

常 晨,张道华,唐 波,等. 猪乙型脑炎病毒 SYBR - Green I 实时荧光定量 PCR 方法的建立[J]. 江苏农业科学,2020,48(18):81-85.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.18.014

# 猪乙型脑炎病毒 SYBR - Green I 实时荧光定量 PCR 方法的建立

常 晨,张道华,唐 波,刘国阳,华 涛,王海燕

(1. 江苏省农业科学院动物免疫工程研究所/国家兽用生物制品工程技术研究中心/江苏省食品质量安全重点实验室 - 省部共建国家重点实验室培育基地,江苏南京 210095; 2. 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心,江苏扬州 225009)

**摘要:**为建立猪乙型脑炎病毒(JEV)的定量检测方法,根据 E 基因序列,设计 1 对特异性引物,建立检测 JEV 的荧光定量 PCR 方法。结果显示,该方法灵敏度达到  $10^3$  拷贝/ $\mu$ L,对猪圆环病毒 2 型(PCV2)、猪细小病毒(PPV)、猪瘟病毒(CSFV)、猪伪狂犬病毒(PRV)均无交叉反应,具有良好的特异性和重复性;采用 JEV 攻毒小鼠,荧光定量 PCR 比普通 PCR 更能灵敏地检出组织带毒量。该方法可用于组织样品中乙脑病毒的定量检测以及临床乙脑病毒感染的早期检测和定量分析猪乙脑病毒感染程度。

**关键词:**猪乙脑病毒;SYBR - Green I;荧光定量 PCR;检测

**中图分类号:**S852.65 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)18-0081-05

日本流行性乙型脑炎(乙脑,Japanese encephalitis, JE)是由乙型脑炎病毒(Japanese

encephalitis virus, JEV)引起的一种人畜共患传染病。乙型脑炎病毒主要通过携带病毒的蚊虫叮咬传播,库蚊、伊蚊和按蚊是 JEV 的主要传播媒介,猪是主要贮存宿主及扩散宿主,JE 主要发生于夏秋季节。猪乙脑病常引起妊娠母猪流产、产死胎或弱胎,公猪睾丸炎,育肥猪持续高热,新生仔猪神经症状,对养殖业安全生产带来严重威胁<sup>[1-2]</sup>。对猪进行疫苗免疫能有效减少 JEV 对养猪业造成的危害,进行及时正确的诊断是预防和控制该病的关键<sup>[3]</sup>。

收稿日期:2019-12-04

基金项目:国家重点研发计划(编号:2018YFD0500800);公益性行业(农业)科研专项(编号:201403051);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(17)3049]。

作者简介:常 晨(1987—),女,江苏南京人,硕士,助理研究员,主要从事动物疫苗产品研究工作。E-mail:346283525@qq.com。

通信作者:张道华,硕士,研究员,主要从事动物分子病原学及免疫学研究。E-mail:zhangdh2005@163.com。

[2]荆常亮,周金辉,张成省,等. 野生大豆营养成分及生物活性因子的研究进展[J]. 大豆科学,2019,38(4):644-649.

[3]王雪琴. 中国大豆进口依存度影响因素及对策研究[D]. 武汉:武汉轻工大学,2018.

[4]郑金英,翁 欣. 国际转基因大豆对中国大豆产业及其期货市场的影响[J]. 亚太经济,2015(5):39-46.

[5]王宇红. 我国转基因食品安全政府规制研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2012.

[6]康宇立,朱 涛,麻晓春. 中美转基因生物安全监管体系对比[J]. 生命世界,2018(9):6-7.

[7]中华人民共和国农业部. 农业部 2630 号公告-15-2017 转基因植物及其产品成分检测 耐除草剂大豆 SHZD32-1 及其衍生品种定性 PCR 方法[S]. 北京:中国标准出版社,2017.

[8]中华人民共和国国家质量监督检验检疫局. 转基因植物产品数字 PCR 检测方法:GB/T 33526—2017[S]. 北京:中国标准出版社,2017.

[9]孟 静,孙满慧,钟立霞,等. 豆制品中转基因成分检测的研究进

展[J]. 大豆科学,2019,38(1):148-152.

[10]闫 伟,龙丽坤,李葱葱,等. 三种转基因大豆品系的多重荧光 PCR 检测体系建立[J]. 大豆科学,2019,38(5):712-718.

[11]窦 雯,李 尤,逯欣宇,等. 转基因大豆 RPA 检测技术的建立及应用[J]. 生物技术通报,2019,35(5):170-175.

