

## PCR 快速检测伪狂犬病病毒野毒感染\*

周 斌, 苏鑫铭, 张素芳, 贾 贇, 曹瑞兵, 陈溥言\*\*

(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)

## Establishment and Application of PCR to Detect Wild-Type

## Pseudorabies Virus

ZHOU Bin, SU Xin-ming, ZHANG Su-fang, JIA Yun, CAO Rui-bing, CHEN Pu-yan\*\*

(Key Laboratory of Animal Disease Diagnostic &amp; Immunology, Ministry of Agriculture of People's Republic of China, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** In order to effectively differentiate between gene-deleted vaccine and wild-type isolates of Pseudorabies virus(PrV), a PCR method, based on sequences of gE and gI of the PrV genome, was established after selection of the optimal reaction conditions. By applying this technique, the 848bp gene fragment was amplified from PrV RA strain, SH strain and LA strain, respectively. The negative results were achieved from Bartha-K61, RK-13, VSV, HCV, PRRSV, JEV, PPV and PCV2. Sequencing of the amplified products showed that the PCR method was specific. The sensitivity of PCR reached to 5pg DNA of PrV RA strain. We applied the PCR method to detect 172 tissue samples from 37 pig farms in Jiangsu, An'hui, Zhejiang, Fujian and Shanghai during 2003-2004, wild-type isolates of PrV were found in 35 tissue samples (20.34%) and 15 pig farms(40.54%). PrV distributed widely in naturally infected pig's tissues including brain, liver, spleen, kidney, lung and lymphnodes. The PrV positive detection rate in lymphnodes was the highest in all tissues examined and reached 83.33%. The established PCR method provided a more sensitive, specific and reliable method to rapidly detect wild-type PrV and epizootic study of PrV.

**Key words:** Pseudorabies virus(PrV); PCR; Establishment; Application

**摘要:** 根据已发表的伪狂犬病病毒(PrV) gE、gI 基因的序列, 设计并合成了一对引物, 以 PrV 容 A 株细胞培养毒为模板, 筛选最佳反应条件和试剂工作浓度, 建立了区分 PrV 野毒株和疫苗弱毒的鉴别 PCR 方法。该方法能从 PrV 容 A 株(RA)、上海株(SH)、鲁 A 株(LA) 中扩增出一条 848bp 的片段, 但 Bartha-K61 株没有扩增出该片段。测序结果表明 PCR 扩增产物和方法的特异性。对正常细胞与其它 6 种引起猪病毒性疫病相关病毒进行检测, 结果均为阴性, 没有出现交叉反应。对 PrV 容 A 株细胞毒提取物 DNA 进行检测, 其最低检出量为 5pg。PCR 对感染野毒的发病猪不同组织器官检测发现, 淋巴结检出率最高, 依次为脾、脑(海马角)、肺、肾、肝等。对 2003~2004 年期间江苏、浙江、安徽、福建、上海等省市的 37 个大中型猪场送检的 172 份病料进行 PCR 检测病料阳性率为 20.34% (35/172), 猪场阳性率为 40.54% (15/37)。实验结果表明所建立的 PCR 技术可用于伪狂犬病野毒感染的快速鉴定和流行病学调查。

**关键词:** 伪狂犬病病毒; PCR; 建立; 应用

中图分类号: R373.9

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2004) 06-0612-04

伪狂犬病病毒(Pseudorabies virus, PrV)是多种家畜和野生动物均可感染的一种疱疹病毒。猪是该

病毒贮存宿主和传染源, 常常引起母猪出现繁殖障碍及初生仔猪大批死亡; 成年猪则系隐性感染, 长

收稿日期: 2004-05-31, 修回日期: 2004-07-16

\* 基金项目: 国家 863 高新技术发展项目 (2001AA249012)

