

牛血清中 6 种外源性病毒的液相芯片检测方法建立

王艳¹, 严敏鸣², 黄忠荣³, 张磊萍¹, 张强¹, 林颖峥¹, 熊炜¹, 李树清¹

(1. 上海海关动植物与食品检验检疫技术中心, 上海 200135; 2. 上海浦东新区动物疫病预防控制中心, 上海 200120; 3. 上海海关, 上海 200135)

摘要 为建立牛血清中 6 种外源性病毒(BVDV、BPV、BTV、REOV、BPyV、RABV)的液相芯片检测方法, 根据 6 种病毒的高度保守区域设计引物和探针, 通过杂交偶联检测, 利用 Luminex 检测仪检测荧光信号, 建立了牛血清中 6 种外源性病毒的快速检测方法。结果表明, 该试验建立的检测体系具有良好的特异性和敏感性, 其检测灵敏度可达 50 拷贝/反应。该研究初步建立了同时检测牛血清中 6 种外源性病毒的液相芯片检测方法, 为牛血清的质量把关提供了技术支持。

关键词 牛血清; 外源性病毒; 液相芯片

中图分类号 S852.5 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2020)23-0116-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.23.028



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Establishment of Liquichip Detection Method of Six Kinds of Exogenous Viruses in Bovine Serum

WANG Yan¹, YAN Min-ming², HUANG Zhong-rong³ et al (1. Animal, Plant and Food Inspection and Quarantine Technology Center, Shanghai Customs, Shanghai 200135; 2. Animal Disease Prevention and Control Center of Pudong New Area in Shanghai, Shanghai 200120; 3. Shanghai Customs, Shanghai 200135)

Abstract In order to establish the liquichip detection method of 6 kinds of exogenous viruses(BVDV, BPV, BTV, REOV, BPyV, RABV) in bovine serum, on the basis of the specific primers and their corresponding oligonucleotide probes of 6 kinds of viruses were designed, synthesized and modified. Specific probe labeled with biotin was prepared and coupled with fluorescence-coded microspheres. Luminex detector was used to detect fluorescence signal, a quick detection method of 6 kinds of exogenous viruses in bovine serum was established. The results showed that this assay method displayed good specificity and sensitivity. The sensitivity test indicated the detection sensitivity could reach 50 copies. A liquichip detection method for six kinds of exogenous viruses in bovine serum was preliminarily established, which provided the technology supports for the quality control of bovine serum.

Key words Bovine serum; Exogenous virus; Liquichip

随着我国生物医药的发展, 对血清的需求以每年 25% 的速度增长, 对外依存度越来越高。牛血清在疫苗生产中被大量使用, 其质量直接影响生物制品的质量安全, 特别是病毒类生物活性物质污染会严重影响制品的质量安全。日本东京大学的 Harasawa 等^[1] 报道, 在 5 批人用麻风腮及风疹疫苗成品中检出了牛病毒性腹泻病毒(BVDV) RNA。Brown 等^[2] 报道, 由于使用了污染 BVDV 的胎牛血清, 导致了胎牛肾细胞、牛肾细胞、牛鼻甲骨细胞、猪肾细胞、猫肾细胞核 Vero 细胞等多种细胞系的污染^[3]。

牛腹泻病毒是疫苗生产中常见的污染物及严重的外源性致病原之一, 因此牛血清中 BVDV 的检测尤为重要^[4]。牛细小病毒(bovine parvovirus, BPV)、蓝舌病毒(bluetongue virus, BTV)、呼肠孤病毒(reoviridae, REOV)、牛多瘤病毒(bovine ployomavirus, BPyV)、狂犬病病毒(rabies virus, RABV)也是牛血清中重要的病原外源因子, 牛血清的质量应严格要求^[5-7], 由于牛血清质量的把关是生物制品质量的重要环节, 原上海检验检疫局曾在进口胎牛血清中检测出牛病毒性腹泻病毒^[8], 因此建立外源性病毒的快速检测方法将有助于把控牛血清质量, 防止外源性病毒的污染。笔者以牛血清中 BVDV、BPV、BTV、REOV、BPyV、RABV 6 种重要外源性病毒为研究对象, 建立可以同时检测的液相芯片检测方法, 并对其灵敏度、特异性等指标进行验证。

1 材料与方法

1.1 试验材料 藻红蛋白标记的链霉素-亲和素(SA-PE)采购自 Invitrogen 公司; 6 种不同编号的荧光编码微球购自 Bio-Rad 公司; Luminex200 为 Luminex 公司产品; BVDV、BPV、BTV、REOV、BPyV、RABV 质粒由上海海关动物检疫实验室保存, 浓度为 500 拷贝/ μL , 保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下备用。

