

半嵌套式 PCR 技术区别检测犬细小病毒疫苗株和强毒株的研究*

刘忠华¹, 钟翎², 黄韧¹, 程树军¹

(1. 广东省实验动物监测所, 广东广州, 510260; 2. 中山大学生命科学院, 广东广州, 510275)

Establishment of Polymerase Chain Reaction for Discrimination of Vaccine Strains of *Canine parvovirus*LIU Zhong-hua¹, ZHONG Ling², HUANG Ren¹, CHENG shu-jun¹

(1. Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangzhou 510260, China; 2. College of life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Two pairs of PCR primers were designed according to the sequences of the vaccine strain and virulent strain of CPV. Heminested PCR method was established. Result of the first PCR amplification showed the same amplified products of 574bp length, after the second PCR amplification, the virulent strain produced the length 364bp fragment, but the vaccine strain couldn't produce that. The products of PCR were examined by electrophoresis and restriction enzyme digestion. The result showed the length of the fragment and enzyme sites were as the same as those designed. The PCR assay of CPV was proved to be specific and sensitive. It shows that this method may be used in discriminating the vaccine strain and virulent strain of CPV or monitoring the vaccinated canine in order to avoid disease and financial losing.

Key words: *Parvoviridae*; Heminested PCR; Vaccine strain

关键词: 犬细小病毒; 半嵌套式 PCR; 弱毒疫苗株

中图分类号: Q93-332

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2003) 04-0401-03

犬细小病毒病是由犬细小病毒 (*Canine parvovirus*, CPV) 引起的一种多发于幼犬的致死性传染病, 主要表现为出血性肠炎和心肌炎^[1]。在自然条件下本病多呈散发, 而在养犬比较集中的地方则常群发^[2]。目前, 预防本病的方法主要依靠接种疫苗 (包括灭活疫苗和弱毒疫苗), 国内外已研制出多种灭活疫苗和弱毒疫苗。但不管是灭活苗、弱毒苗或亚单位苗, 其研制都是以大量培养微生物为基础的, 这不仅给疫苗的制造带来了局限性, 同时在疫苗的安全性、免疫性能、产量及保存方面存在缺陷。在其弱毒疫苗的研制和使用过程中, 对疫苗用毒种的选育和鉴定、毒种的遗传稳定性以及毒种有无被强毒株污染等鉴定中都急需一种能准确检测弱毒疫苗株和强毒株的方法。以往是通过接种易

感动物, 观察易感动物的临床症状、组织学变化来鉴定对易感动物的致病性, 据此来鉴定强、弱毒株。此方法影响因素较多, 准确性低。本研究根据文献^[3]报道的犬细小病毒弱毒疫苗株 (CPV-b114) 的序列, 同 CPV 强毒株 (GenBank 中发表的) 的序列^[4]比较, 发现疫苗株在高度保守的 NS1 区有较多的突变和基因缺乏, 其中有 15 个基因缺失发生在 CPV 的 2040bp-2056bp 之间。本试验利用弱毒疫苗和强毒株基因组的差异, 设计特异引物通过 PCR 技术从分子水平来鉴定 CPV 的弱毒疫苗株和强毒株。

1 材料与方 法

1.1 病毒和细胞

CPV 弱毒疫苗株从美国进口疫苗中分离, 自编

收稿日期: 2003-03-22, 修回日期: 2003-04-21

* 基金项目: 第十批广东省重点科技攻关项目 (1997-35)

作者简介: 刘忠华 (1970-), 硕士, 助理研究员, 研究方向为分子生物学。

号 CPV-VS, 强毒株分别由南京警犬研究所和香港的杨德威博士提供, 自编号 CPV-NJ 和 CPV-HK。FK₈₁ 细胞从中国兽药监察所获得, MDCK 传代细胞由华南农业大学禽病室提供。

1.2 引物合成

我们利用基因序列分析结果, 遵循引物设计原则^[5], 应用 Pcrdesn 软件在犬细小病毒 NS1 和 VP1 区设计出 3 条引物 (引物由上海生工公司合成。) 其序列为:

Primer1(P1): 5'-TGTAAGCTTCCAGGAGACT-3';

Primer2(P2): 5'-AGCAATCCTCAGAGTCAAG-3';

Primer3(P3): 5'ATAACCTGGAGGCACAAGT-3'.

