

温书香,安利民,赵 协,等. 猪伪狂犬病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 江苏农业科学,2019,47(7):50-53.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.07.013

# 猪伪狂犬病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用

温书香,安利民,赵 协,张 军,潘燕燕,葛位西

(河南省漯河市动物疫病预防控制中心,河南漯河 462300)

**摘要:**为建立一种快速、特异、鉴别诊断猪伪狂犬病毒野毒感染与疫苗免疫株,参考 GenBank 上公布的猪伪狂犬病毒 *gE* 基因序列设计了 1 对引物,以猪伪狂犬病毒核酸作为模板,PCR 方法将扩增得到的核酸序列克隆到 PEGM-18T 载体上,将克隆载体转化到 DH5 $\alpha$  感受态细胞中,测序鉴定阳性重组质粒作为标准品建立猪伪狂犬病毒荧光定量 PCR 检测方法。结果表明,本研究所建立的猪伪狂犬病毒荧光定量 PCR 方法检测灵敏度可达 10 拷贝,与蓝耳病毒、猪细小病毒、猪瘟病毒、猪圆环病毒不发生交叉反应,具有良好的特异性和可重复性。此外,对 33 份疑似猪伪狂犬病料也作了检测,结果表明,2 份病料均为阳性。本研究建立的猪伪狂犬病毒实时荧光定量 PCR 检测方法具有灵敏度高、特异性强、重复性好、不发生交叉反应等优点,可用于日常猪伪狂犬病毒野毒感染与疫苗免疫株的鉴别诊断。

**关键词:**猪伪狂犬病毒;荧光定量 PCR 技术;灵敏度;标准曲线

**中图分类号:** S858.285.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)07-0050-04

猪伪狂犬病 (PRV) 是由称猪疱疹病毒感染引起的一种高度接触性、传染性疾病。猪是本病的传染源及自然宿主,本病的暴发可引起妊娠母猪的流产率增高、仔猪的神经症状、公猪因睾丸炎丧失种用价值以及成年猪的呼吸系统疾病,每年给我国养猪业造成严重的经济损失<sup>[1-3]</sup>。任何年龄段的猪感染 PRV 后均能形成潜伏感染,感染 PRV 的猪终身带毒。在一定条件下 PRV 病毒可以被激活,引起隐性猪的复发性感染和散毒。因此,及时地诊断 PRV 是预防和控制该病的有效手段。在病原学诊断方法中,荧光定量 PCR 方法具有灵敏度高、特异性强、快速高通量等优点,广泛应用于多种动物疫病的诊断<sup>[4]</sup>。本研究根据 PRV 病毒核酸设计了 1 对特异性引物,建立了一种快速鉴别诊断 PRV 病毒的荧光定量 PCR 方

法,为河南省漯河市猪伪狂犬病的早期鉴别诊断和病毒分离提供了一种快速检测和定性的方法,为后续猪伪狂犬病的净化提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 病料采集** 漯河市问十乡一散养户母猪存栏量 24 头,其中初产母猪 8 头,经产母猪 16 头。2016 年 11 月 15 日夜里该养猪场 1 头经产母猪产仔 15 头,2 d 晚上有 4 头仔猪表现体温升高、食欲不振、精神萎靡、站立不稳等症状,3 d 早上有 5 头仔猪相继死亡,另有 5 头仔猪相继发病并出现相似的临床症状,1 头仔猪表现为典型的猪伪狂犬病临床症状,犬卧姿势、原地转圈运动、叫声嘶哑,随后体温下降很快死亡。根据临床症状和剖检结果判定为疑似猪伪狂犬病,对发病和死亡的仔猪进行无菌采血,并采集心脏、肝脏、肾脏、脑、脾脏等组织进行充分研磨,用于 PRV 病毒的鉴定。

**1.1.2 毒株、试剂及仪器设备** 本研究所用猪伪狂犬病毒细胞培养物,由河南省疫控中心赠送;猪伪狂犬病毒 *gE*、*gB* 抗

收稿日期:2017-11-22

基金项目:2015 年河南省漯河市青年拔尖人才支持计划。

作者简介:温书香(1988—),女,河南商丘人,硕士,初级兽医师,主要从事猪伪狂犬病研究。E-mail:1327372534@qq.com。

通信作者:赵 协,硕士,中级兽医师,主要从事猪伪狂犬病研究。E-mail:wiwj6969@126.com。

[22] Bottema C D K, Sarkar G, Cassay J D, et al. PCR - amplification of specific alleles: a general method of rapidly detecting mutations, polymorphisms and haplotypes[J]. Meth Enzymol, 1993, 288(1): 388-402.

