

猪传染性胃肠炎病毒 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立

白兴华¹,冯力^{1*},陈建飞¹,时洪艳¹,孙东波¹,吴波平^{1,2},高秀春^{1,2}

(1. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室猪传染病研究室, 哈尔滨 150001; 2. 东北农业大学, 哈尔滨 150030)

摘要: 根据猪传染性胃肠炎病毒和猪肌动蛋白的基因序列设计合成了引物和探针,通过对荧光定量 RT-PCR 反应条件的优化,建立了 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 检测 TGEV 的方法。同时对 37 份现地病料进行检测并与常规 RT-PCR 方法、TGEV 抗原快速检测试剂盒比较。结果,该方法的检测敏感性达到 15.3 拷贝/ μL ,且具有很好的特异性和重复性,而常规 RT-PCR 方法只能检测到 1.53×10^3 拷贝/ μL 。对 37 份现地病料的检测结果也表明该法(检出 17 份)比常规 RT-PCR 方法(检出 12 份)和 TGEV 抗原快速检测试剂盒(免疫层析法,检出 10 份)的敏感性高。

关键词: 猪传染性胃肠炎病毒;TaqMan 探针;荧光定量 RT-PCR

中图分类号:S852.65;S854.43

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2007)05-0476-06

Development of TaqMan Fluorescence Quantitative RT-PCR Assay for Detection of Transmissible Gastroenteritis Virus of Swine

BAI Xing-hua¹,FENG Li^{1*},CHEN Jian-fei¹,SHI Hong-yan¹,
SUN Dong-bo¹,WU Bo-ping^{1,2},GAO Xiu-chun^{1,2}

(1. *Department of Swine Infectious Diseases, National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China*; 2. *Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China*)

Abstract: The primers and probes were designed and synthesized according to the sequences of transmissible gastroenteritis virus and β -actin, and then reaction requirements were optimized to develop a TaqMan fluorescence quantitative RT-PCR assay. Meanwhile, 37 field samples were detected and the results were compared with that of routine RT-PCR and antigen rapid test kit. It was showed that the fluorescence quantitative RT-PCR assay could detect 15.3 copies/ μL of plasmid DNA and its specificity and reproducibility were very good, while the sensitivity of the routine RT-PCR was 1.53×10^3 copies/ μL . The results of field test also showed that its sensitivity was higher than that of the routine RT-PCR and TGEV antigen rapid test kit (chromatographic immunoassay).

Key words: transmissible gastroenteritis virus of swine; TaqMan probe; fluorescence quantitative RT-PCR

猪传染性胃肠炎(Transmissible gastroenteritis of swine, TGE)是由猪传染性胃肠炎病毒(Transmissible gastroenteritis virus of swine, TGEV)引起的一种高度接触传染性的肠道疾病,以引起 1 周龄以下仔猪呕吐、水样腹泻和高死亡率(通常 100%)为主要特征。TGEV 属冠状病毒科冠状病毒属成员,是单股正链 RNA 病毒,基因组全长 28.6 kb,共有 7 个开放阅读框(ORF),其中编码核衣壳蛋白的 ORF 6 高度保守^[1,2]。目前 TGEV 只有一个血清型。TGEV 自 1945 年在美国首次报道后,迅速在北美、欧洲、亚洲等地蔓延,成为一种世界性的猪病,给养猪业带来巨大的经济损失。由于它主要引起 1 周龄以下仔猪几乎 100%死亡,所以及早确诊对该病的防治具有特别重要的意义,因此建立一种快速、高灵敏度的诊断方法对防治 TGE 十分必要。目前,检测 TGEV 的方法主要有病毒的分离鉴定、免疫荧光抗体试验、病毒中和试验、电镜观察、免疫电镜观察、ELISA 方法、核酸探针杂交技术和 RT-PCR 等。1997 年 Paton 等^[3]首先建立了 RT-PCR 方法检测 TGEV;2000 年 Kim 等^[4]和 2003 年 Jung 等^[5]分别建立了 TGEV 的 RT-nPCR 检测方法和多重 RT-nPCR 检测方法;2005 年 Jung 等^[6]又建立了 TGEV 的非放射性探针斑点杂交检测方法。但是这些方法都不能满足特定要求。

