

周雅楠,陈萌萌,仇汝龙,等. 经典和重组兔黏液瘤病毒 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,2025,53(1):226-230.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2025.01.031

经典和重组兔黏液瘤病毒 TaqMan 探针荧光定量 PCR 检测方法的建立和应用

周雅楠^{1,2,3}, 陈萌萌^{2,3}, 仇汝龙^{2,3}, 魏后军^{2,3}, 范志宇^{2,3}, 胡 波^{2,3}, 宋艳华^{2,3},
葛 雷^{2,3}, 李一鸣^{2,3}, 徐为中^{2,3}, 王 芳^{1,2,3}

[1. 新疆农业大学动物医学学院,新疆乌鲁木齐 830052; 2. 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技术重点实验室,江苏南京 210014; 3. 兽用生物制品(泰州)国泰技术创新中心,江苏泰州 225300]

摘要:根据 GenBank 已登录的经典兔黏液瘤病毒(MYXV)和重组兔黏液瘤病毒(ha-MYXV)基因保守序列设计特异性引物和 TaqMan 探针,建立能同时检出 ha-MYXV 和 MYXV 病原的快速、简单且敏感性较高的 TaqMan 探针荧光定量 PCR 临床检测方法。结果显示,稀释度为 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^3$ 拷贝/ μL 标准品建立的标准曲线具有良好的线性关系,相关系数为 1.00;该方法对 MYXV 和 ha-MYXV 具有高度特异性,与绿脓杆菌、兔多杀性巴氏杆菌、沙门氏菌、兔出血症病毒 1 型、兔出血症病毒 2 型等其他病原间无交叉反应;检测灵敏度可达 1×10^2 拷贝/ μL ;组内和组间变异系数在 0.05% ~ 1.19% 间。该方法的建立为引进种兔及家兔相关产品兔黏液瘤病毒的检疫提供了技术支撑。

关键词:兔黏液瘤病;经典兔黏液瘤病毒;重组兔黏液瘤病毒;TaqMan qPCR

中图分类号:S852.65 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2025)01-0226-05

兔黏液瘤病(myxomatosis)是由兔黏液瘤病毒(rabbit myxoma virus, MYXV)引起的一种高度接触性、致死性传染病。该病的主要表现为兔双侧眼睑结膜炎、鼻出血、多器官强烈充血和水肿,以及一些内部出血^[1]。该病最早发现于 1896 年乌拉圭蒙得维的亚的实验室的兔子^[2]。1898 年乌拉圭科学家首次从试验兔分离到该病毒^[3]。1927 年,该病毒被确定为痘病毒,后被澳大利亚引入用作控制野兔数量^[3-4],并迅速在南美、英国、法国等地蔓延^[1,5-7]。

目前,MYXV 在美国、南欧、新西兰和澳大利亚的兔种群中呈持续性感染,引起慢性地方性动物传染病^[8]。2018 年,一种新型重组黏液瘤病毒(ha-MYXV)在伊比利亚半岛的伊比利亚兔(*Lepus granatensis*)中造成了高死亡率,确认了该病毒出现跨物种传播。该病毒于 2018 年 7 月至 2020 年 4 月期间,在伊比利亚兔种群中共确认发生 372 起由

ha-MYXV 引起的疫情^[1,9-12]。我国目前未有报道出现此病,因此需要对引进的家兔进行严格检疫。

兔黏液瘤病毒是痘病毒属的一员,属于痘病毒科(Poxviridae)脊索动物痘病毒亚科(Chordopoxvirinae)野兔痘病毒属(*Leporipoxvirus*)。MYXV 具有一个大型的、线性的双链 DNA 基因组,具有末端反向重复序列(TIRs)和两端共价闭合的发夹环^[13]。经典 MYXV 以洛桑株作为参考株,编码了 158 个独特的开放阅读框架(ORF)^[2,14]。MYXV 的完整复制周期只发生在被感染细胞的细胞质中,并在细胞质中表达宿主相互作用的免疫调节蛋白。该病毒仅在自然环境下感染家兔和欧洲褐兔(偶尔出现临床症状),对除兔形目外的任何受试宿主均无致病性,但 MYXV 可以在许多物种的培养细胞中复制^[3,15]。

