

猪戊型肝炎病毒 RT-nPCR 检测方法的建立及应用

张序, 罗火亮, 张文波*, 邓舜洲

(江西农业大学 动物科学技术学院, 江西 南昌 330045)

摘要: 建立猪戊型肝炎病毒(Swine Hepatitis E Virus, SHEV) RT-PCR 检测方法, 为 SHEV 的流行病学调查、临床诊断提供可靠的技术手段。根据 SHEV 的基因组序列, 设计并合成 2 对引物, 以 SHEV 江西分离株 SHEV-JX-1 为模板, 对反应条件进行了优化, 建立了诊断 SHEV 的 RT-PCR 方法。该方法可从 SHEV-JX-1 中扩增出 230 bp 的片段, 测序结果表明为 SHEV IV 型基因片段; 对猪的其它病毒进行检测结果均为阴性; 能检测出 2.5×10^{-8} μg 的 SHEV RNA; 对江西部分猪场采集的胆汁及肠容物进行检测, 结果胆汁中的阳性率为 10%, 肠容物的阳性率为 4%。实验建立的 RT-PCR 方法具有敏感、特异、重复性好的特点, 可用于 SHEV 的分子流行病学调查和临床快速诊断。

关键词: 猪戊型肝炎病毒; RT-PCR

中图分类号: S858.28 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)01-0107-05

Establishment and Application of RT-nPCR Detection of Swine Hepatitis E Virus

ZHANG Xu, LUO Huo-liang, ZHANG Wen-bo*, DENG Shun-zhou

(School of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: A detection method for Swine Hepatitis E Virus (SHEV) with RT-PCR technique was established as a reliable technological means for epidemiological investigation and clinical diagnosis of SHEV. Two pairs of primers were designed and synthesized according to SHEV's genome sequence. The SHEV strain isolated from Jiangxi Province, SHEV-JX-1, was taken as templates. The RT-PCR detection method for SHEV was finally established with optimal reaction conditions. 230 bp fragment amplified from SHEV-JX-1 through the above method was part of SHEV IV gene. It was all negative to the results of the optimal examination method on other pig viruses. The established RT-PCR technique could identify 2.5×10^{-8} μg RNA of SHEV. Applied to testing some pig bile and intestinal contents collected from several pig farms in Jiangxi Province, the positive rates were 10% and 4%, respectively. The RT-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 SHEV.

Key words: swine hepatitis E virus; RT-PCR

收稿日期: 2010-09-14 修回日期: 2010-12-08

基金项目: 江西省教育厅科学技术研究项目(赣教技字[GJJ08189]号)

作者简介: 张序(1985—)男, 硕士生, 主要从事预防兽医学研究, E-mail: zhangxu_0143@163.com; * 通讯作者, 张文波, 副教授, 博士。

猪戊型肝炎病毒(Swine Hepatitis E Virus, SHEV) 为无囊膜的单股正链 RNA 病毒,直径为 27 ~ 32 nm,表面粗糙,呈不规则球形^[1];是引起猪戊型肝炎的病原体。在我国猪的感染是一个普遍现象。报道显示,在我国的北京、上海、湖北、江西、浙江、新疆、长春、福建等 20 多个省均有不同程度的猪戊型肝炎感染情况^[2-7]。而且越来越多的研究表明猪源 HEV 与人源 HEV 基因组具有很高的同源性。因此猪戊型肝炎也被认为是人畜共患性疾病^[8-9]。此外,猪也是异种器官移植的良好供体,随着异种器官移植的不断增多,人被感染 SHEV 的风险性就会加大。

本实验根据 SHEV 的基因组序列,设计二对引物,通过优化反应条件,建立了 SHEV 的 RT-PCR 诊断方法,并对临床采集的病料进行检测,以期对江西省 SHEV 感染的分子流行病学调查及快速诊断提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 引物设计与合成 以 GenBank 登录(登录号: DQ450072.1)的 SHEV 基因组序列,设计 2 对引物。引物序列如下:

