

鉴别伪狂犬病病毒野毒与疫苗毒荧光定量 PCR 方法的建立

赵丽^{1,2}, 崔保安¹, 陈红英¹, 魏战勇¹, 郑兰兰¹, 吕晓丽¹, 贾艳艳¹, 赵绪永²

1 河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002

2 郑州牧业工程高等专科学校, 郑州 450011

摘要: 根据猪伪狂犬病病毒(PRV) *gH*、*gE* 基因的序列, 设计了两对引物及其对应的 TaqMan 探针, 通过对引物、探针、 Mg^{2+} 的浓度和样品 DNA 提取方法等进行优化, 建立了鉴别 PRV 野毒与疫苗毒感染的荧光定量 PCR 方法。该方法线性范围为 $10^1 \sim 10^8$ 拷贝/ μL , 达 8 个数量级, 灵敏度可达 10^1 拷贝/ μL , 比常规 PCR 高 100 倍。用此方法对 60 份疑似组织样品进行检测, 并与血清中和试验、常规 PCR 相比较, 结果显示该方法具有快速、灵敏、特异、重复性好和能对样品进行定量检测等优点, 并且该法以闭管的模式操作, 减少了后续步骤污染的可能性, 整个 PCR 检测过程不到 2 h。此方法的建立, 为猪伪狂犬病病毒的早期鉴别诊断和定量分析猪伪狂犬病病毒感染程度奠定了基础。

关键词: 伪狂犬病病毒, 荧光定量 PCR, 鉴别诊断, 野毒与疫苗毒, 检测

Diagnosis Establishment of Fluorescent Quantitative PCR Assay for Pseudorabies Wild-type Virus and Vaccine Virus

Li Zhao^{1,2}, Baoan Cui¹, Hongying Chen¹, Zhanyong Wei¹, Lanlan Zheng¹, Xiaoli Lü¹, Yanyan Jia¹, and Xuyong Zhao²

1 College of Animal Husbandry And Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2 College of Zhengzhou Animal Husbandry Engineering, Zhengzhou 450011, China

Abstract: We designed two pairs of primers and their corresponding TaqMan probes according to *gH*, *gE* gene of PRV. By optimizing the probe's concentration, Mg^{2+} concentration, primers concentration and sample DNA extraction, real-time fluorescent quantitative PCR (FQ-PCR) which can quickly identify field virus and vaccine virus of PRV was established. According to our results, the dynamic range of the FQ-PCR assay is between 10×10^1 copies/ μL and 10×10^8 copies/ μL , and the detection limit of FQ-PCR is 1.0×10^1 copies/ μL , which is 100 fold higher than that of conventional PCR. We detected 60 doubtful tissue samples using the FQ-PCR assay, serum neutralization and conventional PCR. In conclusion, the FQ-PCR method is rapid, sensitive, specific and accurate, and can be used to detect field strains of PRV rapidly. The closed-tube format of the assay minimized the risk of contamination of subsequent reaction and the assay can be performed in 2 h or less. Development of real-time quantitative PCR provides the basis for the early and rapid detection and analyzing quantitatively the infectious degree of PRV.

Keywords: pseudorabies virus(PRV), fluorescent quantitative PCR, field virus and vaccine virus, detection

Received: October 30, 2007; **Accepted:** January 16, 2008

Supported by: the Outstanding Person Innovation Fund of Henan, China (No. 0621002100).

Corresponding author: Baoan Cui. Tel: +86-371-63558878; Fax: +86-371-63558878; E-mail: baoancui@henau.edu.cn

