



猪病毒性腹泻病相关病原的MLPA检测技术的建立及应用

何海健^{1*} 刘正奎^{2*} 吴瑗¹ 王志鹏² 陈琳² 王磊² 周莹珊² 蒋春燕¹ 宋厚辉^{2**} 王晓杜^{2**}

1 金华职业技术学院 农业与生物工程学院, 金华 321007; 2 浙江农林大学 动物科技学院·动物医学院, 杭州 311300

* 同等贡献作者

**通讯作者, xdwang@zafu.edu.cn; songhh@zafu.edu.cn

摘要 每年冬春季爆发于规模化养猪场的腹泻常由不同病毒引起, 临床表现为相似腹泻症状。为了区分临床腹泻样本中的病毒性病原体, 迫切需求建立一种快速同时检测常见6种病毒性腹泻疾病的病原技术。本研究针对猪流行性腹泻病毒(*Porcine epidemic diarrhea virus*, PEDV)S基因、猪传染性胃肠炎病毒(*Transmissible gastroenteritis virus*, TGEV)N基因、猪Delta冠状病毒(*Porcine delta coronavirus*, PDCoV)N基因、猪博卡病毒(*Porcine bocavirus*, pBCaV)NS1基因、猪诺如病毒(*Porcine norovirus*, pNoV)RdRp基因、猪轮状病毒(*Porcine rotavirus*, pRV)NSP1基因的核酸保守区域, 设计多重连接探针扩增技术(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)探针和预扩增引物, 利用MLPA技术和毛细管电泳技术, 建立检测6种疾病病原核酸的检测方法。结果表明, 单一探针检测混合模板, 显示出高度特异性; 混合探针总浓度在1.33 nmol/L时, 各种疾病扩增条带具有特异性且与预期大小一致, pBCaV、pNoV、PDCoV、PEDV、pRV、TGEV分别约为102、110、117、124、131、138 bp。本方法与其他临床疾病如猪繁殖与呼吸综合征病毒(*Porcine reproductive and respiratory syndrome virus*, PRRSV)、猪瘟病毒(*Classic swine fever virus*, CSFV)、伪狂犬病毒(*Pseudorabies virus*, PRV)和猪圆环病毒2型(*Porcine circovirus type 2*, PCV2)没有交叉反应, 特异性佳。pBCaV、pNoV、PDCoV、PEDV、pRV、TGEV检测最低极限值分别为: 7.58×10^1 、 7.56×10^0 、 7.54×10^0 、 7.53×10^0 、 7.50×10^1 和 7.49×10^0 copies/ μ L。组间和组内重复性好, 利用本方法检测临床收集和模拟样本67份, PEDV与病毒分离方法100%符合, pRV、TGEV、pBCaV、pNoV、PDCoV与病毒模拟样本符合率达到100%。本研究为临床提供一种新型的可同时检测6种腹泻病原的技术, 为临床疾病防控快速反应提供技术支持。

关键词 猪病毒性腹泻; 多重连接探针扩增技术(MLPA); 毛细管电泳; 灵敏度

中图分类号 S855.3 **文献标识码** A

Establishment and Application of Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification Assay for Identification of Pathogens Causing Porcine Viral Diarrhea Diseases

HE Hai-Jian^{1*} LIU Zheng-Kui^{2*} WU Yuan¹ Wang Zhi-Peng² CHEN Lin² WANG Lei² ZHOU Ying-Shan² JIANG Chun-Yan¹ SONG Hou-Hui^{2**} WANG Xiao-Du^{2**}

1 College of Agricultural and Biological Engineer, Jinhua Polytechnic, Jinhua 321007, China; 2 College of Animal Science and Technology·College of Veterinary Medicine, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, China

* The authors who contribute equally

**Corresponding authors, xdwang@zafu.edu.cn; songhh@zafu.edu.cn

基金项目: 金华市农业类重点项目(2018-2-004; 2019-2-012); 国家自然科学基金面上项目(31972656); 浙江省科技重点研发计划项目(2018C02028); 浙江省自然科学基金资助项目(LY16C180001)

收稿日期: 2019-11-25 接受日期: 2020-04-20

Abstract Diarrhea of piglets in large-scale farms is often caused by different viruses, which have similar clinical symptoms in winter and spring. In order to distinguish the pathogens in clinical samples of viral diarrhea, it is urgent to establish a rapid and simultaneous detection technology for viral nucleic acid of six viral diarrhea diseases. In this study, the probes and pre-amplification primers for multiple restriction probe amplification (MLPA) were designed countering for the conserved regions of nucleic acids of *Porcine epidemic diarrhea virus* (PEDV) *S* gene, *Transmissible gastroenteritis virus* (TGEV) *N* gene, *Porcine delta coronavirus* (PDCoV) *N* gene, *Porcine Bocavirus* (pBCaV) *NS1* gene, *Porcine norovirus* (pNov) *RdRp* gene, *Porcine rotavirus* (PRV) *NSP1* gene. The method of detecting nucleic acid of 6 diseases was established using MLPA and capillary electrophoresis. The results showed that the detection of the 6 mixed templates by a single probe showed a high specificity. When the total concentration of the mixed probes were 1.33 nmo/L, and the specific amplified bands of various diseases were the same as expected, with the products of pBCaV (102 bp), pNov (110 bp), PDCoV (117 bp), PEDV (124 bp), pRV(131 bp) and TGEV (138 bp). This method had no cross reaction with other clinical diseases about *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV), *Classic swine fever virus* (CSFV), *Pseudorabies virus* (PRV) and *Porcine circovirus type 2* (PCV2). The minimum limit values for detecting nucleic acid of pBCaV, pNoV, PDCoV, PEDV, pRV, TGEV were 7.58×10^1 , 7.56×10^0 , 7.54×10^0 , 7.53×10^0 , 7.50×10^1 and 7.49×10^0 copies/ μ L, respectively. The repeatability between and within groups was well. The results of 67 clinical and simulated samples by this method showed that PEDV were 100% in accordance with the virus isolation method, pBCaV, pNoV, PRV, TGEV and PDCoV were 100% in accordance with simulated virus. This study provides a new technology for detecting 6 clinical diarrhea pathogens simultaneously, and for the rapid response of clinical disease prevention and control.

Keywords Porcine viral diarrhea diseases; Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA); Capillary electrophoresis; Sensitivity

引起猪(*Sus scrofa*)腹泻的因素很多,比如:微生物等病原体(病毒;细菌;寄生虫)、环境等诱发因素(中毒性;环境应激)引起的,而由病毒引起的腹泻是危害最严重和最难以防控的一类传染性疾病,各种年龄猪都可发病,尤其是3~10日龄仔猪最易发病。猪的病毒性腹泻相关病原常包括:猪流行性腹泻病毒(*Porcine epidemic diarrhea virus*, PEDV)(Zuo et al., 2018)、猪传染性胃肠炎病毒(*Transmissible gastroenteritis virus*, TGEV)(Wang et al., 2019)、猪Delta冠状病毒(*Porcine delta coronavirus*, PDCoV)(McCluskey et al., 2016)、猪博卡病毒(*Porcine bocavirus*, pBCaV)(Blomstrom et al., 2009)、猪诺如病毒(*Porcine norovirus*, pNoV)(Silva et al., 2015)、猪轮状病毒(*Porcine rotavirus*, pRV)(Tatte et al., 2019)等。PEDV、TGEV、PDCoV都属于冠状病毒科冠状病毒属,一种有囊膜的单股正链RNA病毒(Koonpaew et al., 2019); pBCaV属于细小病毒科细小病毒亚科博卡病毒属,一种无囊膜的单股DNA病毒(McMenamy et al., 2013); pNoV是杯状病毒科诺如病毒属的一种无包膜单股正链RNA病毒(Shen et al.,

