

水貂阿留申病毒 VP2 基因 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用

闫文卓¹, 陆涛峰², 周洁³, 赵丽丽¹, 陈洪岩¹

(1. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 兽医生物技术国家重点实验室,

黑龙江省实验动物与比较医学重点实验室, 哈尔滨 150069;

2. 贵州中医药大学实验动物研究所, 贵阳 550025;

3. 上海实验动物研究中心, 上海 201203)

[摘要] 目的 建立一种方便、灵敏的水貂阿留申病毒(AMDV)荧光定量 PCR 检测方法, 从而实现临床样品中 AMDV 的快速定量检测。方法 根据 AMDV 的结构蛋白 VP2 的基因保守区域设计一对特异性引物和探针, 优化 PCR 反应条件, 建立 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法, 绘制标准曲线, 并进行特异性、敏感性和稳定性分析。结果 建立的标准曲线在 1.0×10^2 拷贝/ μL 至 1.0×10^8 拷贝/ μL 之间具有良好的线性关系, 相关系数(r^2)大于 0.994。该方法检测的灵敏度为 10^2 拷贝/ μL , 且与犬细小病毒、犬腺病毒、犬瘟热病毒和水貂病毒性肠炎病毒均无明显交叉反应, 特异性良好。重复性试验结果显示, 该方法的组内和组间变异系数均小于 3%, 重复性良好。利用该方法对 417 份临床组织样品进行检测的结果显示, 中国部分地区的 AMDV 阳性率为 81.5%。结论 本研究建立了一种重复性、特异性和敏感性良好的 AMDV 荧光定量 PCR 检测方法, 可用于 AMDV 的临床检测和流行病学调查。

[关键词] 水貂阿留申病; 水貂阿留申病毒; 实时荧光定量 PCR; VP2; 检测方法

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)03-0289-07

随着医药学研究的进步, 水貂作为动物模型的应用日渐广泛, 水貂的实验动物化也已提上日程。有研究表明, 应用水貂建立呕吐模型, 有助于抗呕吐机制研究和新药筛选^[1]。此外, 水貂的听觉很好, 可作为动物模型测试视力对水平方向声音绝对定位能力的影响^[2]。同时, 水貂模型对各种亚型的 A 型流感病毒(influenza A virus, IAV)易感性均很强, 且感染后表现出与人近似的敏感性和临床症状, 呼吸道受体分布也与人类相

似, 因此其在 IAV 研究中应用广泛^[3-4]。水貂是严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)病毒、新城疫病毒、阿留申病毒、貂圆环病毒以及肠炎病毒的宿主^[5], 要实现水貂的实验动物化, 就必须对其携带的病原体进行控制, 因此建立对水貂易携带病原体的病原学及血清学检测方法是十分必要的。

水貂阿留申病(Aleutian mink disease, AD)又称水貂浆细胞增多症(plasmacytosis), 是由水貂阿留申病毒(Aleutian mink disease virus, AMDV)感染引起水貂自身免疫系统功能紊乱的慢性、传染性疾病^[6-7]。渐进性消瘦、繁殖力下降、血清 γ 球蛋白增多、脾脏肿大、肾脏改变(从肿胀和瘀点到萎缩和凹陷)和肠系膜淋巴结肿大是该病的典型特征。AMDV 可通过水平和垂直方式传播, 引

[收稿日期] 2019-12-23

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31700140)

[作者简介] 闫文卓(1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 预防兽医学。E-mail: wenzhuo_y@126.com

