

顾蓓蓓,王妍鲤,李双洁,等. 生物制品中牛病毒性腹泻病毒 RT-PCR 及套式 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J]. 江苏农业科学,2017,45(8):30-32.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.08.008

生物制品中牛病毒性腹泻病毒 RT-PCR 及套式 RT-PCR 检测方法的建立及应用

顾蓓蓓¹, 王妍鲤², 李双洁³, 卢劲晔², 苗晋锋³

(1. 泰州出入境检验检疫局, 江苏泰州 225300; 2. 江苏农牧科技职业学院, 江苏泰州 225300;

3. 南京农业大学动物医学院, 江苏南京 210095)

摘要:为建立生物制品中牛病毒性腹泻病毒(BVDV)污染的检测方法,根据 GenBank 公布的 BVDV 序列,分别设计了普通 PCR 和套式 PCR 的特异性引物,建立了检测 BVDV 的普通 PCR 和套式 PCR 检测方法。结果表明,该方法可以快速检测出生物制品中的 BVDV 污染,为生物制品中 BVDV 的快速、低含量检测提供了简单快速的检测方法。

关键词:牛血清;疫苗;牛病毒性腹泻病毒;套式 RT-PCR

中图分类号: R914;S858.235.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2017)08-0030-03

牛病毒性腹泻/黏膜病(bovine viral diarrhea/mucosal disease, BVD/MD)是由牛病毒性腹泻病毒(bovine viral diarrhea virus, BVDV)感染引起的,以发热、白细胞减少、胃肠道黏膜糜烂溃疡、腹泻及怀孕母牛不孕、流产或产出畸形胎儿为主要特征的一种传染病^[1]。牛病毒性腹泻呈世界性分布,在养牛发达国家也广泛存在,给畜牧业带来了重大的经济损失。BVDV 属于黄病毒科瘟病毒属,与猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)同属,具有抗原相关性,猪也可感染 BVDV,感染后症状和病理变化与猪瘟类似,此病引起许多国家的关注,尤其是猪瘟已经被消灭或控制的国家和地区。

近年来,国内研究人员多次从发病猪群中分离到 BVDV,证实了该病在我国一直存在。一般认为猪感染 BVDV 的传染源为污染了 BVDV 的猪瘟活疫苗。据调查,我国猪瘟疫苗质量控制问题突出, BVDV 污染严重。中国兽医药品监察所对国内不同厂家生产的不同批次猪瘟疫苗半成品及成品检测结果显示,两者的 BVDV 阳性率分别达 20.7%、22.2%。疫苗生产中感染牛病毒性腹泻病毒是因为在细胞培养时使用了被 BVDV 污染的犊牛血清造成的,而这种感染又不易被发现,使用这种感染的血清用于生产疫苗的细胞受到污染,损失巨大^[2-3]。近年来,多地检验检疫部门在进口牛血清中检测出 BVDV。目前针对牛血清及疫苗中 BVDV 的检测标准缺失,因此建立特异性的 BVDV 检测方法至关重要。本研究根据 GenBank 公布的 BVDV 序列,分别设计了普通 PCR 和套式 PCR 的特异性引物,建立了检测 BVDV 的普通 PCR 和套式 PCR 检测方法,以期牛病毒性腹泻/黏膜病的临床快速诊

断提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

牛病毒性腹泻病毒(BVDV)、猪瘟病毒(CSFV)、牛肾细胞 MDBK、传染性牛鼻气管炎病毒由笔者所在实验室保存。TRIzol 购自 Invitrogen 公司, Takara PCR Mix、凝胶回收试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司。

主要仪器: SmartSpec™ Plus 核酸浓度测定仪、梯度 PCR 仪、GelDoc XR 凝胶成像系统(Bio-Rad)、台式高速低温离心机(eppendorph)。

1.2 病毒基因组 RNA 的提取

将 BVDV 接种于 MDBK 单层细胞,设空白对照,待细胞出现典型的空泡病变后,收获病毒,用 Trizol 试剂盒提取病毒基因组及对照细胞的 RNA。

1.3 RT-PCR 反应

1.3.1 RT-PCR 反应 根据已发表的 BVDV 标准毒株的全序列,设计合成引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物序列如下: WS-BVDV-F: 5'-CTT AGC GAA GGC CGA AAA GAG-3'; WS-BVDV-R: 5'-CTC CAT GTG CCA TGT ACA GCA G-3'。

