

水貂阿留申病毒、肠炎病毒与犬瘟热病毒多重 PCR 检测方法的建立与应用

马 芹, 王元智, 闫文卓, 赵丽丽, 陈洪岩, 陆涛峰*

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 黑龙江省实验动物与比较医学重点实验室, 哈尔滨 100193)

【摘要】 目的 水貂阿留申病、病毒性肠炎与犬瘟热并称影响水貂健康的三大疫病, 拟建立一种可同时检测三种病毒的多重 PCR 检测方法。方法 针对三种病毒基因保守区分别设计了3对特异性引物, 对貂阿留申病毒(ADV)和水貂肠炎病毒(MEV)的DNA模板和犬瘟热病毒(CDV)的RNA模板进行了多重PCR扩增和扩增条件优化。结果 PCR可同时扩增出601 bp(ADV)、205 bp(MEV)和451 bp(CDV)的特异性目的条带, 敏感性试验表明最低核酸检出量为ADV每微升 2.67×10^4 拷贝、MEV每微升 3.02×10^4 拷贝和CDV每微升 1.72×10^5 拷贝。临床样品检测结果表明多重PCR和单一PCR检测结果一致。结论 建立的多重PCR检测方法可快速地检测ADV、MEV和CDV单一或混合感染的临床样品。

【关键词】 多重PCR; 水貂阿留申病毒; 水貂肠炎病毒; 犬瘟热病毒

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017)12-0097-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.12.017

Establishment and application of a multiplex PCR assay for detection of Aleutian disease parvovirus, enteritis parvovirus and canine distemper virus in the mink

MA Qin, WANG Yuan-zhi, YAN Wen-zhuo, ZHAO Li-li, CHEN Hong-yan, LU Tao-feng*

(Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Laboratory Animal and Comparative Medicine, Harbin 100193, China)

【Abstract】 Objective Aleutian disease, mink enteritis and canine distemper are the three major diseases affecting health of mink. This study intends to establish a multiplex PCR assay for simultaneously detecting of these three viruses. **Methods** According to the conservative sequences reported in GenBank, three pairs of specific primers were designed to amplify the DNA templates of Aleutian mink disease parvovirus (ADV), mink enteritis parvovirus (MEV), and RNA templates of canine distemper virus (CDV), and optimized the amplifying conditions. **Results** The specific objective strips of 601 bp (ADV), 205 bp (MEV) and 451 bp (CDV) were amplified simultaneously. The sensitivity test showed that the lowest nucleic acid detection limits were 2.67×10^4 copies per μL for ADV, 3.02×10^4 copies per μL for MEV, and 1.72×10^5 copies per μL for CDV. The results of test of the clinical samples showed that the multiple PCR and single PCR assay were consistent. **Conclusions** The established multiplex PCR assay in this study can be used to rapidly detect the clinical samples of ADV, MEV and CDV single or mixed infections.

【Key words】 Multiplex PCR; Aleutian mink disease parvovirus; Mink enteritis parvovirus; Canine distemper virus

