

猪痘病毒 PCR 检测方法的建立及应用

张文波 蒋新华 冷 闯 邓舜洲*

(江西农业大学 动物科学技术学院 江西 南昌 330045)

摘要: 建立猪痘病毒 (swinepox virus, SWPV) 的 PCR 检测方法, 为 SWPV 的流行病学调查和临床诊断提供可靠技术支持。参考 GenBank 登录的 SWPV (AF410153.1) 基因组序列, 设计合成 1 对引物, 扩增目的片段为 975 bp。以 SWPV 江西分离株 SWPV-JX01 为模板, 对反应条件进行优化, 建立了 SWPV 的 PCR 诊断方法。特异性、敏感性和重复性试验表明, 该方法对临床上常见的其它猪病毒检测结果均为阴性; 对模板的最低检测量为 2.7 pg; 具有良好的重复性。用此方法检测 50 份疑似猪痘的临床样品, 其中阳性率为 80.2%。该方法敏感度高, 重复性和特异性良好, 可用于猪痘病毒的分子流行病学调查和临床病例的诊断。

关键词: 猪痘病毒; PCR; 猪痘

中图分类号: S852.65+9.1 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)04-0781-05

Development and Application of a PCR Assay for Detection of Swinepox Virus

ZHANG Wen-bo, JIANG Xin-hua, LENG Chuang, DENG Shun-zhou

(College of Animal Science and Technology, JAU, Nanchang 330045, China)

Abstract: A detection method for Swinepox Virus (SWPV) with PCR technique was established as a reliable technological means for epidemiological investigation and clinical diagnosis of SWPV. A pair of primers were designed according to the genome of SWPV to develop a PCR assay for detection of SWPV, the length of the product was 975 bp. The SWPV strain isolated from Jiangxi Province (SWPV-JX01) was taken as templates. The PCR detection method for SWPV was finally established under optimal reaction conditions. The tests for the specificity, sensitivity and repeatability of the PCR assay were conducted, the results indicated that all were negative to the optimal examination method on other pig viruses and the necessary dose of templates of the assay was 2.7 pg. 50 clinical samples, which were suspected SWPV syndrome from Jiangxi Province, were analysed by the method, the result showed that 80.2% samples (41/50) were SWPV positive. The PCR detection method established in this study has the characteristics of sensitivity, high specificity and good repeatability, may be used in molecular epidemiological investigation and rapid clinical diagnosis of SWPV.

Key words: swinepox virus; PCR; swinepox

猪痘病毒 (swinepox virus, SWPV) 在分类上属于脊椎动物痘病毒亚科猪痘病毒属唯一成员。是引起猪痘 (swinepox, SWP) 的主要病原, 以引起猪的发热、外表皮肤起水泡、形成痘疹和结痂为特征, 对 3 月

收稿日期: 2012-05-01 修回日期: 2012-06-04

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31160498/C1803)

作者简介: 张文波 (1972—), 男, 讲师, 博士, 主要从事动物传染病与免疫学研究, E-mail: hnzwb22@163.com; * 通

讯作者: 邓舜洲, 副教授, 博士, E-mail: shzhdeng@163.com。

龄以内的仔猪危害较大,成年猪很少发生或症状轻微,可通过猪虱等叮咬机械传播,并与饲养卫生条件差有关^[1]。具有严格的宿主特异性,猪是该病毒的唯一感染宿主,1842年由 Spinola 首次在欧洲发现并报道;2011年, Maria Luiza G 等报道 SWP 在巴西爆发^[2],目前 SWP 呈世界性分布。

SWPV 的成熟病毒粒子呈砖形或椭圆形,有囊膜,是最大型病毒,在水平方向大小约为 320 nm × 240 nm。病毒粒子由一个中央双侧凹陷的核,两个横向的椭圆体和至少两层质膜组成^[3]。SWPV 的基因组约为 146 kb 的双股 DNA,含有 150 个阅读框(ORF),A+T 含量为 72.5%,和其它种属的痘病毒一样,包含一个 139 023 bp 的保守中心基因编码区,该基因区域含有病毒复制和感染的必需基因,包括毒力、宿主范围和组织嗜性的有关基因^[4]。基因组的末端有 2 个反向末端重复序列(Identical inverted terminal repeat, ITR),功能可能与调节或逃逸宿主的免疫应答、调节或抑制宿主细胞凋亡、细胞和组织嗜性等有关^[5]。

