术检测FMDV核酸的基础上,继续优化了各种反应条件,获得了较好的实用效果。本文就应用RT-PCR技术检测动物组织中FMDV的结果报告如下。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 毒株

FMDV F29株、MF307株、O3B3株、T501株、T509株、T510株等用于阳性对照;猪水泡病病毒(SVDV)、猪瘟疫病毒(HCV)、乙型脑炎病毒(JEV)、猪细小病毒(PPV)、伪狂犬病病毒(PRNV)、猪生殖与呼吸道综合征病毒(PRRSV)等用于阴性对照。它们均为本室保存之毒种。

### 1.2 引物设计与合成

根据文献[7],通过计算机分析设计了1对引物,上游引物(P1):5'-TACTACT-TCTCTGACTTGGGA-3',位于VP1基因的后段;下游引物(P2):5'-GAAGGGCCCAAGGT-TGGACTC-3',位于VP1基因的尾;引物之间跨度为480bp。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

### 1.3 工具酶和试剂盒

AMV与M-MLV反转录酶、Taq DNA聚合酶、硫氰酸胍、β-巯基乙醇、DEPC、RNA-sin、dNTPs、各种RNA提取试剂盒与RT-PCR酶混合物试剂盒等分子生物学试剂分别购自相应的生物工程公司。

### 1.4 样品总RNA的提取

**1.4.1 方法1(自配试剂I):**(1)100mg组织样品加1mL变性液(4mol/L硫氰酸胍;25mmol/L醋酸钠,pH7;0.1mol/Lβ-巯基乙醇;0.5% Sarkosyl),匀浆;细胞培养物离心悬浮细胞弃上清,或长成单层的细胞移去细胞培养液,按10<sup>7</sup>细胞加变性液1mL,混匀。(2)将上述匀浆物转移到5mL离心管中,加0.1mL醋酸钠(2mol/L,pH4),混匀。加1mL水饱和的重蒸酚,混匀。再加0.2mL氯仿/异戊醇(49:1),混匀,置0℃~4℃,

15min。4℃, 14,000r/min离心 20min, 上层液相转移到新的离心管。加 1mL (1 倍体积) 的 100% 异丙醇沉淀 RNA, -20℃ 静置 30min。4℃, 14,000r/min离心 10min, 弃上清液。(3) 加 0.3mL 变性液溶解 RNA 沉淀物并转移到 1.5mL 离心管中。加 0.3mL (1 倍体积) 的 100% 异丙醇沉淀 RNA, -20℃ 静置 30min。4℃, 14,000r/min 离心 10min, 弃上清液。用 75% 的乙醇悬浮 RNA 沉淀物, 室温 10 ~ 15min 溶解沉淀物中的硫氰酸胍。4℃, 14,000r/min 离心 5 min, 弃上清液。真空抽干 RNA 沉淀物。加适量 DEPC 处理过的水溶解, -20℃ 备用。

**1.4.2 方法 2 (自配试剂 II):** (1) 50mg 组织样品加 1mL 硫氰酸胍裂解液 (4mol/L 硫氰酸胍; 0.1mmol/L Tris-HCl, pH7.5; 1%  $\beta$ -巯基乙醇), 匀浆; 细胞培养液, 加等体积的硫氰酸胍裂解液, 混匀。(2) 冰浴 15min, 加等体积酚/氯仿, 混匀。4℃, 14,000r/min 离心 20min, 上层液相转移到新的离心管, 再加等体积酚/氯仿抽提 1 次。(3) 离心后取上层液相, 加 10% 体积 2mol/L NaAc (pH4.8) 和 1 倍体积的异丙醇, -20℃ 静置 30min。4℃, 14,000r/min 离心 15min, 弃上清液。沉淀物用 75% 的乙醇洗 2 次。真空抽干 RNA 沉淀物。加适量 DEPC 处理过的水溶解, -20℃ 备用。

**1.4.3 方法 3:** 组织样品或细胞培养液用 QIAGEN 公司的 RNeasy Mini 试剂盒提取 RNA。

**1.4.4 方法 4:** 组织样品或细胞培养液用华美生物工程公司生产的 RT-PCR RNA 一步样品处理试剂盒提取 RNA。

**1.4.5 方法 5:** 组织样品或细胞培养液用 Pharmacia 生物技术公司生产的 Quick Prep<sup>®</sup> 总 RNA 提取试剂盒提取 RNA。

## 1.5 RNA 电泳

按 Sambrook 等<sup>[8]</sup>介绍的方法对所提取的 RNA 在含有甲醛的凝胶上进行电泳, 检查 RNA 的完整性。

## 1.6 反转录与 PCR 过程

按文献 [8] 介绍的方法优化各步反应条件及最佳试剂浓度, 确定 RT-PCR 工作程序。即反应总体积为 50 $\mu$ L, 其中 20  $\times$  Buffer 2.5 $\mu$ L、2.5 $\mu$ mol/L dNTPs 4 $\mu$ L、20 $\mu$ mol/L 上游引物 (P1) 2 $\mu$ L、20 $\mu$ mol/L 下游引物 (P2) 2 $\mu$ L、25 $\mu$ mol/L MgCl<sub>2</sub> 4 $\mu$ L、RNA 模板 10 $\mu$ L、去离子水 23.5 $\mu$ L。上述试剂混匀后 70℃ 5min, 冰浴后加 RT-PCR 酶混合物 2 $\mu$ L, 混匀, 最后加 50 $\mu$ L 矿物油覆盖。

