

夏文龙,余树培,吴植,等. 荧光定量 RT-PCR 检测高致病性 PRRSV 接触感染仔猪增殖动态[J]. 江苏农业科学,2018,46(10):169-172.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.10.043

荧光定量 RT-PCR 检测高致病性 PRRSV 接触感染仔猪增殖动态

夏文龙¹, 余树培¹, 吴植¹, 郭长明¹, 卢会鹏², 孙怀昌², 朱善元¹

(1. 江苏农牧科技职业学院/江苏省兽用生物制药高新技术研究重点实验室, 江苏泰州 225300;

2. 扬州大学兽医学院/江苏省重要动物疫病与人兽共患病协同创新中心, 江苏扬州 225009)

摘要:为检测高致病性 PRRSV 接触感染仔猪的增殖动态,建立了荧光定量 RT-PCR 方法,该方法在模板为 $2.18 \times 10^1 \sim 2.18 \times 10^6$ 拷贝范围内具有良好线性关系,相关系数为 0.996,灵敏度比常规 RT-PCR 高 1 000 倍,并且与其他猪病病毒无交叉反应;在 3 头健康仔猪中引入 1 头 PRRSV 人工感染猪,定期监测仔猪接触感染 PRRSV 后病毒血症和排毒水平,研究结果表明,接触感染猪后分别于 3、5 d 首次在血清和粪便中检出 PRRSV,相比人工接种猪推迟 2 d,此后 7 d 内病毒含量迅速上升并维持较高水平直至死亡。本研究为 PRRSV 在猪体内的定量检测提供了有效手段,为进一步了解 PRRSV 的传播机制以及建立防治 PRRSV 感染的仔猪模型提供了基础数据。

关键词:猪繁殖与呼吸综合征;荧光定量 RT-PCR;增殖动态

中图分类号: S858.285.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)10-0169-04

猪繁殖与呼吸综合征(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)是由 PRRS 病毒(PRRSV)引起的一种高度接触性传染病,以母猪繁殖障碍和仔猪及育肥猪呼吸道疾病为主要特征^[1]。该病于 1987 年在美国和加拿大首次发现并迅速蔓延到世界各地,给全球养猪业造成了巨大经济损失^[2]。2006 年,我国大规模暴发以高热、高死亡率为主要特征的 PRRS 疫情,研究表明其主要病原为高致病性 PRRSV 变异株^[3],鉴于 PRRSV 具有复杂的感染及免疫逃避机制^[4],目前防控手段无法将其净化和根除。

PRRS 主要依靠疫苗接种进行预防控制,近年来,有许多学者利用 micro-RNA^[5]、干扰素^[6]、受体阻断^[2]等新策略进行抗病毒研究,而这些研究前提是具备稳定、可靠的动物模型,以便评价其保护效果。目前,PRRSV 人工感染仔猪主要是通过肌肉注射和滴鼻方式接种^[7-8],缺少接触感染的相关研究资料,为了模拟 PRRSV 在猪群内的自然扩散,本试验通过同居饲养方式在健康猪中引入 PRRS 病猪,并建立荧光定量 RT-PCR 方法,动态监测感染仔猪的病毒血症和排毒水平,为进一步了解 PRRSV 的传播机制和建立防治 PRRSV 感染的仔猪模型提供了参考依据。

1 材料与方法

收稿日期:2017-10-06

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号: CX(14)2087];江苏省自然科学基金(编号: BK20151576);江苏高校优势学科建设工程(编号: PAPD);江苏省人兽共患病重点实验室项目;江苏农牧科技职业学院人才项目(编号: NSFPT201631)。

