

多重 PCR 检测 PRV、PPV、PCV 方法的建立及其应用

姜 焱¹ 周 斌² 张常印¹

(江苏出入境检验检疫局 南京 210001)¹ (南京农业大学动物医学院 南京 210095)²

摘要: 根据 GenBank 上已发表的猪伪狂犬病病毒 (PRV) 的 gE、gI 基因序列、猪细小病毒 (PPV) 的 E 蛋白的基因序列、II 型猪圆环病毒 (PCV-2) 的 ORF2 基因序列, 分别设计并合成 3 对能特异性扩增 PRV、PPV、PCV-2 的引物, 通过 DNASTar 软件分析这 3 对引物不存在 cross dimer。建立了 PCR 方法分别检测 PRV、PPV、PCV-2, 然后通过条件的优化, 建立了 PCR 同时检测 PRV、PPV、PCV-2 的方法并研制出试剂盒。对试剂盒的特异性和有效期进行了研究。结果表明, 该试剂盒具有很好的特异性, 有效期在 -20℃ 至少可以保存 1 年。

关键词: PRV、PPV、PCV-2、PCR、特异性、敏感性

中图分类号: S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 06-0110-06

伪狂犬病 (Pseudorabies, PR) 是由伪狂犬病病毒 (Pseudorabies Virus, PRV) 引起的多种家畜和野生动物共患的传染病, 除马和灵长目动物外的多数哺乳动物易感, 死亡率接近 100%, 猪是 PRV 自然贮主^[1]。由于伪狂犬病病毒也能对人造成感染, 故此该病毒的进出境检测显得尤为重要。猪细小病毒 (PPV) 是 Mary 和 Mahnel 于 1966 年进行猪瘟病毒组织培养时发现的。此后, 相继从欧洲、美洲、亚洲的很多国家分离到病毒或查出抗体, 它在猪群中检出率很高。我国已经从多数省区分离到 PPV, 血清学调查阳性率达到 80%。病毒能够通过胎盘传染给胎儿, 形成垂直传播。PPV 常呈潜伏状态存在, 近年来的研究发现, 该病毒往往与其他病原协同作用引起疾病, 加重其他繁殖障碍性疾病或有持续感染特征的传染病的损失。猪圆环病毒 (porcine circovirus, PCV) 属圆环病毒科圆环病毒属成员^[2]。

PCV 分两种血清型, 即 PCV-1 和 PCV-2, 其中 PCV-1 由 Tischer 等^[3]于 1974 年检测到, 对猪没有致病性; PCV-2 可引起部分断奶仔猪和育肥猪的断奶仔猪多系统综合征 (postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)^[4]。目前, 该病呈世界分布, 给养猪业造成巨大的经济损失。

本研究利用现有的计算机软件对已知病毒序列进行了分析, 确定出扩增病毒基因组中的靶序列, 设计并合成了扩增 PRV、PPV、PCV-2 的引物, 在确定各单项 PCR 的最佳条件范围、敏感性、特异性的基础上, 建立了多联 PCR 检测 PPV、PRV、PCV-2, 并将其研制成试剂盒, 检测临床疑似病料, 结果表明能特异、敏感地从病料中检出 PRV、PPV、PCV-2, 该试剂盒使用方便、快速、敏感、特异, 符合国内的养殖场及进出口的需要。

* 通讯作者 Tel: 025-52345235, E-mail: jiangyan1029@yahoo.com.cn

收稿日期: 2005-01-13, 修回日期: 2005-03-21

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒和细胞: PK-15 细胞 (无 PCV-1 污染), PCV-2 标准毒、猪伪狂犬病病毒 (PRV)、猪细小病毒 (PPV)、由南京农业大学传染病组赠送。

1.1.2 试剂: PCR 试剂、蛋白酶 K 购自大连 Takara 公司; 胰蛋白酶、MEM 购自 Gibco 公司, 其它化学试剂购于南京生兴生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计和合成: 根据 PRV、PPV、PCV-2 的基因序列, 利用 Primer 程序设计 3 对引物, 由上海博亚公司合成。引物序列如下:

