

利用荧光定量 PCR 检测猪细小病毒 在 IBRS - 2 细胞增殖动态研究

马慧慧,薛霜,陈其兵,朱薇,漆世华,谢红玲*

(武汉中博生物股份有限公司,武汉 430070)

[收稿日期]2013-05-30 [文献标识码]A [文章编号]1002-1280(2013)10-0001-05 [中图分类号]S852.659.2

[摘要] 为了解猪细小病毒(PPV)在 IBRS-2 细胞中的增殖规律,建立了基于 TaqMan 实时荧光定量 PCR 技术的 PPV 检测方法,并应用该方法研究 PPV 在 IBRS-2 细胞中的增殖动态。结果显示,该方法特异性较好且灵敏度高,可检测低至 1.4×10^0 拷贝/ μL 的病毒量。检测显示 PPV 接种 IBRS-2 细胞后 12 h 开始大量增殖,60~72 h 增殖最为迅速,到 72 h 病毒含量达到最高峰,之后逐渐下降。结果表明,所建立的荧光定量 PCR 方法可用于 PPV 的快速定量检测,对病毒增殖规律的研究为该病毒疫苗的生产提供了科学依据。

[关键词] 猪细小病毒;IBRS-2 细胞;荧光定量 PCR;增殖动态

Study on the Proliferation Dynamics of Porcine Parvovirus in IBRS - 2 Cells Using Real - time PCR Technology

MA Hui - hui, XUE Shuang, CHEN Qi - bing, ZHU Wei, QI Shi - hua, XIE Hong - ling*

(Wuhan Chopper Biology Co Ltd, Wuhan 430070, China)

Abstract: To explore the proliferation dynamics of PPV in IBRS-2 cells, a TaqMan fluorescent quantitative real-time PCR technology was established. The results showed that this method was specific and sensitive for the detection of PPV. Experiment of sensitivity indicated that this method could detect 1.4×10^0 copies/ μL viral load at least. After inoculation of PPV, the IBRS-2 cells showed obvious CPE. Virus began to proliferate when the cells infected with PPV after 12 hours, and proliferated rapidly during 60 to 72 hours, viral load achieved the highest value in 72 hours and then decreased gradually. This study results indicated that the TaqMan real-time PCR technology could be used in the rapid quantitative detection of PPV. The proliferation dynamics also could provide a scientific basis for the vaccine production of PPV.

Key words: porcine parvovirus; IBRS-2 cells; fluorescent quantitative real-time PCR; proliferation dynamics

猪细小病毒(Porcine Parvovirus, PPV)属于细小病毒科细小病毒属,主要引起以初产母猪发生流产、产死胎、畸形胎、木乃伊胎、不孕而母猪本身无症状为特征的母猪繁殖障碍性传染病。同时 PPV 还可引起皮炎、腹泻、仔猪非化脓性心肌炎及消瘦

型综合征^[1-3]。Mayr 和 Mahnel 于 1966 年首次发现 PPV,随后 Cartwright 从猪的流产胎儿中分离到 PPV,并证实了其病原作用。目前我国已有许多地区分离出了 PPV,血清学调查阳性率高达 80% 以上^[4-5],为保障我国养猪业的健康发展,加强对本

