

口蹄疫病毒实时 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立

卢受昇^{1,2}, 樊惠英¹, 孙彦伟², 任涛¹, 卢洪芬², 闫晓菊², 孔令辰², 查云峰², 廖明¹

(1 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642; 2 广东省动物防疫监督总所, 广东 广州 510230)

摘要:基于口蹄疫病毒聚合酶 3D 蛋白基因的序列分析,设计合成了特异的引物和探针,通过反应条件的优化,建立了实时 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 检测方法.试验表明,实时 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 能特异性检测 A、O、Asia I 3 种血清型的口蹄疫病毒,对猪水泡病、猪瘟、蓝耳病等猪常见病原检测结果均为阴性.对比检测试验表明,实时 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 的检测敏感性比常规的多重 RT-PCR 提高达 10^5 倍,对口蹄疫病毒细胞增殖病毒液的检测灵敏度可达 0.063 个 TCID₅₀.对临床样品的检测试验证实,该方法可以有效检测临床样品中的猪水泡皮、组织、血清及 O-P 液中的口蹄疫病毒.

关键词:口蹄疫病毒; 荧光定量 RT-PCR; 病毒检测; TaqMan 探针

中图分类号:S852.65

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2009)03-0086-04

Development of a Real-Time TaqMan RT-PCR Assay for the Detection of Foot-and-Mouth Disease Virus

LU Shou-sheng^{1,2}, FAN Hui-ying¹, SUN Yan-wei², REN Tao¹, LU Hong-fen²,
YAN Xiao-ju², KONG Ling-chen², ZHA Yun-feng², LIAO Ming¹

(1 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 Guangdong Provincial Veterinary Station of Epidemic Prevention & Supervision, Guangzhou 510230, China)

Abstract: In this study, one set of primer and one probe were designed according to the sequence of 3D gene of foot-and-mouth disease virus (FMDV). Through the optimization of reaction conditions, a TaqMan RT-PCR detection method was developed. The TaqMan RT-PCR assay specifically detected A, O, Asia I serotype of FMDV and the test results were negative for swine vesicular disease, classical swine fever virus, porcine reproductive and respiratory syndrome. Comparison tests indicated that TaqMan RT-PCR assay was at least 10^5 fold sensitive than the conventional multi-RT-PCR. The detection limit of the assay reached 0.063 TCID₅₀ as showed by tests on serial ten fold dilution of cell propagated virus samples. Clinical applications showed that this method can be used for FMDV detection of swine blisters, tissues, serum, oesophageal-pharyngeal fluid. So it provided one reliable method for the diagnosis and supervision of foot and mouth disease.

Key words: foot-and-mouth disease virus; fluorescence quantitative RT-PCR; virus detection; TaqMan probe

口蹄疫病毒主要引起偶蹄动物发生口蹄疫 (Foot-and-mouth disease, FMD), 该病严重影响着动物产品的国际贸易^[1]. 作为一种烈性、急性和高度传 染性的疾病,其预防控制的基础是能够进行及时准确的诊断,而临床症状中出现水泡症状的疫病还包括猪水泡病、猪水泡疹和水泡性口膜炎,因此,仅仅

收稿日期:2009-01-04

作者简介:卢受昇(1972—),男,博士;通讯作者:樊惠英(1977—),女,讲师,博士,E-mail: fanhy@scau.edu.cn;廖明(1968—),男,教授,博士,E-mail: mliao@scau.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金青年基金(30800826);广东省博士启动基金(8451064201001131)

依据临床症状难以区分,需要借助实验室方法的进一步鉴别诊断.我国现行对 FMDV 病原进行诊断的方法是进行病毒分离、以间接夹心酶联免疫吸附试验、反向间接血凝试验(IHA)、RT-PCR 等方法鉴定,但这些方法都有其各自的局限性^[2].近年来发展起来的实时 TaqMan 荧光定量 RT-PCR(Real-time TaqMan RT-PCR)技术以其特异性强、灵敏度高、速度快等优点在基因表达水平分析、病原体基因的定性和定量检测等方面得到广泛应用,并且已经成为当前病毒核酸快速检测的主要方法^[3].本研究旨在根据广东省近期流行毒株的序列特点,建立一种特异性强、敏感性高的实时 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 方法,用于口蹄疫的快速诊断与监测.

