

徐 雷, 赵 军, 杨晓宇, 等. 猪繁殖与呼吸综合征类 NADC30 与 HP-PRRSV 毒株 RT-PCR 鉴别方法的建立与应用[ J ]. 江苏农业学报, 2019, 35( 1 ): 109-113.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.01.016

## 猪繁殖与呼吸综合征类 NADC30 与 HP-PRRSV 毒株 RT-PCR 鉴别方法的建立与应用

徐 雷<sup>1</sup>, 赵 军<sup>1</sup>, 杨晓宇<sup>1</sup>, 殷鑫欢<sup>1</sup>, 张继宗<sup>1</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. 动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川 成都 611130)

**摘要:** 猪繁殖与呼吸综合征病毒( PRRSV )是一种能够引起大面积呼吸道疾病并快速传播, 导致母猪流产和仔猪死亡的 RNA 病毒, 其特性为变异快, 存在毒株间的重组。因此, 病原的快速检测和鉴定对于该病的防控十分重要。本试验建立了一种能够区分高致病猪繁殖与呼吸综合征病毒类 NADC30 与 HP-PRRSV 毒株的检测方法, 根据 *nsp2* 基因的高变区的比对结果, 选择其保守序列, 设计一对检测引物, 类 NADC30 扩增片段大小为 334 bp, HP-PRRSV 毒株扩增片段大小为 514 bp, 通过优化反应条件, 最终建立了一种一对引物就可以区分检测类 NADC30 与 HP-PRRSV 毒株的 RT-PCR 检测方法。应用本试验所建立的 RT-PCR 方法对 2017 年 12 月至 2018 年 2 月采自四川多地区的疑似 PRRSV 感染发病的 46 份肺脏进行检测。结果显示, 类 NADC30 检出率为 32.6%, 高于 HP-PRRSV 毒株的检出率( 10.9% )。该方法的建立, 为类 NADC30 和 HP-PRRSV 毒株的快速鉴别诊断提供了方法, 具有重要意义。

**关键词:** 猪繁殖与呼吸综合征; 类 NADC30; HP-PRRSV; 鉴别诊断; RT-PCR

**中图分类号:** S828 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440( 2019 ) 01-0109-05

## Establishment and application of RT-PCR methods for identifying porcine reproductive and respiratory syndrome virus ( PRRSV ) NADC30-like strain and HP-PRRSV strain

XU Lei<sup>1</sup>, ZHAO Jun<sup>1</sup>, YANG Xiao-yu<sup>1</sup>, YIN Xin-huan<sup>1</sup>, ZHANG Ji-zong<sup>1</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, Chengdu 611130, China )

**Abstract:** The porcine reproductive and respiratory syndrome virus( PRRSV ) is a RNA virus that can cause a large area of respiratory diseases and spread rapidly, resulting in a large number of abortions and piglet deaths in sows. Its characteristics include rapid variation and recombination between strains. Therefore, the rapid detection and identification of pathogens is very important for the prevention and control of the disease. To establish a RT-PCR detection method for distinguishing the PRRSV NADC30-like strain from HP-PRRSV strain, the conserved sequence was selected and a pair of detection

收稿日期: 2018-04-02

基金项目: “十二五” 国家科技计划项目( 2015BAD12B04-2.3 ); 四川省科技支撑计划项目( 2016NYZ0052、2017NZ0038 )

作者简介: 徐 雷( 1994- ), 男, 四川绵阳人, 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 ) 601473235@qq.com

通讯作者: 朱 玲, ( E-mail ) abtcl72@126.com

primers were designed based on the comparison of the hypervariable regions of the *nsp2* gene. The amplified fragments of the NADC30-like strain and HP-PRRSV strain were 334 bp and 514 bp. By optimizing the reaction conditions, a RT-PCR detection method using a pair of primers to distinguish NADC30-like strain and the HP-PRRSV was established. Using the RT-PCR method estab-

lished in this experiment, 46 cases of suspected PRRSV infections collected from many areas in Sichuan from December 2017 to February 2018 were tested. The detection rate of NADC30-like was 32.6%, which was higher than that of HP-PRRSV strain (10.9%). In conclusion, these results provide a method for rapid differential diagnosis of NADC30-like and HP-PRRSV strains and have great significance.