河南省杰出人才创新基金项目(No. 0621002100)资助。

伪狂犬病病毒(Pseudorabies virus, PRV)是多种家畜和野生动物均可感染的一种疱疹病毒。猪是该病毒的贮存宿主和传染源,常引起母猪出现繁殖障碍及初生仔猪大批死亡;成年猪则系隐性感染,长期带毒排毒,严重影响种猪场生产及优良品种的推广,给养猪业造成极大的损失^[1]。控制和消灭伪狂犬病所面临的主要困难是确定伪狂犬病病毒的潜伏感染、野毒感染或疫苗感染,在初次感染康复后往往会建立病毒的潜伏状态,当在机体受到内外因素刺激时,病毒被活化并持续排毒^[2-5],引起疾病的发生和传播。疫苗免疫接种和疾病的早期鉴别诊断是有效防制和根除伪狂犬病的根本措施。传统的病毒分离、ELISA和PCR等检测技术的建立和应用,在猪伪狂犬病的防制中发挥了重要作用,但这些方法各有其不足,诸如耗时长、不能检出潜伏感染和不能对病毒进行定量检测等。因此,有必要建立一种快速、早期并能同时确定是疫苗株感染还是野毒株感染的诊断方法。实时荧光定量PCR(Real-time fluorescent quantitative PCR, FQ-PCR)将普通PCR技术与荧光检测相结合,不仅具有敏感性高、特异性强、重复性好等优点;而且通过分析软件对数据进行分析整理,结果更为准确直观;整个检测过程只打开一次试管,有效地减少了假阳性发生的机会,已成为病原体检测的重要方法^[6-9]。

*gH*基因是伪狂犬病病毒中较保守和病毒复制所必需的基因;*gE*基因是伪狂犬病病毒的毒力基因也是世界动物卫生组织所规定基因缺失疫苗的缺失基因。以*gH*、*gE*基因序列作为靶序列建立的PCR技术,能够区分基因缺失疫苗接种与野毒感染^[10]。因此本研究根据猪伪狂犬病病毒*gH*、*gE*基因序列设计两对引物和两条TaqMan探针,建立了鉴别猪伪狂犬病毒野毒与疫苗毒的荧光定量PCR方法。

1 材料与方 法

1.1 毒株与菌种

PRV 闽 A 株购自中国兽药监察所、Bartha(*gE*⁻)株和 Norden(*Tk*)株、猪圆环病毒(PCV)、猪细小病毒(PPV)均为河南省动物性食品安全重点实验室保存之毒种;PRV *gE*基因缺失疫苗购自武汉科前生物制品有限公司。工程菌 JM109 感受态细胞为宝生物工程(大连)有限公司产品。

1.2 主要试剂和仪器

Taq DNA 聚合酶、DL2000 marker 和大肠杆菌(*Escherichia coli* JM109)感受态细胞等购自大连宝生物工程(大连)有限公司;PRV 标准抗原和标准阳性血清购自武汉科前生物制品有限公司。异硫氰酸胍(GuSCN)、重蒸饱和酚、酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)、氯仿:异戊醇(24:1)等均购自宝生物工程(大连)有限公司;质粒 DNA 小量快速制备试剂盒:V-gene 公司;Rotor-Gene 2000 型实时定量 PCR 扩增仪为美国 Corbett Research 公司生产。

1.3 引物的设计与合成

从 GenBank 中下载全部伪狂犬的 *gH* 和 *gE* 基因序列,利用 DNASTAR(version5.0)软件进行同源性分析找出 *gH*、*gE* 序列的保守区;根据 Primer Express 分别设计出扩增 *gH* 基因 190 bp 和 *gE* 基因 139 bp 的 2 对特异引物和 1 对探针:

gH(PR1)-P1 引物(5'-3'): CTC GTT ATG CTC
AGT CA

gH(PR1)-P2 引物(5'-3'): ACT GCT CCT CCA
TGT CTA

探针(probe1)(5'-3'): ROX-ATC GTG TTA GTG
CGA TAC TCAT-Eclipse

gE(PR2)-P3 引物(5'-3'): ACG ATC GGC GAC
CAT

gE(PR2)-P4 引物(5'-3'): GCA CGT GCA GCG
TGT AGAC

探针(probe2) (5'-3'): FAM-CAC TGC GTG TTC
TCC CGC TAC-Eclipse

探针(probe 1)5'端标记报告荧光染料为 ROX, 3'端标记淬灭荧光染料为 Eclipse;探针(probe 2)5'端标记报告荧光染料为 FAM, 3'端标记淬灭荧光染料为 Eclipse。引物及探针由大连宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.4 伪狂犬病毒 *gH*、*gE* 基因常规 PCR(Con-PCR) 扩增

采用异硫氰酸胍一步裂解法提取病毒 DNA^[11]。*gH* 和 *gE* 基因按常规 PCR 反应进行 PCR 扩增。同时设立无模板的阴性对照。反应结束后,分别取 5 μ L *gH*、*gE* 基因 PCR 产物用 3%琼脂糖凝胶(含 0.5 μ g/mL EB)进行电泳检测 PCR 结果。

