

姜子义, 李 碧, 蔡 瑶, 等. 猪伪狂犬病毒野毒株与疫苗株的多重 PCR 鉴别[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(6): 1307-1311.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.06.015

猪伪狂犬病毒野毒株与疫苗株的多重 PCR 鉴别

姜子义¹, 李 碧¹, 蔡 瑶¹, 颜久洪¹, 龚双燕¹, 樊 毅¹, 黄剑波¹, 朱 玲^{1,2},
徐志文^{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: 为建立一种快速鉴别猪伪狂犬病毒野毒株与疫苗株的方法, 根据猪伪狂犬病毒(PRV)全基因序列, 并参照 SA215、Bartha-K61 疫苗株基因缺失位点特征, 在单一检测野毒株与疫苗株的基础上, 针对 *gE*、*gB* 和 *TK* 基因设计引物, 首次建立了同时检测猪伪狂犬病毒野毒株与疫苗株的多重 PCR 检测方法。通过一次 PCR 检测能区分感染野毒株、疫苗株 SA215 和 Bartha-K61, 且与猪圆环Ⅱ型病毒(PCV-2)、细小病毒(PPV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)和猪瘟疫病毒(CSFV)无交叉反应。多次试验证明该方法简单、可靠且敏感度高, 可用于科学研究和临床诊断等方面。

关键词: PRV; 检测; 多重 PCR; 疫苗株; 变异株

中图分类号: S858.282

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2018)06-1307-05

Multiplex PCR identification of pseudorabies vaccine strains and wild viruses

JIANG Zi-yi¹, LI Bi¹, CAI Yao¹, YAN Jiu-qi¹, GONG Shuang-yan¹, FAN Yi¹, HUANG Jian-bo¹,
ZHU Ling^{1,2}, XU Zhi-wen^{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 establish a diagnostic method for rapid identification of swine pseudorabies virus (PRV) wild virus infection and vaccine strains, this study was developed based on the whole gene sequence of PRV and the characteristics of gene deletion sites of SA215 and Bartha-K61 vaccine strains. On the basis of single detection of vaccine virus and wild virus, primers designed for the three genes of *gE*, *gB* and *TK* were used to establish a multiplex PCR assay for the simultaneous detection of wild virus infections and vaccine strains in pigs. The infection of wild-type virus, vaccine strains SA215 and Bartha-K61 were distinguished by the PCR assay once and there was no cross reaction with porcine circovirus type 2(PCV-2), porcine parvovirus(PPV), porcine reproductive and respiratory syndrome virus(PRRSV) and classical swine fever virus(CSFV). Several experiments have proved that the method is simple, reliable and highly sensitive. It can be used in scientific research, clinical diagnosis and other aspects.

Key words: pseudorabies virus(PRV); diagnosis; multiplex PCR; vaccine strain; wild virus

收稿日期: 2018-01-31

基金项目: 国家科技计划(科技支撑-子课题)项目(2015BAD12B00-2); 四川省科技支撑计划项目(2017NZ0038)

作者简介: 姜子义(1992-), 男, 湖南株洲人, 硕士研究生, 主要从事病原分子生物学研究, (E-mail)jiangziyi_2013@163.com

通讯作者: 徐志文, (E-mail) abtcxzw@126.com

猪伪狂犬病毒(Pseudorabiesvirus, PRV)属于疱疹病毒科 α -疱疹病毒亚科, 可感染多种动物, 其中最敏感、唯一的自然宿主, 常呈流行性感染^[1-3]。2012 年以来, 猪伪狂犬病毒变异株在华东、华中、东北、西南和华北地区呈爆发态势^[4], 给养猪业造成了极大的经济损失。PRV *gE* 抗体阳性率从 2012 年的

