

张永英,马腾壑,刘彦威,等.猪瘟疫病毒强毒株 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J].江苏农业科学,2017,45(13):142-143.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.13.040

# 猪瘟疫病毒强毒株 SYBR Green I 实时 荧光定量 PCR 检测方法的建立

张永英,马腾壑,刘彦威,王慧真,朱美霞

(河北工程大学农学院动物医学重点实验室,河北邯郸 056021)

**摘要:**为准确快速诊断猪瘟疫病毒(classical swine fever virus,简称 CSFV)强毒,对 GenBank 已公布的 CSFV 的基因组全序列进行分析,根据 CSFV-5'NTR 核苷酸序列设计 1 对特异的荧光定量引物,建立快速检测猪瘟疫病毒强毒株 SYBR Green-I 实时荧光定量 PCR 方法。结果表明,该法具有很好的敏感性,对猪瘟疫病毒最低检出量为 10 拷贝/ $\mu\text{L}$ ;特异性强,与猪瘟疫兔化弱毒苗、伪狂犬病毒(简称 PRV)、猪细小病毒(简称 PPV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(简称 PRRSV)、圆环病毒组织苗(简称 PCV2)没有交叉反应;重复性好,变异系数(CV)为 0.47%~1.36%。该方法可用于猪瘟疫病毒的快速检测。

**关键词:**猪瘟疫病毒;强毒株;SYBR Green I;定量 PCR

**中图分类号:** S852.65<sup>+</sup>1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)13-0142-02

猪瘟疫(简称 CSF),是由猪瘟疫病毒(classical swine fever virus,简称 CSFV)引起的猪的一种热性、致死性、高度接触性传染病,是一种对猪危害性极大的传染病<sup>[1]</sup>。目前我国将其定为一类传染病,且已纳入国家强制免疫计划<sup>[2]</sup>。CSFV 是单股正链 RNA 病毒,基因组大小约为 12.3 kb。我国 CSFV 野毒株均属于基因 II 群,而 C 株属于基因 I 群,由于 C 株疫苗的广泛使用,即使在实验室检测 CSFV 野毒感染时,也难以将两者区分开。而且 CSFV 和牛病毒性腹泻病(简称 BVDV)、绵羊边界病毒(简称 BDV)同属,均能引起猪的感染,且存在血清学交叉反应,给 CSF 的鉴别诊断带来了困难。因此,建立一种快捷、准确、灵敏的诊断方法,对有效控制和扑灭猪瘟疫是非常有必要的。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

CSFV 石门系强毒株、HCV 兔化弱毒苗、猪繁殖与呼吸综合征病毒(简称 PRRSV)、猪细小病毒灭活苗(简称 PPV)、伪狂犬病毒灭活苗(简称 PRV)、圆环病毒组织苗(简称 PCV2)。由河北工程大学农学院预防实验室保存并提供。

SYBR Premi Ex Taq、Taq DNA 聚合酶、pMD18-T 载体等均购自宝生物工程(大连)有限公司。小量质粒提取试剂盒、胶回收纯化试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司。仪器主要有 Bio-RAD Mini 荧光定量 PCR 仪。

### 1.2 引物的设计与合成

参照 GenBank 中公布的 25 株 CSFV 基因组进行比较分析,采用 Primer Express2.0 软件设计了 1 对特异性引物,上游引物为 P1:5'-TTGGCATCATTCATAAGGG-3',下游引物

为 P2:5'-GATTACAACGCCATCTCTGTTACA-3'。引物由北京华大基因科技服务有限公司合成。

### 1.3 病毒基因组总 RNA 的提取

参照 Trizol 试剂使用说明书提取样品总 RNA。

### 1.4 反转录 cDNA 的合成

参照反转录酶 M-MuLV 使用说明书合成 cDNA,反应产物于 -20℃ 保存。20  $\mu\text{L}$  反应体系:4  $\mu\text{L}$  模板 RNA、2  $\mu\text{L}$  特异性引物 P2、6  $\mu\text{L}$  DEPC 水、4  $\mu\text{L}$  5 $\times$  buffer、1  $\mu\text{L}$  M-MuLV (200 U/ $\mu\text{L}$ )、1  $\mu\text{L}$  RNA 抑制剂、2  $\mu\text{L}$  dNTPs,42℃ 水浴 90 min,70℃ 水浴 10 min。