[23] 乐素菊,刘鹏飞,曾慕衡,等. 超甜玉米 *bt2* 基因 SNP 位点的分析及分子标记辅助筛选[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2012, 40(11): 73-78.

[24] 江云珠. 中国稻种资源同工酶和 SSR 标记遗传多样性研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2002.

[25] 赵 波,叶 剑,金文林,等. 不同类型小豆种质 SSR 标记遗传多样性及性状关联分析[J]. 中国农业科学, 2011, 44(4): 673-682.

[26] 陈 婧,李建平. 西北地区糯玉米自交系遗传多样性研究[J]. 玉米科学, 2014, 22(3): 29-35.

[27] 王风格,田红丽,赵久然,等. 中国 328 个玉米品种(组合) SSR 标记遗传多样性分析[J]. 中国农业科学, 2014, 47(5): 856-864.

[28] 李齐向,张小中,涂前程,等. 基于 SSR 分子标记的青贮玉米自交系遗传多样性分析[J]. 福建农业学报, 2013, 28(4): 320-323.

[29] 胡 萍,杨恩琼,施文娟,等. 贵州 108 份地方玉米品种的 SSR 遗传多样性分析[J]. 种子, 2012, 9(9): 61-65, 68.

[30] 王利锋,李会勇,唐保军,等. 利用表型和 SSR 标记分析河南省玉米地方品种的遗传多样性[J]. 中国农业科学, 2009, 42(4): 1136-1144.

体检测试剂盒,购于美国 IDEX 公司;猪伪狂犬病毒 *gE* 基因实时荧光定量 PCR 检测试剂盒,购自上海之江生物科技股份有限公司;SYBR Green 荧光染料、PMD-18T 载体、DH5 $\alpha$ ,均购自 TaKaRa;2  $\times$  Taq Mix、质粒提取试剂盒,均购自天根生化科技(北京)有限公司,14 mL 摇菌管,购自美国 BD 公司。

1.1.3 仪器设备 酶标仪购自美国宝特公司,超低温冰箱购自中科美菱,电热恒温水浴锅购自上海树立仪器仪表公司,PCR 仪、电泳仪均购自美国伯乐,荧光定量 PCR 仪购自美国热电公司,凝胶成像分析系统购自美国 Protein Simple 公司,台式高速冷冻离心机购自德国艾本德股份公司(Eppendorf AG),掌上离心机购自美国赛洛捷克,生物安全柜购自上海力申。

1.1.4 引物设计及合成 从 NCBI 上下载 7 个猪伪狂犬病毒保守基因 *gE* 基因核酸序列,用 DNAMAN 软件将以上 7 种序列进行比对,寻找突变率较低的区域用 Primer 3 在线软件进行引物设计,用 Oligo 6 对设计的多对引物进行评价,最终选择 1 对最优的引物作为本次荧光定量 PCR 方法建立所用引物(表 1)。

表 1 荧光定量 PCR 引物

引物	引物序列 (5'→3')	基因	产物大小 (bp)
<i>gE</i> -F	5'-CTTCCACTCGCAGCTCTTCT-3'	<i>gE</i>	165
<i>gE</i> -R	5'-TAGATGCAGGGCTCGTACAC-3'		

1.2 方法

1.2.1 PRV *gE* 抗体检测结果的判定 将无菌采集的 6 份猪血清用 PRV *gE/gB* 抗体检测试剂盒进行检测,结果判定依据试剂盒说明书: $S/N$  值 $\leq 0.5$  判为抗体阳性; $0.5 < S/N \leq 0.6$  判为可疑; $S/N \geq 0.6$  判为阴性。