PRV. S: 5'-CGGGACCCTGGACGCGAACG-3';

PRV. AS: 5'-CGGTCTGTCGCCGTTGAGGTCGC-3'。

PPV. S: 5'-ACC TAT CAT CCA TCA GAA ACC-3';

PPV. AS: 5'-TTG TTG AGG AGA GTC AGC ATT-3'。

PCV-2. S: 5'-CACGGATATTGTAGTCCTGGT-3';

PCV-2. AS: 5'-CCGCACCTTCGGATATACTGTC-3'。

1.2.2 病毒培养: 长成单层的 PK-15 细胞用 0.5 g/L 胰酶消化分瓶, 分别接种 PCV-2、PPV、PRV。接种 PCV-2 的 PK-15, 24 h 后用 300mmol/L D-氨基葡萄糖处理 30 min, 洗涤后换上新鲜培养液继续培养 48 h, 传代 2 次后收获 PK-15 细胞; 接种 PRV、PPV 的 PK-15 细胞瓶待细胞出现 CPE 时收获病毒, -20℃ 保存备用。

1.2.3 病毒 DNA 模板的制备: 取 500μL PK-15 细胞悬浮液或病毒液, 按参考文献 [3] 提取病毒基因组, 将提取物溶解于 30μL 超纯水, 取 10μL 用作 PCR 模板。

1.2.4 单项 PCR 扩增 PCV-2、PPV、PRV: 将上述提取的病毒 DNA 分别用各自的引物进行 PCR 扩增。50μL 反应体系中 10 × buffer 5μL, MgCl₂ (25mmol/L) 3μL, dNTP (2.5mmol/L) 4μL, 引物 1μL, Taq 酶 (5U/μL) 0.5μL, 模板 10μL, 加超纯水至 50μL。PCV-2 和 PPV 的 PCR 反应过程: 95℃ 5min; 94℃ 1min, 51℃ 1min, 72℃ 1min, 30 个循环; 72℃ 10min; 4℃ 保存。PRV 的 PCR 反应过程: 95℃ 10min; 94℃ 1min, 65℃ 1min, 72℃ 1min, 30 个循环; 72℃ 10min; 4℃ 保存。

1.2.5 多联 PCR 反应条件的确定: (1) 引物浓度: 将引物浓度选择在 3.2、1.6、0.8、0.4、0.2、0.1μmol/L, 与 4 个不同稀释度病毒模板进行方阵滴定。(2) Taq DNA 聚合酶浓度: 以终浓度为 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05U/μL 的 Taq DNA 聚合酶分别与 4 个不同稀释度病毒 DNA 模板进行方阵滴定。(3) dNTP 浓度: 以终浓度为 50、100、200、300、400μmol/L 的 dNTP 分别与 4 个不同稀释度病毒 DNA 模板进行方阵滴定。(4) MgCl₂ 浓度: 以终浓度为 50、100、150、200、250、300μmol/L 的 MgCl₂ 与 4 个不同稀释度病毒 DNA 模板进行方阵滴定。Taq DNA 聚合酶浓度以上述 (2) 确定的浓度加入。(5) 反应程序的确定: 对 PCR 反应的循环数 10、20、30 以及退火温度 52℃、53℃、54℃、55℃、63℃、64℃、65℃ 进行多次方阵试验。

1.2.6 同时检测 PCV-2、PPV、PRV 试剂盒的研制: 试剂盒包括试剂 A、试剂 B, 阴性

和阳性对照。试剂 A 包括 $10 \times$ buffer, $MgCl_2$, dNTP, 引物, 超纯水; 试剂 B 为 Taq 酶, 阳性对照为 PCV-2、PPV、PRV 的 PCR 产物, 阴性对照为非 PCV-2、PPV、PRV 的 DNA 片段。试剂盒使用时, 每份样品的 $50 \mu L$ 反应体系取试剂 A $39.5 \mu L$, 试剂 B $0.5 \mu L$, 检测模板 $10 \mu L$ 。然后进行 PCR 反应即可。

