

陈萌萌, 仇汝龙, 范志宇, 等. 兔出血症病毒 2 型 TaqMan 探针荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(6): 1476-1480.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2021.06.015

兔出血症病毒 2 型 TaqMan 探针荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及应用

陈萌萌, 仇汝龙, 范志宇, 胡波, 宋艳华, 魏后军, 朱伟峰, 徐为中, 王芳
(江苏省农业科学院兽医研究所/农业部兽用生物制品工程重点实验室, 江苏 南京 210014)

摘要: 以新发生的兔出血症病毒 2 型(RHDV2) SC 2020/04 株 VP60 基因序列为参考, 设计出 1 对特异性引物和 TaqMan 探针, 建立了一种快速、灵敏且特异的用于检测新型病毒的荧光定量 RT-PCR 检测方法。试验结果显示: 本研究建立的方法, 标准曲线线性关系良好, R^2 值达到 0.999; 其特异性较好, 与兔出血症病毒 1 型(RHDV1)、仙台病毒(SV)和轮状病毒(RRV)病原均无交叉反应; 灵敏性高, 最低检出量为 $1\mu\text{l}$ 1×10 拷贝; 且重复性良好, 批内和批间试验的变异系数平均值均小于 2%。临床检测结果表明, 利用该方法对 108 份临床病料进行检测, 检出 RHDV2 阳性样品 72 份, 检出率为 66.7%, 明显高于常规的 RT-PCR 方法(62.0%)。结果证明, 新建立的 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 方法适合于 RHDV2 感染的特异性诊断。

关键词: 兔出血症病毒 2 型; TaqMan 探针; 荧光定量 RT-PCR; 敏感性; 特异性

中图分类号: S855.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2021)06-1476-05

Establishment and application of a TaqMan-based fluorescence quantitative real-time PCR assay for detection of rabbit hemorrhagic disease virus type 2

CHEN Meng-meng, QIU Ru-long, FAN Zhi-yu, HU Bo, SONG Yan-hua, WEI Hou-jun, ZHU Wei-feng, XU Wei-zhong, WANG Fang

(Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory for Veterinary Bio-Product Engineering, Ministry of Agriculture, Nanjing 210014, China)

Abstract: A rapid, sensitive and specific fluorescence quantitative real-time PCR (RT-qPCR) method for the detection of rabbit hemorrhagic disease virus type 2 (RHDV2) was established. A pair of specific primers and TaqMan probes were designed in the conserved region of VP60 gene of the new variant strain SC 2020/04. The results showed that the standard curve had a good linear relationship, the R^2 was 0.999. The TaqMan-based RT-qPCR method had good specificity and no cross reactions with rabbit hemorrhagic disease virus type1 (RHDV1), sendai virus (SV) and rotavirus (RRV). The method established in this study had high sensitivity, and the minimum detectable amount was 10 copies per microlitre. Moreover, the repeatability was good, and the mean coefficient of variation was less than 2%. The TaqMan-based RT-qPCR

method was used to detect 108 clinical samples. The detection rate was 66.7%, which was higher than that of conventional RT-PCR. To sum up, the newly established TaqMan-based RT-qPCR method is suitable for the specific diagnosis of RHDV2 infection.

Key words: rabbit hemorrhagic disease virus type 2; TaqMan probe; fluorescence quantitative real-time PCR; sensitivity; specificity

收稿日期: 2020-12-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(31702274); 现代农业产业技术体系建设专项资金项目(CARS-43-C-1)

作者简介: 陈萌萌(1987-), 女, 连云港人, 博士, 助理研究员, 主要从事兔疾病防治与兽医生物技术研究。(E-mail) moonchen2010@yeah.net

通讯作者: 王芳, (E-mail) rwangfang@126.com

兔出血症病毒(Rabbit hemorrhagic disease virus, RHDV)感染家兔可引起兔病毒性出血症(Rabbit hemorrhagic disease, RHD)。这是一种致死率高达 90% 的毁灭性传染病,该病首次于 1984 年在中国报道,随后在全球范围内大肆传播,给世界养兔业带来巨大的经济损失。

