

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.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.05.026

兔出血症病毒经典毒株和变异毒株的 RT-PCR 鉴定

宋艳华¹, 魏后军¹, 范志宇¹, 左园园¹, 胡波¹, 仇汝龙¹, 陈萌萌¹, 李明勇²,
薛家宾¹, 徐为中¹, 王芳¹

(1. 江苏省农业科学院兽医研究所/农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室/国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏 南京 210014; 2. 山东青岛康大欧洲兔业育种有限公司, 山东 青岛 266400)

摘要: 本研究旨在建立鉴别兔出血症病毒经典毒株(RHDV)和变异毒株(RHDV2)的 RT-PCR 检测方法。根据 GenBank 中经典 RHDV 和 RHDV2 的 VP60 基因序列, 设计 2 对分别结合两种基因的特异性引物。利用 2 对引物, 以人工合成 RHDV2 的 VP60 基因构建的 pMD19-T-VP60-2 和 pMD19-T-VP60 为模板, 进行 RT-PCR 体系退火温度的优化, 优化后的退火温度为 58.2 °C。对优化后的 RT-PCR 体系进行 RHDV 和 RHDV2 的敏感性试验、特异性试验, 并用于检测 RHDV 人工感染样品和疑似临床样品, 结果显示, 该方法具有良好的特异性和敏感性, 经典 RHDV 和 RHDV2 的检测限度分别为 95 拷贝和 76 拷贝的靶基因片段, 且对支气管败血波氏杆菌、多杀性巴氏杆菌、产气荚膜梭菌、大肠杆菌等病原以及重组质粒 pMD19-T-EBHSV 的检测结果均为阴性。RHDV 人工感染的组织样品检出率为 100%, 15 份临床样品中 3 份为经典 RHDV 阳性, 其他均为经典 RHDV 及 RHDV2 阴性。该方法的建立能够实现快速、特异及敏感地检测 RHDV 和 RHDV2, 为监测 RHDV 变异株的流行情况提供技术支撑。

关键词: 兔出血症病毒经典毒株(RHDV); 兔出血症病毒变异毒株(RHDV2); RT-PCR 鉴定

中图分类号: S858.2912.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)05-1117-05

Development of a RT-PCR technique for rapid identification of classical and variant rabbit hemorrhagic disease virus

SONG Yan-hua¹, WEI Hou-jun¹, FAN Zhi-yu¹, ZUO Yuan-yuan¹, HU Bo¹, QIU Ru-long¹,
CHEN Meng-meng¹, LI Ming-yong², XUE Jia-bin, XU Wei-zhong, WANG Fang

(1. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Veterinary Biologicals Engineering and Technology, Ministry of Agriculture/National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China; 2. Qingdao Kangda-Eurolap Rabbit Selection Co., LTD., Qingdao 266400, China)

Abstract: This study aims to develop a RT-PCR system to distinguish the classical and variant rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV). According to VP60 sequences of the classical and variant RHDV available in GenBank, two pairs of primers were designed. pMD19-T-VP60-2 containing VP60 gene of variant RHDV2 and pMD19-T-VP60 containing VP60 gene of classical RHDV were used as templates to optimize the annealing temperature of RT-PCR reactions and test sensitivity and specificity. The RT-PCR was also used to detect the samples experimentally infected with RHDV and RHDV-suspected clinical samples. The RT-PCR system with annealing temperature at 58.2 °C showed good sensitivity and specificity to RHDV and RHDV2. The detection limits were 96 copies for classical RHDV and 75 copies for RHDV2, respectively. The results were negative for *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* and pMD19-T-EBHSV. The diagnostic rate was 100% for the samples experimentally infected with RHDV. Fifteen RHDV-suspected clinical samples were detected, three of which were positive for classical

收稿日期: 2016-08-08

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK20140740); 现代农业产业技术体系建设专项基金项目(CARS-44); 国家自然科学基金项目(31502073)

作者简介: 宋艳华(1985-), 女, 博士, 山东聊城人, 副研究员, 主要从事畜禽传染病防控研究。(Tel) 025-84390337; (E-mail) songyanhua8507@126.com