1.5 标准阳性模板的构建

将回收纯化的 PRV *gH*、*gE* 基因的 PCR 产物分别与 pGEM-T Easy 载体连接,转化 *E. coli* JM109,用质粒提取试剂盒提取重组质粒,对重组质粒进行

PCR 鉴定。将鉴定正确的阳性重组质粒送宝生物工程(大连)有限公司进行序列测定。

用紫外分光光度计分别测定阳性重组质粒在 260 nm 和 280 nm 处的吸光度, 并根据公式计算出重组质粒的 DNA 浓度与纯度。将重组质粒进行 10 倍梯度稀释, 以 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 倍稀释作为标准品模板, 用于荧光定量 PCR 反应条件的优化、标准曲线的建立。

$$\text{分子拷贝数(个/mL)} = \text{DNA 质量浓度} / \text{DNA 分子量} \\ \text{DNA 分子量} = \text{DNA 碱基数} \times 324.5$$

$$\text{DNA 质量浓度} = A_{260} \times 50 \mu\text{g/mL} \times \text{稀释倍数} \times 6.02 \times 10^{23}$$

1.6 荧光定量 PCR 反应条件的优化

本实验的 PCR 程序以 Rotor-Gene 2000 为基础建立的, *gH* 和 *gE* 基因荧光定量 PCR 反应体系均为 25 μL , 优化一项时其他参数不变。PCR 体系优化如表 1 所示。

1.7 *gH*-Taqman、*gE*-Taqman 荧光定量 PCR 反应标准曲线的建立

利用上述优化的反应条件, 分别以经梯度浓度稀释的 *gH*、*gE* 基因质粒为模板进行荧光定量 PCR

扩增, 并利用随机软件进行分析, 分别选取 *gH*、*gE* 基因各因素最佳浓度建立标准曲线。

2 结果

2.1 PRV *gH*、*gE* 基因 PCR 扩增、克隆与侧序

取 PCR 产物 5 μL 于 3% 琼脂糖上电泳, 结果表明扩增产物分别为 190 bp 和 140 bp 左右的 DNA 片段, 与预计的片段大小相一致(图 1、2)。PCR 产物经纯化后, 与 pGEM-T Easy 载体连接并转化 JM109 感受态细胞。提取质粒, 进行 PCR 鉴定。将 PCR 鉴定正确的重组质粒送宝生物工程(大连)有限公司进行序列测定, 测定结果与下载的基因序列完全一致(序列略)。

2.2 实时荧光 PCR 体系优化

通过对 PCR 体系的优化, 25 μL 反应体系中在以下条件时 *gH*、*gE* 基因扩增效率最高。

2.3 标准曲线的建立

按上述优化的反应条件, 分别取 *gH*、*gE* 基因重组质粒 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 等 5 个梯度稀释的质粒作为模板, 分别加入到 PCR 反应体系中进行扩增(图 3~6)。

表 1 Taqman-PCR 体系优化方案
Table 1 Optimizing program of Taqman-PCR

PCR type	Mg ²⁺ concentration optimization (mmol/L)	Primers concentration optimization (mmol/L)	Probe concentration optimization (mmol/L)	Renaturation T _m optimization (°C)
<i>gH</i> Taqman-PCR	3, 4, 5, 6, 7, 8	0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9	0.06, 0.07, 0.08, 0.09	58, 60, 62, 64
<i>gE</i> Taqman-PCR	3, 4, 5, 6, 7, 8	0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9	0.06, 0.07, 0.08, 0.09	58, 60, 62, 64

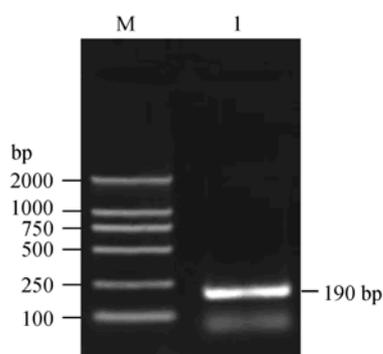


图 1 PRV *gH* 基因 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR result of PRV *gH*