RHDV 目前分为 2 种基因型:RHDV1(基因型 GI.1)和 RHDV2(基因型 GI.2)。自 1984 年中国首次报道 RHD 暴发之后的 30 多年里,中国主要流行 RHDV1 的 GI.1a 和 GI.1c 基因型毒株^[1-2]。2010 年,法国首次发现 RHDV 新的基因型 RHDV2,该毒株具有独特的遗传和抗原特征^[2-3],在欧洲、澳大利亚和非洲等多个国家广泛传播^[4-7]。目前,在国外 RHDV2 具有取代 RHDV1 的趋势,并且出现了高致病性 RHDV2 毒株,对中国兔养殖业的健康发展存在潜在的威胁。

我们新近分离报道了一株新的 RHDV 毒株,该株于 2020 年 4 月在中国四川省的养殖场兔子身上采集。经系统发育分析,该新分离株与 RHDV2 在同一分支,与荷兰 NL2016 株核苷酸序列同源性最高(98.3%; MN061492),属于 RHDV2 GI.2 基因群。这是在中国首次发现的 RHDV2 毒株^[8],我们将该分离株命名为 SC2020/04(登陆号:MT383749)。在致病性方面,与 RHDV1 相比,RHDV2 更具危害性,不仅能够感染不同日龄的家兔,还能感染不同种的野兔,感染兔病死率可达 80%。在遗传特性及抗原性方面,RHDV2 与 RHDV1 也存在较大差异。兔病毒性出血症 1 型疫苗对 RHDV2 的交叉保护较差,不能有效抵抗 RHDV2 的感染^[9]。可以预测,RHDV2 倘若在中国流行,将会给兔养殖业带来灾难性的危害。

RHDV2 与 RHDV1 感染引起的家兔临床症状极为相似,所以通过临床症状难以进行鉴别诊断,需要分子生物学检测手段进行诊断。目前通过实验室检测发现已有的用于检测 RHDV1 的 RT-PCR、胶体金试纸条和 ELISA 等方法并不适用于 RHDV2 的特异性检测。因此急需建立一种快速有效的诊断方法持续监测临床发病情况。荧光定量 RT-PCR 方法通过荧光信号的积累实时监测整个 PCR 过程,具有高效、特异和灵敏等特点,在临床疾病的诊断方面广泛应用。而已报道的基于国外 RHDV2 流行毒株建立的实时荧光定量 RT-PCR 方法,能否用于对国内流行毒株

的检测还有待于进一步确认^[10-12]。本研究选取中国 2020 年 4 月分离的四川株 SC2020/04 VP60 基因序列,通过分析设计一组引物和探针,旨在建立一种可检测 RHDV2 的 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒株与样品 兔出血症病毒 2 型 SC2020/04 分离株(RHDV2)、兔出血症病毒 1 型 GI.1a 和 GI.1c 株(RHDV1)、仙台病毒(SV)和轮状病毒(RRV)cDNA 由本实验室保存。临床待检样品为来自全国多地养兔场送检的病死兔肝脏。

1.1.2 主要试剂 pMD19-T、2×Taq Master Mix、DNA Marker DL2000、RNAiso Plus(病毒 RNA 提取试剂)均购自 TaKaRa 公司。Hiscript III RT Super-Mix for qPCR(反转录试剂)、Ace UniversalU+ probe Master Mix V2(探针法荧光定量试剂盒)均为诺唯赞生物有限公司产品。

1.1.3 主要仪器设备 普通 PCR 扩增仪,购自 Eppendorf 公司。凝胶成像仪,购自 Tanon 公司。Q-one Real-Time PCR 仪,购自 Applied Biosystems 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物和探针 根据 RHDV2 分离株 SC2020/04(GenBank No. MT383749)中保守 VP60 基因序列,利用 Primer Express 3.0.1 软件设计荧光定量 RT-PCR 引物和探针,上游引物为 5'-CGGTTTGC-CGCCATTG-3',下游引物为 5'-CCAAAGCTCAAG-CACGTTTG-3',TaqMan 探针序列为 5'-FAM-AACGCAAGTTTCCCTGGAAGCAGTTC-BHQ1-3',引物和探针由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。使用无菌水将引物和探针稀释至 10 μmol/L, -20℃ 保存备用。

