

猪流行性腹泻病毒嵌套式 RT-PCR 检测方法的建立

张素芳^{1,3}, 贾 赟², 王敏秀¹, 倪艳秀³, 何孔旺^{3**}, 陈溥言¹(1. 南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 江苏南京 210095; 2. 沈阳农业大学动物医学院, 辽宁沈阳 110161;
3. 江苏省农业科学院农业部畜禽疫病诊断重点开放实验室, 江苏南京 210014)Establishment of Nested RT-PCR Diagnostic Method
for Porcine Epidemic Diarrhea VirusZHANG Su-fang^{1,3}, JIA Yun², WANG Min-xiu¹, NI Yan-xiu³, HE Kong-wang^{3**}, CHEN Pu-yan¹(1. Key Laboratory of Animal Disease diagnosis and Immunology, Ministry of Agriculture at Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095; 2. Department of veterinary medicine, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161;
3. Key Lab of Animal and Poultry Diseases Diagnostic, Ministry of Agriculture at Jiangsu Academy of Agricultural Science, Nanjing, 210014)**Abstract:** Two pairs of primers were designed according to the *N* gene sequence of PEDV-CV777 strain in Genbank (No. AF353511). PCR amplification product of outer-primers was 1328bp, and the inter-primers amplification product was 538bp. With the primers, a nested PCR assay was established to detect PEDV. This method was sensitive and specific and could be used in PEDV diagnosis and epidemiological investigation.**Key words:** Porcine epidemic diarrhea virus; Nested-PCR; Identification by restriction analysis**关键词:** 猪流行性腹泻病毒; 嵌套式 PCR; 酶切鉴定

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5152(2004)02-0174-03

猪流行性腹泻(Porcine epidemic diarrhea, PED)是由猪流行性腹泻病毒(*Porcine epidemic diarrhea virus*, PEDV)引起的一种以呕吐、腹泻和失水为特征的猪肠道传染病。各种年龄的猪都可发病^[1], 哺乳仔猪、架子猪或育肥猪的发病率最高可达 100%, 尤其哺乳仔猪的受害最严重。本病在欧洲许多国家均有报道。上海畜牧兽医研究所等单位证实, 我国近年来发生的仔猪腹泻, 有很多为 PEDV 引起。

PED 的诊断方法有病原分离鉴定(VN)、免疫荧光染色(IF)、酶联免疫吸附试验(ELISA)。这些方法各有其优缺点^[5,6]。其共同的缺陷是难以检出微量病毒, 不适宜早期诊断。

PCR 作为一种极为敏感的分子生物学技术, 已广泛应用于人畜传染病诊断及分子生物学诸多领域。国外已在 PEDV 分子生物学特性、cDNA 克隆、

序列分析、RT-PCR 等方面进行深入的研究^[2-4], 而国内在此领域几乎是一片空白。本实验旨在建立 PEDV 的嵌套式 RT-PCR 检测方法, 为该病的诊断和流行病学研究提供更为敏感和可靠的手段; 对于建立猪轮状病毒(*Porcine rotavirus*, RV)、猪传染性胃肠炎病毒(*Transmissible gastroenteritis virus*, TGEV)和 PEDV 三种腹泻病毒鉴别诊断有实际意义。

1 材料与方法

1.1 病毒

PEDV 疫苗毒, 南京分离 PEDV 毒株 NJ1、NJ2、NJ3, 参考毒株 RV、TGEV 均由江苏省农业科学院牧医所分离鉴定; 其它实验用 PEDV 毒株为送检粪样毒。

收稿日期: 2003-10-13, 修回日期: 2003-11-21

作者简介: 张素芳(1978-), 女, 汉族, 河南安阳籍, 博士生, 主要从事分子病毒学与分子免疫学方面的研究。

** 通讯作者。Corresponding author. Tel: 025-4390988. E-mail: jaasias@jlonline.com

1.2 引物

外引物 PEDV/N-F、PEDV/N-R, 扩增产物大小为 1 328bp; 内引物 PEDV/N-F2、PEDV/N-R2, 扩增产物大小为 538bp, 由上海生工合成。引物序列如下:

PEDV/N-F: 5' -ttggcatttactactacctcgga-3'

PEDV/N-R: 5' -agatgaaaaggtactgcgttcc-3'

PEDV/N-F2: 5' -aggaacgtgacctcaagacatccc-3'

PEDV/N-R2: 5' -ccaggataagccggcttaacattg-3'