$P_1: 5' - CCGACAGAATTGATTTGTCGGC - 3'$, $P_2: 5' - CCGTARGTCGACTGGTCGTACTC - 3'$; $P_3: 5' - GTYGTCTCRGCCAATGCCGAGCC - 3'$; $P_4: 5' - KCGGCRGCGGTRAGRCARAGCCA - 3'$ 。

扩增片段大小为 230 bp。

1.1.2 猪 HEV 江西分离株(SHEV-JX1) 本实验室分离鉴定。

1.1.3 待检病料 胆汁 50 份及肠内容物 50 份 采自江西省不同地区规模化猪场 编号为 D1 ~ D50、C1 ~ C50。

1.1.4 主要试剂 RNA 提取试剂 TRNzol 及 PCR 试剂购至北京天根生物有限公司、反转录酶(AMW)及反转录试剂为 Promage 公司产品。

1.2 SHEV RNA 的提取

取 SHEV 细胞培养物 200 μ L;加 800 μ L TRNzol,剧烈振荡 15 s,室温静置 3 min;加 160 μ L 氯仿,剧烈振荡 15 s,室温静置 3 min;4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 10 min,将上层水相转移到新的离心管中;加入等体积的异丙醇,混匀,冰上放置 20 ~ 30 min;4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 10 min,弃上清;加 800 μ L φ (乙醇) = 75% (DEPC 处理过的水配制);4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 10 min,弃上清,室温放置晾干;加入 30 μ L RNase-free ddH₂O 溶解 RNA。

1.3 RT-nPCR

1.3.1 RT 5 \times RT Buffer 4 μ L, dNTP (25 mmol/ μ L) 3 μ L, 下游引物 2 μ L, RNasin 0.5 μ L, AMV 1 μ L, RNA 模板 10 μ L, 42 $^{\circ}$ C 下水浴 1 h, 95 $^{\circ}$ C 灭活 5 min, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3.2 PCR 第 1 轮 PCR: 10 \times PCR MIX 12.5 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L, cDNA 模板 5 μ L, 加 ddH₂O 至总体积 25 μ L; 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 45 s, 54 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

第 2 轮 PCR: 以第 1 轮 PCR 产物作 1 000 倍稀释,取 2 μ L 作 PCR 模板,其它条件均同第 1 轮 PCR。

第 2 轮 PCR 产物以质量分数为 1% 琼脂糖凝胶电泳观察。

1.4 特异性实验

以文献操作提取猪戊型肝炎病毒(SHEV-JX)、猪瘟病毒(SF)、蓝耳病毒(PRRS)、高致病性蓝耳病毒(HPPRS)阳性病料和正常猪胆汁的 RNA,伪狂犬病毒(PRV)、圆环病毒(PCV)、流行性乙型脑炎病毒(JEV)阳性病料的 DNA。以 P_1/P_2 、 P_3/P_4 为引物进行 PCR 或 RT-nPCR。

1.5 敏感性实验

将纯化的猪戊型肝炎病毒(SHEV-JX) RNA,用紫外分光光度法定量后,取 2.5 μ g 进行倍比稀释($10^0 \sim 10^{-8}$),进行 RT-nPCR 扩增。