11.5%上升到了 2014 年的 64.3%^[5],2015–2017 年依然保持非常高的阳性率,通过分离毒株测序对比发现爆发地区都是新变异的野毒株感染。

免疫猪群再次发病,阴性猪场重新转阳性是近年来猪伪狂犬病大流行的最主要特征^[6],猪伪狂犬病防控面临着巨大的挑战。上世纪末中国开始使用 *gE* 缺失的 Bartha-K61 (*gE*-) 疫苗^[7],近年中国自主研发的基因缺失株 SA215 (*gE*-*gI*-*TK*-) 使用相当广泛,对经典毒株有非常好的防控力^[8]。很多研究者报道现有疫苗对近年来变异毒株感染缺乏保护力,血清阴性重新转阳性^[8-9],在绵羊攻毒保护模型中对新流行变异毒株感染的保护不到 50%^[10]。在未有针对新变异毒株疫苗的情况下,快速区分野毒株和疫苗株成为目前防控猪伪狂犬病疫情的当务之急。

本研究旨在建立一种快速、稳定和有效的多重 PCR 检测方法,快速鉴别发病猪感染的变异野毒株和之前接种的疫苗种类,从而采取不同的紧急措施防控猪伪狂犬病疫情。

1 材料与方法

1.1 疫苗和病毒

PRV 基因缺失疫苗株 (SA215、Bartha-K61)、PRV 变异株 (2014 年分离的 XJ 株)、猪圆环 II 型病毒 (PCV-2)、细小病毒 (PPV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV)、T3256 质粒 (*TK* 基因缺失阳性对照质粒)、PP63 质粒 (*gE* 基因缺失阳性对照质粒) 均由四川农业大学动物生物技术中心保存提供。

1.2 细胞与试剂

Vero 细胞购自武汉典型物保藏中心。HS *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、2×GC Buffer II、DL1000™ Marker 均购置于大连宝成生物工程有限公司。

1.3 *gE*、*gB* 和 *TK* 基因核苷酸序列分析

参照文献^[11]和^[12]中的引物进行 *gE*、*gB* 及

TK 全基因扩增和测序。利用 NCBI 进行 BLAST 对比分析,发现 PRV-XJ、PRV-JJ、PRV-MS 和 PRV-YA 新分离株 *gE* 基因扩增核苷酸序列与国内野毒株核苷酸序列的同源性在 91.6%至 98.8%之间,氨基酸序列同源性在 92.1%至 98.6%之间,与国内 2012 年后分离毒株之间核苷酸序列同源性都超过了 97.8%,与经典毒株 Fa、Ea、MinA 株核苷酸序列同源性在 87.9%至 96.8%之间。新分离株 *gB* 基因扩增核苷酸序列与国内野毒株核苷酸序列的同源性在 97.4%至 100.0%之间,氨基酸序列同源性在 96.6%至 100.0%之间,与国内 2012 年后分离毒株之间核苷酸序列同源性都超过了 98.8%,与经典毒株 Fa、Ea、MinA 株核苷酸序列同源性也达到 98.2%以上。新分离株 *TK* 基因扩增核苷酸序列与国内野毒株核苷酸序列同源性在 98.2%至 100.0%之间,氨基酸序列同源性在 97.6%至 100%之间,与国内 2012 年后分离毒株之间核苷酸序列同源性高达 99%,与经典毒株 Fa、Ea、MinA 株核苷酸序列同源性也超过了 98.4%。

PRV-XJ、PRV-JJ、PRV-MS 和 PRV-YA 新分离株的 *gE*、*gB* 和 *TK* 基因都高度保守。大量核苷酸序列对比结果显示,2012 以来新流行的 PRV 变异株之间具有共同的分子特征,即 *gE* 基因编码的氨基酸序列第 48 位和第 492 位各插入了 1 个天冬氨酸,此变异处可作为判断 PRV 是否为变异毒株的重要指标之一^[13-14]。

1.4 引物设计

参照 GenBank 中已发布的序列及 SA215、Bartha-K61 疫苗株的 PRV *gE* 基因、*gB* 基因以及 *TK* 基因的序列,分析对比,找出高度保守区段,应用 Primer5 和 Oligo7.0 软件,优化设计引物 *gE*-F/*gE*-R、*gB*-F/*gB*-R、*TK*-F/*TK*-R (表 1),交上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 引物序列