1 材料与方法

1.1 材料

A 型、O 型、Asia I 型 FMDV 标准株由广东省动物防疫监督总所分离保存;猪水泡病病毒(SVDV)及猪瘟疫病毒(HCV)等由华南农业大学传染病教研室等提供;增殖病毒用的 BHK-21 细胞,由武汉大学中国典型培养物保藏中心提供;2~3 日龄乳鼠,由广东省实验动物研究中心提供.荧光定量 PCR 仪型号为 AB 7500;RNA 抽提用的 TRIzol® Reagent 为 Invitrogen 公司产品;荧光 RT-PCR 预混试剂及普通 RT-PCR 试剂为宝生物工程(大连)有限公司产品;FMDV 多重 RT-PCR 检测试剂盒由中国农业科学院兰州兽医研究所提供.

1.2 引物与探针的设计与合成

以高度保守的 FMDV 编码聚合酶蛋白的 3D 基因作为扩增靶区,设计并合成了 1 对引物和 1 条 TaqMan 探针.具体序列——上游引物 P1:5'-CGAGTCCTGCCACGGAGAT-3';下游引物 P2:5'-ACCTGTGATGGCYTCGAAGA-3';TaqMan 探针:5'(FAM)-ATGGTCCCACGGCGTGCAA-(TAMRA)3'.探针的 5' 端标记荧光发射基团 FAM(6-羧基荧光素),靠近 3' 端标以荧光淬灭基团 TAMRA.扩增的目的片段长 92 bp.引物和探针由宝生物工程(大连)有限公司合成.

1.3 引物和探针浓度的筛选

应用 25 μL PCR 反应体系,以质粒 pGEM-T 3D 作为检测样品,终浓度为 50、100、200、300、400、500、600 nmol/L,对引物和探针采用矩阵法进行优化,以确定引物和探针的最佳使用浓度.

1.4 定量用标准品的制备

3D 基因的 PCR 产物用 Omega 公司的凝胶纯化试剂盒纯化后,与 pGEM-T 载体连接,转化 DH5 α 大肠杆菌增殖,碱裂解法抽提质粒,命名为 pGEM-T

3D,经试剂盒纯化后,用 NanoDrop 微量紫外分光光度计测定质粒浓度,计算拷贝数.

1.5 标准曲线的建立

以质粒 pGEM-T 3D 作为标准品,并梯度稀释至拷贝数为 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 μL^{-1} 作为模板,以起始模板数的对数为 X 轴, Ct 值(每个管内的荧光信号到达设定的阈值时需要的循环数)为 Y 轴做回归曲线,建立标准曲线.反应体系如下:Premix Ex Taq(2 $\times$) 12.5 μL ,上、下游引物(25 pmol/ μL)各 0.2 μL ,探针(25 pmol/ μL) 0.1 μL ,模板 3.0 μL 和 ddH₂O 9.0 μL .反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 5 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环, 60 $^{\circ}\text{C}$ 反应结束后收集荧光.

1.6 荧光 RT-PCR 反应条件

根据引物与探针使用浓度优化结果,结合 TaKaRa 公司 One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit 使用说明,确定一步法的反应体系和条件如下:20 μL 反应体系中含有 One step RT-PCR Buffer(2 $\times$) 10 μL 、Ex Taq HS(5 U/ μL) 0.4 μL 、M-MLV Rtase(H free)(200 U/ μL) 0.2 μL 、RNase Inhibitor(40 U/ μL) 0.4 μL 、上游引物(25 $\mu\text{mol/L}$) 0.2 μL 、下游引物(30 $\mu\text{mol/L}$) 0.2 μL 、探针(25 $\mu\text{mol/L}$) 0.1 μL 、ddH₂O 6.5 μL 、RNA 模板 2.0 μL .瞬时离心混匀后放入荧光定量扩增仪中,填写被检样品、阳性对照、阴性对照,定量标准曲线孔,设置通道,运行程序为 42 $^{\circ}\text{C}$ 25 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 5 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环,于 60 $^{\circ}\text{C}$ 延伸结束后收集荧光,根据标准曲线计算出待测样品的基因拷贝数.

1.7 TaqMan RT-PCR 的特异性、敏感性试验

用 SVDV、PRRSV、HCV、圆环病毒、乙脑疫苗毒、猪瘟活疫苗、伪狂犬活疫苗、猪传染性胃肠炎猪流行性腹泻二联苗以及正常猪蹄组织进行特异性比较检测.对 FMDV 细胞培养物(TCID₅₀为 $10^{6.8}$ mL⁻¹)样品进行 10 倍系列稀释,用中国农业科学院兰州兽医研究所生产的 FMDV 的多重 RT-PCR 和 TaqMan RT-PCR 检测,以比较它们的敏感性.

1.8 A 型、O 型和 Asia I 型口蹄疫病毒的检测试验

为了验证所建立的方法对多种血清型口蹄疫病毒的普遍适用性,用 A 型、O 型、Asia I 型口蹄疫病毒和 SVDV 进行验证.反应条件同 1.6.