通讯作者: 王芳, (Tel) 025-84390337; (E-mail) rwangfang@126.com

ted clinical samples. The RT-PCR system with annealing temperature at 58.2 °C showed good sensitivity and specificity to RHDV and RHDV2. The detection limits were 96 copies for classical RHDV and 75 copies for RHDV2, respectively. The results were negative for *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* and pMD19-T-EBHSV. The diagnostic rate was 100% for the samples experimentally infected with RHDV. Fifteen RHDV-suspected clinical samples were detected, three of which were positive for classical

RHDV infection, and others were all negative for both classical RHDV and RHDV2. The RT-PCR method is rapid, specific and sensitive for distinguishing RHDV and RHDV2 in a reaction system, and will offer a technical support for rapid detecting the epidemic of RHDV, especially RHDV2.

Key words: classical RHDV; RHDV2; RT-PCR identification

兔出血症(Rabbit hemorrhagic disease, RHD)是由兔出血症病毒(RHDV)引起的一种急性、高度接触性传染病,家兔通常于感染后48~72 h死亡,以呼吸系统出血、肝坏死、实质性脏器水肿、淤血出血为特征,在全球许多国家和地区均有报道,呈暴发性流行,发病率和死亡率高达90%,给养兔业造成极大经济损失^[1-3]。该病毒易感2月龄家兔,目前主要应用组织灭活疫苗进行免疫预防^[4]。

2010年,法国首次报道变异型RHDV,命名为RHDV2,该变异毒株与经典G1~G6型毒株在遗传特性上有很大的差异^[3-4]。目前该变异毒株迅速在欧洲扩散^[5-8],已给欧洲养兔业造成了极大损失。2015年,澳大利亚也发现并报道RHDV2的流行^[9]。家兔感染RHDV2后死亡率高达70%,15~20日龄(未断奶家兔)以上家兔对该病毒均易感^[3],经典毒株组织灭活疫苗不能有效交叉保护RHDV2感染的家兔^[3]。目前中国肉兔配套系100%依赖进口,且进口国为已经存在RHDV2流行的欧洲国家,因此,相关部门在家兔引种等方面应加强RHDV2的监测,寻找能够快速鉴别诊断兔出血症病毒经典RHDV与RHDV2的方法迫在眉睫。

本研究拟通过收集大量经典G1~G6型毒株以及RHDV2 VP60基因序列,设计特异性结合引物,经一系列条件优化,建立快速鉴别经典RHDV或RHDV2的RT-PCR方法,以期为中国对RHDV流行情况的监测提供技术保障。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株及其他材料

质粒pMD19-T-VP60^[10]由江苏省农业科学院草食动物疫病防控研究室保存。pMD19-T、2×Taq Master Mix、DNA Marker DL2000、RNAiso Plus、PrimeScript™ RT reagent kit (RR047A)均为宝生物工程(大连)有限公司产品。RHDV2 VP60全长基因由Invitrogen公司合成。支气管败血波氏杆菌、多杀性巴氏杆菌、产气荚膜梭菌、大肠杆菌、兔出血症病毒皖阜株(Accession no: FJ794180.1)人工感染兔肝脏组织和临

床采集样品均由江苏省农业科学院保存。欧洲野兔综合征病毒(European brown hare syndrome virus, EBHSV)重组质粒pMD19-T-EBHSV由本实验室保存。

1.2 引物设计

对GenBank中RHDV G6的VP60基因序列(GenBank: FJ794180.1)以及RHDV2的VP60基因序列(GenBank: HE800529.1)进行同源性分析,利用DNASar软件设计2对特异性引物(表1),引物RHDV2-F912-930针对RHDV2 VP60序列中较经典RHDV高度变异区(912~930 bp),即可与RHDV2的VP60基因序列特异性结合,不能与经典RHDV G1~G6结合。引物RHDV1-F1548-1566针对经典RHDV VP60序列中较RHDV2高度变异区(1548~1566 bp),即可与经典RHDV特异性结合,不能与RHDV2结合。下游引物RHDV-R1720-1740共用,针对两毒株的保守区(1720~1740 bp)。3条引物均由Invitrogen公司合成。