1995 年美国 PE 公司成功研制了 TaqMan 技术,1996 年推出了首台荧光定量 PCR 检测仪。荧光定量 PCR 技术具有能定量、高敏感性、高特异性、高通量等优点,非常适用于病毒感染的检测,尤其是感染早期检测。本研究旨在应用 TaqMan 探针建

立一种 TGEV 的荧光定量 RT-PCR 检测方法,用于 TGEV 的定量检测、表达差异及感染后病毒在体内分布等研究。

1 材料与方 法

1.1 病毒

猪瘟病毒(CSFV),由猪传染病研究室仇华吉老师惠赠;鸡传染性支气管炎病毒(IBV)由禽传染病研究室刘胜旺老师惠赠;猪传染性胃肠炎病毒、猪轮状病毒(PRV)、猪流行性腹泻病毒(PEDV)均由本实验室保存。

1.2 仪器与试剂

Rotor-Gene 3000 荧光定量 PCR 仪;Eppendorf 分光光度计;Eppendorf 金属恒温连接仪。

质粒提取试剂盒,购自上海生工生物工程有限公司;M-MLV 反转录酶购自 Promega 公司;ExTaq 聚合酶,pMD 18-T 载体均购自大连宝生物工程有限公司;TGEV 抗原快速检测试剂盒(免疫层析法)购自韩国 Animal Genetics 公司。

1.3 引物与探针

以本实验室保存的 TGEV 华毒株的 ORF6 作为靶基因设计了引物和 TaqMan 探针,目的片段 95 bp;同时本试验设置了内参对照 β -actin(β -肌动蛋白),根据 GenBank 上猪 β -actin 的基因序列(登录号:AY550069)设计了内参的引物与 TaqMan 探针,目的片段 117 bp。

引物和探针均由大连宝生物工程有限公司合成。引物和探针序列见表 1。

表 1 引物和探针序列

Table 1 Sequences of the primers and the probes

名称 Name	序列 Sequence	位置 Location	碱基数/bp Length
TGEV-F	5'-TGGGGAGATGAATCCACCAAAC-3'	49	23
TGEV-R	5'-AGGGTTATGGGGTTGAAGAATGAA-3'	143	24
TGEV-P	5'FAM-CGTGGTCGCTCCAATTCCCCTGGT-TAMRA 3'	73	24
β -actin-F	5'-GCAGCCATCACAATCCCCTTT-3'	1 706	21
β -actin-R	5'-TCTCAAGTCAGTGTACAGGTAAGC-3'	1 822	24
β -actin-P	5'ROX-CCTCCGCACCTCAACCGCTCCTA-ECLIPSE 3'	1 790	24

1.4 病毒 RNA 的提取及 cDNA 的合成

RNA 提取:按照 TRIzol(Invitrogen 公司)说明书从 TGEV 细胞培养物和组织样品中提取总

RNA。

cDNA 的合成(25 μ L 体系):用 13 μ L DEPC 处理的水溶解 RNA,并加入 1 μ L Oligo dT(18) (0.5

$\mu\text{g}/\mu\text{L}$), $70\text{ }^\circ\text{C}$ 作用 5 min, 迅速置冰上。加入 $5\times\text{M-MLV}$ 反转录 Buffer $5\ \mu\text{L}$, dNTPs ($2.5\ \text{mmol}/\text{L}$) $4\ \mu\text{L}$, M-MLV ($200\ \text{U}/\mu\text{L}$) $1\ \mu\text{L}$, Ribonuclease Inhibitor ($40\ \text{U}/\mu\text{L}$) $1\ \mu\text{L}$, $42\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中 1.5 h, $95\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中 10 min, 置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 待用。

1.5 标准品的制备

将 TGEV 和内参的目的片段克隆到 pMD18-T 载体上并转化到 TG1 大肠杆菌中, 摇菌提取质粒, PCR 鉴定、测序, 证明目的基因已成功克隆入 pMD18-T 载体中。测定质粒的 OD_{260} 值, 并换算质粒浓度到拷贝数/ μL , $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存作为标准品备用。

