

口蹄疫、水泡性口炎和猪水泡病多重荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立

王乃福*, 黄 晨, 吴冬雪, 赵祥平, 陈本龙, 董志珍
(天津出入境检验检疫局动植物与食品检测中心, 天津 300461)

摘要: **目的** 建立同时检测口蹄疫病毒、水泡性口炎病毒和猪水泡病病毒的多重荧光 RT-PCR 检测方法。**方法** 根据口蹄疫病毒 3D 蛋白编码基因、水泡性口炎病毒 N 蛋白编码基因和猪水泡病病毒 VP1 蛋白编码基因的高保守区设计特异性引物和探针, 对 3 种动物病毒进行多重荧光定量 RT-PCR 扩增。**结果** 经过扩增, 可以同时检测口蹄疫病毒、水泡性口炎病毒和猪水泡病病毒, 而其他参试病原均无扩增信号, 显示其良好的特异性。对口蹄疫病毒、水泡性口炎病毒、猪水泡病病毒的最低检测限分别达到 10^1 、 10^2 、 10^2 个质粒拷贝浓度。**结论** 本方法灵敏度高, 特异性良好, 可实现多种病毒混合感染的同时检测。**关键词:** 口蹄疫病毒; 水泡型口炎病毒; 猪水泡病病毒; 多重荧光定量 RT-PCR

Establishment of simultaneous detection of foot-and-mouth disease virus, vesicular stomatitis virus and swine vesicular disease virus by multiplex real-time RT-PCR

WANG Nai-Fu*, HUANG Chen, WU Dong-Xue, ZHAO Xiang-Ping, CHEN Ben-Long, DONG Zhi-Zhen
(Animal, Plant and Foodstuffs Inspection Center, Tianjin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tianjin 300461, China)

ABSTRACT: Objective To establish a multiplex real-time RT-PCR method for simultaneous detection of foot and mouth disease virus, vesicular stomatitis virus and swine vesicular disease virus. **Methods** According to the gene encoding 3D protein of foot-and-mouth disease virus, vesicular stomatitis virus N protein coding gene and swine vesicular disease virus VP1 protein encoding gene, specific primers and probe were designed, and 3 kinds of animal viruses were amplified by multiplex real-time RT-PCR. **Results** The FMDV, VSV and SVDV could be simultaneously detected after amplification, and other tested pathogens were no amplification signal, displaying the good specificity. The minimum detection limits of foot and mouth disease virus, vesicular stomatitis virus and swine vesicular disease virus were 10^1 , 10^2 , and 10^2 plasmid copy concentration, respectively. **Conclusion** This method has a good specificity and sensitivity for simultaneous detection of FMDV, VSV and SVDV at the same time.

KEY WORDS: foot and mouth disease virus; vesicular stomatitis virus; swine vesicular disease virus; multiplex real-time RT-PCR

基金项目: 天津出入境检验检疫局科技计划项目(TK006-2011)

Fund: Supported by the Scientific and Technological Project of Tianjin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau (TK006-2011)

*通讯作者: 王乃福, 兽医师, 主要研究方向为动物疫病诊断技术。E-mail: wangnf@tjciq.gov.cn

*Corresponding author: WANG Nai-Fu, Veterinarian, Animal, Plant and Foodstuffs Inspection Center, Tianjin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, NO.158, Jingmen Road, Tanggu District, Tianjin 300461, China. E-mail: wangnf@tjciq.gov.cn

1 引言

口蹄疫、水泡性口炎和猪水泡病都是猪的重要病毒性传染病, 以口和蹄部产生水泡性损伤为特征, 其临床症状极为相似, 引起严重的公共卫生问题, 均被世界动物卫生组织(OIE) 列为 A 类传染病^[1-3]。3 种水泡性疾病在临床症状上难以区别, 必须通过实验室检测进行鉴别诊断^[4-6]。目前, 对 3 种疫病的诊断多采用病原分离鉴定及常规的血清学方法, 所需时间较长, 也可使用 PCR 进行检测, 但尚无稳定、操作性强、能同时鉴别 3 种病毒的方法^[7,8]。为此, 有必要建立能同时快速检测 3 种疫病的方法, 以便动物疫情爆发时尽快采取有效防控措施。本研究针对口蹄疫病毒(foot and mouth disease virus, FMDV)、水泡性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)和猪水泡病病毒(swine vesicular disease virus, SVDV)分别设计多对特异性引物及探针, 经过前期试验筛选后选取灵敏度和特异性良好的引物及探针组合, 优化反应条件和引物探针应用浓度, 最终实现经过一次多重荧光定量 RT-PCR 试验同时鉴别三种动物疫病的目的。