1.6 重复性实验

以本实验室建立的 RT-nPCR 对猪戊型肝炎病毒(SHEV-JX)以及阴性猪胆汁进行重复性实验检测,每组样品重复 3 次。

1.7 样品的初步检测

从江西省各规模化猪场收集的 50 份肠容物和 50 份胆汁,提取 RNA,RT-nPCR 检测。

2 结 果

2.1 RT-nPCR 检测方法的建立

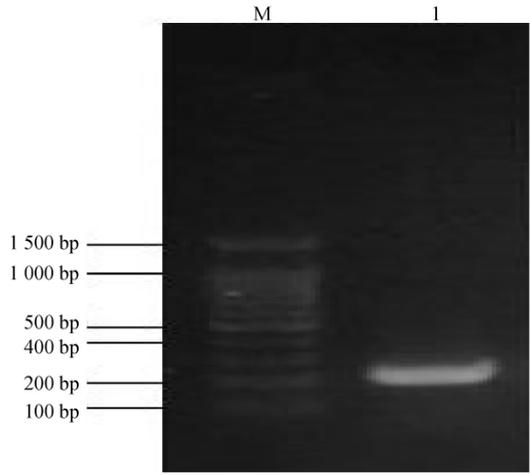
以纯化的猪戊型肝炎病毒(SHEV-JX)株 RNA 为模板,P₂作反转录引物进行反转录;引物 P₁/P₂、P₃/P₄扩增 cDNA;并选择不同退火温度做对比实验。结果,在退火温度为 54℃ 时可扩增到 1 条大小约 230 bp 的条带。测序结果表明,扩增的条带是猪戊型肝炎病毒 IV 型的特异性序列(图 1)。

2.2 特异性试验

以建立的 RT-nPCR 对猪常见病毒病的阳性病料进行检测,结果表明本方法只对猪戊型肝炎病毒(HEV)产生特异性扩增(图 2)。

2.3 敏感性试验

SHEV RNA 定量后做 10 倍系列稀释(2.5×10^{-1} 、 2.5×10^{-2} 、 2.5×10^{-3} 、 2.5×10^{-4} 、 2.5×10^{-5} 、 2.5×10^{-6} 、 2.5×10^{-7} 、 2.5×10^{-8} μg),以已建立的方法分别扩增。结果,RNA 浓度为 2.5×10^{-8} μg 时,本方法仍能扩增到条带(图 3)。

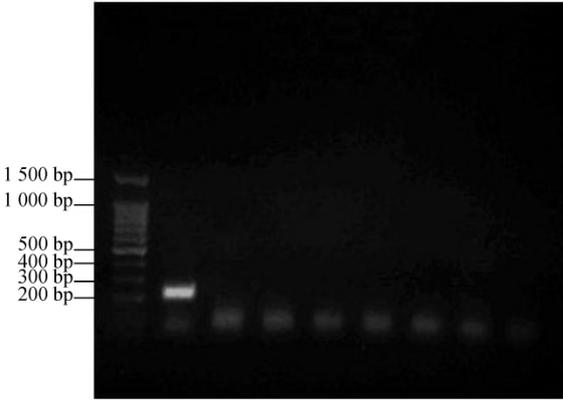


M: 100 bp DNA Ladder; 1: SHEV-JX 株 RNA。
M: 100 bp DNA Ladder; 1: SHEV-JX genomic RNA.

图 1 RT-nPCR 方法可行性分析

Fig. 1 The results of RT-nPCR feasibility

M 1 2 3 4 5 6 7 8



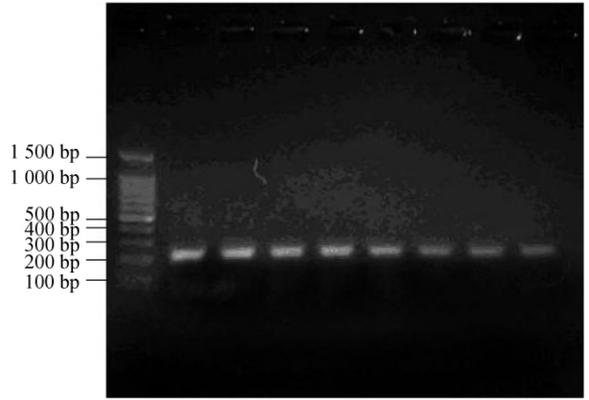
M: 100 bp DNA Ladder; 1~8 为: SHEV-JX、SF、PRRS、HPPRRS、正常猪胆汁、PRV、PCV、JEV。