感染兔黏液瘤病毒的家兔与感染兔纤维瘤病毒(Shoope fibroma virus, SFV)的家兔表现的症状相似,均会表现为皮下肿瘤病灶。但感染黏液瘤病毒会产生全身性病变并死亡,而纤维瘤病毒仅会引起自限性皮肤损伤,肿块经数月后会自动消退。二者仅靠临床症状无法区分或靠病程后期区分等待周期过长^[16],需要建立检测危害严重的黏液瘤病毒病的诊断方法。本研究采用基于 TaqMan 探针法荧光定量 PCR 技术建立一种能够同时检测出经典兔黏

收稿日期:2024-01-29

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项资金(编号:CARS-43-C-1)。

作者简介:周雅楠(1999—),女,新疆库尔勒人,硕士研究生,主要从事家兔疫病病原检测技术研究。E-mail:rzhouyanan@163.com。

通信作者:王 芳,博士,研究员,主要从事家兔疫病防控及免疫机理研究。E-mail:rwangfang@126.com。

液瘤毒株和重组兔黏液瘤的方法,以便于海关检测中兔黏液瘤病毒的快速判断和防控。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 毒株与样品 兔出血症病毒 1 型、兔出血症病毒 2 型的 cDNA 及兔多杀性巴氏杆菌、绿脓杆菌、沙门氏菌 DNA 由笔者所在实验室保存备用。

1.1.2 主要试剂 AceQ qPCR Probe Master Mix (TaqMan 荧光定量试剂盒)、HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+ gDNA wiper) (反转录试剂)均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;TsingZol Total RNA Extraction Reagent (病毒 RNA 提取试剂),购自北京擎科生物科技股份有限公司;HiPure

Tissue DNA Mini Kit,购自上海迈跟生物科技有限公司。

1.1.3 主要仪器 普通 RCR 扩增仪,由 Eppendorf 公司购入;QuantStudio1 荧光定量 PCR 仪从美国 Applied Biosystems 公司购入。

1.1.4 引物和探针及标准质粒的构建 由表 1 可知,选择在 MYXV 和 ha-MYXV 中均保守的基因序列 m000.5 L/R 基因^[17],利用软件 Primer Express

3.0.1 对基因序列设计 1 组特异性引物、TaqMan 探针和包含 m000.5 L/R 完整片段的标准品质粒 MYXV-pUC18。引物和探针均由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。使用时用 DEPC 水将引物和探针稀释至 10 μmol/L,短期可 -20 ℃ 保存,长期需在 -80 ℃ 保存。

表 1 引物、TaqMan 探针

引物名称	序列(5' →3')	长度 (bp)
MYXV-125Y 136R-F	CGGYCTATCCTCGGRCAGACA	21
MYXV-175-200-R	CCGACGACGTAGATTTATCGTATACC	26
MYXV-144-170-probe	6FAM-AGACGCGTCCACCTCCGAATCTAAACA-BHQ1	27

1.2 方法

1.2.1 标准曲线的建立 20.0 μL 反应体系:采用 AceQ qPCR Probe Master Mix (TaqMan 荧光定量试剂盒),2 × AceQ qPCR Probe Master Mix 10.0 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 0.4 μL,ROX 0.4 μL,荧光探针 0.2 μL,标准品质粒 2.0 μL,DEPC 水 6.6 μL。反应条件:95 ℃ 5 min;95 ℃ 10 s,60 ℃ 34 s,40 个循环。将“1.1.4”节中的标准品质粒进行 10 倍倍比稀释,选择 1 × 10⁷ ~ 1 × 10³ 拷贝/μL 5 个梯度质粒标准品作为阳性对照的模板进行扩增。根据荧光定量 PCR 仪自带软件 QuantStudio™ Design & Analysis Software 自动生成标准曲线。

1.2.2 特异性试验 以兔多杀巴氏杆菌、绿脓杆菌、沙门氏菌基因组 DNA 及兔出血症病毒 1 型、兔出血症病毒 2 型基因组 RNA 逆转录后的 cDNA 为模板,以无菌水为阴性对照,以合成的 MYXV 阳性标准品质粒作为对照模板,进行荧光定量 PCR 特异性检测。

1.2.3 敏感性试验 以 1 × 10⁸ 拷贝/μL 作为标准品质粒的起始浓度,进行 10 倍倍比稀释,使用 1 × 10⁸ ~ 1 × 10¹ 拷贝/μL 的质粒作为反应模板,以无菌水作为阴性对照。在荧光定量 PCR 仪进行扩增。

