

① S 058-2826

应用 RT-PCR 检测流产胎儿组织中 猪繁殖与呼吸综合征病毒

272 - 276

蔡家利¹, 姜平², 蔡宝祥²

¹(西南农业大学动物养殖学院, 重庆 400716)

²(南京农业大学动物医学院, 南京 210095)

摘要:根据猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)美洲型膜蛋白和核衣壳蛋白基因序列,设计了一对含有 *EcoR* I 和 *Bam* H I 酶切位点的引物,用 RT-PCR 对四个流产猪场的病料进行了检测,扩增出约 918 bp 的基因片段。通过病毒分离、酶切鉴定和序列分析证实为 PRRSV 感染。结果说明应用所设计的引物进行 RT-PCR 快速检测 PRRS 是可行的,为我国快速特异诊断 PRRS 和 PRRSV 强毒株的深入研究奠定了基础。

关键词:猪繁殖与呼吸综合征; 反转录-多聚酶链反应(RT-PCR); 诊断

中图分类号:S858.28 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-5125(2000)03-0272-05

猪繁殖与呼吸综合征(PRRS)是一种新发现的动物传染病,以母猪繁殖障碍和仔猪呼吸困难为特征。我国 1996 年报道本病开始流行^[1,2]。病原 PRRSV 分类地位已基本确定。PRRSV、马动脉炎病毒、小鼠乳酸脱氢酶升高病毒、猴出血热病毒一起归为动脉炎病毒科(*Arteriviridae*)^[3]。由于 PRRSV 基因结构变异较大,所以根据基因结构和抗原的不同分为欧洲型和美洲型。PRRSV 为正链的单股 RNA 病毒,基因组长 15 kb,是动脉炎病毒科中最大的一类病毒。PRRSV 基因组含有 8 个开放阅读框(ORF),分别编码相关的蛋白质。ORF2-ORF7 编码病毒的结构蛋白质,其中 ORF6 和 ORF7 分别编码病毒的膜蛋白(M)和核衣壳蛋白(N)。ORF6 和 ORF7 是 PRRSV 整个基因组中较保守的序列^[4]。各种分子生物学诊断方法都缘于这段基因。RT-PCR 是目前较特异的诊断方法。我国目前报道的主要是一些常规血清学诊断方法^[5]。根据我国 PRRS 的流行特点,我们设计了一对能够扩增 M 和 N 基因的引物,通过 RT-PCR 来检测 PRRS 可疑猪场的病料,以探讨这种方法的可行性,为快速诊断 PRRS 奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 病毒样品制备

取可疑 PRRS 猪场流产胎儿肺、脾和淋巴结剪碎,匀浆,制成乳悬液,冻融三次。10 000 r/min 离心 10 min,取上清作病毒分离培养鉴定。剩余上清加等体积氯仿抽提 3 次,每次 10 000 r/min 离心 10 min,取上清。

1.2 RNA 制备

参考林万明介绍方法^[6]。取病毒样品上清 500 μ L,加入 16% PEG(6000)500 μ L,混匀。12 000 r/min 离心 10 min,弃上清,沉淀溶于 1 mL TE(pH8.0)中,加蛋白酶 K 1 mg 和 10% SDS 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 作用 2 h。用饱和

收稿日期:1999-04-08,修回日期:1999-06-15

作者简介:蔡家利(1956年-),男,重庆市人,副教授,博士,主要研究动物病毒性传染病。

酚、苯酚-氯仿及氯仿各抽提一次,每次 15 000 r/min 离心 3 min,取上清。加入 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠 (pH5.2)和冷无水乙醇 2 mL, $-20^{\circ}C$ 1 h。12 000 r/min 离心 15 min,沉淀以 70% 乙醇 1 mL 轻洗一次,弃上清,自然干燥。沉淀用灭菌双蒸馏水 100 μL 溶解,同时加入 RNA 酶抑制剂 RNasin 2 u, $-20^{\circ}C$ 保存。