作者简介: 周斌(1977-), 硕士, 助教, 主要从事动物病毒分子生物学研究。E-mail: aidzhou77@sina.com

\*\* 通讯作者。Corresponding author. Tel: 025-84396028, E-mail: aid@njau.edu.cn

期带毒排毒,严重影响种猪场生产及优良品种的推广,给养猪业造成极大的损失<sup>[1]</sup>。自70年代中期以来,人工筛选的自然弱毒疫苗及基因工程缺失疫苗的广泛应用,对防制伪狂犬病作出重要贡献<sup>[2]</sup>。这些疫苗的应用可以使猪免于发病,但不能阻止野毒的潜伏感染。此外,常规的血清学检测方法无法区分疫苗免疫猪和野毒感染猪。近年随着PCR技术的建立和广泛应用,国内外许多学者将它应用于PrV的检测<sup>[3-6]</sup>。我国早期使用的疫苗株(Bartha-K61)是一基因缺失致弱株,在其基因组BamH I-7片段中缺失了约4kb的序列,此序列包括整个gE和大部分gI序列。gE基因是PrV的主要的毒力因子之一<sup>[7]</sup>,但不是病毒复制所需的。90年代后欧美日等国规定只准含gE基因缺失的疫苗生产上市。也就是说目前所用基因缺失弱毒疫苗基本上都带有gE基因缺失。本实验根据缺失的gE、gI序列设计了一对引物,建立了检测PrV野毒株的PCR方法,应用该方法进行了猪场PrV野毒的快速诊断和流行病学调查。

## 1 材料和方法

### 1.1 毒株与细胞

PrV容A(RA)株购自中国兽药监察所,PrV Bartha-K61株由哈尔滨兽医研究所惠赠,PrV鲁A(LA)株由山东农业大学范伟兴副教授惠赠,PrV上海(SH)株由本实验室分离并保存,兔肾传代细胞株(RK-13)细胞株由青岛出入境检验检疫局中心实验室惠赠,用于病毒增殖。猪水泡性口炎病毒(*Vesicular stomatitis virus*, VSV)、猪瘟病毒(*Hog cholera virus*, HCV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(*Porcine reproductive and respiratory syndrome virus*, PRRSV)、猪乙型脑炎病毒(*Japanese encephalitis virus*, JEV)、猪细小病毒(*Porcine parvovirus*, PPV)和猪圆环病毒2型(*Porcine circovirus 2*, PCV2)均为本实验室分离并保存之毒种,大肠杆菌DH5 $\alpha$ 株由本实验室保存。

### 1.2 细胞培养基、工具酶和主要试剂

MEM培养液、新生牛血清购自GIBCO公司;Taq DNA聚合酶, dNTPs, Mg<sup>2+</sup>, 2 $\times$ GC buffer II, 分子量标准DL2000、DL15000, 限制性内切酶Sal I、EcoR I, pMD18-T载体均购自宝生物(TaKaRa)大连有限公司, 蛋白酶K购自Promega公司。

### 1.3 引物设计与合成

根据GenBank已公布的PrV病毒核苷酸序列(登录号: BK001744), 设计1对引物。上游引物(P1): 5' CCCTGGACGCGAACGGCACGATG3', 位于PrV DNA基因组123052bp~123074bp; 下游引物

(P2): 5' GGGTGGCACGCGGTCTCGAAGCA3', 位于PrV DNA基因组的123899bp~123877bp, 引物扩增片段的长度为848bp, 包括部分gE和部分gI, 并跨越了gE启动区。引物由上海博亚生物工程有限公司合成。

### 1.4 病毒培养

RK-13细胞经含10%小牛血清和双抗(青霉素100IU/mL、链霉素100 $\mu$ g/mL)的MEM培养液培养, 待细胞长成80%以上单层时, 接种病毒液, 37 $^{\circ}$ C吸附1h, 其间不时摇动使液面均匀地铺在细胞上, 然后加含2%小牛血清和双抗的MEM维持液, 37 $^{\circ}$ C继续培养, 在细胞病变达80%以上时收获。

### 1.5 PrV容A株DNA和送检样品DNA的提取

伪狂犬病毒容A株DNA的提取参照文献<sup>[8]</sup>所述方法进行, 但略作改进。收获病变细胞冻融3次, 离心取上清500 $\mu$ L加入蛋白酶K(20mg/mL)和SDS至终浓度为500 $\mu$ g/mL和1%。55 $^{\circ}$ C水浴0.5h, 酚、酚: 氯仿、氯仿各抽提一次, 吸取水相。无水乙醇沉淀后离心, 沉淀经70%乙醇洗涤, 干燥后溶于20 $\mu$ L TE中, -20 $^{\circ}$ C冻存备用。采集疑似感染PrV的病猪或流产胎儿的肝、脾、肺、肾、淋巴结、脑等组织, 剪碎、研磨后加PBS制成混悬液, 按上述方法提取组织中的病毒DNA。