1.2 试验方法

1.2.1 探针及引物的设计和合成。 根据 GenBank 数据库发布的基因序列, 应用 Primer 5.0 序列分析软件进行序列分析、引物、探针设计, 并分别在 5' 端和 3' 端进行修饰(表 1)。引物、探针送至上海生物工程有限股份公司合成。

1.2.2 单对引物及多重引物的扩增产物电泳检测。 利用设计的引物对目标质粒进行单重和多重扩增, 以鉴定引物的特异性。PCR 反应体系: $10\times\text{buffer}$ (Mg^{2+}) 2.5 μL 、dNTP (2.5 mol/L) 1.0 μL 、引物 1.0 μL 、模板 2.0 μL 、Taq 0.5 U、ddH₂O 18.5 μL , 总 PCR 体系 25 μL 。多重 PCR 引物的加入量 REOV/R 1.5 pmol, BPV/R 2.0 pmol, BTV/R 3.0 pmol, BVDV/R 2.0 pmol, BPyV/R 1.5 pmol, RABV/R 2.0 pmol。PCR 扩增程序如下: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 s, 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 再延伸 1 min。反应结束后, 取 5 μL PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测。

1.2.3 微球探针的交联。 在 EP 管中加入相应的荧光编码微球 100 μL (表 2), 5 000 r/min 离心 10 min 后弃上清, 并用 ddH₂O 冲洗 2 次; 用 100 μL 0.1 mol/L pH 6.0 的 MES 将之悬浮后, 加入 0.2 nmol/ μL 探针 3 μL , 充分混匀后, 加入 15%

基金项目 上海市科学技术委员会科研项目(16DZ0501502)。

作者简介 王艳(1981—), 女, 江苏南通人, 高级兽医师, 博士, 从事动物检疫工作。

收稿日期 2020-04-15; **修回日期** 2020-05-12

EDC,用铝箔纸包裹 EP 管于 37 °C 条件下放置 30 min;离心吸去上清,用 0.1% SDS 洗涤 2 次后,用 50 μ L TE 缓冲液(pH

8.0)重新悬浮后,4 °C 下避光保存,备用^[9-10]。

表 1 探针和引物序列

Table 1 Probe and primer sequences

基因 Gene	引物 Primer	序列 Sequence	大小 Size//bp
BVDV	BVDVF	biotin-ATGCCCTTACTAGGACTAGC	224
	BVDVR	CAACTCCATGTGCCATGTACAGCAG	
	BVDVP	NH ₂ -TTTTTTTTTTTGAACCATTGACGACTCCC	
BPV	BPVF	AACGTGTTTCCGTGCGTAAT	79
	BPVR	biotin-ATGGCCGTTTTTGATGTCACA	
	BPVP	NH ₂ -TTTTTTTTTTTGGTCACTAAAAACACTCGC	
BTV	BTVF	biotin- GTTGCCCTTGAAATATTGGACA	113
	BTVR	TCACATCATCAGCAAACGCTTC	
	BTVP	NH ₂ -TTTTTTTTTTTAGCACAGTGAGCGGCAAG	
REOV	REOVF	biotin- CCCACTTTCCATTGCTTTCA	115
	REOVR	GGCAGTTCACGACTAAGAATCT	
	REOVP	NH ₂ -TTTTTTTTTTTAGCACAGTGAGCGGCAAG	
BP _Y V	BP _Y VF	biotin- GCTAGATCCTACCCTCAAGGGAAT	77
	BP _Y VR	TTACTTGGATCTGGACACCAAC	
	BP _Y VP	NH ₂ -TTTTTTTTTTTAAACAGGATACACACCATCTTTG	
RABV	RABVF	biotin- CCTACAAAGTGAATGAGATTGAAC	117
	RABVR	GGAGACAGCTGTTCTCACTCTTATT	
	RABVP	NH ₂ -TTTTTTTTTTTCTAGTGAACGGAAGTGGA	

表 2 探针名称及对应编码微球

Table 2 Probe name and corresponding coded microspheres

序号 No.	探针名称 Probe name	编码微球 Coded microspheres
1	REOVP	21#
2	BPVP	28#
3	BTVP	32#
4	BVDVP	37#
5	BP _Y VP	38#
6	RABVP	45#