我国已有猪群中发生猪痘的少量报道,但仅限于临床诊断或动物感染试验,均未见通过分子生物学手段从病原学角度确诊^[6-8]。本试验旨在利用 PCR 反应对 SWPV 基因进行扩增,建立一种快速、准确检测 SWPV 的 PCR 方法,以为江西省 SWPV 感染的分子流行病学调查及快速诊断提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 引物设计与合成 根据 GenBank 中登录(登录号: AF410153.1)的 SWPV 基因组序列,设计 1 对引物。引物序列如下:

SP1: 5'-CCGGAATTCATGACGACGCCTCAAAAAGAAATCG-3'。

SP2: 5'-CCCTCGAGTTATACAATATACGTGAATCCTATTCC-3', 扩增片段大小为 975 bp。

1.1.2 SWPV 江西分离株(SWPV-JX01) 本实验室分离鉴定。

1.1.3 待检病料 疑似猪痘病猪皮肤痘痂,采自江西省部分规模化猪场。

1.1.4 主要试剂 Taq DNA 聚合酶等均购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 SWPV DNA 的提取 以分离的毒株 SWPV-JX01 株接种 PK15 单层细胞,盲传 3 代,收集第 3 代细胞培养液 600 μL,反复冻融 3~4 次;加入 5 μL 蛋白酶 K 56 °C 消化 2 h;再加入等体积的 Tris 平衡酚,轻轻反复颠倒混匀 10 min,室温 12 000 r/min 离心 10 min;吸取上清转移到新的离心管中,加入等体积的苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)重复上述抽提步骤;转移上清到新的离心管中,加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1)重复上述抽提步骤;向最后获得的上清液中加入 2 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA,室温 12 000 r/min 离心 10 min,再用 500 μL 70% 乙醇洗涤 1 次;轻轻弃去无水乙醇,自然风干 2 min,加入 50 μL 灭菌的去离子水溶解。用紫外分光光度计测量核酸的浓度,重复测量 3 次取平均值,-20 °C 保存备用。

1.2.2 PCR 以提取的基因组 DNA 为模板,进行 PCR。反应体系为 50 μL,其中含 10 × EasyTaq Buffer 5 μL,5 U/μL 的 DNA 聚合酶 0.5 μL,2.5 mmol/L dNTPs 4 μL,20 μmol/L 的上、下游引物各 0.5 μL,模板 2 μL,ddH₂O 37.5 μL。

扩增条件为:95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 45 s,54 °C 复性 1 min,72 °C 延伸 1 min,共 30 个循环;最后 72 °C 延伸 8 min。

1.2.3 特异性试验 按文献^[9-10]方法提取猪痘病毒(SWPV-JX01)、伪狂犬病毒(PRV)、圆环病毒(PCV)、流行性乙型脑炎病毒(JEV)阳性病料和正常 PK15 细胞的 DNA,猪痘病毒(SFV)、猪流行性腹泻病毒(PEDV)和猪繁殖与呼吸综合症病毒(PRRSV)阳性病料的 RNA。以 SP1/SP2 为引物进行 PCR 或 RT-PCR。

1.2.4 敏感性实验 取 SWPV 细胞培养液 600 μL,提取病毒 DNA,用紫外分光光度法定量后,将 DNA 做 10 倍比稀释,每个稀释度取 2 μL DNA 稀释液作为模板,按 1.2.2 体系及方法进行 PCR 扩增,验证本方法的敏感性。

1.2.5 重复性实验 以建立的 PCR 对猪痘病毒(SWPV-JX01)进行重复性试验,重复检测 3 次,以验证 PCR 方法的重复性。

1.2.6 临床样品的检测 从江西省各地区规模化猪场收集 50 份疑似猪痘病毒感染的病料(病猪背部和腹部外侧皮肤呈现数量不等、突出皮肤表面、直径 0.5 ~ 2.0 cm 的丘疹或结痂,采集其皮肤或结痂),加入灭菌生理盐水,匀浆器匀浆后 12 000 r/min 离心 10 min 取上清,按 1.2.1 操作提取 DNA 用作模板。按 1.2.2 的方法进行 PCR 检测。