1.3 引物设计

根据 PRRSV 美洲毒株的基因序列设计的一对引物,含 *EcoR* I 和 *Bam*HI 酶切位点,能同时扩增 M 和 N 蛋白基因^[7]。P1: 5'CCG AAT TCC AGA GTT TCA GCG G3';P2: 5'TGG GAT CCA CCA CGC ATT CTT C3'

1.4 反转录(RT)

按 Reverse transcription system (Promega 公司产)说明进行。25 mmol/L $MgCl_2$ 4 μL , $10\times$ RT buffer 2 μL , 10 mmol/L dNTP 2 μL , rRNA 酶抑制剂(RNasin) 1 μL , P1 1 μL ,病毒 RNA 提取液 9 μL ,反转录酶 1 μL ,灭菌液体石蜡 20 μL , $42^{\circ}C$ 1 h, $94^{\circ}C$ 5 min,冰浴 3 min, $-20^{\circ}C$ 保存。

1.5 PCR 反应

P1 1 μL , P2 1 μL , 2 mmol/L dNTP 5 μL ,反转录 cDNA 1 μL , ddH₂O 31 μL , $5\times$ buffer 10 μL , $94^{\circ}C$ 5 min,加入 Taq DNA 聚合酶 1 μL (2~2.5 u),灭菌液体石蜡 50 μL , $94^{\circ}C$ 1 min, $55^{\circ}C$ 1 min, $72^{\circ}C$ 1 min,30 个循环,最后 $72^{\circ}C$ 延伸 10 min。1% 琼脂糖电泳,紫外线检测扩增片段。

1.6 克隆与鉴定

回收 PCR 产物,经 *Hinc* II 酶切初步鉴定。然后 PCR 产物与 pSK+ 质粒分别用 *EcoR* I 和 *Bam*HI 双酶切后混合,加入 T4 DNA 连接酶, $14\sim 16^{\circ}C$ 过夜,转化入 DH5a 受体菌,选取阳性克隆酶切鉴定后作序列测定分析^[7]。

1.7 病毒分离鉴定

见姜平等的报道^[8]。

2 结果

2.1 RT-PCR 通过 RT-PCR 对 4 个 PRRS 可疑猪场进行检测,从流产胎儿组织中扩增出约 918 bp 的基因片段(图 1)。

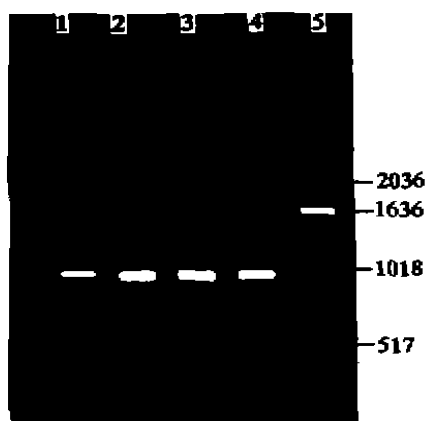


图 1 从感染 PRRSV 流产胎儿组织扩增出的基因片段
1-4 扩增出的 M 和 N 基因片段,5 Markers
Fig. 1 The M and N genes amplified by RT-PCR from
the stillborn fetuses affected by PRRSV
Lane 1-4 the M and N gene fragments, lane 5 the markers

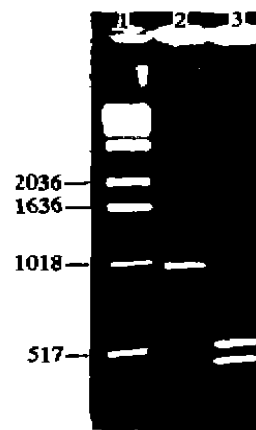


图 2 PCR 产物的酶切鉴定
1. Markers; 2, PCR 产物; 3, *Hinc* II 酶切后的片段
Fig. 2 Identification of PCR product
lane 1 the markers, lane 2 PCR product
lane 3 PCR product digested with *Hinc* II