M: DL 2000 marker; 1: PCR products of PRV *gH* gene

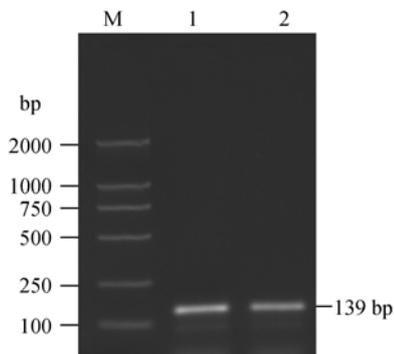


图 2 PRV *gE* 基因 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR result of PRV *gE*

M: DL 2000 marker; 1, 2: PCR products of PRV *gE* gene

表 2 Taqman-PCR 体系优化结果
Table 2 Optimizing result of Taqman-PCR

PCR type	Mg ⁺⁺ concentration optimization (mmol/L)	Primers concentration optimization (mmol/L)	Probe concentration optimization (mmol/L)	Renaturation T _m optimization (°C)
<i>gH</i> Taqman-PCR	5	0.6	0.08	60
<i>gE</i> Taqman-PCR	5	0.6	0.08	60

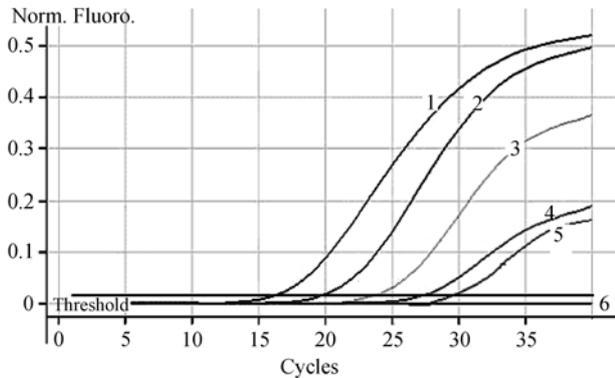


图 3 荧光定量 PCR 对 10 倍梯度稀释 *gH* 质粒的检测结果

Fig. 3 Detection results of the *gH* plasmid with 10 fold serial dilutions by the real-time PCR assay

The plasmid concentrations of curve 1, 2, 3, 4 and 5 were 3.98×10^9 , 3.98×10^8 , 3.98×10^7 , 3.98×10^6 and 3.98×10^5 copies/25 μ L, respectively. Curve 6 was the negative control

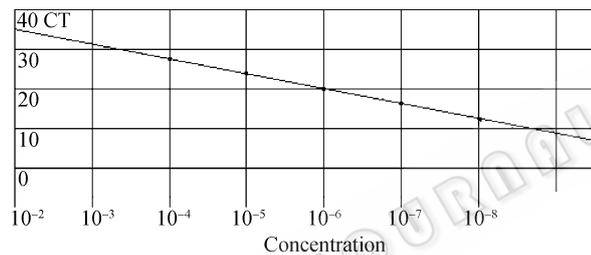


图 4 *gH* 基因标准曲线

Fig. 4 The standard curve of *gH* gene

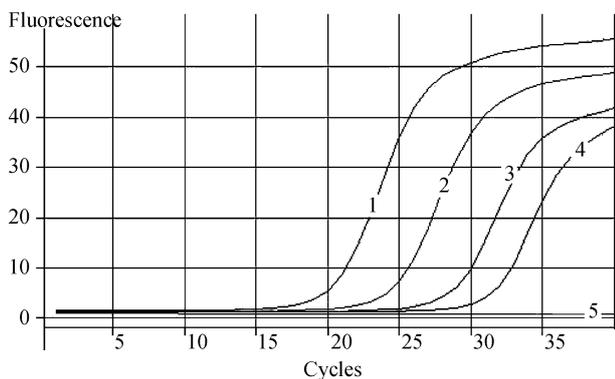


图 5 荧光定量 PCR 法对 10 倍梯度稀释 *gE* 质粒的检测结果

Fig. 5 Detection results of the *gE* plasmid with 10 fold serial dilutions by the real-time PCR assay

The plasmid concentrations of curve 1, 2, 3, 4 were 3.54×10^8 , 3.54×10^7 , 3.54×10^6 , 3.54×10^5 copies/25 μ L, respectively. Curve 5 was the negative control