1.9 临床样品的检测

对 12 份临床样品进行检测,包括 FMDV 感染动物水泡皮 3 份、血清 5 份、牛 O-P 液 4 份,其中水泡皮样品用反向间接血凝和多重 RT-PCR 方法进行复核,血清及 O-P 液只用多重 RT-PCR 方法进行复核.对检

测结果不一致的部分样品经乳鼠保护试验进行验证。

2 结果与分析

2.1 引物与探针浓度的筛选

应用含有扩增目的片段的质粒标准品,制备系列稀释的 DNA 作为检测样品,将引物和探针的浓度配成 50、100、200、300、400、500 nmol/L,采用矩阵法优选引物和探针的最佳浓度.结果表明,用 100 nmol/L 的引物浓度和 50 nmol/L 探针浓度,对质粒标准品检测可获得较小 Ct 值和较高的荧光强度增加值。

2.2 TaqMan RT-PCR 标准曲线的建立

病毒的 BHK-21 细胞培养物,经测定 TCID₅₀ 毒价,提取病毒 RNA 作 10 倍系列稀释后,做 TaqMan RT-PCR 检测.以 TCID₅₀ 的对数为 X 轴,Ct 值为 Y 轴作回归曲线 $y = -0.28x + 11.03$,从 FMDV 检测的标准曲线中可知,各浓度范围内有极好的线性关系,相关系数为 0.999,见图 1。