表1 引物序列

Table 1 Primers used in this study

引物对	引物	序列(5'→3')	产物大小(bp)
引物对1	RHDV2-F912-930	5'-CCCTGGAAGCACT-TCGTCAAAT-3'	829
	RHDV-R1720-1740	5'-TCAGACATAAGAAA-AGCCATT-3'	
引物对2	RHDV1-F1548-1566	5'-GTTAACCTTTGCAT-CTGGT-3'	193
	RHDV-R1720-1740	5'-TCAGACATAAGAAA-AGCCATT-3'	

1.3 RHDV2靶基因VP60的克隆

根据GenBank中RHDV2 VP60基因序列,送由上海Invitrogen公司人工合成VP60全长基因,并克隆至pMD19-T载体,获得重组质粒,命名为pMD19-T-VP60-2,经菌液PCR鉴定正确后,送Invitrogen公司测序。

1.4 RT-PCR反应条件的优化

以pMD19-T-VP60-2及重组质粒pMD19-T-VP60为模板,利用2对引物,进行PCR退火温度的优化。PCR

反应条件为 95.0 ℃ 5 min;95.0 ℃ 30 s,50.0~60.0 ℃ 30 s;72.0 ℃ 1 min,35 个循环;72.0 ℃ 10 min。

1.5 引物结合特异性鉴定

以 2 种重组质粒为模板,按照方法 1.4 中优化的退火温度进行 PCR,验证引物对 2 特异性结合经典 RHDV VP60 基因,与 RHDV2 VP60 基因无交叉反应。引物对 1 特异性结合 RHDV2 VP60,与经典 RHDV VP60 基因无交叉反应。

1.6 敏感性试验

将 2 种重组质粒用 NanoDrop 2000 紫外分光光度计定量后,10 倍系列稀释作为模板,按优化的条件进行 PCR,检测该方法的灵敏度。

1.7 特异性试验

提取人工感染经典 RHDV 死亡兔肝脏组织中总 RNA,反转录后获得 cDNA 作为模板,分别提取支气管败血波氏杆菌、多杀性巴氏杆菌、产气荚膜梭菌、大肠杆菌的 DNA,以重组质粒 pMD19-T-EBHSV 为模板,在相同条件下同步进行优化后 PCR 扩增。

1.8 样品检测

从江苏、山东、浙江 3 省不同兔场采集疑似 RHDV 感染死亡兔的肝脏样品 15 份,以提取 RNA 后反转录获得的 cDNA 作为模板,进行优化后 RT-PCR 检测,同时检测 6 份人工感染经典 RHDV 的肝脏样品。

结果判定:PCR 扩增获得一条大小为 193 bp 特异性条带的样品,为经典 RHDV 感染样品;PCR 扩增获得一条大小为 829 bp 的特异性条带样品,为 RHDV2 感染样品;当同时出现以上 2 条特异性条带时,为经典 RHDV 和 RHDV2 共感染样品。

结合中华人民共和国农业行业标准《兔出血症血凝和血凝抑制试验方法》(NY/T 572-2002)进行复合检验。

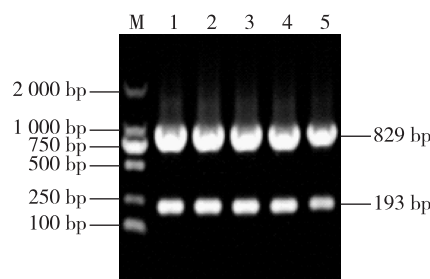
2 结果

2.1 RT-PCR 反应条件的优化

利用 2 对引物,以 2 种重组质粒为模板,进行 PCR 反应条件的优化。优化退火温度范围为 50.0~60.0 ℃。如图 1 所示,58.2 ℃ 扩增获得 2 个条带较其他泳道亮度亮,因此,退火温度为 58.2 ℃ 时,扩增效率最高。

