

安乐乐, 罗 迅, 杨宣叶, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 *ORF7* 基因实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(9): 1681-1688.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.09.012

猪繁殖与呼吸综合征病毒 *ORF7* 基因实时荧光定量 PCR 检测方法的建立

安乐乐^{1,2}, 罗 迅², 杨宣叶^{1,2}, 胡欣妍^{1,2}, 赵永清^{1,2}

(1.西北民族大学生物医学研究中心, 甘肃 兰州 730030; 2.西北民族大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730100)

摘要: 为建立一种快速、高效检测猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)的实时荧光定量 PCR 方法, 本研究根据 GenBank 公布的中国流行 PRRSV 病毒株基因序列, 制备包含 PRRSV *ORF7* 基因的重组质粒标准品, 同时, 针对 PRRSV 保守区域 *ORF7* 基因序列设计特异性引物和探针, 并优化引物和探针终浓度, 建立 PRRSV *TaqMan* 实时荧光定量 PCR 检测方法。以质粒标准品为模板构建检测方法线性模型, 评估灵敏度、重复性和特异性, 并在疑似临床样品中初步应用。本研究建立的 PRRSV *TaqMan* 荧光定量 PCR 检测方法线性关系良好, 线性决定系数为 0.997 5; 病毒载量检测限为 1 μ L 3.32×10^1 拷贝; 变异系数在组内和组间重复中均小于 1.500%; 仅与 PRRSV 发生特异性反应, 未与其他病毒发生交叉反应。临床样品 qPCR 检测阳性率为 36.92%, 高于 PCR 检测阳性率 (26.15%), 阳性符合率为 100%。基于 PRRSV *ORF7* 基因构建的 *TaqMan* 荧光定量 PCR 检测方法线性关系良好, 灵敏度高、重复性好、特异性强, 可快速、高效检测临床样品 PRRSV, 为 PRRSV 早期诊断、及时防控和流行病学调查提供了科学的技术支撑。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征; *ORF7* 基因; *TaqMan* 实时荧光定量 PCR; 早期诊断

中图分类号: S855.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)09-1681-08

Establishment of real-time fluorescence quantitative PCR method for detection of *ORF7* gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus

AN Lele^{1,2}, LUO Xun², YANG Xuanye^{1,2}, HU Xinyan^{1,2}, ZHAO Yongqing^{1,2}

(1. Biomedical Research Center, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China; 2. College of Life Science and Engineering, Northwest Minzu University, Lanzhou 730100, China)

Abstract: To establish a rapid and efficient qPCR method for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), standard recombinant plasmid samples containing the *ORF7* gene of PRRSV were prepared, according to the gene sequences of popular PRRSV strains in China announced by GenBank. Meanwhile, specific primers and probes were designed according to the *ORF7* gene sequence of the conserved region of PRRSV, and the final concentrations of primers and probes were optimized to construct a real-time fluorescence quantitative PCR detection method for PRRSV *TaqMan*. The linear model of the assay was constructed by using the plasmid standard sample as the template to evaluate the sensitivity, repeatability and specificity, and the

preliminary application was made in suspected clinical samples. The linear determination coefficient of the established *TaqMan* qPCR detection method for PRRSV was 0.997 5 and the linear relationship was good. The minimum detection limit of viral load was 3.32×10^1 copies/ μ L. The coefficient of variation was less than 1.500% in both intra-group and inter-group replicates. It only reacted specifically with PRRSV, and did not cross-react with other viruses. The positive detection rate of qPCR in clini-

收稿日期: 2024-02-29

基金项目: 甘肃省自然科学基金项目(21JR1RA221); 兰州市科技计划项目(2023-1-31); 中央高校基本科研项目(31920220050)

作者简介: 安乐乐(1997-), 男, 河南周口人, 硕士研究生, 主要从事病毒基因工程研究。(Tel) 17836954272; (E-mail) 1803180130@qq.com

通讯作者: 赵永清, (E-mail) 450883800@qq.com

cal samples was 36.92%, which was higher than that of PCR (26.15%), and the positive coincidence rate was 100%. The *TaqMan* fluorescence quantitative PCR method based on PRRSV *ORF7* gene had good linear relationship, high sensitivity, good repeatability and strong specificity. It can quickly and efficiently detect PRRSV in clinical samples, which provides scientific technical support for PRRSV early diagnosis, timely prevention and control as well as epidemiological investigation.

Key words: porcine reproductive and respiratory syndrome; *ORF7* gene; *TaqMan* real-time fluorescence quantitative PCR; early diagnosis

猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 感染妊娠母猪会导致妊娠终止、胎儿死亡、木乃伊胎产生、畸形胎产生和弱仔产生等繁殖障碍,各日龄猪群感染后表现出以呼吸困难、咳嗽等呼吸道典型症状为主要特征的猪繁殖与呼吸综合征^[1],其中最易感猪群是 30 日龄以下仔猪和妊娠母猪,且 PRRSV 仅感染猪群,对其他动物不发生感染。因猪繁殖与呼吸综合征病毒病在临床上可使病猪耳朵部位呈现蓝紫色,故又称“猪蓝耳病”。1987 年 PRRSV 在美国北卡罗来纳州、艾奥瓦州等地首次被发现,1988 年在加拿大暴发,1990 年以来在德国、丹麦及欧洲其他国家相继发现该病毒的存在^[2]。1991 年荷兰学者 Wensvoort 等分离出 Lelystad virus (简称 LV 株),1992 年美国学者分离出 ATCC VR-2332 株,依照病毒代表株最初分离地域不同,将分离毒株分别命名为欧洲型株 (I 型猪繁殖与呼吸综合征) 和北美洲型株 (II 型猪繁殖与呼吸综合征)^[3]。PRRSV 基因组为易发生变异的 RNA,该 RNA 单股正链,不分节段,序列长度约 15.4 kb^[4]。PRRSV 是网巢病毒目,归属动脉炎病毒科成员,是病毒科 4 个成员中基因组长度最大的,透射电镜观察病毒颗粒呈现球状,具有表面纤突的囊膜结构,病毒颗粒直径为 45~65 nm,核衣壳直径为 25~35 nm,呈现二十面体对称^[5]。PRRSV 基因组碱基易发生突变和缺失,变异区域主要集中在非结构蛋白 Nsp2 区域^[6],而编码核衣壳 N 蛋白的 *ORF7* 基因高度保守,是 PRRSV 通用性检测引物设计最佳靶基因的区域^[7-8]。

1996 年,在中国大陆首次发现并成功分离出 PRRSV 毒株^[9],毒株血清型与北美洲型接近。迄今,中国国内发现并报道的 PRRSV 毒株,大多数血清型为北美洲型,关于欧洲型毒株的报道较少^[10]。2006 年,在江西省首次发现高热、高致死率的高致病性 PRRSV,对免疫力尚弱的仔猪和健康的育肥猪均能引起感染,此高致病性毒株的流行导致中国生猪养殖面临极大的风险挑战和经济财产损失,并逐步发展成为中国流行毒株^[11]。现如今科技发展迅

速,生猪养殖越来越集中化、立体化、工业化,单位面积内猪数量庞大,猪与猪之间接触紧密,PRRSV 接触传染性较强,易发生大规模快速传播且不可控。因此,建立一种快速高效的特异性检测方法不仅是解决 PRRSV 预防和控制的有效手段,更对中国兽医公共卫生学具有深远的意义。目前,由于存在大量亚临床感染^[12],且不同猪群发病临床症状也存在不同,因此需要更精准的实验室方法进行临床检测,以更好地确定发病原因,从而积极科学有效地针对性治疗和确定快捷处置方案。实验室检测方法多以 PCR 为主,也有血清学检查,包括间接免疫荧光技术、血清中和试验、酶联免疫吸附测定和免疫过氧化物酶单层试验。常规 PCR 存在无法定量分析、敏感性差、易发生中途开盖污染等缺陷;酶联免疫吸附试验、间接免疫荧光试验及其他血清学检测技术存在操作繁琐、时间周期长等缺点;实时荧光定量 PCR (qPCR) 技术具有相对定量和绝对定量、操作简单快捷、重复性好、敏感性高、检测速度快等优点^[13],在实验室临床检测方法中更具优势。

本研究基于 PRRSV 保守基因 *ORF7* 设计多对引物探针,并对比试验数据筛选出最佳荧光定量检测性引物和探针,在荧光定量 PCR (探针法) 方法上构建一种能够快速准确检测 PRRSV 的实验室方法,用标准曲线创建病毒载量拷贝数与循环数 (*Ct*) 之间的定量关系,采用质粒标准样本作模板的试验方案验证检测方法的灵敏度、重复性、特异性,并在临床样品上进行初步应用,为 PRRSV 早期诊断、预防控制和流行病学调查提供科学的技术支撑。

1 材料与方法

1.1 病毒株与临床病料

PRRSV 病料、伪狂犬病病毒 (PRV)、猪瘟病毒 (CSFV)、猪细小病毒 (PPI)、猪圆环病毒 2 型 (PCV2)、猪流感病毒 (SIV) 等经过 56 ℃、30 min 灭活处理的阳性毒株样本均由中国农业科学院畜牧

兽医研究所实验室通过基因扩增测序鉴定和保存。65 份病猪疑似临床组织样本(淋巴结、粪便等)分别从不同地区的养猪场采集,由本实验室于 56 ℃、30 min 灭活处理后,于-80 ℃冷冻保存。

1.2 主要试剂与仪器

微生物培养皿(90 mm),50×TAE 购自北京索莱宝科技有限公司;RNA 反转录试剂[HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)]、荧光定量 PCR 探针法酶试剂(*Taq* Pro U⁺ Multiple Probe qPCR Mix)均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;克隆载体(pUC57, Ampicillin 抗性)购自宝日医生物技术有限公司;BeyoPure™ Ultrapure Water (PCR 级, Sterile)购自碧云天生物技术有限公司;DH5α 大肠杆菌感受态细胞、SanPrep 柱式质粒小提试剂盒、SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;AxyPrep 体液病毒 DNA/RNA 小量试剂盒购自康宁生命科学有限公司。

SH-NanoOne 超微量分光光度计购自杭州申光科技有限公司;GM-O5 PCR 基因扩增仪购自杭州晶格科学仪器有限公司;qPCR 仪购自西安天隆科技有限公司。