[基金项目] 国家支撑计划项目(2015BA107B02)。

[作者简介] 马芹(1990-), 女, 硕士研究生, 专业: 预防兽医学。E-mail: 542446515@qq.com

[通讯作者] 陆涛峰(1982-), 男, 助理研究员, 博士, 研究方向: 实验动物与比较医学。E-mail: taofenglu@126.com

貂作为重要的经济动物,不仅仅具有经济价值^[1],同时貂还是流感病毒、SARS、新城疫病毒、貂圆环病毒、阿留申病毒以及肠炎病毒的宿主,其中雪貂对流感病毒十分易感,感染后表现出与人相似的症状,还能产生免疫反应,因此雪貂可作为研究流感病毒最佳的实验动物模型。貂的实验动物化养殖必须保证背景清晰,并对其携带的病原体进行控制,所以需要建立一系列针对貂携带的病原体的检测方法。水貂阿留申病、病毒性肠炎与犬瘟热并称影响貂健康的三大疫病^[2-4],给貂养殖造成了极大的影响。水貂阿留申病是由水貂阿留申病毒(Aleutian mink disease parvovirus, ADV, 单链 DNA 病毒)引起的一种慢性消耗性疾病,主要特征为浆细胞增多,γ 球蛋白增多和免疫复合物堆积^[5,6]。水貂病毒性肠炎是由水貂肠炎病毒(mink enteritis parvovirus, MEV, 单链 DNA 病毒)引起的急性、高度接触性传染病,主要临床症状是强烈腹泻^[7,8]。水貂犬瘟热是由犬瘟热病毒(canine distemper virus, CDV, 单链 RNA 病毒)引起的急性、热性、高度接触性传染病^[9,10]。临床上这三种病混合感染现象愈发普遍,本试验拟建立多重 PCR 检测方法同时检测 ADV、MEV 和 CDV,为这三种疫病的单一或混合感染进行快速、准确的诊断。

1 材料和方法

1.1 病毒和样品

水貂阿留申病毒(ADV),貂肠炎病毒(MEV),犬瘟热病毒(CDV)及犬腺病毒(CAV)由本实验室保存;临床病料来自黑龙江省周边发病貂场。

1.2 主要试剂与仪器

EasyPure Viral DNA/RNA Kit 试剂盒、EasyScript One-Step RT-PCR SuperMix 购自于 TransGene Biological Science & Technology; AxyPrep DNA Gel Extraction Kit 购自于 Axygen; pMD18-T 载体购自宝生物(大

连)工程有限公司;PCR 仪购于 Bio-Rad;电泳仪购于北京市六一仪器厂;凝胶成像分析系统购于 Sagecreation;其他常规试剂为分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 引物的设计

依据 GenBank 收录的 ADV、MEV、CDV 序列,根据各自保守序列应用 Primer 5.0 软件设计三对特异性引物,均由哈尔滨博仕生物技术有限公司合成,序列如表 1。

1.3.2 病毒 DNA/RNA 的提取

阿留申病毒的 DNA、肠炎病毒的 DNA 及犬瘟热病毒的 RNA 模板,按照 EasyPure Viral DNA/RNA Kit 试剂盒说明书进行提取。

1.3.3 PCR 扩增

利用 One-Step RT-PCR 试剂盒,以提取的 DNA 和 RNA 为模板先进行单一 PCR 扩增,检测引物间的特异性。又将三种模板混合,构建三重 PCR 扩增体系:R-mix 10 μL, E-mix 1 μL, 模板 1.5 μL, 引物 F 各 0.5 μL, 引物 R 各 0.5 μL, ddH₂O 4.5 μL。扩增条件为:45℃ 反转录 30 min;94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 40 个循环;72℃ 再延伸 10 min。

1.3.4 多重 PCR 扩增条件的优化

根据设计的引物,计算 $T_m = (A + T) \times 2 + (G + C) \times 4$,再根据实际情况,设定温度梯度 PCR 反应(梯度为 58℃, 57℃, 56℃, 55℃, 54℃),摸索合适的退火温度。将三对引物等量混合,分别加入 2、1.5、1、0.5 μL 进行 PCR 扩增,摸索合适的引物浓度,确定最佳的多重 PCR 扩增条件。

