

猪乙型脑炎病毒 RT- PCR 检测方法的建立

车勇良^{1,2}, 陈少莺^{1,2}, 魏 宏¹, 王隆柏¹, 陈仕龙¹, 周伦江^{1,2}, 庄向生^{1,2}

- (1. 福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福建 福州 350013;
2. 福建省畜禽疫病防治工程技术研究中心, 福建 福州 350013)

摘 要: 根据猪乙型脑炎病毒 (JEV) 基因序列, 设计合成了一对引物, 以 JEV 疫苗株为模板, 建立了检测 JEV 的 RT-PCR 方法. 应用该方法对 JEV 疫苗株 RNA 进行扩增, 获得与预期大小相符, 长度为 430 bp 的特异性目的片段; RT-PCR 产物测序结果与文献报道的 JEV 不同毒株的序列同源性达到 98% ~ 100%; 敏感性测定该 RT-PCR 可扩增至 10 pg 的 JEV- RNA. 结果表明, 建立的 RT-PCR 方法对 JEV 的检测敏感性高、特异性强.

关键词: 乙型脑炎病毒; RT-PCR; 检测

中图分类号: S 858. 28 文献标识码: A

Development of RT-PCR method for detecting swine japanese encephalitis virus

CHE Yong-liang^{1,2}, CHEN Shao-ying^{1,2}, WEI Hong¹, WANG Long-bai^{1,2}, CHEN Shi-long¹,
ZHOU Lun-jiang¹, ZHUANG Xiang-sheng¹

(1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences,
Fuzhou, Fujian 350013, China; 2. Fujian Animal Diseases Control Technology Development Center,
Fuzhou, Fujian 350013, China)

Abstract: A pair of primers were designed and synthesized based on the sequences of the JEV genome, and the RT-PCR method to detect the Japanese Encephalitis Virus (JEV) were development. The 430 bp specifical fragment were obtained from the JEV vaccine strains RNA by this RT-PCR. The test of the gene sequence of RT-PCR product achieved to 98% - 100% with that of other JEV strains. The sensitivity of RT-PCR reached to 10 pg JEV RNA. These results showed that the RT-PCR method to detect JEV were of better specificity and higher sensibility.

Key words: japanese encephalitis virus; RT-PCR; detection

乙型脑炎是由黄病毒科的乙型脑炎病毒引起的急性自然疫源性疾病, 是一种人畜共患的病毒性传染病^[1], 主要导致人的中枢神经系统疾病和母猪繁殖障碍, 该病不但影响畜牧业尤其是养猪业的发展, 而且严重威胁人类健康. 我国是乙型脑炎发病最多的国家, 占全球发病率 80% 左右, 而猪是主要传染来源和扩散宿主, 蚊虫是传播媒介, 在传播病毒方面起着非常重要的作用^[2]. 因此猪乙型脑炎的有效防治对养猪业的发展和人类健康均具有重要的公共卫生学意义.

据报道, 目前乙型脑炎的病原学诊断方法有病原分离鉴定、免疫细胞化学法^[3]、反向被动间接血凝^[4]、荧光抗体检测法^[5]等. 由于病毒分离鉴定所需时间长, 难用于流行病学调查和临床检测; 反向被

动间接血凝需对血凝素进行复杂的处理, 荧光抗体检测法尚未见商品化荧光诊断试剂, 不能满足临床确诊该病的需求, 因此亟须建立简单、特异、敏感的诊断方法用于临床上乙型脑炎病毒的检测. 聚合酶链式反应 (PCR) 自 1985 年问世以来, 已在疫病诊断等领域得到广泛应用, 如 RT-PCR 应用于人乙型脑炎的诊断^[6-7], 然而将 RT-PCR 应用于动物乙型脑炎的病原学诊断却很少见报道. 据此, 本试验根据 GenBank 登录的 JEV-NS1 基因序列设计 1 对引物, 建立了检测猪乙型脑炎病毒的 RT-PCR 方法, 评价了该 RT-PCR 的敏感性和特异性.

1 材料与方法

1.1 毒株与接种细胞

收稿日期: 2006- 05- 29 初稿; 2006- 08- 29 修改稿

作者简介: 车勇良 (1976-), 男, 硕士, 研究实习员, 主要从事预防兽医学研究.