1.2.2 标准质粒制备 用 RHDV2 分离株 SC2020/04 VP60 基因全长引物克隆目的基因,将扩增到的 VP60 基因序列连接到 pMD19-T 载体上,筛选并测序后获得阳性 pMD19-T-SC2020-VP60 重组质粒。将重组质粒用 Nano drop 进行浓度测定并计算拷贝数,用去离子水将重组质粒稀释成 1 μl 1×10³ 拷贝 ~ 1×10⁸ 拷贝,作为模板标准品。

1.2.3 标准曲线的建立 20 μl 反应体系:采用 Ace Universal U+ probe Master Mix V2 试剂盒,2×Ace Universal U+ probe Master Mix V2 10.0 μl,上、下游引物

(10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.4 μl , 探针 0.2 μl , 标准品质粒 2.0 μl , DEPC 水 7.0 μl 。反应条件为: 37 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 45 个循环, 使用 Q-One Real-Time PCR System 进行检测, 并生成标准曲线。

1.2.4 特异性试验 将 1 μl 1×10^6 拷贝的标准品质粒作为阳性对照模板, 以免出血症病毒 1 型 GL1a 株和 GL1c 株 (RHDV1)、轮状病毒 (RRV)、仙台病毒 (SV) 的 cDNA 为检测模板, 将水作为模板设立阴性对照, 进行特异性试验。

1.2.5 敏感性试验 10 倍梯度稀释质粒标准品, 选取 8 个不同的梯度 (1 μl $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^8$ 拷贝), 取 2 μl 作为模板进行敏感性试验, 以水为阴性对照。

1.2.6 重复性试验 选取 1 μl $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^8$ 拷贝稀释度的质粒标准品为模板, 进行 3 批重复性试验, 批次内设 3 个重复。通过计算变异系数来评价建立方法的稳定性。

1.2.7 临床样品检测 用建立的 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 方法检测临床疑似 RHDV2 感染的家兔肝

脏组织病料 108 份。

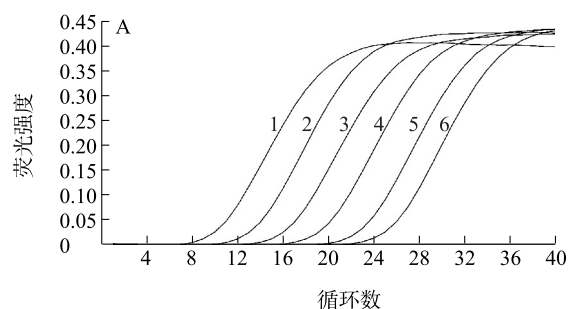
2 结果

2.1 质粒标准品的构建

利用 RHDV2 分离株 SC2020/04 VP60 全长的引物进行 PCR 扩增, 用实验室储存的 RHDV2-SC2020 cDNA 为模板, 将扩增得到的目的片段克隆到 pMD19-T 载体上, 构建 pMD19-T-SC2020-VP60 质粒。经过测序鉴定, 获得阳性质粒。测定 DNA 浓度, 计算拷贝数, 10 倍梯度稀释, 梯度为 1 μl $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^8$ 拷贝, 将其作为荧光定量 RT-PCR 的标准品。

2.2 标准曲线的绘制

利用优化的反应条件和反应体系对质粒标准品进行扩增, 当质粒标准品含量在 1 μl $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^8$ 拷贝时, 获得较好的扩增动力学曲线, 如图 1 所示, 标准曲线斜率为 -3.072, 截距为 10.72, R^2 为 0.999, 扩增效率为 111.6%, 即标准曲线 $Y = -3.072x + 10.72$ 。