1.3 引物探针设计与合成

参考 GenBank 发布的 PRRSV (OR805486) 相对保守区域 *ORF7* 基因,按照 *Taq* Man 复合荧光引物探针设计和常规 PCR 引物设计原则,利用 Oligo7.60 设计 1 对标准品上下游引物 (PRRSV-F1/PRRSV-R1)、1 对荧光定量 PCR 上下游引物 (PRRSV-F2/PRRSV-R2) 及探针 (PRRSV-P),PCR 引物及探针序列见表 1,荧光定量 PCR 引物及探针序列位置信息见图 1,其中探针序列 2 端进行特殊荧光基团修饰(5'端为 FAM,3'端为 BHQ-1)。引物及探针合成由擎科生物科技股份有限公司完成。

表 1 设计的引物、探针序列

Table 1 Sequences designed for primers and probes

名称	引物/探针序列(5'→3')	产物长度 (bp)
PRRSV-F1	ATGCCAMATAACAAMGGCAG	372
PRRSV-R1	TCATGCTGAGGCTGACGCT	
PRRSV-F2	CAGTCAATCAGCTGTGCC	136
PRRSV-R2	ACGTCATCTTCAGTCGCTA	
PRRSV-P	FAM-CCCAACAGAGCCAGTCCAG-BHQ-1	

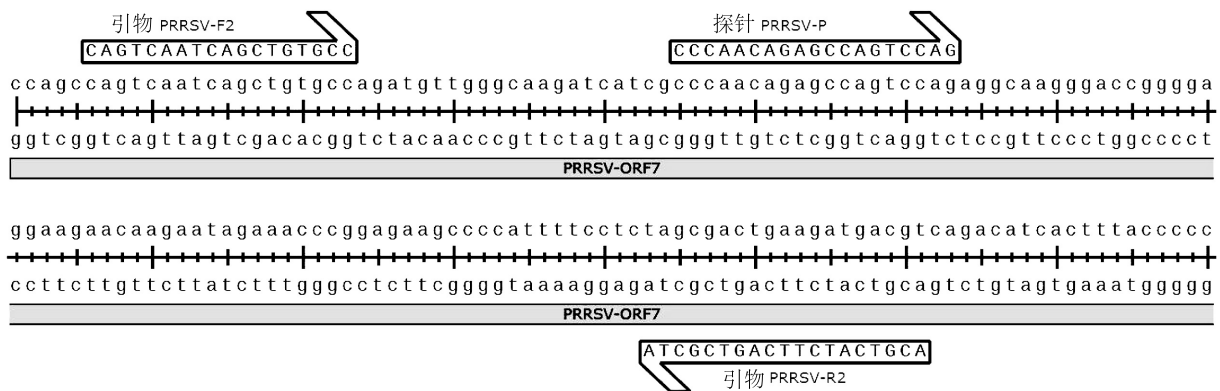


图 1 荧光定量 PCR 引物靶向 *ORF7* 基因位置示意

Fig.1 Schematic diagram of *ORF7* gene location targeted by fluorescence quantitative PCR primers

1.4 重组质粒标准品构建

使用 AxyPrep 体液病毒 DNA/RNA 小量试剂盒提取病料中 PRRSV 基因组并反转录,以 cDNA 为模板,使用常规引物扩增获取 *ORF7* 目的基因,使用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收目的基因并纯化。按照 TaKaRa DNA 连接试剂盒说明书配置目的基因 *ORF7*,然后和 pUC57 克隆载体反应体系进行连接,用连接产物转化 *E.coli* DH5α Competent cells,37 ℃ 培养。挑取

单个菌斑进行抗性培养,阳性菌斑培养液进行菌液基因扩增鉴定和基因测序鉴定[由生工生物工程(上海)股份有限公司完成]。使用 SanPrep 柱式质粒小提试剂盒抽提阳性菌液获取质粒,质粒命名为 pUC57-PRRSV-ORF7。阳性质粒 pUC57-PRRSV-ORF7 作为质粒标准品和后续试验的阳性模板,放置于-20 ℃备用。

1.5 病料核酸提取及反转录

取灭活处理后的 PRV、CSFV、PCV2、PPI、SIV

阳性血清样本和 65 份病猪灭活临床组织样本,利用 AxyPrep 体液病毒 DNA/RNA 小量试剂盒提取基因组 RNA 和 DNA,其中猪瘟病毒和猪流感病毒基因组 RNA 易降解,无法长期稳定保存,故需要用商业化反转录试剂盒反转录处理,获取高稳定性产物 cDNA。所有病毒基因组于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。

1.6 荧光定量 PCR 反应体系优化

以 $1\text{ }\mu\text{L}$ 质粒标准品 pUC57-PRRSV-ORF7 为反应模板,反应总体积为 $20\text{ }\mu\text{L}$,对引物终浓度、探针终浓度进行优化。反应程序:污染消化 ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min),预变性 ($95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s),循环反应 ($95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s , $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s),循环 40 次。引物终浓度和探针终浓度如表 2 所示,以循环数低、荧光强度高和稳定性好来综合考量确定该 qPCR 检测方法引物和探针的最佳终浓度。

表 2 引物和探针的体积和浓度

Table 2 Volume and concentration of primers and probes

组别	引物和探针体积 (μL)			引物终浓度 (nmol/L)	探针终浓度 (nmol/L)
	F	R	P		
1	0.2	0.2	0.1	100	50
2	0.4	0.4	0.2	200	100
3	0.6	0.6	0.3	300	150
4	0.8	0.8	0.4	400	200
5	1.0	1.0	0.5	500	250
6	1.2	1.2	0.6	600	300

