

杨晓宇, 徐 雷, 殷鑫欢, 等. 猪非典型性瘟病毒与猪流行性腹泻病毒双重 PCR 方法的建立与应用[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(5): 1081-1086.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.05.016

猪非典型性瘟病毒与猪流行性腹泻病毒双重 PCR 方法的建立与应用

杨晓宇¹, 徐 雷¹, 殷鑫欢¹, 张继宗¹, 徐志文^{1,2}, 朱 玲^{1,2}

(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: 为了快速准确地检测出猪非典型性瘟病毒(APPV)与猪流行性腹泻病毒(PEDV), 根据 GenBank 中发布的 PEDV S2 基因和 APPV NS3 基因的序列, 分别选取 PEDV S2 基因和 APPV NS3 基因的保守序列, 设计、合成了 1 对特异性引物。通过对体系进行优化, 分别扩增出 190 bp 和 500 bp 的特异性片段。建立的双重 RT-PCR 方法对猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪瘟病毒(CSFV)、猪轮状病毒(RV)的检测均为阴性。对 PEDV 和 APPV 的最低检出量分别为 1 μ l 2.65×10^5 和 1 μ l 3.56×10^4 , 对四川遂宁、眉山等地采集到的腹泻、肌肉震颤的病料进行检测, PEDV、APPV 阳性病料检出率分别为 41.18% 和 11.76%, 经分别与特异性检测 APPV 和 PEDV 的单一 RT-PCR 法检测结果进行比较分析, 符合率均为 100%。与单一 RT-PCR 检测方法具有相同特异性和重复性, 可用于临床检测。

关键词: 猪非典型性瘟病毒; 猪流行性腹泻病毒; 双重 RT-PCR

中图分类号: S852.65⁺1 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2018)05-1081-06

Establishment and application of double PCR method between atypical porcine pestivirus and porcine epidemic diarrhea virus

YANG Xiao-yu¹, XU Lei¹, YIN Xin-huan¹, ZHANG Ji-zong¹, XU Zhi-wen^{1,2}, ZHU Ling^{1,2}

(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: In order to detect the atypical porcine pestivirus (APPV) and porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) rapidly and accurately, according to the conservative sequences of PEDV S2 gene and APPV NS3 gene deposited in GenBank, a pair of specific primer was designed and synthesized. By optimizing the system, specific fragments of 190 bp and 500 bp were amplified, respectively. The detection results of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), classical swine fever virus (CSFV) and porcine rotavirus (RV) using this double RT-PCR method were negative. The minimum detectable amount of PEDV and APPV were 1 μ l 2.65×10^5 and 1 μ l 3.56×10^4 , respectively. The detection rates for diarrhea and muscular tremor collected from Suining and Meishan in Sichuan province were 41.18% and

11.76%, respectively. The coincidence rates of the results detected by double RT-PCR method and the specific RT-PCR method for APPV and PEDV were all 100%. The double RT-PCR method has the same sensitivity, specificity and repeatability as the single RT-PCR assay and can be used for clinical detection.

Key words: atypical porcine pestivirus; porcine epidemic diarrhea virus; double RT-PCR

收稿日期: 2018-01-12

基金项目: 四川省科技支撑计划项目(2017NZ0038); 四川省“十三五”育种攻关项目(2016NYZ0052); 国家“十二五”科技支撑计划项目(2015BAD12B04-2.3)

作者简介: 杨晓宇(1993-), 男, 山东烟台人, 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) 1491618529@qq.com