用随机引物同时对样品进行反转录,建立样品的 cDNA。PCR 扩增反应体系: Takara PCR Mix 12.5 μL, cDNA 2 μL, 10 μmol/L 上游、下游引物各 1 μL, 加水至 25 μL。PCR 反应条件: 94 ℃ 4 min; 94 ℃ 40 s, 60 ℃ 40 s, 72 ℃ 40 s, 30 个循环; 72 ℃ 10 min, 扩增反应条带为 312 bp。

1.3.2 套式 RT-PCR 反应 根据已发表的 BVDV 标准毒株的全序列,选择 BVDV 保守性较强的 5' 非编码区域,设计合成 2 对特异性引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物序列如下: BVDV-1 F: 5'-TCAGCGAAGGC-CGAAAAGAGG-3'; BVDV-1 R: 5'-TCCATGTGCCATGTACAG-CAGAG-3'; BVDV-1 Fn: 5'-CAGTGCCGAGTTCGTTGCATG-

收稿日期: 2016-05-24

基金项目: 江苏出入境检验检疫局科研计划(编号: 2016KJ37)。

作者简介: 顾蓓蓓(1983—), 女, 江苏兴化人, 博士, 兽医师, 主要从事动物检疫研究。E-mail: beibei_gu@163.com。

通信作者: 卢劲晔, 博士, 讲师, 主要从事动物生理生化研究。E-mail: leopardleo@163.com。

3';BVDV-1 Rn;5'-GGCCTCTGCAGCATCTATCAG-3'。

用随机引物同时对样品进行反转录,建立样品的 cDNA。第 1 轮 PCR 扩增反应体系:TaKaRa PCR Mix 12.5 μ L,cDNA 2 μ L,上游、下游引物 BVDV-1F、BVDV-1R(10 μ mol/L)各 1 μ L,加水至 25 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,56 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min,扩增反应条带为 309 bp。

第 2 轮 PCR 扩增反应模板为第 1 轮 PCR 产物,反应体系:TaKaRa PCR Mix 12.5 μ L,第 1 轮 PCR 扩增反应产物 1 μ L,20 μ mol/L 上游、下游引物各 1 μ L,加水至 25 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,56 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min,扩增反应条带为 197 bp。

1.4 PCR 特异性试验

分别提取 BVDV、CSFV、传染性牛鼻气管炎病毒、MDBK 正常细胞的 RNA,用已建立的 2 种方法进行扩增,验证所建方法的特异性。

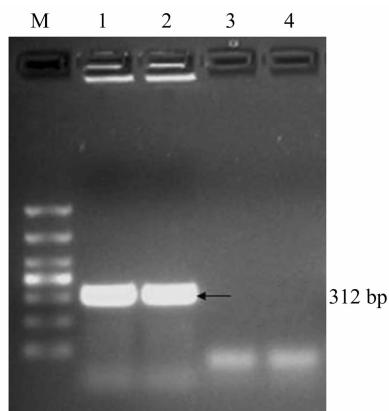
1.5 检测方法的初步应用

利用所建的套式 RT-PCR 方法检测血清、疫苗等生物制品,同时对阳性扩增产物进行测序鉴定,进行序列分析。

2 结果与分析

2.1 扩增产物检测

PCR 扩增产物经过 1% 琼脂糖凝胶电泳,普通 PCR 扩增产物位于 312 bp,套式 PCR 第 1 轮扩增产物位于 309 bp(图 1),第 2 轮扩增产物在 197 bp 处可见特异性 DNA 扩增条带,与预期大小相符(图 2)。



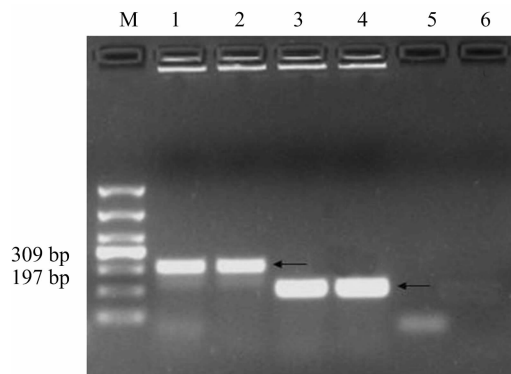
M为Marker DL1000,条带自下而上分别为100、200、300、400、500、700、1 000 bp;1、2泳道为普通 PCR 结果,扩增产物为 312 bp;3、4泳道为阴性对照