1.2.4 杂交捕获检测。取 PCR 产物 5 μ L,加入微球溶液 25 μ L(荧光编码微球的数量约 80 个/ μ L),充分混合均匀后按照以下步骤进行杂交反应:94 °C 变性 3 min,50 °C 孵育 30 min;随后加入 0.2 μ g/ μ L SA-PE 70 μ L,50 °C 孵育 20 min,孵育结束后直接上机读取信号(试验须在微球个数不小于 20 个且背景空白荧光强度不高于 300 的情况下才成立)。

1.2.5 探针特异性的检测。每个反应体系 25 μ L,将 6 种不同编码的荧光微球混合,与每一对引物 PCR 扩增产物进行杂交。

1.2.6 液相芯片检测体系的建立。取 20 份其他检测方法检测为阴性的样品进行检测,计算每种微球平均荧光强度(median fluorescent intensity, MFI)的平均值和标准差,以平均值+3 倍标准差所得的值作为对应检测指标的 cut-off 值,确定阈值,高于 cut-off 值就视为阳性。

1.2.7 液相芯片检测体系特异性。将牛腹泻病毒、牛细小病毒、蓝舌病毒、呼肠孤病毒、牛多瘤病毒、狂犬病毒、牛副流感病毒 3 型(bovine parainfluenzavirus 3, BPIV3)、传染性鼻气管炎病毒(infectious bovine rhinotracheitis virus, IBRV)、赤羽病病毒(Akabane disease virus, ADV)的 DNA 作为 PCR 扩增

模板,利用已建立的检测方法进行杂交检测。

1.2.8 液相芯片检测体系灵敏度。将质粒 BVDV、BPV、BTV、REOV、BP_YV、RABV 进行 5、10、50 倍稀释,并分别作为 PCR 扩增模板,利用已建立的检测方法进行杂交检测。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增产物的电泳检测结果 扩增结果表明,该试验设计的引物具有良好的特异性(图 1)。



注:1~14 分别为单对引物及多重引物对目的基因 REOV、BPV、BTV、BVDV、BP_YV、RABV 的扩增,其中 1~6 依次为 REOV、BPV、BTV、BVDV、BP_YV、RABV 单对引物的扩增;8~13 为多重引物的扩增,7 和 14 为阴性对照

Note:1~14 are the amplification of target genes REOV, BPV, BTV, BVDV, BP_YV, RABV respectively with single pair of primers and multiple primer pairs, of which 1~6 are the amplification of REOV, BPV, BTV, BVDV, BP_YV, RABV with single pair of primers; 8~13 are the amplification with multiple primer pairs, 7 and 14 are negative control

图 1 PCR 扩增产物的电泳检测结果

Fig. 1 Electrophoresis detection results of PCR amplified products

2.2 探针特异性检测 6 种混合微球对单一引物扩增产物的杂交检测结果如表 3 所示。

以上数据显示,混合的 6 种探针能特异性识别捕获引物,表明该试验设计的探针具有良好的特异性。

表3 探针特异性检测结果(MFI)

Table 3 The specific detection results of probes(MFI)

探针 Probe	REOV	BPV	BTV	BVDV	BPvV	RABV
REOV	2 537	13	22	19	33	35
BPV	23	1 622	12	23	6	9
BTV	50	12	1 591	25	6	14
BVDV	21	19	9	2 718	21	12
BPvV	34	16	15	23	5 601	16
RABV	35	24	10	24	6	1 751

2.3 液相芯片检测体系的建立 20份阴性样品经PCR扩增的产物用于液相芯片检测方法阈值的确定,计算MFI的平均值和标准差,阈值=42.15+3×10.62=74.01。

2.4 液相芯片检测体系特异性 特异性检测结果表明,建立的液相芯片体系对REOV、BPV、BTV、BVDV、BPvV、RABV

产生特异性反应;与牛血清其他重要病原不产生反应,表明建立的液相芯片检测体系具有良好的特异性(表4)。

2.5 液相芯片检测体系灵敏度 灵敏度试验结果见表5,所建立的检测体系的灵敏度为50拷贝/反应。

表4 液相芯片检测体系特异性(MFI)

Table 4 Specific detection of liquichip detection system(MFI)

目的基因 Target gene	REOV	BPV	BTV	BVDV	BPvV	RABV
REOV	2 342	14	7	51	6	32
BPV	27	1 833	7	47	12	13
BTV	25	11	1 292	43	7	19
BVDV	30	50	20	2 111	10	29
BPvV	15	14	10	25	4 784	12
RABV	34	41	18	34	9	1 395
BPIV3	17	14	16	9	11	21
ADV	29	33	15	25	17	35
IBRV	15	10	18	16	17	26