2 结果

2.1 PCR 检测方法的建立

以纯化的猪痘病毒(SWPV-JX01)株 DNA 为模板,SP1 和 SP2 作为引物进行扩增,选择不同的退火温度做对比试验。结果,在退火温度为 54 °C 时可扩增到 1 条大小约 975 bp 的条带(图 1)。将 PCR 产物送 Invitrogen(上海)公司测序。测序结果与 GenBank 中登录的 SWPV P35 基因序列同源率为 98%(图 2)。

2.2 特异性试验

以建立的 PCR 方法对猪常见病毒性疾病的阳性病料进行检测,结果表明只有 SWPV-JX01 产生特异性扩增(图 3)。

2.3 敏感性试验

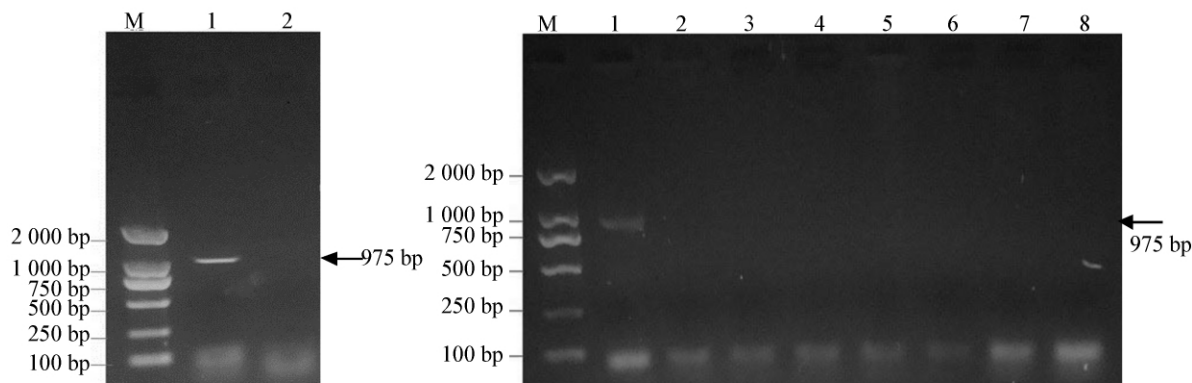
将测定浓度后的病毒 DNA 进行 10 倍比稀释,在相同的反应体系和反应条件下进行 PCR 扩增,结果显示在稀释至 10^{-5} 仍可见特异性扩增条带,即在此 PCR 反应中模板的最低检测量为 2.7 pg(图 4)。

2.4 重复性试验

用该方法对 SWPV-JX01 DNA 进行 3 次重复性检测,结果完全一致,说明本方法重复性好(图 5)。

2.5 临床样品的检测

用此方法对 50 份采自江西省不同地区疑似猪痘的猪皮肤结痂进行 PCR 检测,结果检测 41 份为阳性,阳性率为 80.2%。



M: Trans2K DNA Marker; 1: SWPV-JX01;

2: 正常 PK15 细胞对照。

M: Trans2K DNA Marker; 1: SWPV-JX01

genomic DNA; 2: PK15 cell as negative control.

图 1 SWPV PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR Amplification of SWPV

M: Trans2K DNA Marker; 1: SWPV-JX01;

2-8: 正常 PK15 细胞、PRV、PCV、JEV、SFV、PEDV、PRRSV。

M: Trans2K DNA Marker; 1: SWPV-JX01;