2 材料与方法

2.1 毒株和质粒

灭活口蹄疫病毒(FMDV)O 型、A 型、Asia I 型病毒液来自兰州兽医研究所, 口蹄疫灭活疫苗为中牧实业股份有限公司出品; 猪水泡病病毒反向间接血凝标准抗原, 由中国农业科学院兰州兽医研究所

出品; 灭活水泡性口炎病毒液由云南出入境检验检疫局技术中心馈赠; 含扩增靶基因的阳性重组质粒由本实验室构建; 赤羽病毒、牛白血病病毒、牛病毒性腹泻病毒及副结核分枝杆菌由本实验室分离保存。480 份奶牛及种猪血清为天津口岸送检。

2.2 试剂与仪器

总 RNA 提取试剂盒、DNA 提取试剂盒、DNA 片段回收试剂盒为 Qiagen 公司产品; 鼠源 M-MULV 反转录酶、*Taq* DNA 聚合酶、RNA 酶抑制剂购自 NEB 公司; 大肠杆菌 TOP10 感受态细胞购自 Takara 公司; 定量 PCR SuperMix-UDG with ROX 购自 Invitrogen 公司; 氯仿、异丙醇、乙醇等试剂均为分析纯, 天津市津东天正精细化学试剂厂。

ABI Prism® 7000HT 荧光定量仪器(美国应用生物系统公司); 冷冻离心机(德国 EPPENDORF 公司); PCR 扩增仪(美国 BIO-RAD 公司); 台式低温冷冻离心机(德国 SIGMA 公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 引物设计与合成

从 GenBank 数据库收集口蹄疫病毒(O 型、A 型、Asia I 型)、水泡性口炎病毒(新泽西型和印第安型)及猪水泡病病毒基因序列, 应用生物学软件 Clustalx 进行序列比对, 选取口蹄疫病毒 3D 蛋白编码基因、水泡性口炎病毒 N 蛋白编码基因及猪水泡病病毒 VP1 蛋白编码基因为扩增靶序列, 针对靶序列分别设计引物和探针(表 1), 所有探针、引物的合成修饰由英俊公司完成。

表 1 试验引物及探针
Table 1 The primers and probes in the study

病毒	引物及探针(5'-3')	序列	长度
FMDV	P1-3D	CATGGATTATGGAACCTGGGTT	13~156 bp
	P2-3D	TACTCGTCAGGTCCAGAGTGG	
	Probe-3D	FAM-TTACAAACCTGTGATGGCCTCGAAG-BHQ1	
VSV	P3-N	ATGTGAGCACTAAAGTAGCCCT	135~294 bp
	P4-N	GTTCTTCCAAAGCTAACCCAGT	
	Probe-N	ROX-TATGTCTACCAGGGAATCAAATCCG-BHQ1	
SVDV	P5-VP1	GGCATGTGAAGAATTACCACTC	149~282 bp
	P6-VP1	GTTGATGACCCAATAAGCGAAG	
	Probe-VP1	HEX-AGAGTCGACCGTGGAGAACTTCCTAT-BHQ2	

2.3.2 样品 RNA 的提取

取经 DEPC 水处理过的 EP 管, 加入 1 mL TRIzol 和 200 μ L 灭活病毒液或灭活疫苗样品, 混匀后室温放置 5 min; 加入 200 μ L 氯仿, 用力摇晃 30 s, 室温静置 3 min, 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min, 得到分层液; 取上层液移入干净的 EP 管, 加入 500 μ L 异丙醇, -20 $^{\circ}$ C 静置 30 min, 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min; 移去上层悬液; 加入 1 mL 75% 的 DEPC 乙醇, 涡旋振荡, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min; 去上清, 空气中干燥 5 min; 向试管中加入 50 μ L DEPC 水, -20 $^{\circ}$ C 备用。