[12]Kamle M, Kumar P, Patra J K, et al. Current perspectives on genetically modified crops and detection methods[J]. 3 Biotech, 2017,7(3):219.

[13]Xu C, Li L, Jin W J, et al. Recombinase polymerase amplification (RPA) of CaMV-35S promoter and nos terminator for rapid detection of genetically modified crops[J]. International Journal of Molecular Science, 2014,15(10):18197-18205.

[14]祖 新,徐轶飞,李羽翥,等. 可视化膜芯片检测转基因大豆的研究[J]. 食品安全质量检测学报,2019,10(11):3488-3492.

[15]魏 霜,周广彪,刘 津,等. 多重串联式 PCR 基因芯片技术检测转基因大豆 GTS 40-3-2[J]. 中国食品学报,2018,18(2):244-249.

诊断猪乙型脑炎的病原学方法有病毒分离鉴定、RT-PCR 检测、荧光定量 RT-PCR、荧光环介导逆转录等温扩增 (RT-LAMP)、基因芯片技术等<sup>[4]</sup>。孙静等曾报道,采用 RT-PCR 方法检测 JEV,虽灵敏且能在疾病早期对病毒进行检测,但由于分析步骤繁琐且容易造成污染,所以使用受到限制<sup>[5]</sup>。荧光定量 RT-PCR 方法操作简便、灵敏度高、特异性好,荧光染料 SYBR-Green I 荧光信号的积累与扩增的双链 DNA 数量呈正相关,该方法成本较探针法低,且可达到快速、定量的目的,对疾病的早发现、早预防起着重要的作用<sup>[6]</sup>。

JEV 为单股正链 RNA 病毒,*E* 基因是乙脑病毒毒力基因,*E* 蛋白为该病毒的主要表面结构蛋白,存在大量的中和抗原表位,是病毒重要的抗原决定簇<sup>[7]</sup>。本研究以 *E* 基因序列作为靶序列设计 1 对引物,利用 SYBR-Green I 荧光染料定量 PCR 方法,定量检测组织中的病毒含量,对诊断乙脑早期感染和对病毒净化有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 毒株与试验动物

JEV J3 株、猪圆环病毒 2 型 (PCV2)、猪细小病毒 (PPV)、猪瘟病毒 (CSFV)、猪伪狂犬病毒 (PRV),由笔者所在实验室分离与保存;1 周龄无特定病原体 (SPF) 级 BALB/c 小鼠,由南京市江宁区青龙山动物繁殖场提供。

### 1.2 主要试剂与仪器

RNA iso Reagent 试剂盒、DL 2000 Marker、Ex Taq™、SYBR Premix Ex Taq™、pMD18-T 载体、凝胶回收试剂盒、载体连接试剂盒、质粒小量提取试剂盒、DH5 $\alpha$  感受态细胞,购自宝生物工程 (大连) 有限公司;Rotor-Gene 3000 荧光定量 PCR 仪,购自美国 Gene 公司。

### 1.3 引物设计与合成

根据 Gen Bank 中 JEV 的 *E* 基因序列设计获得重组质粒标准品引物,即上游引物:5'-TTGGTCGCTCCGGCTTACAG-3';下游引物:5'-GCCACTTCCA CACCTCATCT-3',目的片段大小为 1 574 bp。设计获得荧光定量 PCR 上下游引物,即上游引物:5'-A GAGCGGGGAAAAAGGTC-3';下游引物:5'-TTTCACGCTCTTTCTACAGT-3',目的片段大小为 162 bp。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

### 1.4 质粒模板标准品的制备

提取 JEV J3 株病毒 RNA 并反转录获得 cDNA,

通过 PCR 扩增获得乙脑 *E* 基因片段,PCR 运行程序如下:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 1.5 min,30 个循环;72 ℃ 10 min。对扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,目的片段采用凝胶回收试剂盒回收,将回收产物连接至 pMD-18T 载体上,并转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞中。提取获得重组质粒后,进行酶切鉴定。将酶切大小正确的重组质粒送至上海英骏生物技术有限公司进行测序。将经测序验证的阳性质粒作为质粒标准品,命名为 pMD-JEV-E。