1~6 分别为 1 μl $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^8$ 拷贝的标准质粒。

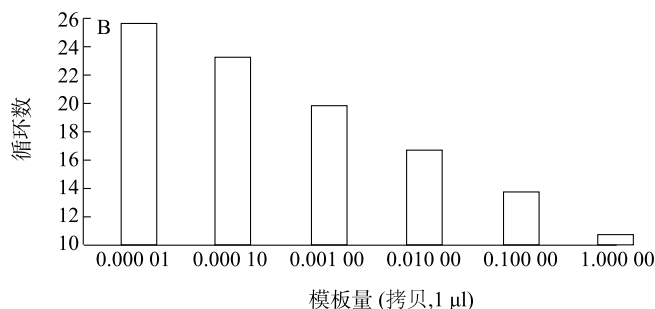


图 1 RHDV2 RT-qPCR 扩增曲线 (A) 和标准曲线 (B)

Fig.1 The amplification curve (A) and standard curve (B) of RT-qPCR

2.3 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 方法的特异性

以 1 μl 1×10^6 拷贝标准质粒作为模板设阳性对照, 保存的 RHDV1 (GL1a 株和 GL1c 株)、仙台病毒 (SV) 和轮状病毒 (RRV) cDNA 为模板, 检测所建立的 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 方法的特异性。如图 2 所示, RHDV2 cDNA 组出现特异性扩增曲线, 而其他病毒 cDNA 样品检测结果均为阴性, 说明本试验设计的引物和探针以及建立的检测方法特异性较好。

2.4 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 方法的敏感性

对标准品质粒进行 10 倍梯度稀释, 使其含量依次为 1 μl $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^8$ 拷贝。选取该梯度的标准品质粒进行敏感性试验。试验测得最低检出量为 1 μl

10 拷贝 (图 3), 对应 C_t 值约为 31.79, 敏感度约为常规 RT-PCR 方法的 100 倍。

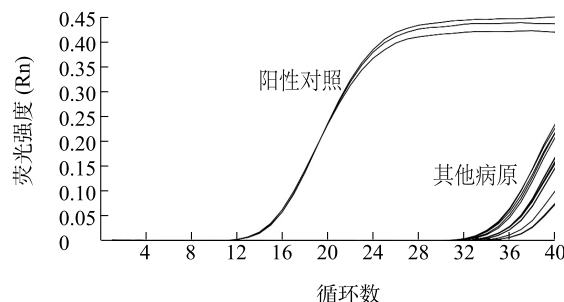
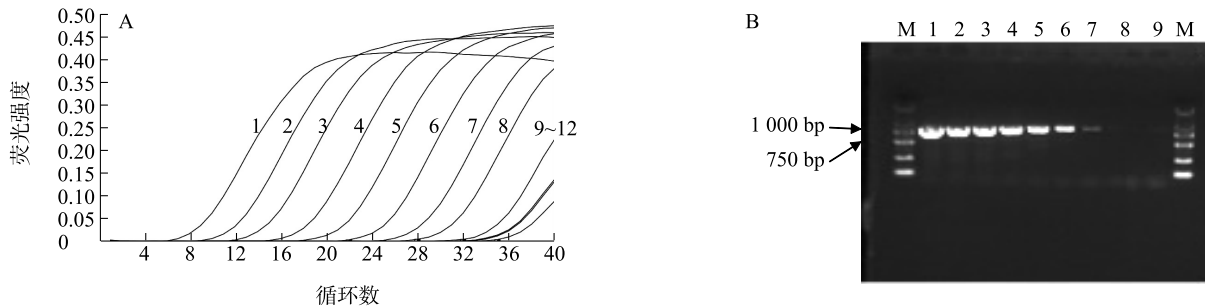


图 2 RHDV2 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 特异性分析

Fig.2 The specificity analysis of TaqMan-based fluorescence quantitative RT-PCR method for detection of rabbit hemorrhagic disease virus type 2 (RHDV2)



A: 荧光定量 RT-PCR 扩增曲线, 1~12 为 10 倍梯度稀释的标准质粒, 含量依次为 $1 \mu\text{l } 1 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^8$ 拷贝; B: 常规 RT-PCR 扩增结果, 1~8 为 10 倍梯度稀释的标准质粒, 含量依次为 $1 \mu\text{l } 1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^8$ 拷贝, 9 为水, M 为 DNA 分子量标准 (DL2000)。