Table 1 Sequence of primers

基因	引物名称	碱基序列 (5'→3')	产物长度 (bp)
<i>gE</i>	<i>gE</i> -F	CATGGTCTGCTGGGCCCCACGATCGTC	0 (Bartha-K61 株)、0 (SA215 株)、531 (野毒株)
	<i>gE</i> -R	CGTTGAGGTCGCCGTCGAGGTCAT	
<i>gB</i>	<i>gB</i> -F	CCGTCTCCTTGAGCGYCTTC	264 (Bartha-K61 株)、264 (SA215 株)、264 (野毒株)
	<i>gB</i> -R	CGGCATCGCCAACTTCTTCC	
<i>TK</i>	<i>TK</i> -F	CGCACACGCACTGCCGGAT	710 (Bartha-K61 株)、432 (SA215 株)、710 (野毒株)
	<i>TK</i> -R	GCCTTCGCGACGCCGTACCTG	

1.5 鉴别 *gE*、*gB*、*TK* 基因的多重 PCR 方法的建立

1.5.1 多重 PCR 反应的退火温度 (T_m) 优化 在单一基因 PCR 的基础上,确定 30 μl 三重 PCR 优化体系进行试验,在退火温度 60~75 $^{\circ}\text{C}$ 进行梯度试验找出最适退火温度。

1.5.2 多重 PCR 反应中多个引物浓度优化 二重 PCR 反应中,固定一对引物浓度改变另一对引物加入量确定其使用量,然后以优化的一对引物加入量不变,改变另一对引物加入量,一同确定 2 对引物的最适条件。三重 PCR 反应过程建立在二重 PCR 的基础上,保持二重 PCR 引物用量不变确定第三对引物量,最终确定三重 PCR 最适引物浓度。

1.6 敏感性试验

采用优化后的 PCR 条件,PRV 基因缺失疫苗株 (SA215、Bartha-K61)、PRV 变异株 (2014 年分离的 XJ 株) 分别选择不同模板的量,1 μl 1.8×10^{11} 拷贝、 1.8×10^{10} 拷贝、 1.8×10^9 拷贝、 1.8×10^8 拷贝、 1.8×10^7 拷贝、 1.8×10^6 拷贝、 1.8×10^5 拷贝进行 PCR 扩增。

1.7 特异性试验

采用优化后的反应条件和体系分别扩增 PRV 基因缺失疫苗株 (SA215、Bartha-K61)、PRV 变异株 (2014 年分离的 XJ 株)、猪圆环 II 型病毒 (PCV-2)、细小病毒 (PPV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 和猪瘟病毒 (CSFV)。同时用建立的多重 PCR 检测方法对其他变异株 PRV-JJ、PRV-MS、PRV-YA 和经典毒株 PRV-Fa 进行检测。扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,然后用溴化乙锭 (EB) 染色后在凝胶成像系统下成像、观察。

1.8 重复性试验

采用优化后的反应条件和体系,将 PRV 基因缺失疫苗株 (SA215、Bartha-K61) 和 PRV 变异株 (2014 年分离的 XJ 株) 连续扩增 3 次。扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,然后用溴化乙锭 (EB) 染色后在凝胶成像系统下成像、观察。

1.9 临床样品检测试验

采用优化后的反应条件和体系,对收集的 76 份猪伪狂犬病临床样品进行检测。

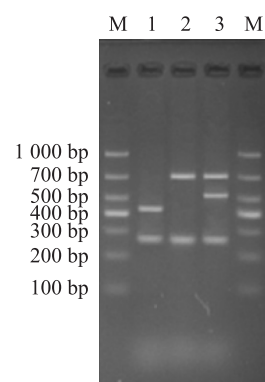
2 结果

2.1 多重 PCR 反应条件优化

通过对多重 PCR 各种反应条件的试验探索,确定 *gE*、*gB*、*TK* 基因多重 PCR 反应体系为: 2 \times GC

Buffer II 15.00 μl 、2.5 mmol/L dNTPs 0.75 μl 、20 $\mu\text{mol/L}$ *gB* 上下游引物各 0.60 μl 、20 $\mu\text{mol/L}$ *TK* 上下游引物各 0.75 μl 、20 $\mu\text{mol/L}$ *gE* 上下游引物各 0.75 μl 、模板 3.10 μl 、HS *Taq* 酶 0.75 μl 、去离子水补足到 30.00 μl 。退火温度 (T_m) 优化为 66 $^{\circ}\text{C}$, 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 66 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。

