

龚双燕, 李小璟, 李幽幽, 等. 猪传染性胃肠炎病毒 SYBR Green II 荧光定量 PCR 检测方法的建立及在初乳检测上的应用[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(5): 1076-1081.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.05.018

## 猪传染性胃肠炎病毒 SYBR Green II 荧光定量 PCR 检测方法的建立及在初乳检测上的应用

龚双燕<sup>1</sup>, 李小璟<sup>1</sup>, 李幽幽<sup>1</sup>, 陈瑛琪<sup>1</sup>, 蔡瑶<sup>1</sup>, 李雨濛<sup>1</sup>, 徐逸飞<sup>1</sup>, 徐志文<sup>1,2</sup>, 朱玲<sup>1,2</sup>

(1. 四川农业大学动物医学院, 四川 成都 611130; 2. 四川农业大学动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川 成都 611130)

**摘要:** 为了提高初乳中猪传染性胃肠炎病毒(Transmissible gastroenteritis virus, TGEV)的检出率, 避免初生仔猪受到带毒初乳的危害, 建立了一种 SYBR Green II 荧光定量 PCR (qPCR) 检测方法。根据 GenBank 已发表的 TGEV 的 *N* 基因序列, 选择保守区域设计、合成了 1 对特异性引物, 扩增 TGEV 的 *N* 基因片段(174 bp), 构建含有 *N* 基因片段的重组质粒, 以重组质粒作为模板建立了特异性检测 TGEV 的 qPCR 检测方法。该方法的灵敏性比普通 PCR 方法高, 应用建立的 qPCR 检测方法, 对 2016 年 10 月~2017 年 4 月采集自四川省部分地区腹泻猪场的母猪初乳 130 份进行检测, 并与普通 PCR 检测方法进行比较。结果显示: 用 qPCR 方法检测, 130 份样本中有 13 份为 TGEV 阳性, 而普通 PCR 方法只检测到 5 份 TGEV 阳性样本。说明 qPCR 检测方法的敏感性高于普通 PCR 方法, 更适合用于猪初乳检测。

**关键词:** 猪传染性胃肠炎病毒; 荧光定量 PCR 检测; 初乳

中图分类号: S858.282.65 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2017)05--0

## Establishment of SYBR Green II fluorescence quantitative PCR for detection of infectious gastroenteritis virus and its application in colostrum detection

GONG Shuang-yan<sup>1</sup>, LI Xiao-jing<sup>1</sup>, LI You-you<sup>1</sup>, CHEN Ying-qi<sup>1</sup>, CAI Yao<sup>1</sup>, LI Yu-meng<sup>1</sup>, XU Yi-fei<sup>1</sup>, XU Zhi-wen<sup>1,2</sup>, ZHU-Ling<sup>1,2</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; 2. Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

**Abstract:** A SYBR Green II fluorescence quantitative PCR (qPCR) method was established to improve the detection rate of transmissible gastroenteritis virus (TGEV) in colostrum, and to avoid the damage to primary piglets by toxic colostrum.

According to the *N* gene sequence of TGEV published in GenBank, the conservative area was selected to design a pair of specific primers, and the amplified *N* gene fragment was 174 bp. A recombinant plasmid containing *N* gene fragment was used as template to establish a qPCR method for the specific detection of TGEV. The qPCR method was used to detect 130 samples of sow colostrum.

收稿日期: 2017-06-08

基金项目: 四川省科技支撑计划项目(2017NZ0038); “十二五”农村领域国家科技计划课题(2015BAD12B04-2.3)

作者简介: 龚双燕(1994-), 女, 重庆开县人, 硕士研究生, 主要从事动物传染病病原分子生物学研究。(E-mail) gsymanas@163.com

通讯作者: 朱玲, (E-mail) abtexzw@126.com

trum collected from October 2016 to April 2017 in some parts of Sichuan province (diarrhea pig farm). The results showed that 13 of the 130 samples were positive for TGEV by qPCR, and only five samples of TGEV were detected by common PCR. This indicated that qPCR method was more sensitive than the common PCR method, and the qPCR method was more suitable for colostrum testing.