2.3.3 多重荧光定量 RT-PCR 方法的建立

将 3 对引物和 3 条探针组合起来, 模板采用等比例混合的口蹄疫病毒 RNA、水泡性口炎病毒 RNA、猪水泡病病毒 RNA, 经过对引物、探针、dNTP、 Mg^{2+} 浓度、*Taq* DNA 聚合酶用量和反应条件进行优化, 建立口蹄疫病毒、水泡性口炎病毒、猪水泡病病毒多重荧光定量 RT-PCR。

2.3.4 标准曲线的建立

分别利用针对口蹄疫病毒 3D 蛋白编码基因、水泡性口炎病毒 N 蛋白编码基因及猪水泡病病毒 VP1 蛋白编码基因的特异性引物, 将病毒 RNA 在 50 μ L 体系中进行 PCR 扩增, 得到的 PCR 产物纯化后克隆到 pGEM-T easy 载体中并转化至大肠杆菌 TOP10 感受态细胞中, 从纯化扩增的重组菌中提取质粒, 经试剂盒纯化, 质粒浓度用紫外分光光度计通过 OD260 测定, 根据阿佛加德罗常数将浓度转换为基因拷贝数。

将定量后的质粒进行 10 倍梯度稀释, 选取多个浓度梯度用于荧光定量 RT-PCR, 以建立检测的标准曲线。

2.3.5 特异性试验

分别以口蹄疫病毒 RNA、水泡性口炎病毒 RNA 及猪水泡病病毒基因组为阳性对照, 以未感染上述三种病毒的细胞提取的总 RNA 作为阴性对照, 以水作为空白对照, 其他病毒如赤羽病毒 RNA、牛白血病病毒 cDNA、牛病毒性腹泻病毒 RNA 及副结核分枝杆菌 DNA 作为对照来鉴定所建立多重荧光定量 RT-PCR 的特异性。

2.3.6 多重荧光定量 RT-PCR 的灵敏度试验

分别以口蹄疫病毒 RNA、水泡性口炎病毒 RNA、猪水泡病病毒 RNA 为模板, 应用所建立的多重荧光定量 RT-PCR 方法进行检测, 以测定其灵敏度。

2.3.7 样本检测

收集天津口岸进口奶牛及种猪血清样本 480 份, 应用本研究所建立的方法及实验室常用的 ELISA 方法同时进行检测, 考察两种方法的一致性。另应用本研究所建立方法检测口蹄疫(O 型、A 型、Asia I 型) 灭活病毒液各 1 份, 水泡性口炎病毒(新泽西型) 灭活病毒液及猪水泡病病毒 VP1 基因阳性重组质粒(人工合成) 样本。

3 结果与分析

3.1 多重荧光 RT-PCR 检测方法的建立

将 3 对引物和 3 条探针组合起来, 经过对引物、探针、dNTP、 Mg^{2+} 浓度、*Taq* 酶用量和反应条件进行优化, 最终确定 50 μ L 反应体系, 具体成分为 5 μ L PCR 缓冲液(10 \times), 5 μ L 氯化镁(25 mmol/L), 5 μ L dNTPs(10 mmol/L), 各 0.75 μ L FMDV-3D 引物(15 μ mol/L), 各 1 μ L VSV-N 引物(10 μ mol/L), 各 1 μ L SVDV-VP1 引物(15 μ mol/L), 探针各 1 μ L, 1 μ L *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L), 1 μ L AMV 反转录酶(5 U/ μ L), 各 4 μ L 模板, 12.5 μ L ddH₂O。反应条件为 50 $^{\circ}$ C 2 min, 1 个循环; 95 $^{\circ}$ C 2 min, 1 个循环; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 59 $^{\circ}$ C 35 s, 40 个循环。

3.2 标准曲线的建立

3.2.1 基因拷贝数测定

分别利用针对口蹄疫病毒 3D 蛋白编码基因、水泡性口炎病毒 N 蛋白编码基因及猪水泡病病毒 VP1 蛋白编码基因的特异性引物进行扩增, 构建重组质粒并通过 OD260 测定, 根据阿佛加德罗常数将浓度转换为基因拷贝数, 经测定 pGEM T-3D 基因拷贝数为 1.21×10^{10} copies/ μ L, pGEM T-N 基因拷贝数为 2.14×10^{10} copies/ μ L, pGEM T-VP1 基因拷贝数为 1.68×10^{10} copies/ μ L。

