

RT-PCR 和酶切方法区分猪瘟疫苗毒与野毒的研究*

赵 耘 秦玉明 张广川 赵启祖 宁宜宝

(中国兽医药品监察所 北京 100081)

摘要: 建立了套式 RT-PCR 与限制性内切酶酶切相结合的区别猪瘟兔化弱毒疫苗株与猪瘟病毒田间分离株的诊断方法。通过对猪瘟兔化弱毒疫苗株与猪瘟石门株 E2 基因主要抗原编码区序列进行限制性内切酶酶切位点分析, 分别找出猪瘟兔化弱毒疫苗株与猪瘟石门株各自独有的限制性内切酶酶切位点, 结果二者分别有 10 和 16 个独有的限制性内切酶的酶切位点; 分别对 17 株猪瘟病毒 E2 基因主要抗原编码区序列进行这 26 个限制性内切酶酶切位点分析, 结果表明有 3 个限制性内切酶 (*HgaI*、*Hin8I* 及 *Hsp92I*) 的酶切位点在 HCLV 株序列是独有的; 利用 *HgaI* 限制性内切酶分别对 HCLV、HCVSM 及 5 株不同基因群的猪瘟病毒田间分离株进行酶切鉴定, 结果只有 HCLV 株能够被 *HgaI* 酶切成 2 个片段, 而其它的毒株则不能被切开。同时测定了套式 RT-PCR 方法的敏感性及其特异性, 结果其敏感性可达到 0.2MLD, 而对 BDV 以及 BVDV 均不能特异扩增。本方法的建立无疑对猪瘟在我国的控制和消灭具有重要的意义。

关键词: 猪瘟兔化弱毒, 猪瘟田间分离毒, RT-PCR, 酶切

中图分类号: S852 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 03-0082-06

Differentiation Between Vaccine Strain and Field Isolates of Classical Swine Fever Virus Using Polymerase Chain Reaction and Restriction Test*

ZHAO Yun QIN Yu-Ming ZHANG Guang-Chuan ZHAO Qi-Zu NIN Yi-Bao

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081)

Abstract: A nest RT-PCR/restriction test has been developed in order to distinguish the lapinised vaccine strain from field isolates of classical swine fever virus. The restriction enzyme cut sites mapping of the major coding sequence of E2 gene lapinised vaccine strain and ShiMen strain of classical swine fever virus have been compared. Ten and sixteen unique restriction markers have been found in the lapinised vaccine strain and ShiMen strain. The restriction enzyme cut sites mapping of the twenty six unique restriction marker in the major coding sequence of E2 gene of 17 classical swine fever field isolates have been analyzed. Only 3 sites (*HgaI*, *Hin8I* 及 *Hsp92I*) are present in the lapinised vaccine strain sequence. Two pairs of nested primers and a criteria of analysis have been designed for *HgaI* restriction marker site. The tests have been conducted first on the lapinised vaccine strain and ShiMen strain of classical swine fever virus resulting in predicted restriction patterns. Finally, the tests have been applied to 5 field isolates of different gene group analyzed by phylogenetic study. The result showed that only HCLV strain gene can be cut to 2 fragment by *HgaI*, and ShiMen strain and 5 field isolates can't be cut. At the same time the sensitivity and specificity of nest RT-PCR have been tested. The sensitivity is 0.2MLD. The specific fragment of BDV and BVDV were not obtained by the nest RT-PCR. These results showed that the development of the nest RT-PCR/restriction tests is very important for the control and perish of classical swine fever in china.

Key words: Lapinised vaccine strain, Field isolates, RT-PCR, Restriction test

* 国家重点基础研究发展规划项目 (No. G1999011905)

通讯作者 Tel: 010-62158844-3416, E-mail: zhaoyun1126928@sohu.com

收稿日期: 2005-08-31, 修回日期: 2005-10-31

猪瘟病毒属于黄病毒科瘟病毒属^[1]。病毒基因组为单股正链 RNA, 长约 12.5kb, 包括一个大的开放读码框, 编码 4 种结构蛋白 [C (p14)、E^m (gp48)、E1 (gp33)、E2 (gp53)] 和 7 种非结构蛋白 (P7, NS2, NS3, NS4A-B, NS5A-B)^[2]。借助于猪瘟病毒 E2、NS5B 及 5' 端基因序列测定及分析可以进行猪瘟病毒的遗传演化分析, 将猪瘟病毒分为不同的组群, 这对于了解猪瘟病毒的起源、传播以及遗传变化都具有重要的意义^[3]。

