

王冠萱,陈萌萌,仇汝龙,等. 兔出血症病毒 1、2 型双重 TaqMan 探针荧光定量 PCR 检测方法的建立和应用[J]. 江苏农业科学,2023,51(18):40-44.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.18.006

兔出血症病毒 1、2 型双重 TaqMan 探针荧光定量 PCR 检测方法的建立和应用

王冠萱^{1,2}, 陈萌萌¹, 仇汝龙¹, 范志宇¹, 胡波¹, 宋艳华¹, 魏后军¹, 葛雷¹, 徐为中¹, 王芳^{1,2}, 钱莺娟²

(1. 江苏省农业科学院兽医研究所/农业农村部兽用生物制品工程重点实验室, 江苏南京 210014;

2. 南京农业大学动物医学院/教育部动物健康与食品安全国际合作联合实验室/农业农村部动物细菌学重点实验室, 江苏南京 210095)

摘要:兔出血症(rabbit hemorrhagic disease,RHD)是由兔出血症病毒(rabbit hemorrhagic disease virus,RHDV)引起的欧洲兔(*Oryctolagus cuniculus*)的急性致死性传染性疾病。RHDV 属于杯状病毒科(Calicivirus)兔病毒属(*Lagovirus*)。目前兔出血症病毒 1 型(GI.1)和兔出血症病毒 2 型(GI.2)2 种基因型均有在我国流行。为了更好地进行流行病学调查、实时监测兔出血症发展趋势和临床诊断,建立了一种检测 RHDV1 型和 RHDV2 型病原的快速、简单、特异且敏感的 TaqMan 实时 PCR。结果显示,稀释度为 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^4$ copies/ μ L 标准品建立的标准曲线有良好的线性关系,决定系数 r^2 为 0.999;该方法对 RHDV1 型和 RHDV2 型具有高度特异性,与兔多杀性巴氏杆菌、兔支气管败血波氏菌等其他病原没有任何交叉反应;检测灵敏度为 100 ~ 1 000 copies/ μ L;组内和组间变异系数在 0.01% ~ 1.61% 之间。用该方法对 60 份临床肝脏样品和 52 份鼻肛拭子样本进行检测,结果显示,RHDV 检出率为 70.5%,敏感性显著高于普通 RT-PCR 方法(51%)。因此,该方法能够同时检测 RHDV1 型和 RHDV2 型,可用于鉴别诊断兔出血症病毒。

关键词:兔出血症病毒 1 型;兔出血症病毒 2 型;双重 TaqMan qPCR

中图分类号:S852.65 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)18-0040-05

兔出血症(rabbit hemorrhagic disease,RHD)是一种急性、烈性、高度接触性传染病^[1-4],由兔出血症病毒(rabbit hemorrhagic disease virus,RHDV)引起。于 1984 年首次在中国发现^[2],并迅速传播至欧洲、澳大利亚、非洲等地^[3,5-6],该疾病死亡率高达 90%,严重危害养兔业的发展^[3]。2010 年,一种新的 RHDV 毒株在法国被发现,不同于经典 RHDV 毒株的血清型,被命名为 RHDV2^[7]。目前,RHDV2 在欧洲、亚洲、非洲、澳大利亚、北美等地广泛流行^[5,8],并逐渐取代经典 RHDV 和 RHDVa 成为当地的优势毒株^[8-9]。我国于 2020 年出现由 RHDV2 毒株引起的 RHD 暴发^[10],由于目前使用的针对经典 RHDV 毒株制备的疫苗对 RHDV2 的交叉保护效果

有限^[11-12],导致 RHDV2 在国内迅速流行,国内呈现经典 RHDV 和 RHDV2 这 2 种基因型共同流行的情况。

RHDV 是杯状病毒科(Calicivirus)^[13]兔病毒属(*Lagovirus*)成员,目前引起 RHD 的 RHDV 有 GI.1 和 GI.2 这 2 个基因型。截至 2010 年,经典 RHDV 分离株属于 GI.1 基因型。2010 年,在欧洲发现了一种新的变异 RHDV,该毒株在系统发育和抗原方面与 GI.1 基因型不同,被命名为 RHDV2 或 RHDVb,属于 GI.2 基因型^[7,14]。RHDV 为单股正链 RNA 病毒^[1],基因组全长为 7437 个核苷酸,衣壳由单个结构蛋白 VP60 构建^[15],包含有 2 个开放阅读框(ORF)^[16]。