2012); pRV属于呼肠孤病毒科一种双链RNA病毒(Tuanthap et al., 2019),这几类病毒常在仔猪肠道上皮细胞内定植,感染后引起严重的水样腹泻,症状非常相似,临床上很难区分,及时准确区分病原,有利于养殖场建立针对其确切病原的免疫防控措施,而要达到此目的需要一种方便快捷准确的检测技术进行鉴别诊断。

多重连接探针扩增技术(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)是一种新的核酸检测技术(Massalska et al., 2013)。其原理是利用MLPA探针与靶标核酸进行退火杂交,然后利用连接酶进行连接,再利用通用引物进行PCR扩增,不同疾病获得不同大小扩增产物,利用毛细管电泳高分辨率,从而实现检测产物的特异性和高灵敏度分析。MLPA建立的关键是科学设计长探针和短探针,既要保障探针识别靶序列的保守性,又要考虑区分不同疾病扩增产物的大小差异,常见设计时不同疾病大小差异5~10个碱基,结合毛细管电泳完成对单个碱基差异的产物鉴定。目前该技术广泛用于肿瘤疾病突变体筛查(Turan et al., 2019)、遗

传染病筛查(Arunachalam et al., 2019)、多种传染性
疾病检测(Jia et al., 2014)、表观遗传学的修饰检测
(Kim et al., 2019)等。

本研究选取猪腹泻相关的6种猪病毒性腹泻
病毒相对保守基因(pBCaV的NS1、pNoV的RdRp、
PDCoV的N、PEDV的S、RV的NSP1、TGEV的N基
因,基因全称见表1)的保守序列,设计6对预扩增
引物和特异性杂交探针,利用MLPA扩增、毛细管
电泳分析扩增片段大小,建立一种同一反应体系检
测6种猪病毒性腹泻病毒核酸的MLPA方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒及临床样品

本研究所涉及到的pBCaV、pNoV、PDCoV、
PEDV、pRV、TGEV等腹泻相关病毒,猪繁殖与呼
吸综合征病毒(*Porcine reproductive and respiratory
syndrome virus*, PRRSV)、猪瘟疫病毒(*Classic swine fe-
ver virus*, CSFV)、伪狂犬病病毒(*Pseudorabies virus*,
PRV)和猪圆环病毒2型(*Porcine circovirus 2*, PCV2)
来自浙江农林大学动物预防医学与公共卫生实验
室;pBCaV由广东省农业科学院动物卫生研究所
惠赠。临床样品采集于浙江省各地规模化养殖场。

1.1.2 试剂

2×PCR Mix购自南京诺唯赞生物技术有限公
司(南京);RNA反转录试剂盒购自杭州硕盟生物
技术有限公司(杭州);一步法RT-PCR试剂盒50T
购自QIAGEN公司(上海);DNA标准品、TRIzol试
剂盒购自TAKARA公司(大连);病毒基因组DNA/
RNA提取试剂盒、质粒小提试剂盒和其他常规分
析纯化学试剂购自上海生工生物工程有限公司
(上海)。

1.2 方法

1.2.1 MLPA探针和PCR预扩增引物设计

选用NCBI GenBank数据库中pBCaV-NS1
(GenBank No. NC_023673.1)、pNoV-RdRp(Gen-
Bank No. EU448331)、PDCoV-N(GenBank No.
MF041982)、PEDV-S(GenBank No. NC_003436)、
pRV-NSP1(GenBank No. KU886308)、TGEV-N
(GenBank No. NC_038861)基因(基因全称见表1),

各种病毒选取代表性毒株10株,对不同株之间的
核苷酸序列进行差异比对,选择其保守序列作为模
板,采用Primer Premier 7.0软件,分别设计针对每
个病毒基因的特异性MLPA探针和一步法RT-PCR
预扩增引物,由苏州金唯智生物科技有限公司合
成。其MLPA探针序列和一步法RT-PCR预扩增引
物序列分别见表1和表2。

1.2.2 MLPA方法的阳性质粒构建

依据病毒基因组DNA/RNA提取试剂盒说明
书的操作指南,选取本研究中6种病毒的病毒液
300 μL,提取6种病毒的基因组(RNA或DNA),使
用随机引物合成cDNA,预扩增引物扩增含有上游
杂交序列(left hybridizing sequence, LHS)和下游杂
交序列(right hybridizing sequence, RHS)特异性病
毒序列的片段,利用pGH-T构建重组质粒,分别采
用PCR鉴定和测序技术鉴定阳性重组质粒,针对
pBCaV、pNoV、PDCoV、PEDV、pRV、TGEV的阳
性质粒分别命名为pSL2000、pSL2001、pSL2002、
pSL2003、pSL2004、pSL2005。

1.2.3 MLPA方法的检测条件

1)预扩增:按照如下要求配制体系:一步法RT-
PCR 5×缓冲液2.5 μL, dNTP 缓冲液0.5 μL,上/下
游引物为0.75/0.75 μL, RNase-free H₂O 2.5 μL,
RT-PCR 酶0.5 μL, 5×Q-Solution 2.5 μL, RNA/DNA
模板(或阳性质粒模板混合液)5 μL,总体积15 μL。
PCR扩增条件:50 °C 30 min, 95 °C 15 min; 94 °C 1
min, 56 °C 0.5 min, 72 °C 1 min,共30个循环;15 °C
2 min。

2) MLPA步骤:(a)DNA变性:核酸样品预扩增
后取5 μL到新的EP管,在PCR仪上98 °C预处理5
min,冷却至16 °C;(b)探针与样本DNA的杂交:在a
步骤的管中加入按照浓度要求混合均匀的探针1.5
μL和MLPA杂交缓冲液1.5 μL,混合均匀后,95 °C
保温1 min,然后60 °C 孵育4 h,温度降至54 °C时
暂停PCR仪;(c)杂交探针的连接:打开PCR内管
盖,加入32 μL连接酶混合液(3 μL连接酶缓冲液
A, 3 μL连接酶缓冲液B, 25 μL无RNA酶的H₂O,
1 μL ligase-65),54 °C 孵育15 min,98 °C加热5 min
变性灭活连接酶;(d)PCR扩增:PCR仪温度降至
16 °C,打开PCR管,加入10 μL PCR混合物(7.5 μL
RNase-free H₂O, 2 μL PCR Mix, 0.5 μL PCR 酶),盖
好盖后进行PCR扩增,扩增条件为:95 °C 30 s,

