

# 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒的 RT-PCR 鉴别诊断方法

赵志权, 王福广, 郝环颖, 张思远, 贺东生

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

**摘要:**为了快速鉴别诊断高致病性猪繁殖与呼吸综合征,参照 GeneBank 已发表的猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 的 *Nsp2* 基因,设计了 1 对引物,建立了一种 RT-PCR 检测方法. 该方法可以区分高致病性 PRRSV 毒株与经典 PRRSV 弱毒疫苗株,扩增 PCV2、PRV、PPV 和 CSFV 等均为阴性. 该方法敏感性较高,可以检测到 0.2 ng 的病毒核酸.

**关键词:**猪繁殖与呼吸综合征; RT-PCR; *Nsp2*

中图分类号: S858.28

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2008)03-0085-03

## Diagnosis and Identification of the Highly Virulent Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus by RT-PCR

ZHAO Zhi-quan, WANG Fu-guang, HAO Huan-ying, ZHANG Si-yuan, HE Dong-sheng

(College of Veterinary and Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** A pair of primers based on *Nsp2* gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) was designed and a method of RT-PCR was developed to distinguish the highly pathogenic PRRSV from the classic attenuated vaccine strain. The method was sensitive to detect as low as 0.2 ng viral genome. PCV2, PRV, PPV and CSFV were negative in their reactions.

**Key words:** porcine reproductive and respiratory syndrome; RT-PCR; *Nsp2*

由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 所致的猪繁殖与呼吸综合征 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS), 是一种以妊娠母猪的繁殖障碍和仔猪的呼吸道疾病为特征的病毒性传染病, 该病已成为危害全球养猪业的主要疫病之一. 我国自 1995 年底爆发本病以来, 已成为困扰养猪生产的一大问题, 2006 年在我国南方暴发的以“高热和高死亡率”为特征的“猪无名高热”更是给我国养猪业造成了严重的经济损失. PRRSV 属套式病毒目动脉炎病毒科成员, 基因组全长约 15 kb, 为单股正链、不分节段的 RNA 病毒, 含 8 个开放阅读框 (ORF)<sup>[1]</sup>. 不同地域的分离毒株的序列分析表明, PRRSV 有 2 种基

因型, 即以 VR2332 毒株为代表的美洲型和以 Lelystad virus (LV) 为代表的欧洲型. 近年来, PRRSV 的变异现象引起了人们的关注, 国外的研究表明, 同一基因型的分离毒株之间存在明显的序列差异, 特别是在基因组 ORF1a 的 *Nsp1β* 和 *Nsp2*、ORF3 和 ORF5 的变异性很大<sup>[2]</sup>. 高志强等<sup>[3]</sup>发现分离的 PRRSV HB22 (sh) / 2002 *Nsp2* 存在编码 12 个氨基酸的连续 36 个核苷酸的缺失. 童光志等<sup>[4]</sup>报道来自 12 省市不同猪场的 PRRSV 的 *Nsp2* 基因高度同源, 都有 2 个相同位点的缺失, 并且通过动物试验, 人工发病动物与发病猪场病猪的症状一致. 据此推测 PRRSV 可能是引起高热病大流行的主要原因. 笔者参照 GeneBank 上 2000 年以来发表的序列, 设计了 1 对引

收稿日期: 2007-12-04

作者简介: 赵志权 (1981—), 男, 硕士研究生; 通讯作者: 贺东生 (1968—), 男, 副教授, 博士; Email: dhe@scau.edu.cn

基金项目: 广东省科技计划项目 (2007A020300006-4); 教育部创新团队项目 (IRT0723); 广东省动物防疫检疫专项经费 (粤财农 2007-479)

物,建立了一种 RT-PCR 方法,该方法可以区别鉴定 PRRSV 基因缺失株与经典弱毒疫苗株. 为临床诊断和防治 PRRS 提供参考依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒和细胞

PRRSV 粤 A 株 (PRRSV YA strain) 由华南农业大学兽医学院传染病实验室分离并保存于  $-80^{\circ}\text{C}$ , 经测序鉴定为 *Nsp2* 基因缺失株, 再经猪体攻毒试验证明为高致病性毒株; PRRSV 经典弱毒疫苗株为某生物制品厂的产品; PRRSV 阴、阳性血清、PCV2、PPV、PRV、CSFV 和 Marc-145 细胞由华南农业大学兽医学院传染病实验室保存.