M: 100 bp DNA Ladder; 1~8: SHEV-JX、SF、PRRS、HPPRRS、Normal pig bile、PRV、PCV、JEV。

图 2 RT-nPCR 方法特异性分析

Fig. 2 The results of RT-nPCR specificity

M 1 2 3 4 5 6 7 8



M: 100 bp DNA Ladder; 1~8 为: SHEV-JX 株 RNA 2.5×10^{-1} 、 2.5×10^{-2} 、 2.5×10^{-3} 、 2.5×10^{-4} 、 2.5×10^{-5} 、 2.5×10^{-6} 、 2.5×10^{-7} 、 2.5×10^{-8} μg 检测结果。

图 3 RT-nPCR 方法敏感性分析

Fig. 3 The results of RT-nPCR sensitivity

2.4 重复性试验

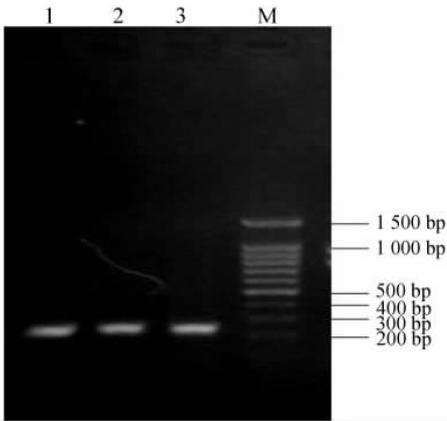
用该方法对 HEV RNA 进行 3 次重复检测,结果完全一致,说明本方法重复性良好(图 4)。

2.5 样品检测

对收集的粪便和胆汁进行检测,结果表明,粪便的阳性率为 4%,胆汁的阳性率为 10%(图 5)。

3 讨 论

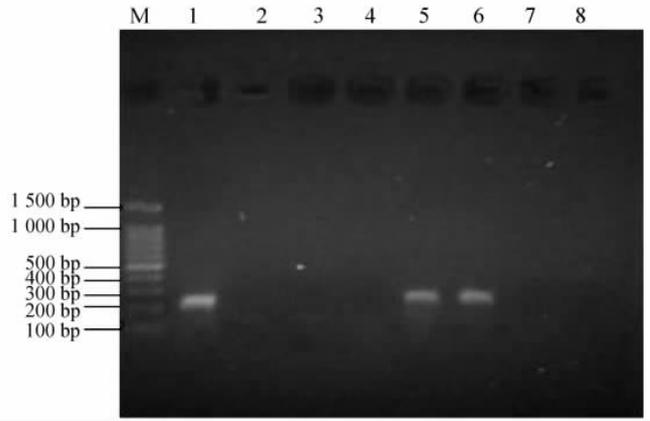
由于 SHEV 感染多呈隐性感染,并可在混合感染中加重病情,但无明显戊型肝炎症状,因此判断猪



M: 100 bp DNA Ladder;
1 ~ 3: SHEV - JX 株 RNA。
M: 100 bp DNA Ladder;
1 ~ 3: SHEV - JX genomic RNA。

图4 RT - nPCR 方法重复性分析

Fig. 4 The results of RT - nPCR repeatability



M: 100 bp DNA Ladder;
1 ~ 4: 肠内容物样品; 5 ~ 8: 胆汁样品。
M: 100bp DNA Ladder;
1 ~ 4: Intestinal content; 5 ~ 8: Bile。