2.2 引物结合特异性鉴定

利用引物对 2,分别以 2 种重组质粒 pMD19-T-

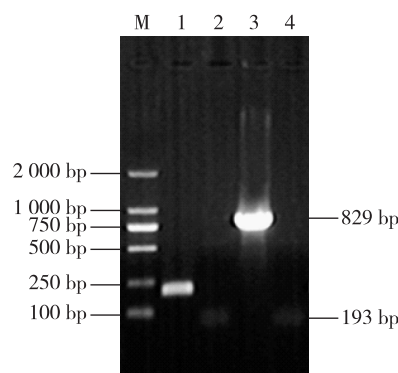


M:DL2000 DNA marker;1:60.0 ℃;2:58.2 ℃;3:55.6 ℃;4:51.8 ℃;5:50 ℃。

图 1 RT-PCR 退火温度的优化

Fig. 1 The optimization of annealing temperature of RT-PCR system

VP60 和 pMD19-T-VP60-2 为模板进行 PCR 反应,结果(图 2)显示,以 pMD19-T-VP60 为模板时,出现一条 193 bp 大小的片段;以 pMD19-T-VP60-2 为模板时,无特异性条带产生。利用引物对 1,分别以 2 种重组质粒 pMD19-T-VP60 和 pMD19-T-VP60-2 为模板,进行 PCR 反应,结果(图 2)显示,以 pMD19-T-VP60-2 为模板时,出现一条 829 bp 大小的片段;以 pMD19-T-VP60 为模板时,无特异性条带产生。表明 2 对引物均能够特异性识别各自对应的毒株,且无非特异性交叉反应,可用于鉴别诊断经典 RHDV 和 RHDV2。



M:DL2000 DNA marker;1:引物对 2,模板为 pMD19-T-VP60;2:引物对 2,模板为 pMD19-T-VP60-2;3:引物对 1,模板为 pMD19-T-VP60-2;4:引物对 1,模板为 pMD19-T-VP60。

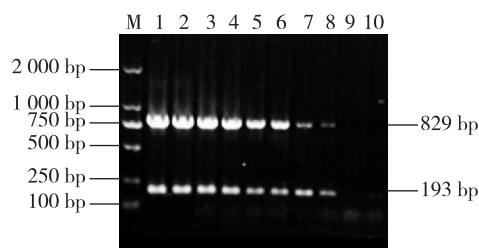
图 2 RHDV 和变异株 RHDV2 引物结合特异性鉴定

Fig. 2 The specificity of the primers for classic RHDV and variant RHDV2

2.3 敏感性试验

分别将 2 种重组质粒 pMD19-T-VP60 和 pMD19-T-VP60-2 定量,起始浓度分别为 9.5×10^8 拷

贝和 7.6×10^6 拷贝,并 10 倍比稀释后进行敏感性检测。结果显示,2 种重组质粒 pMD19-T-VP60 和 pMD19-T-VP60-2 的检测下限分别为 95 拷贝和 76 拷贝(图 3),该方法敏感性较高。



M:DL2000 DNA ladder; 1~9:表示连续 10 倍稀释的 pMD19-T-VP60 和 pMD19-T-VP60-2,起始浓度分别为 9.5×10^8 拷贝和 7.6×10^8 拷贝;10:阴性对照。

图 3 方法灵敏度检测

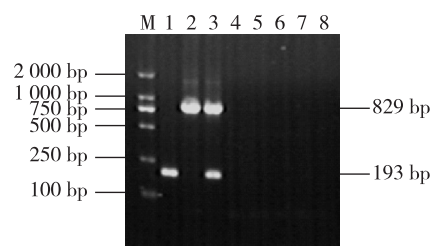
Fig.3 The sensitivity of the RT-PCR method