通讯作者: 陈少莺 (1962-), 女, 硕士, 研究员, 主要从事动物疫病病原学与防治技术研究 (E-mail: chensy58@163.com)。

猪乙型脑炎病毒(JEV)疫苗株购自湖南亚华种业股份有限公司生物药厂；猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪瘟病毒(CSFV)、猪伪狂犬病毒(PRV)、猪圆环病毒型(PCV2)均为由本研究所保存的毒株。

1.2 工具酶和主要试剂

AMV 反转录酶、Nuclease Inhibitor、Taq DNA 聚合酶、dNTPs、Wide Range DNA Ladder Marker、蛋白酶K 购自TakaRa 公司；Trizol 试剂、氯仿、无水乙醇购自华美生物工程有限公司。

1.3 JEV-RNA 模板的制备

将JEV 冻干疫苗用TE (pH8.0) 稀释，取液体200 μl ，加入800 μl 的Trizol 试剂，摇匀后室温静置5 min，加入70 μl 乙酸钠 ($3\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和200 μl 氯仿，上下剧烈颠倒混匀，室温静置15 min，12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min，取上清加入等体积的异丙醇，-20 放置30 min，离心，弃上清，用1 ml 75% 乙醇洗涤沉淀，离心，弃上清，自然干燥30 min，沉淀溶于30 μl 无RNase 水，-20 保存备用。

1.4 引物合成

参照GenBank 中录入的JEV-NS1 基因序列，通过引物设计软件Primer 5.0 和Oligo 6.0 分析设计了1 对引物，上游引物(JV1)：5-GACACTGGATGTGCCATTGAC-3 位于基因组的2 478 ~ 2 498 位；下游引物(JV2)：5-GGCATTCCTTTGTCTCAGGTC-3 位于基因组的2 907 ~ 2 887 位。引物由TaKaRa 公司合成。

1.5 RT-PCR 反应及电泳检测

1.5.1 反转录反应体系 无RNase 水1.25 μl ，5 \times AMV buffer 2 μl ，MgCl₂ ($25\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1.0 μl ，dNTP 1 μl ，JV2 引物1.0 μl ，Nuclease Inhibitor 0.25 μl ，AMV 反转录酶0.5 μl ，模板RNA 3.0 μl 。反转录条件为30 10 min，42 1 h，99 5 min，一个反应。

1.5.2 PCR 反应体系 无菌水12 μl ，10 \times PCR Buffer 2 μl ，MgCl₂ ($25\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1.2 μl ，dNTP (各 $2.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1.0 μl ，Ex-Taq 酶 ($5\text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) 0.2 μl ，上下游引物 ($50\text{ pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) 各0.4 μl ，模板2.8 μl 。反应条件为95 预变性5 min，94 变性1 min，59 复性1 min，72 延伸1 min，35 个循环，最后72 延伸10 min，4 保存。

1.5.3 电泳检测 配制1% 的琼脂糖凝胶，上样6 μl ，8 V $\cdot \text{cm}^{-2}$ 电泳1 h。

1.6 特异性测定

应用所建立的 RT-PCR 方法扩增 JEV、

PRRSV、CSFV、PRV、PCV2 等病毒，检测该方法的特异性。回收RT-PCR 电泳条带，与T 载体相连，转化感受态DH5 α ，铺LB 琼脂平板37 倒置培养，经鉴定后挑取阳性菌落进行扩增培养，送TaKaRa 公司测序。

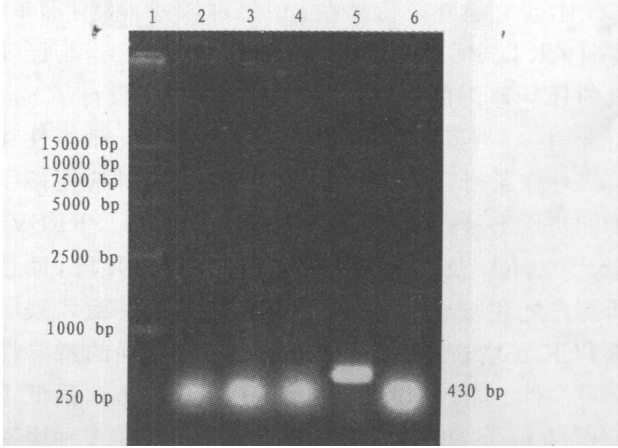
1.7 敏感性测定

将JEV 疫苗株按上述方法提取RNA，测定其含量，然后进行10 倍比稀释，取2.8 μl 做模板，其他条件不变进行RT-PCR 检测扩增。以出现阳性反应条带的模板用量最高稀释倍数，计算可检出最低JEV-RNA 量。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 检测JEV 的特异性

应用建立的方法检测JEV，可扩增到与预期大小相符的430 bp 的特异性目的片段，而PRRSV、CSFV、PRV 及PCV2 检测为阴性结果，没有出现交叉反应(图1)。