**Key words:** porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV); NADC30-like strain; HP-PRRSV; differential diagnosis; RT-PCR

猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 属于动脉炎病毒科, 有囊膜, 是单股正链 RNA 病毒, 基因组约长 13~15 kb。自 1987 年被首次报道<sup>[1]</sup>时就一直是影响养猪业健康发展的呼吸道疾病和繁殖障碍的传染性疾病, 1996 年郭宝清等<sup>[2]</sup>首次从流产胎儿中分离出 PRRSV, 证实中国成为了 PRRSV 流行区域, 随后暴发猪繁殖与呼吸综合征, 然后发展成为高致病猪繁殖与呼吸综合征 (Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome, HP-PRRS)<sup>[3]</sup>, 并且逐步向全国蔓延<sup>[4]</sup>。在 2008 年, 美国暴发猪呼吸道疾病, 并分离出病毒命名为 NADC30, 2013 年, 在中国河南首次发现了类 NADC30<sup>[5]</sup>, 在 2017 年四川大面积暴发母猪流产, 断奶仔猪表现为呼吸困难, 经检测发现病原是类 NADC30。仔猪和育肥猪伴随有间质性肺炎, 出血性肺炎等症状, PRRSV 通常导致免疫功能障碍, 伴随细菌感染, 可能会有胸腔积液并形成绒毛心, 病死率较高, 母猪表现为流产<sup>[6-8]</sup>。由于 PRRSV 会发生自身重组和缺失, 造成近年来在中国流行毒株不断发生变异, 并形成很多新基因亚型和新型毒株, 加之外来毒株传入中国, 虽然根据流行病学和临床症状能够确定感染 PRRSV, 但是 HP-PRRSV 毒株的疫苗对类 NADC30 交叉保护效果差, 因此, 病毒的鉴别对该病的控制非常重要。

PCR 方法是鉴定 PRRSV 毒株的有效方法, 目前已建立了类 NADC30 和 HP-PRRSV 毒株单一的 PCR 检测方法。在实际生产中, 一旦发现 2 个毒株同时感染或者单一毒株感染时, 使用单一 PCR 对其进行检测就会出现操作麻烦, 时间长, 成本增加等缺点。因此, 建立一种一对引物即可区分 HP-PRRSV

毒株和类 NADC30 的 RT-PCR 将使诊断更加方便<sup>[9]</sup>, 本研究拟通过设计一对特异性引物, 能够以类 NADC30 和 HP-PRRSV 毒株为模板, 扩增出不同条带, 能够快速有效地对类 NADC30 和 HP-PRRSV 进行鉴别检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒和病料

类 NADC30 (NADC30-like virus)、HP-PRRSV、猪瘟病毒 (Classical swine fever, CSFV)、细小病毒 (Porcine parvovirus, PPV)、日本乙型脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV)、轮状病毒 (Rotavirus, RV)、猪流行性腹泻病毒 (Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)、猪传染性胃肠炎病毒 (Transmissible gastroenteritis virus, TGEV) 均由四川农业大学动物生物技术中心保存。病料 (肺) 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

2×Taq PCR Master Mix、DNA Marker DL2000 购自北京天根生化科技有限公司; RNAiso Plus、Prime-Script RT Kit 购自大连宝生物工程有限公司。

### 1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 中已发表的类 NADC30 毒株基因组序列 (JN654459.1、KF724397.1、KF724398.1 等) 和 HP-PRRSV 株基因组序列 (EU106888.1、EU236259.1、EU236259.1 等), 通过 MEGA 对比, 选取 *nsp2* 的保守序列, 运用 Primer premier5.0 设计引物, 并采用 NCBI 网站上的 blast 方法, 进行比对其特异性, 引物由生工生物工程 (上海) 有限公司合成 (表 1)。

表 1 引物序列

Table 1 Sequence of primers

引物	引物序列 (5'→3')	产物	大小 (bp)
PRRSV-F	TTGATTGGGATGTTGTGCTTCTCG	NADC30-like; HP-PRRSV	334; 514
PRRSV-R	CGCGGAGCAGGACAGGC		