表1 6种猪腹泻病毒多重连接探针扩增技术(MLPA)探针序列

Table 1 MLPA probe sequences of Six porcine diarrhea virus

病毒	基因	基因全称	探针名称	序列(5'~3')	片段大小/bp
Viruses	gene	Gene full name	Probe name	Sequence (5'~3')	Fragment size
pBCaV	NS1	非结构蛋白1 Nonstructural protein 1	PBoV-LHS	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAC CTGGCTGGGTCCAGATATCTG - CACTCCGA	102
			PBoV-RHS	GCGTAGCTCAGTTTGTAGTCCAACAAGACCTTCTAGATTG - GATCTTGCTGGCAC	
pNoV	RdRp	RNA 依赖RNA 聚合酶 RNA dependent RNA polymerase	NoV-LHS	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAT CAATGAGGGTCTTCCCTCT - GGGGTGCCCTGCGC	110
			NoV-RHS	CTCCCAATGGAACCTCCATCGCCCACTGGCTCCTCTCTAG - ATTGGATCTTGCTGGCAC	
PDCoV	N	核蛋白 Nucleoprotein	PDCoV-LHS	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACT TAACTCCGCCATCAAACCC - GTTGAAAACCATGGCTA	117
			PDCoV-RHS	CTGGCTGCGTTACACCAGACAAAAGCCAGGTGGCACTTCTA - GATTGGATCTTGCTGGCAC	
PEDV	S	纤突蛋白 Spike protein	PEDV-LHS	GGGTTCCCTAAGGGTTGGATT TCAATCACAAGGGT - GAGTTGATTACTGGCACGCCTAA	124
			PEDV-RHS	CCACTGAAGGTGTTACGGACGTTTCTTTTATGACTCTG - GTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	
pRV	NSP1	非结构蛋白1 Nonstructural protein 1	RV-LHS	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACT TCCTTCAAAGTGCATCTTCT - GCTGAATTCAAAACTACCATC	131
			RV-RHS	TAATAATTACTATCGCGCTGCCTTGATTGCTTTGCTATTCCG TTTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	
TGEV	N	核蛋白 Nucleoprotein	TGEV-LHS	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAT GGCCAACCAGGACAACGTGTCA - GTTGGGGAGATGAATCTACAAAA	138
			TGEV-RHS	CACGTGGTCGTTCCAATTCCTGGTCGGAAGAATAATAACAT ACCTCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	

加粗黑体碱基:MLPA 通用序列;LHS:左侧杂交序列;RHS:右侧杂交序列

Base of bold boldface type: Universal sequence of MLPA; LHS: Left hybridizing sequence; RHS: Right hybridizing sequence

60 °C 30 s, 72 °C 60 s, 35 个循环; 72 °C 孵育 20 min, 降至 15 °C 2 min; (e) 毛细管电泳: 从 PCR 仪中取出 2 μL 产物, 按照 Qseq100 仪器操作指南进行检测分析。

3) MLPA 探针的优化: 以 pBCaV、pNoV、PDCoV、PEDV、pRV 和 TGEV 的预扩增产物为模板, 分别配置混合探针的总浓度分别为 0.33、0.66、1.33、2.66 和 5.32 nmol/L 的探针浓度, 其中各探针浓度均等, 按照 1.2.3 的 2) MLPA 实验步骤开展实验, 以超纯水作为阴性对照。分析实验结果, 确定最佳的探针反应浓度。

1.2.4 MLPA 的特异性

1) 单一探针特异性

以 pBCaV、pNoV、PDCoV、PEDV、pRV 和

TGEV 的阳性质粒混合物为模板, 分别采用 6 种病毒的单一探针为对象, 浓度采用 1.2.3 步骤 3) 筛选到的每种病毒 MLPA 探针浓度 (0.11 nmol/L), 按照 1.2.3 的步骤 2) 进行 MLPA 扩增, 以确定其单一探针特异性。

2) 混合探针特异性

分别选用 pBCaV、pNoV、PDCoV、PEDV、pRV、TGEV 以及其他临床常见病毒 PRRSV、CSFV、PRV 和 PCV2 单一模板, 使用六种病毒的混合探针 (总浓度 1.33 nmol/L, 各种探针浓度为 0.11 nmol/L), 按照 1.2.3 的步骤 2) 进行 MLPA 扩增, 以确定混合探针的特异性。

1.2.5 MLPA 的灵敏性

阳性质粒以 10 倍系列稀释为 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^1$

表2 6种猪腹泄病毒MLPA方法的一步法预扩增引物序列

Table 2 One-step pre-amplification primer sequence of six porcine diarrheavirus for MLPA

病毒	靶基因	引物名称	序列(5'~3')
Viruses	target gene	Primer name	Sequence (5' ~ 3')
pBCaV	NSI	PBoV-fwd	CCTGGCTGGGTCCAGA
		PBoV-rev	AGGTCTTGTGGACTCAAACCTG
pNoV	RdRp	NoV-fwd	CGCACAGAGGGTGAGG
		NoV--rev	GTGGTGGACGTGGGC
PDCoV	N	PDCoV-fwd	TAGGATGGAGGAATCGGAGT
		PDCoV-rev	GGCAATGGAGTTCGCG
PEDV	S	PEDV-fwd	TTGCAATCTGTTAATGATTACCTGTCTTTTAGCA
		PEDV-rev	TGTCCAGAATCAGATGTATAATAAACACCTGC
pRV	NSPI	RV-fwd	CTTCCTCAAAGTGCATCTTCTG
		RV-Rev	AAGCGAATAGCAAAGCAATCAAG
TGEV	N	TGEV-fwd	TGGCCAACCAGGGACA
		TGEV-rev	GAGGTATGTTATTATTCTTCCGACCAC

copies/ μL (浓度计算公式: $(6.02 \times 10^{23}) \times (\text{ng}/\mu\text{L} \times 10^{-9}) / (\text{DNA 碱基数} \times 660) = \text{copies}/\mu\text{L}$)不同浓度,分别取6种病毒的相同浓度作为模板,利用1.2.3建立的MLPA方法进行分析,计算该方法检测各种病毒核酸的灵敏度。

1.2.6 MLPA的重复性

分别取5 μL 6种病毒的阳性质粒标准品作为模板,浓度分别为 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 copies/ μL ,利用1.2.3建立的MLPA方法进行检测分析。同一次实验为组内样品,分别设置3个浓度,每个浓度设置3个重复;组间样品为选取3个同批次的样本,相隔一周进行检测,上述3个浓度设置重复。依据MLPA的峰面积值(RFU值),利用统计学方法分别计算组内和组间的变异系数(CV%),并进行t检验分析其是否存在显著性差异。

1.2.7 临床样品检测

依据1.2.3建立的MLPA检测方法,对67份样品(临床分离的PEDV病毒液13份,小肠组织1份,肛门拭子38份,pBCaV、pNoV、PDCoV、pRV、TGEV病毒不同浓度(1×10^{-5} TCID₅₀/0.1 mL, 1×10^{-3} TCID₅₀/0.1 mL, 1×10^{-1} TCID₅₀/0.1 mL)分别添加至细胞培养基中模拟临床样本各3份)进行检测,提取临床样品核酸,以质粒标准品为阳性对照,正常细胞培养上清为阴性对照,MLPA的检测方法与实时荧光定量RT-PCR的方法及病毒分离鉴定结果进行比较分析。

2 结果与分析

2.1 6种病原阳性标准品制备

6株病毒(pBCaV, pNoV, PDCoV, PEDV, pRV和TGEV)液分别提取病毒核酸,利用预扩增引物进行PCR扩增,所获得产物进行T-A克隆和PCR鉴定(图1),送杭州有康生物公司测序验证重组质粒构建成功,使用多功能酶标仪测定浓度并换算其拷贝数浓度为 1×10^9 copies/ μL , -20 $^{\circ}\text{C}$ 贮存备用。用灭菌Tris和EDTA缓冲液进行10倍系列稀释,制备成浓度为 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^0$ copies/ μL 的阳性标准品。