2.4 特异性试验

图 4 显示,以 2 种重组质粒为模板进行 PCR 反应,显示出大小为 193 bp 和 829 bp 的两条特异性条带;以 RHDV cDNA 为模板进行 PCR 反应,显示 1 条大小为 193 bp 的特异性条带;以 pMD19-T-VP60-2 为模板进行 PCR 反应,显示 1 条大小为 829 bp 的特异性条带。以支气管败血波氏杆菌、多杀性巴氏杆菌、产气荚膜梭菌、大肠杆菌的 DNA 以及重组质粒 pMD19-T-EBHSV 为模板,均无条带产生。因此经退火温度优化后的 RT-PCR 方法特异性良好。

2.5 样品检测

分别对 RHDV 人工感染兔肝脏样品和临床收集样品进行 RT-PCR 检测,结果显示,6 份 RHDV 人工感染样品均产生大小为 193 bp 的特异性条带,检



M:DL2000 DNA ladder;1.经典 RHDV cDNA;2.pMD19-T-VP60-2;3.重组质粒 pMD19-T-VP60 和 pMD19-T-VP60-2;4.支气管败血波氏杆菌;5.多杀性巴氏杆菌;6.产气荚膜梭菌;7. 大肠杆菌;8. pMD19-T- EBHSV。

图 4 方法特异性检测

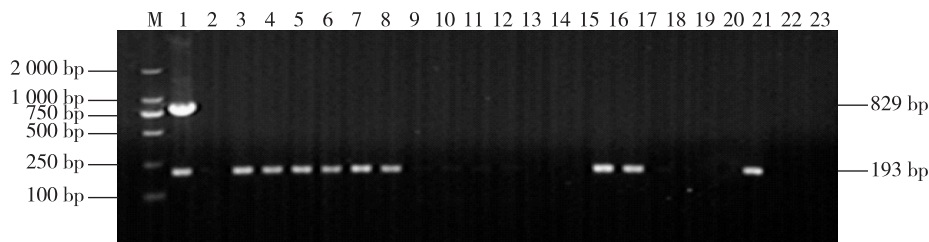
Fig.4 The specificity of the RT-PCR method

出率为 100%;15 份临床样品中有 3 份产生大小为 193 bp 的特异性条带,其他样品均无特异性条带产生,所有临床样品均未检测到 RHDV2(图 5)。

根据行业标准《兔出血症血凝和血凝抑制试验方法》(NY/T 572-2002)进行复合检验,上述检验中 9 份 RHDV 阳性组织样本处理后与 1%人“O”型红细胞作用,均具有血凝特性,12 份 RHDV 阴性组织样本与 1%人“O”型红细胞作用均无血凝特性,2 种检测方法符合率 100%。

3 讨论

RHDV 属于杯状病毒科兔病毒属,自 1984 年中国首次报道至今,RHDV 持续发生遗传变异。研究者们根据系统发育关系,将 RHDV 毒株分为不同的基因型 G1~G6,其中 G6 也称 RHDVa^[11],是目前国内主要的流行毒株^[12]。2010 年法国 G. Le-Recule 等首次发现并报道 RHDV2^[4],此后该毒株已经在欧洲迅速扩散,2015 年在欧洲以外的大陆也发现 RHDV2^[9, 13],RHDV2 正在世界范围内迅速传播。



M:DL2000 DNA marker;1:阳性对照(2 种重组质粒为模板);2:阴性对照;3~8:人工感染经典 RHDV 样品;9~23:疑似 RHDV 感染的临床样品。

图 5 RHDV 感染样品的 RT-PCR 检测

Fig.5 Identification of RHDV in the samples by RT-PCR

虽然目前中国尚未检测到该变异毒株的存在,但由于国内家兔行业与欧洲兔业具有密切的贸易来往,因此随时面临发生该疫情的风险。

遗传变异分析发现变异毒株与经典毒株基因同源性仅 82.7%,经典 RHDV 疫苗对 RHDV2 感染的家兔不能提供有效的交叉保护^[3]。经典 RHDV 与 RHDV2 对家兔的致病性以及症状相似,在临床上较难区分^[6]。因此,利用分子生物学技术进行鉴别诊断十分必要。