[通信作者] 陈洪岩(1963—), 男, 研究员, 研究方向: 实验动物与比较医学。E-mail: chenhongyan@caas.cn

起母貂自然流产和仔貂死亡,能明显影响水貂的繁殖性能和毛皮质量^[8],是影响水貂养殖业的三大疫病(犬瘟热、阿留申病和病毒性肠炎)之一^[9]。

AMDV 又称肉食动物细小病毒 1 型(Carnivore amdoparvovirus 1),属于细小病毒科(Parvoviridae)细小病毒亚科(Parvovirinae)细小病毒属(Amdoparvovirus)^[10],基因组大小约 4.8 kb,编码 2 个结构蛋白(VP1 和 VP2)和 3 个非结构蛋白(NS1、NS2 和 NS3)。其中 VP2 蛋白是主要的免疫原性蛋白,在病毒入侵、致病性和宿主选择方面发挥重要作用^[11]。宿主感染 AMDV 后,会产生明显的抗体依赖性增强作用(antibody dependent enhancement, ADE)^[12],发生严重的免疫复合物疾病和高 γ 球蛋白血症,造成血管炎及肝肾损伤,使感染进一步加重。目前,针对 AD 尚无有效的疫苗^[13],也无可以彻底根治的治疗方案,只能通过定期检疫和淘汰 AMDV 阳性水貂,逐步净化动物种群,从而达到最终控制该病的目的^[14]。阿留申病毒还可以感染雪貂、狐、貉、臭鼬、浣熊和水獭等动物,是实验用动物雪貂必须排查的病原。

阿留申病诊断方法主要有病原学诊断、血清学诊断和分子生物学诊断。病原学诊断主要通过组织研磨液接种克兰德尔猫肾细胞(CRFK),培养后电子显微镜直接观察,结果准确,适于实验室诊断。血清学诊断中,碘凝集试验(IAT)操作简易,适合群体检测,但特异性差,一般仅作为辅助检测方法;对流免疫电泳(CIEP)敏感性、特异性和重复性尚可,比较适合于动物群体定期检疫等大规模检测,但操作较复杂;酶联免疫吸附试验(ELISA)和免疫复合物检测法(CIC)效率高、结果可靠,可用于临床检测。血清学诊断方法在不断改进和丰富,分子生物学诊断方法也在不断建立中。然而,任何一种检测与诊断方法都是有局限性的,应根据实际需求及动物种群的状态,有针对性地选择一种或结合多种方法,实现对

AD 及病原的精确诊断、检测与防控,以及对实验水貂和雪貂微生物质量的全面评价。因此,探索建立灵敏、高效、准确的 AD 诊断与 AMDV 检测方法具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒与样品 水貂细小病毒性肠炎灭活疫苗(mink enteritis virus, MEV)B 株和水貂犬瘟热活疫苗(canine distemper virus, CDV)3 株购自吉林特研生物技术有限责任公司。AMDV、犬细小病毒(canine parvovirus, CPV)株及犬腺病毒(canine adenovirus, CAV)株由本实验室保存。水貂临床样品(肝和脾)采自山东、河北和黑龙江水貂养殖场,共 417 份。

1.1.2 主要仪器和试剂 TransStart Probe qPCR SuperMix 购自北京全式金生物技术有限公司。病毒 DNA 抽提试剂盒(Viral DNA Kit)和质粒提取试剂盒(Plasmid Mini Kit)购自美国 Omega 公司。微量紫外分光光度计购自德国 Implen 公司。荧光定量 PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司。PCR 扩增仪购自美国 Perkinelmer 公司。其他常规试剂为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 根据 GenBank 上 AMDV-G 株(No. M20036)的 VP2 基因保守序列,应用 Primer 5.0 软件设计 1 对特异性引物和 1 条特异性探针,探针 5' 端标记 FAM, 3' 端标记 TAMRA。预计扩增片段长度为 109 bp。引物及探针均由苏州泓迅生物科技有限公司合成,序列见表 1。

1.2.2 质粒标准品的制备 利用拯救 AMDV-G 株病毒的全基因合成重组质粒作为标准品用于荧光定量 PCR 方法的建立,AMDV-G 株基因组 GenBank 号为 M20036,病毒全基因由北京六合华大基因科技有限公司合成,亚克隆到 pUC-19 载

表 1 水貂阿留申病毒(AMDV)VP2 基因引物和探针的序列信息

Table 1 Sequence information of primers and probe of Aleutian mink disease virus (AMDV) VP2 gene