### 1.5 SYBR-Green I 荧光定量 PCR 反应体系及标准曲线的建立

采用紫外分光光度计测量质粒标准品 pMD-JEV-E 的吸光度,并计算拷贝数,以 10 倍梯度稀释质粒为模板进行荧光定量 PCR 扩增,得到动力学曲线及标准曲线。PCR 扩增体系为 20  $\mu$ L 反应体系,其中上、下游引物各 0.4  $\mu$ L (10  $\mu$ mol/L),SYBR Premix Ex Taq™ 10.0  $\mu$ L,模板 2.0  $\mu$ L,灭菌去离子水 7.2  $\mu$ L。反应的循环参数为 95 ℃ 5 min;95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,40 个循环。

### 1.6 重复性检验

选取乙脑病毒同一浓度的质粒进行 SYBR Green I 荧光定量 PCR 反应,每个样品做 3 个重复,通过  $C_t$  值和溶解曲线峰值温度分析验证 JEV SYBR Green I 荧光定量 PCR 方法的重复性与稳定性。

### 1.7 特异性检验

提取 JEV、CSFV 病毒液总 RNA,再反转录为 cDNA。提取 PRV、PPV、PCV2 病毒液 DNA,按照 SYBR Green I 荧光定量 PCR 反应体系检测上述病毒核酸,同时设置阴性对照组,验证本研究方法特异性。

### 1.8 敏感性检验

对质粒标准品进行 10 倍梯度稀释,将稀释为 1~10<sup>8</sup> 拷贝/ $\mu$ L 的质粒作为模板进行荧光定量 PCR 扩增,分析本研究方法检出的最低拷贝数。

### 1.9 对免疫攻毒小鼠脑组织的检测

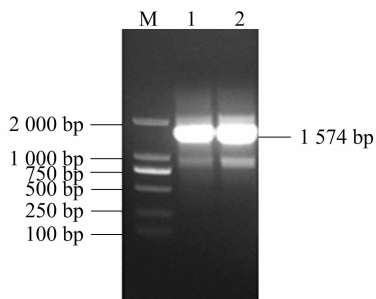
选取 SPF 级 BALB/c 小鼠 10 只,乙脑灭活苗免疫小鼠 5 只,同时设空白小鼠 5 只,6 d 后加免,9 d 后进行腹腔攻毒,JEV J3 株 F<sub>3</sub> 代 100 LD<sub>50</sub> (100 倍半数致死量) 0.2 mL/只,同时对小鼠进行脑部空刺,攻毒后每日观察,取濒死小鼠的脑部组织,研磨、提取组织 RNA 并进行反转录,通过本研究方法

和普通 PCR 进行检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 JEV E 基因 PCR 扩增与测序

由图 1 可知,PCR 产物电泳结果显示,扩增产物在 1 000 ~ 2 000 bp 之间,测序得片段大小为 1 574 bp,与预计的片段大小相符。



M—DL2000; 1—JEV J3 毒株; 2—重组质粒  
图1 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果

### 2.2 标准曲线的建立

将重组质粒进行 10 倍梯度稀释,选取合适浓度范围( $10^4 \sim 10^9$  拷贝/ $\mu\text{L}$ )的质粒进行荧光 PCR,并通过 LightCycler 480 进行数据分析,样品在该范围

内具有良好的扩增曲线(图 2)。由图 3 可知,倍比稀释质粒样品在此浓度范围内具有良好的扩增曲线,标准曲线的截距为 41.24,斜率为 -3.761,扩增效率为 99.5%,误差为 0.019 5,判定系数  $R^2$  为 0.99。

### 2.3 重复性检测

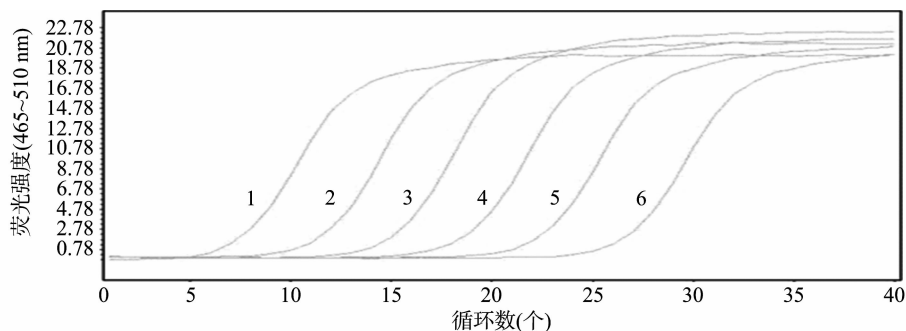
为验证荧光定量 PCR 检测结果的可重复性,对每个稀释度( $10^4 \sim 10^9$  拷贝/ $\mu\text{L}$ )重组质粒样品设 3 个重复进行检测试验,由图 4 可知,3 次重复的动力学曲线重合,可见荧光定量 PCR 有很高的可重复性。