世界上许多国家是把弱毒活疫苗免疫作为猪瘟控制的主要手段, 而检测抗体的 ELISA 方法对于免疫猪群猪瘟的净化几乎是无能为力。常用的检测猪瘟病毒的实验室诊断方法是免疫组化和病毒分离培养。这些方法均存在费时的缺点。已报道有数个程序利用 RT-PCR 方法检测猪瘟病毒 RNA^[4]。瘟病毒属特异的引物多选自基因组的 5' 端保守区^[5]。PCR 方法最突出的优点是其产物能用来直接测序, 直接进行病毒株的分型^[3,6]。套式 RT-PCR 方法一般来说是检测猪瘟病毒更敏感的方法, 但其缺点是比较费时, 难于适用于大量样品的检测。McGoldrick 等报道了一种检测猪瘟病毒的荧光 RT-PCR 方法, 本方法可检测感染中等毒力-高等毒力仔猪血样中的猪瘟病毒, 其敏感性高于病毒分离方法。本研究的目标是建立能区别猪瘟病毒兔化弱毒疫苗株与猪瘟野毒株的套式 RT-PCR 及酶切方法, 并对其敏感性及特异性进行评价。

1 材料与方法

1.1 病毒

猪瘟病毒石门株 (ShiMen) 由中国兽医药品监察所保存、鉴定, 毒价为对猪的最小感染量 $\leq 10^5$ /mL; 猪瘟兔化弱毒 (HCLV) 淋脾毒种毒由中国兽医药品监察所保存、鉴定, 毒价为对兔的最小感染量 $\leq 10^5$ /mL; 牛病毒性腹泻病毒 (BVDV) 及边界病病毒 (BDV) 种毒由中国兽医药品监察所保存、鉴定; 共收集 HCV 流行毒株 17 株, 编号分别为: SCCD1.79 (四川); LN1.84 (辽宁); SZGM1.85 (深圳); GDGZ1.95 (广东); JL1.94 (吉林); HeBHH2.95 (河北); BJCY1.96 (北京); HeNBY1.96 (河南); GSLZ1.98 (甘肃); JSNJ1.98 (江苏); FJFQ1.99 (福建); JLCC1.00 (吉林); BJSY1.01 (北京); HuBXY1.01 (湖北); TJ1.02 (天津); JXDN1.02 (江西); FJFQ1.02 (福建)。其中 GDGZ1.95、BJCY1.96 为细胞毒, 由本所分离鉴定; JL1.94 由长春兽医大学分离鉴定, 本所进行了细胞和本动物传代; 其它均为血毒或组织毒。

1.2 引物

根据 Alfort^[7] 和 Brescia^[8] 株序列设计而成, 共设计 2 套引物, 均由上海博雅生物工程公司合成。引物分别是: P1 5' ctggttaactggggcacaag 3', P2 5' gcagtagtatccatttcttat 3'; PZD1 5' tc(ga)(at)caaccaa(tc)gagataggg 3', PZD2 5' cacag(ct)cc(ag)aa(tc)cc(ag)aagtcac 3'。其中 P1/P2 引物包括 E2 基因全长, 长度为 1273bp, PZD1/PZD2 引物包括 E2 基因主要抗原编码区 B、C 区, 长度为 251bp。

1.3 病毒 RNA 的提取

参照 GIBCO 公司 TRIZOL RNA 提取试剂说明书进行。

1.4 套式 RT-PCR

反转录按照 Gibco 公司的说明书进行。套式 PCR 第一步的反应条件为: 98℃ 5min 预变性, 93℃ 60s, 54℃ 60s, 72℃ 100s, 35 个循环, 然后 72℃ 10min。以此 PCR 产物

1 μL 为模板进行套式 PCR 的第二步, 第二步的反应条件为: 98 $^{\circ}\text{C}$ 5min 预变性, 95 $^{\circ}\text{C}$ 50s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 60s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 35s, 40 个循环, 然后 72 $^{\circ}\text{C}$ 5min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 60min。取 5 ~ 8 μL PCR 产物进行电泳检测。然后送上海博雅生物工程公司测序。

1.5 酶切

取适量 PCR 产物利用鼎国公司的 PCR 纯化试剂盒进行浓缩纯化, 方法按试剂盒说明书进行。取适量纯化的 PCR 产物进行酶切, 最后取 5 ~ 8 μL PCR 产物进行电泳检测。