### 1.2 病料

广东 3 个发病猪场疑为高致病性 PRRS 的送检病料.

### 1.3 主要试剂

RNAiso plus、Ex Taq DNA 聚合酶、2.5 mmol/L dNTP、AMV 反转录酶、RNA 酶抑制剂 (Ribonuclease Inhibitor)、10.0 mmol/L dNTP、DNA marker DL 2000 均为 TaKaRa 公司产品, DNA 提取试剂盒为深圳尚能生物科技有限公司的产品 (生产厂家: UPENERGY 产品编号: NP1041-50), 其余试剂为国产分析纯.

### 1.4 引物

参照 GenBank 中发表的 PRRSV 基因序列, 应用生物学软件 Primer5.0 设计扩增 PRRSV *Nsp2* 部分序列的特异性引物, 引物序列为:  $P_1$ : 5' - GCGACAAT-GTCCCTAACG - 3';  $P_2$ : 5' - CTGCTA (G) CGT-CAGCGTTGTT - 3', 由 TaKaRa 公司合成. 扩增区间为 2 751 bp ~ 3 040 bp, 该引物可扩增缺失株与经典弱毒疫苗株, 缺失株目的片段为 200 bp, 经典弱毒疫苗株目的片段为 290 bp.

### 1.5 总 RNA 的提取

当大部分接种 PRRSV 粤 A 株的 Marc-145 细胞发生病变时收集病毒, 反复冻融 3 次后按照 RNAiso plus 说明书提取总 RNA, 同时提取经典弱毒疫苗株、PRRSV 阳性血清和 PRRSV 阴性血清的总 RNA.

### 1.6 RT-PCR

取抽提的总 RNA 样品进行反转录. 按 20  $\mu\text{L}$  反转录体系, 其中含 2  $\mu\text{L}$  (25 nmol/L) Oligo (dT)、6  $\mu\text{L}$  10.0 mmol/L dNTP、4  $\mu\text{L}$  5  $\times$  RT-PCR Buffer、1  $\mu\text{L}$  (50 U/L) AMV 酶、6  $\mu\text{L}$  RNA 模板、1  $\mu\text{L}$  RNA 酶抑制剂.  $42^{\circ}\text{C}$  水浴 1 h, 合成 cDNA, 置  $-20^{\circ}\text{C}$  备用.

PCR 反应体系为 50  $\mu\text{L}$ , 其中含灭菌双蒸水 32.5  $\mu\text{L}$ 、10  $\times$  PCR Buffer 5  $\mu\text{L}$ 、dNTP 4  $\mu\text{L}$ 、上下游引

物各 2  $\mu\text{L}$ 、EX Taq DNA 聚合酶 0.5  $\mu\text{L}$ 、cDNA 模板 4  $\mu\text{L}$ ; 扩增程序为:  $94^{\circ}\text{C}$  4 min, 1 个循环;  $94^{\circ}\text{C}$  30 s,  $53.8^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  30 s, 30 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min, 产物通过电泳进行检测.

### 1.7 特异性试验

取 CSFV 按照 RNAiso plus 说明书提取总 RNA, 按照 1.6 进行 RT-PCR.

按照深圳尚能生物科技有限公司的组织/细胞基因组 DNA 提取试剂盒 (含蛋白酶 K) 的说明书提取 PCV2、PPV、PRV 的 DNA, 然后按照 1.6 的相关要求进行 PCR.

### 1.8 敏感性试验

将抽提的粤 A 株的 cDNA 用紫外分光光度计测其质量浓度为 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 然后进行 10 倍系列稀释, 依次稀释到 0.05  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  再进行 RT-PCR 扩增, 以检测其敏感性.