2.4 实时荧光 PCR 扩增的可重复性

为验证荧光 PCR 检测结果的可重复性, 选取 PRV *gH* 基因 107 稀释的质粒样本, 以 25 μ L 体系连续扩增 4 次(如图 7), 结果表明每次之间的误差不到 1 个循环(见表 3), 可见荧光 PCR 检测方法具有较高的可重复性, 从而保证了不同样品间检测结果的可靠性和稳定性。

2.5 实时荧光 PCR 扩增的特异性

对 Fa 毒株、Fa 感染兔的各种组织样品(脑、肝、脾、淋巴结等)及 PK15 阴性细胞、疫苗毒、双蒸水和 PCV、PPV 进行荧光 PCR 检测, 结果显示 *gH* Taqman-PCR 对 Fa 毒株、Bartha(*gE*⁻)株、*gE*-疫苗毒均有荧光上升, 而对 PK15 细胞、PPV、PCV、水均无荧光产生; 而 *gE* Taqman-PCR 只对 Fa 毒株、Norden(*Tk*)有荧光上升, 对 Bartha(*gE*⁻)株、*gE*-疫苗毒、PK15 细胞、PPV、PCV、水均无荧光产生(图 8, 9)。可见, 用于检测的引物 P1/P2 和 P3/P4 具有高度的特异性, 能用于区分有毒力的 PRV 野毒株和疫苗株。

2.6 实时荧光 PCR 扩增的敏感性

以 10 倍梯度稀释的 *gH* 标准质粒($3.98 \times 10^0 \sim 3.98 \times 10^{11}$ 拷贝/ μ L)和 *gE* 标准质粒($3.54 \times 10^0 \sim 3.54 \times 10^{11}$ 拷贝/ μ L)作为模板, 分别加入到含有引物 PR1/PR2 探针的反应体系中, 在退火温度 60°C 下扩增。其检测到的稀释限点为 3.98 拷贝和 3.54 拷贝。将上述稀释样品进行 PCR 扩增, 扩增产物作琼脂糖凝胶电泳观察, 其可观察到的稀释限点为 3.98×10^2 和 3.54×10^2 拷贝。结果表明实时荧光 PCR 直接观察的灵敏度较普通 PCR 高 100 倍。

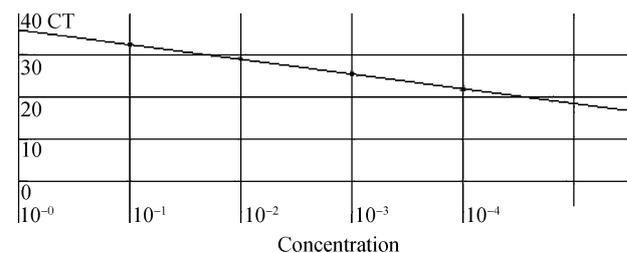


图 6 *gE* 基因标准曲线

Fig. 6 Standard curve of *gE* gene

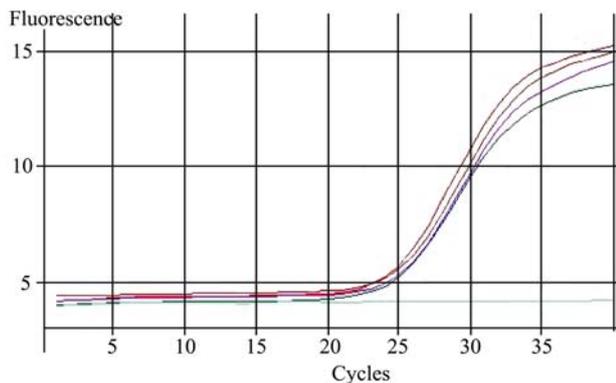


图 7 *gH* Taqman-PCR 重复性试验
Fig. 7 Reproducibility experiment of *gH* Taqman-PCR

表 3 *gH* Taqman-PCR 重复试验 Ct 值
Table 3 Ct value of reproducibility experiment of *gH* Taqman-PCR

No.	Colour	Name	Type	Given conc. (Copies)	Calculated conc. (Copies)	CV	Ct	Ct Std. Dev.
1	■	1	Sample				23.78	
2	■	2	Sample				23.84	
3	■	3	Sample				23.73	
4	■	4	Sample				23.90	
5	■	NTC	NTC					