1.2.7 PCV-2、PPV、PRV 检测试剂盒特异性、稳定性的研究: 按参考文献 [2] 提取 PPV、PRV、PCV-2 的 DNA, 并以此为模板, 用试剂盒进行 PCR 扩增, 并将 PPV、PRV、PCV-2 的 PCR 产物测序, 对该试剂盒的特异性进行检测。

试剂盒保存于 $-20^\circ C$, 对经过反复冻融、保存时间进行了研究。

1.2.8 PCV-2、PPV、PRV 检测试剂盒的应用: 将疑似病料 (肝、肺、脾、肾等) 研磨 (与 PBS 1: 5) 后, 冻融 3 次, $10,000 r/min$ 离心 10min, 取上清 $-20^\circ C$ 保存备用。按参考文献 [2] 提取病料中 DNA 作模板。用该试剂盒对来自福建、上海、江苏、浙江、安徽、山东等地的养殖场的疑似病料进行检测。

2 结果

2.1 单项 PCR 扩增结果

单项 PCR 扩增后, 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 见图 1。PRV 扩增出一条 650bp 和 200bp 的条带。PCV 扩增一条 500bp 的条带, PPV 扩增一条 900bp 的条带。大小与预期相符。

2.2 二联 PCR 扩增结果

在单项 PCR 扩增的基础上, 将 PRV、PPV、PCV-2 之间两两组合, 建立了二联 PCR 检测方法 (见图 2)。

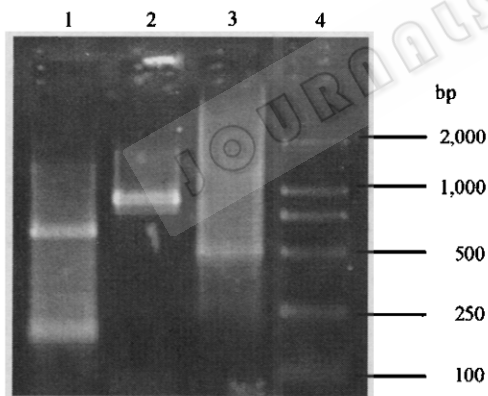


图 1 单项 PCR 扩增结果

1 PRV 扩增结果, 2 PPV 扩增结果, 3 PCV-2 扩增结果, 4 标准分子量 DL-2000

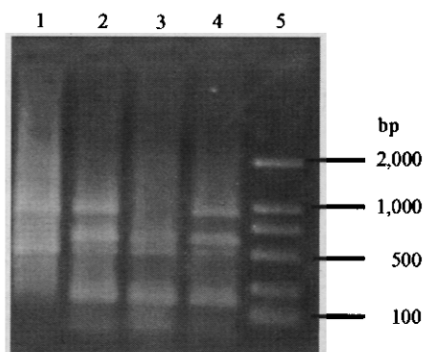


图 2 二联 PCR 扩增结果

1 PPV + PCV-2, 2 PPV + PRV, 3 PRV + PCV-2, 4 PPV + PRV + PCV-2, 5 标准分子量 DL-2000

2.3 多联 PCR 反应条件的确定

引物可调节的终浓度范围见表 1。PPV $0.1 \sim 3.2 \mu mol/L$, PRV $0.2 \sim 3.2 \mu mol/L$, PCV-2 $0.1 \sim 3.2 \mu mol/L$ 。PPV、PRV、PCV-2 PCR 的 Taq DNA 聚合酶可用范围均为 $0.02 \sim 0.05 U/\mu L$ 。dNTP 可调节的终浓度范围见表 2。PPV、PRV、PCV-2 均为 $50 \sim 300 \mu mol/L$ 。 $MgCl_2$ 可调节的终浓度范围见表 3。PPV $150 \sim 250 \mu mol/L$ 、PRV $100 \sim 250 \mu mol/L$ 、PCV-2 $100 \sim 250 \mu mol/L$ 。

表 1 引物浓度滴定结果

病毒	引物浓度 (μmol/L)					
	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2
PPV	+	+	+	+	+	+
PRV	-	+	+	+	+	+
PCV-2	+	+	+	+	+	+