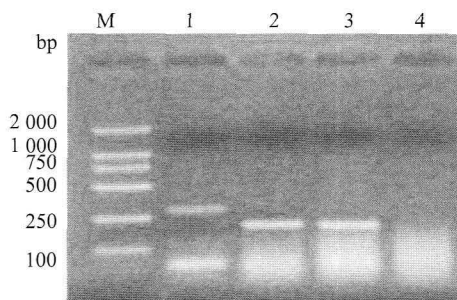
### 1.9 临床样品的检测

取病料 2.0 g 于研钵中, 研磨并用 PBS 缓冲液稀释成 1:4 的乳剂, 置于灭菌的 EP 管中,  $-20^{\circ}\text{C}$  室温反复冻融 3 次. 融化后的溶液以 5 000 r/min 离心 5 min, 取上清液按照上述方法提取总 RNA 进行 RT-PCR 检测.

## 2 结果与分析

### 2.1 高致病性 PRRSV 粤 A 株和经典弱毒疫苗株的扩增结果

经典弱毒疫苗株在大约 290 bp 处出现了 1 条带, 粤 A 株则在 200 bp 处出现了 1 条带. 最前面小于 100 bp 的为引物条带 (云雾状, 下同), 见图 1.



M: DNA marker DL 2000; 1: PRRSV 经典弱毒疫苗株; 2: PRRSV 粤 A 株; 3: PRRSV 阳性血清; 4: PRRSV 阴性血清

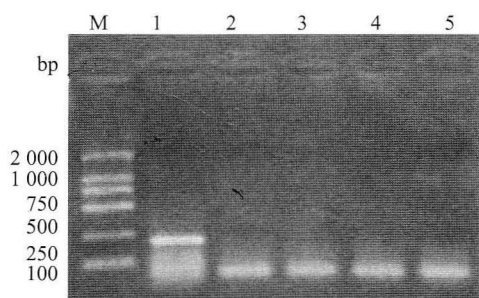
M: DNA marker DL2000; 1: PRRSV classic attenuated vaccine strain; 2: PRRSV YA strain; 3: PRRSV positive serum; 4: PRRSV negative serum

图1 粤 A 株和疫苗株的扩增结果

Fig. 1 RT-PCR amplification of PRRSV YA strain and vaccine strain

### 2.2 特异性试验结果

只有粤 A 株在 200 bp 处出现了 1 条带, CSFV、PCV2、PRV、PPV 均为阴性, 见图 2.



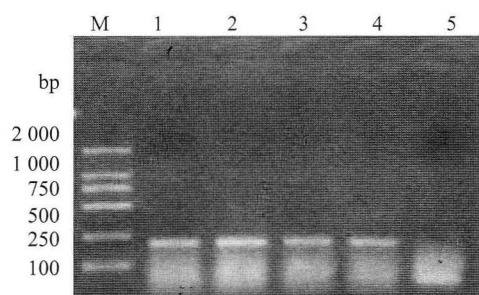
M: DNA marker DL2000; 1: 粤 A 株; 2: CSFV; 3: PCV2; 4: PRV; 5: PPV  
M: DNA marker DL2000; 1: YA strain; 2: CSFV; 3: PCV2; 4: PRV; 5: PPV

图2 特异性试验结果

Fig. 2 Specificity of RT-PCR amplification

### 2.3 敏感性扩增结果

粤 A 株的模板质量浓度从  $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  直到稀释度为  $0.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$  都可以扩增出目的条带, 每个反应体系加入  $4 \mu\text{L}$  模板, 即最低可检测到  $0.2 \text{ ng}$  的病毒核酸, 见图 3。