### 1.6 PCR扩增条件的优化

对PCR的引物浓度、dNTPs浓度及PCR的退火温度、时间、循环参数等进行优化, 筛选出PCR扩增的最佳反应模式。

### 1.7 PCR产物的克隆与测序分析

按文献<sup>[9]</sup>所述方法将PCR产物片段克隆进pMD18-T载体中, 挑取阳性菌落, 提取质粒并进行酶切鉴定。将酶切鉴定为阳性的重组质粒进行测序(由大连TaKaRa公司进行测序)。利用基因分析软件DNASTar分析测序结果, 将所测定基因序列与已公布的PrV基因序列比较。

### 1.8 PCR的特异性和敏感性试验

利用优化后的PCR扩增条件分别对试验毒株和对照毒株进行检测, 确定鉴别PCR的特异性。以上述SDS-蛋白酶K法抽提的PrV容A株的DNA作为模板, 用GeneQuantpro核酸定量检测仪测其含量, 然后进行10倍系列稀释。采用优化后的PCR反应体系进行扩增, 检测其敏感性。

### 1.9 PCR对送检样品的检测

样品来源于2003~2004年期间江苏、浙江、安徽、福建、上海等省市某些大中型猪场的发病猪。发病猪临床症状、病理剖检变化与伪狂犬病症状相

符,并用美国 IDEXX 公司生产的伪狂犬病血清学鉴别诊断试剂盒 gE-ELISA 检测其血清为阳性者,取其肝、脾、肺、肾、淋巴结(包括肠系膜淋巴结、颌下淋巴结、腹股沟淋巴结)和脑(海马角)等组织作为被检材料,然后进行 PCR 检测,确定不同组织中 PrV 野毒的检出率。将 2003~2004 年期间江苏、浙江、安徽、福建、上海等省市的猪场送检的 172 份病料制成混悬液,按上述介绍的方法提取 DNA 进行 PCR 检测。

## 2 结果

### 2.1 PCR 方法的建立

通过对 PCR 反应条件与试剂的优化,确定了如下反应方案:反应总体积为 50 $\mu$ L,其中 2 $\times$ GC buffer II 25 $\mu$ L、10mmol/L dNTPs 2 $\mu$ L、40pmol 的引物 P1、P2 各 1 $\mu$ L、DNA 模板 10 $\mu$ L、去离子水 10.5 $\mu$ L、Taq DNA 聚合酶 0.5 $\mu$ L(2.5 U)。上述试剂混匀后,加 20 $\mu$ L 矿物油覆盖。PCR 反应程序为:96 $^{\circ}$ C 预变性 5min,96 $^{\circ}$ C 变性 1 min、70 $^{\circ}$ C 退火 1 min、72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

### 2.2 PCR 扩增结果和产物的特异性分析

应用所建立的方法检测发现,除正常的 RK 细胞和 Bartha-K61 株外,容 A 株、上海株、鲁 A 株均能扩增出了一条 848bp 长的片段,大小与设计相符。说明建立的该 PCR 方法能够区分 PrV 野毒株和疫苗弱毒。容 A 株、上海株、鲁 A 株的 PCR 扩增产物分别与 pMD18-T 连接,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。挑取白色菌落,提取质粒用 Sal I 与 EcoR I 酶切分析,酶切结果表明 3 条基因片段均已正确插入进 pMD18-T 载体中,重组质粒分别命名为 pTRA、pTSH 和 pTLA (图 1)。测序鉴定(序列略,提交 GenBank 获取的登录号分别为:AY683134,AY683135,AY683136)后表明序列结果与文献报道一致,从而说明 PCR 扩增产物的特异性。

### 2.3 PCR 检测 PrV 的特异性和敏感性

应用所建立的方法检测猪病毒性疾病相关的病

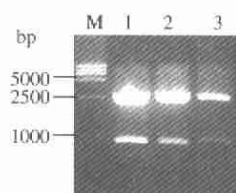


图 1 酶切鉴定结果

Fig.1 The results of RE analysis

M, DL15 000 marker; 1, pTRA(Sal I+Eco R I); 2, pTSH(Sal I+Eco R I); 3, pTLA(Sal I+Eco R I).