F、R 为引物;P 为探针。

1.7 标准曲线的建立

将质粒标准品 pUC57-PRRSV-ORF7 进行 10 倍倍比稀释,以 $1\text{ }\mu\text{L}$ $10^3\sim 10^8$ 拷贝质粒标准品作为反应模板,使用方法 1.6 最优引物探针终浓度进行 qPCR 扩增,每组 3 个重复, C_t 取平均值,由阳性质粒拷贝数和 C_t 平均值绘制该 qPCR 检测方法的标准曲线。

1.8 灵敏性试验

以 $1\text{ }\mu\text{L}$ $10^0\sim 10^8$ 拷贝质粒标准品作为反应模板,以去离子水作为阴性对照,使用最优引物探针终浓度进行 qPCR 扩增。同时以常规 PCR 方法^[14]检测质粒标准品,作为灵敏性试验的对照组,其中选用质粒标准品拷贝数 $1\text{ }\mu\text{L}$ 10^{10} 拷贝作阳性对照。分析荧光定量 PCR 和常规 PCR 检测的最小病毒载量拷贝数,通过数据对比说明该 qPCR 检测方法在灵

敏度上的优势。

1.9 重复性试验

以 $1\text{ }\mu\text{L}$ $10^3\sim 10^7$ 拷贝质粒标准品作为反应模板,以去离子水作为阴性对照,使用上述最优反应条件进行 qPCR 扩增,对建立的检测方法进行重复性验证,每个质粒拷贝设组内重复试验和组间重复试验各 3 次。以组内和组间重复试验算术平均值和标准差来计算变异系数 (CV),评价该 qPCR 检测方法的重复性及稳定性。

1.10 特异性试验

以猪繁殖与呼吸综合征病毒病料基因组和方法 1.5 提取的 PRV、CSFV、PPI、PCV2 及 SIV 基因组作为反应模板,同时以去离子水作为阴性对照,使用上述最优反应条件进行特异性试验,通过观察是否出现“S”形扩增曲线来检验该 qPCR 检测方法的特异性。

1.11 临床样本的检测

以方法 1.5 提取的 65 份病猪临床组织样本基因组及反转录的 cDNA 作为反应模板,同时以去离子水作为阴性对照,使用上述建立的 qPCR 检测方法进行扩增。同时用方法 1.8 中常规 PCR 方法对 65 份基因组 cDNA 进行检测。

2 结果与分析

2.1 重组质粒标准品制备

以反转录产物 cDNA 为模板,使用扩增 ORF7 基因的上下游引物 PRRSV-F1/PRRSV-R1 进行常规 PCR 扩增,获得 ORF7 基因,基因大小为 372 bp (图 2)。将 PCR 扩增产物切胶回收并纯化,连接转化至 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞,经氨苄青霉素筛选后挑取单克隆菌斑进行 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜扩大培养。使用菌液进行 PCR 鉴定,目的基因条带大小为 372 bp (图 3),将阳性菌液送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序鉴定,对比测序序列与目的基因 ORF7 序列,结果一致,证明重组质粒 pUC57-PRRSV-ORF7 构建成功。抽提阳性质粒并用 SH-NanoOne 仪器进行浓度检测,重组质粒质量浓度为 $112.316\text{ ng}/\mu\text{L}$,理论拷贝数为 $1\text{ }\mu\text{L}$ 3.32×10^{10} 拷贝。

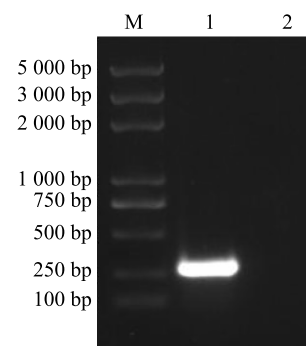
2.2 TaqMan 荧光定量 PCR 反应体系优化

在退火温度 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应条件下,在合理的引物探针浓度范围 ($100\sim 600\text{ nmol/L}$) 内,设置 6 个不同浓度的处理,每个处理 3 个重复,对 TaqMan 荧光定量

方法进行终浓度优化。引物终浓度在 100 nmol/L、200 nmol/L、300 nmol/L、400 nmol/L、500 nmol/L、600 nmol/L 的条件下,循环数分别为 17.736 ± 0.356 、 17.561 ± 0.383 、 17.247 ± 0.149 、 17.492 ± 0.475 、 17.366 ± 0.594 、 17.474 ± 0.403 ,每个浓度的扩增曲线的重复性、稳定性均较佳且无非特异性扩增(图 4),在引物终浓度为 300 nmol/L 时,循环数(17.247 ± 0.149)最低,稳定性最好,故优化得到最佳引物终浓度为 300 nmol/L,最佳探针终浓度为 150 nmol/L。