图5 样品检测

Fig. 5 The results of RT - nPCR repeatability

是否感染 HEV 主要通过实验室手段来确认。目前用于 SHEV 的检测方法主要有免疫电泳法、免疫荧光法、传统 PCR 法、real - time RT - PCR 法、原位杂交法、ELISA 法、血清中和法、免疫印记法等^[10]。免疫电泳法与免疫荧光法稳定性差且灵敏度低;传统 PCR 法假阳性率高;real - time PCR 法灵敏度高但成本高,难以在基层推广应用;原位杂交法虽可精确定位病毒或其 RNA 组分,但也存在操作复杂的缺点;检测血清 HEV 抗体的 ELISA 试剂盒,其敏感性和特异性尚不能令人满意;血清中和法是证实戊肝暴发流行快速有效的方法,但其操作复杂,也有非病毒成分导致假阳性的可能。套式 RT - PCR (RT - nPCR)^[11]使用两对引物(套式引物:一对外引物和一对内引物)进行两次 PCR 反应,从而降低了扩增多个靶位点的可能性(因为与两套引物都互补的引物很少)增加了特异性;又有两对 PCR 引物与检测模板结合,敏感性和可靠性大大提高,因此在检测极低含量的 DNA 或 cDNA 时有明显的优势。目前该方法在多种病毒的检测中应用较广。

SHEV 在动物组织器官、血清和粪便中的载量低,持续时间短,因此建立 RT - nPCR 是准确、快速诊断猪戊型肝炎的基础工作。而建立能在临床上诊断 SHEV RT - nPCR 方法的关键是设计合适的套式引物。本研究依据 Genbank 中登录的 SHEV 序列为模板,通过 BLAST 比较,选择保守序列,同时充分考虑序列的变异,设计 2 对套式简并引物,以尽可能降低因病毒基因序列变异造成的假阳性和假阴性率,提高检测的准确率。

以建立的 RT - nPCR 对猪常见病毒病的阳性病料进行检测,结果表明本方法只特异性扩增 SHEV 的目的片段,与猪的其它病毒均无交叉反应;通过优化条件,本方法可检出 SHEV RNA 的最低含量为 $2.5 \times 10^{-8} \mu\text{g}$ 的样品,灵敏度高,可用于 SHEV 载量低样品的快速检测;在检测的样品中随机抽取 20 份扩增产物进行测序比对,结果序列的同源性均在 98.2% ~ 99.7%,表明本方法稳定性高,同时也表明猪戊型肝炎存在准种现象(另文发表)。这些结果也提示本方法可用于建立快速检测 SHEV 的试剂盒。

SHEV 经口侵入机体^[12],从肠道经门静脉感染肝细胞,在肝细胞浆内增殖,增殖的子代病毒可进入血液出现短暂的病毒血症,并可分泌进入胆汁中。病毒主要随胆汁一起经粪便排出体外,带病毒的粪便可再次经口引发新的感染^[13]。因此, SHEV 载量较高的应是猪胆汁、肠内容物和粪便。猪粪便较易收集,且可进行无损检测,是目前检测猪戊型肝炎病毒的最常用的材料。笔者研究中,用建立的 RT - nPCR 方法对采集的 100 份 3 ~ 4 月龄猪粪便进行 SHEV 检测,结果均为阴性。对于造成这一现象的原因,可能与粪便样品的收集方式有关,若粪便散落,则会增大阳性粪便和阴性粪便的污染机率,难以保证结果一致。

根据 SHWV 在猪体内的增殖规律和采集材料交叉污染概率低等,本实验选择胆汁和肠内容物作为

检测的起始材料。结果表明,胆汁中病毒检出率为 10%,肠内容物中病毒检出率为 4%,与国内外文献^[14-17]报道的结果基本一致。表明,从胆汁和肠内容物中检测 SHEV,是较为可靠、能真实反映感染率的方法之一。

由于 SHEV 的可跨物种感染人,特别是从事与猪相关的兽医、屠宰人员及检疫员等职业人群^[18];同时猪被公认是人类器官移植的供体首选动物^[19],因此准确诊断 SHEV 就有着非常重要的公共卫生学意义。虽然 SHEV 只有一个血清型,但不同地区分离和鉴定的 SHEV 基因型和生物学特性并不完全相同,加之,目前 SHEV 仍无可靠的体外培养方法^[20],对 SHEV 的准确诊断标准和流行病学调查结果难尽人意。因此,研究开发敏感、特异的用于临床检测、流行病学调查诊断方法和试剂盒仍是未来 SHEV 的研究方向之一。