作者简介:马慧慧,硕士,从事动物病毒分子诊断试剂研究工作。

通讯作者:谢红玲。E-mail:13419546263@163.com

病的检测和防控具有重要的实际意义。

疫苗接种是控制 PPV 感染行之有效的办法。在疫苗生产过程中,多使用传代细胞来增殖病毒,因而病毒的收获时间是疫苗生产中至关重要的因素之一。已有的文献报道中多采用免疫荧光、荧光抗体技术或观察病变的方法研究 PPV 在 PK-15 或 ST 细胞上的增殖规律^[6-8],这些方法灵敏度和特异性偏低且操作时间长。本研究利用所建立的 PPV 实时荧光定量 PCR 检测技术,研究 PPV 在 IBRS-2 细胞内的增殖规律,以期 PPV 疫苗的生产提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 PPV CP-99 株($10^{7.25}$ TCID₅₀/mL)、猪圆环病毒 I 型(PCV-1)、猪圆环病毒 II 型(PCV-2)、猪伪狂犬病毒(PRV)、犬细小病毒(CPV)和 IBRS-2 细胞,均由武汉中博生物股份有限公司鉴定和保存;大肠杆菌 Trans5 α 感受态株细胞,北京全式金生物技术有限公司提供;TaqDNA 聚合酶、DNA 片段回收纯化试剂盒、质粒小量快速提取试剂盒、病毒核酸提取试剂盒、pMD18-T 载体和 Premix Ex Taq 试剂盒(探针法),均来自宝生物(大连)有限公司;DMEM 培养基,美国 Hyclone 公司;胎牛血清,美国 GIBCO 公司;胰蛋白酶,美国 DIFCO 公司;StepOnePlus 荧光 PCR 仪,美国 ABI 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物及探针设计 从 GenBank 中下载多条具有代表性的猪细小病毒基因全序列,利用 DNASTar 生物软件分析选出基因高度保守的核苷酸区域,然后应用 Primer Express 及 DNASTar 软件设计筛选出最佳引物和探针组合,确定为本方法中所使用的引物和探针。引物探针由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2.2 定量标准品的制备 取 PPV 细胞毒 200 μ L,按 TaKaRa 公司生产的病毒核酸小量提取试剂盒说明书提取病毒 DNA,用所设计的特异性引物对提取的细胞毒 DNA 进行 PCR 扩增,PCR 体系为 10 \times PCR Buffer 5 μ L, dNTPs 4 μ L,上、下游引物终浓度均为 0.5 μ mol/L, Taq 酶 1 μ L,模板 10 μ L,补加无菌无核酸酶水至 50 μ L。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 45 s(35 个循环);72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物经胶回收试剂盒纯化,连接至 pMD18-T 载体上,转化 Trans5 α 感受态细胞,37 $^{\circ}$ C

培养 12~16 h。随机挑取若干单菌落接种于 5 mL LB/Amp^r 培养液中,37 $^{\circ}$ C 振摇过夜,提取质粒。按上述 PCR 体系和条件进行鉴定,将初步鉴定为阳性的重组质粒送生物公司测序。测序鉴定正确后作为荧光定量 PCR 阳性质粒,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。经紫外分光光度计测定核酸浓度(连续测定 5 次取平均值),计算出每微升所含的 DNA 拷贝数并进行 10 倍梯度稀释,取其中 $10^1 \sim 10^7$ 拷贝/ μ L 的阳性质粒作为定量标准品。

1.2.3 荧光定量 PCR 检测方法的建立

1.2.3.1 反应体系的建立 根据宝生物 Premix Ex Taq 试剂盒说明书,用所构建的阳性重组质粒对 PCR 反应的退火温度、引物浓度及探针浓度等进行初步优化后确定反应体系。

1.2.3.2 标准曲线的建立 以 1.2.2 项中制备的定量标准品为模板,利用 1.2.3.1 项中确定的反应体系进行荧光定量 PCR 检测,得到相关标准曲线。

1.2.3.3 特异性试验 在相同的条件下,同时对未接毒的 IBRS-2 细胞、PCV-1、PCV-2、PRV、CPV 和 PPV 提取核酸,按照 1.2.3.1 项确定的反应体系对上述样品进行荧光定量 PCR 检测,同时设立阴阳性对照,从而确定该方法的特异性。

1.2.3.4 灵敏度试验 将 PPV 细胞毒($10^{7.25}$ TCID₅₀/mL)和已计算出拷贝数的重组质粒分别做 10 倍梯度稀释,按照 1.2.3.1 项确定的反应体系对所稀释的不同浓度荧光定量 PCR 阳性质粒和 PPV 细胞毒进行检测,以此确定该方法的检测灵敏度。