2.3 标准曲线的建立

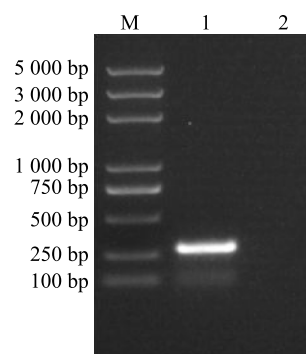
以 $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^2$ 拷贝、 $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^3$ 拷贝、 $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^4$ 拷贝、 $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^5$ 拷贝、 $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^6$ 拷贝、 $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^7$ 拷贝、 $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^8$ 拷贝的质粒为模板,每组 3 个重复,用最佳引物探针终浓度进行 qPCR 扩增反应,采用循环数平均值建立标准曲线模型。如图 5 所示,标准曲线的回归方程为 $Y = -3.398 9x + 38.114 0$,使用 GraphPad Prism8.0.1 软件进行数据分析,在线性回归模型拟合度中的决定系数(R^2)为 0.997 5,用公式 $[\text{扩增效率}(E) = 10^{(-1/\text{斜率})-1}]$ 计算扩增效率,为 96.89%。结果表明标准曲线具有良好的拟合性,线性关系良好。



M: Marker; 1: ORF7 基因; 2: 阴性对照。

图 2 ORF7 基因 PCR 扩增

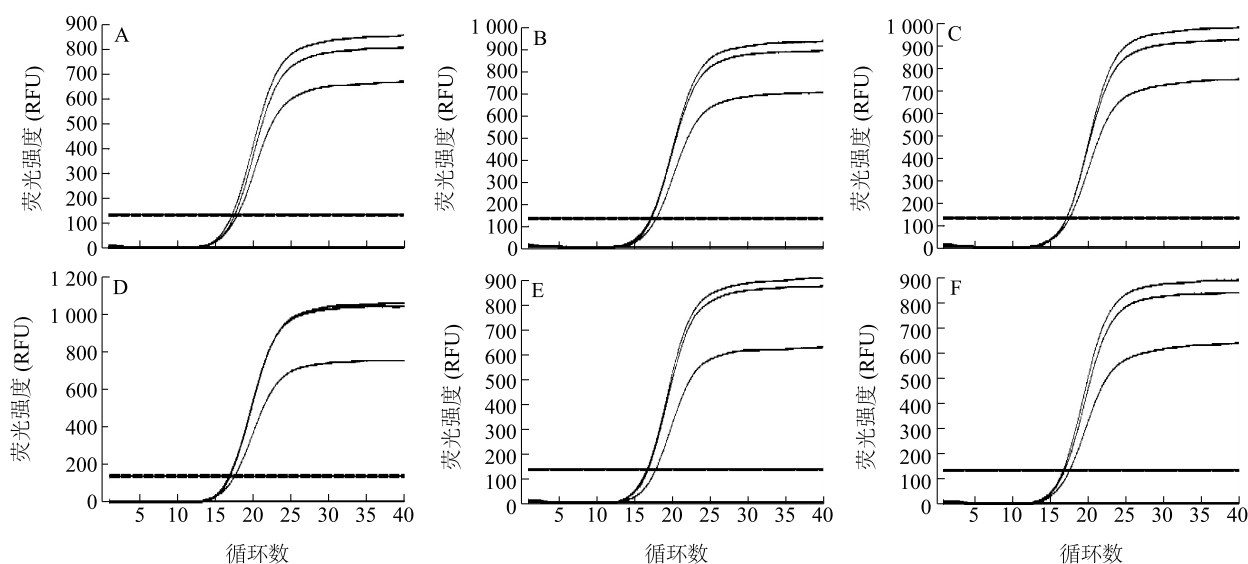
Fig.2 PCR amplification of the ORF7 gene



M: Marker; 1: ORF7 基因; 2: 阴性对照。

图 3 菌液 PCR 鉴定结果

Fig.3 PCR identification result of bacterial solution



A: 引物终浓度 100 nmol/L; B: 引物终浓度 200 nmol/L; C: 引物终浓度 300 nmol/L; D: 引物终浓度 400 nmol/L; E: 引物终浓度 500 nmol/L; F: 引物终浓度 600 nmol/L。

图 4 qPCR 检测方法优化结果

Fig.4 Optimization results of qPCR detection method

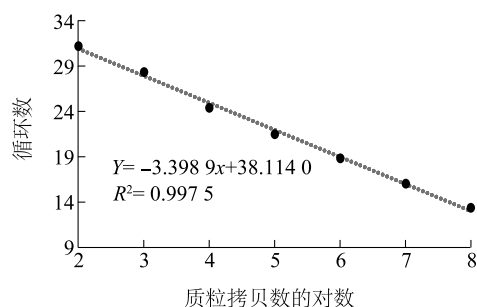
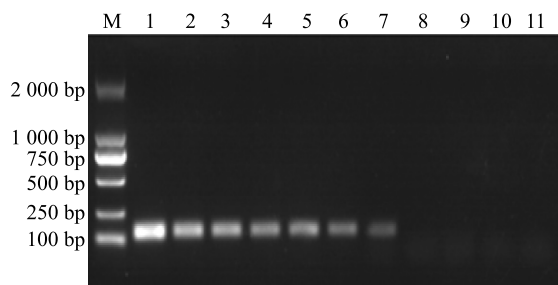