通讯作者: 朱 玲, (Tel) 08352885846; (E-mail) abtcxzl72@126.com

猪非典型性瘟 (APP) 是猪非典型性瘟病毒 (Atypical porcine pestivirus virus, APPV) 引起的仔猪先天性震颤 (俗称“抖抖病”), APP 在临床上可以导致出生仔猪全身肌肉震颤、八字腿、严重可导致全身震颤,吮乳困难。规模化养殖场猪发病率在 5% 左右。先天性震颤 (Congenital tremor) 可以分为 A、B 两种类型^[1-2], B 型没有明显的组织损伤, A 型有明显的大脑脊柱的组织损伤。根据脑和脊柱的受伤程度可将 A 型分为 I~V 5 种亚型, 其中 A-III 型先天性震颤是只有在长白猪品种中存在的遗传性疾病, 其特征是髓鞘缺失, 少突细胞减少^[3]; A-IV 型, 其特点是脑脊髓髓鞘形成过少引起的^[4]; A-V 型病例是由敌百虫中毒引起的^[5], 常导致小脑发育不全; 只有 A-I 与 A-II 是传染病, A-I 型是由猪瘟病毒 (CSFV) 引起的^[6], 但是 A-II 型的病因此前尚未可知。Hause 等^[7]验证了 APPV 是引起仔猪先天性震颤的主要病原, 通过分子和血清学检测, 证明了 APPV 在美国猪群的广泛存在, 随后, 德国、荷兰、奥地利等多个国家先后发现猪群存在 APPV 流行^[8]。猪流行性腹泻病毒 (Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 是引起猪流行性腹泻 (Porcine epidemic diarrhea, PED) 的主要病原, PED 是临床上引起水样腹泻、严重肠炎、呕吐、脱水和食欲下降为症状的高度接触性肠道传染病^[9-10]。由于其传染性强和较短的病程, 哺乳仔猪的死亡率可达 50%~90%, 给养猪业带来巨大的损失。1977 年, 在比利时养猪场分离出一种与腹泻相关的新型冠状病毒样颗粒, 随后在中国、加拿大、德国、日本、韩国等国家相继报道了该病毒。2009 年以来, 韩国、日本相继有 PED 发生, 2010 年冬季以来, 中国也大规模爆发 PED^[11]。

APPV 和 PEDV 都是 RNA 病毒, 均可导致出生仔猪发病。母源抗体是保护仔猪预防 PEDV 的重要手段之一。APPV 的感染导致仔猪吮乳困难, 严重影响仔猪对母乳的摄入, 从而导致母源抗体对出生仔猪的保护力不足。为了进一步研究 APPV 和 PEDV 两者之间的感染状况与疾病的损伤, 本试验建立了同时检测 APPV 和 PEDV 的双重 RT-PCR 方法, 为疾病诊断提供一个快速、灵敏、高效的检测方法, 为疾病防控提供合理依据。

1 材料与方法

1.1 病毒和病料

猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Porcine reproductive

and respiratory syndrome virus, PRRSV)、猪瘟病毒 (Classical swine fever virus, CSFV)、猪非典型性瘟病毒、猪流行性腹泻病毒、猪轮状病毒 (Rotavirus, RV)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 均由四川农业大学动物生物技术中心保存; 病料 (肠道、肠系膜淋巴结、脑、腹股沟淋巴结) 采自四川眉山、遂宁、宜宾、泸州、自贡等各市规模化养猪场。

1.2 主要试剂

DL2000 DNA Marker、RNAiso plus、Taq Hs、10× Reaction Buffer (Mg²⁺ free)、dNTP Mix、ddH₂O、pMD19-T 载体均购自宝生物工程 (大连) 有限公司, DNA 凝胶回收试剂盒 (DNA Gel Extraction Kit) 和质粒提取试剂盒 (Plasmid Kit I) 购自 Omega 公司。

1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 中发表的 PEDV S2 基因 (登录号: JQ638513.1) 和 APPV NS3 基因 (登录号: MF069133.1) 相关序列, 选取其保守序列, 并通过 NCBI 进行特异性比对, 分别设计了一对特异性引物 (表 1), 由生工生物工程 (上海) 有限公司合成。

表 1 双重 RT-PCR 的引物序列

Table 1 Primer sequences for the double RT-PCR

引物名称	引物序列 (5'→3')	预期扩增片段的大小 (bp)
PEDV	F: GAACCTAAGACCAACACGGAT	190
	R: GAGGGTAGGAAGGGAAAG	
APPV	F: TGATCGTCTCATCACCAGCA	500
	R: GCCATCACCACCACAAAAAC	

1.4 样品处理及核酸的提取

将获得的 PEDV 和 APPV 样品分别编号, 将编号的样品在研磨器中多点取样, 剪碎后加入适量的液氮, 研磨成粉末状后加生理盐水形成研磨液, -20℃ 反复冻融 3 次后备用。采用 Trizol 法提取病料的总 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 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 dH₂O 3.5 μl。反转录的条件是: 37℃ 15 min, 85℃ 30 s, 将转录产物置于 -20℃ 保存备用。