1.6 核苷酸序列计算机分析

分析用软件为 DNASTar 生物软件, 利用其进行序列分析及酶切位点分析。

2 结果

2.1 特异性测定

利用所设计的引物分别对猪瘟病毒石门株、猪瘟病毒兔化弱毒株进行套式 RT-PCR, 结果 2 个毒株中均能扩增出相应的片段, 大小约为 250bp (预期片段为 251bp) (图 1), 而 BVDV、BDV 均未扩增出相应的片段 (图片略)。

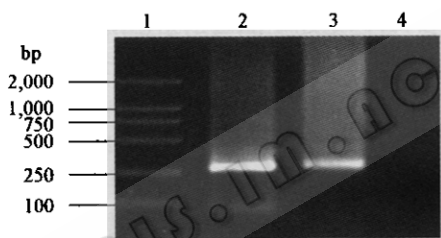


图 1 套式 RT-PCR 方法特异性测定结果

1 DL2000 标准分子量, 2 猪瘟病毒石门株, 3 猪瘟病毒兔化弱毒疫苗株, 4 阴性对照

2.2 敏感性测定

将猪瘟病毒石门株做系列稀释, 使其浓度为 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} MLD/mL, 进行 RT-PCR 时分别取 0.2 mL, 则浓度分别为 20,000、2,000、200、20、2、0.2、0.02 及 0.002 MLD, 结果套式 RT-PCR 可以检测到 0.2 个 MLD 的病毒样品, 大小均约为 250bp (预期片段为 251bp) (图 2)。

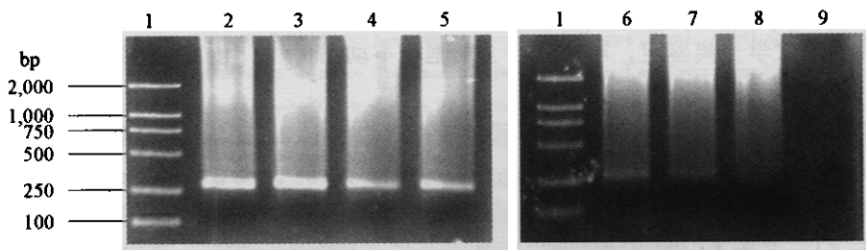


图 2 套式 RT-PCR 方法敏感性测定结果

1, 6 DL2,000 标准分子量, 2 20,000MLD, 3 2,000MLD, 4 200MLD, 5 20MLD, 7 2MLD, 8 0.2MLD, 9 0.02MLD

2.3 猪瘟病毒序列测定及遗传进化分析

得到了 HCVSM、HCLV 及 17 株猪瘟田间分离病毒株 E2 基因主要编码区序列 (序列略), 利用 DNASTar 软件对其遗传进化进行了分析, 结果 17 株猪瘟田间分离病毒被

分成 2 个基因群, 其中 Alfort 株所在的基因群包括 13 株, Brescia 株所在的基因群包括 4 株。

2.4 酶切位点计算机分析

分别对猪瘟兔化弱毒株 (HCLV) 及猪瘟石门株 (HCVSM) 所测序列进行限制性内切酶酶切位点分析, 分别找出 HCLV 及 HCVSM 株各自特有的酶切位点, 结果 HCVSM 株独有的限制性内切酶酶切位点有: *AcrI*、*AquI*、*AvaI*、*BscAI*、*BsmNI*、*BspST5I*、*Eco88I*、*NcuI*、*Nti387/7I*、*SfaNI*; HCLV 株独有的限制性内切酶酶切位点包括 *AsuHPI*、*BscI07I*、*BscHI*、*BseMII*、*BslI*、*Bst295I*、*BstDEI*、*DdeI*、*DrdI*、*EcoDrl*、*HgaI*、*Hin8I*、*HphI*、*Hsp92I*、*NgoBVIII*、*NgoDVIII*; 分别对 17 株猪瘟病毒田间分离株进行这些限制性内切酶酶切位点的分析, 结果由表 1、表 2 可以看出, 有 3 个限制性内切酶的酶切位点 (包括 *HgaI*、*Hin8I* 及 *Hsp92I*) 为 HCLV 株所独有, 所有 17 株猪瘟病毒田间分离株均无这 3 个限制性内切酶的酶切位点, 结果见表 1、表 2。