1.2.3.5 重复性试验 用所建立的方法对 3 个不同稀释度的阳性质粒模板进行 4 次重复测定,所得检测结果经统计学处理后,计算其组内变异系数(CV)。

1.2.4 增殖动态检测

1.2.4.1 细胞培养及接毒 按常规细胞培养方法,待 IBRS-2 细胞长成单层后,弃细胞生长液,按整个细胞培养液体积的 10% 接种 PPV($10^{7.25}$ TCID₅₀/mL),置 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱吸附 60 min 后,补加含 2% 胎牛血清的细胞维持液,置 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱继续培养。

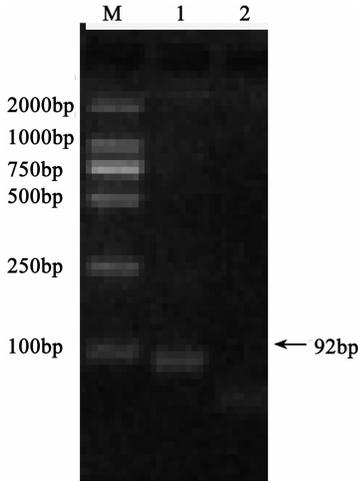
1.2.4.2 病毒的收集 按 1.2.4.1 项的方法用 PPV 感染 IBRS-2 细胞,同时每天观察细胞状态。分别于感染后 0、6、12、24、30、36、48、60、72、78、84、96 h 收集病毒液,将收集的病毒液反复冻融 3 次

后,12000 r/min 离心 5 min,吸取上清液用于病毒核酸提取。

1.2.4.3 增殖曲线 用 1.2.3 项建立的荧光定量 PCR 检测方法对各时间点收集的病毒液进行定量检测,根据检测结果,绘制 PPV 在 IBRS-2 细胞上的增殖动态曲线。

2 结果与分析

2.1 定量标准品的制备 鉴定正确的阳性质粒(图 1)经紫外分光光度计测定核酸浓度,按公式换算成 DNA 拷贝数为 1.4×10^{10} 拷贝/ μL 。1:10 倍比稀释后取 $1.4 \times 10^7 \sim 1.4 \times 10^1$ 拷贝/ μL 的阳性质粒作为荧光 PCR 定量标准品。



M:DL2000 DNA Marker;1:PPV PCR 产物;2:阴性对照

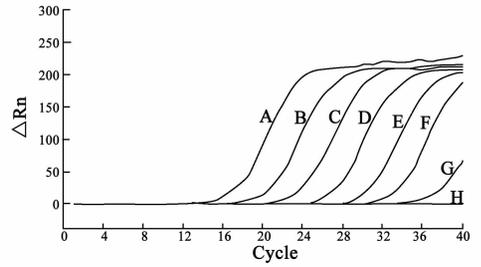
图 1 PPV 目的基因片段的 PCR 鉴定

2.2 荧光定量 PCR 检测方法的建立

2.2.1 反应体系的建立 经相关试验优化后的最佳反应体系为:上下游引物,荧光探针终浓度均为 $0.2 \mu\text{mol/L}$,Premix Ex Taq™ ($2 \times$) $10 \mu\text{L}$,DNA 模板 $2 \mu\text{L}$,补加灭菌蒸馏水至总体积 $20 \mu\text{L}$ 。反应程序为:95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 5 s,60 °C 35 s (收集荧光信号 FAM),40 个循环。

2.2.2 标准曲线的建立 本研究所建立的猪细小病毒荧光定量 PCR 检测方法在 $1.4 \times 10^1 \sim 1.4 \times 10^7$ 拷贝/ μL 的线性范围内可以得到良好的动力学曲线(图 2),且标准曲线较理想(图 3)。标准曲线的线性相关系数 R^2 为 0.999,扩增效率为 97%。说明本方法的检测误差较小,可信度较高。