表 2 dNTP 浓度滴定结果

	dNTP 浓度 (μmol/L)				
	50	100	200	300	400
PPV	+	+	+	+	-
PRV	+	+	+	+	-
PCV-2	+	+	+	+	-

表 3 Mg²⁺ 浓度滴定结果

	Mg ²⁺ 浓度 (μmol/L)					
	50	100	150	200	250	300
PPV	-	-	+	+	+	-
PRV	-	+	+	+	+	-
PCV-2	-	+	+	+	+	-

2.4 反应程序的确定

在优化条件的同时, 对反应程序进行了多次的研究, 最终确定反应程序为: 95℃ 5min; 94℃ 1min, 55℃ 1min, 72℃ 1min, 10 个循环; 94℃ 1min, 65℃ 1min, 72℃ 1min, 30 个循环; 72℃ 10min; 4℃ 保存。

2.5 试剂盒特异性和稳定性鉴定

对试剂盒的特异性和稳定性进行了研究, 结果表明该试剂盒具有较好的特异性 (图 3)。将试剂 A 和试剂 B 保存于-20℃。经过一年的保存和反复冻融后, 对 PPV、PRV、PCV-2 模板进行检测, 结果表明, 该试剂盒的稳定性较好, 见图 4。

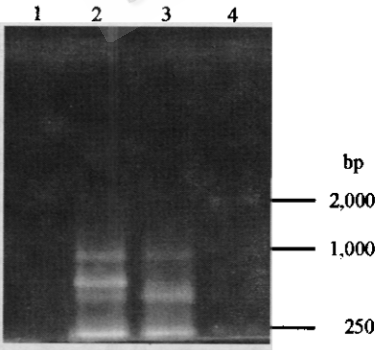


图 3 试剂盒的特异性

1 空白对照, 2 PPV + PRV + PCV-2, 3 PPV + PRV, 4 标准分子量 DL-2000

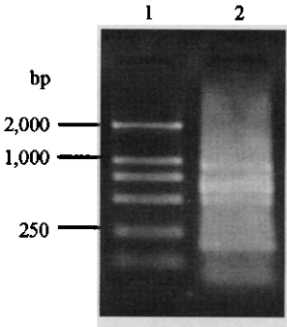


图 4 试剂盒的稳定性

1 标准分子量 DL-2000, 2 PPV + PRV + PCV-2

2.6 PPV、PRV、PCV-2 检测试剂盒的应用

用该试剂盒对来自福建、上海、江苏、浙江、安徽、山东等地的养殖场的疑似病料 (表 4) 进行检测, 部分电泳结果见图 5。将检出阳性结果的病料进行病毒分离, 结

果与 PCR 结果符合率达 100%，同时将部分 PCR 产物回收进行测序，并将测序结果与 GenBank 中已发表的基因序列分别进行比较，与 PPV、PRV、PCV-2 的同源性达 96% ~ 99%，与 PCR 反应的结果是一致的，这表明该试剂盒的特异性较好。

表 4 病料试剂盒检测结果

病料来源	病料数 (例)	PPV + PCV	PPV + PRV	PRV + PCV	PRV + PCV + PPV
		阳性病料数 (例)	阳性病料数 (例)	阳性病料数 (例)	阳性病料数 (例)
福建 (Fujian)	45	2	1	2	2
上海 (Shanghai)	30	1	3	2	1
江苏 (Jiangsu)	23	2	4	3	3
浙江 (Zhejiang)	41	5	2	3	3
山东 (Shandong)	39	4	1	2	2
合计 (Total)	178	14	11	12	11