### 2.4 特异性检测

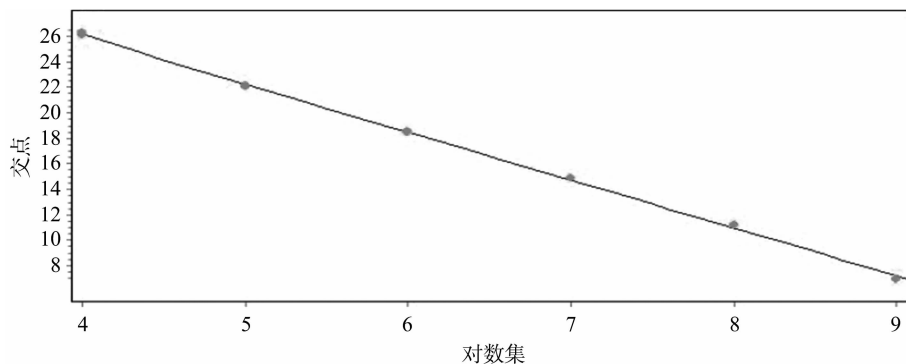
对猪病毒 JEV、PRV、CSFV、PPV、PCV2 的核酸及双蒸水进行荧光定量 PCR 检测,由图 5 可知,JEV 在 5 个循环左右开始起峰,而其他病毒及双蒸水均在 35 个循环后起峰,均为非特异性起峰,表明该方法具有良好的特异性。

### 2.5 敏感性检测

将 10 倍梯度稀释后的质粒( $10^0 \sim 10^8$  拷贝/ $\mu\text{L}$ )作为模板,采用建立的荧光定量 PCR 方法进行检测。由图 6 可知,当模板浓度为  $10^3$  拷贝/ $\mu\text{L}$  时,检测结果仍为有规律的 S 型荧光曲线。说明本研究方法的最低检测限为  $10^3$  拷贝/ $\mu\text{L}$ 。

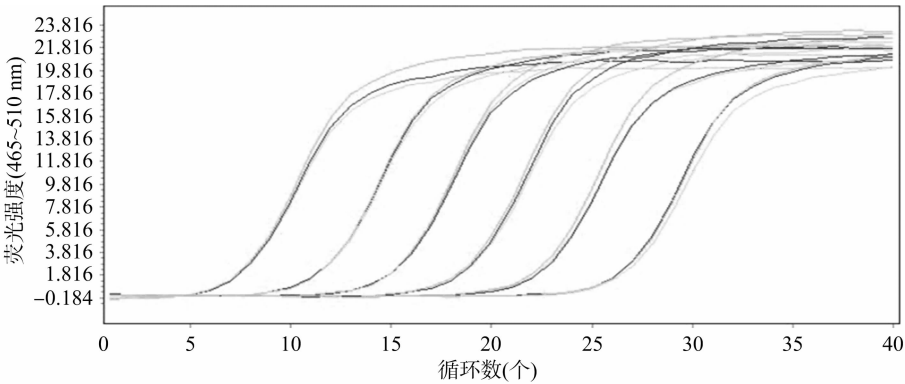


1~6 号扩增曲线对应的 JEV 核酸稀释浓度分别为  $1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^4$  拷贝/ $\mu\text{L}$   
图2 荧光定量 PCR 对 10 倍梯度稀释 pMD-JEV-E 质粒的检测结果