由 P1 和 P3 组成一对引物 (其扩增产物长度为 585bp) 对弱毒疫苗株和强毒株进行第一轮扩增, 再由 P2 和 P3 组成一对引物 (其扩增产物长度为 375bp) 对 585bp 产物进行第二轮半嵌套式扩增, 分析两轮扩增产物的电泳结果来达到区分弱毒疫苗株和强毒株之目的。

1.3 培养细胞中病毒 DNA 的制备

按文献^[6]方法进行裂解、抽提和沉淀 DNA, TE 溶解, 储于 -20℃ 备用。

1.4 PCR 方法的建立

采用 20μL 反应体系, 体系组成: 10×PCR 缓冲液, 2.5 mmol/L dNTP, 25 mmol/L MgCl₂, 16 mmol/μL 上下游引物 2μL, 模板 2μL, 加灭菌双蒸水至总体积为 20μL, 灭菌的石蜡油 20μL, 预变性后加入 1U 的 TaqDNA 多聚酶, 进入 PCR 循环。

经多次实验后, 确定出最佳的反应条件: 即第一轮为 96℃ 预变性 10min; 25 次循环 (96℃ 变性 60s, 55℃ 退火 60s, 72℃ 延伸 60s), 72℃ 延伸 10min。第二轮为 96℃ 预变性 5min; 30 次循环 (96℃ 变性 60s, 55℃ 退火 60s, 72℃ 延伸 60s), 72℃ 延伸 10 min。

1.5 PCR 产物鉴定

1.5.1 琼脂糖凝胶电泳分析: 按常规方法^[7]用内切酶 *TaqI* 对第一轮 PCR 扩增产物进行消化, 在 2% 的琼脂糖凝胶上电泳分析 PCR 扩增产物和酶切产物。

1.5.2 特异性鉴定: 取正常的 FK81 细胞培养上清液, 以及 CPV 弱毒疫苗株和强毒株、犬传染性肝炎病毒的 FK81 和 MDCK 细胞培养物为模板。在相同条件下, 按上述试验中选出的最佳条件进行 PCR, 并设标准阳性和阴性对照, 电泳观察扩增产物的结果。

1.5.3 敏感性鉴定: 将 100 μl 犬细小病毒的细胞培养物 (HA 1:5120) 中抽提的 DNA, 分别按 1:20、1:50、1:100、1:150、1:200 的梯度稀释, 每个稀释

度各取 2μl 分别作为模板, 按上述试验中选出的最佳条件进行第一轮 PCR, 并设标准阳性和阴性对照, 电泳观察扩增产物的结果。将第一轮扩增产物分别按 1:10、1:100、1:1000、1:2000 梯度稀释, 每个稀释度各取 2μl 分别作为模板, 以最佳条件进行第二轮 PCR, 并设标准阳性和阴性对照, 电泳观察扩增产物的结果。

2 结果和讨论

根据设计的引物, 用 P1 和 P3 进行第一轮 PCR 扩增, 其结果应是 CPV 弱毒疫苗株和强毒株有相同的目片 (585bp); 用 P2 和 P3 进行第二轮 PCR 扩增, 其结果应是 CPV 强毒株有 375bp 目的片段, 而 CPV 弱毒疫苗株没有 375bp 目的片段。通过电泳与 50bp DNA Ladder 对照, 弱毒疫苗株和强毒株所扩增的片段与设计的片段大小基本相符 (图 1), 从图 1 也可以看出第二轮扩增结果中 CPV 强毒株有 375bp 目的片段, 而 CPV 弱毒疫苗株没有 375bp 目的片段, 因此, 用所设计的引物进行半嵌套式扩增能区分弱毒疫苗株和强毒株。

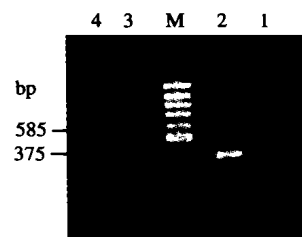


图 1 半嵌套式 PCR 扩增结果

Fig.1 Amplification products of heminested PCR

M, DNA Ladder marker; 1, CPV-HK products1; 2, CPV-HK products2; 3, CPV-VS products1; 4, CPV-VS products2.