1.6 Real time PCR 反应条件的优化

用矩阵法对荧光定量 PCR 的引物浓度、探针浓度、 Mg^{2+} 浓度等进行筛选优化, 以得到最佳的荧光定量 PCR 反应条件。

1.7 标准曲线的建立

质粒标准品 10 倍梯度稀释作为模板, 在 Rotor-Gene 3000 荧光定量 PCR 仪上检测, 得出各自的动力学曲线, 仪器软件自动生成标准曲线。

1.8 敏感性试验

阳性质粒 10 倍梯度稀释到最低浓度为每微升几个拷贝, 以此作为未知模板在 Rotor-Gene 3000 荧光定量 PCR 仪上检测, 得出荧光定量 PCR 所能检出的最低模板拷贝数。同时 PCR 产物用 2.5% 琼脂糖凝胶电泳观察, 电泳结果作为常规 RT-PCR 的敏感性与荧光定量 RT-PCR 的敏感性进行比较。

1.9 特异性试验

提取 CSFV、PRV、IBV 和 PEDV 的病毒 RNA 并反转录得到 cDNA, 在 Rotor-Gene 3000 荧光定量 PCR 仪检测, 同时设阴、阳性对照。

1.10 重复性试验

用荧光定量 RT-PCR 方法对来自辽宁、河南、上海的 3 份粪便样品及 1 份病毒的细胞培养物进行批内重复性试验和批间重复性试验。批内试验每个样品设 4 个重复, 批间试验是在两个不同的时间(第 1 天和第 2 天)对 4 份样品进行检测。对检测结果进行统计学分析。

1.11 现地样品的检测

对上海、广州、内蒙古、辽宁、河南等地猪场送检的 37 份粪便病料进行处理, 提取 RNA, 应用荧光定量 RT-PCR 方法检测。同时用常规 RT-PCR 方法和 TGEV 抗原快速检测试剂盒检测, 比较三者检测结果。

2 结果

2.1 荧光定量 RT-PCR 反应条件的优化

PCR 反应体系 ($25\ \mu\text{L}$): 筛选出最佳的引物、探针、 Mg^{2+} 终浓度分别为 $0.4\ \mu\text{mol}/\text{L}$ 、 $0.12\ \mu\text{mol}/\text{L}$ 、 $3\ \text{mmol}/\text{L}$ 。

PCR 反应条件: $95\text{ }^\circ\text{C}$ 1 min; $95\text{ }^\circ\text{C}$ 15 s, $60\text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, 40 个循环。

2.2 标准曲线的建立

如图 1 所示, 曲线 1、2、3、4、5 分别是模板浓度为 2.62×10^9 、 2.62×10^8 、 2.62×10^7 、 2.62×10^6 、 2.62×10^5 拷贝/ μL 的质粒标准品的动力学曲线, 水平线为阴性对照。它们的循环阈值分别为 7.55、10.82、15.04、19.38、22.07。图 2 为数据分析后仪器自动生成的标准曲线, y 轴为循环阈值, x 轴为质粒标准品的拷贝数。标准曲线的斜率为 -3.759 , x 轴截距为 42.860, 直线方程为 $y = -3.759 \lg x + 42.860$ 。