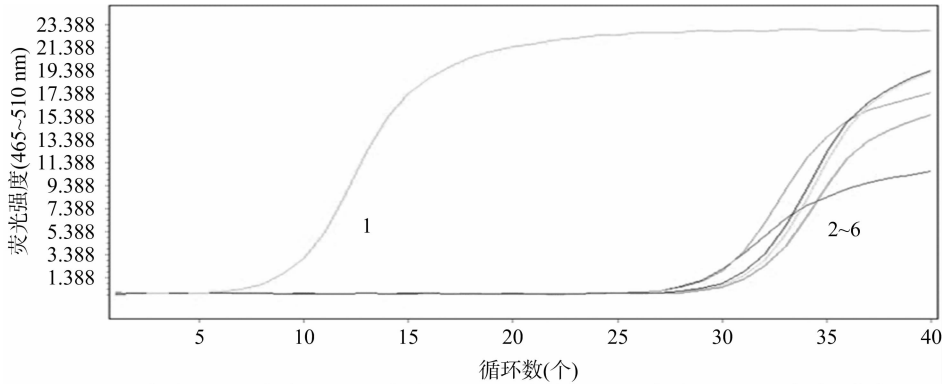


标准曲线截距为 41.24,斜率为-3.761,扩增效率为 99.5%,误差为 0.019 5,判定系数  $R^2$  为 0.99;横坐标为 JEV 核酸稀释浓度的对数;纵坐标为  $C_T$  值,表示样品检出时对应的循环数。

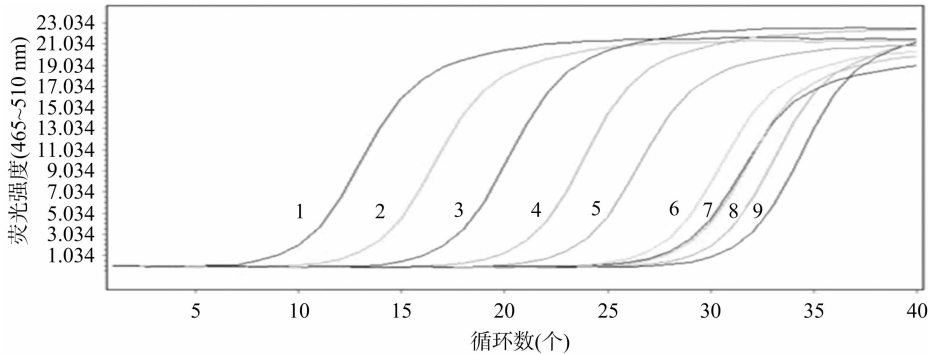
图3 JEV E 基因标准曲线



从左起扩增曲线对应的 JEV 核酸稀释浓度分别为  $1\times10^9$ 、 $1\times10^8$ 、 $1\times10^7$ 、 $1\times10^6$ 、 $1\times10^5$ 、 $1\times10^4$  拷贝/ $\mu\text{L}$ 。  
图4 重复性试验结果



1 表示 EV；2 表示 PRV；3 表示 CSFV；4 表示 PPV；5 表示 PCV2；6 表示双蒸水。  
图5 特异性扩增试验结果



1~9 号扩增曲线对应的 JEV 核酸稀释浓度分别为  $1\times10^8$ 、 $1\times10^7$ 、 $1\times10^6$ 、 $1\times10^5$ 、 $1\times10^4$ 、 $1\times10^3$ 、 $1\times10^2$ 、 $1\times10^1$ 、 $1\times10^0$  拷贝/ $\mu\text{L}$ 。  
图6 敏感性试验结果

2.6 对免疫攻毒小鼠脑组织的检测

由表 1、表 2 可知,采用本研究方法检测到对照组攻毒小鼠的脑组织中乙脑病毒结果均为阳性,且可计算出组织中的病毒载量,免疫组攻毒小鼠仅 1 只检测结果呈阳性,而 PCR 检测仅部分结果呈阳性,且无法计算出组织中的病毒载量。

3 讨论

乙型脑炎是人兽共患病,且自然界中大部分脊椎动物均是乙型脑炎病毒易感宿主,提高乙脑病毒检测的质量和效率对乙脑病毒的发现和预防有重要作用。乙脑病毒感染至产生抗体存在一定的“窗