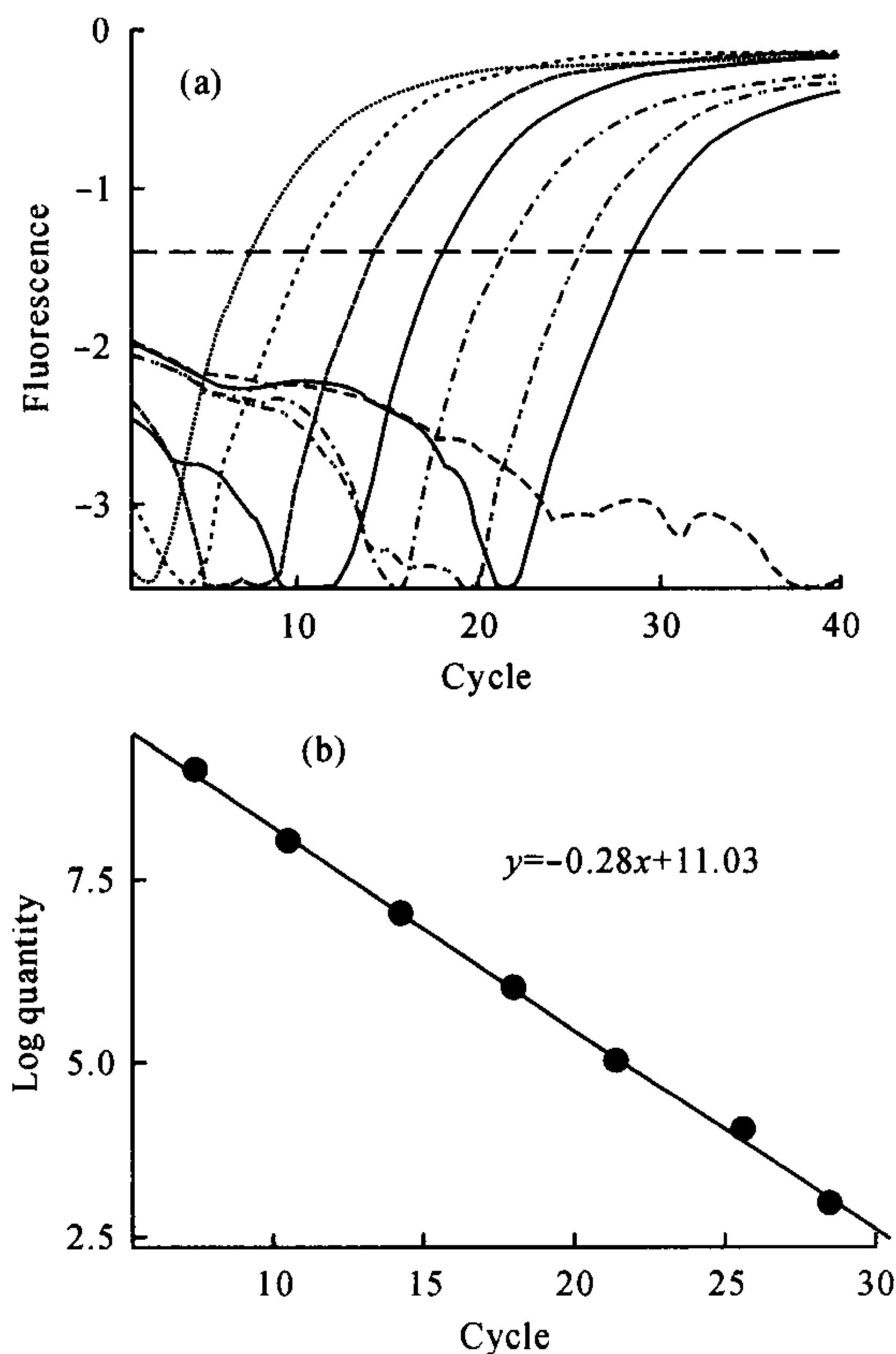


图1 荧光 PCR 扩增曲线(a)与荧光 PCR 标准曲线(b)

Fig.1 Amplification curve of real-time PCR (a) and standard curve of real-time PCR(b)

2.3 TaqMan RT-PCR 方法的特异性检验

从图 2 看出,TaqMan RT-PCR 法可很好检测到 A 型、O 型和 Asia I 型口蹄疫病毒,同时水泡病病毒为阴性.说明本方法对常见血清型的 FMDV 能很好

检出。

正常猪蹄部皮肤组织、SVDV、PRRSV、HCV、乙脑活疫苗、猪瘟活疫苗、伪狂犬活疫苗、猪传染性胃肠炎猪流行性腹泻二联苗、圆环病毒病料、检测结果均为阴性;阴、阳性对照成立,见图 3. 常见的猪病病原及正常的组织不会干扰本方法的检测结果,说明本方法具有良好的特异性。