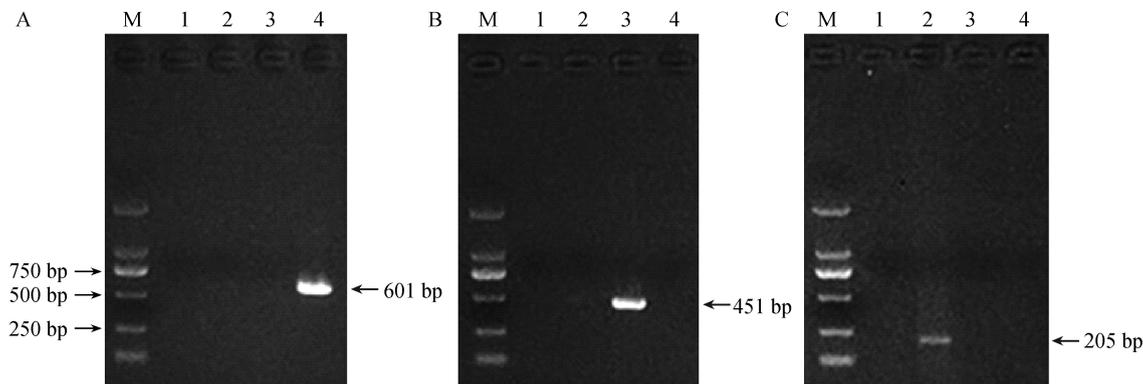
1.3.5 特异性试验

利用上述最佳多重 PCR 扩增体系和扩增条件,对水貂阿留申病毒、貂肠炎病毒、犬瘟热病毒及犬腺病毒样品进行扩增,验证多重 PCR 扩增的特异性。

表 1 引物信息

Tab. 1 Primer information

引物 Primers	序列 Sequence (5'-3')	位置 Location	扩增长度 Length
ADV -F	CITGGGGTGTATGGATGA	2670 ~ 3269	601 bp
ADV-R	GCTCCGTTTCTTTTGAG		
MEV-F	ATGCCCTTGTGTAGACG	3680 ~ 3884	205 bp
MEV-R	TTGGGCTTACCACCATTT		
CDV-F	AGTCTTTGAGATAGGGTT	747 ~ 1197	451 bp
CDV-R	TCCAAAGGTTCCCATGA		



注:A、B 和 C 分别为 ADV、CDV 和 MEV 的 PCR 扩增结果;泳道 1 为阴性对照; M 为 DL 2000 marker;泳道 2~4 分别为 MEV、CDV 和 ADV。

图 1 单一 PCR 扩增结果

Note. A, B, C were the amplification products of ADV, CDV and MEV PCR, respectively. Line 1 was negative control.

M was DL 2000 marker. Lines 2-4 were MEV, CDV and ADV, respectively.

Fig. 1 Amplification products of single PCR test

1.3.6 敏感性试验

将 ADV、MEV、CDV 扩增产物(片段分别为 601 bp、205 bp 和 451 bp)与 pMD18-T 载体连接构建阳性质粒,利用紫外分光光度计测定浓度并换算成质粒拷贝数。将三种阳性质粒等量混合,并进行 10 倍系列稀释,利用多重 PCR 进行扩增,检测方法的灵敏性。

1.3.7 临床样品的检测

利用构建的多重 PCR 方法,对黑龙江省周边貂场疑似水貂阿留申病、貂病毒性肠炎和犬瘟热感染的 10 份病料进行 PCR 检测,并与单一 PCR 检测结果比较。

2 结果

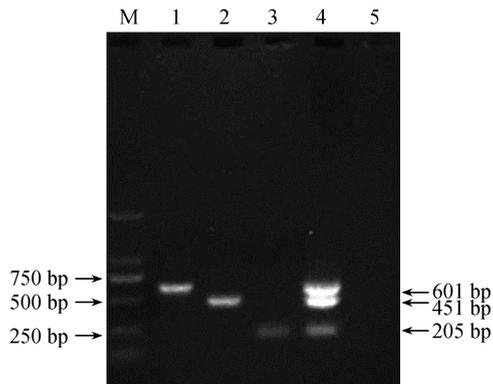
2.1 PCR 扩增

单一和多重 PCR 的扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后,三对引物分别扩增出各自的目的条带,即 ADV 为 601 bp,MEV 为 205 bp,CDV 为 451 bp(图 1),无扩增交叉现象,多重 PCR 能同时扩增出三条片段大小差异明显的条带,与单一 PCR 扩增片段大小一致,不存在引物干扰现象(图 2),测序结果表明扩增产物为三种病毒的特异性片段。

2.2 多重 PCR 扩增条件的优化

通过设置不同的退火温度,优化多重 PCR 扩增条件,结果表明,在 58℃、57℃、56℃、55℃ 和 54℃ 温度下均能扩增出 3 条目的条带,但当退火温度设为 55℃ 时,扩增条带最亮。通过加入不同体积的引物,优化多重 PCR 扩增条件,结果表明,在 2 μL 和 1.5