1.2.2 PMD-*gE* 质粒的构建 以 PRV 全毒为模板,采用“1.1.5”节的引物进行扩增,反应条件:95  $^{\circ}\text{C}$  5 min 预变性;95  $^{\circ}\text{C}$  20 s,58  $^{\circ}\text{C}$  20 s,72  $^{\circ}\text{C}$  20 s,30 个循环;最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。反应结束后将 PCR 产物进行电泳和切胶回收,将回收产物与 PMD18-T 载体连接 2 h 并全部转入 DH5 $\alpha$  细胞中,加入无氨苄抗性的 LB 液体培养基,180 r/min 摇菌 1 h,取 100  $\mu\text{L}$  涂布到含有氨苄抗性的 LB 固体培养基上,37  $^{\circ}\text{C}$  温箱过夜,挑取阳性单克隆菌落用 PCR 方法鉴定,并将鉴定为阳性的质粒送测序。将测序正确的质粒作为荧光定量 PCR 的重组质粒标准品,用 Nanodrop 测定质粒浓度并计算拷贝数,拷贝数=质粒浓度 $\times 6.02 \times 10^{23}/(660 \times \text{质粒总长度})$ 。

1.2.3 荧光定量 PCR 方法的建立和条件的优化 荧光定量 PCR 反应体系的组成:2  $\times$  Mix 12.5  $\mu\text{L}$ , PRV 上下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 2.0  $\mu\text{L}$ , 无菌蒸馏水 6.5  $\mu\text{L}$ , DNA 2.0  $\mu\text{L}$ 。反应条件为:95  $^{\circ}\text{C}$  5 min 预变性;95  $^{\circ}\text{C}$  20 s,58  $^{\circ}\text{C}$  20 s,72  $^{\circ}\text{C}$  20 s,30 个循环;最后 72  $^{\circ}\text{C}$  总延伸 10 min。根据以上反应条件,以 PRV 病毒株为模板,分别对引物浓度范围(2.5 ~ 15.0  $\mu\text{mol/L}$ )和退火温度(52 ~ 60  $^{\circ}\text{C}$ )进行优化。

1.2.4 标准曲线的建立 将构建的 PRV 阳性质粒用无菌蒸馏水先稀释至  $1 \times 10^8$ ,再 10 倍系列稀释 7 个梯度,并且以每个稀释度的稀释液为模板,进行荧光定量 PCR 反应,反应条件按照优化好的条件进行。

1.2.5 荧光定量 PCR 特异性检测 将笔者所在实验室购买

的猪瘟、猪蓝耳、猪圆环、口蹄疫病毒核酸连同猪伪狂犬病毒核酸,采用本研究所建立的诊断方法一同检测,以验证该方法的特异性。

1.2.6 重复性试验 分别取  $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^2$  拷贝/ $\mu\text{L}$  质粒进行 3 次批内和批间的重复试验,计算本方法的变异系数,判定本检测方法是否可重复。

1.2.7 临床样本的检测 采用本研究所建立的 PRV 荧光定量 PCR 方法对 6 份猪伪狂犬病疑似病例进行检测,所得结果与 PRV 检测试剂盒进行对比,判定该方法是否能够用于临床样本的检测。

2 结果与分析

2.1 PRV *gE/gB* 抗体检测结果

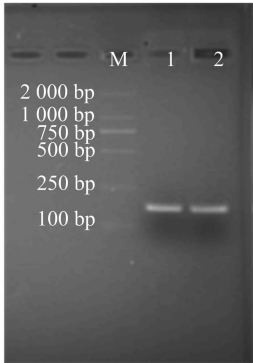
本试验将采集的 6 份仔猪血清做猪伪狂犬病毒抗体水平检测,检测结果见表 2。由表 2 可知,发病猪场仔猪猪伪狂犬病 *gB* 抗体阳性数为 0, *gE* 抗体阳性数为 6 个。

表 2 抗体检测结果

抗体	检测个数(个)	阳性个数(个)	阳性率(%)
<i>gB</i>	6	0	0
<i>gE</i>	6	6	100

2.2 引物扩增结果

使用设计好的引物,以 PRV 全病毒进行扩增,获得约 200 bp 的核酸条带(图 1),与预期结果相符合。



1、2—阳性样品的扩增; M—DNA mark  
图1 PRV 特异性引物的扩增

2.3 PMD18-T-*gE* 阳性克隆的鉴定

用设计的引物对克隆的载体进行阳性鉴定,结果见图 2。由图 2 可知,该引物成功克隆出约 200 bp 条带,与预期结果一致。将 PCR 鉴定阳性的样品进行测序,测序结果正确。