RT-PCR 反应程序为: 42℃ 90min; 93℃ 2min、55℃ 1.5min、72℃ 2min, 1 个循环; 92.5℃ 1min、55℃ 1min、72℃ 1.5min, 29 个循环; 72℃ 10min。

## 1.7 PCR 产物的检测

取 10 ~ 15 $\mu$ L 扩增产物于 1.2% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 $\mu$ g/mL 溴乙锭) 中 120V 电泳 30 ~ 60min。配胶及电泳缓冲液均为 1  $\times$  TAE (0.04mol/L Tris-乙酸, 0.001mol/L EDTA, pH8.0)。以 100bp DNA Ladder 的分子量为参照物, 在紫外灯下观察 PCR 产物在凝胶中的位置, 判定结果。

## 1.8 样品的采集

淋巴结 15 份、脊髓 5 份、4 个屠宰场组织样品 (肌肉或淋巴结) 各 10 份、疑似感染口蹄疫病毒的患儿粘膜与口水及其吃的奶粉各 1 份, 由广东省兽医防疫检疫站送检; 鲜牛奶 58 份、奶牛鼻粘液 32 份、唾液 1 份, 由深圳市兽医卫生防疫检疫所等单位送检; 疑似感染口蹄疫病毒的患儿口腔棉拭子 2 份, 由中山医科大学附属三院送检; 老

鼠2只、蟑螂4只、病猪痊愈水泡皮1份,由本室采集。

### 1.9 样品的处理

屠宰场采集的组织样品放入灭菌容器,加盖后装入食品保鲜袋中,结扎紧袋口后立即放入冷藏箱中送检。鲜牛奶由兽医卫生防疫检疫所的技术人员对疑似口蹄疫的病牛用一次性消毒注射器采集,而奶牛鼻咽拭子则用灭菌的棉签采集后,均放保鲜袋中加冰贮存送检。在无菌室选取1~2g组织先用PBS缓冲液(0.02mol/L, pH7.2)冲洗干净,剪碎,制成1:5的悬液作为被检材料。

## 2 结果

### 2.1 不同的提取方法对 FMDV RNA 完整性与 RT-PCR 检出率的影响

采取不同方法在阳性样品中提取 FMDV RNA, 然后进行电泳和 RT-PCR, 观察其完整性与检出率。从表1可知, 方法4提取 FMDV RNA 的效果最好, 检出率也最高。

表1 不同的提取方法对 FMDV RNA 完整性与 RT-PCR 检出率的影响

项目	份数	完整	部分完整	降解	RT-PCR 阳性数
方法1	17	10 (58.82%)	3 (17.65%)	4 (23.53%)	14 (82.35%)
方法2	7	4 (57.14%)	1 (14.29%)	2 (28.57%)	5 (71.43%)
方法3	12	6 (50.00%)	2 (16.67%)	4 (33.33%)	8 (66.67%)
方法4	15	11 (73.33%)	4 (26.67%)	0	15 (100%)
方法5	11	1 (9.09%)	4 (36.36%)	6 (54.55%)	5 (45.46%)

### 2.2 不同试剂对 RT-PCR 检出率的影响

在阳性样品中提取 FMDV RNA, 然后用不同厂家的试剂或试剂盒进行 RT-PCR 检测。从表2结果可知, 国产的 RT-PCR 酶混合物试剂盒检测 FMDV RNA 效果最好。

表2 不同试剂对 RT-PCR 检出率的影响

试剂	RT-PCR		
	阳性	可疑	阴性
组装的 RT-PCR 试剂		10	18
MasterAmp™ RT-PCR 试剂盒	3	1	8
RT-PCR 酶混合物试剂盒 (国产)	33	7	12*

注: \* 为最佳反应条件与试剂确定前的结果

表3 RT-PCR 检测送检临床样品的结果

样本	检测数	阳性数	阳性率 (%)
淋巴结	15	2	13.33
脊髓	5	1	20
屠场 I	10	1	10
屠场 II	10	7	70
屠场 III	10	3	30
屠场 IV	10	4	40
病猪痊愈水泡皮	1	1 <sup>a</sup>	100
鲜牛奶	58	24 <sup>b</sup>	41.4
奶粉	1	1	100
牛鼻咽拭子	32	12 <sup>c</sup>	37.5
牛唾液	1	0	0
老鼠	2	2	100
蟑螂	4	0	0
患儿口腔棉拭子	2	2	100
患儿口腔粘膜	1	1	100
患儿口水	1	1 <sup>a</sup>	100