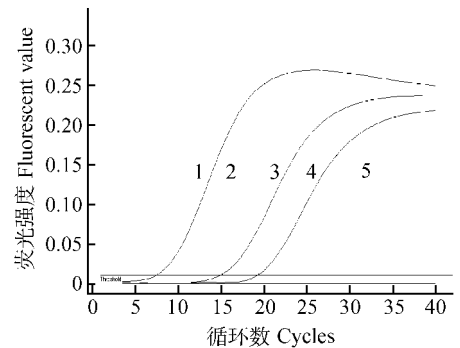


图 1 标准品的动力学曲线

Fig. 1 Dynamic curve of the standards

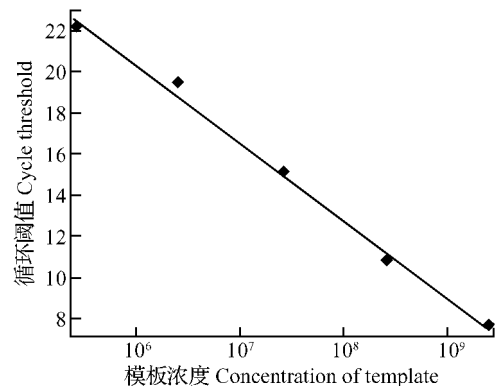


图 2 图 1 对应的标准曲线

Fig. 2 Standard curve of figure 1

2.3 敏感性试验

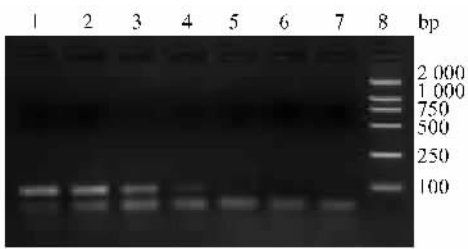
如表 2 所示,荧光定量 RT-PCR 能检测出的模板最低浓度为 15.3 拷贝/ μL 。与常规 RT-PCR 相比:PCR 产物用 2.5% 琼脂糖凝胶电泳观察,模板浓度为 1.53×10^3 拷贝/ μL 标准品的 PCR 产物的电泳带很模糊,再低浓度的未检出(图 3)。这说明荧光定量 RT-PCR 的敏感性比常规 RT-PCR 的高 100 倍。

表 2 荧光定量 RT-PCR 与常规 RT-PCR 敏感性比较

Table 2 Sensitivity comparison between the fluorescence quantitative RT-PCR and the routine RT-PCR

质粒标准品浓度/ (Copies/ μL) Concentration of the standard	荧光定量 RT-PCR The fluorescence quantitative RT-PCR	常规 RT-PCR The routine RT-PCR
1.53×10^6	+	+
1.53×10^5	+	+
1.53×10^4	+	+
1.53×10^3	+	+
1.53×10^2	+	-
1.53×10^1	+	-
1.53×10^0	-	-

+. Positive; -. Negative



1~6. 模板浓度分别为 1.53×10^6 、 1.53×10^5 、 1.53×10^4 、 1.53×10^3 、 1.53×10^2 、 1.53×10^1 拷贝/ μL ; 7. 阴性对照; 8. DL2000 marker

1-6. The concentrations of the templates: 1.53×10^6 , 1.53×10^5 , 1.53×10^4 , 1.53×10^3 , 1.53×10^2 , 1.53×10^1 copies/ μL ; 7. Negative control; 8. DL2000 marker

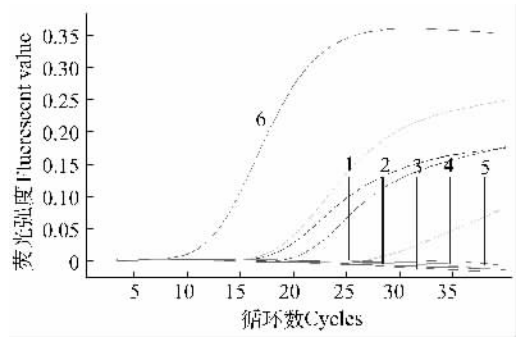
图 3 PCR 产物电泳

Fig. 3 The electrophoretic result of PCR products

2.4 特异性试验

对 CSFV、PRV、IBV 和 PEDV 4 种不同的病毒分别提取病毒 RNA,反转录后进行荧光定量 PCR 反应,其扩增曲线均为水平线,即结果均为阴性(图

4),说明该反应具有很好的特异性。



1~4. 分别为 CSFV、PRV、IBV 和 PEDV 的动力学曲线; 5. 阴性对照; 6. 阳性对照

1-4. The dynamic curves of CSFV, PRV, IBV and PEDV; 5. Negative control; 6. Positive control

图 4 特异性试验

Fig. 4 The result of the specificity assay

2.5 重复性试验

用来自辽宁、河南、上海的 3 份粪便样品及 1 份病毒的细胞培养物进行批内重复性试验和批间重复性试验,并对检测结果进行统计学分析,结果如表 3、4。批内重复性试验和批间重复性试验的变异系数均小于 5%,说明该方法具有很好的重复性。

2.6 现地样品的检测

对地方猪场送检的 37 份粪便病料进行了荧光定量 RT-PCR 检测,同时与常规 RT-PCR 方法和 TGEV 抗原快速检测试剂盒相比较,结果如表 5。在 37 份待检病料中,荧光定量 RT-PCR 方法检出 17 份为阳性,常规 RT-PCR 方法检出 12 份为阳性, TGEV 抗原快速检测试剂盒检出 10 份为阳性。其中,内蒙古、辽宁和河南等地猪场的 7 份病料病毒含量比较高,3 种方法均检为阳性;而广州某猪场的 13 份病料中,荧光定量 RT-PCR 方法检出 2 份为阳性,且病毒含量很低,其他 2 种方法未检出。这再次表明荧光定量 RT-PCR 方法的敏感性明显高于常规 RT-PCR 方法和 TGEV 抗原快速检测试剂盒。

