

俞正玉,逢凤娇,孙冰,等.猪流行性腹泻病毒变异株 RT-PCR 检测方法的建立[J].江苏农业科学,2018,46(1):116-118.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.01.031

猪流行性腹泻病毒变异株 RT-PCR 检测方法的建立

俞正玉,逢凤娇,孙冰,徐向伟,茅爱华,郭容利,范宝超,杜露平,温立斌,倪艳秀,何孔旺,李彬
(江苏省农业科学院兽医研究所/国家兽用生物制品工程技术研究中心/农业部兽用生物制品工程技术重点实验室,江苏南京 210014)

摘要:猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)可引起猪呕吐、腹泻和脱水,各年龄段的猪均可发病,而哺乳仔猪发病和死亡最为严重。2010 年末发生的仔猪腹泻综合征的主要病原为 PEDV 变异株。根据 PEDV 变异株 S 基因发生碱基缺失和插入的特征设计并合成了 1 对特异性引物,首次建立了 PEDV 变异株的 RT-PCR 检测方法。结果表明,所建立的 PCR 检测方法特异性强,不和 PEDV 经典毒株反应,也不与其他动物病原反应;敏感性较高,最低可检测 10^{-3} ng/ μ L,且重复性较好。用该方法对 2013—2014 年我国华东地区猪场的 318 份临床样品进行检测,结果发现 109 份样品(34.3%)为 PEDV 变异株阳性,表明我国腹泻猪群中 PEDV 变异株感染较为普遍。本研究建立的 PCR 方法可以作为 PEDV 变异株在临床上的一种鉴别诊断技术。

关键词:猪流行性腹泻病毒;变异株,RT-PCR;检测;特异性;敏感性;重复性

中图分类号: S855.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)01-0116-02

猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhoea virus, PEDV)是引起猪呕吐、腹泻和脱水为主要临床症状特征的猪肠道传染病病原,哺乳仔猪、架子猪或育肥猪等各年龄段均可发病,但哺乳仔猪中的感染率最高^[1-2]。该病多发生在冬春寒冷季节,以 12 月至次年 2 月为高发季节^[3]。

2010 年冬季至 2011 年春季全国各地猪场的猪群中先后发生严重的传染性腹泻疾病,发病突然,传播较快,流行范围广,流行时间长,应用各种抗生素防治无效,发病率约 80%,死亡率高达 50%~85%,造成重大的经济损失^[4-5]。经研究表明,猪流行性腹泻病毒变异株是此次疫情的元凶。变异株与原来毒株 PEDV 经典毒株 CV777(AF353511.1)的基因组同源性在 97%左右,变异最大的为 S 基因,同源性在 94%以下,且存在氨基酸发生缺失和插入的序列特征。此前,我国尚无 PEDV 变异株的特异检测技术,目前的常规 RT-PCR 技术不能区分 PEDV 经典毒株和变异株^[6-8],只能依靠序列测定和分析来确诊,操作繁杂、耗时长、成本较高。因此,本试验根据猪流行性腹泻病毒变异株 S 基因发生核苷酸缺失和插入的特征,设计并合成检测引物,采用 RT-PCR 方法扩增 PEDV 变异株的部分 S 基因,而不与 PEDV 经典毒株反应,从而特异、敏感、省时、省力地检测出 PEDV 变异株,为 PEDV 的检测提供工具,对防控猪流行性腹泻病具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 病毒株

猪流行性腹泻病毒变异株 AH2012、猪流行性腹泻病毒

经典株 CV777、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪传染性胃肠炎(TGEV)、猪轮状病毒(PoRV)均由江苏省农业科学院兽医研究所分离并保存。

1.2 主要试剂与仪器

核酸(RNA/DNA)提取试剂盒购自北京天恩泽基因科技有限公司,RT-PCR Mix 反转录试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司,dNTP、DL2000 DNA Marker、pMD18-T 载体等购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 引物的设计和合成

根据猪流行性腹泻病毒变异株 AH2012 S 基因的核苷酸序列,采用 Primer 5.0 设计引物,经过大量筛选得到如下引物序列:正向引物(PEDV-VF)序列为 5'-TTGGTGAACACCAGGGTGTC-3',反向引物(PEDV-VR)序列为 5'-CAACACTATGTTCACTCA-3'。