### 1.5 标准品的制备

反应结束后取 cDNA 产物进行电泳鉴定。回收大小为 548 bp 的目的条带,纯化后连接 pMD18-T 载体、转化大肠杆菌,经双酶切和 PCR 鉴定为阳性的重组菌按试剂盒说明提取其 DNA, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  比值在 1.8~2.0 的阳性重组质粒用于绘制标准曲线。根据  $D_{260\text{ nm}}$  值计算质粒浓度并换算成拷贝数,然后 10 倍稀释成  $1.0\times 10^9\sim 1.0\times 10^1$  拷贝/ $\mu\text{L}$  9 个梯度,分别以 9 个稀释度为模板进行 SYBR Green I 定量 PCR 检测。并且判定在 40 个循环内出现特异性扩增曲线的最低拷贝数。

### 1.6 SYBR Green I 定量 PCR 标准曲线的绘制

采用 25  $\mu\text{L}$  反应体系:SYBR Premix Ex Taq (2 $\times$ ) 12.5  $\mu\text{L}$ ,上、下游引物各 0.5  $\mu\text{L}$ ,模板 1.0  $\mu\text{L}$ ,用双蒸水补足至 25  $\mu\text{L}$ 。反应程序:95℃ 10 s;95℃ 5 s,60℃ 25 s,72℃ 30 s,40 个循环。反应结束后,采用软件制作溶解曲线。当荧光定量 PCR 检测结果有 S 形扩增曲线,判定待测样品为阳性;如为一条直线,则判定样品为阴性。

### 1.7 敏感性试验

将阳性模板从  $1.0\times 10^9\sim 1.0\times 10^1$  经 10 倍系列稀释的 9 个浓度梯度,各梯度稀释液分别取 1  $\mu\text{L}$  作为模板,测定其敏感性。

### 1.8 特异性试验

SYBR Green I 实时荧光 PCR 扩增猪瘟疫病毒兔化弱毒毒

收稿日期:2016-03-15

基金项目:河北省邯郸市科技局资助项目(编号:1422101047)。

作者简介:张永英(1972—),女,河北衡水人,硕士,副教授,主要从事动物疾病防控研究。E-mail:1626074123@qq.com。

苗株、石门强毒株、PRRSV、PCV2、PRV、PPV 基因组。

### 1.9 重复性试验

将 cDNA 进行 10 倍系列稀释,选 3 个稀释度,每个稀释度进行 3 次平行试验,用 SYBR Green I 定量 PCR 检测,根据  $C_T$  值差异计算组内变异系数(CV)。

## 2 结果与分析

### 2.1 SYBR Green - I 实时荧光 PCR 确定病毒的 $T_m$ 值

以石门毒株 cDNA 为模板,进行 SYBR Green - I 实时荧光定量 PCR,结果见图 1。判定标准:动力学曲线呈现指数扩增,阴性对照无扩增, $T_m$  在 83.5 ~ 84.5 °C 出现特异荧光信号时,判定为石门毒株(图 1)。

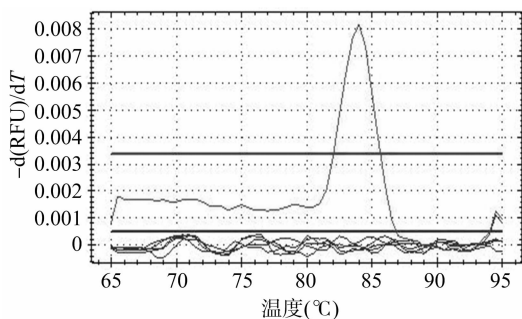


图1 定量 PCR 熔解曲线

### 2.2 荧光定量 PCR 标准曲线的建立

通过优化荧光定量 PCR 反应条件和体系,绘制检测猪瘟疫病毒的标准曲线(图 2)。结果显示,石门病毒荧光定量 PCR 标准品浓度从  $10^9 \sim 10^1$  拷贝/ $\mu$ L 具有很好的线性关系。

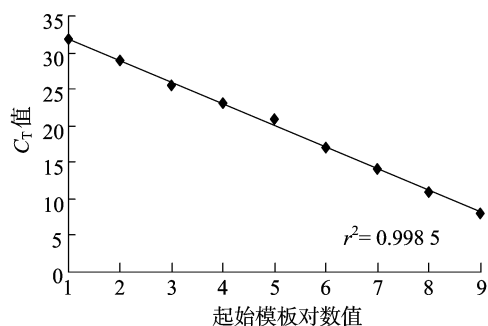


图2 定量 PCR 标准曲线

### 2.3 特异性试验

用建立的实时荧光定量 PCR 方法对猪瘟兔化弱毒苗、PRV、PPV、PRRSV、PCV2、CSFV 进行检测。结果显示,根据判定标准,除 CSFV 为阳性外,其他检测结果均为阴性(图 3)。