毒如 HCV、PRRSV、PPV、VSV、JEV、PCV2 等病毒均为阴性结果(图未示),没有出现交叉反应,证明该方法具有良好的特异性。将已知含量的 PrV 容 A 株 DNA,进行 10 倍系列稀释。当 PrV DNA 模板量为 5pg 时,PCR 扩增仍能获得清晰的目的条带,而当模板量为 0.5pg 时,PCR 扩增的目的条带不清晰(图 2)。

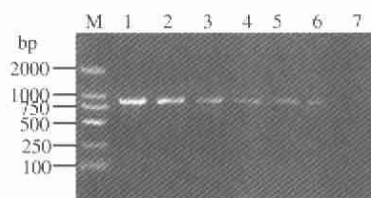


图 2 PCR 检测 PrV 模板 DNA 的敏感性

Fig.2 The sensitivity of PCR for detection of PrV DNA

M, DL2 000 Marker; 1, 50ng DNA; 2, 5ng DNA; 3, 500pg DNA; 4, 50pg DNA; 5, 5pg DNA; 6, 0.5pg DNA; 7, 0.05pg DNA.

### 2.4 PCR 对各种样品的检测结果

2.4.1 PCR 检测伪狂犬病自然发病猪不同组织病料的结果:从临床症状诊断为疑似伪狂犬病的自然发病猪采血清,用 gE-ELISA 试剂盒检测为阳性的猪中,取 15 头病猪的病料进行 PCR 检测,结果 15 头猪均存在野毒感染。通过对发病猪检测的不同部位病料发现,淋巴结检出率最高,其下依次为脾、脑(海马角)、肺、肾、肝等。

表 1 自然发病猪不同组织病料中野毒感染结果

Table1 Results of different tissue samples from the naturally wild-type PrV infected piglets tested by PCR

Pig NO.	Lymph	Liver	Lung	Brian	Spleen	Kidney
1	NT	NT	NT	+	+	-
2	+	+	+	NT	+	-
3	NT	NT	-	NT	+	-
4	+	NT	-	-	NT	NT
5	NT	-	+	NT	-	NT
6	+	-	+	+	+	-
7	-	-	NT	+	-	NT
8	+	NT	NT	-	NT	-
9	+	-	NT	+	+	NT
10	+	+	-	NT	+	NT
11	-	NT	NT	+	-	-
12	+	NT	+	-	+	NT
13	+	+	NT	+	+	NT
14	NT	-	NT	NT	NT	+
15	+	-	+	+	+	-
percentage (%)	81.82 (9/11)	33.33 (3/9)	62.50 (5/8)	70.00 (7/10)	75.00 (9/12)	37.50 (3/8)

Notes: +(Positive); -(Negative); NT(Not test).

2.4.2 PCR 检测临床送检样品的结果:对 2003.6.1~2004.4.31 期间江苏、浙江、安徽、福建、上海等省市的 37 个大中型猪场送检的 172 份病料,应用所建立的 PCR 方法进行检测,结果 35 份病料中存在野毒感染,阳性率为 20.34% (35/172),共检测到 15

个猪场存在 PrV 野毒株流行, 阳性猪场率为 40.54% (15/37) (表 2)。

表 2 送检病料的伪狂犬病病毒野毒感染检测结果  
Table 2 Results of clinical tissue samples tested by PCR

Areas	Pig farms (No.)	Samples (No.)	Positive pig farms (No.)	Positive rate of pig farms (%)	Wild-type virus(No.)	Positive rate of samples (%)
Jiangsu	10	64	3	30.00	12	18.75
Zhejiang	5	23	2	40.00	4	17.39
An' hui	4	15	2	50.00	3	20.00
Fujian	15	56	7	46.67	14	25.00
Shanghai	3	14	1	33.33	2	14.28
Summation	37	172	15	40.54	35	20.34

### 3 讨论

*gE* 基因是 PrV 的一种糖蛋白基因, 对 PrV 的复制是非必需的。目前, 国际上防制伪狂犬病的主要措施是疫苗接种, 基因缺失疫苗也成了目前预防控制伪狂犬病的主要手段, 西方许多国家都依赖基因缺失疫苗进行免疫接种而制定了根除伪狂犬病的计划。由于 *gE* 基因缺失疫苗在病毒侵入神经系统方面被认为比其它单个非必需糖蛋白缺失苗更安全, 同时 *gE* 不会影响病毒的复制和中和抗体的产生, 并且 *gE* 是所有野毒株均表达的一类糖蛋白。因此 *gE* 可作为标志基因, 区别感染动物和疫苗接种动物, 为剔除阳性的野毒感染动物, 根除本病提供良好的前景, 为此在检测中起着很重要的作用。国外已建立了 *gE*-ELISA 鉴别诊断方法<sup>[10]</sup>, 但由于敏感性的原因, 常常有感染野毒的猪“漏网”。目前, 在我国尚没有成熟、完善的 PrV 野毒与疫苗弱毒的快速鉴别诊断方法。因此我们根据目前我国大部分地区使用的基因缺失疫苗多为缺失了 *gE* 基因序列而设计了一对引物, 建立了能够快速区分 PrV 野毒的 PCR 方法。应用该方法能够检测到国内已分离到的容 A 株、上海株和鲁 A 株等野毒, 但不能检测到已缺失了 *gE* 基因的 Bartha-K61 疫苗病毒。应用该方法可以进行 PrV 野毒株的快速检测, 对某猪场或某地区的 PrV 野毒流行情况可以进行调查。