表5 液相芯片检测体系灵敏度(MFI)

Table 5 Sensitivity detection of liquichip detection system(MFI)

灵敏度 Sensitivity // 拷贝/反应	REOV	BPV	BTV	BVDV	BPvV	RABV
10	58	6	12	13	21	24
	22	110	14	33	14	15
	12	9	89	18	20	29
	9	13	25	77	16	32
	21	13	17	16	211	15
	20	31	10	12	14	98
50	125	13	31	35	28	16
	17	279	25	13	11	19
	35	37	263	31	33	8
	32	17	36	303	31	25
	26	15	23	32	1 036	18
	16	15	28	41	27	301
100	1 153	28	52	35	33	8
	12	1 360	25	22	28	18
	25	14	1 423	25	26	22
	19	24	19	1 989	31	38
	35	26	32	12	3 306	25
	26	19	9	14	35	1 075
500	2 078	22	23	51	45	27
	35	1 631	33	25	31	22
	44	15	1 465	18	25	27
	19	18	25	2 333	21	40
	31	33	21	25	4 506	28
	33	25	26	15	35	1 267

3 讨论

动物疫苗的主要作用是预防传染病。动物疾病传入某一国家,其最主要的风险途径是通过进口活动物及动物产品,通过疫苗进口传入疾病则较为少见。但是,由于动物疫苗本身产品的特殊性,在疫苗生产期间若使用的种子毒株、

细胞培养物、动物或动物源性成分被污染,或发生交叉污染,或疫苗本身灭活工作没有做好,动物疫苗在生产过程中就会被污染。此类污染疫苗一经使用,就会将病原直接传入动物体内。为此,对进口动物疫苗进行病毒安全性研究,为控制

(下转第124页)

艾里克湖捕捞量根据鱼产力估算来初步确定,建议捕捞量为渔产潜力的60%~80%。根据浮游生物量估算2018年艾里克湖鱼产力为824.9 t/a,故艾里克湖建议捕捞量为495~660 t/a,后续捕捞量应根据增殖放流活动、湖区水量和鱼类资源变动现状监测结果相应调整年捕捞量。

通过对艾里克湖水质、饵料生物及鱼类群落组成等分析,艾里克湖养殖鱼类应以滤食性鱼类鲢、鳙为主,草鱼为辅,控制水体富营养化发展及芦苇腐败带来的二次污染。鲤、鲫生长严重受限,不应作为湖区的增殖对象;大口鲶可在湖区自繁,无需人工增殖。鲢、鳙及草鱼建议投放大规模鱼苗为主,鲢、鳙投放个体100 g以上,其中鲢鱼年投放量20万尾/a,鳙鱼投放量为15万尾/a;草鱼投放个体在200 g以上,草鱼投放量为2万尾/a,草鱼投放量应按照水生植物丰度进行调整,当水生植物资源大幅度减少时,应降低草鱼投放量,加大草鱼捕捞量。

近年来,艾里克湖渔业产量主要受限于上游白杨河来水量。根据乌尔禾区农林水牧局提供湖区捕捞数据,从2003年起,艾里克湖年均鱼产量达400 t;2018年湖区渔业产量增至630 t,符合建议捕捞量。这说明湖区现有渔业生产规模满足生态养殖密度。艾里克湖具有干旱区湖泊典型的脆弱性、敏感性等特征,具有破坏容易、恢复困难的特点。对于艾里克湖今后的渔业养殖生产活动,应严格按照地方性文件规定,合理、合法开展渔业养殖活动。不可进行投饵、施肥等渔业生产模式,确定艾里克湖大水面生态渔业的发展目标。依托查干湖旅游渔业模式、千岛湖渔业模式,积极探寻适应艾里克湖的渔业发展模式。

参考文献

[1] 吕光俊,陈建,李代金. 东湖水库浮游生物研究[J]. 江西农业学报, 2007,19(7):81-83.

(上接第118页)

其风险提供有力保障。该研究利用液相芯片技术,建立了能特异性检测BVDV、BPV、BTV、REOV、BPyV、RABV 6种病原的液相芯片检测方法。该检测方法能够对目标基因进行快速检测,其检测灵敏度达50拷贝/反应,特异性好。

参考文献

[1] HARASAWA R, TOMIYAMA T. Evidence of pestivirus RNA in human virus vaccines[J]. Journal of clinical microbiology, 1994,32(6):1604-1605.
[2] BROWN F, CARTWRIGHT T, HORAUD F, et al. Animal sera derivatives and substitutes used in the manufacture of pharmaceutical: viral safety and regulatory aspects[J]. Dev Biol Stand, 1999,99:45-47.
[3] 马岩松. 新生牛血清病毒检测[D]. 长春:吉林农业大学,2011:3-4.