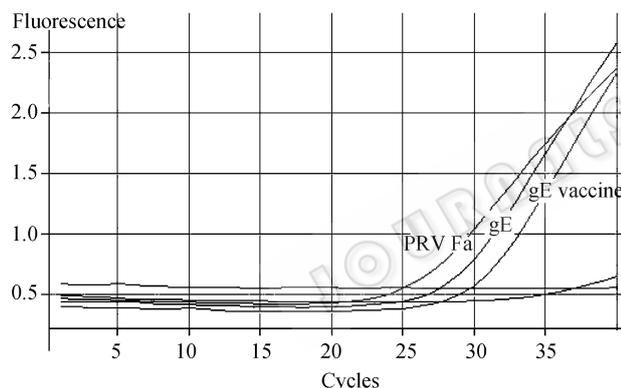


图 8 *gH* Taqman-PCR 特异性扩增
Fig. 8 Specificity amplification of *gH* Taqman-PCR

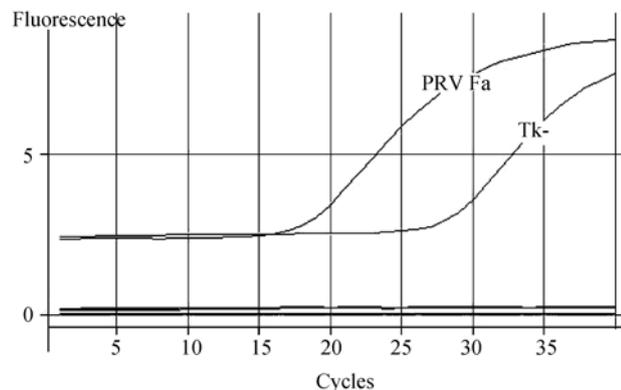


图 9 *gE* Taqman-PCR 特异性扩增
Fig. 9 Specificity amplification of *gE* Taqman-PCR

2.7 对组织样品的检测

用优化后的 *gH* Taqman-PCR、*gE* Taqman-PCR 检测来自河南、河北、山东等地不同地区的 60 份疑似组织冰冻样品, 同时用普通 PCR 和血清中和试验作对照。其中 10 份 *gH* Taqman-PCR 检测阳性; 5 份 *gH* Taqman-PCR、*gE* Taqman-PCR 检测皆为阳性; 普通 PCR 检测其中 7 份 *gH* 阳性、3 份 *gH*、*gE* 皆阳性; 血清中和实验检测结果阳性为 6 份, 血清中和检测阳性样品经 Taqman-PCR 检测均为阳性, 而且 *gH* Taqman-PCR、*gE*-Taqman PCR 检测为阴性的样品通过结合血清中和实验检测结果同样为阴性。

3 讨论

猪伪狂犬病目前仍是威胁我国养殖业的一类重要传染病, 并且 PRV 与其它许多病原引起的猪繁殖障碍综合征存在非常类似的临床症状。加上各猪场间的临床症状差异极大, 尤其是有细菌性或病毒性的继发感染或混合感染, 给临床诊断工作造成了一定难度。对猪伪狂犬病毒进行快速、及时、准确的诊断, 是有效防制该病的重要前提, 特别是在 PRV 感染早期的诊断具有重要意义。实时荧光定量 PCR 方法采用完全闭管检测, 不需 PCR 后处理, 避免了交叉污染; 根据 Ct 值进行定量, 相对误差较小; 检测仪直接与电脑相连, PCR 循环结束之后便可直接观察结果, 可将实验记录所得到的数据直接用 Excel 处理, 得到实验结果, 从而提高了检测效率和速度。荧光定量 PCR 可以定量检测出病畜组织中的病毒含量, 除了在 PRV 的早期诊断中具有重要意义以外, 在对抗病毒药物及疫苗效果的评价中也具有重要意义。

本试验选取猪伪狂犬病毒含 *gH*、*gE* 基因的重组质粒作为标准品, 建立了线性良好的标准曲线, 经探针、引物、 Mg^{2+} 浓度、退火温度的条件优化最终建立了对猪伪狂犬病毒的荧光定量 PCR 检测方法,

并且两条探针标记了不同的荧光标记，反应条件基本相同，在同一 PCR 仪上可同时扩增。分析结果显示该荧光定量 PCR 方法特异性高，有良好的重现性和稳定性，且敏感性高(最小检出量约达 10¹ 拷贝)，说明本研究建立的实时荧光定量 PCR 方法能够用于猪伪狂犬病病毒的早期鉴别诊断。