2.2.3 特异性试验结果 检测结果显示,除 PPV 和阳性对照外,PCV-1、PCV-2、PRV、CPV、IBRS-2 细胞和阴性对照均无阳性扩增信号(图 4)。



A: 1.4×10^7 拷贝/ μL ;B: 1.4×10^6 拷贝/ μL ;C: 1.4×10^5 拷贝/ μL ;
D: 1.4×10^4 拷贝/ μL ;E: 1.4×10^3 拷贝/ μL ;F: 1.4×10^2 拷贝/ μL ;
G: 1.4×10^1 拷贝/ μL ;H:阴性对照

图 2 PPV DNA 扩增曲线图

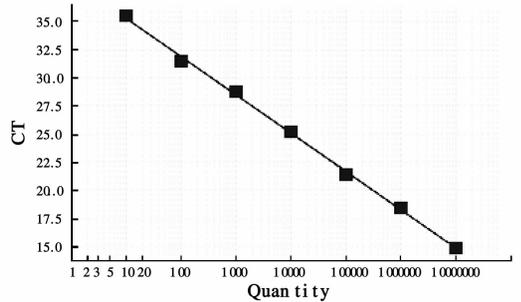
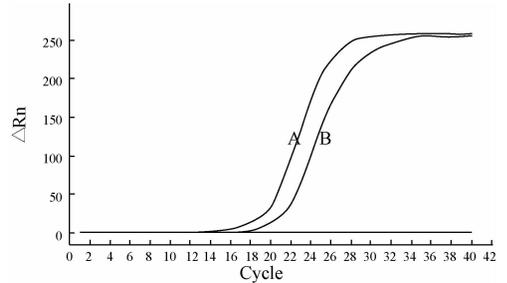


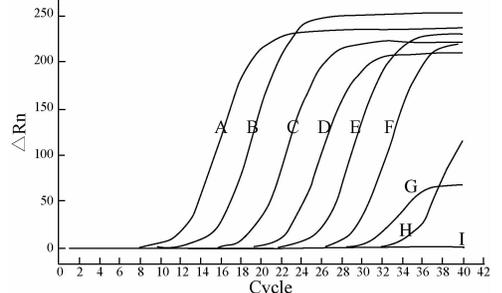
图 3 PPV 荧光定量标准曲线



A:PPV;B:阳性对照

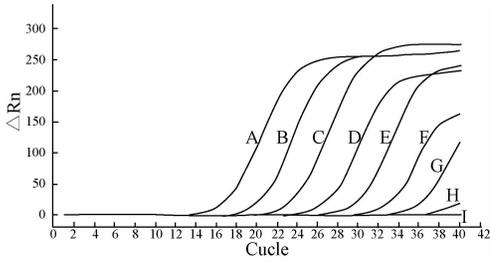
图 4 荧光定量 PCR 特异性检测结果

2.2.4 灵敏度试验结果 荧光定量 PCR 最少可检测到 $10^{0.25}$ TCID₅₀/mL (10^7 倍稀释的细胞毒液)的病毒液(图 5),检测到的最小病毒核酸量为 1.4×10^0 拷贝/ μL (图 6)。



A: $10^{7.25}$ TCID₅₀/mL;B: $10^{6.25}$ TCID₅₀/mL;C: $10^{5.25}$ TCID₅₀/mL;
D: $10^{4.25}$ TCID₅₀/mL;E: $10^{3.25}$ TCID₅₀/mL;F: $10^{2.25}$ TCID₅₀/mL;
G: $10^{1.25}$ TCID₅₀/mL;H: $10^{0.25}$ TCID₅₀/mL;I:阴性对照

图 5 荧光定量 PCR 灵敏度检测结果(TCID₅₀)