表 1 17 株猪瘟田间分离株对 HCVSM 株独有限制性内切酶酶切位点的分析

酶/毒株	<i>AcrI</i>	<i>AquI</i>	<i>AvaI</i>	<i>BscAI</i>	<i>BsmNI</i>	<i>BspST5I</i>	<i>Eco88I</i>	<i>NcuI</i>	<i>Nti387/7I</i>	<i>SfaNI</i>	<i>NgoVIII</i>	<i>NgoDVIII</i>
SCCD1. 79	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
LN1. 84	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
SZGM1. 85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
JI1. 94	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
GDGZ1. 95	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
HeBHH2. 95	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
BJCY1. 96	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
HeNBY1. 96	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
GSLZ1. 98	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-
JSNJ1. 98	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
FJFQ1. 99	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
JLCC1. 00	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
BJSY1. 01	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
HoBXY1. 01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
TJ1. 02	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-
JXDN1. 02	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
FJFQ1. 02	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

表 2 17 株猪瘟田间分离株对 HCLV 株独有限制性内切酶酶切位点的分析

酶/毒株	<i>AsuHPI</i>	<i>BscI07I</i>	<i>BscHI</i>	<i>BseMII</i>	<i>BslI</i>	<i>Bst295I</i>	<i>BstDEI</i>	<i>DdeI</i>	<i>DrdI</i>	<i>EcoDrl</i>	<i>HgaI</i>	<i>Hin8I</i>	<i>HphI</i>	<i>Hsp92I</i>
SCCD1. 79	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
LN1. 84	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
SZGM1. 85	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
GDGZ1. 95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
JI1. 94	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
HeBHH2. 95	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
BJCY1. 96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
HeNBY1. 96	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-

续表 2

GSLZ1. 98	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
JSNJ1. 98	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
FJFQ1. 99	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
JLCC1. 00	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
BJSY1. 01	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
HuBXY1. 01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
TJ1. 02	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
JXDNI. 02	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
FJFQ1. 02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

2.5 酶切分析

分别将猪瘟病毒石门株、兔化弱毒疫苗株及 5 株猪瘟病毒田间分离株 (BJSY1. 01、HuBXY1. 01、TJ1. 02、JXDNI. 02、FJFQ1. 02) RT-PCR 纯化产物利用 *Hga*I 限制性内切酶对其进行酶切, 结果猪瘟病毒兔化弱毒疫苗株 RT-PCR 产物能够被 *Hga*I 酶切成大小分别约为 150bp、120bp 两条片段 (预期片段大小分别为 151bp、123bp), 而猪瘟病毒石门株及 5 株猪瘟病毒田间分离株的 RT-PCR 产物则不能被切开, 结果见图 3、表 3。

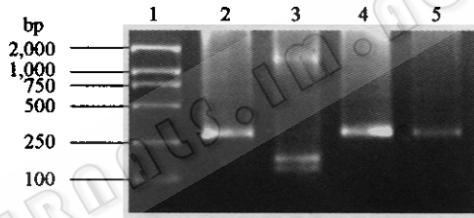


图 3 酶切结果

1 DL2000 标准分子量 2 HCLV 3 HCLV/*Hga*I 4 SM 5 SM/*Hga*I

表 3 HCLV、HCVSM 及猪瘟病毒田间分离株 *Hga*I 酶切结果

毒株	HCLV	HCVSM	BJSY1. 01	HuBXY1. 01	TJ1. 02	JXDNI. 02	FJFQ1. 02
结果	+	-	-	-	-	-	-

3 讨论

猪瘟兔化弱毒疫苗为我国乃至全世界猪瘟的控制和消灭做出了重要的贡献。但是猪瘟兔化弱毒疫苗目前最大的困难就是无确实的方法区分自然感染猪与疫苗接种猪, 尤其是抗原检测方法。RT-PCR 方法和限制性内切酶酶切方法相结合进行猪瘟病毒的诊断早有报道^[9,10]。但是目前尚无能够进行猪瘟兔化弱毒疫苗株与其它田间分离株的报道, 因此本方法的建立无疑具有重要的意义。

疫苗研究的一个重要方面是建立配套的能区分疫苗接种动物与自然感染动物。本研究就是利用套式 RT-PCR 方法与限制性内切酶的方法相结合, 对猪瘟兔化弱毒疫苗接种猪和自然感染猪进行区别。通过对猪瘟兔化弱毒疫苗株与猪瘟石门株 E2 基因主要抗原编码区序列进行限制性内切酶酶切位点分析, 分别找出猪瘟兔化弱毒疫苗株与猪瘟石门株各自独有的限制性内切酶酶切位点, 结果二者分别有 10 和 16 个独有的限制性内