作者简介:夏文龙(1989—),男,江苏盐城人,博士,主要从事动物传染病防治研究。E-mail: 469525768@qq.com。

通信作者:朱善元,博士,教授,主要从事动物疾病防控研究。

E-mail: jstzsy@126.com。

1.1 主要试剂

AxyPrep 质粒 DNA 小提试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒购自 AXYGENT 公司; rTaq DNA 聚合酶、pMD-18T 载体、MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit、PrimeScript RT Master Mix、SYBR Premix Ex Taq II 为日本 TaKaRa 公司产品; PRRS ELISA 检测试剂盒为美国 IDEXX 公司产品;引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 病毒和试验动物

猪圆环病毒 2 型(PCV2)、猪伪狂犬病毒(PRV)、猪瘟病毒(CSFV)、高致病性 PRRSV JXA1 毒株均由笔者所在实验室保存;PRRS 阴性仔猪购于江苏省如东某养殖场,动物试验在江苏农牧科技职业学院新兽药研发临床试验中心进行。

1.3 标准品制备

按照 TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit 操作说明,从 PRRSV JXA1 病毒液中提取 RNA,参考 TaKaRa PrimeScript RT Master Mix 试剂盒提供的反应体系进行反转录,将获得的 cDNA 作为模板,利用针对 PRRSV ORF7 编码序列的特异性引物(F: 5'-GGGGAATGCCAGYCACTCAA-3', R: 5'-GCCAGRGGAAAATGKGGCTTCTC-3'),进行 PCR 扩增,回收目的片段后,连接 pMD-18T 载体,转化 DH5 α 感受态细胞,挑选阳性克隆并送测序,鉴定正确的重组质粒作为标准品。

1.4 标准曲线绘制

将标准品 10 倍梯度倍比稀释作为模板,按照 TaKaRa SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒说明书配制反应体系并在 ABI 7300 仪器上进行荧光定量 PCR 反应条件的设置,优化后的反应程序为:95℃ 预变性 30 s;95℃ 变性 5 s,60℃ 退火并延伸 31 s,共扩增 40 个循环,延伸结束收集荧光信号;最后于 60~95℃ 过程中制作熔解曲线。

1.5 重复性试验

为验证该方法重复性,随机选取 3 个不同稀释度的标准质粒作为模板,重复 3 次扩增,记录各模板 C_T 值,计算其变异系数,变异系数 = 标准偏差/平均数。

1.6 敏感性、特异性试验

将不同稀释度的标准品作为模板,分别进行常规 RT-PCR 扩增以及实时荧光 PCR 试验,以确定 2 种方法所能检测的最低拷贝数,进行灵敏度比较;分别以猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 和猪瘟病毒 (CSFV) RNA 反转录得到的 cDNA,猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 和猪伪狂犬病毒 (PRV) DNA 为模板,并设立空白对照,在相同条件下进行实时荧光 PCR 反应,分析扩增曲线及 C_T 值,验证本方法的特异性;将 PRRSV cDNA 和标准品质粒作为模板进行荧光定量 PCR 反应后,观察溶解曲线,确保无引物二聚体及非特异扩增。

1.7 动物试验分组

将 8 头 28 日龄断奶仔猪平均分为 2 组,每组 4 头,置于 2 个负压隔离器中饲养 3~5 d,观察无异样表现,前腔静脉采集血液并分离血清,经 ELISA 检测 PRRSV 特异性抗体为阴性;提取 RNA 后,通过上述 RT-PCR 方法检测 PRRSV 抗原阴性。第 1 组作为攻毒组,随机选择 1 头仔猪肌肉注射和滴鼻接种 PRRSV JXA1 (1×10^5 TCID₅₀),与其余 3 头健康仔猪同居饲养;第 2 组作为空白对照组,接种相同量 DMEM 细胞培养液;试验期间每日观察并记录各仔猪临床症状。

1.8 病毒血症检测

在同居饲养后 1、3、5、7、10、13 d,前腔静脉采集每组仔猪血液 5 mL 并分离血清,取 200 μ L 提取病毒 RNA,根据上述定量 RT-PCR 方法,检测各血清样品中病毒基因组拷贝数。