用内切酶 *TaqI* 对 585bp 目的片段 (CPV-HK 产物 1) 进行酶切, 理论上可得到 439bp 和 146bp 2 个片段, 酶切后电泳如图 2 所示, 与理论值相符。证明此产物与设计的片段有相同的酶切位点。

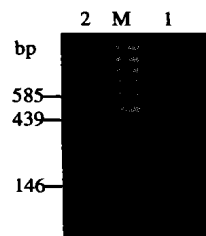


图 2 *TaqI* 酶切 CPV-HK 产物 1

Fig.2 Result of restriction enzyme digestion by *TaqI*
M, DNA Ladder marker; 1, Digestion products; 2, CPV-HK products1.

在相同条件下, 用 P1 和 P3 引物进行第一轮 PCR 扩增, 结果显示: 此对引物能将 CPV 弱毒疫苗株和强毒株扩增出 585bp 目的片段, 而对正常的 FK81 细胞培养上清液和犬传染性肝炎病毒细胞培养物的 DNA 模板不能扩增出 585bp 目的片段。说明该方法具有高度特异性。

将模板 DNA 按梯度稀释, 在相同条件下, 用 P1 和 P3 引物进行第一轮 PCR 扩增, 结果显示 PCR 方法能检测出 7.8 ng 的 CPV DNA。

犬细小病毒是目前我国犬群中危害最为严重的病毒性疾病之一, 无特异性治疗方法。有关实验动物国家标准中规定普通级犬须采用免疫接种, SPF 级犬必须排除此病毒^[8]。目前多数动物场主要使用弱毒苗进行免疫接种, 但弱毒苗毒株本身有潜在致病力危险, 其残毒在自然界动物群体中持续传递后毒力有增强返祖危险。故迫切需要建立一种特异、敏感和准确的强、弱毒株鉴定方法。聚合酶链反应 (PCR) 是一种选择性体外扩增 DNA 的方法, 有灵敏度高、特异性强等优点。嵌套式和半嵌套式 PCR 能减少或消除不需要的产物同时提高敏感性^[5]。本研究通过分析比较有关文献^[3, 4, 9]报道的弱毒疫苗株和强毒株的基因序列, 弄清了在弱毒疫苗株和强毒株之间除发生的点突变外, 弱毒疫苗株主要在 CPV 的 NS1 区发生 15 个核苷酸缺失。根据这一特性, 我们设计了上述三条引物并组成两对引物对弱毒疫苗株和强毒株进行半嵌套式 PCR 扩增, 同时对 585bp 目的片段进行酶切分析, 电泳结果证实与

理论值相符, 并能较好区分弱毒疫苗株和强毒株。特异性和敏感性测定结果说明由 P1 和 P3 组成的第一套引物进行的 PCR 扩增是高度特异和敏感的。本试验所建立的半嵌套式 PCR 鉴定方法将能用于弱毒疫苗的研制和使用过程中, 对疫苗用毒种的选育和鉴定、毒种的遗传稳定性以及毒种有无被强毒株污染等。

参考文献

- [1] 田克恭. 实验动物病毒性疾病[M]. 北京: 农业出版社, 1992, 305-314.
- [2] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997, 1159-1165.
- [3] Remod M, Boireau P, Lebreton F. Partial DNA cloning and sequencing of a canine parvovirus vaccine strain: application of nucleic acid hybridization to the diagnosis of canine parvovirus disease[J]. Arch Virol, 1992, 127: 257-269.
- [4] Reed A P, Jones E V, Miller T J. Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus[J]. Virol, 1988, 62: 266-276.
- [5] 迪芬巴赫, 德维克斯勒. PCR 技术实验指南[M]. 北京: 科学出版社. 1988, 88-116.
- [6] 颜子颖, 王海林, 译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 37-39.
- [7] 姜泊, 张亚历, 周殿元. 分子生物学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 1996. 47-49.
- [8] 国家标准 GB14922.2-2001, 实验动物微生物学等级及监测[M]. 北京: 中国标准出版社. 2002, 3-4.
- [9] 董江丽, 李淑芬, 张鹤龄. 犬细小病毒中国内蒙株 VP2 基因克隆及序列分析[J]. 中国病毒学, 2000, 15(4): 380-387.