切酶的酶切位点; 分别对 17 株猪瘟病毒 E2 基因主要抗原编码区序列进行这 26 个限制性内切酶酶切位点分析, 结果表明有 3 个限制性内切酶 (*HgaI*、*Hin8I* 及 *Hsp92I*) 的酶切位点在 HCLV 株序列是独有的, 而 HCVSM 株及 17 株猪瘟病毒田间分离株序列均无这 3 个限制性内切酶的酶切位点; 利用 *HgaI* 限制性内切酶分别对 HCLV、HCVSM 及 5 株猪瘟病毒田间分离株进行酶切鉴定, 结果只有 HCLV 株能够被 *HgaI* 酶切成 2 个片段, 而其它的毒株则不能被切开。这与前面计算机软件分析的结果完全一致, 从而使 HCLV 株与田间分离株能够区分。

17 株猪瘟病毒田间分离株是本室分离鉴定或保存的自 1979 年至 2002 年 12 个省市的猪瘟病毒野毒株, 序列遗传进化分析表明 17 株猪瘟病毒野毒株分别被分成 2 个大的基因群, 其中 Alfort 株所在的基因群包括 13 株, Brescia 株所在的基因群包括 4 株, 更多的野毒株是位于远离 HCLV 所在的基因群 (Brescia 株所在的基因群), 这个变异趋势与以往的研究结果相似^[11]。为证实本研究所具的普遍性, 本研究特意从 2 个基因群中分别选择野毒株进行酶切鉴定, HuBXY1.01 及 FJFQ1.02 株与 HCLV 株在同一基因群, 而 BJSY1.01、TJ1.02 及 JXDN1.02 株则在另一个基因群, 结果证实 2 个不同基因群的 5 个野毒株均无 *HgaI* 的酶切位点。

目前进行猪瘟病毒 RT-PCR 诊断方法的引物多选在 5' 段保守区^[5], 而进行病毒遗传进化分析的基因区段主要是 E2 基因及 NS5B 基因^[3]。本研究中所选的引物正是在 E2 基因主要抗原编码区, 扩增片段包括 E2 基因 B、C 区, E2 基因 B、C 区是猪瘟病毒相对变异较为活跃的区域, 本研究室多年来正是利用这段基因进行猪瘟病毒遗传进化分析的研究, 共完成猪瘟病毒田间分离毒株序列测定 70 余株 (结果未发表), 积累了丰富的猪瘟病毒分子流行病学资料。本研究进行了 RT-PCR 方法的敏感性测定, 结果表明其敏感性对石门种毒 (10^5 MLD/mL) 可达到 0.2 MLD, 此结果说明本方法完全可以满足作为诊断方法的敏感性要求。

参考文献

- [1] Pringle C R. Arch Virol, 1999, **144** (2): 421 ~ 429.
- [2] Meyers G, Thiel H G. Adv Vir Res, 1996, **47**: 53 ~ 118.
- [3] Lowings J P, Ibata G, Needham J, et al. Virology, 1996, **77**: 1311 ~ 1321.
- [4] Wirz B, Trautschin J D, Muller H K, et al. J Clin Microbiol, 1993, **31**: 1148 ~ 1154.
- [5] McGoldrick A, Lowing J P, Ibata G, et al. J Vir Meth, 1998, **72**: 125 ~ 135.
- [6] Greiser W I, Depner K, Fritzemeier J, et al. J Vir Meth, 1998, **75**: 141 ~ 150.
- [7] Meyers G, Rumenapf T, Thiel H J, et al. Virology, 1989, **171**: 555 ~ 567.
- [8] Moormann R J M, Warmerdam P A M, Van Der Meer B, et al. Virology, 1990, **177**: 184 ~ 198.
- [9] Vilcek S, Belak S. Acta Vet Scand, 1998, **39**: 395 ~ 400.
- [10] Zaberezhny, A D, Gerbennikova, T V, Kurinnov, V V, et al. Dtsch tierarztl Wschr, 1999, **106**: 373 ~ 416.
- [11] 赵 耘, 王在时, 王 琴等. 中国兽医科技, 2002, **32** (3): 3 ~ 7.