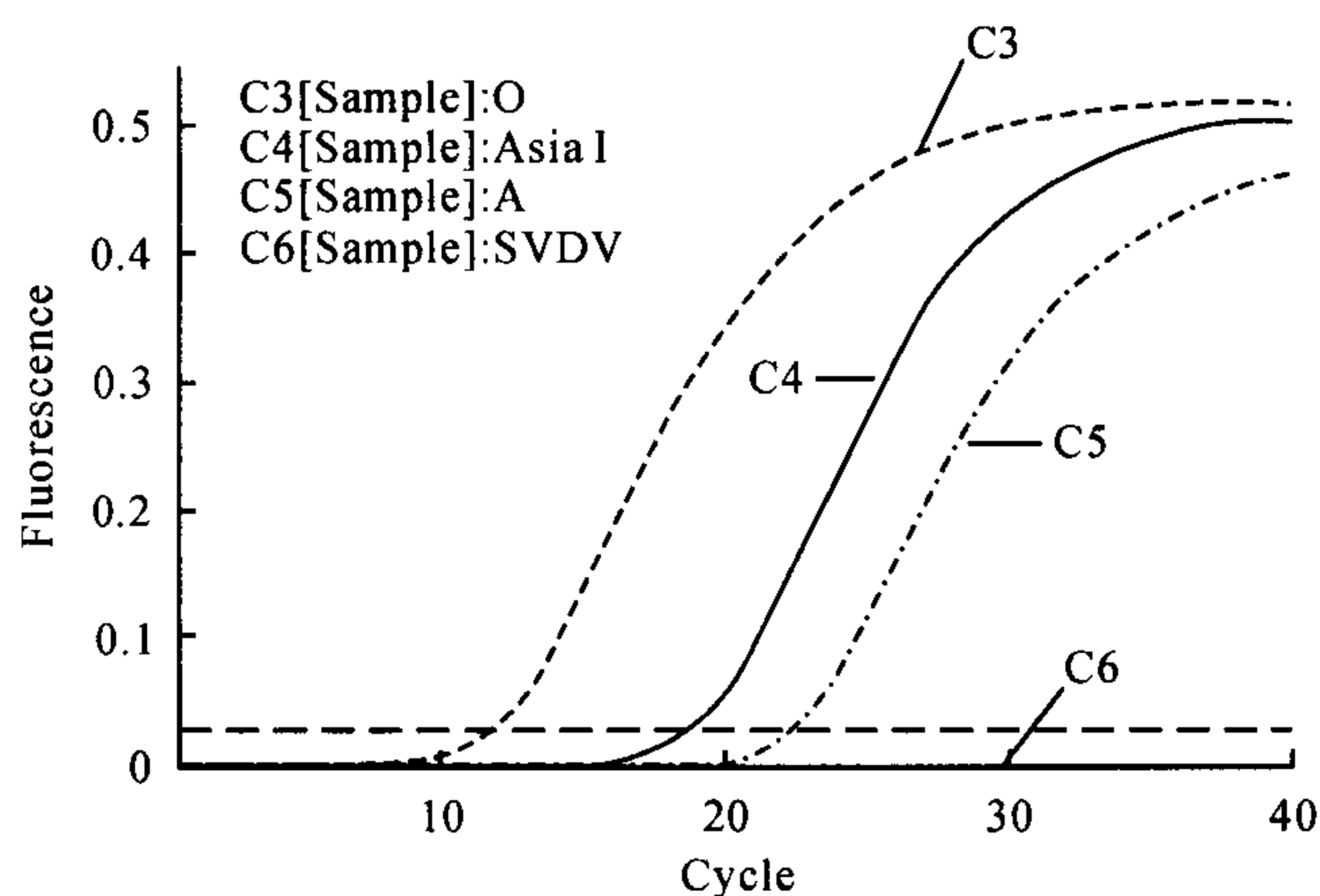


图2 适用性检测结果

Fig.2 The detection result of applicability

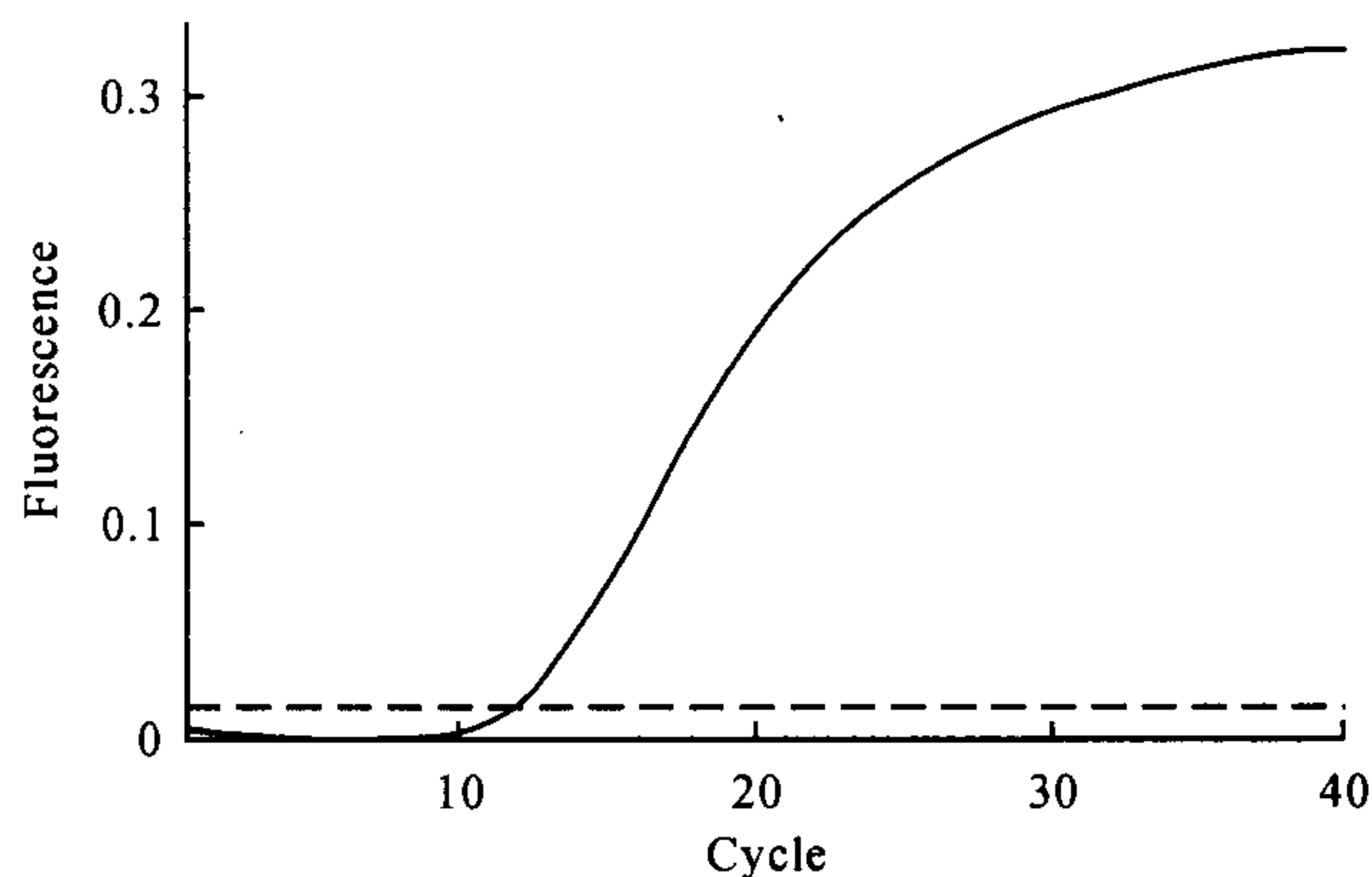


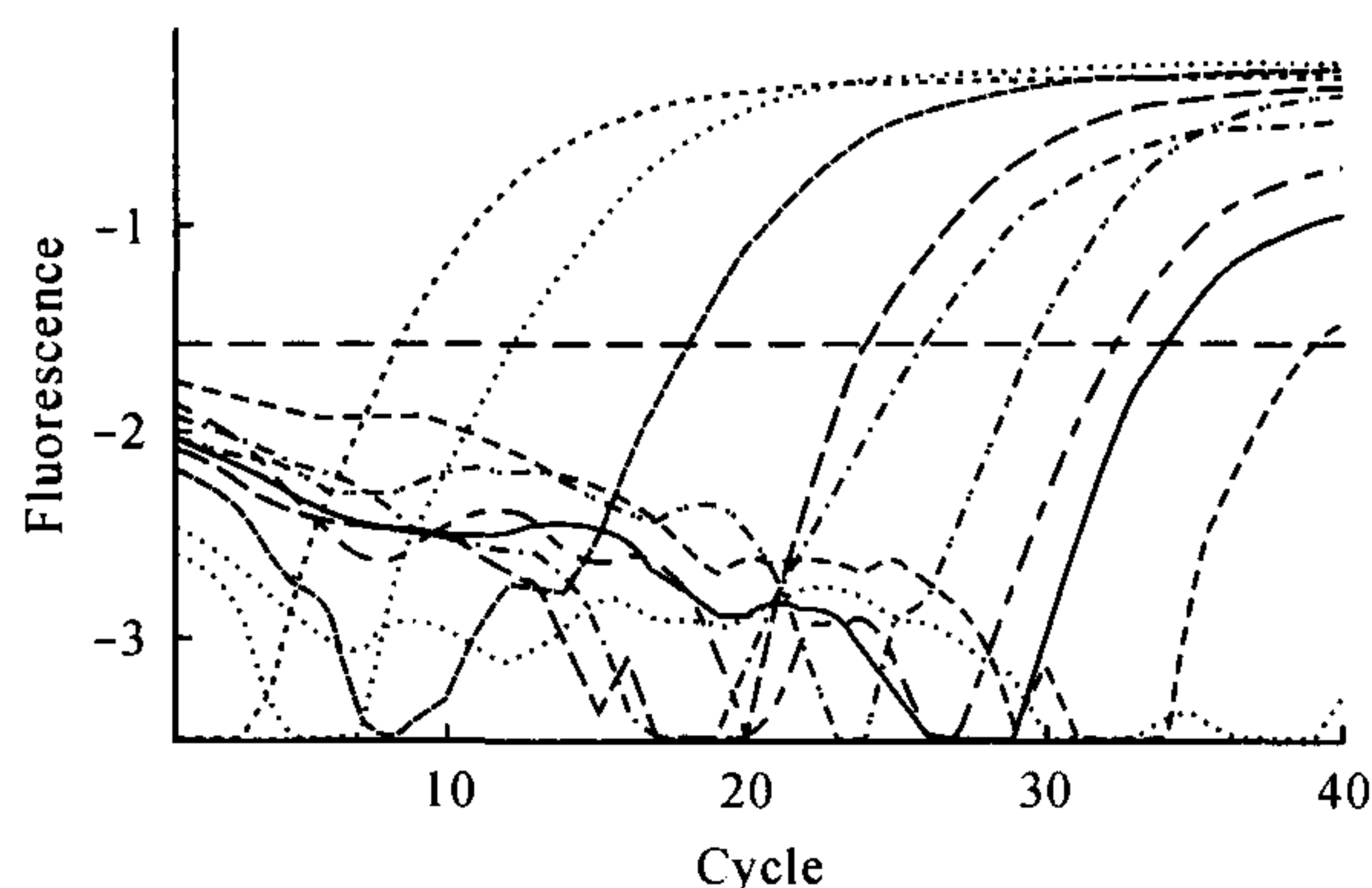
图3 特异性检测结果

Fig.3 Results of specificity test of real-time RT-PCR

2.4 敏感性检验

将 FMDV 病毒(TCID₅₀ 为 $10^{6.8}$ /mL)按 10^{-1} 倍比稀释.采用 TaqMan RT-PCR 方法对病毒原液、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 均能检出,Ct 值分别为 8.31、12.18、17.97、24.04、25.92、29.54、32.24、34.10; 10^{-8} 的 Ct 值为 39.02,但扩增曲线不典型,故本方法对病毒的敏感性为 10^{-7} ,相当于 0.063 个 TCID₅₀,见图 4。

