

# 高致病性猪繁殖与呼吸综合征活疫苗(JXA1-R 株)病毒含量荧光定量 PCR 方法的建立

魏 津, 蒋 卉, 戴志红, 关孚时, 李 翠, 张秀英, 温 芳, 陆连寿, 王在时\*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2013-05-06 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2013)10-0039-04 [中图分类号] S852.65

**[摘 要]** 为快速、准确测定高致病性猪繁殖与呼吸综合征(HP-PRRS)活疫苗(JXA1-R 株)的病毒含量, 根据 GenBank 中该病毒的保守基因序列设计合成了引物和探针, 优化反应条件, 建立了其活疫苗病毒含量的荧光定量 PCR 方法。用该方法测定疫苗样品的病毒含量, 每头份稀释 100 倍后, Ct 均值为 17.08, 病毒拷贝数均值为  $4.61 \times 10^7$  copy/ $\mu$ L。将建立的荧光定量 PCR 与传统的 TCID<sub>50</sub> 方法进行相关性分析, 相关系数  $r=0.83$ , 表明该方法可用于 HP-PRRS 活疫苗半成品及成品的病毒含量测定。

**[关键词]** 高致病性猪繁殖与呼吸综合征; 病毒含量测定; 荧光定量 PCR 方法

## Development of Real-time Fluorescent Quantitative PCR Method for the Evaluation of Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Vaccine (JXA1-R Strain)

WEI Jin, JIANG Hui, Dai Zhi-hong, GUAN Fu-shi, LI Cui, ZHANG Xiu-ying,

WEN Fang, LU Lian-shou, WANG Zai-shi\*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

**Abstract:** To detect the viral titre of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome (HP-PRRS) living vaccine (JXA1-R strain) quickly and accurately, the probes and primers were designed and synthesized according to the conserved genes of PRRSV available in GenBank, and reaction parameters were optimized to develop a real-time fluorescent quantitative PCR method. The titre of some vaccines was determined with this method. The average Ct value is 17.08, and the average concentration is  $4.61 \times 10^7$  copy/ $\mu$ L. The correlation ratio between the real-time fluorescent quantitative PCR method and TCID<sub>50</sub> method was 0.83, which indicates that this method can be used to detect the titre of HP-PRRS living vaccine.

**Key words:** highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome; viral titre detection; real-time fluorescent quantitative PCR method

2006 年, 我国爆发了以母猪发热、厌食和流产、死产、产弱仔等繁殖障碍以及仔猪的呼吸道症状和高死亡率为特征的高致病性猪繁殖与呼吸综

合征(HP-PRRS), 使养猪业蒙受重大经济损失<sup>[1-2]</sup>。目前, 国内已有多种 HP-PRRS 活疫苗应用于防控工作<sup>[3]</sup>。目前测定 HP-PRRS 活疫苗效

作者简介: 魏 津, 硕士, 从事兽药标准物质研究。

通讯作者: 王在时。E-mail: wangzaishi@ivdc.gov.cn

力和病毒含量主要采用半数组织感染量( $TCID_{50}$ ),但该方法受人为因素影响较大。因此建立一种更加准确、快速的测定方法对保证活疫苗质量有重要意义。

近年来荧光定量 PCR 技术以其高灵敏度、特异性等优点在基因表达水平分析、病原体的定性和定量检测等方面得到广泛应用。本实验设计了探针、引物并优化了反应条件,建立了仅用于检测 HP-PRRS 活疫苗(JXA1-R 株)参考品病毒含量的荧光定量 PCR 方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 主要试剂 SuperScript<sup>TM</sup> III 反转录试剂盒、RNA 酶抑制剂,Invitrogen 公司;DNA 回收试剂盒、DNA 提取试剂盒、质粒小量提取试剂盒,Omega 公司;TOP10 感受态细胞,TIANGEN 公司;PCR 试剂盒、RNA 提取试剂盒、pGM-T 克隆试剂盒、DL2000 Marker, Takara 公司;LightCycler 480 Probes Master 荧光定量试剂盒,罗氏公司;氯仿、异丙醇、乙醇,北京化工厂。

1.1.2 主要仪器 荧光定量 PCR 仪,德国罗氏生物技术公司(Roche 480);梯度 PCR 仪 Tgradient,德国 Biometra 公司;凝胶成像分析系统,美国 UVP 公司;核酸测定仪(ND1000),NanoDrop 公司;凝胶电泳仪,PowerPac 公司;超净工作台,北京东联哈尔仪器制造有限公司。