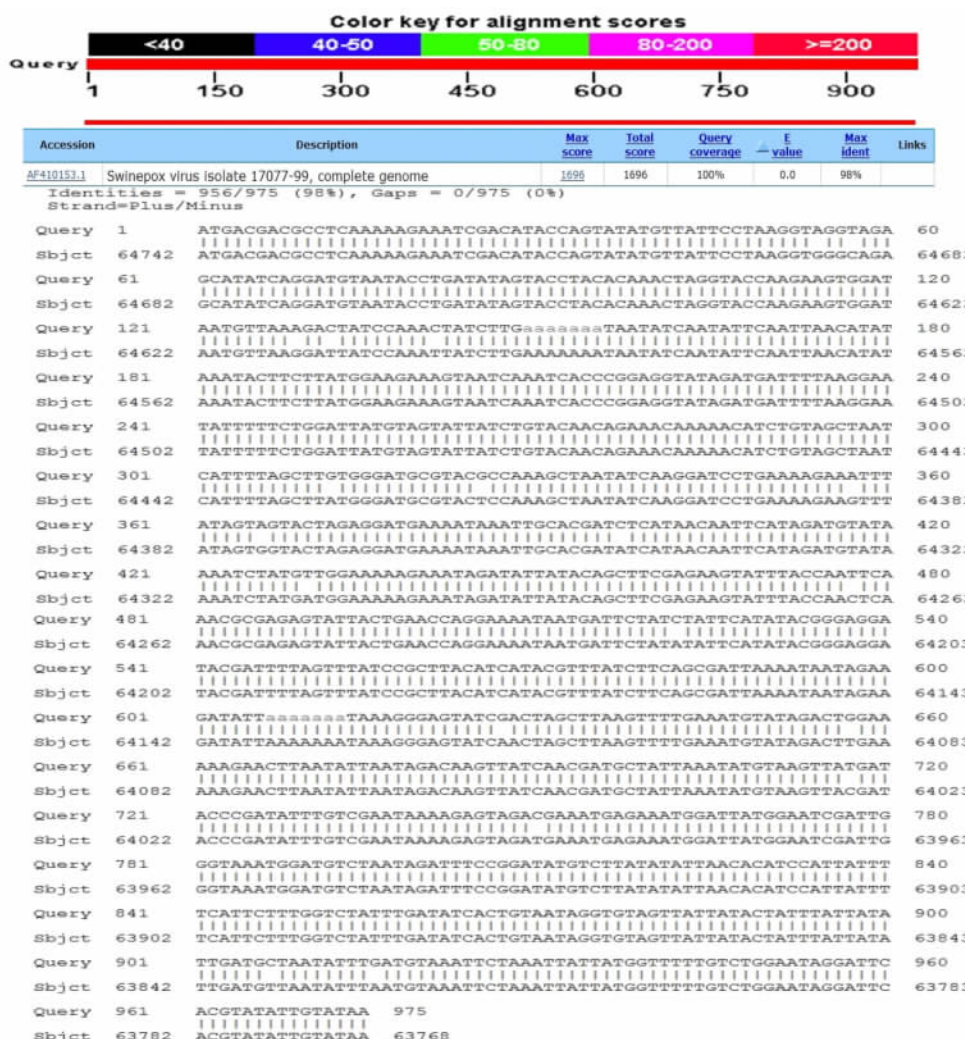
2-8: PK15 cell, PRV, PCV, JEV, SFV, PEDV and PRRSV.

图 3 PCR 特异性试验

Fig. 3 Specificity test of PCR

3 讨论

临床上导致猪皮肤发生痘疹症状的病原主要有猪痘病毒和痘苗病毒(vaccinia virus, VV)^[11]。VV 的感染主要是通过人群感染天花或接种天花疫苗而传播给当地猪群,自从消灭了天花以后停止使用痘苗免疫后,由 VV 引起的 SWP 很少,但猪仍有感染痘苗病毒的可能^[12]。痘苗病毒感染猪也能引起猪皮肤痘疹的发生,临床症状非常相似,单从临床症状上很难与 SWPV 感染进行区分。猪痘病毒具有严格的宿主特异性,自然条件下只感染猪;实验可感染家兔,但不会在兔体内复制^[13];分离培养时只能在猪源细胞中复制,不能用鸡胚和其它动物源的细胞培养。而 VV 的宿主谱和细胞感染谱非常广。而且有