以反转录得到的 cDNA 为模板, 用所设计的引

物对模板进行扩增。扩增体系为(25 μl):总 RNA 2.0 μl , 10 \times Reaction buffer 2.5 μl , dNTP Mix 1.0 μl , *Taq* Hs 0.5 μl , dd H₂O 18.0 μl , 上下游引物各 0.5 μl 。反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 4 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 目的片段的克隆及测序

将扩增出来的单一条带用 DNA 凝胶回收试剂盒回收目的片段,连接 pMD19-T 载体,转化到 DH5 α 感受态细胞中。将阳性克隆送到生工生物工程(上海)有限公司测序,并将阳性菌扩大培养后用质粒提取试剂盒提取 PEDV、APPV 质粒,作为后续试验的阳性模板。

1.6 双重 RT-PCR 的建立

1.6.1 Mg^{2+} 、*Taq* Hs、dNTP Mix 用量的优化 在单一 PCR 的基础上,分别改变单一变量对 PEDV 和 APPV 的混合模板进行检测。体系为 25 μl ,分别调整 Mg^{2+} 、*Taq* Hs、dNTP Mix 的用量,选取 Mg^{2+} 的用量依次为 0.5 μl 、1.0 μl 、1.5 μl 、2.0 μl 、2.5 μl 和 3.0 μl ,选取 *Taq* Hs 的用量依次为 0.1 μl 、0.2 μl 、0.3 μl 、0.4 μl 、0.5 μl 和 0.6 μl ,选取 dNTP Mix 的用量依次为 1.0 μl 、1.5 μl 、2.0 μl 、2.5 μl 、3.0 μl 和 3.5 μl 。进行双重 RT-PCR 扩增,反应程序同方法 1.4 单一 PCR 扩增。在保证单一变量的情况下,选取目的条带效果最好的试剂用量。

1.6.2 引物及退火温度的优化 在优化 Mg^{2+} 、*Taq* Hs、dNTP Mix 用量的基础上,单一改变引物用量和退火温度,其引物用量选取 1.0 μl 、1.5 μl 、2.0 μl 和 2.5 μl ,退火温度选取 50.8 $^{\circ}\text{C}$ 、51.8 $^{\circ}\text{C}$ 、53.1 $^{\circ}\text{C}$ 、58.6 $^{\circ}\text{C}$ 、59.9 $^{\circ}\text{C}$ 、61.0 $^{\circ}\text{C}$ 和 61.6 $^{\circ}\text{C}$ 。用来筛选最适引物用量和退火温度。

1.6.3 特异性试验 在上述优化的基础上,用建立的双重 RT-PCR 方法对 PRRSV、CSFV、RV、PEDV、APPV 进行特异性检测,设立阴性对照,扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6.4 重复性试验 对 APPV 和 PEDV 阳性病料进行抽提,以反转录好的 cDNA 为模板,用建好的双重 RT-PCR 方法分别进行批间、批内重复性试验,已验证所建立方法的稳定性。

1.6.5 敏感性试验 用质粒提取试剂盒提取 PEDV、APPV 质粒,用核酸蛋白仪测定所构建的阳性质粒的质量浓度,计算出模板的拷贝数。在上述

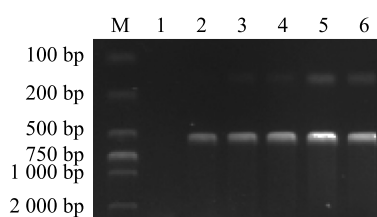
优化体系优化后,将模板倍比稀释进行双重 RT-PCR。

1.6.6 符合性检测 用本研究建立的双重 RT-PCR 方法对四川遂宁、眉山等地采集的病料进行双重 RT-PCR 和单一 PCR 的检测,并对结果、检出率和符合率进行对比分析。

2 结果

2.1 Mg^{2+} 、*Taq* Hs、dNTP Mix 用量的优化

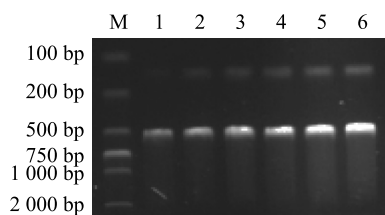
扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,结果显示,当 Mg^{2+} 、*Taq* Hs、dNTP Mix 依次为 2.5 μl 、0.6 μl 、1.0 μl 时,扩增出来的 2 条条带最为清晰(图 1、图 2、图 3)。