3 讨论

荧光定量 PCR 是在 PCR 反应过程中通过连续监测荧光信号的强弱来即时测定特异性产物的量,并据此推断目的基因的初始量。它综合 PCR 技术、荧光标记技术、激光技术、数码显相技术等于一体,因此具有很高的检测灵敏度;而且它的靶序列由引物和探针双重控制,特异性高。根据采用的荧光材

表 3 批内重复性试验

Table 3 The intra-assay reproducibility

样品 Sample	Ct 值 Ct value				平均 Ct 值 Average Ct value	变异系数/% Coefficient of variation	病毒载量/ (Copies/ μ L) Viral load
	重复 1 1st	重复 2 2nd	重复 3 3rd	重复 4 4th			
辽宁	22.35	22.59	22.29	22.86	22.52 \pm 0.52	1.15	6.24 \times 10 ³
河南	22.93	22.43	22.04	23.48	22.72 \pm 1.24	2.73	5.88 \times 10 ³
上海	20.95	21.95	21.63	21.57	21.52 \pm 0.84	2.23	9.33 \times 10 ³
细胞毒	20.90	21.46	21.08	21.49	21.23 \pm 0.29	1.37	1.96 \times 10 ⁶

表 4 批间重复性试验

Table 4 The inter-assay reproducibility

样品 Sample	Ct 值 Ct value		平均 Ct 值 Average Ct value	变异系数/% Coefficient of variation	病毒载量/ (Copies/ μ L) Viral load
	第 1 天 1st day	第 2 天 2nd day			
辽宁	24.81	24.23	24.52 \pm 0.41	1.67	6.24 \times 10 ³
河南	24.52	24.04	24.28 \pm 0.34	1.40	5.88 \times 10 ³
上海	23.06	22.59	23.83 \pm 0.33	1.38	9.33 \times 10 ³
细胞毒	21.20	21.06	21.13 \pm 0.10	0.47	1.96 \times 10 ⁶

表 5 现地试验结果

Table 5 The results of field test

病料来源 Sample	份数 Amounts	荧光定量 RT-PCR	常规 RT-PCR	试剂盒
		The fluorescence quantitative RT-PCR	The routine RT-PCR	The kit
内蒙古	3	3/3	3/3	3/3
辽宁	2	2/2	2/2	2/2
河南	2	2/2	2/2	2/2
上海	17	8/17	5/17	3/17
广州	13	2/13	0/13	0/13
总量	37	17/37	12/37	10/37

料不同,荧光定量 PCR 分为 SYBR Green I 染料法、TaqMan 探针法、分子信标法、杂交探针法等^[7]。其中,SYBR Green I 染料与任何双链 DNA 都结合,易产生非特异性荧光,而 TaqMan 探针法对目标序列有很高的特异性,与分子信标法等相比设计相对简单,且重复性好,因此被普遍使用。本研究利用了 TaqMan 探针法。荧光定量 PCR 由于其具有能定量、灵敏度高和重复性好等优点,被广泛应用于医学检测、基因表达研究、病原体检测、病毒荷载体测定和食品卫生检疫等方面。但是荧光定量 PCR 仪器和探针的合成价格昂贵,检测成本比较高,这也限制了它的普遍应用。

荧光定量 PCR 技术应用于 TGEV 检测,能在病毒隐性感染、发病猪早期快速确诊和实时监测等

方面发挥重要的作用。但是国内外的报道较少。Chen 等^[8]以 Invitrogen 公司的 LUX (Light upon extension, LUX) 引物为基础建立了检测 TGEV 的荧光定量 PCR 方法,敏感性比常规 RT-PCR 方法提高了 10 倍。Escors 等^[9]利用建立的荧光定量 PCR 方法以及免疫纯化技术研究 TGEV 病毒蛋白合成和 RNA 壳体化的过程。

本研究以高度保守的 ORF6 为靶基因成功建立了 TGEV 的 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 检测方法,并应用于临床现地病料的检测。本方法的检测敏感性达到 15.3 拷贝/ μ L,比常规 RT-PCR 的敏感性高了 100 倍,优于 Invitrogen 公司的 LUX 引物法。与常规 RT-PCR 相比,本方法特异性更高,假阳性低,不易污染,且扩增与检测一步完成,不需要