PRV 野毒 (2014 年分离的 XJ 株) 条带为 264 bp (*gB* 基因)、531 bp (*gE* 基因)、710 bp (*TK* 基因), PRV 基因缺失疫苗株 Bartha-K61 条带为 264 bp (*gB* 基因)、710 bp (*TK* 基因), PRV 基因缺失疫苗株 SA215 条带为 264 bp (*gB* 基因)、432 bp (*TK* 基因) (图 1)。



M: Marker DL1000; 1: PRV 基因缺失疫苗株 SA215; 2: PRV 基因缺失疫苗株 Bartha-K61; 3: PRV 变异株 (2014 年分离的 XJ 株)。

图 1 伪狂犬病毒野毒株和疫苗株的多重 PCR 鉴别

Fig. 1 Multiplex PCR identification of pseudorabies virus (PRV) vaccine strains and wild viruses

2.2 猪伪狂犬病毒多重 PCR 检测方法的敏感性

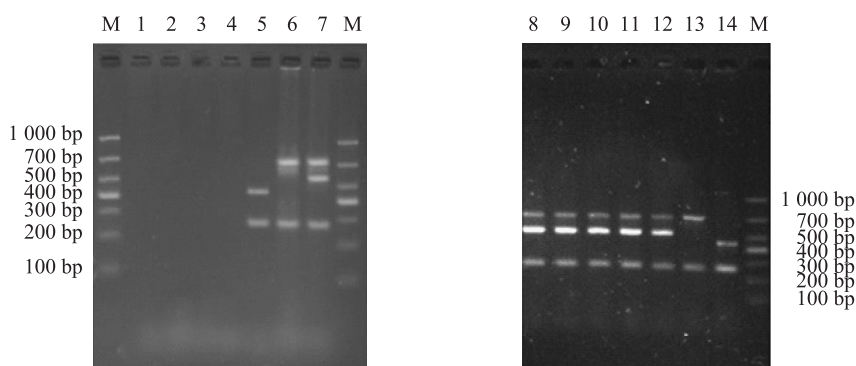
采用优化后的 PCR 反应条件和体系,用不同浓度模板量 1 μl 1.8×10^{11} 拷贝、 1.8×10^{10} 拷贝、 1.8×10^9 拷贝、 1.8×10^8 拷贝、 1.8×10^7 拷贝、 1.8×10^6 拷贝、 1.8×10^5 拷贝进行 PCR 扩增反应。结果表明模板量小于 1 μl 1.8×10^6 拷贝时没有发现目标条带。

2.3 猪伪狂犬病毒多重 PCR 检测方法的特异性

用建立的猪伪狂犬病毒多重 PCR 检测方法检测猪常见疫病病原猪圆环 II 型病毒 (PCV-2)、细小病毒 (PPV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 和猪瘟病毒 (CSFV), 以及猪伪狂犬病毒其他变异株 PRV-JJ、PRV-MS、PRV-YA 和经典毒株 PRV-Fa。结果 (图 2) 显示,猪圆环 II 型病毒 (PCV-2)、细小病毒

(PPV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 和猪瘟病毒 (CSFV) 均未出现特异性条带, PRV 基因缺失疫苗株 (SA215、Bartha-K61) 和 PRV 变异株 PRV-

XJ、PRV-JJ、PRV-MS、PRV-YA 和经典毒株 PRV-Fa 均有特异性目的条带。



M: Marker DL1000; 1: 猪圆环Ⅱ型病毒 (PCV-2); 2: 细小病毒 (PPV); 3: 猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV); 4: 猪瘟病毒 (CSFV); 5: PRV 基因缺失疫苗株 SA215; 6: PRV 基因缺失疫苗株 Bartha-K61; 7: PRV 变异株 (2014 年分离的 XJ 株); 8: PRV 经典株 (Fa 株); 9: PRV 变异株 (YA 株); 10: PRV 变异株 (MS 株); 11: PRV 变异株 (JJ 株); 12: PRV 变异株 (2014 年分离的 XJ 株); 13: PRV 基因缺失疫苗株 Bartha-K61; 14: PRV 基因缺失疫苗株 SA215。