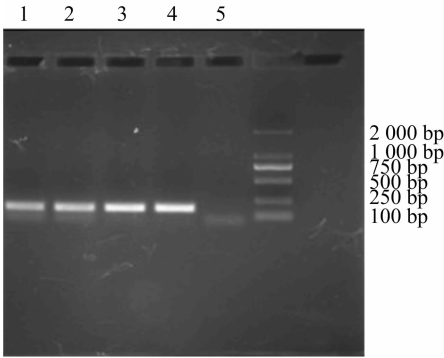


图2 阳性质粒鉴定

2.4 荧光定量 PCR 反应条件的确定

为选择最优的荧光定量 PCR 反应条件,本研究同时设立在不同引物浓度和退火温度的条件下进行扩增,结果见图 3。由图 3 可知,当引物浓度为 0.02  $\mu\text{mol/L}$ 、退火温度为 58  $^{\circ}\text{C}$  时,电泳核酸条带丰度最好,无非特异扩增。

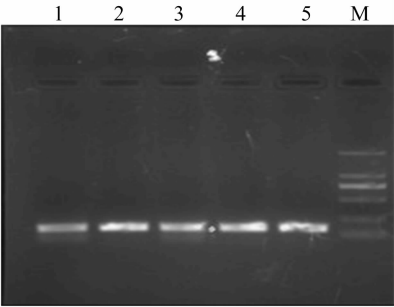


图3 退火温度和引物浓度的选择

2.5 荧光定量 PCR 标准曲线的建立

用含有目的片段质粒作为标准品,将标准品浓度为  $10^9$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的质粒进行 10 倍稀释 8 个梯度,每个稀释度的质粒作为模板进行荧光 PCR 扩增。由图 4、图 5 可知,每个稀释度的扩增曲线之间的距离均匀,标准曲线相关系数为 3.42,  $R^2$  值为 0.998,扩增效率为 102.426,每个稀释度的 3 个重复之间的标准差为 0.243,说明定量结果精密度高、重复性好,本研究所建立的标准曲线参数优越于标准的规定,可用于猪伪狂犬病的定量检测。

2.6 荧光定量 PCR 方法的特异性和准确性

本研究将猪瘟、猪蓝耳、猪圆环、口蹄疫和猪伪狂犬病毒核酸作为模板进行荧光 PCR 扩增,结果显示,除了猪伪狂犬病毒外,其余病毒的扩增曲线均为直线且在基线以下,猪伪狂犬病毒的扩增曲线为典型的 S 形(图 6、图 7)。说明本研究所建立的荧光 PCR 检测方法具有良好的特异性和准确性。