A: 1.4×10^7 拷贝/ μL ; B: 1.4×10^6 拷贝/ μL ; C: 1.4×10^5 拷贝/ μL ;
 D: 1.4×10^4 拷贝/ μL ; E: 1.4×10^3 拷贝/ μL ; F: 1.4×10^2 拷贝/ μL ;
 G: 1.4×10^1 拷贝/ μL ; H: 1.4×10^0 拷贝/ μL ; I: 阴性对照

图6 荧光定量 PCR 灵敏度试验(拷贝数)

2.2.5 重复性试验结果 利用建立的荧光 PCR 检测方法重复检测 3 个样本,组内变异系数为 0.2% ~ 0.6% (表 1)。

表 1 荧光定量 PCR 重复性检测结果

样品 (拷贝/ μL)	检测结果 (CT 值)				变异系数 (CV/%)
	1 次	2 次	3 次	4 次	
1.4×10^7	13.38	13.45	13.29	13.35	0.002
1.4×10^5	19.71	19.72	19.78	19.89	0.006
1.4×10^2	28.34	28.43	28.44	28.42	0.002

2.3 增殖规律 PPV 接种到 IBRS - 2 细胞后 12 h,细胞内开始出现弥散性颗粒,少量细胞聚集、变圆,48 h 以后出现明显的细胞病变,细胞开始拉网、脱落,72 h 左右细胞大量崩解脱落,出现大片空斑 (图 7)。利用所建立的荧光 PCR 检测方法对不同时间收集的 PPV 病毒液中的病毒 DNA 含量进行精确定量,根据检测结果绘制病毒 DNA 增殖曲线 (图 8)。由图 8 可以看出:接毒后 12 h 病毒量开始明显升高,60 ~ 72 h 增殖最为迅速,大约在 72 h 病毒量达到最高值,而后迅速下降至较低水平。