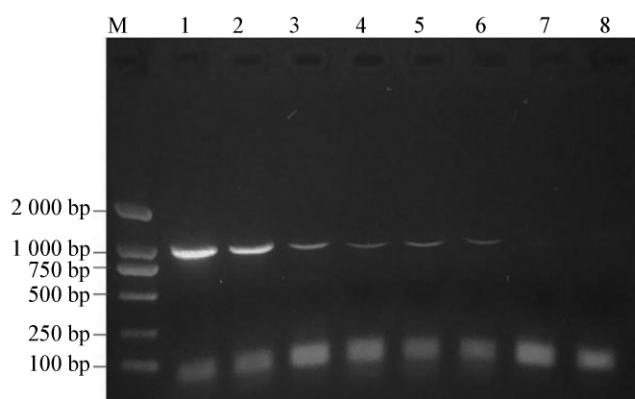


Query: PCR 产物的核苷酸序列; sbjct: Swinepox virus isolate 17077 - 99 基因组序列。

Query: The nucleotide sequence of the PCR products; sbjct: Swinepox virus isolate 17077 - 99 complete genome.

图 2 PCR 产物核苷酸序列的 BLAST 结果

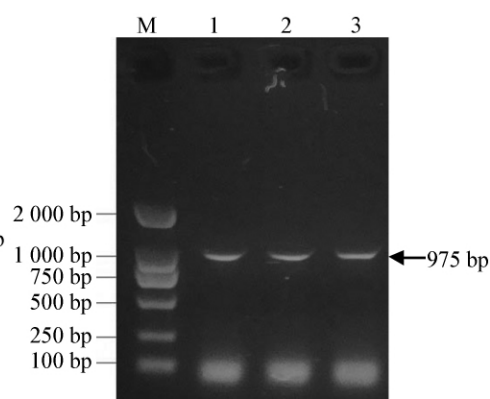
Fig. 2 BLAST results of the nucleotide sequences of the PCR products



M: Trans2K DNA Marker;
1 - 8: DNA 模板浓度依次为 $10^0 - 10^{-7}$ 。
M: Trans2K DNA Marker;
1 - 8: DNA template dilutions from 10^0 to 10^{-7} 。

图 4 PCR 敏感性试验

Fig. 4 Sensitivity test of PCR



M: Trans2K DNA Marker;
1 - 3: SWPV - JX01 3 次重复检测。
M: Trans2K DNA Marker;
1 - 3: Repeated detection 3 times.

图 5 PCR 重复性试验

Fig. 5 Repeatability test of PCR

研究表明,猪痘病毒和 VV 在血清学上没有相关性^[14]。因此,利用动物接种试验、鸡胚接种、细胞培养和血清学试验等方法可进行鉴别诊断。但这些方法均存在实验周期长、费用高等缺点,很难推广应用。PCR 检测技术以其快速、准确、操作方便等优点,已被广泛地应用于各种动物病原的检测,而国内还未见用于猪痘相关病原的研究报道。目前国内部分猪场出现猪痘病,感染率较高,病死率不高,但会影响猪群的生长和增加对其它病原感染的风险,同时在一些疫病的病情中扮演重要的角色。所以,建立快速、准确的 SWPV 诊断方法,对防控该病有着重要的实际意义。

猪痘病毒的基因组测序已经完成,与其它痘病毒的基因组进行比较的结果表明,SWPV 的基因比较特殊,虽大部分基因有相关性,但只是推测的蛋白功能相似,核苷酸序列相差较大。本试验在对 SWPV 和其它痘病毒的基因比较中发现,SWPV P35 基因编码的 P35 蛋白在功能上与羊痘病毒(sheepox virus SPV)的 P32 蛋白和 VV 的 H3L 编码蛋白相似;核苷酸序列分析表明,3 者的核苷酸序列同源非常低,与 Olivia Carulei 的研究结果基本一致^[15]。SPV 的 P32 基因在所有分离株中高度保守,且编码的 P32 蛋白在病毒吸附、成熟病毒粒子的组装、病毒毒力、免疫原性方面发挥着重要作用^[16],因而对该基因及其编码蛋白的研究已成为 SPV 的热点之一。根据 SPV 和 VV 相关研究结果,推测 SWPV 的 P35 也具有相似的作用。所以,本试验选用 SWPV 的 P35 作为研究的靶标。