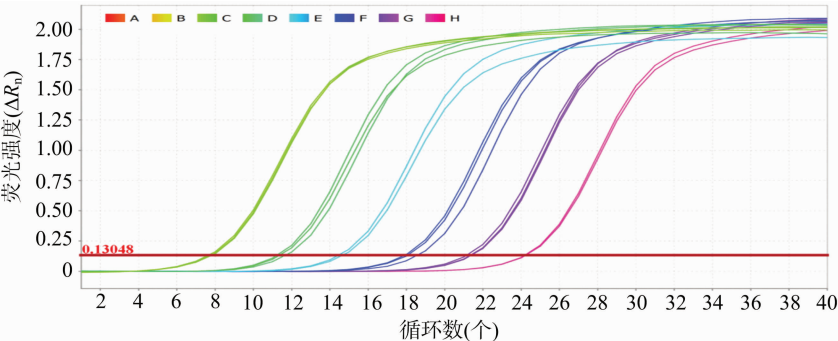


图4 梯度稀释后的扩增曲线

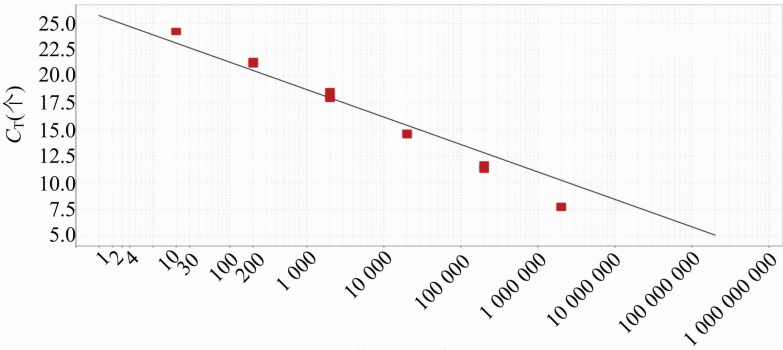


图5 标准曲线

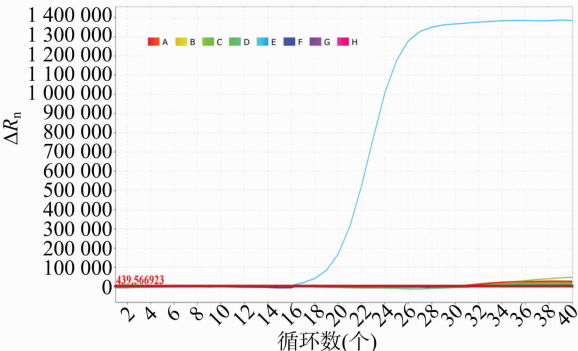


图6 上海之江生物科技试剂盒检测结果

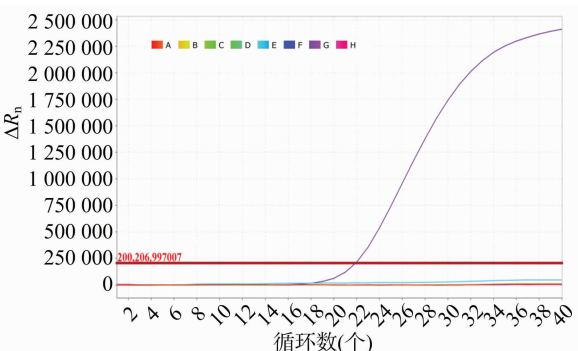


图7 本研究建立的荧光 PCR 方法检测结果

2.7 荧光 PCR 检测方法的重复性和稳定性

分别抽取  $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^2$  拷贝/ $\mu\text{L}$  质粒进行 3 次批内和批间的重复试验,由表 3 可知,每个梯度的最终实测值数量级不变,常数在 0.99~1.01 之间,对应的 CTsd 值和变异系数见表 3,同一批次 3 个浓度梯度 3 次重复试验的  $C_T$  值变异系数 <5%,说明本研究所建立的荧光 PCR 检测方法重复性好、稳定性高。

表 3 荧光定量 PCR 批内和批间差异

拷贝数 (拷贝/ $\mu\text{L}$ )	批内		批间	
	$C_T$ (个)	CV(%)	$C_T$ (个)	CV(%)
$4.35 \times 10^6$	15.148	1.98	15.876	1.98
$4.35 \times 10^4$	18.197	2.01	18.886	1.30
$4.35 \times 10^2$	21.328	0.67	21.691	1.32

2.8 荧光 PCR 检测方法的灵敏度

由图 8 可知,扩增曲线各个稀释度间距均匀,线性范围在  $10^0 \sim 10^9$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ,所建立的标准曲线斜率为 -3.243,标准曲线的  $R^2$  为 0.998,扩增效率为 102.426,当标准品的稀释度达到  $1 \times 10^1$  拷贝/ $\mu\text{L}$  时可以看到明显的扩增曲线,对应的  $C_T$  为 2.46 个,当标准品的稀释度达到  $1 \times 10^0$  拷贝/ $\mu\text{L}$  时,仍有扩增曲线, $C_T$  为 35.43 个,拷贝数为 2.158 拷贝,已超出可信范围,所以本研究所建立的荧光 PCR 检测方法最低检测范围为 10 拷贝/ $\mu\text{L}$ 。