1.9 粪便排毒检测

在同居饲养后 1、3、5、7、10、13 d,采集每组仔猪粪便 1 g 并用 10 mL PBS 溶液重悬,8 000 g 离心 10 min 后取 200 μ L 上清,根据上述定量 RT-PCR 方法,检测各粪便样品中

PRRSV 基因组拷贝数。

2 结果与分析

2.1 标准质粒鉴定

通过常规 RT-PCR 成功扩增预期大小的 130 bp 目的片段(图 1),克隆至 pMD-18T 载体,获得重组质粒 pMD-ORF7,测序结果表明,扩增的 cDNA 基因片段和已发表 PRRSV ORF7 (GenBank 登录号:EF112445) 编码序列的同源性为 99.7%。利用紫外分光光度计测其 $D_{260\text{ nm}}$ 值,根据计算公式^[9]:质粒拷贝数(拷贝/ μ L) = $6.02 \times 10^{23} \times$ 质粒浓度/平均分子量,换算标准质粒拷贝数为 2.18×10^9 拷贝/ μ L。

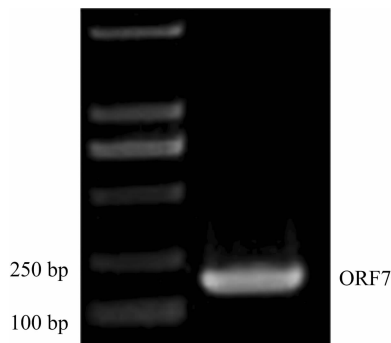


图1 RT-PCR 扩增 ORF7 编码序列

2.2 标准曲线建立和重复性试验

将标准质粒连续 10 倍系列稀释,分别取 $2.18 \times 10^1 \sim 2.18 \times 10^6$ 拷贝/ μ L 共 6 个稀释度作为模板进行荧光定量 PCR 反应,以 C_T 值为纵坐标、模板拷贝数为横坐标,获得标准曲线(图 2-a),回归方程为 $y = 33.855 - 3.16x$, $r^2 = 0.996$,结果表明,其线性关系良好、相关系数较高。随机选取 3 个不同稀释度作为模板重复扩增 3 次,结果表明,每个稀释度之间的 C_T 值误差非常小(图 2-b),变异系数均小于 0.005,表明该方法具有较高的准确性和重复性。

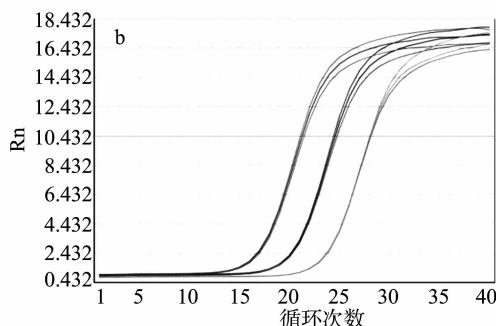
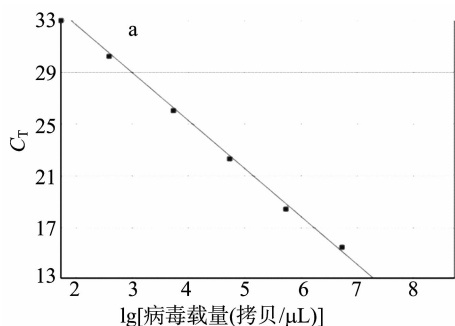


图2 标准曲线建立(a)和重复性试验扩增曲线(b)

2.3 灵敏度比较

以不同稀释度的标准质粒为模板,分别进行常规 RT-PCR 和荧光定量 RT-PCR 试验,结果表明,常规 RT-PCR 方法的最小检出量为 2.18×10^4 拷贝(图 3-a),荧光定量 PCR 方法的最小检出量为 2.18×10^1 拷贝(图 3-b),比常规方法高 1 000 倍。