图1 普通 PCR 扩增产物检测结果

2.2 特异性试验

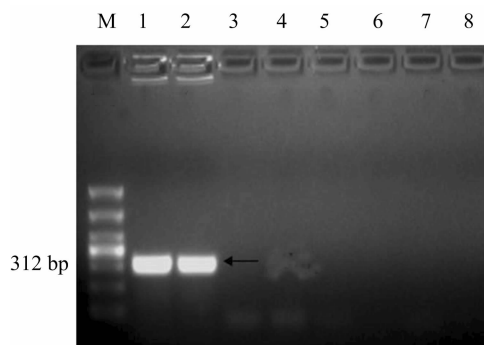
利用设计的普通 PCR 引物对牛病毒性腹泻病毒进行扩增,扩增产物位于 312 bp,猪瘟病毒、MDBK 细胞、牛传染性鼻气管炎病毒均未扩增出片段(图 3)。利用设计的套式 PCR 第 1 轮引物对牛病毒性腹泻病毒扩增除了 309 bp 的目的基因片段,测序结果与 BVDV 毒株序列一致,而猪瘟病毒、MDBK 细胞、牛传染性鼻气管炎病毒均未能扩增出片段(图 4)。取第 1 轮 PCR 产物各 1 μ L 为模板,利用第 2 轮引物进行扩增,在位于 197 bp 处可见特异性 DNA 扩增条带,与预期

大小相符,测序鉴定结果与 BVDV 序列一致,而猪瘟病毒、MDBK 细胞、牛传染性鼻气管炎病毒均未扩增出片段(图 5)。



M 为 Marker DL1000,条带自下而上分别为 100、200、300、400、500、700、1 000 bp;1、2 泳道为套式第 1 轮 PCR 结果,扩增产物为 309 bp;3、4 泳道为套式第 2 轮 PCR 结果,扩增产物为 197 bp;5、6 泳道为阴性对照

图2 套式 PCR 扩增产物检测结果



M 为 Marker DL1000,条带自下而上分别为 100、200、300、400、500、700、1 000 bp;1、2 泳道为 BVDV 病毒;3、4 泳道为猪瘟病毒;5、6 泳道为 MDBK 细胞;7、8 泳道为牛传染性鼻气管炎病毒。图4、图5同

图3 普通 PCR 扩增产物特异性试验结果

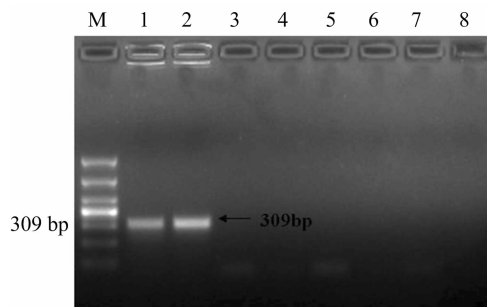


图4 套式 PCR 第 1 轮扩增产物特异性试验结果

2.3 检测方法的应用

应用本研究建立的 BVDV 普通 RT-PCR 和套式 RT-PCR 检测方法,检测来自不同批次的牛血清和疫苗制品各 6 份,共计 12 份样品,检测结果表明,本研究建立的方法能够检测出生物制品中污染 BVDV 的情况,且套式 PCR 的检测结果更为灵敏、准确(图 6、图 7)。

3 结论与讨论

小牛血清是生物制品制造过程中不可或缺的原材料,其安全性备受关注。研究表明,细胞培养的生物制品中 BVDV

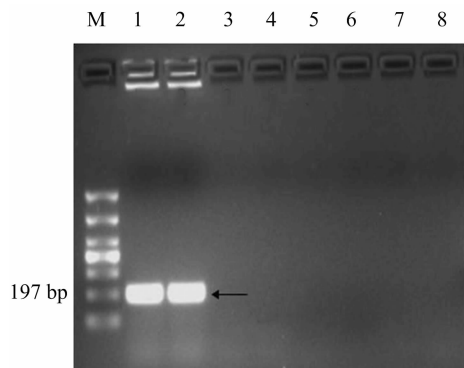
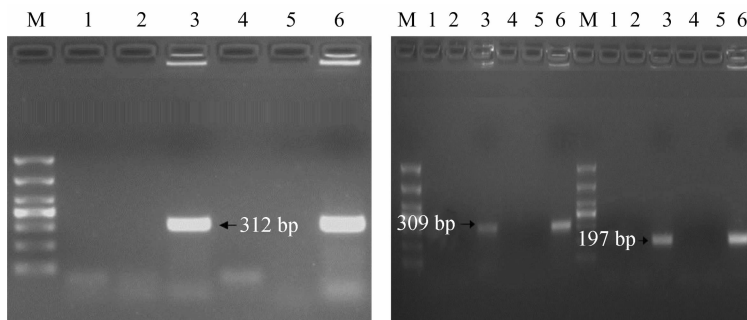
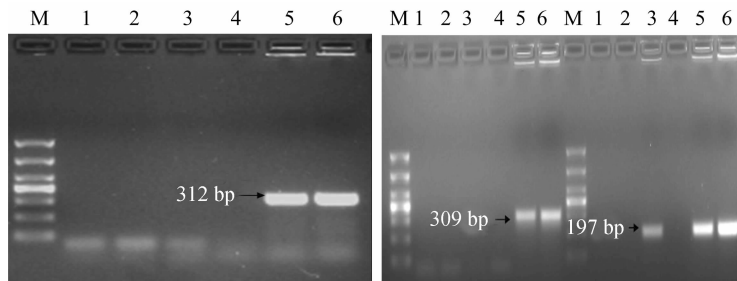