## 1.4 样品处理和模板制备

将 46 份疑似感染的样品分别编号,多点取样(约 5 g),剪碎,放入研钵,加入液氮研磨成粉末,加入生理盐水形成悬浊液, -20 ℃ 反复冻融 3 次后, 5 000 r/min 离心 5 min, 取 300  $\mu$ l 上清液,按照 RNAiso Plus 说明书抽提总 RNA, 然后按照 Prime-Script RT Kit 试剂盒的说明书将 RNA 反转录为 cDNA 置于 -20 ℃ 备用。

以得到的 cDNA 作为模板,按照 2 $\times$ Taq PCR Master mix 说明书,进行 PCR 扩增,PCR 反应体系为 10  $\mu$ l:总 RNA 1  $\mu$ l,2 $\times$ Taq PCR Master mix 5  $\mu$ l,上下游引物各 0.5  $\mu$ l,加 ddH<sub>2</sub>O 至 10  $\mu$ l。反应条件为:95 ℃ 4 min;95 ℃ 30 s、54 ℃ 30 s、72 ℃ 30 s,30 个循环;72 ℃ 7 min。通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。

## 1.5 RT-PCR 反应条件的优化

引物用量优化:保证反应体系中其他条件不变,使引物用量成为单一变量。将生工合成的引物溶解后,稀释至 10  $\mu$ mol/L,设置引物用量梯度:上下游引物各 1.2  $\mu$ l、1.0  $\mu$ l、0.8  $\mu$ l、0.6  $\mu$ l、0.4  $\mu$ l、0.2  $\mu$ l,确定最佳引物用量。

其次,在确定了最佳引物用量的基础上,优化反应体系的退火温度,确定其最佳退火温度。温度梯度为:46.0 ℃、48.0 ℃、49.3 ℃、51.6 ℃、54.4 ℃、56.3 ℃、58.2 ℃。

## 1.6 特异性试验

参考方法 1.4,将类 NADC30、HP-PRRSV、CSFV、PPV、JEV、RV、PEDV、TGEV 制备 cDNA,以 cDNA 为模板,在优化了的温度和引物用量的反应条件下进行 PCR 扩增,确定引物的特异性。

## 1.7 敏感性试验

用 ScanDrop100 核酸蛋白仪测定类 NADC30 和 HP-PRRSV 混合 cDNA 的浓度,然后将模板 10 倍梯度稀释,然后进行 PCR 扩增,扩增产物通过 1%的琼脂糖凝胶电泳,检测 PCR 的敏感性。

## 1.8 重复性试验

将同一份混合感染 HP-PRRSV、类 NADC30 的肺脏,采用本试验所建立的鉴别类 NADC30 和 HP-PRRSV 毒株的 PCR 方法,进行 PCR 扩增,重复 6 次,验证该方法的重复性。

## 1.9 临床应用

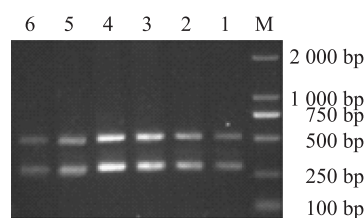
将 2017 年 12 月-2018 年 2 月的疑似样品,用

液氮研磨后加入生理盐水混合形成悬液,反复冻融 3 次,5 000 r/min 离心 5 min 后,取上清液,提取总 RNA,采用所建立的 RT-PCR 对 2017 年 12 月至 2018 年 2 月收集的样品进行检测。并与孙英峰等<sup>[8]</sup>建立的鉴别方法的检测结果进行比较。

# 2 结果

## 2.1 引物用量及退火温度的优化

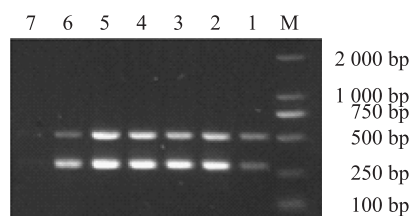
优化结果显示,当上下游引物用量各为 0.6  $\mu$ l (图 1),退火温度为 54.4 ℃ 时(图 2),条带亮度最清晰。



M: DNA 分子质量标准;1:1.2  $\mu$ l;2:1.0  $\mu$ l;3:0.8  $\mu$ l;4:0.6  $\mu$ l;5:0.4  $\mu$ l;6:0.2  $\mu$ l。