1.4 病毒核酸的提取

按照核酸(RNA/DNA)提取试剂盒说明书进行病毒核酸的提取。

1.5 RT 反应

在 20 μ L 反应体系中加入 4.75 μ L DEPC 处理水,6 μ L 总 RNA,1 μ L PEDV-VR(20 μ mol/L),1 μ L dNTP(10 μ mol/L),混匀后于 65 $^{\circ}$ C 保持 5 min,迅速转移到冰上骤冷 5 min;然后向反应管中加入 2 μ L DTT(0.1 mmol/L)、4 μ L 5 \times 反转录缓冲液、1 μ L RNA 酶抑制剂(40 U/ μ L)、0.25 μ L 反转录酶(200 U/ μ L),42 $^{\circ}$ C 反应 50 min;72 $^{\circ}$ C 15 min 灭活反转录酶后获得反转录产物 cDNA。

1.6 PCR 扩增

在 50.0 μ L 的反应体系中加入 30.5 μ L DEPC 处理水、2.0 μ L cDNA、2.0 μ L PEDV-VF(20 μ mol/L)、2.0 μ L PEDV-VR(20 μ mol/L)、5.0 μ L 10 \times PCR 缓冲液、8.0 μ L dNTP(2.5 mmol/L)、0.5 μ L DNA 聚合酶(5 U/ μ L)。PCR 的反应参数为 94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,52 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。对扩增产物进行琼脂糖凝胶

收稿日期:2016-07-28

基金项目:国家重点研发计划(编号:2016YFD0500101);江苏省农业科技自主创新资金[编号: CX(15)1056]。

作者简介:俞正玉(1978—),男,江苏南京人,助理研究员,主要从事动物病毒学研究。E-mail: yuzhengyu@sina.com。

通信作者:李彬,博士,副研究员,主要从事动物病毒学研究。

E-mail: libinana@126.com。

电泳,并观察结果。

1.7 特异性试验

以 PEDV 变异株、PEDV 经典毒株、PRRSV、TGEV、PRV 病毒 RNA 反转录成的 cDNA 为模板。取等量的模板进行 PCR 扩增,同时做阴性对照,观察琼脂糖凝胶电泳情况。

1.8 敏感性试验

在 20 μ L 反转录体系中,加 1 μ L 连续 10 倍稀释后的总 RNA。按照本试验建立的方法,在 PCR 反应体系中加入 2 μ L 的 cDNA,进行 PCR 扩增,观察琼脂糖凝胶电泳情况。

1.9 重复性试验

用所建立的 RT-PCR 方法对 6 份不同的 PEDV 变异株阳性病料样品分别进行 3 次重复性试验,检测该方法的重复性和稳定性。

1.10 临床样品检测

2013 年自华东多地猪场中采集腹泻发病猪肠道及粪便样品共 318 份,提取样品 RNA,用本研究所建立的 RT-PCR 方法检测各份样品 RNA 中是否含有 PEDV 变异株核酸。检测中使用 PEDV 变异株作为阳性对照。

1.11 RT-PCR 方法的可靠性检测

将 PEDV 变异株阳性的 PCR 产物进行克隆、测序,序列比对后验证 PCR 的可靠性。

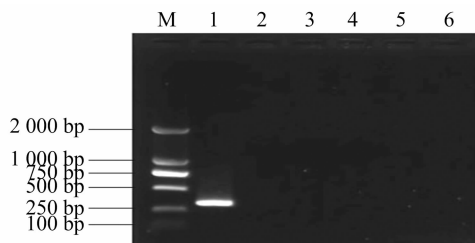
2 结果与分析

2.1 RT-PCR 结果

以猪流行性腹泻病毒变异株提取的总 RNA 为模板,用设计的引物进行 RT-PCR 扩增,检测到长度为 327 bp 的 DNA 片段。

2.2 特异性试验

对 PEDV 经典毒株 CV777、猪传染性胃肠炎 (TGEV)、猪轮状病毒 (PoRV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 进行特异性检测,仅 PEDV 变异株中可检测出长度为 327 bp 的 DNA 片段, PEDV 经典毒株及其他可能引起猪腹泻的病毒和健康猪材料中均未检测出 (图 1)。



M—DL2000 DNA ladder; 1—PEDV 变异株; 2—PEDV 经典毒株; 3—TGEV; 4—PoRV; 5—PRRSV; 6—阴性对照

图1 猪流行性腹泻病毒变异株的 RT-PCR 检测结果

2.3 敏感性试验

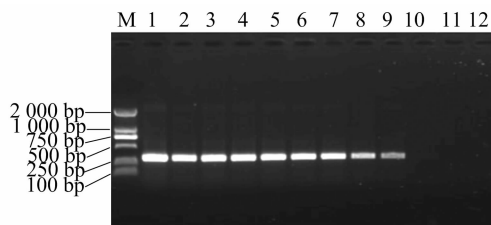
将提取的阳性 RNA 以 10 倍系列稀释,反转录后进行 PCR,结果 (图 2) 表明,RT-PCR 最低可检测出 10^{-3} ng/ μ L 的 PEDV 样品。