图 3 RHDV2 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 敏感性分析

Fig.3 The sensitivity analysis of TaqMan-based fluorescence quantitative RT-PCR method for detection of RHDV2

2.5 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 方法的重复性

选取含量为 $1 \mu\text{l } 1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^8$ 拷贝的质粒标准品进行重复性试验, 结果如表 1 所示, 组内变异系数

为 0.23%~0.65%, 组间变异系数为 0.67%~1.57%, 说明本试验建立的方法稳定性良好。

表 1 RHDV2 RT-qPCR 重复性分析

Table 1 Repeatability analysis of RT-qPCR method for detection of RHDV2

模板拷贝数 (拷贝, $1 \mu\text{l}$)	组内			组间		
	<i>Ct</i> 平均数	<i>Ct</i> 标准差	变异系数 (%)	<i>Ct</i> 平均数	<i>Ct</i> 标准差	变异系数 (%)
1×10^8	10.88	0.07	0.65	10.73	0.15	1.34
1×10^7	13.98	0.05	0.37	13.82	0.15	1.06
1×10^6	16.27	0.09	0.53	16.50	0.24	1.49
1×10^5	19.86	0.10	0.50	19.74	0.31	1.57
1×10^4	23.25	0.05	0.23	23.16	0.16	0.67

2.6 临床病料检测

利用已建立的 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 和常规 RT-PCR 方法分别对 2020 年 4 月至 2020 年 11 月份之间所接收的全国不同兔场疑似 RHDV2 感染的 108 份临床样品进行检测。结果表明, 常规 RT-PCR 方法检测出 RHDV2 阳性样品 67 份, 检出率为 62.0%; TaqMan 荧光定量 RT-PCR 方法检测出 RHDV2 阳性样品 72 份, 检出率为 66.7%, 经核苷酸序列测定, 所有阳性样品与 RHDV2 的同源性达 99.4% 以上, 表明 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 方法检测临床样品更加敏感。

3 讨论

自 2020 年 4 月 RHDV2 被报道以来, 本实验室陆续收到全国各地疑似 RHDV2 感染的临床样品 108 份, RHDV2 的阳性检出率高达 66.7%, 充分显示出 RHDV2 在中国兔场已形成流行态势, 这将给

家兔养殖产业带来严重的威胁。但是, 目前中国已建立的用于检测 RHDV1 型的诊断方法, 如 RT-PCR 方法^[13]和胶体金免疫层析试纸条^[14]无法应用。因此, 急需建立一种快速、高效和敏感的检测方法来监测和防控 RHDV2 的发生。

与常规 RT-PCR 方法相比, 实时荧光定量 RT-PCR 技术更加便捷和灵敏, 能够进行高通量和精准的定量^[15-16]。在实时荧光定量 PCR 中常使用的荧光标记染料有 SYBR Green I 和 TaqMan 探针两种, 其中 TaqMan 探针法是根据病毒序列特异设计的, 所以 TaqMan 探针能靶向目的基因, 在准确性和灵敏度方面明显优于 SYBR Green I 法, 可以精准检测病原^[17]。目前已建立的针对 RHDV2 的诊断方法有 RT-PCR 和基于 SYBR Green I 的荧光定量 RT-PCR。

针对 RHDV2 保守的 VP60 基因, 本试验应用软件 Primer Express 设计了引物和探针, 通过试验筛选引物和探针优化反应条件, 成功建立了 RHDV2 的

TaqMan 荧光定量 RT-PCR 方法。通过绘制标准曲线和线性回归分析,可见线性关系良好(R^2 达到 0.999);利用建立的 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 方法检测 RHDV2 时,与 RHDV1、SV 和 RRV 等均无交叉反应,说明该方法具有良好的特异性;灵敏度能够达到 $1 \mu\text{l}$ 10^3 拷贝,比常规 RT-PCR 灵敏 100 倍,说明该方法灵敏度高。通过对 108 份临床样本进行检测,发现建立的方法阳性检出率为 66.7%,高于常规 RT-PCR 方法的阳性检出率,说明该方法具有较高的灵敏性。重复试验结果表明,批间和批内试验变异系数均小于 2%,说明该方法有良好的重复性。