**Key words:** transmissible gastroenteritis virus; fluorescence quantitative PCR; colostrum

猪传染性胃肠炎 (Transmissible gastroenteritis of swine, TGE) 是由猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV) 引起的以仔猪严重腹泻、呕吐甚至脱水死亡为主要症状的急性传染病<sup>[1-2]</sup>。该病主要侵害 2 周以内的仔猪<sup>[3]</sup>。有研究结果表明, 新生仔猪采食纯净 (无 TGEV 病原体) 的初乳可有效预防新生仔猪腹泻的发生<sup>[4]</sup>。母猪初乳中含有大量的免疫球蛋白 A (IgA)、生长因子及激素<sup>[5]</sup>, 其中 IgA 是黏膜免疫中主要的抗体分子, 在胃肠道内不受 pH 值的影响, 不易被消化, 可以阻止病毒入侵肠道黏膜<sup>[6]</sup>, 从而提高仔猪成活率。因此确保仔猪采食到 TGEV 抗原阴性的母猪初乳, 对新生仔猪可起到一定的保护作用。

目前, TGEV 的检测通常采用 PCR 方法, 但是普通 PCR 方法灵敏度相对较低, 对病毒含量过低的样品一般不易检出, 容易发生漏检, 而且普通 PCR 方法检测耗时较长。本研究根据 TGEV 的 N 基因序列设计 1 对特异性引物, 拟建立一种基于 SYBR Green II 染料快速检测 TGEV 的 qPCR 方法, 通过实时荧光定量分析母猪初乳中的 TGEV 病毒数量, 为控制猪传染性胃肠炎病的传播提供灵敏而快速的监测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 毒株

猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV) SC-T 株、A 群猪轮状病毒 (Group A porcine rotavirus, ProV-A) SC201201 株、猪流行性腹泻病毒 (Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) SC2011 株、猪瘟病毒 (Classical swine fever virus, CSFV) C 株、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Porcine respiratory and reproductivesyn-drome virus, PRRSV) SCM 株, 均由四川农业大学动物生物技术中心分离鉴定并保存。

### 1.2 临床样品的收集及处理

猪初乳样品于 2016 年 10 月-2017 年 4 月间采自四川省内 10 个疑似 TGE 猪场 (2 周龄内仔猪严重腹泻、脱水以及高死亡率) 母猪初乳样品共计 130

份, 其中 30 份采自 5 个散养户猪场, 100 份采自 5 个规模化猪场。参照孙瑞芹的方法<sup>[7]</sup>收集、处理乳汁, 并低温运送至实验室, -80 °C 保存备用。

### 1.3 主要试剂

DL2000 DNA Marker、2×Taq PCR Master Mix、SYBR Green Premi×E×Taq II 购自北京天根生化科技有限公司, 逆转录试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、pMD19-T Simple Vector、质粒 DNA 小量提取试剂盒购自大连宝生物工程有限公司, Trizol 购自 Invitrogen 公司, 大肠埃希菌 DH5α 和感受态细胞由本实验室制备并保存, 其他试剂均为分析纯。

### 1.4 qPCR 引物的设计及合成

从 GenBank 上下载 TGEV N 基因序列, 利用 DNASTar 5.0 软件进行分析比较, 选出高度保守且特异的核苷酸区域, 利用 Primer Premier 5.0 软件根据 TGEV 保守区域基因设计 1 对引物。上游引物 (TGEV-F) 序列为 5'-ACGCTTGCTAGTCTGCTG-3', 下游引物 (TGEV-R) 序列为 5'-GGATTGTTGCCTGCCTCT-3', 预期扩增目的片段长度为 174 bp。采用 BLAST 工具初步验证该引物的特异性。引物送往宝生物工程 (大连) 有限公司合成。

### 1.5 TGEV N 基因片段重组质粒的制备

**1.5.1 病毒 RNA 的提取及 cDNA 的制备** 按照试剂盒操作方法提取 TGEV 阳性病料总 RNA, 随后用反转录试剂盒将提取的 RNA 反转录成 cDNA。转录体系 (10.0 μl) 为: 总 RNA 3.0 μl, 5×Primescript buffer 2.0 μl, Primer script RT enzyme mix I 0.5 μl, Oligo dT primer 0.5 μl, Random 6 mers 0.5 μl, RNase free H<sub>2</sub>O 3.5 μl。反转录条件为: 37 °C 15 min, 85 °C 30 s。将转录产物置于 -20 °C 保存备用。