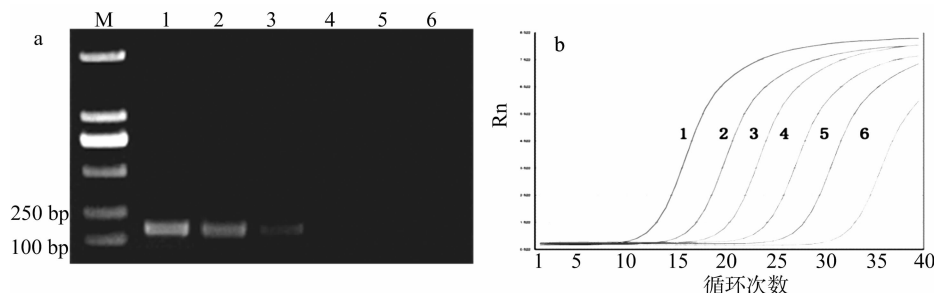
2.4 特异性分析

分别以 PRRSV、CSFV RNA 反转录产物,PCV2 和 PRV 的 DNA 为模板,相同条件下进行定量 RT-PCR 反应,结果显

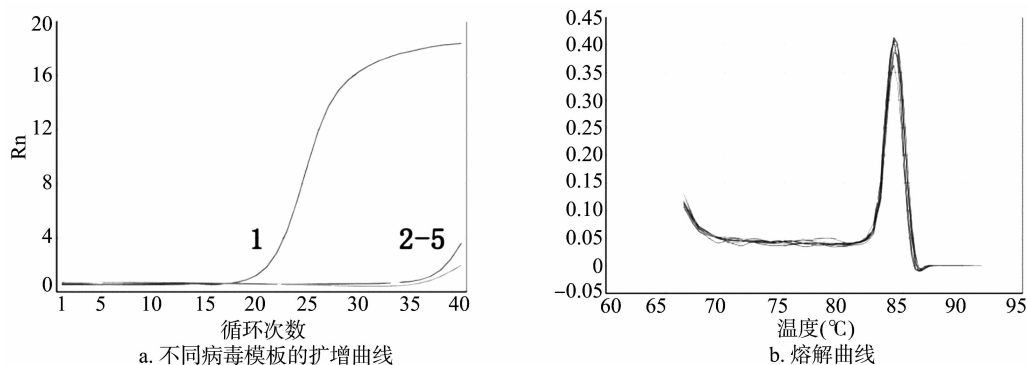
示:仅 PRRSV 基因组出现扩增曲线,其余样品检测结果均为阴性(图 4-a);随后以 PRRSV 反转录产物和标准质粒作为模板进行荧光 PCR 扩增,反应后的熔解曲线波峰单一,无引物二聚体或非特异扩增(图 4-b),说明本方法具有较好的特异性。

2.5 临床症状观察

人工接种猪于攻毒后 2 d 开始即出现体温升高,并于 5 d 左右出现呼吸困难、咳嗽等 PRRS 典型症状,持续至 11 d 死亡;同居接触后仔猪于 4~5 d 开始体温升高,7~8 d 表现出



M—DNA 分子质量标准 DL2000; 1~6—分别代表 2.18×10^1 、 2.18×10^6 拷贝/ μ L
图3 常规 RT-PCR(a)和荧光定量 PCR(b)灵敏度比较



a. 不同病毒模板的扩增曲线
1—PRRSV cDNA 作为模板; 2~5—分别代表 CSFV、PCV2、PRV 和空白对照的检测结果
图4 荧光定量 RT-PCR 特异性试验

相应临床症状,并分别于 12、13 d 全部死亡。

2.6 病毒血症检测

定期采集仔猪血清样品,利用建立的荧光定量 RT-PCR 方法对病毒血症进行检测,检测结果见图 5。人工接种仔猪在 1 d 时即为 PRRSV 检测阳性,随后病毒载量逐渐上升,并维持较高水平,病毒载量为 $10^{8.4} \sim 10^{8.7}$ 拷贝/mL 直至 11 d 死亡;接触感染后仔猪在 3 d 首次检出 PRRSV,7 d 内迅速升高至 $10^{8.5}$ 拷贝/mL,并稳定在较高含量,至 13 d 时 3 头仔猪全部死亡;空白对照组仔猪全部血清样品均检测为 PRRSV 阴性。