2.2 MLPA探针浓度优化

混合探针的浓度优化,以pBCaV、pNoV、PDCoV、PEDV、pRV和TGEV的混合DNA/cDNA(每

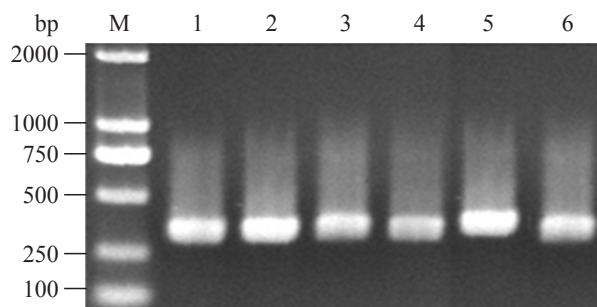


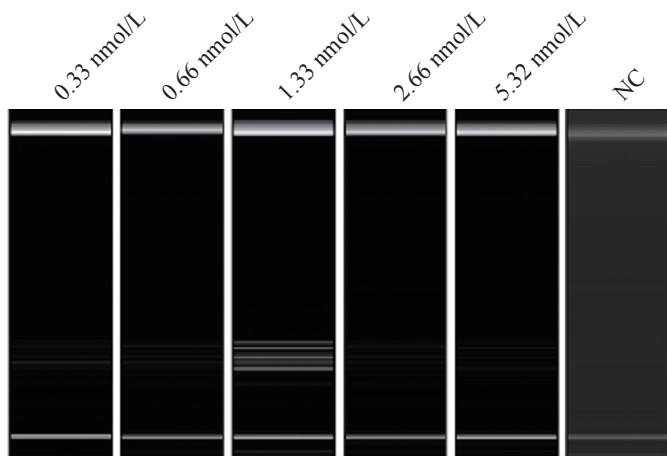
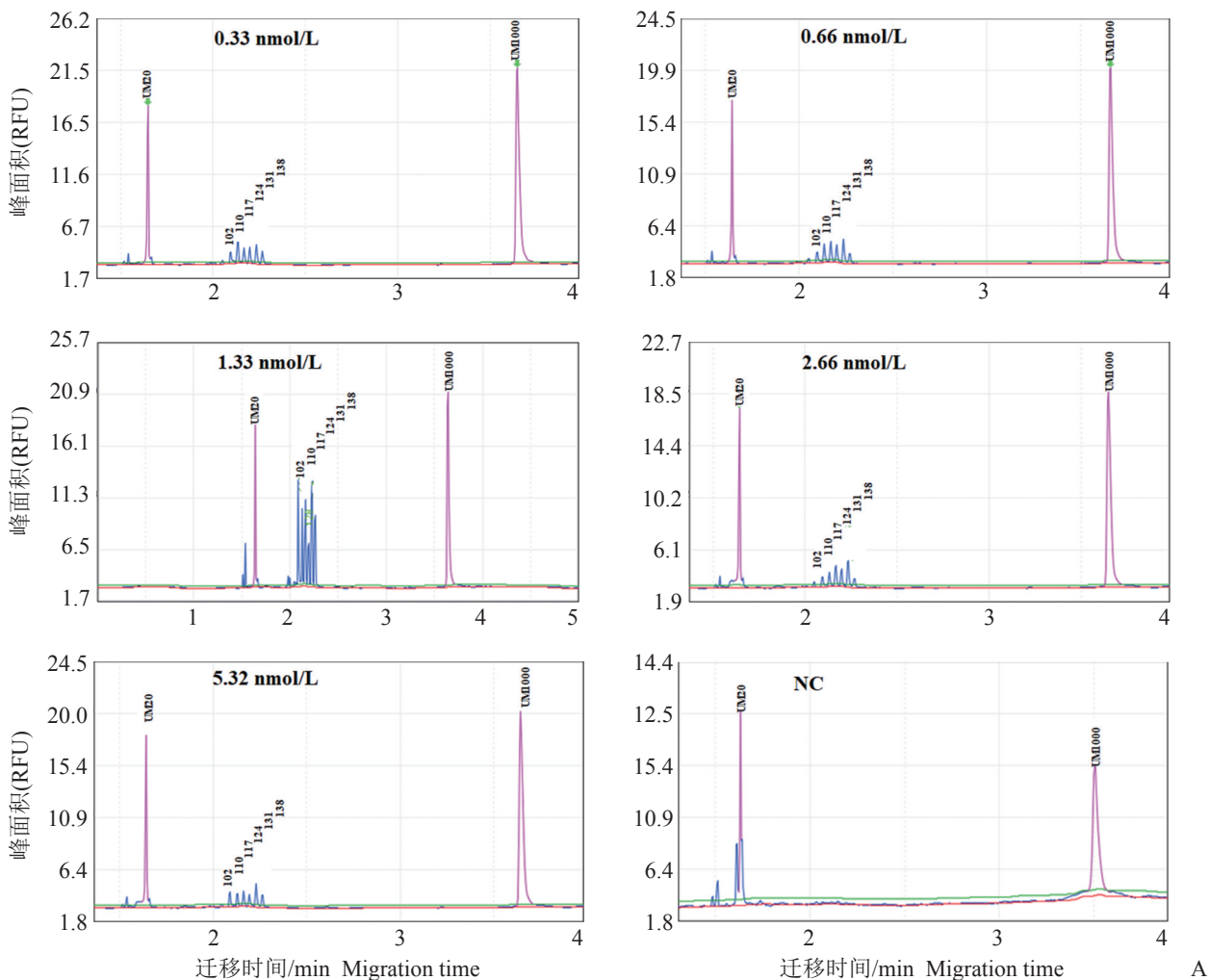
图1 6种病毒目的基因PCR扩增

Figure 1 Amplification of target gene of six viruses

M: DL2000 DNA Marker; 1~6: pBCaV, pNoV, PDCoV, PEDV, pRV and TGEV

种病原 DNA/cDNA 为 1 μL, 浓度为 1×10⁴ copies/μL, 总模板量为 6 μL) 为模板, 12 个探针按照相同浓度混合, 最终探针总浓度分别为 0.33、0.66、1.33、2.66 和 5.32 nmol/L, 进行 MLPA 扩增实验, 结

果表明, MLPA 混合探针浓度在 1.33 nmol/L 时(各不同探针浓度均为 0.11 nmol/L), 其扩增有较好的峰图, 扩增效率最佳, 各种疾病扩增条带与预期大小一致, pBCaV、pNoV、PDCoV、PEDV、pRV、



NC 超纯水(阴性对照)
Ultra-pure water (Negative control)

B

图 2 混合探针的浓度优化峰图(A)及胶图(B)

Figure 2 Peak plot (A) and glue plot (B) of optimized of mixed probe concentration