**1.5.2 目的基因的 PCR 扩增** 以反转录得到的 cDNA 为模板, 用所设计的特异性荧光定量引物对模板进行 PCR 扩增。扩增体系 (50 μl): 2×Taq PCR Master Mix 25 μl, TGEV-F 2 μl, TGEV-R 2 μl, ddH<sub>2</sub>O 19 μl, cDNA 2 μl。反应条件: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 20 s, 35 个循环, 最后 72 °C

延伸 7 min。取 5  $\mu\text{l}$  PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳,对扩增的目的片段大小进行初步验证。

**1.5.3 重组质粒的构建及浓度测定** 使用 DNA 凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物,回收后的产物与 pMD 19-T simple Vector 相连接,构建重组质粒。取 2  $\mu\text{l}$  TGEV 重组阳性质粒,在核酸蛋白仪上测定  $OD_{260}$  和  $OD_{280}$ ,计算重组质粒  $OD_{260}$  与  $OD_{280}$  的比值。计算质粒拷贝数,拷贝数=质粒浓度( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) $\times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23}$ /质粒分子量。

## 1.6 qPCR 检测方法的建立

**1.6.1 标准曲线的制作** 按照 10 倍系列连续稀释的方法处理重组质粒。取 7 个梯度的重组质粒(1  $\mu\text{l}$   $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^8$  拷贝)作为模板,同时设立空白对照,每个梯度重组质粒及空白对照设 3 个重复。用优化后的 qPCR 体系及程序进行检测,横坐标为起始模板数的对数,纵坐标为反应的循环数( $C_t$  值),标准曲线由荧光定量仪自动生成。

**1.6.2 特异性试验** 分别提取 TGEV、ProV-A、PEDV、CSFV、PRRSV 的 RNA,并反转录为 cDNA,以 cDNA 为模板进行 qPCR 扩增,评价该方法的特异性。

**1.6.3 敏感性试验** 对重组质粒进行连续 10 倍系列稀释,以稀释后的各浓度重组质粒作为模板,用所建立的 qPCR 和普通 PCR 进行检测,确定检测下限,并将两种方法进行对比,对灵敏度进行评价。

**1.6.4 重复性试验** 对重组质粒进行连续 10 倍系列稀释,对同一浓度的重组质粒设 3 个重复,用所建立的 qPCR 方法进行检测,作为组内重复性试验。取以上稀释好的样品,在同一反应条件下进行 3 次独立的 qPCR 检测,作为组间重复性试验。通过计算  $C_t$  值的变异系数(CV),验证并评估此 qPCR 检测方法的重复性。

## 1.7 临床样品检测

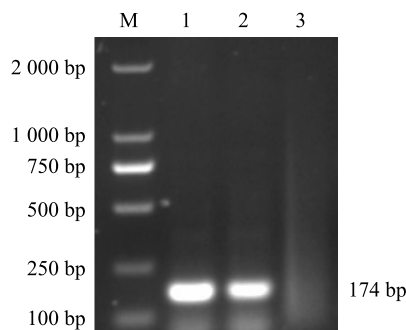
对采集自四川省部分地区(腹泻猪场)的母猪初乳 130 份,分别用建立的 qPCR 方法和普通 PCR 方法进行检测,比较检测结果。

# 2 结果

## 2.1 TGEV N 基因片段重组质粒的鉴定

提取的 TGEV 阳性病料总 RNA 反转录成 cDNA,利用设计的引物进行 PCR 扩增,得到与目的片段大小一致的扩增产物。回收 PCR 产物,与 pMD

19-T simple Vector 相连接,构建标准质粒,经 PCR 及测序鉴定,证实成功构建了 TGEV N 基因片段重组质粒(图 1)。测定和计算结果显示,质粒的质量浓度为 69.58  $\text{ng}/\mu\text{l}$ ,拷贝数为 1  $\mu\text{l}$   $2.22 \times 10^{10}$  拷贝。



M: DNA 分子质量标准;1: PCR 扩增产物;2: 阳性对照;3: 阴性对照(水)。

图 1 TGEV N 基因片段重组质粒目的片段的 PCR 扩增

Fig.1 Amplification of target fragments of recombinant plasmids containing TGEV N gene fragment by PCR