本试验根据 GenBank 中唯一的 SWPV 全基因组序列,设计 1 对可用于克隆全长 P35 基因的引物,通过优化条件,建立检测 SWPV 的 PCR 方法。序列测定表明,扩增的序列片段与 GenBank SWPV 中相对应的序列同源性在 98%,而与其它痘病毒的序列同源性非常低(Blast 比较结果中不显示),说明扩增的序列是 SWPV 的特异性基因序列;特异性、重复性和敏感性试验结果表明,该方法具有良好的特异性、敏感性;对临床可疑样本进行检测,效果较好。另外作为临床检测,本试验建立的 PCR 检测方法对模板的要求很低,采样过程简单方便,只需刮取猪体外表皮肤少量痘痂组织即可使用,采完样后对猪体皮肤表面进行简单消毒即可,对病猪无太大影响,也无须进行剖检采样。因此该建立的 PCR 检测 SWPV 方法具有较高的实用价值,可用于 SWPV 的分子流行病学调查、快速检测。

参考文献:

- [1] Barbara E Straw. Diseases of swine [M]. 9th ed. Ames (IA): Iowa State University Press 2006: 483-487.
- [2] Medaglia M L, Pereira Ade C, Freitas T R, et al. Swinepox virus outbreak, Brazil, 2011 [J]. Emerg Infect Dis 2011, 17 (10): 1976-1978.
- [3] Stephen C Harrison, Bruce Alberts et al. Discovery of antivirals against smallpox [J]. PNAS 2004, 101(31): 11178-11192.
- [4] Afonso C L, Tulman E R, Lu Z et al. The genome of swinepox virus [J]. Journal of Virology 2002, 76(2): 783-790.
- [5] 芦晓立, 张强, 颜新敏. 猪痘病毒研究进展 [J]. 畜牧与饲料科学 2012, 33(2): 91-99.
- [6] 孙坤林, 张俊, 魏居正. 猪痘临床调查 [J]. 中国兽医杂志, 1997, 23(9): 3.
- [7] 陈杰, 黄海晖. 仔猪猪痘与大肠杆菌混合感染 [J]. 中国兽医杂志 2004, 40(9): 56-57.
- [8] 黎丽, 俞宁, 何刚. 猪痘的诊断与防治 [J]. 畜牧与饲料科学 2009, 30(7/8): 60-61.
- [9] 张序, 蒋新华, 张文波, 等. 猪戊型肝炎病毒 RT-nPCR 检测方法的建立及应用 [J]. 江西农业大学学报 2011, 33(1): 107-111.
- [10] Sambrook J, Russell D. Molecular cloning: A laboratory manual [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001.
- [11] Massung R F, Moyer R W. The molecular biology of swinepoxvirus (II): The infectious cycle [J]. Virology, 1991, 180(1): 355-364.
- [12] Megid J, Borges I A, Abrahao J S, et al. Vaccinia virus zoonotic infection, Sao Paulo State, Brazil [J]. Emerging Infectious Diseases 2012, 18(1): 189-191.
- [13] Bórcena J, Blasco R. Recombinant swinepox virus expressing beta-galactosidase: Investigation of viral host range and gene expression levels in cell culture [J]. Virology, 1998, 243(2): 396-405.
- [14] Myskiw C, Arsenio J, Hammett C et al. Comparative analysis of poxvirus orthologues of the vaccinia virus E3 protein: Modulation of protein kinase R activity, cytokine responses, and virus pathogenicity [J]. J Virol 2011, 85(23): 12280-12291.
- [15] Olivia Carulei, Nicola Douglass, Anna-Lise Williamson. Phylogenetic analysis of three genes of Penguinpox virus corresponding to Vaccinia virus G8R(VLTF-1), A3L(P4b) and H3L reveals that it is most closely related to Turkeypox virus, Ostrichpox virus and pigeonpox virus [J]. Virology Journal 2009, 6(52): 1-5.
- [16] Bhanot V, Balamurugan V, Bhanuprakash V et al. Expression of P32 protein of goatpox virus in Pichia pastoris and its potential use as a diagnostic antigen in ELISA [J]. J Virol Methods 2009, 162(1/2): 251-257.