3.2.2 标准曲线

将定量后的质粒进行 10 倍梯度稀释, 选取 5 个浓度梯度用于荧光定量 RT-PCR, 以建立检测的标准曲线。口蹄疫病毒标准曲线方程为 $Y = -2.993 \lg X + 41.718$ (图 1), 水泡性口炎病毒标准曲线方程为 $Y = -2.840 \lg X + 40.800$, 猪水泡病病毒标准曲线方程为 $Y = -2.69 \lg X + 42.2$ 。

3.2.3 特异性试验

分别以口蹄疫病毒 RNA、水泡性口炎病毒 RNA

及猪水泡病病毒 RNA 为阳性对照, 以未感染上述三种病毒的细胞提取的基因组 RNA 作为阴性对照, 以水作为空白对照, 其他病毒如赤羽病毒 RNA、牛白血病病毒 cDNA、牛病毒性腹泻病毒 RNA 及副结核分枝杆菌 DNA 来检测荧光定量 RT-PCR 的特异性, 结果 FMDV、VSV 和 SVDV 均获得特异性扩增, 其他病毒及对照样品均无明显扩增曲线 (图 2)。

3.2.4 多重荧光定量 RT-PCR 方法的灵敏度试验

将重组质粒进行 10 倍系列稀释, 依次为 $1.21 \times 10^0 \sim 1.21 \times 10^6$ copies/ μ L, 进行灵敏度试验。经多次试验后, 确定多重实时荧光 RT-PCR 方法对口蹄疫病毒、水泡性口炎病毒、猪水泡病病毒的最低检测

限分别达到 10^1 copies/ μ L、 10^2 copies/ μ L、 10^2 copies/ μ L, 口蹄疫病毒荧光定量 RT-PCR 的灵敏度试验结果见图 3。

3.2.5 样本检测

收集天津口岸进口奶牛及种猪血清样本 480 份 (牛 400 份, 猪 80 份), 应用本研究所建立的方法及实验室常用的 ELISA 方法同时进行检测。480 份样本经 ELISA 检测全部为阴性, 应用本研究建立的多重荧光 RT-PCR 检测结果也全部为阴性, 与 ELISA 方法的一致性为 100%。另应用本研究所建立方法检测口蹄疫(O 型、A 型、Asia I 型)灭活病毒液各 1 份, 猪水泡病病毒 VP1 基因阳性重组质粒(人工合成)样本, 均为阳性。