表 1 攻毒小鼠样品荧光定量 PCR 检测结果

分组	免疫攻毒组	对照攻毒组
01	—	13.73
02	—	10.71
03	31.10	11.46
04	—	15.88
05	—	16.12

注：“—”代表结果呈阴性；表中数据为  $C_T$  值，表示阳性样品检出时对应的循环数。

表 2 攻毒小鼠样品 PCR 检测结果

分组	免疫攻毒组	对照攻毒组
01	—	—
02	—	+
03	—	+
04	—	+
05	—	—

注：“+”代表结果呈阳性；“—”代表结果呈阴性。

口期”，故抗体检测不利于乙脑的早期诊断<sup>[8]</sup>。病毒分离与鉴定操作繁琐、耗时多、灵敏度不高，不能实现乙脑病毒的快速检测，RT-PCR 可获得很好的检测效果，但不能对病原定量分析。刘卫滨等根据 JEV NS5 基因<sup>[9]</sup>、霍红等根据 *E* 基因分别设计引物与探针<sup>[10]</sup>，建立了 *TaqMan* 荧光定量 RT-PCR 方法，通过该方法检测猪血清样品的灵敏度可达 10 拷贝/ $\mu\text{L}$ ，但其成本高，需结合特异性探针。韩国学者 Jeong 等利用荧光染料 SYBR Green I 构建实时荧光 PCR 检测 JEV 方法，将扩增区段选定在 3'端非编码区（共 323 bp），该区段的 GC 含量高并存在连续的 G 或 C，且 3'端非编码区在病毒基因组中能够形成一定的空间结构，不利于逆转录过程引物的退火与 cDNA 合成过程，所以本研究未将 3'端非编码区作为扩增检测分析目的区段<sup>[10]</sup>。本研究根据 JEV *E* 基因片段保守序列，设计合成荧光定量 PCR 上下游引物，结果显示，本研究方法不仅呈现良好的特异性，检测灵敏度也达到  $10^3$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ，与常规的 PCR 方法相比，该方法更精确、更省时、操作更简便。本试验建立了 SYBR - Green I 实时荧光定量 PCR 方法，选取猪乙型脑炎病毒 *E* 基因的重组质粒作为标准品，建立标准曲线，检测结果为良好的 S 型荧光曲线，且具有很好的重复性，能够灵敏地检测出病毒感染的情况。

为了更好地验证本研究建立的荧光定量 PCR 方法的可操作性、灵敏性、实用性，利用该方法检测攻毒保护试验中小鼠脑组织的病毒载量，发现各稀释质粒样品均具有良好的扩增曲线，根据  $C_T$  值和标准曲线公式可精确计算出组织中的初始病毒量，与该方法相比，普通 PCR 方法有很多阳性漏检。荧光定量 PCR 检测不需要通过凝胶电泳检测和测序分析，节约了试验时间和成本。

本试验建立的 SYBR - Green I 实时荧光定量 PCR 方法，有助于分析在乙脑的发病过程中 JEV 的动态变化与疾病发展的关系以及乙脑病毒感染的早期检测和定量分析猪乙脑病毒感染程度。

#### 参考文献：

- [1] Tiroumourogane S V, Raghava P, Srinivasan S. Japanese viral encephalitis[J]. Postgraduate Medical Journal, 2002, 78 (918): 205 - 215.
- [2] Yang D K, Jin - Ju N, Ha - Hyun K, et al. Inactivated genotype 1 Japanese encephalitis vaccine for swine [J]. Clinical and Experimental Vaccine Research, 2014, 3(2): 212.
- [3] Igarashi A. Control of Japanese encephalitis in Japan; immunization of humans and animals, and vector control[J]. Current Topics in Microbiology and Immunology, 2002, 267: 139 - 152.
- [4] 吕玉金, 吴凤笋, 刘胜利, 等. 猪日本乙型脑炎及猪细小病毒复合 PCR 检测方法的建立[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(19): 176 - 179.
- [5] 孙 静, 陶三菊, 陈伯权. 逆转录 - 聚合酶链反应方法检测乙型脑炎病人标本[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2000, 14(2): 184.
- [6] 庄金秋, 梅建国, 张 颖, 等. 猪乙型脑炎病毒实验室检测方法研究进展[J]. 中国动物检疫, 2017, 34(11): 60 - 63.
- [7] Sumiyoshi H, Mori C, Fuke I, et al. Complete nucleotide sequence of the Japanese encephalitis virus genome RNA[J]. Virology, 1987, 161(2): 497 - 510.
- [8] 黄福新, 高世同, 张仁利, 等. 乙型脑炎病毒 *TaqMan* 逆转录聚合酶链反应检测方法的建立[J]. 中国热带医学, 2008, 8(9): 1481 - 1482.
- [9] 刘卫滨, 付士红, 宋 宏, 等. 乙型脑炎病毒 *TaqMan* PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2005, 25(8): 656 - 662.
- [10] 霍 红, 李业南, 薛 遥, 等. 猪流行性乙型脑炎病毒 *TaqMan* 荧光定量 PCR 方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2014, 36(7): 547 - 550.
- [11] Jeong H S, Shin J H, Park Y N, et al. Development of real - time RT - PCR for evaluation of JEV clearance during purification of HPV type 16 L1 virus - like particles[J]. Biologicals, 2003, 31(3): 223 - 229.