## 2.2 优化的 TGEV 荧光定量 PCR 检测条件

优化后的 TGEV qPCR 最佳反应体系(25.0  $\mu\text{l}$ )为:SYBR Green Premi $\times$ E $\times$ Taq II 12.5  $\mu\text{l}$ ,上、下游引物(10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )各 1.0  $\mu\text{l}$ ,阳性重组质粒稀释液 2.0  $\mu\text{l}$ ,ddH<sub>2</sub>O 8.5  $\mu\text{l}$ 。最佳反应条件为:95  $^{\circ}\text{C}$  30 s;95  $^{\circ}\text{C}$  5 s,58  $^{\circ}\text{C}$  30 s,39 个循环。熔解曲线:65  $^{\circ}\text{C}$  以 0.5  $^{\circ}\text{C}/\text{s}$  升至 95  $^{\circ}\text{C}$ 。

## 2.3 TGEV 荧光定量 PCR 标准曲线

以 10 倍系列稀释的重组质粒为模板进行 qPCR,扩增结束后系统自动绘制出标准曲线。起始模板浓度与  $C_t$  值呈现良好的线性关系,相关系数( $r$ )达到 0.999,扩增效率( $E$ )=101.8%。模板起始浓度与  $C_t$  值之间的线性关系表达式: $Y = -3.280x + 38.276$ 。根据标准曲线方程,在已知待检样品的循环阈值( $C_t$  值)的情况下,可以推算出待检样品的初始拷贝数,以进行定量测算。

## 2.4 TGEV 荧光定量 PCR 的熔解曲线与特异性

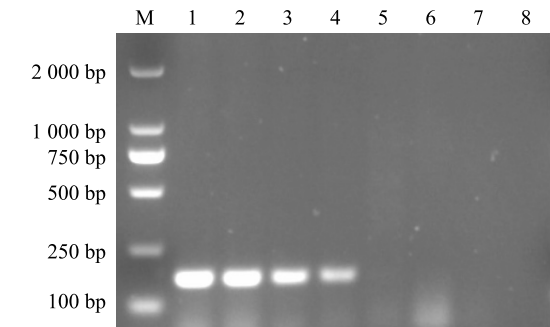
所建立的 qPCR 对阳性重组质粒的扩增产物熔解曲线显示,在熔解温度( $T_m$ )为 81.0  $^{\circ}\text{C}$  左右出现了唯一的特异性峰,无引物二聚体或其余杂峰。

用建立的 qPCR 方法对猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)、A 群猪轮状病毒(ProV-A)、猪流行性腹泻病毒(PEDV)、猪瘟病毒(CSFV)、猪繁殖与呼吸综

合征病毒 (PRRSV) 进行检测,结果显示,除了 TGEV 的检测结果为阳性外,其余病毒检测结果均为阴性。将样品扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,仅 TGEV 阳性样品扩增产物出现约 174 bp 的特异电泳条带,与预期结果一致。

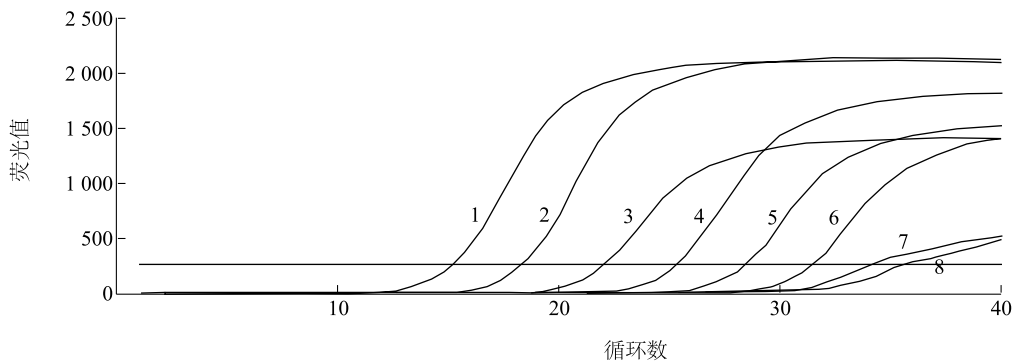
2.5 TGEV 荧光定量 PCR 检测方法的灵敏性

用 10 倍系列稀释的 TGEV N 基因片段重组质粒作为模板,进行 qPCR 和普通 PCR 检测,结果显示普通 PCR 的检测下限为 1 μl 2.22×10<sup>5</sup> 拷贝 (图 2),而 qPCR 的灵敏度可以达到 1 μl 2.22×10<sup>2</sup> 拷贝 (图 3)。通过对比可知,qPCR 方法比常规 PCR 法敏感 1 000 倍。