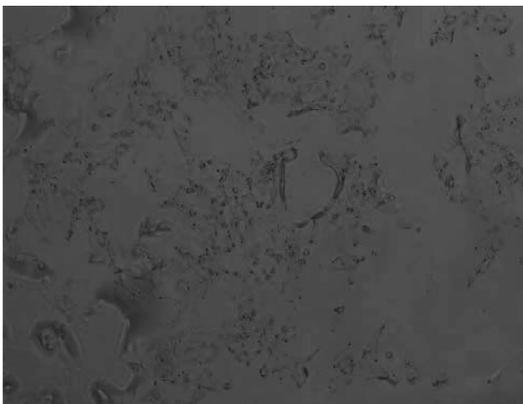


图 7 PPV 感染 72 h 细胞病变情况

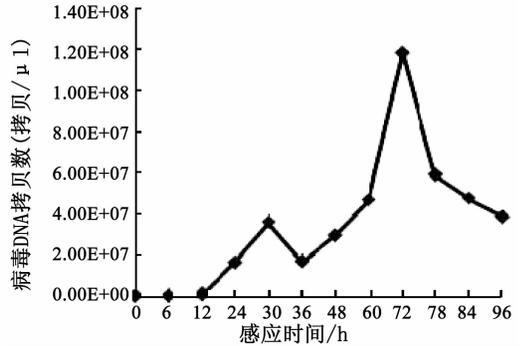


图 8 PPV 在 IBRS - 2 细胞中的增殖曲线

3 讨论

目前在 PPV 疫苗的生产中主要使用 ST、PK - 15、IBRS - 2 等猪源细胞来培养增殖病毒。在疫苗生产中,病毒收获时间是至关重要的因素之一,病毒收获时间过早或过晚都会使病毒滴度降低,如不能掌握病毒的增殖规律和收获时间,将难以生产出优质的疫苗。已有的报道大多使用 PK - 15、ST 细胞增殖 PPV,通过观察 CPE 情况来研究 PPV 的增殖规律^[9-11],但是此方法难以准确反映出病毒的增殖动态。荧光定量 PCR 技术具有灵敏度高且操作简便等特点,已广泛应用于病毒核酸的定量检测^[12-14]。魏战勇等^[15]利用 TaqMan 探针荧光定量 PCR 技术发现 PPV 感染 PK - 15 细胞后 12 h 病毒开始快速增殖,24 h 病毒开始快速释放,60 h 细胞中病毒含量达到最高,72 h 培养上清中病毒含量达到最高。本试验则利用所建立的 TaqMan 荧光定量 PCR 技术对 PPV (CP - 99 株)在 IBRS - 2 细胞上的增殖情况进行了研究。通过绘制的增殖曲线可以看出,PPV 接种到 IBRS - 2 细胞后,12 h 病毒量开始升高,大约在 72 h 病毒量达到最高值,之后明显下降,因此生产上应在 72 h 左右及时收毒。

通过灵敏而准确的检测 PPV DNA 的拷贝数,精确分析病毒在细胞中的增殖动力学规律,为研究 PPV 在 IBRS - 2 细胞中的复制过程提供了基础数据,并为 PPV 疫苗的生产提供了科学的理论依据。

参考文献:

- [1] Kelly M Lager, William L, Mengeling. Porcine parvovirus associated with cutaneous lesions in piglets[J]. J Vet Diagn Invest, 1994, (6):357-359.
- [2] Bolt D M, Hani H, Muller E, et al. Non-suppurative myocarditis in piglets associated with porcine parvovirus infection [J]. J Comp Path, 1997, (117): 107-118.
- [3] Krakowka S, Ellis J A, Meehan B, et al. Viral wasting syndrome of swine; experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus [J]. Vet Pathol, 2000, 37(3):254-263.
- [4] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 北京:科学出版社, 1997: 1145-1155.
- [5] Mengeling W L. Prevalence of porcine parvovirus induced reproductive failure[J]. J Am Vet Med Assoc, 1978, 172: 1291-1294.
- [6] 魏战勇, 崔保安, 黄克和, 等. 猪细小病毒在 PK15 细胞中的增殖过程[J]. 中国兽医学报, 2005, 25(5):453-455.
- [7] Pirtle E C. Titration of two porcine respiratory viruses in mammalian cell culture by direct fluorescent antibody staining[J]. Am J Vet Res, 1974, 35:249-250.
- [8] 倪娇, 赵建增, 刘长辉, 等. 猪细小病毒在 PK15 细胞中增殖规律的研究[J]. 中国兽药杂志, 2009, 43(1): 21-24.
- [9] 庄金秋. 猪细小病毒在不同组织细胞上增殖特性的研究[J]. 现代畜牧兽医, 2005, (7): 47-48.
- [10] 殷华平, 郭万柱, 徐志文, 等. 猪细小病毒 (PPV) sc1 株的分离鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2006, (7): 63-65.
- [11] 朱绍辉, 张述智, 单虎, 等. 猪细小病毒 X 株在不同细胞上增殖效果比较[J]. 东北农业大学学报, 2012, 43(6):6-10.
- [12] Chen H Y, Li X K, Cui B A, et al. A TaqMan-based real-time polymerase chain reaction for the detection of porcine parvovirus [J]. J Virological Methods, 2008, 16:214-219.
- [13] Kang S E, Nam Y S, Hong K W. Rapid detection of Enterobactersakazakii using TaqMan real-time PCR assay [J]. J Microbiol Biotechnol, 2007, 17(3):516-519.
- [14] Yoon H A, Eo S K, Aleyas A G, et al. Molecular survey of latent pseudorabies virus infection in nervous tissues of slaughtered pigs by nested and real-time PCR [J]. J Microbiol, 2005, 43(5):430-436.
- [15] 魏战勇, 王学兵, 陈红英, 等. 利用 Real-time PCR 技术检测猪细小病毒在 PK-15 细胞增殖动态研究[J]. 河南农业大学学报, 2009, 43(4):398-401.

(责任编辑:侯向辉)