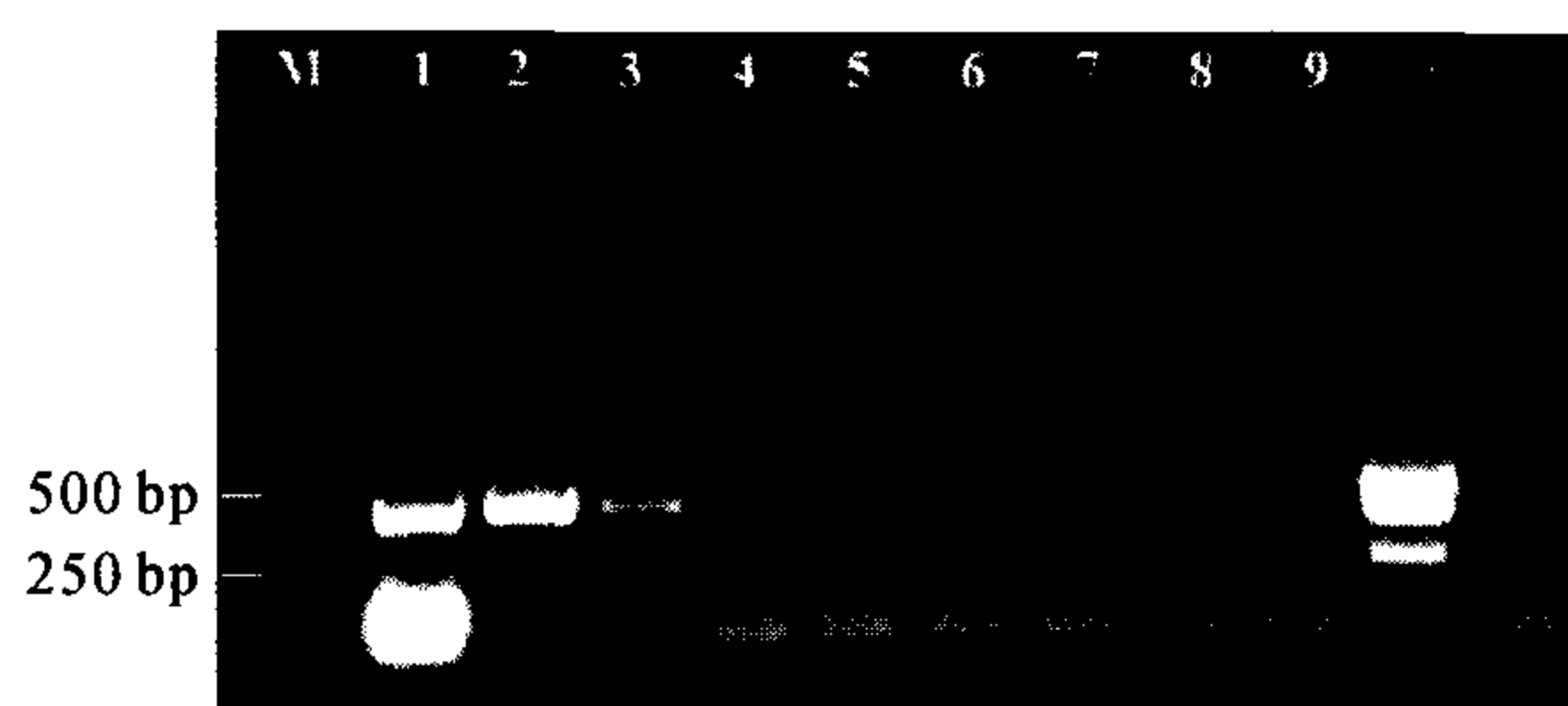
同时进行比对的普通 RT-PCR 方法,即中国农业科学院兰州兽医研究所生产的 FMDV 多重 RT-PCR,只能检测到病毒 10^{-2} 稀释组,FMDV 多重 RT-PCR,含有 3 对引物,扩增长度分别为 634、483 和 278 bp,只要扩出 1 条以上的目的带即可判为阳性.见图 5。



从左到右依次为病毒原液、 10^{-1} ~ 10^{-8} 倍稀释的病毒的反应曲线

图4 对病毒的敏感性检验结果

Fig. 4 The sensitive detection result of FMDV



M: DNA Marker DL2000; 1 ~ 9 分别为:原液、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 倍稀释的病毒; + : 阳性对照, - : 阴性对照