M: DNA 分子质量标准;1~7:10 倍系列稀释的重组质粒拷贝数依次为 1 μl 2.22×10<sup>8</sup>~2.22×10<sup>2</sup> 拷贝;8:阴性对照 (水)。

图 2 普通 PCR 方法检测 TGEV 的灵敏性  
Fig.2 Sensitivity of TGEV detection by common PCR method



1~7:10 倍系列稀释的重组质粒拷贝数依次为 1 μl 2.22×10<sup>8</sup>~2.22×10<sup>2</sup> 拷贝;8:阴性对照。

图 3 qPCR 方法检测 TGEV 的灵敏性  
Fig.3 Sensitivity of TGEV detection by qPCR method

2.6 TGEV 荧光定量 PCR 检测方法的重复性

用建立的 qPCR 方法对不同稀释度的重组质粒 (1 μl 1×10<sup>8</sup>~1×10<sup>2</sup> 拷贝) 分别进行 3 次重复检测,作为组内重复性试验;再取上述样品,在同一反应条

件下进行 3 次独立的 qPCR 检测,作为组间重复性试验。通过计算变异系数 (表 1、表 2) 发现,组内变异系数小于 1.0%,组间变异系数小于 1.5%,表明所建立的 qPCR 检测方法具有良好的重复性。

表 1 qPCR 检测方法的组内变异系数 (CV)  
Table 1 Intra-batch coefficient variant (CV) of the qPCR assay

样品浓度 (1 μl 拷贝数)	Ct 值				方差	组内变异系数 (%)
	重复 1	重复 2	重复 3	平均		
1×10 <sup>8</sup>	10.52	10.68	10.55	10.58	0.07	0.66
1×10 <sup>7</sup>	14.33	14.57	14.48	14.46	0.10	0.68
1×10 <sup>6</sup>	18.01	18.22	18.31	18.18	0.13	0.69
1×10 <sup>5</sup>	21.27	21.33	21.41	21.34	0.06	0.27
1×10 <sup>4</sup>	25.89	25.76	25.69	25.78	0.08	0.32
1×10 <sup>3</sup>	27.22	27.25	27.23	27.23	0.01	0.05
1×10 <sup>2</sup>	30.44	30.52	30.37	30.44	0.06	0.20



表 2 qPCR 检测方法的组间变异系数 (CV)

Table 2 Inter-batch coefficient variant (CV) of the qPCR assay

样品浓度 (1 $\mu$ l 拷贝数)	Ct 值				方差	组间变异系数 (%)
	重复 1	重复 2	重复 3	平均		
$1 \times 10^8$	10.44	10.58	10.56	10.54	0.06	0.62
$1 \times 10^7$	14.86	15.16	15.28	15.09	0.18	1.17
$1 \times 10^6$	18.03	18.76	18.46	18.42	0.30	0.99
$1 \times 10^5$	21.61	21.64	21.58	21.61	0.02	0.11
$1 \times 10^4$	25.01	25.18	25.11	25.10	0.07	0.28
$1 \times 10^3$	27.87	27.99	28.05	27.97	0.07	0.27
$1 \times 10^2$	30.41	31.09	30.98	30.83	0.30	0.97

## 2.7 临床样品检测

应用本研究建立的 qPCR 检测方法对临床采集的 130 份疑似 TGE 发病猪的初乳样本进行检测,并与普通 PCR 检测方法进行比较。qPCR 检测结果显示 130 份样本中有 13 份为 TGEV 阳性,而普通 PCR 方法只检测到了 5 份 TGEV 阳性样本。说明 qPCR 方法的敏感性高于普通 PCR 方法。