1.2.4 重复性试验 以稀释后浓度为 1 × 10⁶ ~

1 × 10³ 拷贝/μL 4 个梯度的质粒为模板进行荧光定量 PCR 扩增,每个梯度重复 3 次,分别计算组内及组间平均数、标准差和变异系数,作为评估其重复性的依据。

1.2.5 临床样本的检测 使用本研究建立的 TaqMan 荧光定量的方法对 2023 年 7 月之后收到的来自全国各地疑似 MYXV 感染的家兔眼鼻拭子、生殖器拭子、脾脏样本进行检测。

2 结果与分析

2.1 TaqMan qPCR 标准曲线的绘制

采用 AceQ qPCR Probe Master Mix 20 μL 反应体系对标准品质粒进行扩增,如图 1-A 所示,当标准品质粒含量在 1 × 10³ ~ 1 × 10⁷ 拷贝/μL 时,获取其扩增动力曲线。由图 1-B 可知,可得到标准曲线 $y = -3.4741gx + 44.828$,其相关系数为 1.00,扩增效率为 94.12%。图 1-A、图 1-B 均由仪器自带软件 QuantStudio™ Design & Analysis Software 生成。

2.2 TaqMan qPCR 的特异性试验

以 1 × 10⁷ 拷贝/μL 标准质粒作为模板设阳性对照,以无菌水为阴性对照,以保存的兔多杀巴氏杆菌、绿脓杆菌、沙门氏菌基因组 DNA 及兔出血症

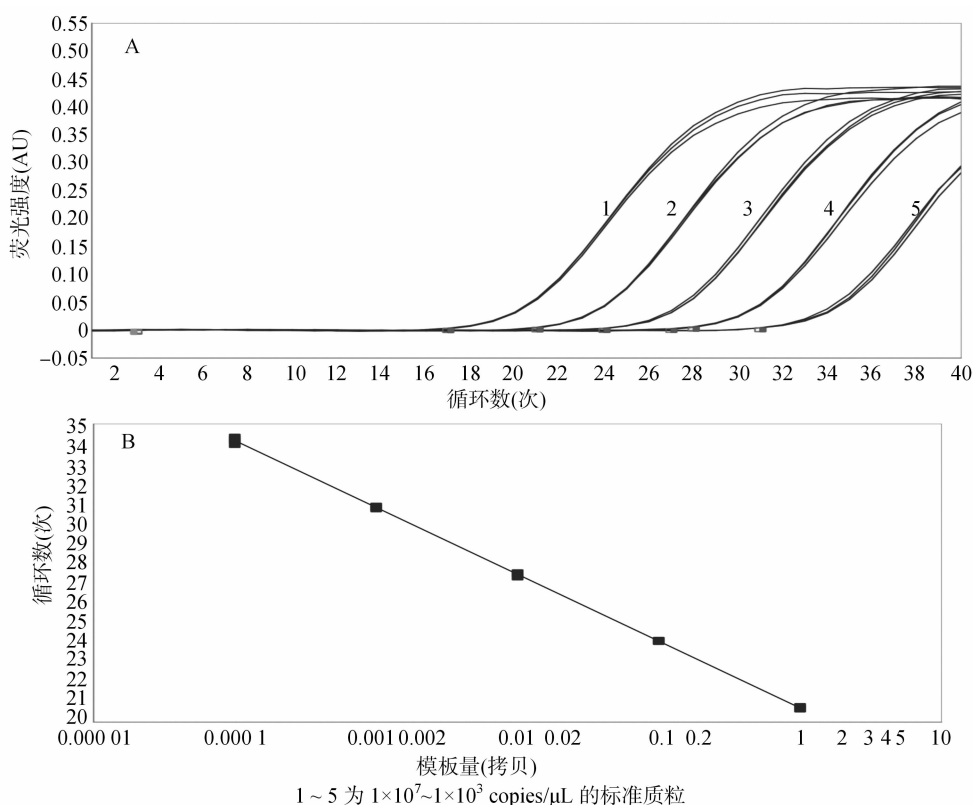
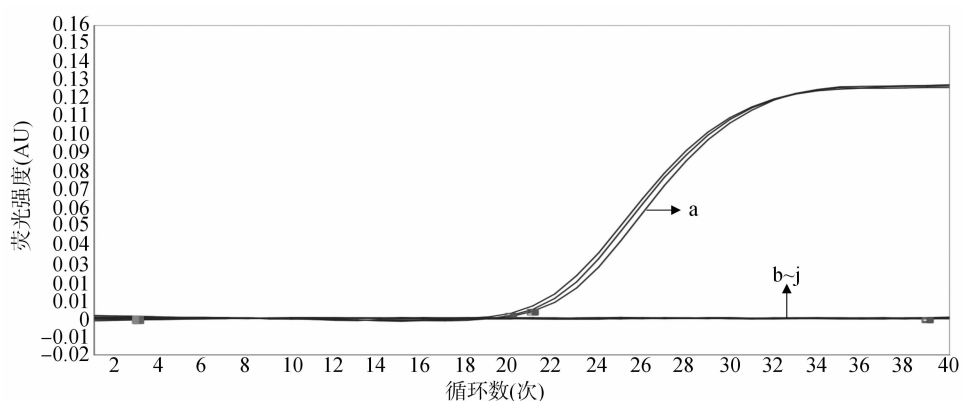