TGEV 分别约为 102、110、117、124、131、138 bp, 所以本研究选取该浓度为 MLPA 的探针浓度(图 2)。

2.3 特异性

2.3.1 单一探针的特异性

分别以 pBCaV、pNoV、PDCoV、PEDV、pRV 和 TGEV 单一 MLPA 探针构建扩增体系, 以 6 种病毒的混合 DNA/cDNA(平均浓度)为模板, 并设细胞培养上清和正常猪组织 DNA/RNA 样品为阴性对照, 设置临床常见病毒(PRRSV、CSFV、PCV2 和 PRV)核酸为对照, 进行 MLPA 扩增和分析。结果表明: 在含有 6 种腹泻病毒探针的反应体系中, 每一种病毒作为模板时, 仅出现针对自身反应的特异条带, 各反应体系 MLPA 扩增大小分别为: pBCaV 约 102 bp、pNoV 约 110 bp、PDCoV 约 117 bp、PEDV 约 124 bp、pRV 约 131 bp、TGEV 约 138 bp(图 3), 未出现其他非特异条带, 阴性也无其它任何条带; 6 个探针单独与临床其他病毒反应, 无特异性条带和扩增峰(结果未显示)。

2.3.2 混合探针的特异性

以 pBCaV、pNoV、PDCoV、PEDV、pRV 和 TGEV 探针混合构建 MLPA 检测体系, 分别用 pBCaV、pNoV、PDCoV、PEDV、pRV、TGEV、PRRSV、CSFV、PRV 和 PCV2 单一模板, 和六种病毒性腹泻

病原混合物作为模板, 并设阴性对照和临床常见病毒对照, 进行 MLPA 反应。结果显示: 混合探针体系针对单一模板扩增时, 分别扩增出预期的特异性条带, 峰图和凝胶图显示单一条带(图 4)。混合有 6 个探针的体系里面, 针对混合 6 种病毒的 RNA/DNA 模板, 分别获得 6 个特异的扩增峰(图 4A)和 6 条特异的模拟凝胶条带(图 4B), 对于临床上常见的 PRRSV、CSFV、PRV、PCV2 没有显示任何条带和扩增峰。

2.4 灵敏度

以 pBCaV、pNoV、PDCoV、PEDV、pRV 和 TGEV 探针混合构建 MLPA 体系, 对 6 种猪腹泻病毒阳性质粒分别按照 10 的倍数分别稀释为 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{-1}$ copies/ μL 作为模板, 进行 MLPA 扩增和毛细管电泳。结果显示(图 5 和表 3): 6 种猪腹泻病毒检测最低极限值分别为: pBCaV(7.58×10^1 copies/ μL)、pNoV(7.56×10^0 copies/ μL)、PDCoV(7.54×10^0 copies/ μL)、PEDV(7.53×10^0 copies/ μL)、pRV(7.50×10^1 copies/ μL)和 TGEV(7.49×10^0 copies/ μL)。

2.5 重复性实验

将 pBCaV、pNoV、PDCoV、PEDV、pRV 和 TGEV 阳性质粒混合后, 分别按照 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 copies/ μL 稀释, 按照 1.2.6 方法进行组内和组间