1. DNA Marker; 2. 猪繁殖与呼吸综合征病毒; 3. 猪瘟病毒; 4. 猪伪狂犬病毒; 5. 猪乙型脑炎病毒; 6. 猪圆环病毒型

图1 JEV 的特异性测定结果

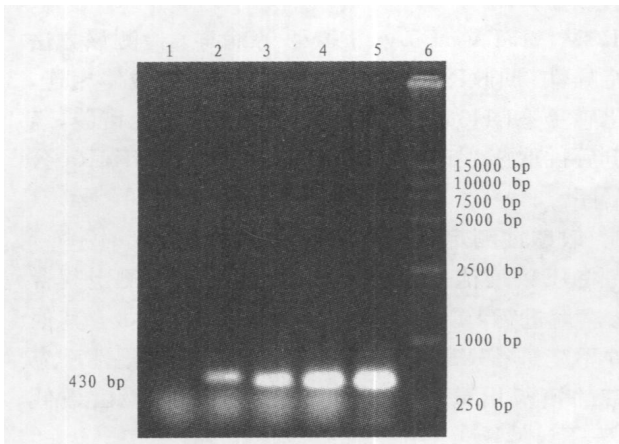
Fig.1 The results of specificity test of RT-PCR product

2.2 RT-PCR 检测JEV 的敏感性

将已知含量的JEV-RNA，进行10 倍比系列稀释，结果RT-PCR 可检出10 pg 的JEV-RNA (图2)。

2.3 RT-PCR 扩增条带的序列测定

将所测序列与GenBank 中发表的JEV 不同毒株[SA14-12-1-7、SA(A)、SA(V)、T1P1、JaOH0566/Japan/1966/human、TC/KV1899、JEV/sw/Mie/40/2004 strains] 基因序列进行比较，其同源性分别达到98% ~ 100%。



1. 1.0 pg RNA; 2. 10 pg RNA; 3. 100 pg RNA;
4. 1 ng RNA; 5. 10 ng RNA; 6. DNA Marker

图2 JEV 敏感性试验结果

Fig.2 The results of sensitivity test to JEV

3 讨 论

本研究建立了特异性、敏感性较好，而且简单、省时的RT-PCR法作为检测JEV方法。经过与已发表的JEV基因的比较，根据其NS1基因设计了1对特异引物，对其RT-PCR检测的特异性、敏感性和可靠性作了研究。结果显示，JEV疫苗株应用该引物能扩增出目的片段，而在同样条件下，PRRSV、CSFV、PRV及PCV2均没有扩增出目的片段，而且所测序列片段与发表的JEV-NS1基因一致，表明该PCR扩增技术用于鉴别JEV具有较强的特异性和可靠性。经PCR敏感性检测表明，该方法最低可检出10 pg的病毒RNA。RT-PCR检测受多种因素

影响，如RNA的不稳定、复性温度、镁离子浓度等都会影响检测结果，故本研究在提取病毒RNA时，对与RNA直接接触的试剂、离心管和Tip头都用DEPC水处理，以防止RNA酶的污染；本研究通过使用多种浓度的镁离子在温度梯度下进行PCR，最后确定最佳镁离子浓度为1.5 mmol·L⁻¹，最佳复性温度为59。然而本研究只对JEV疫苗株进行了检测鉴定，对组织病料中的病毒检测是否有效，还有待进一步研究。

参考文献:

[1] 殷震, 刘景华. 动物病毒学 [M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1997: 631- 640.

[2] 吴光华, 杨佩英, 唐家琪. 八种重要传染病的防治 [M]. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 2001: 129- 130.

[3] 邓艳清, 粟秀初, 冯幼起, 等. 流行性乙脑患者外周血及脑脊液中某些单个核细胞的免疫细胞化学 [J]. 中国病理学杂志, 1987, 7 (1): 43- 45.

[4] 陈伯权, 刘琴兰, 孙月英, 等. 单克隆抗体反向被动血凝和反向被动血凝抑制试验在乙脑快速诊断中的应用 [J]. 中华微生物和免疫学杂志, 1987, 7 (1): 43- 45.

[5] RAVI V, PREMKUMAR S, CHANDRAMUK A, et al. A reverse passive haemagglutination test for detection of Japanese encephalitis virus antigens in cerebro spinal fluid [J]. J Virol Methods, 1989, 23 (3): 291- 298.

[6] 桂卫星, 王大斌, 涂自良, 等. 聚合酶链反应对儿童流行性乙型脑炎55例诊断价值探讨 [J]. 中华传染病杂志, 1997, 15 (3): 176- 178.

[7] 方美玉, 陈翠华, 田小东, 等. RT-Nested-PCR快速诊断黄病毒感染 [J]. 中华传染病杂志, 1996, 14 (3): 156- 158.

(责任编辑: 周 琼)