1.1.3 实验用其他材料 HP-PRRS 活疫苗(JXA1-R 株),本研究室制备的参考品;牛病毒性腹泻病毒(BVDV)、猪瘟病毒(SFV)、猪细小病毒(PPV)、猪圆环病毒(PCV),本实验室保存。

### 1.2 方法

1.2.1 引物与探针的设计 根据从 GenBank 中检索 HP-PRRSV(JXA1 株)序列(EF112445.1)用于定量引物设计。以高度保守的 ORF7 作为扩增靶区,利用 Primer Premier 5 软件设计引物扩增基因片段大小为 471 bp。上游引物为:5'-TTTACCTTCGGGTACATGACA-3';下游引物为:5'-CCTTGCCTCTGGACTGGTTT-3';利用 Primer Express 3.0 设计荧光探针(Probe)为:5'-FAM-TCAGCCATAGAAACC-BHQ。引物和探针均由英骏科技有限公司合成。

1.2.2 标准质粒的构建 用 RNA 提取试剂盒提取 HP-PRRSV 病毒 RNA。进行反转录和 PCR,反转录操作在超净工作台中进行,反应体系为 20  $\mu$ L。

取 RNA 11  $\mu$ L, Random Primer 1  $\mu$ L, dNTP mix 1  $\mu$ L (10 nmol/L each) 加入到 EP 管中,在 PCR 仪中 65  $^{\circ}$ C 5 min, 4  $^{\circ}$ C 2 min 后加 1  $\mu$ L DTT (0.1 mol/L)、4  $\mu$ L Buffer、1  $\mu$ L RI (RNA 酶抑制剂)、1  $\mu$ L SSIII (反转录酶), 25  $^{\circ}$ C 5 min, 50  $^{\circ}$ C 60 min 70  $^{\circ}$ C 15 min。得到 cDNA 后,在 50  $\mu$ L 体系中进行 PCR 扩增。经 1.5% 琼脂糖电泳鉴定扩增片段为目的片段后,回收 PCR 产物。将回收的 DNA 目的片段按下面反应体系插入到克隆载体 PGM-T 中并转化入大肠杆菌 TOP10 菌株。通过测序鉴定,证实目的基因已正确克隆入 PGM-T 克隆载体中。提取质粒,经测定,浓度大约为  $2.08 \times 10^{10}$  copy/ $\mu$ L。

1.2.3 引物、探针浓度的优化 在 Roche 480 荧光定量 PCR 仪上对荧光定量 PCR 的引物、探针浓度进行优化,以得到最佳的反应浓度配比。

1.2.4 特异性试验 取等量的 BVDV、SFV、PPV、PCV,从 BVDV、SFV 中提取 RNA,从 PPV、PCV 中提取 DNA,灭菌双蒸水作为阴性对照,进行荧光定量 PCR 检测。

1.2.5 灵敏性试验 取标准质粒( $2.08 \times 10^{10}$  copy/ $\mu$ L) 10 倍系列稀释成  $2.08 \times 10^9 \sim 2.08 \times 10^1$  copy/ $\mu$ L 为模板,进行荧光定量 PCR 检测,用以检验该方法的敏感性。

1.2.6 重复性试验 用同一 HP-PRRS 疫苗稀释不同头份提取 RNA 后分别组内和组间实验,组内实验是任取不同头份组 RNA 后,同一次反应重复 5 次;组间实验是对上述 RNA 分别 5 次重复。

1.2.7 参考品病毒含量的荧光定量方法初定值 取已用传统测半数组织感染量方法测得效力值的 HP-PRRS 活疫苗参考品 5 份,效力值分别为 6.33、6.00、6.4、6.29、6.5 ( $-\lg TCID_{50}$ /头份)。使用未加血清的细胞培养基 DMEM 将其复溶成 1 头份/mL,并再稀释 100 倍,提取样品 RNA,经反转录成 cDNA 后,应用荧光定量方法初步测定其病毒核酸含量,每个样品重复 3 次。

## 2 结果

2.1 荧光定量 PCR 反应条件的建立 荧光定量 PCR 使用 Roche LightCycler 480 Probes Master 荧光定量试剂盒,其中 Taq DNA 聚合酶、反应缓冲液和 dNTP 等都已经预混。反应总体积 20  $\mu$ L,反应体系含 10 倍系列稀释的标准质粒或疫苗样品 RNA 反转录得到的 cDNA 2  $\mu$ L, LightCycler 480 Probes Master 10  $\mu$ L, Probe 溶液 0.1  $\mu$ L, 上、下游引物分别