参考文献:

- [1] Vivek Chandra, Shikha Taneja, Manjula Kalia, et al. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus [J]. *J Biosci*, 2008, 33(4): 451-464.
- [2] Li W, She R, Wei H, et al. Prevalence of hepatitis E virus in swine under different breeding environment and abattoir in Beijing, China [J]. *Vet Microbiol* 2009, 133(1-2): 75-83.
- [3] Ma Z, Feng R, Zhao C, et al. Seroprevalence and distribution of hepatitis E virus in various ethnic groups in Gansu Province, China [J]. *Infect Genet Evol* 2010, 10(5): 614-619.
- [4] Jinshan, Jirintai, Manglai D, et al. Molecular and serological survey of hepatitis E virus infection among domestic pigs in Inner Mongolia, China [J]. *Arch Virol* 2010, 155(8): 1217-1226.
- [5] 朱奕奕, 李燕婷, 张爱香, 等. 上海地区猪戊型肝炎感染状况及病毒序列分析 [J]. *上海预防医学杂志*, 2006, 18(3): 103-105.
- [6] 孙中锋, 金宁一, 朱光泽, 等. 长春地区人与猪戊型肝炎病毒分子流行病学及部分基因序列分析 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2006, 22(10): 941-945.
- [7] 帅江冰, 张晓峰, 徐晶靓, 等. 2005-2008 年浙江省生猪主产区猪戊型肝炎血清流行病学调查 [J]. *畜牧兽医学报*, 2009, 40(7): 1037-1042.
- [8] Pavio N, Meng X J, Renou C. Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks [J]. *Vet Res* 2010, 41(6): 46.
- [9] Mushahwar IK. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention [J]. *J Med Virol* 2009, 80(4): 646-658.
- [10] Forgách P, Nowotny N, Erdélyi K, et al. Detection of hepatitis E virus in samples of animal origin collected in Hungary [J]. *Vet Microbiol* 2010, 143(2/4): 106-116.
- [11] Song M K, Chang J, Hong Y. Direct multiplex reverse transcription-nested PCR detection of influenza viruses without RNA purification [J]. *J Microbiol Biotechnol* 2009, 19(11): 1470-1474.
- [12] Mushahwar I K. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention [J]. *J Med Virol* 2008, 80(4): 646-658.
- [13] Abro A H, Abdou A M, Saleh A A, et al. Hepatitis E: a common cause of acute viral hepatitis [J]. *J Pak Med Assoc*, 2009, 59(2): 92-94.
- [14] 张维谊, 刘健, 鞠厚斌, 等. RT-nPCR 检测屠宰场胆汁中猪戊型肝炎病毒 [J]. *中国兽医杂志*, 2009, 45(11): 29-30.
- [15] Reuter G, Fodor D, Forgách P, et al. Molecular epidemiology of hepatitis E virus in Hungary: endemic, food-borne zoonosis [J]. *Orv Hetil*, 2009, 150(9): 415-421.
- [16] Casas M, Pina S, de Deus N, et al. Pigs orally inoculated with swine hepatitis E virus are able to infect contact sentinels [J]. *Vet Microbiol* 2009, 138(1/2): 78-84.
- [17] Casas M, Cortés R, Pina S, et al. Longitudinal study of hepatitis E virus infection in Spanish farrow-to-finish swine herds [J]. *Vet Microbiol* 2010.
- [18] Meng X J. Recent advances in Hepatitis E Virus [J]. *J Viral Hepa* 2010, 17(3): 153-161.
- [19] Aigner B, Klymiuk N, Wolf E. Transgenic pigs for xenotransplantation: selection of promoter sequences for reliable transgene expression [J]. *Curr Opin Organ Transplant* 2010, 15(2): 201-206.
- [20] Meng X J. Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk [J]. *Vet Microbiol* 2010, 140(3/4): 256-265.