综上所述,本研究建立了基于 VP60 基因的 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 检测 RHDV2 的方法,此方法具有特异性强和敏感度高优点。在临床疾病诊断中,可为 RHDV2 早期流行的监测和病原的诊断定量,提供一种快速、简便、有效的检测方法。

参考文献:

- [1] HU B, WANG F, FAN Z, et al. Recombination between G2 and G6 strains of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) in China [J]. Arch Virol, 2017, 162(1): 269-272.
- [2] HU B, FAN Z, WANG F, et al. A new variant of rabbit hemorrhagic disease virus G2-like strain isolated in China [J]. Virus Res, 2016, 215: 20-24.
- [3] LE GALL-RECULE G, LAVAZZA A, MARCHANDEAU S, et al. Emergence of a new lagovirus related to rabbit hemorrhagic disease virus [J]. Vet Res, 2013, 44: 81.
- [4] ABRANTES J, LOPES A M, DALTON K P, et al. New variant of rabbit hemorrhagic disease virus, Portugal, 2012 - 2013 [J]. Emerg Infect Dis, 2013, 19(11): 1900-1902.
- [5] LOPES A M, ROUCO C, ESTEVES P J, et al. GI.1b/GI.1b/GI.2 recombinant rabbit hemorrhagic disease virus 2 (*Lagovirus europaeus*/GI.2) in Morocco, Africa [J]. Arch Virol, 2019, 164(1): 279-283.
- [6] MAHAR J E, HALL R N, PEACOCK D, et al. Rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2; GI.2) is replacing endemic strains of RHDV in the Australian Landscape within 18 months of its arrival [J]. J Virol, 2018, 92(2): e01374.
- [7] PUGGIONI G, CAVADINI P, MAESTRALE C, et al. The new french 2010 rabbit hemorrhagic disease virus causes an RHD-like disease in the Sardinian Cape hare (*Lepus capensis mediterraneus*) [J]. Vet Res, 2013, 44: 96.
- [8] 魏后军,胡波,范志宇,等. 兔出血症病毒 2 型的分离鉴定与序列分析 [J]. 江苏农业学报, 2020, 36(2): 404-409.
- [9] LE GALL-RECULE G, LAVAZZA A, MARCHANDEAU S, et al. Emergence of a new lagovirus related to rabbit haemorrhagic disease virus [J]. Vet Res, 2013, 44: 81.
- [10] 宋艳华,魏后军,范志宇,等. 兔出血症病毒经典毒株和变异毒株的 RT-PCR 鉴定 [J]. 江苏农业学报, 2016, 32(5): 1117-1121.
- [11] 王波. 用 SYBR Green I 实时荧光定量 RT-PCR 方法检测 RHDV, RHDV2 的初步研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2016.
- [12] 谭永贵,刘腾,朱杰,等. SYBR Green II 荧光定量 PCR 结合熔解曲线鉴别不同亚型兔病毒性出血症病毒方法的建立 [J]. 中国动物传染病学报, 2017, 25(1): 7-11.
- [13] 胡波,魏后军,王芳,等. 兔出血症病毒 RT-PCR 检测方法的建立及其临床应用 [J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(11): 1442-1446.
- [14] 蔡少平,王芳,贾华敏,等. 兔出血症病毒胶体金免疫层析试纸条诊断方法的建立及初步应用 [J]. 畜牧兽医学报, 2012, 43(11): 1795-1801.
- [15] 吴双,姜勇,徐建生,等. 鸭坦布苏病毒、鸭肠炎病毒和番鸭细小病毒 TaqMan 三重实时荧光定量 PCR 检测方法的建立与临床应用 [J]. 江苏农业学报, 2020, 36(3): 626-633.
- [16] 温书香,安利民,赵协,等. 猪伪狂犬病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用 [J]. 江苏农业科学, 2019, 47(7): 50-53.
- [17] 蒙正群,李桂黎,周丽军,等. 兔出血症病毒 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. 中国兽医科学, 2017, 47(6): 694-700.

(责任编辑:张震林)