图5 qPCR 检测方法标准曲线

Fig.5 Standard curve of qPCR detection method

2.4 灵敏性试验

以 $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^0$ 拷贝、 $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^1$ 拷贝、 $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^2$ 拷贝、 $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^3$ 拷贝、 $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^4$ 拷贝、 $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^5$ 拷贝、 $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^6$ 拷贝、 $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^7$ 拷贝、 $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^8$ 拷贝的质粒作为反应模板,同时设置阴性对照(ddH₂O),在优化的最佳引物探针终浓度条件下进行 qPCR 扩增反应,通过比较 TaqMan qPCR 方法和常规 PCR 方法的质粒拷贝数最小值来验证方法的灵敏度。结果(图 6)显示,常规 PCR 方法可以检测最小病毒载量拷贝数为 $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^3$ 拷贝;图 7 显示, TaqMan qPCR 方法可以检测最小病毒载量拷贝数为 $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^1$ 拷贝。二者对比, TaqMan qPCR 方法灵敏度更高,是常规 PCR 方法的 100 倍,具备更好的实验室检测优势。



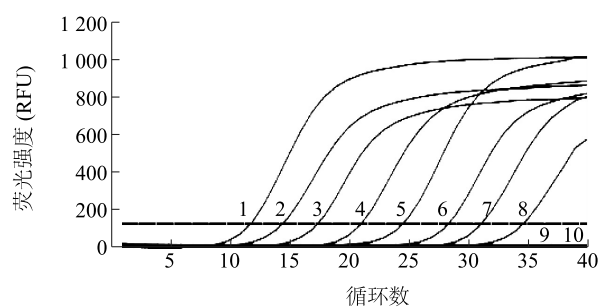
M: marker; 1: 阳性对照; 2: 质粒拷贝数为 $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^8$ 拷贝; 3: 质粒拷贝数为 $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^7$ 拷贝; 4: 质粒拷贝数为 $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^6$ 拷贝; 5: 质粒拷贝数为 $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^5$ 拷贝; 6: 质粒拷贝数为 $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^4$ 拷贝; 7: 质粒拷贝数为 $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^3$ 拷贝; 8: 质粒拷贝数为 $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^2$ 拷贝; 9: 质粒拷贝数为 $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^1$ 拷贝; 10: 质粒拷贝数为 $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^0$ 拷贝; 11: 阴性对照。

图6 常规 PCR 灵敏性试验

Fig.6 Sensitivity test of conventional PCR

2.5 重复性试验

以 $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^3$ 拷贝、 $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^4$ 拷贝、 $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^5$ 拷贝、 $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^6$ 拷贝、 $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^7$ 拷贝、 $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^8$ 拷贝的质粒作为反应模板,每组 3 个重复作为组内重复试验,在不同时间段进行 3 次试验作为组间重复试验,在优化的最佳引物探针终浓度条件下进行 TaqMan qPCR 扩增,对组内和组间重复试验数据进行分析来评估 TaqMan qPCR 方法的重复性。由表 3 可知,该方法组内变异系数为 0.460%~1.124%,组间变异系数为 0.607%~1.366%,组内、组间变异系数均小于 1.500%,因此该 TaqMan qPCR 方法具有良好的重复性和稳定性,表明该检测方法具备合理性和可重复性。



1: $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^8$ 拷贝的标准质粒; 2: $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^7$ 拷贝的标准质粒; 3: $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^6$ 拷贝的标准质粒; 4: $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^5$ 拷贝的标准质粒; 5: $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^4$ 拷贝的标准质粒; 6: $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^3$ 拷贝的标准质粒; 7: $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^2$ 拷贝的标准质粒; 8: $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^1$ 拷贝的标准质粒; 9: $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^0$ 拷贝的标准质粒; 10: 阴性对照。

图7 qPCR 灵敏性试验

Fig.7 Sensitivity test of qPCR

3.32×10^5 拷贝、 $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^6$ 拷贝、 $1 \mu\text{L } 3.32 \times 10^7$ 拷贝的质粒作为反应模板,每组 3 个重复作为组内重复试验,在不同时间段进行 3 次试验作为组间重复试验,在优化的最佳引物探针终浓度条件下进行 TaqMan qPCR 扩增,对组内和组间重复试验数据进行分析来评估 TaqMan qPCR 方法的重复性。由表 3 可知,该方法组内变异系数为 0.460%~1.124%,组间变异系数为 0.607%~1.366%,组内、组间变异系数均小于 1.500%,因此该 TaqMan qPCR 方法具有良好的重复性和稳定性,表明该检测方法具备合理性和可重复性。

2.6 特异性试验

使用优化反应条件检测 PRV、CSFV、PPI、PCV2、SIV 基因组和 PRRSV 病料基因组,以去离子水作为阴性对照,观察分析扩增曲线来验证 TaqMan 荧光定量 PCR 方法的特异性。由图 8 可知,仅有 PRRSV 出现扩增曲线,说明本检测方法与猪身上常见的病毒核酸未发生交叉反应,特异性较强。

2.7 临床样本的检测

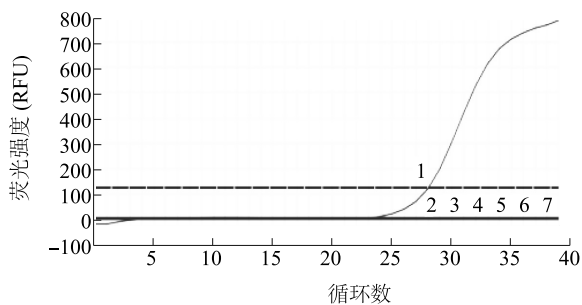
为了验证所建 qPCR 方法临床应用的可行性,以 65 份病猪临床组织样本的核酸作为反应模板,用建立的 qPCR 方法在临床样本中进行初步检验。结果显示: TaqMan 荧光定量 PCR 方法阳性检出率为 36.92% (24/65),高于常规 PCR 方法阳性检出率 (26.15% = 17/65),qPCR 阳性样品经测序鉴定,符合率为 100%,并且 PCR 方法检出的 17 份阳性样品均包含在 qPCR 方法检出的 24 份阳性样品中,论证了 2.4 节 qPCR 方法的高灵敏性,表明建立的 qPCR 检测方法具有更好的临床适用性。