## 3 讨论

2010 年冬季以来,全国多个猪场暴发传染性腹泻,导致哺乳仔猪大量死亡,造成惨重经济损失<sup>[8]</sup>。通过本实验室近几年检测发现,引起哺乳仔猪腹泻的主要疾病为 TGE 或 PED,但 TGEV 检出率相对较低。正因为如此,使得 TGEV 经常被忽略,导致猪场发病率大大增加;其次初乳病毒含量较低,普通 PCR 法一般不易检出,也是引起仔猪发病几率增加的重要因素之一。目前 TGEV 的检测方法有核酸探针法、普通 PCR 方法、多重 PCR 方法、套式 PCR 法、qPCR 方法、环介导等温扩增技术等<sup>[9]</sup>。本试验所建立的 qPCR 检测方法灵敏度比普通 PCR 方法高,可以避免漏检情况的发生,而且相比于其余几种方法而言本方法操作简易、成本较低。

TGEV 是一种单股正链 RNA 病毒,全基因组大小接近  $2.86 \times 10^4$  bp。在其结构蛋白基因中,N 基因

高度保守<sup>[10]</sup>。非常适合作为 PCR 检测的靶基因。本研究建立的 qPCR 方法特异性好,在对猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)、A 群猪轮状病毒(ProV-A)、猪流行性腹泻病毒(PEDV)、猪瘟病毒(CSFV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)的检测结果显示,仅 TGEV 为阳性;灵敏度比常规 PCR 法高 1 000 倍,普通 PCR 方法的检测下限为 1  $\mu$ l  $2.22 \times 10^5$  拷贝,而 qPCR 方法的灵敏度可以达到 1  $\mu$ l  $2.22 \times 10^2$  拷贝,也高于李继良等<sup>[11]</sup>和张雪等<sup>[12]</sup>建立的 qPCR 方法的灵敏度(分别为 1  $\mu$ l  $4.90 \times 10^2$  拷贝和  $6.30 \times 10^2$  拷贝);检测结果重复性良好,批内和批间重复试验的变异系数分别低于 1.0%、1.5%,说明本方法的重现率很高、检测数据可靠。建立的 qPCR 检测方法可用于感染潜伏期和早期母猪初乳中 TGEV 的检测,若初乳中检出 TGEV,母猪应及时停止哺乳,以避免初生仔猪受到带毒初乳的危害。加强母猪初乳中 TGEV 的监测对于控制猪传染性胃肠炎病的传播有重要意义。

## 参考文献:

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1997.
- [2] 郭容利,李彬,范宝超,等. 猪传染性胃肠炎病毒分离株 JS2012 全基因组序列分析[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(6): 1351-1358.

- [3] JEFFREY J Z. 猪病学[M]. 赵德明,译.北京:中国农业大学出版社, 2014.
- [4] 张永香. 初乳中分泌型免疫球蛋白(SIgA)在防控新生仔猪腹泻方面的研究进展[J]. 中国动物保健, 2017, 19(2):72-75.
- [5] VAN WETTERE W H, PAIN S J, HUGHES P E. Dietary ractopamine supplementation during the first lactation affects milk composition, piglet growth and sow reproductive performance[J]. Animal Reproduction Science, 2016, 174:87-92.
- [6] BRANDTZAEG P. Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces[J]. Vaccine, 2007, 25(30):5467-5484.
- [7] 孙瑞芹. 华南地区猪流行性腹泻病毒的分子流行病学与病原学研究[D]. 咸阳:西北农林科技大学, 2014.
- [8] SUN R Q, CAI R J, CHEN Y Q, et al. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China[J]. Emerging Infectious Diseases, 2012, 18(1):161-163.
- [9] 朱 密. 猪传染性胃肠炎病毒分子生物学检测方法研究进展[J]. 安徽农学通报, 2016, 22(12):110-111.
- [10] BRIAN D A, DENNIS D E, GUY J S. Genome of porcine transmissible gastroenteritis virus[J]. Journal of Virology, 1980, 34(2):410-415.
- [11] 李继良,王保有,董树仁,等. 猪传染性胃肠炎病毒荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 北京农学院学报, 2016, 31(3):67-70.
- [12] 张 雪,杨 倩,于红欣,等. 猪传染性胃肠炎病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 中国兽医科学, 2015(6):644-648.

(责任编辑:张震林)