名称	引物序列(5' → 3')	片段大小 /bp	退火温度 /℃
正向引物	CGTTACAGGTTGCTTTAGATAC	109	60
反向引物	TATTGGGTTGGTTTGGT		
探针	CCGTTGGGGGAAACACTGGGCT		

7.8 μL Nuclease-free Water、0.4 μL 探针(10 $\mu\text{mol/L}$)、0.4 μL AMDV VP2 基因上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)、0.4 μL AMDV VP2 基因下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)和 1 μL 质粒模板。优化后的最佳反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 45 个循环。

2.3 荧光定量 PCR 标准曲线

以 1×10^8 拷贝/ μL 为原始 DNA 量进行 10 倍梯度稀释, 每个稀释度设立 3 个重复, 进行荧光定量 PCR, 获得扩增曲线。以 C_t 值为纵坐标, 不同标准品梯度稀释的拷贝数的对数为横坐标, 绘制标准曲线。标准曲线方程为 $Y = -3.456x + 40.488$, 相关系数(r^2)为 0.994(图 2)。结果显示, 荧光定量 PCR 在 $10^8 \sim 10^2$ 拷贝/ mL 的稀释度范围内呈现良好的线性关系。

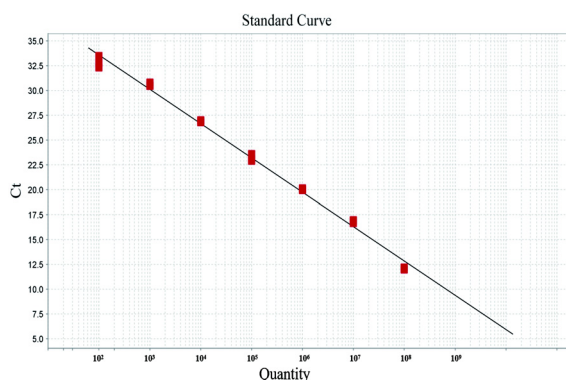


图 2 实时荧光定量 PCR 检测 AMDV VP2 基因的标准曲线

Figure 2 The standard curve of real-time fluorescent quantitative PCR for detecting VP2 gene of AMDV

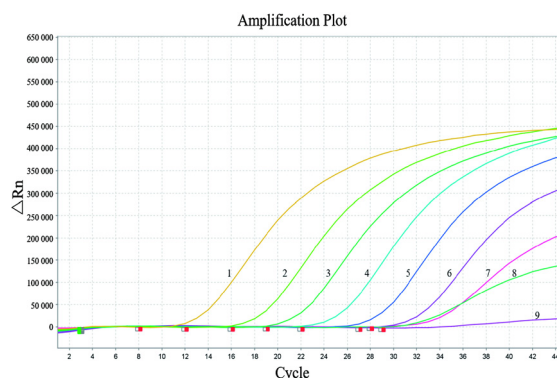
2.4 荧光定量 PCR 检测的敏感性和特异性

敏感性检测结果显示, 荧光定量 PCR 的检测下限为 10^2 拷贝/ μL (图 3)。

运用建立的荧光定量 PCR 方法对 AMDV、CPV、MEV、CDV 和 CAV 的 DNA 进行扩增, 从扩增曲线看, 只有 AMDV 检测出阳性, 而对水貂可能携带的其他病原(CPV、MEV、CDV 和 CAV)扩增的 C_t 值均 > 36 或无数值, 可判定为阴性。结果表明, 该方法对 AMDV 具有良好的特异性(图 4)。