2.4 重复性试验

PEDV 变异株的 6 次 PCR 扩增的条带大小均约 330 bp,表明该方法具有良好的重复性。

2.5 临床样品检测

对我国华东地区采集的 318 份临床腹泻发病猪的样品进



M—DL 2000 DNA ladder; 1~11—反转录反应体系中加入的连续 10 倍稀释的 RNA 模板; 12—阴性对照

图2 敏感性试验结果

行 RT-PCR 检测,其中 PEDV 变异株阳性共有 109 份,阳性率为 34.3%。结果表明,近年华东地区猪腹泻病发病中, PEDV 变异株的感染率较高,应当引起足够重视。

2.6 RT-PCR 方法的可靠性检测

将临床上检测的 PEDV 变异株阳性 10 份 PCR 产物进行克隆、测序,经过序列测定后发现所测序列与 PEDV 变异株 AH2012 株的同源性在 99.5% 以上,证实所建立的 RT-PCR 方法确实能够检测 PEDV 变异毒株。

3 讨论

PEDV 属冠状病毒,主要破坏小肠茸毛,从而减小营养吸收的面积,并导致体液流失,引起脱水^[1-2]。正常情况下,易感猪群遭病毒侵入 2~3 周内即可产生很强的免疫,病毒就会从猪群消失^[1-2]。易感猪群初次接触病原时会爆发急性腹泻,这种情况下各种猪群的发病率可达 100%,有的表现为轻微的腹泻,有的则呈现水样下痢,哺乳仔猪尤为严重。在规模化猪场当中,母猪群会存在反复性的感染,而没有母源抗体保护的仔猪会出现散发的临床症状。母猪具体表现为腹泻,可能有较微的牛粪样稀粪,也可能呈水样下痢;仔猪主要表现为腹泻、脱水,死亡率可能会很高,尤其是 <10 日龄的哺乳仔猪最为严重;断奶猪与生长猪主要症状为急性水样下痢,发病率可能很高,但死亡率通常较低^[9]。

PEDV 是目前临床上猪病毒性腹泻的主要病原^[10],而 PEDV 变异株是 2010 年我国爆发的大规模猪群腹泻疫情的主要毒株,其与 PEDV 经典毒株的同源性较高,且由于猪病毒性腹泻与猪传染性胃肠炎 (transmissible gastroenteritis, TGE) 在流行病学、临床症状、病理剖检等变化上非常相似,在快速诊断方面有一定的困难,尚需结合试验室诊断方法进行确诊。目前,主要的实验室诊断方法有免疫电泳法 (IEM)、免疫荧光法 (IF)、微量血清中和试验、ELISA 法、RT-PCR 法等^[9,11]。而 RT-PCR 方法是目前诊断 PEDV 最敏感、特异的方法^[9,11]。

本试验中,根据变异株 AH2012 等 S 基因发生缺失和插入的序列特征,设计合成引物。以样品总 RNA 为模板,利用核苷酸序列为 SEQ ID NO. 2 的引物 PEDV-VR 进行反转录反应 (RT) 合成 cDNA。以合成的 cDNA 为模板,利用核苷酸序列为 SEQ ID NO. 1 的引物 PEDV-VF 和核苷酸序列为 SEQ ID NO. 2 的引物 PEDV-VR 进行 PCR 扩增,反应结束后根据特异性扩增 DNA 片段的位置判定猪流行性腹泻病毒变异株的存在。该 RT-PCR 方法解决了目前其他 PCR 方法不能解决的问题,从而特异、敏感、省时、省力、低本地检测出猪流行性腹泻病毒变异株。因此,该技术可对猪流行性腹泻病毒变异株的诊断和监测起到重要作用。本试验中使用该

徐玉平,蒋向辉,王翔.一测多评法测定金银花中咖啡酰奎尼酸类化学成分的含量[J].江苏农业科学,2018,46(1):118-121.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.01.032

一测多评法测定金银花中咖啡酰奎尼酸类化学成分的含量

徐玉平,蒋向辉,王翔

(凯里学院化学与材料工程学院,贵州凯里 556011)