感染 RHDV1 和 RHDV2 的家兔临床症状相似,均会出现死亡、厌食、发热等症状,剖检可见肝脏出血、坏死,脾肿大,全身弥漫性血管内凝血(DIC)^[3,17-18]等,所以仅靠临床症状无法准确区分,需要依靠分子生物学诊断技术进行鉴别^[19]。TaqMan RT-qPCR 技术与普通 RT-PCR 相比,具有污染少、定量准确、实时检测、敏感性高等优点^[20-21],而且可以在同一个反应管中同时检测多种

收稿日期:2022-10-20

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项(编号:CARS-43-C-1)。

作者简介:王冠萱(1999—),女,山西汾阳人,硕士研究生,主要从事兔病原检测研究。E-mail:gxwang@163.com。

通信作者:王芳,博士,研究员,主要从事家兔重要疫病致病机制及防控技术研究,E-mail:rwangfang@126.com;钱莺娟,博士,教授,主要从事动物传染病研究,E-mail:yqian@njau.edu.cn。

基因,大大提高了反应效率^[21]。因此本研究采用 TaqMan RT-qPCR 技术建立一种可以在同一个反应管中鉴别 RHDV1 和 RHDV2 型病原的方法,以便于临床和实际生产中免出血症的快速诊断和防控。

1 材料与方法

1.1 病毒株与样品

免出血症病毒 1 型(RHDV1)、免出血症病毒 2 型(RHDV2)、轮状病毒(Rotavirus, RV)、兔支气管败血波氏菌、兔多杀性巴氏杆菌、绿脓杆菌、沙门氏菌 cDNA 由笔者所在实验室保存。临床待检样品来自 2021 年 12 月之后山东、福建等地养兔场送检的疑似 RHDV 感染兔肝脏及笔者所在实验室模拟动物试验中获取的鼻肛拭子。

1.2 试剂与仪器

RNAiso Plus(病毒 RNA 提取试剂)从 TaKaRa

公司购买, HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+ gDNA wiper)(反转录试剂)、AceQ qPCR Probe Master Mix(TaqMan 荧光定量试剂盒)均从诺唯赞生物有限公司购入;凝胶成像仪从上海天能(Tanon)科技有限公司购入。电泳仪购自(Bio-Rad)公司。QuantStudio 1 荧光定量 PCR 仪从美国 Applied Biosystems 公司购入。PCR 仪从艾本德(Eppendorf)中国有限公司购入。

1.3 引物和探针

根据 GenBank 中的 RHDV1 分离株 WF 2007(登录号:FJ794180)和 RHDV2 分离株 SC 2020/04(登录号:MT383749)的基因序列,利用 Primer Express3.0.1 软件针对保守 VP60 基因序列设计 2 组特异性引物和 TaqMan 探针(表 1)。引物和探针由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 RHDV1 型和 RHDV2 型 TaqMan qPCR 特异性引物与 TaqMan 探针

名称	序列(5'→3')	大小 (bp)
RHDV1-O-F	ACYTGACTGAACTCATTGACG	104
RHDV1-O-R	TCAGACATAAGAAAAGCCATTGG	
RHDV1-O-Probe	VIC-CCAARAGCACRCTCGTGTTC AACCT-BHQ1	
RHDV2-C-F	CGGTTTGCCGCCATTG	78
RHDV2-C-R	CCAAAGCTCAAGCACGTTTG	
RHDV2-C-Probe	FAM-AACGCAAGTTTCCCTGGAAGCAGTTC-BHQ1	

1.4 标准质粒的构建

采用 RHDV1 分离株 WF2007、RHDV2 分离株 SC 2020/04 的 VP60 基因全长引物克隆目的基因,将获得的基因序列连接到 pMD18-T 载体上,将筛选验证成功的 pMD18-T-WF2007-VP60、pMD18-T-SC2020-VP60 质粒送去生物公司进行测序,将测序结果进行比对符合预期结果。测定重组质粒浓度并计算拷贝数,用 ddH₂O 稀释为 1 × 10¹⁰ copies/μL,作为模板标准品。

