

# 猪口蹄疫病毒 MFIA xTAG 检测方法的建立

崔雨葳

辽宁省抚顺市现代农业及扶贫开发促进中心, 辽宁抚顺 113006

**摘要** 为了提高猪口蹄疫病毒诊断准确性, 针对口蹄疫病毒的 3D 基因建立了 FMDV 的 xTAG 检测方法。根据 3D 基因序列设计特异引物, 上游引物 5' 端加 TAG 序列, 下游引物 5' 端加生物素, 进行 PCR 扩增, 扩增产物与荧光编码微球和 SA-PE 杂交, 在 Luminex 200 检测仪上读数。用所建立的 MFIA xTAG 检测方法进行特异性、灵敏度、重复性及病料样品的检测。结果表明, 该方法的特异性强; 检测的敏感性可达  $1 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L; 批内、批间的变异系数都在 3% 以下; 检测结果与 SYBR Green I 荧光 PCR 方法 100% 相符。表明建立的液相基因芯片方法特异性好、灵敏度高、重复性好, 可用于猪口蹄疫病毒的检测。

**关键词** 猪; 口蹄疫病毒; 3D 基因; xTAG 检测方法

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒、毒株、载体和临床样本

猪口蹄疫病毒(FMDV)灭活抗原、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV)JXA 1 株、猪伪狂犬病 (PRV)活疫苗、猪瘟 (CSFV)弱毒疫苗、猪圆环病毒 2 型 (PCV2)灭活疫苗、细小病毒 (PPV)灭活疫苗购自商用疫苗。临床样本包括: 来源于 2017-2019 年收集到的广东省各市的水泡液、组织等样本,  $-80$  °C 保存, 临床样本共计 15 份。

### 1.2 引物设计与修饰

设计 1 组用于快速检测猪口蹄疫病毒的 xTAG 检测引物组, 用于检测猪口蹄疫病毒的引物对是根据猪口蹄疫病毒的 3D 基因的保守序列设计的; 经过反复试验与筛选后, 得到表 1 中引物序列, 在上游引物的 5' 端通过间隔臂序列添加 tag 序列, 下游

引物的 5' 端添加生物素标记<sup>[1]</sup>。

### 1.3 方法

1) 核酸提取。从猪场采集的水泡液、组织等样本装入离心管中加入适量灭菌的 PBS, 匀浆; 疫苗、组织匀浆液的 PBS 溶液等样品用天根核酸自动抽取仪提取 RNA/DNA, 操作按说明书进行。

2) 质粒标准品制备。用天根的核酸自动抽取仪提取猪口蹄疫病毒的 RNA/DNA 为模板, 使用表 1 中的引物, 进行 RT-PCR 扩增, 将扩增产物分别进行琼脂糖凝胶电泳检测并切胶纯化<sup>[2]</sup>。用 TaKaRa 公司的试剂盒将纯化后的 cDNA 连接至 pMD-19T 载体中, 将连接产物转化至 DH5a 感受态细胞, 挑选单克隆, 进行菌落 PCR 鉴定, 将鉴定为阳性菌的菌落进行质粒抽提, 并对阳性重组质粒测序验证。用质粒提取试剂盒 (OMEGA 公司) 提取质粒, 微量紫外分光光度计测定浓度与纯度, 根据下面的公式计算

表 1 猪口蹄疫病毒引物和 xTAG 标签

种类	上游引物 (5-3)	下游引物 (5-3)	目的基因	扩增大小/bp	磁珠号
FMDV	TACTACTTCTATAACTCACTTAAA-spacer18 -CAGAGATGTGGAAGAGCGCG	GCGGAACAGCGC TTTGTCC	3D gene	208	29

收稿日期: 2020-03-11

崔雨葳, 女, 1993 年生, 助理兽医师。

拷贝数。拷贝数 (copies/ $\mu\text{L}$ ) =  $6.022 \times 10^{23}$  (copies/ $\text{mol}$ )  $\times$  DNA 浓度 (g/ $\mu\text{L}$ ) / 质量 MW (g/ $\text{mol}$ )。其中, MW = DNA 碱基数 (bp)  $\times$  660 daltons/bp, DNA 碱基数 = 载体序列碱基数 + 插入序列碱基数。

3) xTAG 检测方法的建立。表 1 中上游下游引物按等比例进行混合。用 FMDV、PRRSV、CSFV、PRV、PPV、PCV2 的核酸为特异性模板, 分别进行单重检测。

4) PCR 扩增反应体系。2 $\times$ buffer, 10  $\mu\text{L}$ ; 上、下游引物混合液, 1  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{mol/L}$ , final conc.); 酶, 1  $\mu\text{L}$ ; ddH<sub>2</sub>O, 7  $\mu\text{L}$ ; 总体积 20  $\mu\text{L}$ 。