为 0.2 μL,RNase Free dH<sub>2</sub>O 7.7 μL。将反应混合液加入 8 连管中,加样时尽量避免反应体系中产生气泡,短暂离心后放入仪器中,反应条件为:95 ℃ 预热 5 min;95 ℃ 10 s,45 ℃ 25 s,72 ℃ 1 s,扩增 45 个循环。

2.2 引物特异性实验 HP-PRRS 活疫苗参考品 RNA 经荧光定量 PCR 扩增后产物检测为阳性扩增,BVDV、SFV 提取 RNA,PPV、PCV 提取 DNA,双蒸水,进行荧光定量 PCR 检测,均未见扩增曲线,为阴性。

2.3 检验灵敏性试验 经过检测,确定荧光定量 PCR 的最低检出限为 10 copy/μL,即检测病毒 RNA 的敏感度为 10 copy/μL(图 1)。

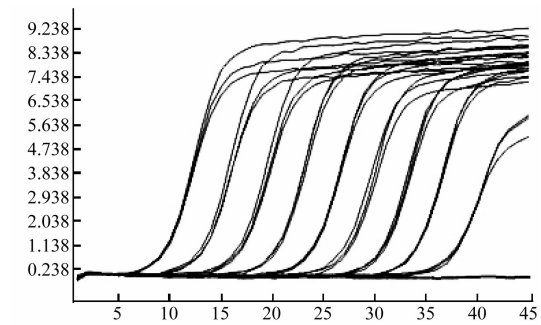


图 1 荧光定量 PCR 检验灵敏度

2.4 标准曲线的建立 由图 2 可知该反应体系当模板浓度在 10<sup>9</sup>~10<sup>1</sup> copy/μL 范围内时反应扩增效率  $E = 10^{(-1/\text{slop}) - 1} = 0.968$ ,不同浓度模板的反应有很好的线性关系。

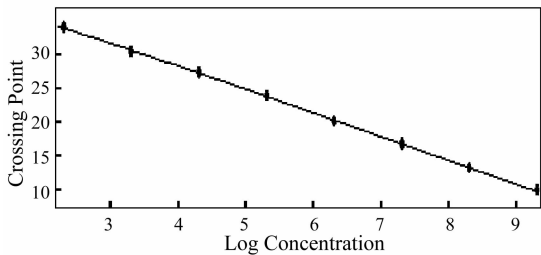


图 2 荧光定量 PCR 扩增标准曲线

2.5 重复性试验 结果显示,组内实验 10 头份、5 头份、1 头份(5 次重复)的变异系数(CV)分别为 0.82%、0.64% 和 1.40%(表 1),组间实验(5 次重复)的相应为 1.46%、2.56% 和 1.74%(表 2)。组间与组内的 CV 均小于 5%,以上结果表明,该检测体系稳定,具有良好的重复性。同时,通过该重复

性实验可以得出,10 头份 Ct 值均值为 9.44,5 头份 Ct 值均值为 11,1 头份 Ct 值均 13.06。

表 1 荧光定量 PCR 组内重复性实验

| 头份 | Ct 值  |       |       |       |       | CV/% |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|------|
|    | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     |      |
| 10 | 9.7   | 9.78  | 9.59  | 9.75  | 9.63  | 0.82 |
| 5  | 11.03 | 11.17 | 11.14 | 11.01 | 11.09 | 0.64 |
| 1  | 13.32 | 13.21 | 13.58 | 13.17 | 13.11 | 1.40 |

表 2 荧光定量 PCR 组间重复性实验

| 头份 | Ct 值  |       |       |       |       | CV/% |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|------|
|    | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     |      |
| 10 | 9.43  | 9.20  | 9.17  | 9.07  | 9.08  | 1.46 |
| 5  | 10.98 | 10.50 | 10.96 | 11.02 | 11.06 | 2.56 |
| 1  | 13.08 | 12.98 | 12.77 | 12.87 | 12.50 | 1.74 |

2.6 参考品样品病毒含量荧光定量 PCR 定值结果 结果见表 3。测得病毒载量均值 Ct 值为 17.08,病毒拷贝数均值为 4.61 × 10<sup>7</sup> copy/μL。将其与传统方法结果进行相关性分析, $r = 0.83$ ,证明两种方法有很好的相关性。