和更好的实验室检测优势,可以对大批量临床样本和低病毒载量的样本进行有效检测。

表 3 qPCR 检测方法的组内和组间重复性试验

Table 3 Intra-group and inter-group repetitive tests of qPCR detection methods

质粒浓度 (1 μ L)	组内重复试验			组间重复试验		
	平均值	标准差	变异系数(%)	平均值	标准差	变异系数(%)
3.32×10^3	28.257	0.216	0.763	28.331	0.172	0.607
3.32×10^4	24.274	0.112	0.460	24.345	0.171	0.701
3.32×10^5	20.948	0.236	1.124	20.612	0.239	1.161
3.32×10^6	17.307	0.161	0.930	17.243	0.126	0.729
3.32×10^7	14.385	0.151	1.053	14.300	0.195	1.366



1:猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV);2:猪瘟病毒(CSFV);3:猪圆环病毒2型(PCV2);4:伪狂犬病病毒(PRV);5:猪细小病毒(PPI);6:猪流感病毒(SIV);7:阴性对照。

图 8 qPCR 特异性试验

Fig.8 Specificity test of qPCR

3 讨论与结论

PRRSV 唯一的易感动物是猪,该病毒传播途径广泛,可以通过动物直接接触方式或排泄物、组织器官等接触方式进行传播;还可以空气作为媒介以气溶胶的形式传播;也能由精液携带方式进行传播。某些鸟类、蚊子也可以携带病原进行传播^[15-16]。患病猪可以通过粪便、尿液、精液、唾液和乳腺分泌物等载体向环境排出猪繁殖与呼吸综合征病毒。1993 年,在中国台湾分离出猪繁殖与呼吸综合征病毒;1995 年底,在中国大陆发现猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性猪场,由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所郭宝清等率先在北京地区分离出 4 株猪繁殖与呼吸综合征病毒(CH-1a、CH-1b、CH-1c 和 CH-1d)^[17-18],均属于北美洲型毒株^[19],从而证实在中国大陆存在猪繁殖与呼吸综合征病毒。2006 年 4 月,高致病性 PRRSV 毒株首次在江西省被发现和报道,感染猪的主要特征是体温高、发病率高及死亡率高,且各品种、各种年龄阶段的猪群均能感染发病^[20]。根据现有的调查数据^[21]初步统计,PRRSV 发病率在

50%以上,死亡率在20%~100%,给中国养猪业造成了巨大的经济损失。随着 PRRSV 疫苗的大规模普及应用,该病毒感染在国内得到显著控制,但亚临床感染逐渐增加,仅依据临床症状很难准确确定疾病类型,无法对早期感染猪进行有效隔离和针对性治疗。因此,找到更方便、灵敏、安全、准确、特异的 PCR 检测方法成为必需。张宇鑫等^[22]利用四重 PCR 方法检测 PRRSV,该方法检测下限为 1 μ L 6.5×10^4 拷贝;王方洲等^[23]建立 RT-PCR 方法检测 PRRSV;王新港等^[24]建立双重 PCR 方法检测 PRRSV,该方法检测下限为 2.48×10^4 ng。与常规 PCR 方法检出率低、无法定量病毒载量、操作时间长、中间操作环节易污染的缺陷相比较,荧光定量 PCR 优势较明显,具备灵敏度高、准确性好、中间操作污染环节减少、绝对或相对定量及实时监测优势,目前被广泛应用于各种疾病的快速诊断和流行病学调查^[25]中。张杰等^[26]利用染料法建立荧光定量 PCR 方法检测 PRRSV,该方法检测下限为 $1 \times 10^{0.5}$ TCID₅₀ (半数组织培养感染剂量)病毒。使用 TaqMan 探针法建立的针对 PRRSV 感染的检测方法,与染料法 SYBR Green I 荧光定量 PCR 相比,探针法的特异性更强,准确性和灵敏性更高,检测结果更具有说服力。

本研究基于 ORF7 基因高保守性,以 ORF7 为靶基因完成特异性引物和探针设计,改善引物和探针终浓度以达到最佳反应条件,建立适用于 PRRSV 早期感染诊断的 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法,该检测方法标准曲线 $Y = -3.398 9x + 38.114 0$,线性决定系数 (R^2) 为 0.997 5,扩增效率为 96.89%,可以稳定检出的最小病毒载量值为 1 μ L 3.32×10^1 拷贝,灵敏度是常规 PCR 方法的 100 倍,组内和组间变异系数均小于 1.500%,重复性和稳定性良好,同时对 PRRSV、PRV、CSFV、PPI、PCV2 和 SIV 进行检测,仅有 PRRSV 出现扩增曲线,常见的感染猪的其余病毒

核酸检测结果均呈现阴性,可见此检测方法与猪身上其他常见病原核酸不存在交叉反应,特异性较强。使用该 qPCR 检测方法对采集的 65 份病猪临床样本核酸进行检测,阳性率为 36.92%,符合率为 100%,具有良好的临床适用性。