1.5 双重 TaqMan qPCR 体系和反应条件的优化

以“1.4”节中质粒标准品为模板,按照 TaqMan 荧光定量试剂盒说明书进行扩增,总反应体系为 20 μL。对退火温度(55 ~ 65 ℃)、引物浓度(0.1 ~ 1 μL)、探针浓度(0.1 ~ 1 μL)进行优化,确定最佳反应体系和条件。

1.6 双重 TaqMan qPCR 标准曲线的建立

将“1.4”节中稀释后的 2 种质粒标准品 1:1 混

合后进行 10 倍倍比稀释,选择 1 × 10⁸ ~ 1 × 10⁴ copies/μL 5 个梯度质粒标准品作为阳性模板进行扩增。根据荧光定量 PCR 仪自带软件 Quant Studio™ Design & Analysis Software 自动生成标准曲线。

1.7 特异性试验

以兔多杀性巴氏杆菌、兔支气管败血波氏菌、沙门氏菌、绿脓杆菌、轮状病毒(RV)的基因组 DNA 为模板,以双蒸水为阴性对照,以构建的 RHDV1 型和 RHDV2 型标准品质粒 1:1 混合后作为阳性对照模板,进行荧光定量 PCR 特异性检测。

1.8 敏感性试验

以 1 × 10⁸ copies/μL 作为 2 种质粒标准品的起始浓度,进行 10 倍倍比稀释,使用 1 × 10⁸ ~ 1 × 10¹ copies/μL 的混合质粒作为反应模板,以 ddH₂O 为阴性对照模板,进行 TaqMan RT-qPCR 和普通 RT-PCR 扩增,检测其敏感性。

1.9 重复性试验

以 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^4$ copies/ μL 的混合质粒为模板进行 TaqMan RT-qPCR 扩增,分别进行组内和组间重复性试验,整理 C_T 值并计算变异系数,评价其重复性。

1.10 临床样本的检测

使用本研究建立的 TaqMan 双重荧光定量 RT-PCR 方法和普通 RT-PCR 方法对 2021 年 12 月之后收到的来自山东、福建等地的疑似 RHDV 感染的家兔肝脏样品、鼻肛拭子以及以及笔者所在实验室模拟动物实验的样本进行检测,比较本研究建立的方法与常规 RT-PCR 方法的检出率。

2 结果与分析

2.1 双重 TaqMan qPCR 反应体系及参数优化

优化后的 20 μL 反应体系: $2 \times \text{AceQ}$ qPCR Probe Master Mix 10 μL , 1 型上下游引物各 0.4 μL

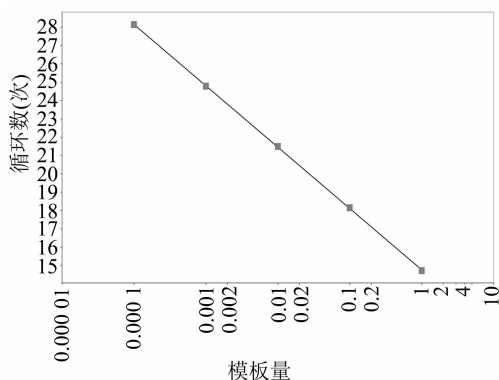
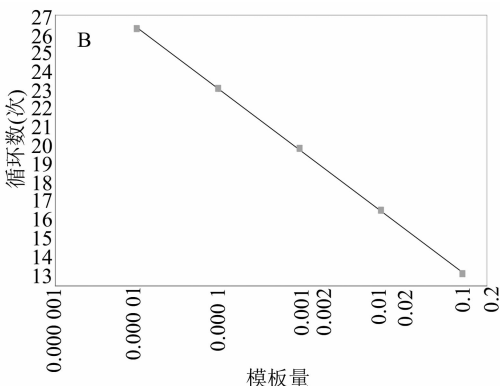


图1 pMD18-T-WF2007-VP60(A)、pMD18-T-SC2020-VP60(B)质粒的标准曲线

(10 $\mu\text{mol/L}$), 2 型上下游引物各 0.2 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), RHDV-1-Probe 0.2 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), RHDV-2-Probe 0.2 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), $50 \times \text{ROX}$ Reference I 0.4 μL , 质粒 cDNA 模板 2 μL , dd₂O 6 μL 。反应程序: 95.0 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95.0 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环。