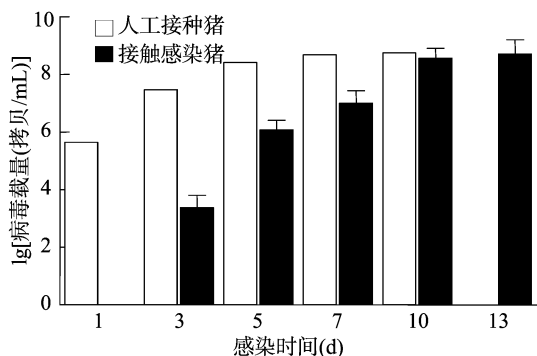


图5 病毒血症动态检测

2.7 粪便排毒检测

定期采集试验仔猪粪样,荧光定量 RT-PCR 检测结果见图 6。人工接种后仔猪在 3 d 为 PRRSV 检测阳性,随后病毒含量呈上升趋势并维持较高水平,病毒载量为 $10^{4.5}$ 拷贝/g 至 11 d 死亡;同居后感染仔猪于 5 d PRRSV 检测阳性,7 d 排毒量迅速上升至 $10^{4.0}$ 拷贝/g,并稳定在较高水平至 13 d 死亡;空白对照组仔猪粪便检测结果均为阴性。

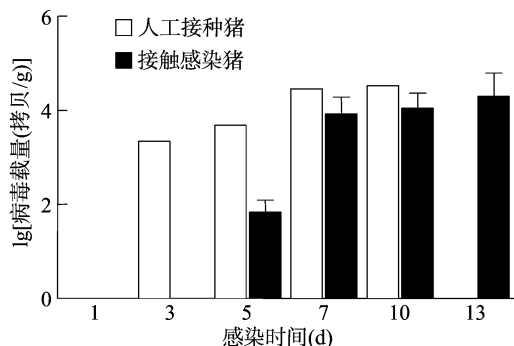


图6 粪便排毒动态监测

3 讨论

常规 RT-PCR 方法检测 PRRSV 在动物体内动态分布时,仅能做定性或半定量分析,而荧光定量 PCR (FQ-PCR) 可以确定病毒在动物组织内的精确拷贝数,因此该技术已越来越多地应用于病毒定量分析的研究中^[10],另外,相比传统的 TCID₅₀ 法检测病毒含量,FQ-PCR 方法更加快速、稳定^[11]。本试验建立的 PRRSV FQ-PCR 检测方法灵敏度比常规 RT-PCR 高 1 000 倍,并且特异性强,和其他常见病毒无交叉反应,具有良好的重复性和稳定性,为 PRRSV 接触感染仔猪后的增殖动态检测提供了技术支持。

PRRSV 动物感染试验不易成功,与宿主、病毒和试验环境等方面密切相关^[12]。猪是 PRRSV 感染和出现临床症状的唯一宿主,用于 PRRSV 动物试验的理想模型是 SPF/CDCD (cesarean-derived colostrum-deprived) 猪和 PRRS 阴性猪^[13],前 2 种试验猪获取比较困难,因此,本试验首先通过 RT-PCR 和 ELISA 方法从某 PRRS 非免疫猪场筛选获得

PRRSV 抗原和抗体双阴性猪,用于感染试验,而所用 PRRSV 毒株为高致病代表株 JXA1^[14],能够引起 PRRS 典型病变;另外,动物试验均在负压隔离器中进行,免受外界环境干扰。以上因素均保证了 PRRSV 能够通过接触传播感染仔猪。