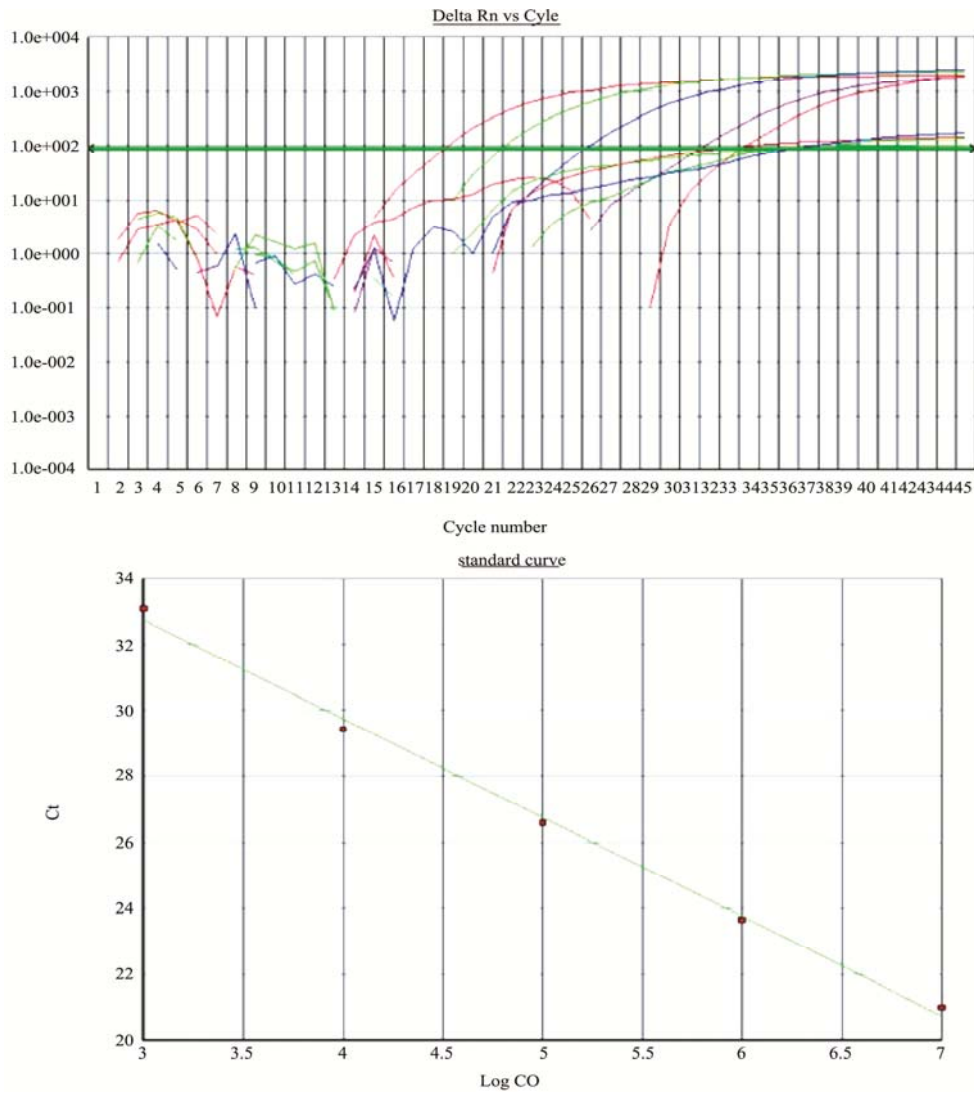


图 1 口蹄疫重组质粒标准曲线
Fig. 1 Standard curve of FMDV recombinant plasmid

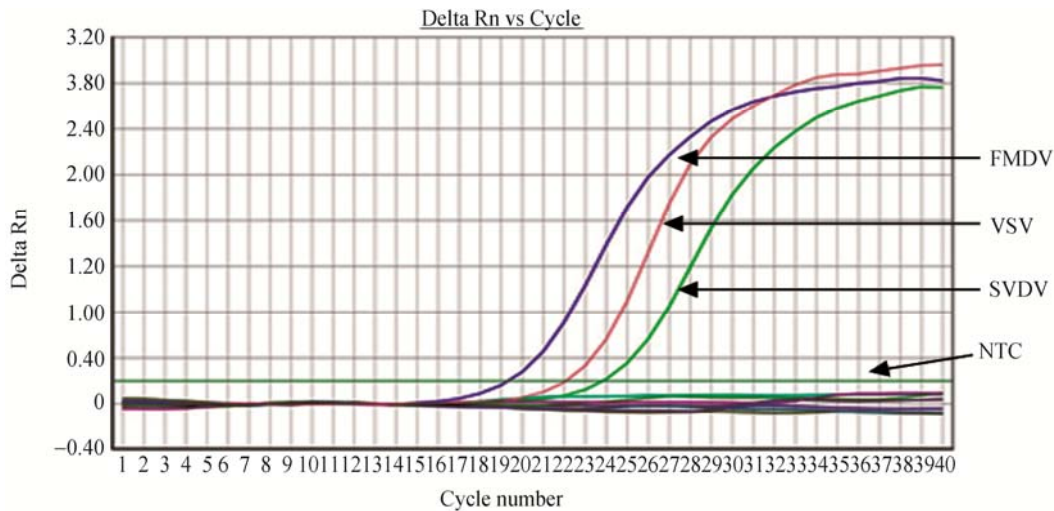


图 2 特异性试验

(样品从左至右分别为: FMDV 1.21×10^8 拷贝、VSV 2.14×10^8 拷贝、SVDV 1.68×10^6 拷贝)

Fig. 2 The specificity test

(Samples from left to right: FMDV 1.21×10^8 copies, VSV 2.14×10^8 copies, SVDV 1.68×10^6 copies, respectively)