2.2 双重 TaqMan qPCR 标准曲线的建立

将 10 倍倍比稀释的 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^4$ copies/ μL 混合质粒按照优化后的反应体系和参数进行扩增,软件自动生成标准曲线(图 1): RHDV1 型标准曲线决定系数 $r^2 = 0.999$, 标准方程为 $y = -3.347x + 14.764$, 目的基因的扩增效率为 98.952%; RHDV2 型标准曲线决定系数 $r^2 = 0.999$, 标准方程为 $y = -3.331x + 9.833$, 目的基因的扩增效率为 99.615%。结果显示,本研究建立的兔出血症病毒 1、2 型 TaqMan 双重荧光定量 PCR 方法有良好的线性关系。



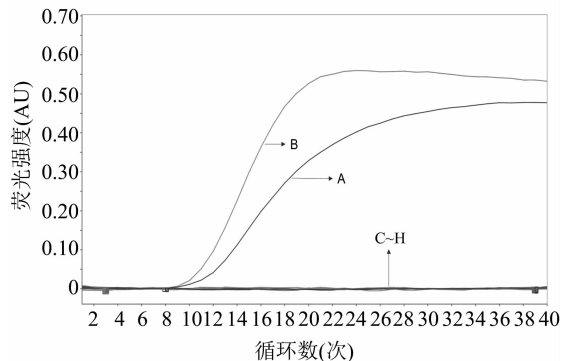
2.3 双重 TaqMan qPCR 的特异性试验

用“1.5”节优化好的体系及参数对兔支气管败血波氏菌、兔多杀性巴氏杆菌、沙门氏菌、绿脓杆菌、轮状病毒(RV)进行检测,同时设置阴阳性对照,结果(图 2)显示,除 RHDV1 型、RHDV2 型产生特异性的扩增曲线外,其他病原体及双蒸水均不产生扩增曲线,说明该方法具有良好的特异性。

2.4 双重 TaqMan qPCR 的敏感性试验

选取稀释度为 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^1$ copies/ μL 的质粒作为模板进行 TaqMan RT-qPCR 和常规 RT-PCR 扩增。RT-qPCR 扩增结果显示,该方法的敏感性可达到 100 ~ 1 000 copies/ μL ; 普通 RT-PCR 结果显示,当质粒 pMD-18T-WF 浓度在 1×10^4 copies/ μL 、pMD-18T-SC 浓度在 1×10^3 copies/ μL 时有模糊的目的条带出现。由此可

见, TaqMan qPCR 的灵敏度约为常规 PCR 的 10 ~ 100 倍(图 3)。



A—RHDV1 型; B—RHDV2 型; C—多杀性巴氏杆菌; D—支气管败血波氏菌; E—沙门氏菌; F—绿脓杆菌; G—轮状病毒; H—阴性对照

图2 双重 TaqMan qPCR 的特异性试验

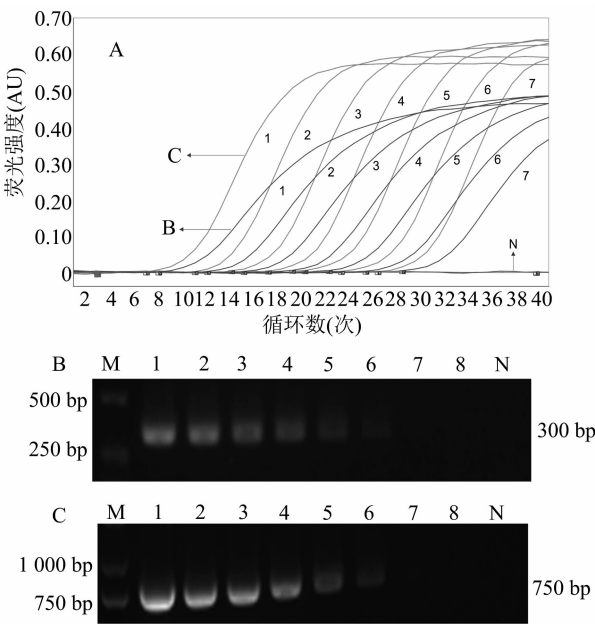


图3 双重 TaqMan qPCR 与常规 PCR 的敏感性试验

表 2 双重 TaqMan qPCR 的重复性试验

样品	浓度 (copies/ μ L)	组内重复		组间重复	
		平均值 \pm 标准差	变异系数(%)	平均值 \pm 标准差	变异系数(%)
RHDV - 1	1×10^6	23.82 ± 0.003	0.01	24.27 ± 0.392	1.61
	1×10^5	27.94 ± 0.004	0.01	27.88 ± 0.039	0.14
	1×10^4	31.55 ± 0.024	0.08	31.71 ± 0.129	0.41
RHDV - 2	1×10^6	23.15 ± 0.029	0.12	22.92 ± 0.210	0.92
	1×10^5	26.36 ± 0.054	0.20	26.14 ± 0.194	0.74
	1×10^4	29.34 ± 0.036	0.12	29.29 ± 0.087	0.30