表 3 荧光定量 PCR 检验样品结果

| 样品编号 | -lgTCID <sub>50</sub> | Ct 值  | Ct 值均值 | 拷贝数 /10 <sup>7</sup> | 拷贝数几何平均数/10 <sup>7</sup> |
|------|-----------------------|-------|--------|----------------------|--------------------------|
| 1    | 4.33                  | 17.54 | 17.56  | 3.47                 | 3.42                     |
|      |                       | 17.60 |        | 3.34                 |                          |
|      |                       | 17.55 |        | 3.45                 |                          |
| 2    | 4.00                  | 18.78 | 18.76  | 1.59                 | 1.61                     |
|      |                       | 18.77 |        | 1.60                 |                          |
|      |                       | 18.73 |        | 1.64                 |                          |
| 3    | 4.4                   | 16.57 | 16.58  | 6.39                 | 6.35                     |
|      |                       | 16.54 |        | 6.49                 |                          |
|      |                       | 16.62 |        | 6.18                 |                          |
| 4    | 4.29                  | 18.16 | 18.49  | 2.35                 | 2.22                     |
|      |                       | 18.58 |        | 1.79                 |                          |
|      |                       | 18.72 |        | 2.53                 |                          |
| 5    | 4.5                   | 13.97 | 14.02  | 9.75                 | 9.47                     |
|      |                       | 14.06 |        | 9.17                 |                          |
|      |                       | 14.02 |        | 9.5                  |                          |

3 讨论

试验表明,本研究建立的荧光定量 PCR 方法可应用于疫苗半成品及成品的病毒含量测定,但也存在一定的局限性。首先,Taqman 荧光定量 PCR

的成本高,对探针的设计和筛选要求很高;其次,在制备活疫苗过程中会导致其病毒失去活性,但荧光定量 PCR 方法测得的病毒核酸含量无法区分病毒是否具有活性,因此不能直接应用其测定疫苗成品的病毒含量结果代替效力值。真正想要将其应用于疫苗效力的测定,还有赖于对其正确的使用。

应用荧光定量 PCR 方法进行效力检验,首先应建立成品疫苗规定接种剂量用该方法检测的含量标准,同时再建立经体内反应表现其活性的荧光定量 PCR 检测结果标准,两个标准的结合才是判定疫苗是否合格的荧光定量 PCR 效力检验方法,如此操作才能既准确检测出疫苗病毒含量,又能区分出疫苗中死病毒和活病毒效力检验的差异。实现该方法的正确应用,这也是我们下一步的研究方向。

#### 参考文献:

[1] Wei Han, Jiajun Wu, Xiaoyu Deng, *et al.* Molecular mutations associated with the *in vitro* passage of virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Virus Genes*, 2009, 38: 276–284.

[2] 梁雪芳, 方维焕. 猪繁殖与呼吸综合征病毒的分子生物学研究进展[J]. *中国兽医科技*, 2001, 31(8): 14–17.

[3] 吴佳俊, 赵 婷, 遇秀玲, 等. 猪繁殖与呼吸综合征弱毒疫苗研究进展[J]. *中国预防兽医学报*, 2010, 32(8): 650–654.

[4] 斯特劳 B E. 猪病学[M]. 8 版. 张仲秋, 赵德明, 沈建忠, 等, 译. 北京: 中国农业大学出版社, 2003: 205–230.

[5] 侯丽丽, 赵铁柱, 遇秀玲, 等. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒分子流行病学调查[J]. *中国兽医学报*, 2009, 29(6): 677–681.

[6] 黄 娟, 姜 平, 张常印, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒实时 PCR 检测方法的建立[J]. *中国病毒学*, 2005, 20(5): 530–533.

[7] 杨宗照, 母安雄, 方维焕. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒实时荧光定量 PCR 方法的建立[J]. *中国预防兽医学报*, 2009, 31(4): 288–291.

[8] 胡 慧, 高晓平, 孟韩冰, 等. 利用荧光定量 PCR 方法研究猪繁殖与呼吸综合征病毒在 Marc-145 细胞中的增殖规律[J]. *中国农学通报*, 2009, 25(21): 22–25.

[9] 宋志军, 宋长续, 杨增岐, 等. 猪繁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(02): 98–102.

[10] Baoqing Guo, Ann C Vorwald, David P Alt, *et al.* Large scale parallel pyrosequencing technology: PRRSV strain VR-2332 nsp2 deletion mutant stability in swine[J]. *Virus Research*, 2011, 161: 162–169.

(责任编辑:李文平)