1.3 RNA 的提取

按 Promega 公司 RNA 提取试剂盒说明进行制备 (异硫氰酸胍法)。

1.4 RT-PCR

RT 反应采用 20 μ L 体系: 5 \times RT buffer 4 μ L, 10mmol/L dNTP 2 μ L, RNase inhibitor 0.5 μ L, AMV Reverse Transcriptase 1 μ L, 外引物 PEDV/N-R 1 μ L, 模板 11.5 μ L, 混匀, 于 PCR 仪上进行反转录: 30 $^{\circ}$ C 10min, 42 $^{\circ}$ C 30min, 95 $^{\circ}$ C 5min。4 $^{\circ}$ C 贮存备用或进行 PCR 反应。

PCR 反应采用 50 μ L 体系: 25mmol/L MgCl₂ 2 μ L, 10 \times PCR Buffer 5 μ L, TaqTM 酶 0.5 μ L, 外引物 PEDV/N-F 1 μ L, cDNA 10 μ L, 补加 ddH₂O 至 50 μ L, 混匀, 置于 PCR 仪上, 94 $^{\circ}$ C 45sec, 47 $^{\circ}$ C 45sec, 72 $^{\circ}$ C 1min, 共 30 个循环, 最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min, 反应结束。1% 琼脂糖凝胶电泳, 在生物电泳图像分析系统(复日, Smart View 2001)下观察并拍照。

1.5 影响 PCR 反应的几个重要参数的优化

以接种 PEDV 疫苗毒的 Vero 细胞所提取的 RNA 作为阳性对照, 不接种的 Vero 细胞提取的 RNA 作为阴性对照。依据以上 PCR 反应的基本条件, 分别对反应体系中的 Mg⁺⁺、dNTP 引物浓度及温度设置不同的梯度, 进行优化。

1.6 嵌套式 PCR

25mmol/L MgCl₂ 2 μ L, 10 \times PCR Buffer 5 μ L, TaqTM DNA 聚合酶 0.5 μ L, 内引物 PEDV/N-F2 1 μ L, PEDV/N-R2 1 μ L, 上述 PCR 产物 1 μ L, 补加 ddH₂O 至 50 μ L, 混匀, 置于 PCR 仪上, 94 $^{\circ}$ C 45s, 47 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 25 个循环, 最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。1% 琼脂糖凝胶电泳, 于生物电泳图像分析系统(复日, Smart View 2001)下观察并拍照记录。

1.7 RT-PCR 灵敏性和特异性

取 PEDV 疫苗株细胞毒和送检粪样毒按上述方法进行 RT-PCR, 以验证嵌套式 PCR 的灵敏性。同时, 设 TGEV、RV 对照组, 并对 RT-PCR 产物及嵌

套式 PCR 产物进行酶切鉴定, 以验证 RT-PCR 及嵌套式 PCR 的特异性。

2 结果与讨论

2.1 反应参数的优化

经过 PCR 优化, 确定 Mg⁺⁺、dNTP 及温度的最佳条件分别为 1.5mmol/L、200 μ mol/L 和 47 $^{\circ}$ C。

2.2 外引物 RT-PCR 扩增结果

用外引物 PEDV/N-F、PEDV/N-R 进行的 RT-PCR, PEDV 疫苗毒、NJ1、NJ3 等毒力较强的粪毒样品扩增出了 1 328bp 的目的条带, 但仅 PEDV-NJ3 的扩增条带很清晰, PEDV 疫苗毒和 NJ1 的扩增条带则较模糊, 同时出现非特异条带; 而且外引物对 PEDV-NJ2 的扩增不足以形成可见条带(图 1)。外引物扩增片段中含有 *Dra* I、*Eco*R I 酶切位点, 经 *Dra* I、*Eco*R I 双酶切后, 可切成 633 bp、421 bp 和 274 bp 的三个片段; *Dra* I 单酶消化后切成 907bp、421bp 两个片段; *Eco*R I 单酶消化后切成 695bp、633bp 两个片段(图 2), 可证明外引物的扩增具有特异性。

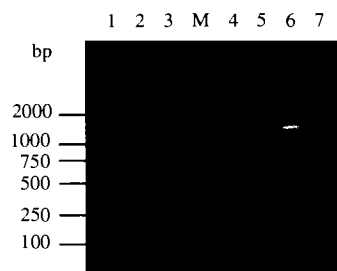


图 1 外引物 PEDV/N-F、N-R 扩增特异性

Fig. 1 RT-PCR specific of outer-primers PEDV/N-F、N-R
1. TGEV; 2. RV; 3. Stool sample 1 from nanjing area; M. DL2000 Marker; 4. Seed strain for PEDV vaccine; 5. PEDV-NJ1; 6. PEDV-NJ3; 7. PEDV-NJ2