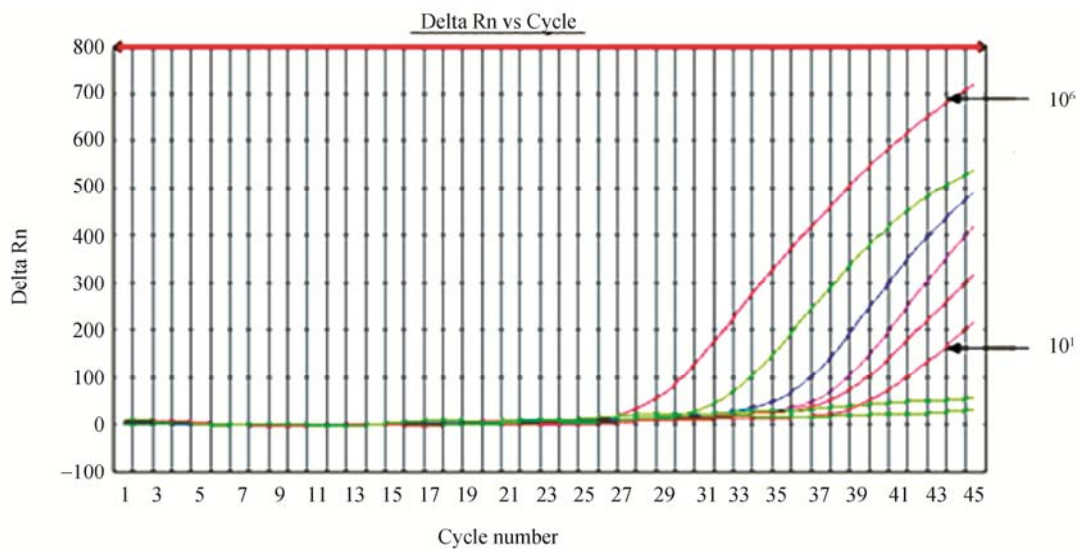


图 3 口蹄疫病毒灵敏度试验

(样品从左至右分别为: 1.21×10^6 、 1.21×10^5 、 1.21×10^4 、 1.21×10^3 、 1.21×10^2 、 1.21×10^1 拷贝)

Fig. 3 Sensitivity test of FMDV

(Samples from left to right: 1.21×10^6 、 1.21×10^5 、 1.21×10^4 、 1.21×10^3 、 1.21×10^2 、 1.21×10^1 copies, respectively)

4 讨论

近几年随着我国经济的高速发展,进口奶牛国内外流通及奶牛饲养规模的不断扩大,动物疫病防治工作正面临着前所未有的压力,快速、高通量检测技术的建立与应用是开展国家动物疫情监测、有效实施风险分析、加强动物疫病管理和进行市场监管的重

要手段。以 PCR 为基础的分子生物学检测技术具有快速、灵敏、特异性强的特点,成为目前多种疫病病原检测的重要手段之一。目前,已见诸多关于口蹄疫病毒、水泡性口炎病毒和猪水泡病病毒检测技术研究的文献报道^[9-12],但尚无稳定、操作性强、能同时鉴别 3 种病毒的多重荧光定量 RT-PCR。

多重 PCR 技术能在同一反应体系中同时检测不

同靶基因, 应用前景广泛。通常多重实时 PCR 体系比较复杂, 各引物探针之间存在相互抑制、竞争以及形成二聚体等复杂问题, 同时不同引物由于扩增效率、探针杂交效率、退火温度的差异, 使多重实时 PCR 的扩增条件摸索比较费时、费力, 需要通过实验反复调整、优化各个引物、探针的浓度及复性条件才能使各基因得到相似的扩增效率和减少非特异性扩增^[13-14]。但多重实时 PCR 使用多对引物和相应的探针, 能在同一个反应体系中对多个目标序列进行荧光检测, 既节约了时间、人力、物力和财力, 又避免了污染, 具有简便、快速、信息量大等特点^[15]。

本研究针对口蹄疫病毒、水泡性口炎病毒和猪水泡病病毒建立的单重实时 RT-PCR 本身就具有很强的特异性和较好的灵敏度, 从模板制备到获得结果不超过 4 h, 缩短了检测时间。在单重实时 PCR 方法基础上建立起来的多重实时 PCR 方法能同时检测出口蹄疫病毒、水泡性口炎病毒和猪水泡病病毒, 使得检测更加简便和高效, 最终实现经过一次多重荧光定量 RT-PCR 同时鉴别三种动物疫病的目的。