对产物进行电泳等后期处理,操作更简便。

荧光定量 RT-PCR 检测 TGEV 的方法不仅能进行定性检测,更能准确定量,这就为 TGEV 感染、增殖规律的研究及病毒复制转录过程的研究奠定了重要的基础。另外,荧光定量 PCR 技术能对点突变、等位基因和单核苷酸多态性(SNP)进行分析,本方法的建立也为建立区分 TGEV 强弱毒的荧光定量 PCR 方法奠定了重要的基础。

参考文献:

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 第2版. 北京:科学出版社,1997. 681~688.
- [2] 斯特劳 B E. 猪病学[M]. 赵德明,张中直,沈建忠,译. 第8版. 北京:中国农业大学出版社,2000. 305~338.
- [3] Paton D, Iyata G, Sands J. Detection of transmissible gastroenteritis virus by RT-PCR and differentiation from porcine respiratory coronavirus[J]. J Vir Met, 1997, 66:303~309.
- [4] Kim L, Chang K, Sestak K. Development of a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay for differential diagnosis of transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus from feces

and nasal swabs of infected pigs[J]. J Vet Diagn Invest, 2000, 12(4):385~388.

- [5] Jung K, Kim J, Kim O, et al. Differentiation between porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus in formalin-fixed paraffin-embedded tissues by multiplex RT-nested PCR and comparison with *in situ* hybridization[J]. J Vir Met, 2003, 108:41~47.
- [6] Jung K, Chae C. RT-PCR-based dot blot hybridization for the detection and differentiation between porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus in fecal samples using a non-radioactive digoxigenin cDNA probe[J]. J Vir Met, 2005, 123:141~146.
- [7] 阳成波,印遇龙,黄瑞林,等. 实时定量 RT-PCR 的原理及方法[J]. 免疫学杂志, 2003, 19(3):145~150.
- [8] Chen R, Huang W M, Lin Z X, et al. Development of a novel real-time RT-PCR assay with LUX primer for the detection of swine transmissible gastroenteritis virus[J]. J Vir Met, 2004, 122:57~61.
- [9] Escors D, Capiscol C, Enjuanes L. Immunopurification applied to the study of virus protein composition and encapsidation[J]. J Vir Met, 2004, 119:57~64.

动物疫情速递

美国发生桃拉综合征

2007年4月25日,美国向OIE报告了该国的桃拉综合征疫情。疫情始于2007年3月16日,并于4月18日确认,不是临床病例,系依靠实验室检验作出诊断,NVSL和Arizona-Tucson大学水产病原实验室的Real-time PCR结果均呈阳性。疫区位于夏威夷州Oahu的养殖场,感染动物是甲壳纲动物,发病率和死亡率均为0。HI水产养殖发展计划旨在保证养殖场无病原并采取定期监测。在监测中,养虾场的地上混凝土池塘和含易感动物的排放池的确证样品检出了桃拉综合征病毒,该养殖场现已被隔离。阳性样品的同群虾已在得出检测结果前上市供人消费。感染来源尚不清楚。美国采取的措施为国内限制移动和检疫,即将进行设施及设备消毒。美国上一次发生桃拉综合征是2004年6月10日。

塞尔维亚和黑山共和国发生新城疫

2007年4月25日,塞黑向OIE报告了该国的新城疫疫情。疫情始于2007年3月29日,并于当天得到确认。病原是新城疫病毒。此次发病属临床病例,依靠临床诊断、实验室诊断和剖解作出诊断。Novi Sad科学兽医研究所的病毒分离试验呈阳性。疫区位于VOJVODINA省Srednjobanatski地区的Taras Zrenjanin村,感染动物是庭院养殖的家禽,有155只易感禽,42例病例,死亡35例,销毁120例。目前流行病学调查正在进行中,感染来源尚不清楚。塞黑采取的措施:国内限制移动、筛选、紧急免疫、设施及设备消毒、浸洗/喷雾、检疫、扑杀和区域化。La Sota苗被用于该省3331只禽的免疫。塞黑上一次发生新城疫是2007年2月1日。

(摘译自OIE网站)