综上所述,本研究基于 PRRSV *ORF7* 基因构建的 *TaqMan* 荧光定量 PCR 检测方法,灵敏性高、重复性好、稳定性高、特异性强,且适用于大批量临床样本检测,为猪群 PRRSV 早期快速诊断、及时防控、流行病学调查提供了科学的技术支撑。

参考文献:

- [1] ZHOU L, KANG R M, ZHANG Y, et al. Emergence of two novel recombinant porcine reproductive and respiratory syndrome viruses 2 (lineage 3) in Southwestern China[J]. *Veterinary Microbiology*, 2019, 232:30-41.
- [2] PEI Y L, LIN C H, LI H, et al. Genetic background influences pig responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2023, 10:1289570.
- [3] FANG K, LIU S D, LI X M, et al. Epidemiological and genetic characteristics of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in South China between 2017 and 2021[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022, 9:853044.
- [4] GUO Z H, CHEN X X, LI R, et al. The prevalent status and genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China: a molecular epidemiological perspective[J]. *Virology Journal*, 2018, 15:2.
- [5] DOKLAND T. The structural biology of PRRSV[J]. *Virus Research*, 2010, 154(1):86-97.
- [6] 张喜懿,温贵兰,管国丹,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒贵州株 *GZ-RNSP2* 基因的克隆与遗传变异分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2020, 47(11):3659-3666.
- [7] ZHENG Y J, LI G, LUO Q, et al. Research progress on the N protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2024, 15:1391697.
- [8] 杨峰,周宏超,许信刚,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. *动物医学进展*, 2018, 39(9):25-29.
- [9] GAO J C, XIONG J Y, YE C, et al. Genotypic and geographical distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in mainland China in 1996-2016[J]. *Veterinary Microbiology*, Elsevier, 2017, 208:164-172.
- [10] XU H, LI C, GONG B J, et al. Protective efficacy of a candidate live-attenuated vaccine derived from the SD-R strain against NADC34-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Vaccines*, 2023, 11(8):1349.
- [11] TIAN K G, YU X L, ZHAO T Z, et al. Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark[J]. *PLoS One*, 2007, 2(6):e526.
- [12] 贺亮,贺峻琳,徐玉,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒研究进展[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2017(17):104-107.
- [13] 杨晓宇,陈世界,林华,等.多重 *TaqMan* 荧光定量 PCR 检测仔猪先天性震颤相关病毒方法的建立与应用[J]. *江苏农业学报*, 2020, 36(4):971-977.
- [14] 门旭坤,孙婷婷,罗画叶,等. CSFV-ASFV-PRRSV 多重 PCR 检测方法的建立[J]. *中国动物传染病学报*, 2023:1-8. DOI: 10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20230606.002.
- [15] 张磊,华利忠,郝飞,等.后非瘟时代猪场 PRRSV 类 NADC30 感染防控案例分析[J]. *江苏农业科学*, 2023, 51(21):182-187.
- [16] 周宇骏,龙明英,孟芳,等.2021-2022 年湖南省 PRRSV 流行病学调查及基因组特征分析[J]. *南方农业学报*, 2023, 54(12):3748-3756.
- [17] 陈玉红,徐琦,刘玉良,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒通用微芯片荧光定量 RT-PCR 方法的建立和初步应用[J]. *中国兽医科学*, 2021, 51(11):1361-1368.
- [18] 郭振华,陈鑫鑫,李睿,等.中国猪繁殖与呼吸综合征病毒流行历史及现状[J]. *畜牧兽医学报*, 2018, 49(1):1-9.
- [19] HAN J, ZHOU L, GE X N, et al. Pathogenesis and control of the Chinese highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Veterinary Microbiology*, Elsevier, 2017, 209:30-47.
- [20] LI Y F, WANG X L, BO K T, et al. Emergence of a highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the Mid-Eastern region of China[J]. *Veterinary Journal*, 2007, 174(3):577-584.
- [21] GAUGER P C, FAABERG K S, GUO B Q, et al. Genetic and phenotypic characterization of a 2006 United States porcine reproductive and respiratory virus isolate associated with high morbidity and mortality in the field[J]. *Virus Research*, 2012, 163(1):98-107.
- [22] 张宇鑫,吴艳,张伟,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒、伪狂犬病病毒、猪圆环病毒 2 型和猪流感病毒四重 PCR 检测方法的建立[J]. *动物医学进展*, 2023, 44(8):22-27.
- [23] 王方洲,张婧,马雪青,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒一步法多重 RT-PCR 检测方法的建立和应用[J]. *中国兽医科学*, 2022, 52(7):805-814.
- [24] 王新港,周峰,王傲杰,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒和盖他病毒双重 RT-PCR 检测方法的建立与应用[J]. *病毒学报*, 2018, 34(2):232-238.
- [25] 吴双,张聪,袁慧莎,等.血清 4 型禽腺病毒 *TaqMan* 探针实时荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用[J]. *江苏农业学报*, 2023, 39(1):134-141.
- [26] 张杰,刘雪威,白娟,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒 SYBR Green I 荧光定量 PCR 方法的建立与应用[J]. *中国兽医科学*, 2019, 49(12):1505-1513.

(责任编辑:陈海霞)