图5 套式 PCR 第 2 轮扩增产物特异性试验结果



M 为 DL1000; 1~5 泳道为样品; 6 泳道为阳性对照

图6 血清样品中 BVDV 检测结果



M 为 DL1000; 1~5 泳道为样品; 6 泳道为阳性对照

图7 疫苗样品中 BVDV 检测结果

污染的猪瘟疫苗免疫猪只可能导致其感染 BVDV,引起类似于非典型猪瘟的发生。因此科研单位和生物制品企业应该加强对其使用的小牛血清的 BVDV 检测。

目前,BVDV 的检测方法有病毒分离技术、免疫荧光技术、病毒中和试验、琼脂扩散试验、酶联免疫吸附试验等^[7]。与病毒分离技术、病毒中和试验等方法相比,RT-PCR 技术具有快速高效且特异性强等特点。本研究建立了 BVDV 的 RT-PCR 检测方法,同时根据 BVDV 5'端非编码区设计 2 对引物,建立了比常规 PCR 灵敏度更高的套式 RT-PCR 方法,为生物制品中微量的 BVDV 污染提供了一种更加特异、敏感的方法。本方法临床应用结果显示,在随机抽检的疫苗和血清样品中均能检测到被 BVDV 污染的样品,且套式 PCR 的检测灵敏度优于普通 PCR,表明上述 2 种方法均能用于检测生物制品中 BVDV 污染。

参考文献:

[1]祖立闯,王金良,李 娇,等. 牛病毒性腹泻病毒套式 RT-PCR

核酸物质污染基本上是由于使用了含有 BVDV 核酸物质的牛血清引起的。因此在使用牛血清前,尤其是在用于制造人或动物疫苗等生物制品时,应严格检测其是否被 BVDV 污染^[4]。《欧盟生物制品生产牛血清使用指南》要求用细胞培养法和免疫荧光抗体法确认牛血清病毒的感染性^[5]。《中国药典》三部附录也对新生牛血清检测提出了相同的技术要求。虽然各国对于牛血清的生产均有严格的技术规范,但由于检测技术存在局限性,市场上还是有部分牛血清存在 BVDV 污染现象^[6]。近 2 年,我国 2 次在进口小牛血清中检测到 BVDV,发布了 2 次风险预警,先后禁止新西兰、澳大利亚的相关产品入境。由于 BVDV 和 CSFV 存在抗原交叉性,带有 BVDV 抗原的血清不能用来培养 CSFV,而应用 BVDV

检测方法的建立及初步应用[J]. 中国兽医学报,2010,30(12): 1598-1601,1605.
[2]Peterhans E, Bachofen C, Stalder H, et al. Cytopathic bovine viral diarrhea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction [J]. Veterinary Research,2010,41(6):44.
[3]陶 洁,廖金虎,张 倩,等. 猪瘟感染牛病毒性腹泻病毒研究进展 [J]. 中国预防兽医学报,2014,36(5):410-413.
[4]祖立闯,魏 凤,苗立中,等. 应用套式 RT-PCR 检测猪瘟制品中牛病毒性腹泻病毒污染的研究[J]. 养猪,2011(6):97-100.
[5]The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Note for guidance on the use of bovine serum in the manufacture of human biological medicinal product(CPMP/BWP/1793/02) [M]. London: EMEA,2003:5-7.
[6]王竞晗,李 素,何文瑞,等. 进口胎牛血清中牛病毒性腹泻病毒的分离及鉴定[J]. 中国生物制品学杂志,2016,29(3):308-311.
[7]张 宁,秦建华,赵博伟,等. 牛病毒性腹泻-黏膜病诊断方法研究进展[J]. 动物医学进展,2008,29(2):93-97.