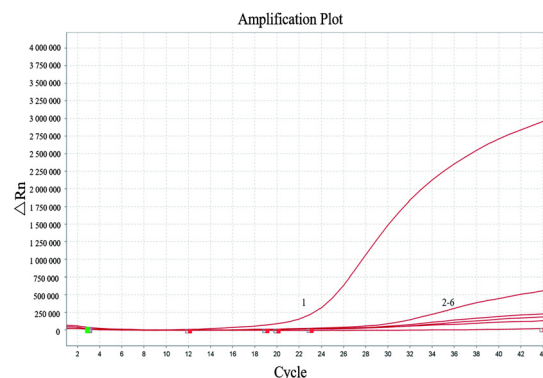
2.5 荧光定量 PCR 检测 AMDV VP2 基因重复性

运用建立的荧光定量 PCR 方法, 对 6 个稀释度的质粒标准品分别进行批次内和批次间的重复



1~8: 1.0×10^8 拷贝/ μL 至 10 拷贝/ μL ; 9: 阴性对照。

图 3 实时荧光定量 PCR 检测 AMDV VP2 基因敏感性试验
Figure 3 Sensitive test of the real-time fluorescent quantitative PCR for detecting VP2 gene of Aleutian mink disease virus (AMDV)



1: AMDV; 2~6: CPV、MEV、CDV、CAV 和阴性对照。

图 4 实时荧光定量 PCR 检测 AMDV VP2 基因特异性试验
Figure 4 Specific test of the real-time fluorescent quantitative PCR for detecting VP2 gene of AMDV

性试验, 结果显示 C_t 值变异系数均小于 3%(表 2), 表明本研究建立的实时荧光定量 PCR 方法的稳定性和重复性均较好。

2.6 临床样品的检测验证

分别利用建立的荧光定量 PCR 方法对采自山东省、河北省和黑龙江省水貂养殖场的 417 份水貂肝脏或脾脏样品中 AMDV VP2 基因进行检测, 统计检测结果的阴阳性数据(表 3)。结果显示, 417 份样品的总 AMDV 阳性率为 81.5%; 其中, 山东省阳性率为 83.5%, 河北省阳性率为 75.0%, 黑龙江省阳性率为 89.0%。3 个省份样品检测的平均 C_t 值分别为 22.77、20.75 和 22.27, 对应的病毒拷贝数分别为 1.34×10^5 、 5.14×10^5 和

表 2 实时荧光定量 PCR 检测 AMDV VP2 基因的组内和组间重复性试验结果

Table 2 Intra-assay and inter-batch reproducibility test of real-time fluorescent quantitative PCR for detecting VP2 gene of AMDV

质粒标准品浓度 / (拷贝 · μL^{-1})	组内变异系数		组间变异系数	
	Ct $\bar{x} \pm s$	变异系数 /%	Ct $\bar{x} \pm s$	变异系数 /%
10^8	12.05 $\pm$ 0.12	1.01	12.16 $\pm$ 0.31	2.59
10^7	16.84 $\pm$ 0.15	0.91	17.05 $\pm$ 0.50	2.94
10^6	20.03 $\pm$ 0.09	0.43	20.24 $\pm$ 0.39	1.92
10^5	23.20 $\pm$ 0.35	1.54	23.50 $\pm$ 0.35	1.49
10^4	26.89 $\pm$ 0.10	0.38	27.35 $\pm$ 0.79	2.87
10^3	30.59 $\pm$ 0.18	0.59	30.72 $\pm$ 0.15	0.48

注: Ct 为循环阈值。

表 3 实时荧光定量 PCR 法检测水貂临床样品中 AMDV 感染结果

Table 3 Detection of AMDV in the mink clinical samples by real-time fluorescent quantitative PCR (n)

样品数	山东	河北	黑龙江	总数
阳性	173	108	59	347
阴性	34	36	7	77
总数	207	144	66	417

1.87×10^5 拷贝/ μL 。数据表明,虽然河北省养殖水貂的 AMDV 阳性率比山东省和黑龙江省低,但是阳性样品的病毒载量相对较高。随机挑选 7 份阳性样品,将其扩增产物胶回收后连接 PMD-18T 载体,进行测序,测序结果与目的片段相吻合(图 5)。