份 RHDV1 型,15 份 RHDV2 型;鼻腔拭子中检出 0 份 RHDV1 型,10 份 RHDV2 型(表 3)。结果显示,本试验建立的双重荧光定量 PCR 方法的敏感性显著高于普通 RT - PCR。

表 3 临床样品的检测结果

临床样本	双重荧光定量 PCR 检测结果		PCR 检测结果	
	肝脏样品	鼻腔拭子	肝脏样品	鼻腔拭子
RHDV1 型	18/60	3/52	14/60	0/52
RHDV2 型	29/60	29/52	23/60	20/52
混合感染	2/60	0/42	0/49	0/42

3 讨论

2020 年至今,RHDV2 型已在我国发生了广泛的流行,相比于 RHDV1 型,RHDV2 型不仅感染成年家兔,还可以感染幼年家兔和野兔^[12],严重危害

2.5 双重 TaqMan qPCR 的重复性检测

2 种重组质粒分别选取 10^6 、 10^5 、 10^4 这 3 个稀释度,每个稀释度重复 3 次,进行重复性试验。并根据荧光定量 PCR 得到的 C_T 值,计算结果见表 2。结果显示,组内和组间的重复试验变异系数在 0.01% ~ 1.61% 之间,说明该双重荧光定量 PCR 方法重复性良好。

2.6 临床样本检测

利用已经建立的 TaqMan RT - qPCR 和常规 RT - PCR 方法分别对来自全国不同兔场疑似 RHDV 感染的 49 份临床样品以及笔者所在实验室保存的 42 份鼻腔拭子进行检测。TaqMan RT - qPCR 方法检测 49 份临床肝脏样品,检出 14 份 RHDV1 型,19 份 RHDV2 型,2 份 RHDV1、2 型混合感染;检测 42 份鼻腔拭子样品,检出 3 份 RHDV1 型,19 份 RHDV2 型;用常规 RT - PCR 方法检出 12

养兔业的发展和自然生态环境。目前,我国已有建立的单独检测 RHDV1 型的诊断方法,如 RT - PCR 方法^[22]、ELISA 方法^[23]等,但均无法应用于 RHDV2 型的检测。笔者所在实验室建立了单独检测 RHDV2 型的 TaqMan qPCR 方法^[19],但是无法同时检测 2 种不同血清型的 RHDV,不利于疫病的检测和诊断。因此,建立一种可以同时检测 RHDV1 型和 RHDV2 型的方法来应对 RHD 的诊断和防控十分必要。

应用软件 Primer Express 3.0 分别针对 RHDV1 型和 RHDV2 型保守的 VP60 序列设计引物和探针,筛选出最合适的引物和探针,并优化反应条件和反应体系,成功建立了双重 TaqMan RT - qPCR 方法。绘制 RHDV1 型和 RHDV2 型标准曲线,决定系数 r^2 均为 0.999,可见线性关系良好;使用该 TaqMan RT - qPCR 方法检测 RHDV1 型、RHDV2 型时,与兔

多杀性巴氏杆菌、兔支气管败血波氏菌、沙门氏菌、绿脓杆菌、轮状病毒均无交叉反应,说明该方法特异性良好;该方法对 RHDV1 型、RHDV2 型的灵敏度可以达到 $1 \mu\text{L}$ 100 ~ 1 000 拷贝数,比笔者所在实验室建立的鉴别经典 RHDV 与 RHDV2 的普通 RT-PCR 方法^[24]灵敏 10 ~ 100 倍;重复试验结果表明,组内和组间重复性试验 *CV* 值在 0.01% ~ 1.61% 之间,说明该方法有良好的重复性。

综上,本试验建立的 TaqMan 双重 RT-qPCR 方法可以在同一个反应管中检测 RHDV1 型和 RHDV2 型,具有特异性好、敏感性高的优点,可以很大程度上提高临床检测效率,有助于实际生产中对 RHD 的诊断和防控,为开发快速诊断试剂盒奠定了基础。