图 2 猪伪狂犬病毒多重 PCR 检测方法的特异性

Fig.2 Specificity of the method for identification of swine pseudorabies virus by multiplex PCR

2.4 猪伪狂犬病毒多重 PCR 检测方法的重复性

将 PRV 基因缺失疫苗株 (SA215、Bartha-K61) 和 PRV 变异株 (2014 年分离的 XJ 株) 连续检测 3 次, 结果完全一致, 说明本方法具有良好的重复性和稳定性。

2.5 临床样品检测试验结果

用建立的猪伪狂犬病毒多重 PCR 检测方法, 对收集的 76 份猪伪狂犬病临床样品进行检测。结果显示 PRV 野毒株、PRV 基因缺失疫苗株 (SA215、Bartha-K61) 均可检出, 其中 39 份为 PRV 野毒株, 16 份为 PRV 基因缺失疫苗株 SA215, 21 份为 PRV 基因缺失疫苗株 Bartha-K61。检测结果与样品来源注射疫苗记录、单一 PCR 检测及测序结果一致。

3 讨论

2012 年以来, 全国超过 20 个省份先后报道发现 PRV 变异株^[15]。疫情表现为大流行, 不同地区 PRV 变异毒株的毒力水平和感染强度都有较大差异, 变异株之间的亲缘关系较近, 变异株与国内传统毒株 (Fa、Ea 及 Min-A 等) 亲缘关系较远^[8, 15-18]。但变异毒株的起源与传统毒株相同, 其中华东地区的感染率最高, 分离的变异株毒力最强^[19]。对新发现 PRV 变异毒株的研究结果表明, 当前各地区流行的

不同变异毒株在毒力增强的同时抗原也发生了一定程度的变异^[17-18]。这也解释了当前广泛使用的基因缺失疫苗株 SA215、Bartha-K61 无法对变异猪伪狂犬病毒侵染提供完全免疫保护的原因^[20-24]。

本试验所建立的区分猪伪狂犬病毒野毒株与疫苗株的多重 PCR 检测方法能够可靠、快速、有效地鉴别野毒株和疫苗株, 区分度大。研究中针对 PRV 的 3 个重要高度保守基因 *gE*、*gB* 和 *TK* 基因设计了 3 对特异性引物, 通过 PCR 扩增条件的优化, 确定 3 对引物的最佳退火温度为 66 °C。在单引物敏感性试验的基础上, 通过优化引物浓度, 最后建立了多重 PCR 检测方法。试验结果表明, *gE*、*gB* 和 *TK* 基因的高度保守确保了扩增片段的正确性, 避免了假阳性结果的发生, 3 个基因的目的条带 264 bp (*gB*)、432 bp (*TK*)、531 bp (*gE*) 和 710 bp (*TK*) 区分度较高, 通过电泳能够直观区分野毒株和疫苗株。敏感性试验结果显示, 本研究的多重 PCR 检测方法能够检测的最低浓度为 1 μl 1.8×10⁶ 拷贝, 具有较高的灵敏度。用多重 PCR 方法对收集的 76 份临床样品进行检测, 检测结果完全正确, 与普通检测方法一致, 证明本方法切实有效。本研究所建立的多重 PCR 检测方法可用于目前 PRV 疫情检测, 为控制猪伪狂犬病毒大流行、大爆发提供了一种可靠、快速、有效