图5 多重 RT-PCR 试剂盒敏感性检测结果

Fig. 5 Results of sensitivity test of multiplex RT-PCR

2.5 临床样品的检验

对 12 份临床样品用反向间接血凝、多重 RT-PCR 和 TaqMan RT-PCR 方法同时进行检测,结果 3 种方法结果均一致,说明本方法与间接血凝和多重 RT-PCR 方法有较高的符合率。

3 讨论

口蹄疫病毒为小 RNA 病毒,基因组约 8.5 kb,共有 7 个血清型.不同血清型口蹄疫病毒之间,不能产生交互免疫,因此,快速准确地检测在口蹄疫的研究和防疫中至关重要.与常规的诊断方法相比,实时荧光定量 RT-PCR 具有高特异性,高灵敏性和快速的特点,已成功地用于 FMDV 的检测^[4-5]。

当前对我国威胁较大的是 A、O、Asia I 3 种血清型 FMDV^[6]。本文建立的实时 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 方法的引物、探针是根据 FMDV 聚合酶 3D 蛋白基因中的保守序列设计,充分考虑了我国 FMDV 流行形势和特点,对 A、O、Asia I 3 种血清型 FMDV 的检测具有普遍的适用性.由于本方法的敏感性较高,可检出 0.063 个 TCID₅₀ 的病毒量,较常规的多重 RT-PCR 高 10^5 倍,且荧光 RT-PCR 具有特异性强,可进行高通量样品检测,无需扩增后的电泳分析,可减少 PCR 产物污染的风险,适用于含毒量较低的样品检测,为 FMD 的诊断和监测提供了一个可靠的方法。

目前,以荧光 RT-PCR 对 FMDV 进行血清型鉴定,现有技术条件仍不易达到.包慧芳^[7]建立了 SYBRGreen 荧光 RT-PCR 方法用于鉴别 O 型、A 型和 Asia I 型 FMDV,但存在敏感性不够高的问题.分型 TaqMan 荧光 RT-PCR 方法建立的主要困难仍是由于 FMDV 基因的变异过大,即使同一血清型内的毒株间也难以找到足够长的保守序列用于探针的设计,缩短探针的长度成为此项技术在口蹄疫分型中应用的关键,MGB 探针^[8-9]和锁定核酸 (Locked nucleic acid, LNA) 探针^[10]技术的应用,可以使探针的长度缩短,MGB 探针尤其对 AT 含量高的序列有很大的帮助,随着这些技术的日益成熟,以及成本的降低,有望解决这一瓶颈问题.另外,针对局部地区少数血清型或基因型的分型荧光 RT-PCR 方法的建立是一个值得探讨的可行方向。

参考文献:

- [1] 谢庆阁. 口蹄疫[M]. 北京:中国农业出版社,2004:1-2.
- [2] KEARNS A M, TURNER A J L, ELTRINGHAM G J A, et al. Rapid detection and quantification of CMV DNA in urine using lightcycler-based real-time PCR [J]. J Clin Virol, 2002, 24: 131-134.
- [3] 宋志军, 宋长绪, 杨增岐, 等. 猪生殖与呼吸综合征病毒 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2006, 36(2): 98-102.
- [4] SHAW A E, REID S M, KATJA E, et al. Implementation of a one-step real-time RT-PCR protocol for diagnosis of foot-and-mouth disease[J]. J Virol Methods, 2007, 143: 81-85.
- [5] PALANI G, DIVAKAR H, CHAKRADHAR T, et al. Development and evaluation of a multiplex PCR for differentiation of foot-and-mouth disease virus strains native to India [J]. J Virol Methods, 2005, 126: 1-11.
- [6] 曲哲会. 口蹄疫病毒 RT-PCR 与抗体 ELISA 检测方法的建立及初步应用[D]. 哈尔滨:东北农业大学动物医学学院, 2006.
- [7] 包慧芳, 许小红, 陈应理, 等. 口蹄疫病毒分型荧光实时定量 RT-PCR 检测方法的初步研究[J]. 中国兽医科技, 2007, 33: 477-479.
- [8] KONDO M, SUDO K, TANAKA R, et al. Quantitation of HIV-1 group M proviral DNA using TaqMan MGB real-time PCR[J]. J Virol Methods, 2009, 157: 141-146.
- [9] PHOLAMPAISATHIT S. Real-time diagnosis and monitoring of cytomegalovirus infections using TaqMan-MGB probe technology[J]. Int J Infect Dis, 2008, 12: 471-472.
- [10] CHOUSALKAR K K, CHEETHAM B F, ROBERTS J R. LNA probe-based real-time RT-PCR for the detection of infectious bronchitis virus from the oviduct of unvaccinated and vaccinated laying hens [J]. J Virol Methods, 2009, 155: 67-71.

【责任编辑 柴 焰】