Species/Ab	Group Name	
1. ADV-G		CGTTACAGGTTGCTTTAGATACTAACACATACTGCCATATACTCCAGCTGCGCCGTTGGGGGAAACACTGGGCTTTGTTCCCTTGGAGAGCAACCAACCAACCAATA
2. 11_RV-M		CGTTACAGGTTGCTTTAGATACTAACACATACTGCCATATACTCCAGCTGCGCCGTTGGGGGAAACACTAGGCTTTGTTCCCTTGGAGAGCAACCAACCAACCAATA
3. 12_RV-M		CGTTACAGGTTGCTTTAGATACTAACACATACTGCCATATACTCCAGCTGCGCCGTTGGGGGAAACACTGGGCTTTGTTCCCTTGGAGAGCAACCAACCAACCAATA
4. 13_RV-M		CGTTACAGGTTGCTTTAGATACTAACACATACTGCCATATACTCCAGCTGCGCCGTTGGGGGAAACACTGGGCTTTGTTCCCTTGGAGAGCAACCAACCAACCAATA
5. 14_RV-M		CGTTACAGGTTGCTTTAGATACTAACACATACTGCCATATACTCCAGCTGCGCCGTTGGGGGAAACACTGGGCTTTGTTCCCTTGGAGAGCAACCAACCAACCAATA
6. 15_RV-M		CGTTACAGGTTGCTTTAGATACTAACACATACTGCCATATACTCCAGCTGCGCCGTTGGGGGAAACACTGGGCTTTGTTCCCTTGGAGAGCAACCAACCAACCAATA
7. 16_RV-M		CGTTACAGGTTGCTTTAGATACTAACACATACTGCCATATACTCCAGCTGCGCCGTTGGGGGAAACACTGGGCTTTGTTCCCTTGGAGAGCAACCAACCAACCAATA
8. 17_RV-M		CGTTACAGGTTGCTTTAGATACTAACACATACTGCCATATACTCCAGCTGCGCCGTTGGGGGAAACACTAGGCTTTGTTCCCTTGGAGAGCAACCAACCAACCAATA

图 5 AMDV 感染阳性水貂临床样品的 VP2 基因测序结果

Figure 5 Sequencing results of AMDV VP2 gene in the positive sample of mink clinical samples

3 讨论

AD是在世界范围内对水貂整体健康水平影响最严重的疫病,也是对水貂养殖产业造成严重经济损失的重要因素^[15]。由于 AMDV 的致病机制特殊,目前尚无有效的疫苗应用于疫病防控。因此,检疫淘汰是控制该病的主要途径^[16]。目前,AD防控工作做得最好的国家是丹麦,该国不仅制定了针对 AMDV 的根除计划,还将其列入国家立法中。丹麦利用 CIEP 血清学检测方法筛查并剔除 AMDV 血清学阳性水貂的措施,基本能将阳性 AMDV 水貂场控制在 5% 以下。在中国,随着水貂产业的发展,很多规模化水貂养殖企业也逐

渐提高了对 AD 防控的重视程度,自觉效仿欧洲国家采用 CIEP 方法对阳性水貂进行检疫和淘汰。但是由于缺乏整体规划,再加上水貂私自买卖和调运等因素的影响,除了极少数控制严格的养殖场外,中国养殖水貂种群的整体 AMDV 阳性率还较高。同时,由于 CIEP 检测方法自身的局限性、AMDV 特殊致病机制和 AMDV 抗体发生的特殊性等原因,采用 CIEP 方法对阳性水貂进行淘汰在一定程度上只能减缓 AMDV 的扩散速度,很难达到根除 AD 的目的^[14]。