摘要:建立金银花中 4 种绿原酸类成分的一测多评法(quantitative analysis of multi-components by single-marker, 简称 QAMS),验证该方法在金银花质量评价中应用的准确性及可行性。以绿原酸为内标,分别建立绿原酸、果酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 的相对校正因子,计算金银花中果酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 的含量,实现一测多评。对金银花样品同时采用外标法与一测多评法测定金银花中 6 种咖啡酰奎尼酸类成分的含量,并比较计算值与实测值的差异,以验证一测多评法在测定中的科学性与可行性。结果表明,各相对校正因子重复性良好,一测多评法测定结果与外标法测定结果进行 t 检验所得的 P 值均大于 0.05,表明 2 种测定方法得到的含量之间无显著差异。以绿原酸为内标同时测定果酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B 与异绿原酸 C 的一测多评法可用于金银花的定量分析。

关键词:一测多评法;金银花;咖啡酰奎尼酸;绿原酸;内标法;外标法

中图分类号:S567.7+90.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)01-0118-04

金银花别称忍冬(*Lonicera japonica*),是忍冬科忍冬属药

收稿日期:2017-04-26

基金项目:贵州省科技合作计划(编号:黔科合 LH 字[2015]7748 号);贵州省科技计划联合基金(编号:黔科合 LH 字[2014]7219);贵州省科学技术基金(编号:黔科合 J 字[2015]2131);贵州省教育厅重点项目(编号:黔教合 KY 字[2014]281、黔教合 KY 字[2014]228)。

作者简介:徐玉平(1985—),女,贵州铜仁人,硕士,讲师,从事中药及民族药药效物质基础及作用机制研究。E-mail:306597035@qq.com。

通信作者:蒋向辉,博士,副教授,主要从事植物化学与分子生物学研究。Tel:(0855)8558093;E-mail:jxfei789@163.com。

RT-PCR 方法对华东地区 318 份临床腹泻发病猪病料进行检测,发现其中 109 份为 PEDV 变异株阳性,阳性率达 34.3%,可见今年我国猪群腹泻发病的病因中,PEDV 变异株的感染仍是值得关注的问题。

参考文献:

- [1]斯特劳,阿莱尔,蒙加林,等.猪病学[M].8版.北京:中国农业大学出版社,2000:181-187.
- [2]殷震,刘景华.动物病毒学[M].北京:科学出版社,1985:688-690.
- [3]施雯.猪流行性腹泻病毒 SZ 株的分离与鉴定[D].哈尔滨:东北农业大学,2011:78-80.
- [4]万遂如.2011 年猪群中发生传染性腹泻疾病的流行状况与防控对策[J].养猪,2011(5):78-80.
- [5]库旭钢,刘云波,凌泽熹,等.猪病毒性腹泻的流行病学调查及分析[J].养猪,2012(5):101-102.

用植物^[1]。金银花作为一种常用中药,已有上千年的使用历史。长期以来,绿原酸与木犀草苷的含量被作为评价金银花质量的标志性成分,而近年来的研究发现,金银花中富含有机酸、黄酮、挥发油等多种生物活性成分^[2],因此,找到更多的能全面反映金银花质量的活性成分很有必要。金银花的花蕾与叶片中富含咖啡酰奎尼酸,咖啡酰奎尼酸是奎尼酸与咖啡酸形成的酯,由于咖啡酸的数目与位置不同,咖啡酰奎尼酸包括绿原酸、果酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 等 6 种不同单体^[3]。咖啡酰奎尼酸有清热、解毒等功效^[4-5],被广泛应用于医疗保健、食品和化妆品行业中^[6-7]。

近年来,已有采用外标法同时测定金银花中绿原酸、果酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 等成分含

- [6]秦毅斌,卢冰霞,赵武,等.猪流行性腹泻病毒变异毒株与经典毒株鉴别检测方法的建立及应用[J].中国兽医科学,2014,44(5):509-514.
- [7]李敬双,于洋.猪传染性胃肠炎病毒和猪流行性腹泻病毒二联 RT-PCR 检测方法的建立[J].中国农学通报,2010,26(23):26-29.
- [8]曾珑.猪流行性腹泻及猪传染性胃肠炎双重 RT-PCR 检测方法的建立及 11 株 PEDV S1 全基因序列分析[D].南昌:江西农业大学,2013.
- [9]吴学敏,陈如敬,王隆柏,等.猪流行性腹泻病毒 RT-PCR 检测方法建立及初步应用研究[J].中国农学通报,2012,28(26):59-62.
- [10]刘云波,赵洪翠,王志成,等.猪病毒性腹泻分子流行病学调查[J].中国畜牧兽医,2013,40(2):204-207.
- [11]Kim O, Choi C, Kim B, et al. Detection and differentiation of porcine epidemic diarrhoea virus and transmissible gastroenteritis virus in clinical samples by multiplex RT-PCR[J]. The Veterinary Record, 2000, 146(22): 637-640.