图1 MYXV 和 ha-MYXV Taq Man 探针法荧光定量 PCR 扩增动力学曲线(A)和 MYXV 和 ha-MYXV Taq Man 探针法荧光定量 PCR 标准曲线(B)

病毒 1 型、兔出血症病毒 2 型基因组 RNA 逆转录后的 cDNA 为模板,检测所建立的 TaqMan 荧光定量 PCR 方法的特异性。由图 2 可知,仅标准品 MYXV

阳性质粒组出现特异性扩增曲线,而其他细菌 DNA 或病毒 cDNA 检测结果均未见扩增。



a—MYXV-pUC18 阳性质粒; b—兔出血症病毒 1 型; c—兔出血症病毒 2 型; d—兔多杀性巴氏杆菌; e—沙门氏菌; f—绿脓杆菌; g—无菌水

图2 MYXV 和 ha-MYXV qPCR 特异性分析

2.3 TaqMan qPCR 的敏感性试验

由图 3 可知,以 1×10^8 拷贝/ μL 作为标准品质粒的起始浓度,进行 10 倍倍比稀释,使用 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^1$ 拷贝/ μL 的质粒作为反应模板,以无菌水作为阴性对照,进行荧光定量 PCR 扩增,该方法最低检出量为 1×10^2 拷贝/ μL 的模板,对应 C_T 值约为

38.1。

2.4 TaqMan qPCR 的重复性试验

选取含量为 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^3$ 拷贝/ μL 4 个梯度的质粒为模板进行重复性试验,每个梯度 3 个重复。由表 2 可知,组内变异系数在 0.05% ~ 0.34% 之间,组间变异系数在 0.57% ~ 1.19% 之间,说明该

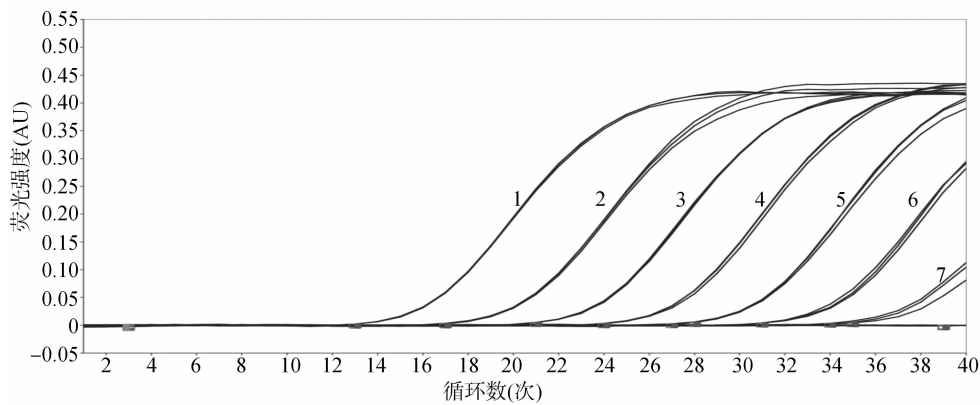


图3 MYXV 和 ha-MYXV qPCR 敏感性分析
1~7 为 $1\times 10^8\sim 1\times 10^2$ 拷贝/ μL 的标准质粒

表 2 MYXV 和 ha-MYXV 探针荧光定量 PCR 检测方法的重复性

模板拷贝数 (拷贝/ μL)	C_T 平均数	C_T 标准差	组内变异系数 (%)	C_T 平均数	C_T 标准差	组间变异系数 (%)
1×10^6	25.55	0.03	0.10	25.67	0.25	0.99
1×10^5	29.07	0.09	0.31	29.08	0.24	0.84
1×10^4	32.65	0.02	0.05	32.55	0.19	0.57
1×10^3	36.42	0.12	0.34	36.14	0.43	1.19