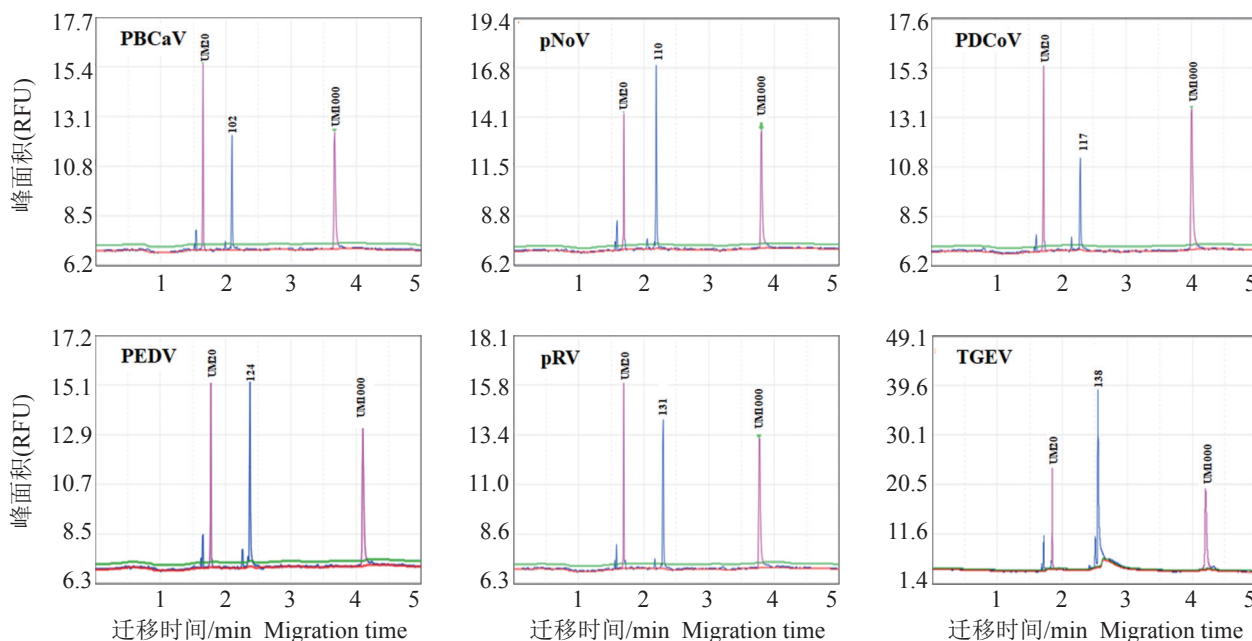


图 3 单一 MLPA 探针混合模板的特异性分析

Figure 3 Specificity analysis of single probe for mixed templates by MLPA

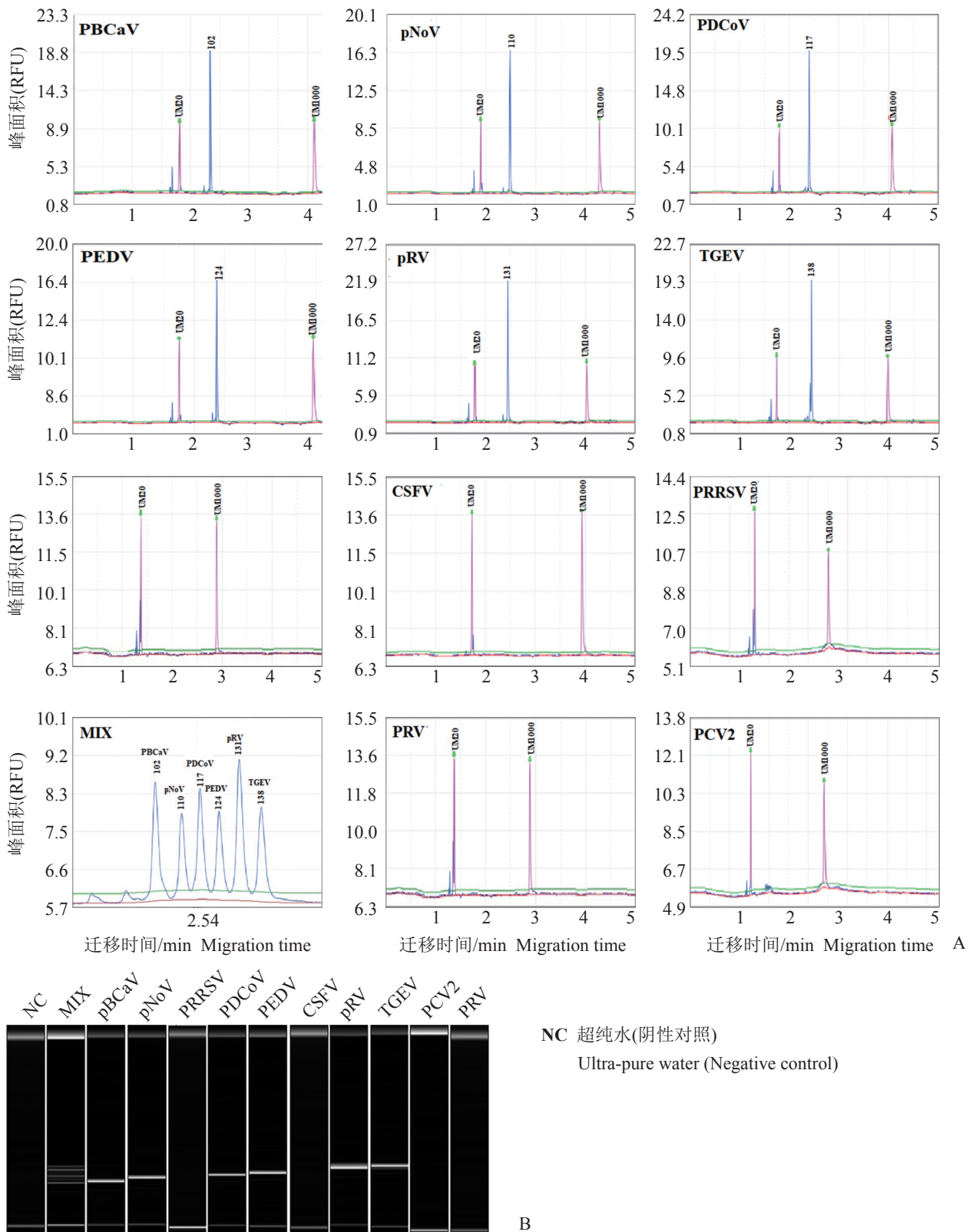


图4 混合探针的特异性分析峰图(A)及胶图(B)

Figure 4 Peak plot (A) and glue plot (B) of specific analysis of mixedprobes for mixed templates by MLPA

重复性实验。结果显示:组内实验的每一种疾病同一浓度的变异系数都低于3%,组间实验结果显示不同批次、每一种疾病同一个浓度的变异系数都低于2%(表4)。

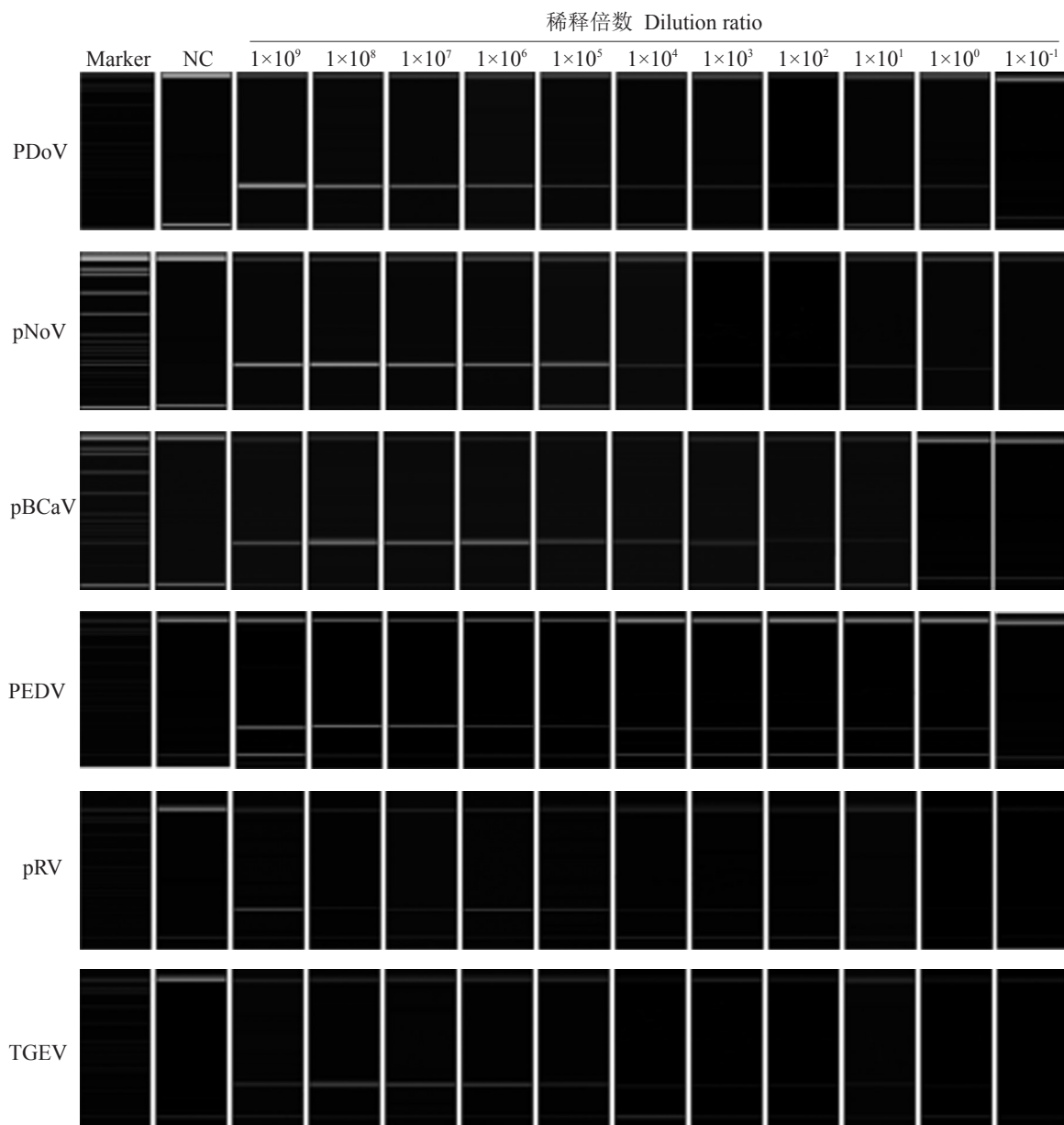


图5 6种病毒性疾病 MLPA 检测技术的灵敏度分析

Figure 5 Sensitivity analysis of six viral nucleic acid by MLPA

NC: 超纯水(阴性对照)

NC: Ultra-pure water (Negative control)

2.6 临床样品检测和MLPA的符合性

依据 1.2.3 建立的针对 6 种猪病毒性腹泻疾病病原核酸的 MLPA 检测方法,对 67 份样品进行检测。结果显示:PEDV 阳性率为 35.82%[95%CI=24.5%~48.5%], pRV 阳性率为 5.97%[95% CI = 1.7%~14.6%], TGEV 阳性率为 5.97%[95% CI = 1.7%~14.6%], pBCaV、pNoV、PDCoV 阳性率则都为 4.48%[95% CI = 0.9%~12.5%](表 5)。其中 13 份病毒分离鉴定为 PEDV 阳性样本,本方法也检测为

表3 MLPA 检测方法灵敏度分析

Table 3 Sensitivity analysis of MLPA

病毒名称	检测极限值/(copies·μL ⁻¹)
Name of virus	Detection limit
pRV	7.50×10 ¹
PEDV	7.53×10 ⁰
TGEV	7.49×10 ⁰
PDCoV	7.54×10 ⁰
pNoV	7.56×10 ⁰
pBCaV	7.58×10 ¹