μL 引物下能扩增出 3 条目的条带,1 μL 的引物不能扩增出 MEV 目的条带,0.5 μL 的引物不能扩增,当加入 1.5 μL 体积的引物时,多重 PCR 扩增结果最佳(图 3)。在 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳下扩增条带效果最佳。



注:泳道 1~4 分别为 ADV、CDV、MEV、ADV + CDV + MEV;泳道 5 为 5:阴性对照;M 为 DL 2000 Marker。

图 2 三重 PCR 扩增结果

Note. Line 1-4 was ADV, CDV, MEV, and ADV + CDV + MEV, respectively. Line 5 was the negative control; M was the DL 2000 marker.

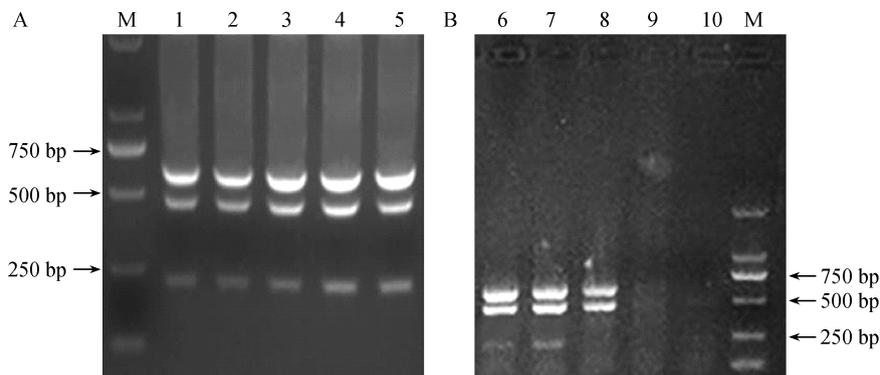
Fig. 2 Amplification products of the multiplex PCR test

2.3 特异性试验

在最佳的多重 PCR 扩增条件下,只能对含有 ADV、CDV 及 MEV 模板的样品扩增出 601 bp、451 bp、205 bp 条带,CAV 样品未扩增出目的条带(图 4)。

2.4 敏感性试验

将 ADV、MEV、CDV 与 pMD18-T 载体构建的质



注:A 为温度优化;B 为引物优化泳道;10 为阴性对照;M 为 DL 2000 Marker;泳道 1~5 分别为 58°C、57°C、56°C、55°C 和 54°C;泳道 6~9 分别为 2、1.5、1、0.5 μL。

图 3 扩增条件优化

Note. A, temperature optimization. B, primer optimization. Line 10 was negative control. M was DL 2000 marker. Lines 1~5 were 58°C, 57°C, 56°C, 55°C, and 54°C, respectively. Lines 6~9 were 2 μL, 1.5 μL, 1 μL, and 0.5 μL, respectively.

Fig. 3 Optimization of the amplifying conditions

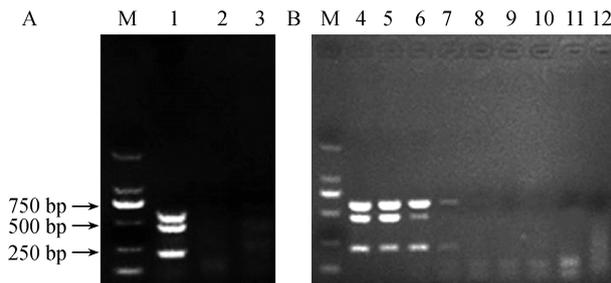
粒进行测序和序列比对分析,表明成功构建阳性质粒。利用紫外分光光度计测定质粒浓度并换算成拷贝数,ADV 的拷贝数为每微升 2.67×10^{10} 个,MEV 的拷贝数为每微升 3.02×10^{10} 个,CDV 的拷贝数为每微升 1.72×10^{10} 个。将混合的模板进行 10 倍系列稀释,取不同浓度模板 1.5 μL 进行多重 PCR 扩增,结果是拷贝数为每微升 10^5 个时能同时扩增出三条目的条带,拷贝数为每微升 10^4 个时只能扩增出 ADV 和 MEV,不能扩增出 CDV,拷贝数为每微升 10^3 个时不能扩增出目的条带(图 4)。多重 PCR 最低检测到 ADV 每微升 2.67×10^4 拷贝、MEV 每微升 3.02×10^4 拷贝和 CDV 每微升 1.72×10^5 拷贝。