荧光定量 PCR 方法重复性良好。

2.5 临床样本的检测

利用已经建立的 TaqMan qPCR 方法对来自 2023 年 7 月至 12 月间四川成都、河南郑州和河南济源不同兔厂疑似 MYXV 感染的 32 份眼鼻拭子、32 份生殖器拭子、32 份脾脏样本进行检测,均未检测出 MYXV 感染(表 3)。

表 3 临床样品的检测结果

临床样品	荧光定量 PCR 检测结果(份)		
	眼鼻拭子	生殖器拭子	脾脏样本
MYXV	0/32	0/32	0/32

3 讨论

MYXV 不仅能够通过环喙库蚊种群作为机械载体传播,几乎所有的啮齿或吸血节肢动物均可作为病毒的载体,在密集封闭区域内,兔子之间也曾报道过直接接触传播,这使的 MYXV 能够大面积的传播^[16,18-20]。在澳大利亚引进 MYXV 后的 7 年内,共同进化选择压力将 MYXV 在野兔中的总体死亡率降低到 30% 以下。在英国和法国引入 MYXV 后,MYXV 与其兔宿主之间也出现了类似的共同进化过程^[5-7]。

迄今为止,已知 MYXV 在欧洲兔中表现出至少

2 种临床表现型:结节型(“经典”或“典型”黏液瘤病)和呼吸型(“非黏液瘤”或“非典型”黏液瘤病)。经典黏液瘤病以明显的皮肤假性肿瘤为特征,称为“黏液瘤”,主要位于头部和肛门区域。非典型形式显示出主要的呼吸道症状,没有或仅有少量小的皮肤病变。这 2 种临床表现型均可伴随眼睑炎、眼睑结膜炎、头部和肛门水肿,以及发热、呼吸困难、倦怠、鼻分泌物或俯卧等临床症状,导致死亡率高达 100%^[18-22]。然而,仅在美洲棉尾兔中,MYXV 感染引起的是一种轻微的疾病,其特征是无害的皮肤纤维瘤^[19]。我国目前未有报道出现此病,但该病毒一旦在国内流行起来,则会对国内家兔养殖行业造成巨大的经济损失,需要对引进的种兔进行严格检疫。因此,需建立一种能够同时检出 MYXV 和 ha-MYXV 且快速、高效和敏感高的检测方法来防范和控制 MYXV 的发生。

对于症状较为明显的病例,可以对临床症状、病理变化以及病程做出初步诊断。如需确诊还需用其他方法进行检测。目前,已有针对兔黏液瘤病毒多种诊断方法的深入研究。其中包括鸡胚绒毛尿囊膜、兔肾等原代细胞分离病毒,观察其病变,但该方法不易区分 MYXV 与 SFV 引起的病变且耗时较长^[23-24]。此外还有琼脂免疫扩散试验以及补体结合试验、ELISA、免疫荧光抗体试验及血清中和试

验等。其中,琼脂免疫扩散试验和 ELISA 试验检测样品仅能是血液样品,较为局限;补体结合试验对补体滴度要求高且标准不好统一;免疫荧光抗体试验敏感性高但需要荧光显微镜,操作过程复杂,检测周期长;血清中和试验,试验周期较长。目前已有的 qPCR 检测方法并未包括 2018 年被报道的会造成较高死亡率的重组黏液瘤毒株^[25]。

综上所述,本研究建立了基于 MYXV 与 ha - MYXV 基因片段 m000.5L 的 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法。此方法具有强特异性和高敏感度等优点,可用于临床疾病诊断,也可为海关提供一种快速、简便、有效的检测 MYXV 的方法。

参考文献:

- [1] Agulló - Ros I, Jiménez - Martín D, Camacho - Sillero L, et al. Pathological changes and viral antigen distribution in tissues of Iberian hare (*Lepus granatensis*) naturally infected with the emerging recombinant myxoma virus (ha - MYXV) [J]. The Veterinary Record, 2023, 192(1): e2182.
- [2] Cameron C, Hota - Mitchell S, Chen L, et al. The complete DNA sequence of myxoma virus [J]. Virology, 1999, 264(2): 298 - 318.
- [3] Bertagnoli S, Gelfi J, Le Gall G, et al. Protection against myxomatosis and rabbit viral hemorrhagic disease with recombinant myxoma viruses expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein [J]. Journal of Virology, 1996, 70(8): 5061 - 5066.
- [4] Fenner F. Deliberate introduction of the European rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, into Australia [J]. Revue Scientifique et Technique, 2010, 29(1): 103 - 111.
- [5] Best S M, Kerr P J. Coevolution of host and virus; the pathogenesis of virulent and attenuated strains of myxoma virus in resistant and susceptible European rabbits [J]. Virology, 2000, 267(1): 36 - 48.
- [6] Ross J, Tittensor A M. The establishment and spread of myxomatosis and its effect on rabbit populations [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London (Series B, Biological Sciences), 1986, 314(1167): 599 - 606.
- [7] Bartrip P W J. Myxomatosis in 1950s Britain [J]. 20 Century British History, 2008, 19(1): 83 - 105.
- [8] Pastoret P P. Biological control of vertebrate pests: The history of myxomatosis - an experiment in evolution [J]. The Veterinary Journal, 2000, 159(3): 219.
- [9] García - Bocanegra I, Camacho - Sillero L, Caballero - Gómez J, et al. Monitoring of emerging myxoma virus epidemics in Iberian hares (*Lepus granatensis*) in Spain, 2018 - 2020 [J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2021, 68(3): 1275 - 1282.
- [10] García - Bocanegra I, Camacho - Sillero L, Rialde M A, et al. First outbreak of myxomatosis in Iberian hares (*Lepus granatensis*) [J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2019, 66(6): 2204 - 2208.
- [11] Abade Dos Santos F A, Carvalho C L, Pinto A, et al. Detection of recombinant Hare Myxoma Virus in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus algirus*) [J]. Viruses, 2020, 12(10): 1127.
- [12] Dalton K P, Martín J M, Nicieza I, et al. Myxoma virus jumps species to the Iberian hare [J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2019, 66(6): 2218 - 2226.
- [13] Moss B, Smith G L. Poxviridae: the viruses and their replication [J]. Field's Virology, 2021: 573 - 613.
- [14] Morales M, Ramírez M A, Cano M J, et al. Genome comparison of a nonpathogenic myxoma virus field strain with its ancestor, the virulent Lausanne strain [J]. Journal of Virology, 2009, 83(5): 2397 - 2403.
- [15] Saari S A M, Rudbäck E, Niskanen M, et al. Contagious mucocutaneous dermatitis of the mountain hare (*Lepus timidus*): pathology and cause [J]. Journal of Wildlife Diseases, 2005, 41(4): 775 - 782.
- [16] 王芳, 范志宇, 薛家宾. 兔病图鉴 [M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2019: 88 - 94.
- [17] Duarte M D, Barros S C, Henriques A M, et al. Development and validation of a real time PCR for the detection of myxoma virus based on the diploid gene M000.5L/R [J]. Journal of Virological Methods, 2014, 196: 219 - 224.
- [18] Burnet F M. Myxomatosis as a method of biological control against the Australian rabbit [J]. American Journal of Public Health and the Nation's Health, 1952, 42(12): 1522 - 1526.
- [19] Bertagnoli S, Marchandeu S. Myxomatosis [J]. Revue Scientifique et Technique, 2015, 34(2): 549 - 556, 539 - 547.
- [20] Farsang A, Makranszki L, Dobos - Kovács M, et al. Occurrence of atypical myxomatosis in Central Europe: clinical and virological examinations [J]. Acta Veterinaria Hungarica, 2003, 51(4): 493 - 501.
- [21] Spiesschaert B, McFadden G, Hermans K, et al. The current status and future directions of myxoma virus, a master in immune evasion [J]. Veterinary Research, 2011, 42(1): 76.
- [22] Kerr P J, Liu J E, Cattadori I, et al. Myxoma virus and the *Leporipoxviruses*: an evolutionary paradigm [J]. Viruses, 2015, 7(3): 1020 - 1061.
- [23] 姜骞. 兔黏液瘤病 [J]. 畜牧兽医科技信息, 2003(10): 51 - 52.
- [24] 王凯民. 兔黏液瘤病毒和兔纤维瘤病毒荧光 PCR 鉴别诊断方法的建立 [D]. 南京: 南京农业大学, 2016: 1 - 2.
- [25] 林颖峥, 林士佳, 宋青, 等. 兔黏液瘤病快速检测方法的建立 [J]. 中国动物检疫, 2015, 32(8): 72 - 75.