阳性,与病毒分离方法符合率100%,同时肛门拭子中检测出11份PEDV,其他病毒则未检出。由于临床样本中主要以PEDV为主,pRV和TGEV在小肠组织中检测到,其他病毒没有检测到,本研究同时利用实验室已知病毒(pBCaV, pNoV, PDCoV, pRV和TGEV)模拟临床样本,MLPA检测结果表明,添加实验室病毒的模拟样本都被检测未阳性,其符合率也达到100%。

3 讨论

临床中很多疾病表现出同一症状,且往往是多个

病原体同时混合感染,特别是病毒性腹泻表现得更加突出,主要病原为PEDV、TGEV、pRV、PDCoV等。张双翔等(2016)对2013~2015年贵州省7个市(州)采集的35个规模养猪场316份仔猪腹泻粪便样品进行病原核酸检测,结果表明PEDV阳性率为62.43%,TGEV阳性率为7.91%,pRV阳性率为11.76%。何颖等(2019)研究表明近几年在我国单独感染主要以PEDV为主,混合感染主要以PEDV+PDCoV和PEDV+pRV双重感染为主。猪诺如病毒归属于诺如病毒的G II型(Yang et al., 2019),在中国、美国等地猪场都有流行(Shen et al., 2012)。PDCoV在河南规模

表4 组间和组内MLPA检测方法的重复性

Table 4 Repeatability of MLPA between and within groups

项目 Project	浓度/(copies·μL ⁻¹) Concentration	组内试验 In group test		组间试验 Intergroup test	
		RFU($\bar{X}\pm SD$) RFU ($\bar{X}\pm SD$)	变异系数(CV)/% Coefficient of variation	RFU($\bar{X}\pm SD$) RFU ($\bar{X}\pm SD$)	变异系数(CV)/% Coefficient of variation
pRV	1×10 ⁷	40.51±0.67	1.65	39.98±0.79	1.25
	1×10 ⁶	36.19±0.33	0.92	35.68±0.45	0.35
	1×10 ⁵	30.06±0.24	0.79	31.25±0.56	0.52
PEDV	1×10 ⁷	35.27±0.41	1.17	34.89±0.44	0.96
	1×10 ⁶	29.54±0.19	0.06	28.51±0.25	0.12
	1×10 ⁵	25.23±0.24	0.10	24.89±0.45	0.56
TGEV	1×10 ⁷	37.13±0.52	1.40	38.11±0.65	0.98
	1×10 ⁶	31±0.71	2.30	30.51±0.82	1.16
	1×10 ⁵	26.56±0.41	1.54	24.52±0.62	1.34
PDCoV	1×10 ⁷	36.37±0.19	0.05	35.26±0.23	0.09
	1×10 ⁶	28.48±0.33	1.16	27.26±0.35	1.23
	1×10 ⁵	24.01±0.17	0.07	23.41±0.56	0.52
pNoV	1×10 ⁷	32.09±0.16	0.05	33.26±0.23	0.18
	1×10 ⁶	27.85±0.27	0.09	26.85±0.33	0.23
	1×10 ⁵	23.78±0.53	2.22	22.35±0.45	1.15
pBCaV	1×10 ⁷	32.20±0.33	1.03	31.56±0.25	0.96
	1×10 ⁶	25.35±0.70	2.77	26.32±0.65	1.56
	1×10 ⁵	20.54±0.36	1.73	19.98±0.29	1.23

表5 MLPA方法检测临床样本的结果

Table 5 Results of clinic samples by MLPA

病毒名称 Name of virus	阳性样本/个 Positive samples	阴性样本/个 Negative sample	阳性率/% Positive rate	95%置信区间(CI)/% 95% Confidence interval
pRV	4	63	5.97	1.7~14.6
PEDV	24	43	35.82	24.5~48.5
TGEV	4	63	5.97	1.7~14.6
PDCoV	3	64	4.48	0.9~12.5
pNoV	3	64	4.48	0.9~12.5
pBCaV	3	64	4.48	0.9~12.5

化猪场流行率达到23.49%(Zhang et al., 2019)。猪博卡病毒在新疆地区仔猪中流行率为5.77%(Meng et al., 2018)。因此,在我国猪场仔猪腹泻临床样本的病原复杂情况下,本研究建立一种同时区分几种病原体的MLPA方法将有利于疫病的防控。

MLPA技术主要应用在疾病的遗传筛查,但在检测疫病方面也有大量研究,在其构建中需要注意以下问题:设计LHS和RHS选取基因的保守区域,且选取的区域应该直接相连;LHS和RHS的长度大于或等于21个核苷酸;探针长度最佳大小在100~140 bp之间;每个杂交探针(LHS和RHS)的 T_m 值应大于71℃(绝对值 ≥ 68 ℃);二级结构的 $\Delta G \geq 0$; GC含量尽量接近50%。采用以上原则,构建MLPA方法的成功几率就会大大增加。史喜菊等(2013)利用以猪流感病毒、伪狂犬病病毒、口蹄疫病毒、猪传染性胃肠炎病毒和猪繁殖与呼吸综合症病毒为研究对象,建立了同时检测这5种病毒的MLPA扩增方法,扩增条带特异,最低检测核酸为3 000~6 000个拷贝;史喜菊等(2017)建立针对蓝舌病、牛传染性鼻气管炎、牛病毒性腹泻、牛地方流行性白血病和口蹄疫等病毒的MLPA方法,扩增条带特异,最低检测核酸为2 000个拷贝。周莹珊等(2019)针对猪猝死综合征的病原(猪尼帕病毒、非洲猪瘟病毒、猪产气荚膜梭菌和猪胸膜肺炎放线杆菌)建立MLPA检测方法,最低检测限可以达到140~370拷贝/反应。临床中采用荧光定量PCR或RT-PCR等技术开展病原核酸检测,Zhou等(2017)检测PEDV病毒时比较了传统RT-PCR, SYBR green I 和 TaqMan 探针荧光定量RT-PCR等技术的灵敏度, Taqman 探针荧光定量RT-PCR技术优于其他方法,检测最低限达到10 copies/ μL 。一种实时反转录重组酶PCR技术(Real-time reverse-transcription recombinase polymerase amplification assay, RT-RPA)能在40℃反应20 min就能完成对PEDV变异和经典毒株的检测,检测的最低限为23 copies/反应(Wang et al., 2018)。尽管这些方法灵敏度比较高,但是相比MLPA而言,针对同一临床症状,它们一个反应只能检测一种疾病,而MLPA检测技术则能一个反应检测6种及以上疾病,达到一次检测就能区分真正的病原。

本研究建立检测多种猪病毒性腹泻相关病原的MLPA检测方法,实现了在同一MLPA反应管中,检测6种猪病毒性腹泻疾病病毒,节省了检测时间和检测费用,提高了检测效率。而且本研究建

立的MLPA检测方法对pBCaV、pNoV、PDCoV、PEDV、pRV和TGEV 6种病毒的检测灵敏度较高,最低检测限低于10个拷贝/ μL ,优于前人建立传统RT-PCR和其他MLPA方法,甚至达到检测单一病原体的实时定量RT-PCR法水平,这主要得益于本研究方法加入了预扩增步骤,采用特异性高的引物,RT-PCR或PCR扩增出临床样本中少量病毒核酸,提高了MLPA技术的灵敏度。