为了提高 AMDV 的检测效率和准确率,有必要在开展 CIEP 检测的基础上,建立 AMDV 核酸检测方法。随着荧光定量 PCR 仪的小型化和普及

程度的加大, 荧光定量 PCR 方法越来越受到青睐, 特别是探针法荧光定量 PCR, 该方法具有优于普通 PCR 的敏感性, 又具有特异性强、重复性好、实时、快速和不易造成污染等优点, 非常值得推广应用^[17]。目前, 已经有研究者建立了针对 AMDV 的 PCR 方法^[18]、多重 PCR^[5, 19]、环介导等温扩增^[19]和荧光定量 PCR 方法^[21-22], 由于 AMDV 编码的 VP2 蛋白是主要的免疫原性蛋白, 在病毒入侵、致病性和宿主选择方面发挥重要作用, 因此建立针对 VP2 基因的探针法荧光定量 PCR 方法非常必要。

本研究在绘制荧光定量 PCR 的标准曲线时, 创新性地采用了 AMDV-G 株全基因组的重组质粒作为标准品, 由于所采用标准品与病毒基因组大小一致、性质相仿, 能够很好地模拟养殖场野生病毒株检测的模板条件, 因此具有更高的可信度和准确性。同时, 本方法所用引物和探针均仅需 0.4 μL , 大大降低了反应成本, 经优化后的反应步骤仅需 1 h 即可读取结果, 能够显著缩短检测时间, 加快检测速度, 提高工作效率。

综上所述, 本研究建立了一种重复性、特异性和敏感性均良好的针对 AMDV 的荧光定量 PCR 检测方法, 该方法检测的灵敏度为 10^2 拷贝/ μL , 且与 CPV、CAV、CDV 和 MEV 均无明显交叉反应, 特异性良好; 组内和组间重复性实验结果表明该方法的组内和组间变异系数均小于 3%, 重复性良好; 应用该方法检测 417 份水貂临床组织样品, 发现我国山东省、河北省和黑龙江省养殖水貂的 AMDV 阳性率为 81.5%, 3 个省份样品检测的平均 Ct 值分别为 22.77、20.75 和 22.27, 对应的病毒拷贝数分别为 1.34×10^5 、 5.14×10^5 和 1.87×10^5 拷贝/ μL ; 另外发现, 虽然河北省的 AMDV 阳性率比山东省和黑龙江省偏低, 但是河北省阳性样品的病毒载量相对较高。以上结果提示, 本研究所建立的荧光定量 PCR 方法能用于 AMDV 的临床检测和流行病学调查, 以及对实验水貂、雪貂的微生物质量进行全面评价。

参考文献:

- [1] 岳旺, 张芳, 王蕾, 等. 一种新型呕吐动物模型——水貂[J]. 药学报, 2003, 38(2):89-91.
- [2] 高下, 王锦玲, 袁军, 等. 视力丧失对雪貂声源定位能力的影响[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2001, 9(3):133-135.
- [3] 邓巍, 许黎黎, 鲍琳琳, 等. 雪貂感染 H7N9 禽流感病毒动物模型的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(1):68-71.
- [4] 马树杰, 张博, 孔宇飞, 等. A 型流感病毒感染雪貂造模的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(2):131-137.
- [5] 马芹, 王元智, 闫文卓, 等. 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[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(12):100-104.
- [6] Canuti M, O' Leary KE, Hunter BD, et al. Driving forces behind the evolution of the Aleutian mink disease parvovirus in the context of intensive farming[J]. Virus Evol, 2016, 2(1):vew004.
- [7] Jensen TH, Hammer AS, Chriél M. Monitoring chronic infection with a field strain of Aleutian mink disease virus[J]. Vet Microbiol, 2014, 168(2/4):420-427.
- [8] Bloom ME, Kanno H, Mori S, et al. Aleutian mink disease: puzzles and paradigms[J]. Infect Agents Dis, 1994, 3(6):279-301.
- [9] 万雪, 庄桂玉, 王磊. 水貂阿留申病研究现状[J]. 中国动物检疫, 2007 (5):48-50.
- [10] Canuti M, Whitney HG, Lang AS. Corrigendum: Amdoparvoviruses in small mammals: expanding our understanding of parvovirus diversity, distribution, and pathology[J]. Front Microbiol, 2016, 7:264.
- [11] Castelruiz Y, Blixenkrone-Møller M, Aasted B. DNA vaccination with the Aleutian mink disease virus NS1 gene confers partial protection against disease[J]. Vaccine, 2005, 23:12-29.
- [12] 朱洪伟, 邢秀梅, 温永俊. 水貂阿留申病毒抗体依赖性感染增强作用的可能机制探讨[J]. 病毒学报, 2014, 30(4):450-455.
- [13] Aasted B, Alexandersen S, Christensen J. Vaccination with Aleutian mink disease parvovirus (AMDV) capsid proteins enhances disease, while vaccination with the major non-structural AMDV protein causes partial protection from disease[J]. Vaccine, 1998, 16(11/12):1158-1165.
- [14] 庄金秋, 梅建国, 王玉茂, 等. 水貂阿留申病毒最新检测方法研究进展[J]. 现代畜牧兽医, 2017(11):57-62.
- [15] 李隍, 胡哲, 孙金辉, 等. 水貂阿留申病诊断技术的进展[J]. 中国兽医杂志, 2018, 54(11):58-60.
- [16] 刘艺, 冷雪, 时坤, 等. 水貂阿留申病毒检测方法研究进展[J]. 动物医学进展, 2018, 39(10):74-77.
- [17] 付明哲, 杨峰, 郝玉青, 等. 小反刍兽疫病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 动物医学进展, 2018, 39(11):18-22.
- [18] 许秋, 姜彦平, 吴纪国, 等. 水貂阿留申病 PCR 检测方法