参考文献:

- [1] Dalton Kevin P, Nicieza Inés, Balseiro Ana, et al. Variant rabbit hemorrhagic disease virus in young rabbits, Spain [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2012, 18(12).
- [2] Xu Z J, Chen W X. Viral haemorrhagic disease in rabbits: a review [J]. *Veterinary Research Communications*, 1989, 13(3): 205 – 212.
- [3] Abrantes J, van der Loo W, le Pendu J, et. al. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review [J]. *Veterinary Research*, 2012, 43(1): 12.
- [4] 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.
- [5] Rouco C, Aguayo – Adán J A, Santoro S, et. al. Worldwide rapid spread of the novel rabbit haemorrhagic disease virus (GI. 2/RHDV2/b) [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2019, 66(4): 1762 – 1764.
- [6] Cooke B D, Robinson A J, Merchant J C, et. al. Use of ELISAs in field studies of rabbit haemorrhagic disease (RHD) in Australia [J]. *Epidemiology & Infection*, 2000, 124(3): 563 – 576.
- [7] le Gall – Reculé G, Zwingelstein F, Boucher S, et. al. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France [J]. *Veterinary Record*, 2011, 168(5): 137 – 138.
- [8] Qi R B, Meng C C, Zhu J, et al. The outbreak of rabbit hemorrhagic virus type 2 in the interior of China may be related to imported semen [J]. *Virologica Sinica*, 2022, 36(4): 623 – 626.
- [9] le Gall – Reculé G, Lavazza A, Marchandeau S, et. al. Emergence of a new lagovirus related to rabbit haemorrhagic disease virus [J].

Veterinary Research, 2013, 44: 81.

- [10] Hu B, Wei H, Fan Z, et. al. Emergence of rabbit haemorrhagic disease virus 2 in China in 2020 [J]. *Veterinary Medicine and Science*, 2021, 7(1): 236 – 239.
- [11] 程蓓蓓, 钟秀平. 新型兔出血症病毒与经典病毒的差异 [J]. *中国动物检疫*, 2021, 38(4): 90 – 94.
- [12] 宋艳华, 胡波, 范志宇, 等. 兔出血症病毒 2 型 SC 株 VP60 基因工程疫苗研制及其与传统兔出血症病毒疫苗的交叉保护作用 [J]. *江苏农业科学*, 2022, 50(16): 50 – 54.
- [13] Parra F, Prieto M. Purification and characterization of a calicivirus as the causative agent of a lethal hemorrhagic disease in rabbits [J]. *Journal of Virology*, 1990, 64(8): 4013 – 4015.
- [14] le Pendu J, Abrantes J, Bertagnoli S, et al. Proposal for a unified classification system and nomenclature of lagoviruses [J]. *Journal of General Virology*, 2017, 98(7): 1658 – 1666.
- [15] Hukowska – Szematowicz B, Tokarz – Deptuła B, Deptuła W. Genetic variation and phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) strains. [J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2012, 59(4).
- [16] Meyers G, Wirblich C, Thiel H J. Rabbit hemorrhagic disease virus – molecular cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome [J]. *Virology*, 1991, 184(2): 664 – 676.
- [17] Capucci L, Scicluna M T, Lavazza A. Diagnosis of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome: – EN – – FR – – ES – [J]. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 1991, 10(2): 347 – 370.
- [18] 范志宇, 陈萌萌, 胡波, 等. 我国首株兔出血症病毒 2 型的致病性及病理学初步研究 [J]. *江苏农业科学*, 2020, 48(11): 143 – 147.
- [19] 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.
- [20] 梁子英, 刘芳. 实时荧光定量 PCR 技术及其应用研究进展 [J]. *现代农业科技*, 2020(6): 1 – 3, 8.
- [21] Jiang W, Yue S, He S, et. al. New design of probe and central – homo primer pairs to improve TaqMan™ PCR accuracy for HBV detection [J]. *Journal of Virological Methods*, 2018, 254: 25 – 30.
- [22] 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.
- [23] 张连芝, 王樱历, 路化梅, 等. 兔出血症病毒间接 ELISA 抗体检测方法的建立 [J]. *中国预防兽医学报*, 2018, 40(1): 35 – 39.
- [24] 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.