图 1 RT-PCR 引物的优化

Fig.1 Optimization of the RT-PCR primer



M: DNA 分子质量标准;1:46.0 ℃;2:48.0 ℃;3:49.3 ℃;4:51.6 ℃;5:54.4 ℃;6:56.3 ℃;7:58.2 ℃。

图 2 RT-PCR 退火温度的优化

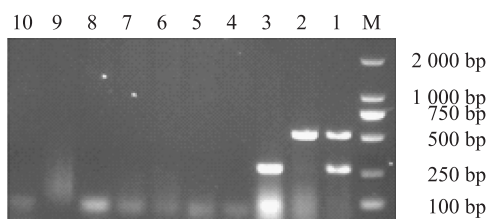
Fig.2 Optimization of annealing temperature of the RT-PCR

## 2.2 特异性试验

用所建立的 RT-PCR 鉴别方法对类 NADC30、HP-PRRSV、CSFV、PPV、JEV、RV、PEDV、TGEV 进行检测,结果(图 3)显示,CSFV、PPV、JEV、RV、PEDV、TGEV 均为阴性,该方法能特异性检测出类 NADC30 毒株和 HP-PRRSV,证明该方法具有很强的特异性。

## 2.3 敏感性试验

采用本试验建立的 PCR 方法对等倍比稀释后的模板进行扩增,结果(图 4)显示,类 NADC30 的最

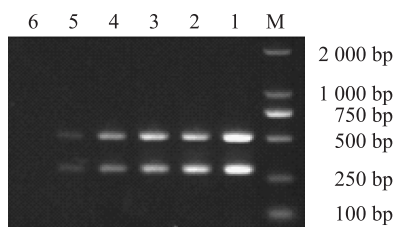


M: DNA 分子质量标准; 1: 类 NADC30、HP-PRRSV 混合模板; 2: HP-PRRSV 单一模板; 3: 类 NADC30 单一模板; 4: 猪瘟病毒; 5: 猪细小病毒; 6: 轮状病毒; 7: 猪流行性腹泻病毒; 8: 猪传染性胃肠炎病毒; 9: 乙型脑炎病毒; 10: 阴性对照。

图 3 RT-PCR 的特异性试验

Fig.3 Specificity test of the RT-PCR

低检出量为  $1 \mu\text{l}$   $7.67 \times 10^5$  拷贝, HP-PRRSV 的最低检出量为  $1 \mu\text{l}$   $4.26 \times 10^5$  拷贝, 证明该方法敏感性较强。



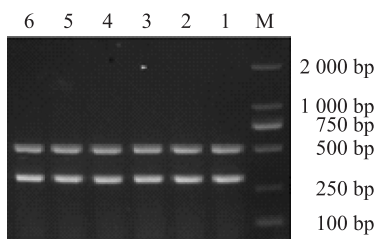
M: DNA 分子质量标准; 1~6: 模板的稀释梯度分别为  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 。

图 4 RT-PCR 的灵敏性试验

Fig.4 Sensitivity test of the RT-PCR

## 2.4 重复性试验

用所建立的 RT-PCR 鉴别方法对同一阳性模板进行检测, 结果显示模板 6 次扩增出来的目的条带完全相同 (图 5), 证明该方法具有很好的重复性。



M: DNA 分子质量标准; 1~6: 为同一模板扩增结果。

图 5 RT-PCR 的重复性试验

Fig.5 Repeatability test of the RT-PCR

## 2.5 临床应用

采用本试验建立的方法对采自四川眉山、遂宁、宜宾、泸州、自贡等地的 46 份流产胎儿肺脏进行检

测。显示检出类 NADC30 阳性 15 份, 阳性率 32.6%。检出 HP-PRRSV 阳性 5 份, 阳性率 10.9%。与孙英峰等<sup>[10]</sup>建立的能够区分 HP-PRRSV、类 NADC30 的 PCR 检测方法相比较, 类 NADC30 检测的一致性为 93.3% (14/15), HP-PRRSV 检测的一致性为 100% (5/5)。