2.5 临床样品的检测

对来自黑龙江省周边貂场的 10 份病貂样品进行多重 PCR 和单一 PCR 检测,(图 5),两种 PCR 检测结果均发现 ADV 感染病例有 6 例,MEV 感染病例有 5 例,CDV 感染病例有 4 例,表明多重 PCR 与单一 PCR 检测结果一致,可以用于临床样品检测。另外,多重 PCR 检测结果显示三重感染率为 20%,ADV 和 MEV 感染率超过 50%,临床 ADV、MEV 和 CDV 混合感染较严重。

3 讨论

多重 PCR 反应体系较为特殊,需在同一个反应条件和反应体系下加入多个模板和多对引物,因此扩增条件要求较高,需摸索最佳的扩增条件,以提高扩增反应的效率。影响扩增效率的主要因素有



注:A 为特异性分析;B 为敏感性分析;泳道 2、12 为阴性对照;M 为 DL 2000 marker;泳道 1、3 分别为 ADV + CDV + MEV、CAV;泳道 4~11 阳性质粒浓度分别为每微升 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 拷贝。

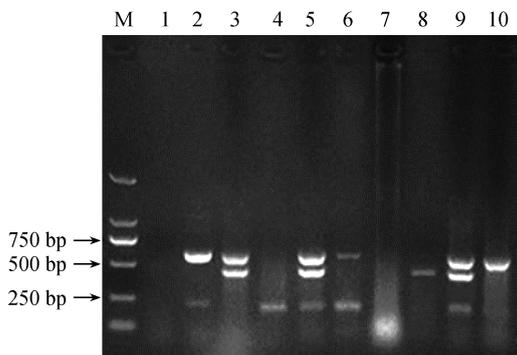
图 4 特异性和敏感性分析

Note. A, specificity analysis; B, sensitivity analysis; Lines 2 and 12 were negative control. M, DL 2000 marker. Lines 1 and 3 were ADV + CDV + MEV and CAV, respectively. Lines 4~11 were different concentrations of the positive recombinant plasmids at 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , and 10^0 copies/μL.

Fig. 4 Specificity and sensitivity analysis

引物和退火温度^[11,12]等。在引物方面,需注意以下几点:(1)引物间不存在互补结构及发卡结构^[13],排除引物干扰现象,提高引物的特异性扩增;(2)多条扩增产物片段大小差异明显,在琼脂糖凝胶电泳中可明显区分;(3)引物间的 Tm 值和 GC% 含量相近,保证在同一退火温度下能同时扩增出多条产物;(4)多重 PCR 扩增体系内,引物浓度直接影响扩增的结果,有必要设立引物浓度梯度摸索合适的引物浓度。在扩增温度方面,退火温度对扩增结果影响较大,需设立温度梯度确定最佳的扩增条件。

水貂阿留申病、病毒性肠炎与犬瘟热并称影响



注:泳道 1~10 分别为临床样品 1~10;M 为 DL 2000 Marker。

图 5 临床样品检测

Note. Lines 1-10 were clinical samples 1-10.

M was DL 2000 marker.

Fig. 5 Detection of the clinical samples

水貂健康的三大疫病,临床上多为混合感染^[2,14],其中水貂阿留申病毒和病毒性肠炎为 DNA 病毒,而犬瘟热病毒为 RNA 病毒,由于三种病毒类型不一致,对多重 PCR 方法的构建要求较高。本试验采用了 DNA/RNA 提取试剂盒和一步法扩增试剂盒,将 DNA 和 RNA 模板同时在一个扩增体系内扩增,缩短了样品处理和扩增的时间,可更快地获取到检测结果,根据检测结果及时地采取防控措施。本试验设计的三对引物在扩增过程中不存在引物干扰现象,可同时扩增出三条目的片段,最佳的退火温度为 55℃;最佳引物体积为 1.5 μL;三重 PCR 敏感性试验表明可检测到每微升 2.67×10^4 拷贝的阿留申病毒、每微升 3.02×10^4 拷贝的水貂肠炎病毒和每微升 1.72×10^5 拷贝的犬瘟热病毒,与杜伟雄^[15]的水貂阿留申病毒的敏感性检测相比,敏感度提高了 10 倍。