M: DNA 分子质量标准;1:0.5 μl ;2:1.0 μl ;3:1.5 μl ;4:2.0 μl ;5:2.5 μl ;6:3.0 μl 。

图 1 双重 RT-PCR Mg^{2+} 的优化

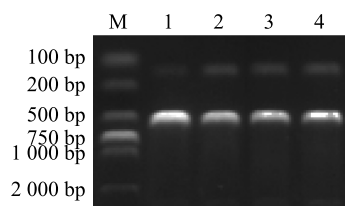
Fig.1 Double RT-PCR amplification with different Mg^{2+}



M: DNA 分子质量标准;1:0.1 μl ;2:0.2 μl ;3:0.3 μl ;4:0.4 μl ;5:0.5 μl ;6:0.6 μl 。

图 2 双重 RT-PCR *Taq* Hs 的优化

Fig.2 Double RT-PCR amplification with different *Taq* Hs



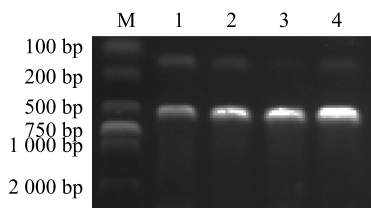
M: DNA 分子质量标准;1:1.0 μl ;2:1.5 μl ;3:2.0 μl ;4:2.5 μl 。

图 3 双重 RT-PCR d NTP Mix 的优化

Fig.3 Double RT-PCR amplification with different d NTP Mix

2.2 引物及退火温度的优化

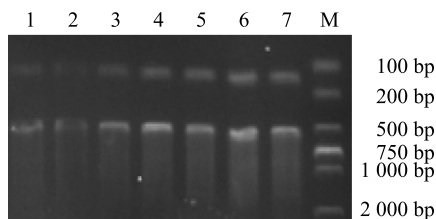
优化结果显示为,当引物用量为 1 μl (图 4),退火温度为 58.6 $^{\circ}\text{C}$ 时(图 5),该方法同时扩增出来的 APPV 和 PEDV 特异性条带亮度相对最清晰。



M: DNA 分子质量标准;1:1.0 μl ;2:1.5 μl ;3:2.0 μl ;4:2.5 μl 。

图 4 双重 RT-PCR 引物的优化

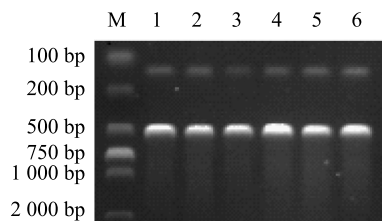
Fig.4 Optimization of primer concentration of the double RT-PCR



M: DNA 分子质量标准;1:50.8 $^{\circ}\text{C}$;2:51.8 $^{\circ}\text{C}$;3:53.1 $^{\circ}\text{C}$;4:58.6 $^{\circ}\text{C}$;5:59.9 $^{\circ}\text{C}$;6:61.0 $^{\circ}\text{C}$;7:61.6 $^{\circ}\text{C}$ 。

图 5 双重 RT-PCR 退火温度的优化

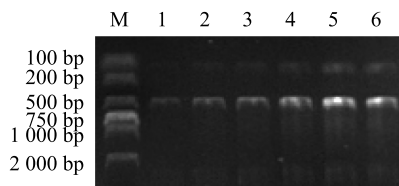
Fig.5 Optimization of annealing temperature of the double RT-PCR



M: DNA 分子质量标准;1~6:批内重复性试验;7~12:批间重复性试验。

图 7 双重 RT-PCR 的重复性试验

Fig.7 Repeatability of the double RT-PCR



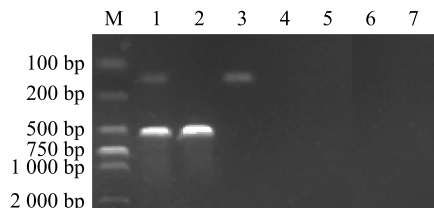
M: DNA 分子质量标准;1~6:模板的稀释梯度分别为 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 。

图 8 双重 RT-PCR 的灵敏性试验

Fig.8 Sensitivity test of the double RT-PCR

2.3 特异性试验

用所建立的双重 RT-PCR 对 PRRSV、CSFV、RV、APPV、PEDV 进行检测,结果(图 6)显示,PRRSV、CSFV、RV 均为阴性,该方法能特异性检测出 APPV 和 PEDV,证明该方法具有很强的特异性。