5) 扩增的反应程序。50  $^{\circ}\text{C}$  30 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 15 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s; 循环 35 次; 72  $^{\circ}\text{C}$  终延伸 10 min。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。

6) PCR 产物与荧光编码微球工作液、链霉亲和素藻红蛋白 (SA-PE) 工作液杂交, 包括以下步骤: 包被有特异的 anti-tag 序列的微球, 其中 anti-tag 序列能相应地与猪口蹄疫病毒引物上的 tag 序列互补配对。微球购自 luminex 公司, 荧光编码微球号为 MTAG-A029<sup>[3]</sup>。

7) 荧光编码微球工作液的制备。将 2 500 个/ $\mu\text{L}$  荧光编码微球用 1.1 $\times$ Tm Hybridization Buffer 稀释到 1  $\mu\text{L}$  约含有 125 个/种荧光编码微球。

8) SA-PE 工作液制备。将 1 mg/mL SA-PE 用 1 $\times$ Tm Hybridization Buffer 稀释到 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。充分重悬荧光编码微球工作液, 每个样品孔和背景孔加入微球工作液 20  $\mu\text{L}$ , 样品孔中加入 5  $\mu\text{L}$  PCR 产物, 背景孔中加入 5  $\mu\text{L}$  PCR blank 产物, 再加入 75  $\mu\text{L}$  SA-PE 工作液, 充分混匀, 于金属加热器中 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min。依照检测仪 Luminex 200 仪器的说明将杂交后的 50  $\mu\text{L}$  上述反应液进行检测<sup>[4]</sup>。

9) 最低检测阈值 (cutoff 值) 的确定。选取 10 只健康猪组织样品 (每个样品平行重复 3 次), 分别读取 MFI 值并计算其平均值和标准差。

10) 特异性试验。使用表 1 中的混合引物, 用 FMDV、PRRSV、CSFV、PRV、PPV、PCV2 作为模板进行 xTAG 特异性分析检测。

11) 灵敏性试验。将上述质粒标准品用 Easy dilution (Takara 公司) 做 10 倍系列稀释, 稀释至 10 copies/ $\mu\text{L}$  作为标准模板。利用 1.3.4) 中优化后的反应体系和条件测定各稀释度的荧光信号值。

12) 重复性试验。对 2 份 10 倍系列稀释的质粒标准品  $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^7$  copies/ $\mu\text{L}$  在同一次反应中进行 3 次重复测定, 对不同稀释度的 MFI 值进行统计, 计算每个样品各反应管之间的批内变异系数 (CV%); 对上述样品分别进行 3 次测定, 计算同一样品每次测定结果之间的批间变异系数 (CV%)。

13) 临床样本的检测。从猪场采集的水泡液、组织等样品, 用天根核酸自动抽取仪提取 RNA, 使用 Qiagen 的 RT-PCR 进行扩增, 以 RNA 作为模板, 采用上述建立的猪口蹄疫病毒的 xTAG 检测方法进行检测, 扩增产物与荧光编码微球和 SA-PE 杂交, 在 Luminex200 检测仪上读数。

## 2 结果与分析

### 2.1 质粒标准品的制备

以猪口蹄疫病毒为模板扩增得到产物大小约为 208 bp, 与预期目的片段大小相符。与 pMD19-T 载体连接构建重组阳性质粒, 对重组质粒进行 PCR 鉴定, 条带大小与预期结果相符。重组质粒的测序结果与目的基因序列同源性为 100%, 表明质粒标准品制备成功。

### 2.2 xTAG 方法的建立

最低检测阈值 (cutoff 值) 的确定: 获得 cutoff 值为 389, 因此将 cutoff 值定为 400。只有检测样品的 MFI 值高于 400 时, 该试验数据才能进行有效分析。待测样本的分析判断: ①待测样本的 MFI 值 > 400 时, 判断为阳性样本; ②待测样本的 MFI 值  $\leq$  400 时, 判断为阴性, 需要进行重复试验或采取其他检测方法进一步验证。

### 2.3 特异性试验结果

采用建立的 xTAG 方法对 FMDV、PRRSV、PPV、PRV、CSFV、PCV2 进行检测, 结果表明引物仅能扩增出对应病原核酸片段, 其他病毒均为阴性, 表明建立的方法具有良好的特异性。

### 2.4 灵敏性试验结果

对 10 倍系列稀释的质粒进行检测, 结果表明, 本试验建立的液相基因芯片方法检测的灵敏度可达  $1 \times 10^2$  copies/ $\mu\text{L}$ 。

### 2.5 重复性试验结果

通过对  $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^7$  copies/ $\mu\text{L}$  2 个稀释度质粒标准品样本进行重复性检测, 批内及批间重复性试验的变异系数均小于 3%, 表明建立的 xTAG 方