参考文献

- [1] Huang H, Yang Z, Xu Q. Recombinant fusion protein and DNA vaccines against foot and mouth disease virus infection in guinea pig and swine [J]. *Viral Immunol*, 1999, 12(1): 1-8.
- [2] Cao SN, Mousa AA, Aboge GO. Prime-boost vaccination with plasmid DNA followed by recombinant vaccinia virus expressing BgGARP induced a partial protective immunity to inhibit *Babesia gibsoni* proliferation in dogs [J]. *Acta Para/Witold Stefański Inst Para, Warszawa, Poland*, 2013, 58(4): 619-623.
- [3] 祁会彩, 龚振华, 杨增岐, 等. 多重 RT-PCR 检测猪口蹄疫病毒、猪水泡病病毒和猪水泡性口炎病毒的研究[J]. *中国动物检疫*, 2006, 23(3): 24-26.
Qi HC, Gong ZH, Yang ZQ, *et al.* Simultaneous detection of foot-and-mouth disease virus, swine vesicular disease virus and vesicular stomatitis virus by multiplex RT-PCR [J]. *China J Anim Quar*, 2006, 23(3): 24-26.
- [4] Zheng M, Jin N, Zhang H. Construction and immunogenicity of a recombinant fowlpox virus containing the capsid and 3C protease coding regions of foot-and-mouth disease virus [J]. *J Virol Method*, 2006, 136(1-2): 230-237.
- [5] Reid SM, Ferris NP, Hut Chings GH, *et al.* Evaluation of real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays for the detection of swine vesicular disease virus [J]. *J Virol Method*, 2004, 116: 169-176.
- [6] Carrillo C, Tulman ER, Delhon G, *et al.* Comparative genomics of foot- and-mouth disease virus [J]. *J Virol*, 2005, 79(10): 6487-6504.
- [7] 韩春来. 三种食源性致病菌多重荧光 PCR 检测方法的建立[J]. *水禽世界*, 2011, (8): 11-14.
Han CL. Establishment of multiplex real-time method for detection of three foodborne pathogens [J]. *Poul Sci*, 2011, (8): 11-14.
- [8] 王慧, 朱瑞良, 谭燕玲, 等. 多重 PCR 检测三种重要食源性致病菌方法的建立及应用[J]. *中国农业科学*, 2011, 44: 11-15.
Wang H, Zhu RL, Tan YL, *et al.* Establishment and application of multiple PCR for diagnosing proteus mirabilis, salmonella and listeria monocytogenes [J]. *Scientia Agric Sinica*, 2011, 44: 11-15.
- [9] Fang X, Zhang S, Sun X. Evaluation of attenuated VSVs with mutated M or/and G proteins as vaccine vectors [J]. *Vaccine*, 2012, 30(7): 1313-1321.
- [10] 许建明, 段向英, 张念之, 等. 三重实时荧光 RT-PCR 检测三种鱼类弹状病毒的研究[J]. *检验检疫科学*, 2009, 19(1): 5-10.
Xu JM, Duan XY, Zhang NZ, *et al.* Triplex real-time RT-PCR assay for simultaneous detection of three fish rhabdoviridae viruses [J]. *Insp Quar Sci*, 2009, 19(1): 5-10.
- [11] Tomás G, Hernández M, Marandino A, *et al.* Development and validation of a TaqMan-MGB real-time RT-PCR assay for simultaneous detection and characterization of infectious bursal disease virus [J]. *J Virol Method*, 2012, 185(1): 101-107.
- [12] Lomakina NF, Fallacara F, Pacciarini M, *et al.* Application of universal primers for identification of Foot-and-mouth disease virus and swine vesicular disease virus by PCR and PCR-ELISA [J]. *Arch Virol*, 2004, 149(6): 1155-1170.
- [13] Rasmussen TB, Uttenthal A, Agüero M. Detection of three porcine vesicular viruses using multiplex real-time primer-probe energy transfer [J]. *J Virol Method*, 2006, 134(1-2): 176-182.
- [14] Martín-Acebes MA, González-Magaldi M, Rosas MF, *et al.* Subcellular distribution of swine vesicular disease virus proteins and alterations induced in infected cells: a comparative study with foot-and-mouth disease virus and vesicular stomatitis virus [J]. *Virology*, 2008, 374(2): 432-443.
- [15] McMenamy MJ, McKillen J, Reid SM, *et al.* Development of a minor groove binder assay for real-time one-step RT-PCR detection of swine vesicular disease virus [J]. *J Virol Method*, 2011, 171(1): 219-224.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



王乃福, 兽医师, 主要研究方向为动物疫病诊断技术。

E-mail: wangnf@tjciq.gov.cn