## 3 讨论

PRRSV 作为能够引起呼吸和繁殖方面疾病的病毒, 可通过呼吸道传播, 猪的规模化养殖模式为 PRRS 大规模爆发提供了潜在条件, 一旦暴发, 传播迅速, 导致大量仔猪死亡, 会造成严重的经济损失。PRRSV 灭活疫苗存在安全性和免疫效果差的问题<sup>[11]</sup>, 且不能引起细胞免疫, 为避免 PRRS 发生, 规模化猪场普遍使用 PRRSV 弱毒疫苗对猪群进行防控, 但是目前 PRRSV 弱毒活疫苗存在安全性问题, 弱毒活疫苗对 PRRSV 有较好的防控效果, 但是存在毒力返强, 导致猪场发病; 虽然同源毒株制成的疫苗可以形成交叉保护<sup>[12]</sup>, 但是不同毒株所制成的疫苗则不行; 亲缘性高的毒株容易在猪体内进行基因重组, 形成重组毒株。中国西南地区流行的主要是 HP-PRRSV, 但是在 2017 年下半年, HP-PRRSV 检出率低, 但是出现持续性暴发母猪流产, 保育猪存在呼吸道疾病等问题, 但是没有检测出圆环病毒和伪狂犬病毒。HP-PRRSV 和类 NADC30 混合感染时<sup>[13]</sup>, 单一的 PCR 方法鉴别 HP-PRRSV 与类 NADC30, 耗时, 操作步骤多, 成本增加。

由于国内流行毒株的重组或缺失变异以及毒株的多样性, 导致呼吸道疾病多样化, 一旦发病, 防控困难, 将会给养殖场带来极大的损失。因此, 对当前的猪繁殖与呼吸综合征进行临床监测和分子流行病学调查十分必要, 及时了解当前流行的毒株, 以进行实时监控, 这样才能够对疫情进行及时的防控。本研究根据最近四川部分地区的流行毒株建立类 NADC30 和 HP-PRRSV 毒株的 RT-PCR 鉴别方法, 可以快速有效鉴别类 NADC30 和 HP-PRRSV, 其方便、灵敏、准确、省时等优点, 对于临床诊断及流行病学调查具有重要意义。

## 参考文献:

- [1] 吴加强, 姜平. 猪繁殖与呼吸综合征[J]. 畜牧与兽医, 1999, 3(S1): 42-46.



- [2] 郭宝清,陈章水,刘文兴,等.从疑似 PRRS 流产胎儿分离 PRRSV 的研究[J].中国禽畜传染病,1996,18(2):1-4.
- [3] 童光志,周艳君,郝晓芳,等.高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒的分离鉴定及其分子流行病学分析[J].中国预防兽医学报,2007,29(5):323-327.
- [4] 彭 红.高致病性猪蓝耳病的流行病学调查报告[J].湖南畜牧兽医,2009(6):37-39.
- [5] 周 峰,常洪涛,赵 军,等.2012-2013 年猪繁殖与呼吸综合征病毒河南流行株的分离鉴定及分子流行病学调查[J].中国兽医学报,2014,34(9):1398-1404,1410.
- [6] 卢艳敏.猪感染 PRRSV 后 Cathelicidins 抗菌肽基因的表达情况[J].江苏农业科学,2018,46(2):24-27.
- [7] 张 栋,王善辉,王振勇.猪繁殖与呼吸综合征的临床症状与鉴别诊断[J].中国畜牧兽医文摘,2006,21(1):17-19.
- [8] 张 宁,刘德清,洪绍峰,等. PRRSV 阳性血清驯化对后备母猪繁殖性能的影响[J].南方农业学报,2017,48(6):1113-1118.
- [9] 李小璟,龚双燕,陈瑛琪,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒与猪流行性腹泻病毒双重 RT-PCR 检测方法的建立与应用[J].中国兽医科学,2017,47(5):544-550.
- [10] 孙英峰.天津地区 PRRSV 类 NADC30 毒株的监测、分离毒株的基因组特征与致病性分析[D].北京:中国农业大学,2017.
- [11] ROVIRA A, BALASCH M, SEGAL S J, et al. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2[J]. Journal of Virology, 2002, 76(7):3232-3239.
- [12] 吴佳俊,遇秀玲,蒋桃珍,等.猪繁殖与呼吸综合征灭活疫苗研究进展[J].中国预防兽医学报,2010,32(8):655-658.
- [13] 周 磊,丁玉平.猪繁殖与呼吸综合征病毒类 NADC30 毒株的新近流行[J].中国猪业,2017,12(11):20-23.

(责任编辑:陈海霞)