2.2 PCR产物酶切 经 *Hinc* II 酶切后,可获得2个500 bp左右片段(图2)。

2.3 阳性克隆质粒的酶切鉴定 重组质粒经提纯后,经 *Eco*R I 和 *Bam* H I 双酶切,可以获得一约950 bp的基因片段(图3),与扩增片段大小相同。

2.4 PRRSV MN 基因推导的氨基酸序列分析 克隆的MN基因共测得918 bp经计算机分析共推导出123个氨基酸,与美洲毒株同源性较高(图4)。

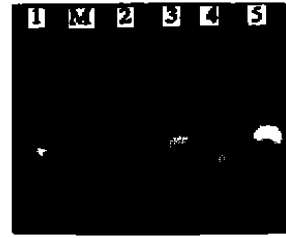


图3 重组质粒酶切鉴定
Fig.3 Identification of the recombinant plasmids with digestion of *Eco*R I and *Bam* H I
Lane 1-3 and lane 5 the recombinant plasmids
lane 4 pSK+, lane M λ DNA *Eco*R I/*Hind* III Markers

3 讨论

RT-PCR是目前应用非常广泛的分子生物学诊断方法^[9]。已报道这种方法可以直接检测PRRSV感染的病猪血清、精液、流产胎儿的病理组织及感染的肺泡巨噬细胞^[10,11],是诊断PRRS特异方法之一,敏感性可达6.7 TCID₅₀。由于我国还未完全建立这种诊断方法检测PRRSV,所以我们在病毒分离、PRRSV弱毒株MN基因克

ORF6			
S1	MGSSLDDFCHOSTAPEKVVLLAFSITYTPVMIYALKVSRGRLGLLHLLIFLNCAFTFGYM	60	
EDRD-1	-----N-----Q-----I-----	60	
VR2332	-----Q-----	60	
LV	-XGG----N-PI-AQ-L-----I-----I-----S-----	59	
S1	TFAHFQSTNKVALTMGAVVALLWGVYSAIETWKFITSRCRLCLLGRKYILAPAHHVESAA	120	
EDRD-1	-V-----R-----	120	
VR2332	-----	120	
LV	-YV-----R----L-----FT-S-----C--R-----	119	
S1	RFHPIAANDNHAFVVRPFGSTTVNGTLVPLGLKSLVLGGRKAVKQGVVNLVKYAK	174	
EDRD-1	-----S-----L-----R-----	174	
VR2332	-----	174	
LV	GL-S-S-SG-R-YA--K--L-S-----R-----KR--R-----GRR	174	
ORF7			
S1	MPNNGKQQRKK GDGQPVNQLCQMLGKIIAQQNQSRGKGPQKKNKKKPEKP	53	
EDRD-1	-----T-----N-----S-----N-----	53	
VR2332	-----	53	
LV	M A--N-SQ--KKSTAPM-N-----L--AM-KS-R- QPR-GQA--K----	54	
S1	AFPLATEDDVRHHFTPSEKQLCLSSIQTAFNQAGTCTLSDSGRISYTVVEFSLPTHHTVR	113	
EDRD-1	-----Y-----	113	
VR2332	-----	113	
LV	H---A---I---L-QT--S---Q-----AS--S---V-FQ---M--VA----	114	
S1	LIRVTA SPSA	123	
EDRD-1	-----	123	
VR2332	-----	123	
LV	-----STSASQGA-S	129	

图4 PRRSV分离毒株S1与日本毒株EDRD-1、美洲毒株VR2332和欧洲毒株LV的MN基因推导的氨基酸序列比较
Fig.4 Alignment of the deduced amino acid sequences of ORF6 (M) and ORF7 (N) of S1 isolate, EDRD-1 (Japan isolate), VR2332(U.S. isolate) and LV (Europe isolate) of PRRSV