多重 PCR 和单一 PCR 都具有相当高的敏感性,可以检测出痕量的核酸模板。对于实验动物貂的常规病原检测,本实验建立的多重 PCR 可同时检测 ADV、MEV 及 CDV 三种病原,与单一 PCR 相比,大大降低了工作量,节约了检测成本,可更快地给出检测结果,及时采取相应的防治措施。有研究^[16]报道多重 PCR 的灵敏度有所下降,但足以达到检测的要求。本实验所建立的重 PCR 可在一次反应中对疑似 ADV、MEV 及 CDV 感染的水貂进行分子

生物学诊断,且快速、特异、简便和灵敏,具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 张立焱,周学红,王惠,等. 哥本哈根、赫尔辛基部分品种水貂皮十年拍卖数据分析 [J]. 野生动物学报,2017,1:110-114.
- [2] 张卓. 水貂阿留申病毒分离鉴定及其致病性研究和诊断方法的建立 [D]. 东北农业大学,2015.
- [3] 钟世勋,迟珊珊,王振,等. 山东规模化养殖场毛皮动物多重感染病原学分析 [J]. 中国兽医学报,2014,11:1770-1777.
- [4] 潘德芹. 水貂多重感染的病原学分析及绿脓杆菌松花粉多糖佐剂灭活疫苗的研制 [D]. 山东农业大学,2014.
- [5] Farid AH, Zillig ML, Finley GG, et al. Prevalence of the Aleutian mink disease virus infection in Nova Scotia, Canada [J]. Prev Vet Med, 2012,106: 32-40.
- [6] Porter DD, Larsen AE, Porter HG. Aleutian disease of mink [J]. Adv Immunol,1980, 29: 61-86.
- [7] 王洋,胡博,马凡舒,等. 水貂病毒性肠炎研究进展 [J]. 特产研究,2016,8(3):67-71.
- [8] Mao Y, Su J, Wang J. Roles of three amino acids of capsid proteins in mink enteritis parvovirus replication [J]. Virus Res, 2016, 222: 24-28.
- [9] 王宇菲,和彦良,孟相秋,等. 水貂犬瘟热的流行、症状及预防 [J]. 山东畜牧兽医,2016,11(3):32.
- [10] 庄金秋,梅建国,王金良,等. 水貂犬瘟热病毒 LD-1 株的分离与鉴定 [J]. 中国畜牧兽医,2014,9(4):226-232.
- [11] 何亚鹏,张琪,史怀平,等. 绵羊痘病毒、山羊痘病毒及羊口疮病毒多重 PCR 检测方法的建立和应用 [J]. 动物医学进展,2017,19(3):11-15.
- [12] 王苗苗,张凡庆,王曼,等. 猪五种繁殖障碍性疫病病原体多重 PCR 的建立及初步应用 [J]. 动物医学进展,2017,22(3):27-31.
- [13] 尹全,李忆,邓强,等. 一种可同步检测 3 种外源基因的多重 PCR 方法 [J]. 山西农业科学,2017,17(1):37-40, 88.
- [14] 潘德芹,朱瑞良,李奕芙,等. 水貂主要病原的分子生物学鉴定及多重感染的病原分析 [J]. 中国兽医学报,2015,16(2):218-224.
- [15] 杜雄伟,李叶,胡传伟. 检测动物产品中水貂阿留申病毒和犬细小病毒复合 PCR 方法的建立和应用 [J]. 中国动物检疫,2012,12(8):43-45.
- [16] 刘飞,张宝存,张晓华,等. 对虾 6 种病毒多重 PCR 检测方法的建立 [J]. 渔业科学进展,2014,19(1):60-67.

[收稿日期]2017-04-20