- 的建立及应用[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(12):192-194.
- [19] 滕传杰. 水貂阿留申疾病的双重 PCR 检测方法建立及其应用[D]. 泰安: 山东农业大学, 2018.
- [20] 田国宁, 张金玲, 李凯, 等. 水貂阿留申病毒环介导等温扩增(LAMP)检测方法的建立[J]. 中国动物检疫, 2015, 32(6):79-82.
- [21] 张秀丽, 于慧娟, 徐超, 等. 水貂阿留申病毒荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(9):1-5.
- [22] 贾赞, 刘钊, 宋大贺, 等. 水貂阿留申病毒TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 中国预防兽医学报, 2016, 38(11):898-902.

Establishment and Application of TaqMan Real-time PCR Assay for Detection of VP2 Gene of Aleutian Mink Disease Virus

YAN Wenzhuo¹, LU Taofeng², ZHOU Jie³, ZHAO Lili¹, CHEN Hongyan¹

(1. State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Laboratory Animal and Comparative Medicine, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150069, China; 2. Institute for Laboratory Animal Research, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China; 3. Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai 201203, China)

[Abstract] Objective To establish a convenient and sensitive fluorescent quantitative PCR method for the detection of Aleutian mink disease virus (AMDV), aim to implement the rapid quantitative detection of AMDV in clinical samples. **Methods** According to the conserved region of VP2 gene of AMDV, a pair of specific primers and a probe were designed. The reaction condition was optimized, and the TaqMan real-time fluorescent quantitative PCR detection method was established. The standard curve was mapped, and the specificity, sensitivity and stability of the method were analyzed. **Results** The correlation coefficient (r^2) of the standard curve was more than 0.994, and it presented a linear relationship in the concentration of the template DNA ranging from 10^2 copies/ μ L to 10^8 copies/ μ L. The assay was highly specific for amplification from AMDV, but no amplification from CPV, MEV, CDV and CAV. The sensitivity of AMDV detection was 10^2 copies/ μ L, and the intra-group and inter-group reproducibility tests showed that the variation coefficient of the method was less than 3%. The result of 417 clinical tissue samples tested by this method showed that the positive rate of AMDV was 81.5% in some areas of China. **Conclusion** A reproducible, specific and sensitive AMDV real-time PCR detection method is established, which can be used for clinical detection and epidemiological investigation of AMDV.

[Key words] Aleutian disease of mink; Aleutian mink disease virus; Real-time fluorescent quantitative PCR; VP2; Detection method