[2] PRADHAN A, BHAUMIK P, DAS S, et al. Phytoplankton diversity as indicator of water quality for fish cultivation[J]. American journal of environmental sciences, 2008,4(4):406-411.
[3] SIDIK M J, RASHED-UN-NABI M, HOQUE M A. Distribution of phytoplankton community in relation to environmental parameters in cage culture area of Sepanggar Bay, Sabah, Malaysia[J]. Estuarine, coastal and shelf science, 2008,80(2):251-260.
[4] 徐先栋,王海华,盛银平,等. 太子河浮游植物初步调查及鲢、鳙鱼产力评估[J]. 水生态学杂志,2012,33(4):84-89.
[5] 张燕萍,陈文静,王海华,等. 太泊湖水水质生物学评价及鲢鳙鱼产力评估[J]. 水生态学杂志,2015,36(1):94-100.
[6] 胡莲,潘晓洁,邹曦,等. 三道河水库浮游植物群落结构特征及其渔产潜力分析[J]. 水生态学杂志,2012,33(4):90-95.
[7] 章宗涉,黄祥飞. 淡水浮游生物研究方法[M]. 北京:科学出版社,1991:12-122.
[8] 胡鸿钧,魏印心. 中国淡水藻类:系统、分类及生态[M]. 北京:科学出版社,2006:23-915.
[9] 蒋燮治,堵南山. 中国动物志:节肢动物门 甲壳纲 淡水枝角类[M]. 北京:科学出版社,1979.
[10] 沈温芬,顾曼如,龚循矩,等. 微生物监测新技术[M]. 北京:中国建筑工业出版社,1990.
[11] 姜雪芹,禹娜,毛开云,等. 冬季上海市城区河道中浮游植物群落结构及水质的生物评价[J]. 华东师范大学学报(自然科学版),2009(2):78-87.
[12] 张才学,周凯,孙省利,等. 深圳湾浮游植物的季节变化[J]. 生态环境学报,2010,19(10):2445-2451.
[13] 全国海洋标准化技术委员会. 海洋监测规范:第7部分:近海污染生态调查和生物监测:GB 17378.7—2007[S]. 北京:中国标准出版社,2007.
[14] 陈金桂. 内陆水域鱼类增殖学[M]. 北京:中国农业出版社,1994.
[15] MOSISCH T D, BUNN S E, DAVIES P M, et al. Effects of shade and nutrient manipulation on periphyton growth in a subtropical stream[J]. Aquatic botany, 1999,64(2):167-177.
[16] TEMPONERAS M, KRISTIANSEN J, MOUSTAKA-GOUNI M. Seasonal variation in phytoplankton composition and physico-chemical features of the shallow Lake Doirani, Macedonia, Greece[J]. Hydrobiologia, 2000,424(1/2/3):109-122.
[17] 李夜光,李中奎,耿亚红,等. 富营养化水体中N、P浓度对浮游植物生长繁殖速率和生物量的影响[J]. 生态学报,2006,26(2):317-325.
[18] 沈治蕊,卞小红,赵燕,等. 南京煦园太平湖富营养化及其防治[J]. 湖泊科学,1997,9(4):377-380.

[4] 陈波,徐程林,董小曼,等. 牛血清中牛腹泻病毒牛肾细胞直接病变检测方法的建立[J]. 中国生物制品学杂志,2009,22(8):819-822.
[5] 刘文静. 保证牛血清质量促进生物制品品质的提高[J]. 科技情报开发与经济,2011,11(5):58-59.
[6] 宋立荣,李思经. 谈新生牛血清的质量控制[J]. 黑龙江畜牧兽医,2008(10):92-94.
[7] 金亦宏,马欣,周莉薇. 国产牛血清的现状[J]. 中国生物制品学杂志,2004,17(4):254-256.
[8] 张强,李树清,李健,等. 进口胎牛血清中牛病毒性腹泻病毒污染的检测[J]. 中国动物检疫,2013,30(2):55-57.
[9] 王艳,沈家红,蒋蔚,等. 6种人兽共患病病原核酸液相芯片检测体系的建立[J]. 中国动物检疫,2018,35(12):80-84.
[10] 王政,蒋静,张磊萍,等. 虾桃拉病毒、黄头病毒和白斑病毒液相芯片快速检测方法的建立[J]. 中国动物传染病学报,2017,25(2):77-81.