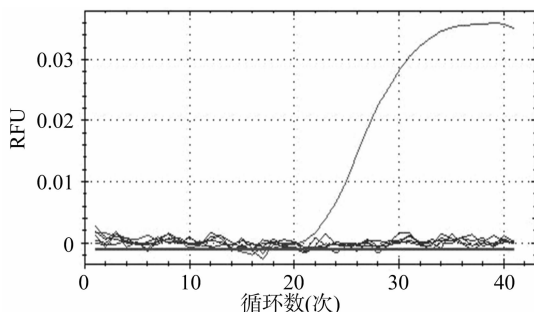


图3 定量 PCR 特异性试验结果

### 2.4 敏感性试验

利用石门病毒实时荧光定量 PCR 方法能检测到最低极限浓度为 10 个拷贝/ $\mu$ L。

### 2.4 重复性试验

从表 1 可以看出,各浓度梯度  $C_T$  变异系数在 0.47% ~ 1.36% 之间。提示该定量 PCR 方法稳定,重复性较好。

表1 定量 PCR 重复性试验结果

样品浓度	平均值(次)	标准差(次)	变异系数(%)
$10^2$	18.05	0.17	0.94
$10^5$	25.85	0.35	1.36
$10^6$	29.50	0.14	0.47

## 3 结论与讨论

SYBR Green I 染料实时荧光定量 PCR 法在核酸检测方面与血清抗体中和试验、间接 ELISA 等方法相比较,在敏感性、特异性、耗时等方面有许多优点,且能区分病毒株和疫苗株。SYBR Green I 与所有的双链 DNA 相结合,不需要特别定制,通用性好,而且它不需要用到对人体有致癌危害的 EB<sup>[3-4]</sup>。但是该方法易受引物二聚体或非特异性扩增产物干扰,对引物要求高<sup>[5-6]</sup>。为确保试验,严格按定量 PCR 要求设计 1 对特异性引物,经过反应体系优化,熔解曲线测试和凝胶电泳验证,结果显示,熔解曲线为单一波峰, $T_m$  值均一;凝胶电泳显示,目的条带都在同一位置,并无杂带干扰。因此,证实该引物设计和反应体系完全符合试验要求。

经过阳性模板稀释检测证明,本试验可以检测到  $1 \times 10^1$  拷贝/ $\mu$ L 的病毒模板,灵敏度较高。在特异性试验中该方法与 PRRSV、PPV、PRV、PCV2、猪瘟兔化弱毒苗不存在交叉反应,说明该方法特异性强。本研究建立了猪瘟强毒株 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 快速检测方法,为猪瘟病毒早期诊断奠定了基础,提供了防控猪瘟的有效技术手段。

### 参考文献:

- [1] Stegeman A, Elbers A, de Smit H, et al. The 1997—1998 epidemic of classical swine fever in the Netherlands [J]. Veterinary Microbiology, 2000, 73 (2/3): 183—196.
- [2] Mennig V. Pestiviruses; a review [J]. Veterinary Microbiology, 1990, 23 (1/2/3/4): 35—54.
- [3] Li H, Yang H. Infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus suppresses the antibody response to classical swine fever virus vaccination[J]. Veterinary Microbiology, 2003, 95 (4): 295—301.
- [4] Gardner S N, Kuczmarski T A, Vitalis E A, et al. Limitations of TaqMan PCR for detecting divergent viral pathogens illustrated by hepatitis A, B, C, and E viruses and human immunodeficiency virus [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41 (6): 2417—2427.
- [5] Ciglenečki U J, Grom J, Toplak I, et al. Real-time RT-PCR assay for rapid and specific detection of classical swine fever virus: comparison of SYBR Green and TaqMan MGB detection methods using novel MGB probes[J]. Journal of Virological Methods, 2008, 147 (2): 257—264.
- [6] Cheng D, Zhao J J, Li N, et al. Simultaneous detection of classical swine fever virus and North American genotype porcine reproductive and respiratory syndrome virus using a duplex real-time RT-PCR [J]. J Virol Methods, 2008, 151 (2): 194—199.