的基础上,探讨了 RT-PCR 方法直接检测感染组织中 PRRSV 的可能性,结果证明我们建立的 RT-PCR 方法完全可以直接检测病理组织中的 PRRSV。

目前建立的诊断 PRRS 的 RT-PCR 方法,都是根据 PRRSV 基因组中较保守的序列 M 或 N 基因而设计的引物,扩增片段都较小(312~500 bp)。为了提高敏感性,我们设计的引物能同时扩增 M 基因和 N 基因。利用这对引物进行 RT-PCR 是否能同时检测 PRRSV 美洲毒株和欧洲毒株尚需进一步探讨。

为了提高检出率,我们采用的是病料组织混合样品,但实际工作中有时可能只有血清样品,有必要继续探讨对血清样品的检出情况。

RT-PCR 方法的建立不仅可以用于临床标本的检验,而且为今后我国 PRRSV 基因的克隆鉴定和序列分析奠定了基础,以便更深入了解我国 PRRSV 毒株的分子特征。

参 考 文 献

- [1] 姜平,简中友,马志勇,等.中国某地区猪繁殖与呼吸综合征流行病学调查及病毒分离[J].南京农业大学学报,1996,19(8):118
- [2] 郭宝清,陈章水,刘文兴,等.从疑似流产胎儿分离猪繁殖和呼吸综合征病毒的研究[J].中国畜禽传染病,1996(2):1-3
- [3] Meulenber J J M, Hulst M M, De Meijer E J, *et al.* Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) is related to LDV and EAV [J]. *Virology*, 1993, 192:62-74
- [4] Mardassi H, Mounir S, Dea S, *et al.* Molecular analysis of the ORF3 to 7 of porcine reproductive and respiratory virus, Quebec reference strain [J]. *Arch Virol*, 1995, 40:1045-1418
- [5] 姜高明,李雪梅,殷震.猪繁殖与呼吸综合征诊断方法的研究进展[J].中国兽医杂志,1998,24(2):40-43
- [6] 林万明,杨瑞霞,黄尚志,等.PCR 技术操作和应用指南[M]北京:人民军医出版社,1993.334-337
- [7] 蔡家利,姜平,蔡宝祥.猪繁殖与呼吸综合征病毒膜蛋白和核衣壳蛋白基因的克隆与鉴定[J].中国兽医学报,1999,19(1):3-6
- [8] 姜平,简中友,马志勇,等.猪繁殖和呼吸综合征病毒分离与鉴定[J].南京农业大学学报,1997,20(3):82-86
- [9] 罗满林,蔡宝祥,陈博言.PCR 技术及其在家畜病毒性疾病诊断中的应用[J].中国畜禽传染病,1993,(5):61-63
- [10] Suarez P, Zardoya R, Prieto C, *et al.* Direct detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus by reverse polymerase chain reaction (RT-PCR) [J]. *Arch Virol*, 1994, 135:88-99
- [11] Christopher H J, Nelson E A, Nelson J K, *et al.* Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR [J]. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(7):1739-1744

Direct Detection of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus of Stillborn Fetus Tissues by Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

CAI Jia-li¹, CAI Bao-xiang², JIANG Ping²

¹(*Animal Husbandry and Veterinary Medical College, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716, China*)

²(*Animal Medical College, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China*)

Abstract: Primers for RT-PCR were designed on the basis of the M and N gene sequences of U. S. isolate of PRRSV. The primers have restriction endonuclease (*EcoR* I and *Bam*H I) sites. The tissues of stillborn fetuses of affected swine were detected by RT-PCR in 4 pig farms. The samples were RT-PCR positive. A gene fragment about 918 bp was amplified by RT-PCR, PRRSV were isolated from the tissues of stillborn fetuses. The result showed that PRRSV can be quickly diagnosed by RT-PCR, which laid a basis for quick diagnosis of PRRS and further research of the PRRSV isolates of our country.

Key words: PRRS; RT-PCR; Detection; Diagnosis