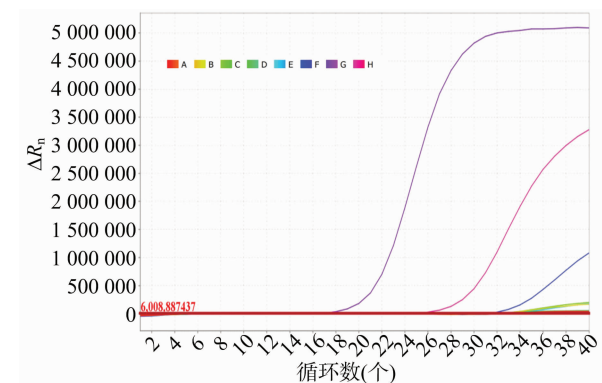


图8 应用荧光定量 PCR 方法对临床样本的检测

2.9 荧光 PCR 检测方法的应用

本研究用所建立的荧光 PCR 检测方法对将从门诊和猪场采集的 35 份疑似猪伪狂犬病病料进行检测。其中标准品扩增曲线的斜率为 -3.18,  $R^2$  为 0.996,扩增效率为 101.273。对检测结果进行分析发现,有 2 份样品的  $C_T$  和拷贝数均在检测限内,判定为阳性,其他 33 份样品的  $C_T$  超出检测限,或者拷贝数小于 10 拷贝,或者两者均在检测限外,判定为阴性。与此同时,笔者用上海之江和洛阳莱普生公司生产的试剂盒作对比,发现三者之间的符合率达到 100%。

3 讨论与结论

实时荧光定量 PCR 技术是在传统 PCR 技术的基础上发展起来的一种灵敏度高、特异性强、反应时间短、定量准确的检测技术,它克服传统 PCR 假阳性高和定量不准确等缺点,已成为病原学检测中重要的方法<sup>[5-6]</sup>。本研究所建立的荧光 PCR 检测方法能够实现对猪伪狂犬病毒的定量检测。相关研究表明,荧光定量 PCR 扩增产物多在 100~200 bp,一般不超过 300 bp<sup>[7]</sup>,本研究设计的引物扩增片段大小为 165 bp,扩增片段适中,有利于提高该检测方法的效率。本研究所建立的荧光 PCR 方法以构建的重组质粒为标准品,将标准品进行梯度稀释,每个梯度间的间距均匀,标准曲线  $R^2$  值均在 0.99 以上,扩增效率在 90%~110% 之间,说明所测结果的准确性较高。此外,对建立的荧光检测方法进行敏感性、特异性和重复性试验,结果显示,本研究建立的检测方法灵敏度可以达到 10 拷贝/ $\mu\text{L}$ ;对猪瘟、猪蓝耳、猪圆环、口蹄疫等病毒均无交叉反应现象,充分证明了该检测方法具有良好的特异性;不同稀释度的模板进行批内和批间试验,其  $C_T$  值变异系数均不超过 5%,说明其重复性比较好。用本研究建立的荧光 PCR 检测方法和购买的 2 个商家试剂盒对临床 35 份样本同时进行检测,发现 3 种检测结果的符合率为 100%。本研究所建立的猪伪狂犬病荧光定量 PCR 方法为规模化猪场猪伪狂犬病的快速检测奠定了基础,为笔者所在实验室病原学检测标准的制定提供了参考依据。

参考文献:

[1] Liu H, Li X T, Hu B, et al. Outbreak of severe pseudorabies virus infection in pig – offal – fed farmed mink in Liaoning Province, China [J]. Archives of Virology, 2017, 162(3): 863 – 866.

[2] Wu C Y, Wu C W, Liao C M, et al. Enhancing expression of the pseudorabies virus glycoprotein E in yeast and its application in an indirect sandwich ELISA [J]. Journal of Applied Microbiology, 2017, 123(3): 594 – 601.

[3] 华利忠, 刘剑锋, 冯志新, 等. 猪伪狂犬病病毒新流行变异毒株的研究进展 [J]. 江苏农业学报, 2017, 33(2): 476 – 480.

[4] 龚双燕, 李小琼, 李幽幽, 等. 猪传染性胃肠炎病毒 SYBRGreen II 荧光定量 PCR 检测方法的建立及在初乳检测上的应用 [J]. 江苏农业学报, 2017, 33(5): 1076 – 1081.

[5] Kong X D, Li L, Sun L, et al. Rapid diagnosis of aneuploidy using segmental duplication quantitative fluorescent PCR [J]. PLoS One, 2014, 9(3): e88932.

[6] Fei B Y, Lv H X, Zheng W H. Fluorescent quantitative PCR of *Mycobacterium tuberculosis* for differentiating intestinal tuberculosis from Crohn's disease [J]. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2014, 47(2): 166 – 170.

[7] Leifer I, Blome S, Beer M, et al. Development of a highly sensitive real – time RT – PCR protocol for the detection of classical swine fever virus Independent of the 5' untranslated region [J]. Journal of Virological Methods, 2011, 171(1): 314 – 317.