VP60 蛋白是 RHDV 的主要结构蛋白,是病毒衣壳的组成单位^[1]。目前针对 RHDV 的检测均以 VP60 基因作为靶基因^[14-16],检测 VP60 基因可以准确鉴定病毒的感染。本研究将经典 RHDV G1~G6 与 RHDV2 VP60 序列进行比对,上游引物设计在两毒株 VP60 序列高度变异区,下游引物设计在两毒株保守区,2 对引物均可以特异性结合对应毒株的 VP60 基因,无交叉反应,可以保证特异性鉴别经典 RHDV、RHDV2 以及两者共感染的情况。

本研究通过人工合成 RHDV2 VP60 全长基因,构建重组质粒,并将其作为模板建立 PCR 方法,克服了目前没有 RHDV2 毒株的问题。为保持与 RHDV2 的同步性,采用经典 RHDV VP60 基因重组质粒作为模板,进行一系列 PCR 反应条件的优化、敏感性检测以及特异性检测,最终利用优化确定的反应条件检测了临床样品,该 RT-PCR 方法实现了经典 RHDV 100%检出率,与农业部行业标准的检测方法复合率 100%。该方法仅需要 3 条引物,在一个 PCR 反应体系中即可最终实现快速有效鉴别诊断经典 RHDV 和 RHDV2 的感染,可用于监测国内 RHDV2 的流行情况,对保障国内家兔养殖业的健康发展具有重要意义。

参考文献:

- [1] ABRANTES J, VAN DER LOO W, LE PENDU J, et al. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review [J]. Vet Res, 2012, 43:12.
- [2] 范志宇,魏后军,胡波,等.兔出血症病毒杆状病毒载体灭活疫苗安全性及效力试验[J].江苏农业科学,2015,43(11):272-275.
- [3] 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.
- [4] LE GALL-RECULE G, ZWINGELSTEIN F, BOUCHER S, et al. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France[J]. The Veterinary Record, 2011, 168(5):137-138.
- [5] 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(1):1-7.
- [6] DALTON K P, NICIEZA I, BALSEIRO A, et al. Variant rabbit hemorrhagic disease virus in young rabbits, Spain [J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18(12):2009-2012.
- [7] 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.
- [8] BAILY J L, DAGLEISH M P, GRAHAM M, et al. RHDV variant 2 presence detected in Scotland [J]. The Veterinary Record, 2014, 174(16):411.
- [9] HALL R N, MAHAR J E, HABOURY S, et al. Emerging rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDVb), Australia [J]. Emerg Infect Dis, 2015, 21(12):2276-2278.
- [10] 王芳,胡波,任雪枫,等.兔出血症病毒衣壳蛋白在昆虫细胞中的表达及对家兔的免疫保护效果[J].畜牧兽医学报, 2008, 39(10):1382-1387.
- [11] LEUTHOLD M M, DALTON K P, HANSMAN G S, et al. Structural analysis of a rabbit hemorrhagic disease virus binding to histoblood group antigens[J]. J Virol, 2015, 89(4):2378-2387.
- [12] 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.
- [13] DUARTE M, CARVALHO C, BERNARDO S, et al. Rabbit haemorrhagic disease virus 2 (RHDV2) outbreak in Azores: Disclosure of common genetic markers and phylogenetic segregation within the European strains [J]. Infection, Genetics and Evolution, 2015, 35:163-171.
- [14] DUARTE M D, CARVALHO C L, BARROS S C, et al. A real time Taqman RT-PCR for the detection of rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2) [J]. Journal of Virological Methods, 2015, 219:90-95.
- [15] YANG L, WANG F, HU B, et al. Development of an RT-PCR for rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) and the epidemiology of RHDV in three eastern provinces of China [J]. Journal of Virological Methods, 2008, 151:24-29.
- [16] WANG X, HAO H, QIU L, et al. Phylogenetic analysis of rabbit hemorrhagic disease virus in China and the antigenic variation of new strains [J]. Arch Virol, 2012, 157(8):1523-1530.

(责任编辑:孙宁)