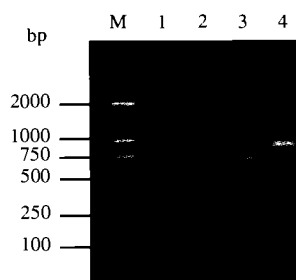


图 2 RT-PCR 产物酶切鉴定结果

Fig. 2 RE analysis of the product of RT-PCR
M. DL2000 Marker; 1. PEDV-NJ3; 2. PEDV-NJ3/*Dra* I and *Eco*R I; 3. PEDV-NJ3/*Eco*R I; 4. PEDV-NJ3/*Dra* I

2.3 内引物嵌套式 PCR 扩增结果

用内引物 PEDV/N-F2、PEDV/N-R2 对 RT-PCR 产物进行的嵌套式 PCR, 几乎所有的 PEDV 样品均可扩增出 538bp 左右的目的条带, 原来扩增不理想的 PEDV-NJ2, 以及几个粪样毒, 均扩增出 538bp 左右的目的片段, 条带清晰, 无非特异扩增。嵌套式 PCR 扩增产物经 *Dra* I 单酶切, 可切成 310bp 和 230bp 左右的两个片段, 与预期结果相符合 (图 3)。

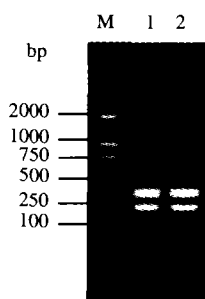


图 3 嵌套式 PCR 扩增产物酶切鉴定

Fig. 3 RE analysis of the product of nested PCR

M. DL2000 Marker; 1. Seed strain for PEDV vaccine nested PCR product digested with *Dra* I; 2. Stool sample 1 from nanjing area nested PCR product with *Dra* I

2.4 嵌套式 RT-PCR 的灵敏性

通过对 14 份送检粪样的 RT-nPCR 检测 (设 PEDV 疫苗毒对照), 有 10 份扩增阳性, 均可见 534bp 左右的清晰条带。

猪流行性腹泻的诊断方法目前国内多用病原分离鉴定和血清学方法。但这些方法多操作繁琐、费时费力, 而且难以检出微量病毒, 不适宜早期诊

断。RT-PCR 作为 RNA 病毒的一种特异诊断方法, 具有快速、特异、灵敏等特点, 国外已经用于 PEDV 的快速检测^[2,3]。但国内 PEDV 的 RT-PCR 检测方法尚未建立, 关于 TGEV 的 RT-PCR 检测的文章也较少。本试验采用外引物、内引物进行嵌套式 RT-PCR, 不仅可以检测细胞培养中的 PEDV, 亦可以检测粪样中的 PEDV, 灵敏性和特异性较好。

参考文献

- [1] Bridgen A, Duarte m, Tobler K, *et al*. Sequence determination of the nucleocapsid protein gene of the porcine epidemic diarrhoea virus confirms that this is a coronavirus related to human coronavirus 229E and porcine transmissible gastroenteritis virus [J]. *J Gen Virol*, 1993,74:1795-1804.
- [2] Ishikawa K, Sekiguchi H, Ogino T, *et al*. Direct and detection of Orcine epidemic diarrhea virus by RT-PCR [J]. *J Virol Method*, 1997,69:191-195.
- [3] Kubota S, Sasaki O, Okada N, *et al*. Detection of porcine epidemic diarrhea virus using polymerase chain reaction and comparison of the nucleocapsid protein genes among strains of the nucleocapsid genes among strains of the virus [J]. *J Vvet med Sci*, 1999, 61(7): 827-830.
- [4] Chang H K W, Jae G L, Myung G H, *et al*. Rapid diagnosis of porcine epidemic diarrhea virus infection by polymerase chain reaction [J]. *J Vet Med Sci*, 1997, 59(3): 231-232.
- [5] Franco G, Curzio B, Kurt T, *et al*. Immunohistochemical Detection of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Compared to Other Methods [J]. *Clin Diag Lab Immunol*, 1998, 5(3): 412-414.
- [6] Hak M L, Beom J L, Joo H T, *et al*. Detection of Porcine Epidemic Diarrhea Virus by Immuno- histochemistry with Recombinant Antibody Produced in Phages [J]. *Virology*, 2000,62(3): 333-337.