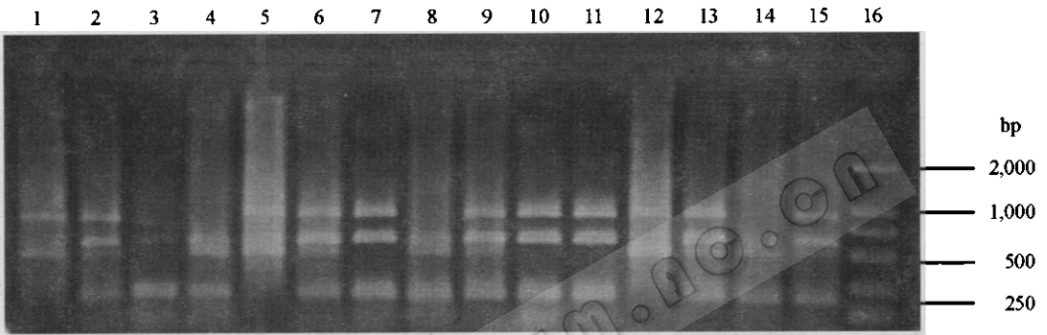


图 5 试剂盒检测部分临床疑似病料

1 ~ 15 疑似病料检测结果, 16 标准分子量 DL - 2000

3 讨论

通常情况下, 病毒病的确诊均需进行病毒分离。但病毒分离需要盲传 3 代以上, PCV 在细胞上不产生细胞病变, 且需将 PCV 盲传多代才能使病毒有效增殖, 因此病毒分离费力、耗时, 不适于这些病的快速诊断。目前, PPV、PRV、PCV-2 在国内的大多数养猪场经常暴发, 为了减少经济损失, 在发病初期就需要确诊, 所以建立快速、敏感、特异的检测方法是急需解决的问题。国外已有多种市售诊断试剂盒, 如 ELISA、间接免疫荧光试验 (IFA) 等, 但其非特异性较高, 且价格昂贵。用 PCR 分别检测这 3 种病的方法也有报道, 但将这些方法研制成试剂盒来同时诊断 PPV、PRV、PCV-2, 至今未见报道。

在多联 PCR 引物设计时, 引物的长度、G + C 含量、 T_m 值应尽量一致; 各扩增片段的大小要适宜, 既要避免电泳不能分辨, 又不能相差过大。片段大小相差太大, 电泳时就不能在同一个电泳胶进行鉴定。另外, 多联 PCR 扩增体系中, 引物之间不应存在具有稳定结构二聚体, 3' 端不能互补, 各引物与其他扩增片段和模板不存在较大互补性, 扩增片段之间也没有较大同源性。在设计引物时, 充分考虑了上述因素, 为多联 PCR 成功奠定了基础。

从本试验 PCR 反应条件筛选可以看出, $MgCl_2$ 浓度的增加能提高 PCR 产量; dNTP 浓度太大, 如达到 400 时, 能抑制 PCR 扩增; Taq DNA 聚合酶量一般大 0.02 时, 即能

达到扩增特异性病毒条带的目的;引物在 PCR 扩增起重要作用,由于 PPV、PRV、PCV-2 为 DNA 病毒,所以引物浓度最佳范围比较大。在 PRV 扩增时,出现了 1 条约 200bp 扩增带,经分析认为是 PRV 的副带,这可能与 PRV 3' 端引物下游存在一段与该引物互补重复序列有关,加之 PRV 引物 G + C 含量比较高,在退火温度相对不高而引物浓度高或模板高时,易出现这条 PRV 病毒带。

本研究研制的试剂盒具有快速、简便、灵敏度高、特异性强、稳定性好等优点。比一般 PCR 方法可最大限度减少取样错误和交叉污染,如大批量检测,按常规 PCR 加样,工作量大,且人为出错几率大。该试剂盒的推出,可以大大减低了劳动强度和出错几率。该试剂盒内的试剂在 -20℃ 条件下可以长期保存,即使多次冻融,也不会影响活性。

参考文献

- [1] 贾幼陵,于康震,马洪超,等译.国际动物卫生法典.北京:中国农业科学技术出版社,2002.
 - [2] 殷震,刘景华.动物病毒学(第二版).北京:科学出版社,1997.
 - [3] Tischer I, Rasch R, Tochtermann G. Zentralbl Bakteriell, 1974, 226: 153 ~ 167.
 - [4] Allan G M, McNeilly F, Kennedy S. J Vet Diagn Invest, 1999, 11: 111 ~ 116.
- © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>