为模拟自然状态下的 PRRSV 传播,本试验首先向 1 头易感仔猪肌肉注射和滴鼻接种 PRRSV JXA1,随后将其和另外 3 头健康仔猪同居饲养,研究结果表明,人工接种猪于攻毒后 2 d 开始即出现体温升高,并于 5 d 左右出现呼吸困难、咳嗽等 PRRS 典型症状,至 11 d 死亡,同居接触仔猪的发病时间推迟 2~3 d,并分别于 12、13 d 全部死亡;通过荧光定量 RT-PCR 对接触感染仔猪的病毒血症和粪便排毒进行动态监测,结果表明,其血清和粪便分别于 3、5 d 首次检测 PRRSV 阳性,相比人工接种猪推迟 2 d 左右,病毒在仔猪体内增殖动态和人工接种猪相似,感染后 7 d 迅速上升并维持在较高水平,说明仔猪确实死于 PRRSV 感染。综上所述,本试验为建立 PRRSV 接触感染仔猪模型奠定了基础,为高致病性 PRRS 新型疫苗的研发及免疫效果评价等研究提供了参考数据。

参考文献:

- [1] Done S H, Paton D J. Porcine reproductive and respiratory syndrome: clinical disease, pathology and immunosuppression [J]. *Veterinary Record*, 1995, 136(2): 32-35.
- [2] Chen Y, Guo R, He S, et al. Additive inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection with the soluble sialoadhesin and CD163 receptors [J]. *Virus Research*, 2014, 179(1): 85-92.
- [3] 童光志, 周艳君, 郝晓芳, 等. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒的分离鉴定及其分子流行病学分析[J]. *中国预防兽医学报*, 2007, 29(5): 323-327.
- [4] Lunney J K, Fang Y, Ladinig A, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): pathogenesis and interaction with the immune system[J]. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2016, 4(1): 129-154.
- [5] Zhu L, Bao L, Zhang X, et al. Inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication with exosome-transferred artificial microRNA targeting the 3' untranslated region[J]. *Journal*

- of Virological Methods*, 2015, 223: 61-68.
- [6] 王彦彬, 孙向丽, 魏战勇, 等. 猪干扰素 α 和 γ 在杆状病毒中共表达及对 PRRSV 抑制作用[J]. *中国农业科学*, 2011, 44(9): 1931-1938.
- [7] Lin H, Ma Z, Hou X, et al. Construction and immunogenicity of a recombinant swinepox virus expressing a multi-epitope peptide for porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 43990.
- [8] Park C, Seo H W, Han K, et al. Evaluation of the efficacy of a new modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine (Fostera PRRS) against heterologous PRRSV challenge [J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 172(3/4): 432-442.
- [9] Zhou G, Cai W, Liu X, et al. A duplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction for the detection and quantitation of avian leukosis virus subgroups A and B [J]. *Journal of Virological Methods*, 2011, 173(2): 275-279.
- [10] Xiao S, Chen Y, Wang L, et al. Simultaneous detection and differentiation of highly virulent and classical Chinese-type isolation of PRRSV by real-time RT-PCR [J]. *Journal of Immunology Research*, 2014(9): 809656.
- [11] Martínez E, Riera P, Sitjà M, et al. Simultaneous detection and genotyping of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by real-time RT-PCR and amplicon melting curve analysis using SYBR Green [J]. *Research in Veterinary Science*, 2008, 85(1): 184-193.
- [12] Martínezlobo F J, Díezfuertes F, Segalés J, et al. Comparative pathogenicity of type 1 and type 2 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in a young pig infection model [J]. *Veterinary Microbiology*, 2011, 154(1/2): 58-68.
- [13] Rose N, Renson P, Andraud M, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) modified-live vaccine reduces virus transmission in experimental conditions [J]. *Vaccine*, 2015, 33(21): 2493-2499.
- [14] Tian K, Yu X, Zhao T, et al. Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark [J]. *PLoS One*, 2007, 2(6): e526.