的检测方法,对切实防控猪伪狂犬病具有十分重要的意义。

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,1997:1180-1183.
- [2] JEFFREY J Z. 猪病学[M]. 赵德明,张仲秋,周向梅,等译.北京:中国农业大学出版社,2014.
- [3] 秦树英,许力士,覃念,等. 2013-2016年广西猪伪狂犬病流行病学调查分析[J].南方农业学报,2017,48(10):1912-1917.
- [4] LIU H, LI X T, HU B, et al. Outbreak of severe pseudorabies virus infection in pig-offal-fed farmed mink in Liaoning Province, China[J]. Archives of Virology, 2017, 162(3):863-866.
- [5] 华利忠,刘剑锋,冯志新,等. 猪伪狂犬病毒新流行变异毒株的研究进展[J]. 江苏农业学报,2017,33(2):476-480.
- [6] ZHANG C, GUO L, JIA X, et al. Construction of a triple gene-deleted Chinese Pseudorabies virus variant and its efficacy study as a vaccine candidate on suckling piglets[J]. Vaccine, 2015, 33(21):2432-2437.
- [7] 郭广君. 猪伪狂犬病毒野毒与基因缺失疫苗株鉴别检测方法的建立及应用[D].长春:吉林大学,2013.
- [8] 于之清. 伪狂犬病毒抗原性变异的分子基础研究[D].北京:中国农业科学院,2017.
- [9] YU X, ZHOU Z, HU D, et al. Pathogenic pseudorabies virus, China, 2012[J]. Emerging Infectious Diseases, 2014, 20(1):102.
- [10] 刘小琬. 伪狂犬病毒的分离鉴定及 gI/gE 双基因缺失株的构建[D].雅安:四川农业大学,2016.
- [11] 周复春,陈焕春,方六荣,等. 伪狂犬病毒鄂 A 株 TK 基因的克隆及其鉴定[J]. 中国兽医学报,1999,19(5):417-420.
- [12] XIULING Y, ZHI Z, DONGMEI H, et al. Pathogenic pseudorabies virus, China, 2012[J]. Emerging Infectious Diseases, 2014, 20(1):102-104.
- [13] 覃雨阳,李雪梅,马军,等.广西地区猪伪狂犬病毒 gE 基因的序列分析[J].动物医学进展,2016,37(1):17-21.
- [14] 张志,樊雅婷,吴发兴,等. 伪狂犬病毒野毒株与疫苗株的实时荧光定量 PCR 鉴别方法的建立[J]. 中国兽医科学,2015,45(7):680-685.
- [15] SONG C, GAO L, BAI W, et al. Molecular epidemiology of pseudorabies virus in Yunnan and the sequence analysis of its gD gene[J]. Virus Genes, 2017, 53(3):392.
- [16] 王继春,曾容愚, DANIEL T, 等. 猪伪狂犬病活疫苗(Bartha K61株)对变异株的保护效力[J]. 畜牧与兽医,2015,47(12):1-4.
- [17] 杨珊珊,徐璇,孙涛,等. 2016年江苏省部分猪场猪伪狂犬病血清流行病学调查[J]. 中国动物检疫,2017,34(8):17-19.
- [18] DONG B, ZARLENGA D S, REN X. An overview of live attenuated recombinant pseudorabies viruses for use as novel vaccines[J]. Journal of Immunology Research, 2014, 2014(1):824630.
- [19] 黄晓慧,吴华健,华耀,等. 安徽部分地区规模化猪场伪狂犬病血清流行病学调查[J]. 动物医学进展,2017,38(8):126-130.
- [20] TANG Y D, LIU J T, FANG Q Q, et al. Recombinant pseudorabies virus (PRV) expressing firefly luciferase effectively screened for CRISPR/Cas9 single guide RNAs and antiviral compounds[J]. Viruses, 2016, 8(4):90.
- [21] 张明辉,库旭钢,凌云志,等. 猪伪狂犬病毒 HNX 株在免疫猪群中水平传播能力的研究[J]. 中国预防兽医学报,2015,37(6):426-429.
- [22] GU Z, DONG J, WANG J, et al. A novel inactivated gE/gI deleted pseudorabies virus (PRV) vaccine completely protects pigs from an emerged variant PRV challenge[J]. Virus Research, 2015, 195:57.
- [23] WANG T, XIAO Y, YANG Q, et al. Construction of a gE-deleted pseudorabies virus and its efficacy to the new-emerging variant PRV challenge in the form of killed vaccine[J]. Biomed Research International, 2016, 2015(1):684945.
- [24] GU Z, HOU C, SUN H, et al. Emergence of highly virulent pseudorabies virus in southern China[J]. Canadian Journal of Veterinary Research, 2015, 79(3):221-228.

(责任编辑:张震林)