该实时荧光定量 PCR 方法不仅可对病毒液进行检测，还可以直接对临床发病猪的各种组织匀浆进行检测。利用该诊断方法对临床上的 60 份样品的检测结果来看，感染 PRV gH 阳性的 10 份，gH、gE 皆阳性的 5 份。血清中和试验检测的阳性样品实时荧光定量 PCR 方法检测全为阳性，证实了检测 gH、gE 基因的实时荧光定量 PCR 方法具有区别伪狂犬病病毒野毒株和疫苗株的功能，适用于目前基因缺失疫苗广泛使用的现状，对 PRV 的临床诊断的分子生物学方法做了重要补充。从我们的检测结果来看 PRV 在我国除了用疫苗而引起的带毒现象外，还存在一定程度的野毒感染。因此，该研究弥补了对 PRV 野毒与疫苗毒进行鉴别诊断和临床检测诊断技术的缺陷，具有很高的实用价值和实践意义。

REFERENCES

[1] Yin ZH, Liu JH. Animal Virology, 2nd ed. Beijing: Science Press, 1997.
殷震, 刘景华 主编. 动物病毒学(第二版). 北京: 科学出版社, 1997.

[2] Yoon HA, Eo SK, Aleyas AG, et al. Investigation of pseudorabies virus latency in nervous tissues of seropositive pigs exposed to field strain. *J Vet Med Sci*, 2006, **68**(2): 143-148.

[3] Yoon HA, Eo SK, Aleyas AG, et al. Molecular survey of latent pseudorabies virus infection in nervous tissues of slaughtered pigs by nested and real-time PCR. *J Microbiol*, 2005, **43**(5): 430-436.

[4] Tanaka S, Mannen K. Effect of mild stress in mice latently infected pseudorabies virus. *Exp Anim*, 2003, **52**(5): 383-386.

[5] Jin L, Schnitzlein WM, Scherba G. Identification of the pseudorabies virus promoter required for latency-associated transcript gene expression in the natural host. *Virology*, 2000, **74**(14): 6333-6338.

[6] Palladino S, Kay I, Fonte R. Use of real-time PCR and the light cycler system for the rapid detection of *Pneumocystis carina* in respiratory specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2001, **39**(4): 233-236.

[7] Wang LY, Hong QH. Technology and application of real-time quantitative polymerase chain reaction. *Chin J Cell Biol*, 2004, **2**(2): 62-67.
王梁燕, 洪其华. 实时定量 PCR 技术及其应用. 细胞生物学杂志, 2004, **2**(2): 62-67.

[8] Stram Y, Kuznetzova L, Guini M, et al. Detection and quantitation of akabane and aino viruses by multiplex real-time reverse- transcriptase PCR. *Virology*, 2004, **116**(2): 147-154.

[9] Walker NJ. Real time and quantitative PCR: applications to mechanism-based toxicology. *J Biochem Mol Toxicol*, 2001, **15**(3): 121-127.

[10] Zhou B, Shu XM, Zhang SF, et al. Establishment and application of PCR to detect Wild-type pseudorabies virus. *Virologica Sinica*, 2004, **19**: 612-615.
周斌, 苏鑫铭, 张素芳, 等. PCR 快速检测伪狂犬病病毒野毒感染. 中国病毒学, 2004, **19**: 612-615.

[11] Zhao L, Cui BA, Fang ZY, et al. Establishment of polymerase chain reaction(PCR) for detecting pseudorabies virus(PRV). *Chin J Preven Vet Med*, 2007, **29**(2): 142-146.
赵丽, 崔保安, 方忠意, 等. PCR 检测猪伪狂犬病病毒方法的研究. 中国预防兽医学报, 2007, **29**(2): 142-146.



本 期 广 告 索 引

企业	版位	企业	版位
GE Healthcare 公司	封底	杭州博日科技有限公司	内页
Roche 诊断产品有限公司	封二	伯乐生命医学产品(上海)有限公司	内页
富士胶片(中国)投资有限公司	封三/内页	上海国强生化工程装备有限公司	内页
美国 Promega 公司	内页	镇江东方生物工程公司	内页
生物谷网站	内页	赛默飞世尔科技有限公司	内页
大连亚博会展有限公司	内页	汕头大学多学科研究中心招聘启事	内页