注: a 为弱阳性结果, b 包括 4 份弱阳性结果, c 均为弱阳性结果

### 2.3 RT-PCR 检测临床送检病料

对影响 RT-PCR 检出率的条件和试剂进行筛选后, 应用所建立的 RT-PCR 方法检测临床送检的样品, 结果见表3。

## 3 讨论

目前常规检测 FMD 技术有动物接种、病毒分离和血清学试验等, 这些方法要求采集发病动物的新鲜水泡液或水泡皮为送检材料。如采集不当或长途运输保存不好, 则难以得出可靠结果。且上述方法有的费时长达几天至数周(如动物接种)、有的需细胞培养等条件(如血清中和试验)、有的存在非特异性反应(如荧光抗体试验), 均不能满足口岸动植物检疫部门及基层兽医检疫部门对进出口动物、畜产品(主要是肉、奶等)、痊愈动物带毒及亚临床感染检测的要求。根据 PCR 的原理, 我们运用优化的试剂建

立了检测 FMDV 核酸的 RT-PCR 技术, 该法克服了目前常规方法的某些缺点, 具有良好的特异性, 不与猪病毒性疾病的其它病原如 SVDV、HCV、JEV、PRRSV、PPV、PRV 等出现交叉反应, 阳性样品检出率 100%; 与动物血清中和试验比较, 中和试验需 5~7d, RT-PCR 仅需 8 h。对影响 RT-PCR 检出率的因素进行探讨, 结果表明 RNA 的完整性对 RT-PCR 检出率影响最大, 所提取的 RNA 越完整, 质量越好, 其检出率就高; 反之, 检出率就低。同样 RT-PCR 试剂也极大地影响其检出率, 质量好、性能稳定的试剂, 其检出率就高。

检测送检的鲜牛奶 58 份, 结果鲜牛奶阳性率为 41.4%。从 RT-PCR 阳性样品中随机取 3 份鲜牛奶样品接种 4 日龄乳鼠, 结果乳鼠出现典型口蹄疫症状而死亡。这一结果与当地暴发牛口蹄疫流行情况相吻合。同时也提示在饮用鲜牛奶时要煮沸消毒, 防止增加人感染及散毒的危险。某地暴发牛口蹄疫, 有关兽医防疫检疫部门采集疑似感染口蹄疫病毒的患儿吃的奶粉和口腔粘膜各 1 份送检, 结果均为阳性。由于人的口腔出现水泡病因较复杂, 加上本室没有标准的传染性口膜炎病毒, 而且 RT-PCR 检测的是 FMDV 核酸, 无法判断是死病毒还是活病毒, 故患儿是否感染 FMDV 应加上常规的测毒方法才能下定论。不过从送检奶粉为阳性这一结果来分析, 不论奶粉中含不含活的 FMDV 或是否由此引起患儿感染均提示在以后的防制工作中要严防奶粉带毒散毒, 这无疑会增加今后防制 FMD 的难度。检测送检的奶粉 (1 份)、老鼠 (2 份)、患儿口腔棉拭子 (4 份), 阳性率均为 100%, 这可能与此地疫区或取样有关, 实际并无如此高的阳性率。但老鼠带毒情况提示在以后防制 FMD 过程中要加强防鼠灭鼠工作。

从上述结果分析, 所建立的 RT-PCR 技术检测动物组织样品、鲜奶及痊愈动物的水疱皮具有常规方法不可替代的优势, 是检测动物组织样品中 FMDV 核酸的一种既简便快速又准确可靠的好方法。

### 参 考 文 献

- [1] 姜高明, 郭万柱, 徐兰芳. 集约化养猪技术与疾病防治. 长春: 吉林科学技术出版社, 1998. 435~438.
- [2] 柳纪省. 中国兽医科技, 1999, 29 (3): 17~22.
- [3] 殷震, 刘景华. 动物病毒学 (第 2 版). 北京: 科学出版社, 1997. 479~499.
- [4] Loar O, Torgersen H, Yadin H, *et al.* J Virol Meth, 1992, 36: 197~208.
- [5] Meyer R F, Brown C C, House C, *et al.* J Virol Meth, 1991, 34: 161~172.
- [6] Amaral-Doel C M F, Owen N E, Ferris N P, *et al.* Vaccine, 1993, 11: 415~421.
- [7] Carroll A R, Rowlands D J, Clarke B E. Nucleic Acids Res, 1984, 12: 2461~2472.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2<sup>nd</sup> ed. Cold spring Harbor Laboratory Press, 1989.