PrV 基因组全长 150kb, GC 含量高达 72%, *gE* 基因达 74.4%。如此高的 GC 含量给 PCR 扩增造成了一定的困难。本实验初期, 反应体系中加入常用的 TaKaRa 的 10×PCR buffer 一直未能得到特异性的扩增片段, 而改换用 2×GC buffer II 后并提高退火温度, 扩增稳定且扩增效率较高。

本实验所建立的检测 PrV 野毒的 PCR 技术, 具有高度的特异性和灵敏性, 检测速度快, 结果可

靠, 检测动物组织样品具有常规方法不可替代的优势, 是检测动物组织样品中 PrV 的一种既简便快速又准确可靠的好方法。应用该技术对 15 头 *gE*-ELISA 试剂盒检测为阳性猪的不同部位病料检测, 结果 15 头猪均查到被野毒感染, 其中淋巴结组织检出率最高, 为 81.82%。对 2003 年 6 月到 2004 年 4 月期间江苏、浙江、安徽、福建、上海等四省一市的 37 个大中型猪场送检的 172 份病料, 应用所建立的 PCR 方法进行检测, 结果检出 35 份病料中存在 PrV 野毒, 阳性率为 20.34%, 检测到 15 个猪场存在 PrV 野毒株流行, 阳性猪场率为 40.54%。其中又以福建和安徽猪场伪狂犬病相对来说比较严重, 说明伪狂犬病的防制还是一个应该值得重视的问题。基因缺失疫苗的使用虽然使猪免于发病, 但不能阻止野毒的潜伏感染。猪场经野毒株感染后, 恢复的猪群极易潜伏感染带毒, 且潜伏感染猪不表现出症状。判断是否存在野毒潜伏感染只有扑杀一定比例的成年猪, 采取三叉神经节组织应用建立的 PCR 鉴定是否存在 PrV 野毒潜伏感染情况。

### 参考文献

- [1] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第 2 版. 北京: 科技出版社, 1997. 998-1009.
- [2] 金升藻, 陈焕春, 熊 符. 伪狂犬病基因缺失疫苗研究进展[J]. 中国农业科学, 2002, 35 (1): 89-93.
- [3] Volz D M, Lager K M, Mengeling W L. Latency of a thymidine kinase negative pseudorabies vaccine virus detected by the polymerase chain reaction[J]. Arch Virol, 1992, 122: 341-348.
- [4] Harding M J, Prud'homme I, Rola J. Specificity and nucleotyping studies of a gp50 based polymerase chain reaction assay for detection of pseudorabies virus[J]. Can J Vet Res, 1997, 61: 157-160.
- [5] 石建平, 宣 华, 卢 强, 等. 伪狂犬病 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 中国畜禽传染病, 1996, 5: 16-20.
- [6] 娄高明, 杜伟贤, 廖筱萍, 等. PCR 检测伪狂犬病病毒 DNA[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2001, 17(4): 519-523.
- [7] Tirabassi R S, Enquist L W. Role of envelope protein *gE* endocytosis in the pseudorabies virus life cycle[J]. J Virol, 1998, 72: 4571-4579.
- [8] 黄伟坚, 姜 焱, 陈德胜, 等. 伪狂犬病毒上海株糖蛋白 G(*gG*)基因的克隆及序列分析[J]. 南京农业大学学报, 2003, 26(1): 107-110.
- [9] J 萨姆布鲁克, E F 弗里克, T 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 金冬燕, 黎孟枫等译. 北京: 科学出版社, 1999. 49-57.
- [10] David K, Sabrina L S, Lie-Ling W, et al. Evaluation of serological tests for the detection of pseudorabies *gE* antibodies during early infection[J]. Vet Micro, 1997, 55: 99-106.