4 结论

本研究建立的MLPA检测技术具有高度的特异性,组间和组内重复性好。利用本方法检测临床样本67份,与病毒分离方法100%符合,检测准确率达到100%。本研究为临床提供一种新型的、一次反应同时检测6种腹泻相关病毒的技术,为临床疾病防控快速反应提供技术支持。

参考文献

- 何颖,秦毅斌,段群棚,等. 2019. 2013-2018年广西部分规模猪场主要病毒性腹泻疫病流行病学调查研究[J]. 中国动物传染病学报, 27(3): 86-93. (He Y, Qin Y B, Duan Q P, et al. 2019. Epidemiological investigation of major viral diarrhea diseases during 2013-2018 on some scale pig farms in Guangxi province [J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 27(3): 86-93.)
- 史喜菊,马贵平,柏亚铎,等. 2017. 多重连接探针扩增对5种牛病毒同步检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 37(2): 224-230. (Shi X J, Ma G P, Bai Y D, et al. 2017. Simultaneous detection of five bovine viruses by multiplex ligation-dependent probe amplification [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 37(2): 224-230.)
- 史喜菊,马贵平,乔彩霞,等. 2013. 多重连接探针扩增(MLPA)技术同时检测五种病毒的研究[J]. 农业生物技术学报, 21(6): 745~752. (Shi X J, Qiao C X, et al. 2013. Simultaneous detection of five viruses by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) technology [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 21(6): 745~752.)
- 张双翔,胡兴义,唐宇,等. 2016. 贵州省仔猪病毒性腹泻病原学调查[J]. 贵州畜牧兽医, 40(6): 8-10. (Zou Y S, Hu T Y, Ran R Z, et al. 2016. The etiological investigation on Viral Diarrhea of piglets in Guizhou province [J]. Guizhou Animal Husbandry and Veterinary, 40(6): 8-10.)
- 周莹珊,陈琳,孙静,等. 2019. 猪猝死症4种重要病原多重连接探针扩增鉴别检测技术的建立与应用[J]. 中国预防兽医学报, 41(2): 161-167. (Zou Y S, Chen L, Sun J,

- et al. 2019. Simultaneous identification of pathogens causing porcine sudden death syndrome by using multiplex ligation-dependent probe amplification assay[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary medicine, 41 (2): 161-167.)
- Arunachalam R K, Koshy T, Venkatesan V, et al. 2019. Mutation analysis using multiplex ligation-dependent probe amplification in consanguineous families in south India with a child with profound hearing impairment [J]. Lab Medicine, 51(1): 56-65.
- Blomstrom A L, Belak S, Fossum C, et al. 2009. Detection of a novel *Porcine bocavirus* in the background of porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome [J]. Virus Research, 146(1-2): 125-129.
- Jia S, Wang F, Li F, et al. 2014. Rapid detection of *Hepatitis B virus* variants associated with lamivudine and adefovir resistance by multiplex ligation-dependent probe amplification combined with real-time PCR [J]. Journal of Clinical Microbiology, 52(2): 460-466.
- Kim H J, Kim S K, Yoo K Y, et al. 2019. Molecular genetics of *von Willebrand disease* in Korean Patients: Novel variants and limited diagnostic utility of multiplex ligation-dependent probe amplification analyses [J]. Annals of Laboratory Medicine, 39(6): 545-551.
- Koonpaew S, Teeravechyan S, Frantz P N, et al. 2019. PEDV and PDCoV pathogenesis: The interplay between host innate immune responses and *Porcine Enteric Corona viruses* [J]. Front Veterinary Science, 6: 34.
- Massalska D, Bijok J, Zimowski J G, et al. 2013. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) --new possibilities of prenatal diagnosis [J]. Ginekologia Polska, 84(6): 461-464.
- McCluskey B J, Haley C, Rovira A, et al. 2016. Retrospective testing and case series study of *Porcine delta corona virus* in U.S. swine herds [J]. Preventive Veterinary Medicine, 123: 185-191.
- McMenamy M J, McKillen J, McNair I, et al. 2013. Detection of a *Porcine bocavirus* in combination with *Porcine circovirus* type 2 *genotypes* and *Torque teno sus virus* in pigs from postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected farms in archival samples from Great Britain [J]. Veterinary Microbiology, 164(3-4): 293-298.
- Meng Q, Qiao M, Gong S, et al. 2018. Molecular detection and genetic diversity of porcine bocavirus in piglets in China [J]. Acta Virology, 62(4): 343-349.
- Shen Q, Zhang W, Yang S, et al. 2012. Complete genome sequence of a new-genotype *Porcine norovirus* isolated from piglets with diarrhea [J]. Journal of Virology, 86 (12): 7015-7016.
- Silva P F, Alfieri A F, Barry A F, et al. 2015. High frequency of *Porcine norovirus* infection in finisher units of Brazilian pig-production systems [J]. Tropical Animal Health and Production, 47(1): 237-241.
- Tatte V S, Jadhav M, Ingle V C, et al. 2019. Molecular characterization of group A *Rotavirus* (RVA) strains detected in bovine and porcine species: Circulation of unusual *Rotavirus* strains. A study from western, India [J]. Acta Virologica, 63(1): 103-110.
- Tuanthap S, Vongpunsawad S, Luengyosluechakul S, et al. 2019. Genome constellations of 24 *Porcine rotavirus* group A strains circulating on commercial Thai swine farms between 2011 and 2016 [J]. PLOS ONE, 14(1): e0211002.
- Turan I, Tastan M, Boga D D, et al. 2019. 21-Hydroxylase deficiency: Mutational spectrum and genotype-phenotype relations analyses by next-generation sequencing and multiplex ligation-dependent probe amplification [J]. European Journal of Medicine Genetics, 63(4): 103782.
- Wang G, Liang R, Liu Z, et al. 2019. The N-terminal domain of spike protein is not the enteric tropism determinant for *Transmissible gastroenteritis virus* in piglets [J]. Viruses, 11(4): E313.
- Wang J, Zhang R, Wang J, et al. 2018. Real-time reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of *Porcine epidemic diarrhea virus* [J]. Journal of Virological Methods, 253: 49-52.
- Yang Y, Xia M, Wang L, et al. 2019. Structural basis of host ligand specificity change of GII *Porcine noroviruses* from their closely related GII *Human noroviruses* [J]. Emerging Microbes & Infections, 8(1): 1642-1657.
- Zhang H, Liang Q, Li B, et al. 2019. Prevalence, phylogenetic and evolutionary analysis of *Porcine deltacoronavirus* in Henan province, China [J]. Preventive Veterinary Medicine, 166(1): 8-15.
- Zhou X, Zhang T, Song D, et al. 2017. Comparison and evaluation of conventional RT-PCR, SYBR green I and TaqMan real-time RT-PCR assays for the detection of *Porcine epidemic diarrhea virus* [J]. Molecule and Cellular Probes, 33: 36-41.
- Zuo Q, Zhao R, Liu J, et al. 2018. Epidemiology and phylogeny of spike gene of *Porcine epidemic diarrhea virus* from Yunnan, China [J]. Virus Research, 249: 45-51.

(责任编辑 任立刚)