M: DNA 分子质量标准;1:APPV、PEDV 混合模板;2:APPV 单一模板;3:PEDV 单一模板;4:PRRSV;5:CSFV;6:RV;7:阴性对照。

图 6 双重 RT-PCR 的特异性试验

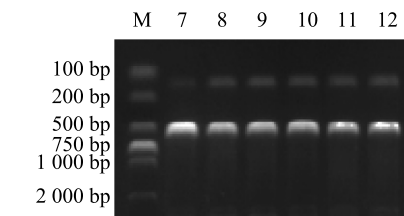
Fig.6 Specificity test of the double RT-PCR

2.4 重复性试验

用所建立的双重 RT-PCR 对阳性模板进行批间与批内重复性检测,结果(图 7)显示阳性模板所扩增出来的目的条带完全相同,证明该方法有良好的重复性。

2.5 敏感性试验

采用建立的双重 RT-PCR 的方法和优化的体系对倍比稀释后的模板进行扩增,结果(图 8)显示 PEDV 的最低检出量为 1 μl 2.65×10^5 ,APPV 的最低检出量为 1 μl 3.56×10^4 ,证明该方法敏感性较强。



2.6 符合性检测

对 34 份采自四川遂宁、眉山等地的疑似病料进行双重 RT-PCR 和单一 PCR 的检测,结果(表 2)显示检出 PEDV 阳性病料 14 份,单一感染阳性率 41.18%。检出 APPV 阳性病料 4 份,单一感染阳性率 11.76%。检出二者混合感染 1 份,检出率 2.94%。双重 RT-PCR 与单一 PCR 检测结果进行比较分析,符合率均为 100%(表 3)。

表 2 PEDV 和 APPV 的检测结果

Table 2 Detection results of PEDV and APPV

检测内容	检测样品数量	测出阳性样品数	阴性样品数量	阳性率 (%)
PEDV	34	14	20	41.18
APPV	34	4	30	11.76
PEDV+APPV	34	1	33	2.94

表 3 双重 RT-PCR 和单一 RT-PCR 对临床病料检测结果的比较

Table 3 Comparison of the clinical results detected by single RT-PCR method and double RT-PCR method

检测内容	样品数量	单一 RT-PCR 检出阳性样品数	双重 RT-PCR 检出阳性样品数	符合率 (%)
PEDV	34	14	14	100
APPV	34	4	4	100
PEDV+APPV	34	1	1	100

3 讨论

最近几年, PEDV 的感染率越来越高, 由于其传染性强和较短的病程, 哺乳仔猪的死亡率可达 50%~90%, 给养猪业带来巨大的损失。新生仔猪的免疫系统发育不完全^[12], 对其进行 PEDV 疫苗注射无法诱导产生有效的体液免疫和肠道黏膜的免疫, 所以母源抗体对新生仔猪尤为重要。初乳中免疫球蛋白主要为 IgG, 乳汁中主要为 SIgA^[13], 乳汁的黏膜免疫对新生仔猪保护力已经被试验证明^[14]。新生仔猪需要足够的免疫乳汁来抵抗 PEDV 感染, 所以新生仔猪能够喝到初乳和乳汁尤为重要。先天性震颤是新生仔猪常见的一种现象^[1], 会导致新生仔猪全身肌肉震颤, 尽管摇动本身并不直接导致死亡, 但震颤可以妨碍仔猪发现奶嘴, 从而导致仔猪喝不到足够的初乳和乳汁, 严重的可导致发育迟缓或死亡。自 2010 年, 新一轮 PEDV 在全球流行, 作者认为, 造成 PEDV 新一轮流行的原因除了 PEDV 变异株的出现, 规模化养殖场疫苗免疫程序不当, 现行疫苗无法对其进行有效的保护之外, 出生仔猪是否能够得到母源抗体的保护也是一个很重要的方面。而非典型性瘟病毒恰恰会导致出生仔猪全身震颤, 妨碍仔猪发现奶嘴。有报道, 中国新生仔猪先天性震颤在规模化猪场发病率约为 5%~6%^[15], 在大多数受到新生仔猪先天性震颤影响的猪场中, APPV 的