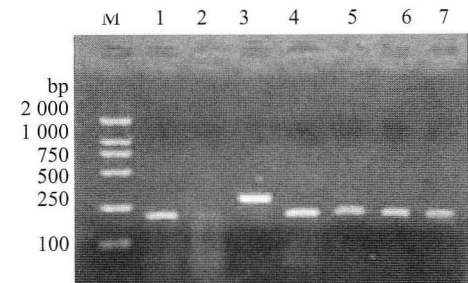
M: DNA marker DL2000; 1:  $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; 2:  $0.05 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; 3:  $5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ; 4:  $0.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ; 5:  $0.05 \text{ ng}/\mu\text{L}$

图3 敏感性试验结果

Fig. 3 Sensitivity of RT-PCR amplification

### 2.4 临床病料检测结果

如图 4 所示, 送检病料均在约  $200 \text{ bp}$  处出现了目的条带, 为 *Nsp2* 基因缺失片段 (4~7 的 RT-PCR 产物经测序证明为 *Nsp2* 基因缺失, 另文报道)。



M: DNA marker DL2000; 1: 粤 A 株; 2: PRRSV 阴性血清; 3: PRRSV 经典弱毒疫苗株; 4~7: 临床送检病料

M: DNA marker DL2000; 1: YA strain; 2: PRRSV negative serum; 3: PRRSV vaccine strain; 4~7: field samples

图4 临床病料检测结果

Fig. 4 RT-PCR amplification of field samples

## 3 讨论

2006 年在我国南方一些猪场暴发了一种以高热、高发病率和高死亡率为特征的传染病, 并很快波及到北方, 给我国的养猪业造成了严重损失。童光志等<sup>[4]</sup>、Tian 等<sup>[5]</sup> 率先分离到病毒, 并通过完整的 ORF5 和部分 *Nsp2* 基因序列比较发现来自 12 个省市不同猪场的 PRRSV 高度同源, 而且在 *Nsp2* 基因上都有 2 个相同位点的缺失: 在 2 933~3 019 位存在连续 87 个碱基的缺失, 在 2 779、2 780、2 781 位存在连续 3 个碱基的缺失。我们将分离到的 PRRSV 粤 A 株病毒人工感染 6 头 60 日龄的健康猪, 结果这些猪在 10~16 d 内全部死亡, 临床症状与发病猪场及文献报道<sup>[4]</sup> 极为相似。这表明以 *Nsp2* 基因连续缺失为特征的 PRRSV 对猪是高致病性的, 可能是高热病流行的原因。我们构建的 RT-PCR 方法可以区分 *Nsp2* 缺失株与经典弱毒疫苗株, 缺失株扩增到的目的片段是  $200 \text{ bp}$ , 经典弱毒疫苗株为  $290 \text{ bp}$ , 该方法特异性强, 敏感度高, 可以为高致病性猪繁殖与呼吸综合症的诊断鉴定提供参考。在电泳图中最前面的条带为引物条带, 长度小于  $100 \text{ bp}$ , 可能是引物稀释的工作浓度过高了或出现了引物二聚体, 有待我们进一步优化试验条件。从 3 个急性暴发 PRRS 的猪场送检的病料看, 都扩增到了大约  $290 \text{ bp}$  的条带, 说明 *Nsp2* 缺失株 PRRSV 确实在我国流行, 毒力也较强。这些缺失毒株可能是 2006 年我国很多猪场暴发“无名高热”的原因。该方法也为下一步分子流行病学调查和病毒遗传变异分析提供参考。

### 参考文献:

- [1] CHO J G, DEE S A. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. Theriogenology, 2006, 66: 655-662.
- [2] ALLENDE R, KUTISH G F, LAEGREID W, et al. Mutations in the genome of porcine reproductive and respiratory syndrome virus responsible for the attenuation phenotype [J]. Arch Virol, 2000; 145: 1149-1161.
- [3] 高志强, 郭鑫, 杨汉春, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒缺失变异株的基因组特征 [J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36 (6): 578-584.
- [4] 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): 323-326.
- [5] TIAN Ke-gong, YU Xiu-ling, ZHAO Tie-zhu, 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): 526.

【责任编辑 柴 焰】