发现率在 1%~20%^[16]。本次试验建立的双重 RT-PCR 方法, 通过优化反应体系和试剂用量, 可以同时检测出 PEDV、APPV。相较于单一 RT-PCR 方法更为简单、省时、省力, 同时也节约了检测试剂的损耗。根据 PEDV S2 基因和 APPV NS3 基因的保守序列设计引物, 保证了扩增出来的目的片段高度保守, 防止了因为病毒的变异而导致试验结果的假阴性。研究中所设计的 2 对引物分别能够扩增出 190 bp 和 500 bp 的目的条带, 与设计的引物长度一致, 证明了该方法的特异性。对 PEDV 和 APPV 的最低检出量分别为 1 μ l 2.65×10^5 和 1 μ l 3.56×10^4 , 具有较高的灵敏性。对样品进行符合性检测, 符合率为 100%, 证明该方法的可行性。相较于单一 RT-PCR 方法, 省时、省力、特异、敏感, 对 PEDV 和 APPV 混合感染的检测及流行病学调查具有重要意义。

参考文献:

- [1] DONE J T, WOOLLEY J, UPCOTT D H, et al. Porcine congenital tremor type AII: Spinal cord morphometry[J]. British Veterinary Journal, 1986, 142:145-150.
- [2] DONE J T, HARDING J D. Congenital tremor in pigs (trembling disease of piglets): lesions and causes[J]. Dtsch Tierarztl Wochenschr, 1967, 74:333-336.
- [3] BLAKEMORE W F, HARDING J D, DONE J T. Ultrastructural observations on the spinal cord of a Landrace pig with congenital tremor type AIII[J]. Research in Veterinary Science, 1974, 17:174-178.
- [4] PATTERSON D S, SWEASEY D, BRUSH P J, et al. Neurochemistry of the spinal cord in British Saddleback piglets affected with congenital tremor, type A-IV, a second form of hereditary cerebospinal hypomyelination[J]. Journal of Neurochemistry, 1973, 21:397-406.
- [5] KNOX B, ASKAA J, BASSE A, et al. Congenital ataxia and tremor with cerebellar hypoplasia in piglets borne by sows treated with Neguvon vet. (metrifonate, trichlorfon) during pregnancy[J]. Nordisk Veterinaermedicin, 1978, 30:538-545.
- [6] DONE J T, WOOLEY J, UPCOTT D H, et al. Porcine congenital tremor type AI: Spinal cord morphometry[J]. British Veterinary Journal, 1986, 142 (2):145-150.
- [7] HAUSE B. Discovery of a novel putative atypical porcine pestivirus in pigs in the United States[J]. Journal of General Virology, 2015, 96(10):2994.
- [8] POSTEL A, HANSMANN F, BAECHLEIN C, et al. Presence of atypical porcine pestivirus (APPV) genomes in new-born piglets correlates with congenital tremor[J]. Sci Rep, 2016, 6:27735.
- [9] 杨春华, 王强, 王毅, 等. 猪流行性腹泻的诊断与科学防治[J]. 畜牧与饲料科学, 2009(7):34-36.

- [10] 杨云乔,郑建高,姜军华,等.复方中药治疗流行性腹泻病毒感染猪的消化道黏膜电镜观察及相关酶检测[J]. 江苏农业科学,2017,45(17):159-163.
- [11] SUN R Q, CAI R J, CHEN Y Q, et al. [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2012, 18(1):161-163.
- [12] JUNG K, SAIF L J. Porcine epidemic diarrhea virus infection; Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis[J]. *Veterinary J*, 2015, 204(2):134-143.
- [13] KLOBASA F, WERHAHN E, BUTLER J E. Composition of sow milk during lactation[J]. *J Animal Sci*, 1987, 64(5):1458-1466.
- [14] WESLEY R D, LAGER K M. Increased litter survival rates, reduced clinical illness and better lactogenic immunity against TGEV in gilts that were primed as neonates with porcine respiratory coronavirus (PRCV) [J]. *Veterinary Microbiol*, 2003, 95(3):175-186.
- [15] YUAN J, HAN Z, LI J, et al. Atypical porcine pestivirus as a novel type of pestivirus in pigs in China[J]. *Front Microbiol*, 2017, 8:862.
- [16] SCHWARZ L, RIEDEL C, HOGLER S, et al. Congenital infection with atypical porcine pestivirus (APPV) is associated with disease and viral persistence[J]. *Vet Res*, 2017, 48(1):1.

(责任编辑:陈海霞)