

# 山羊痘病毒 TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用

程振涛<sup>1,2</sup>, 岳筠<sup>2</sup>, 李永明<sup>1,2</sup>, 许乐仁<sup>2</sup>, 王开功<sup>1,2</sup>, 周碧君<sup>1,2</sup>, 陈军义<sup>2</sup>, 李俊<sup>2</sup>, 江楠<sup>3</sup>

1 贵州大学动物疫病研究所, 贵阳 550025

2 贵州大学动物科学学院, 贵阳 550025

3 贵阳医学院, 贵阳 550025

**摘要:** 利用 DNASTar 分析了 GenBank 中所有 8 株山羊痘病毒全基因序列, 选取位于山羊痘病毒(AY077835)基因组 gp064 区域约 64 bp 的基因片段, 设计并合成了一对 PCR 引物和一条 TaqMan-MGB 探针, 建立了 FQ-PCR 和标准曲线, 并利用该方法对山羊痘临床皮肤痘疹材料和人工感染动物材料进行 GPV 核酸检测。结果表明, 构建的 FQ-PCR 具有良好的敏感性、特异性、稳定性和临床应用性。该方法的建立为山羊痘临床快速高效地诊断和山羊痘病毒感染羊只的发生、发展及转归研究提供了一种有效的手段。

**关键词:** 山羊痘病毒, TaqMan-MGB 探针, 荧光定量 PCR, 建立, 应用

## Development and application of TaqMan-MGB real-time quantitative PCR assay for detection of goat pox virus

Zhentao Cheng<sup>1,2</sup>, Jun Yue<sup>1</sup>, Yongming Li<sup>1,2</sup>, Leren Xu<sup>2</sup>, Kaigong Wang<sup>1,2</sup>, Bijun Zhou<sup>1,2</sup>, Junyi Chen<sup>2</sup>, Jun Li<sup>2</sup>, and Nan Jiang<sup>3</sup>

1 Institute of Animal Disease, Guizhou University, Guiyang 550025, China

2 College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China

3 Guiyang Medical College, Guiyang 550025, China

**Abstract:** The complete gene sequences of eight capripoxvirus strains in GenBank were aligned and analyzed with DNASTar software. We selected a size of 64 bp gene fragment that was located in gp064 region of goat pox virus (GPV) genome, and designed a pair of primers and a TaqMan-MGB probe against the gene fragment with Primer Express 2.0 software. Then, the fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR) assay was developed and the standard curve of different dilution series was described. We extracted the DNA samples from clinical skin pox, scab and GPV infected materials of artificial challenge animals. The FQ-PCR assay has been performed for all kinds of DNA samples. The results showed that the FQ-PCR assay was sensitive, specific, stable and could be used for clinical diagnosis. This method provided an important tool for rapid diagnosis of goat pox clinically, and for study GPV pathogenesis in the course of disease occurrence, development and convalescence.

**Keywords:** goat pox virus, TaqMan-MGB probe, fluorescence quantitative PCR, development, application

**Received:** October 27, 2008; **Accepted:** December 10, 2008

**Supported by:** the Key Project of Chinese Ministry of Education (No. 206132), High Level Talented Man Program (No. TZJF-200606).

**Corresponding author:** Yongming Li. Tel: +86-851-8298078; E-mail: liyongminggz@sohu.com

Leren Xu. Tel: +86-851-8298078; E-mail: xuleren@yahoo.com

教育部科学技术研究重点项目(No. 206132), 高层次人才科研条件特助经费项目(No. TZJF-200606)资助。

山羊痘病毒(Goat pox virus, GPV)、绵羊痘病毒(Sheep pox virus, SPPV)和疙瘩皮肤病病毒(Lumpy skin disease virus, LSDV)同属于痘病毒科(Poxviridae)羊痘病毒属(Capripoxvirus)的成员<sup>[1]</sup>, 其全基因组同源性达 96%以上<sup>[2]</sup>, 其病毒形态、理化特性和血清学反应没有明显的区别, 3种病毒主要是按照易感宿主划分。自 1879 年 Hansen 报道挪威暴发山羊痘以来<sup>[3]</sup>, 世界各地时有报道该病的发生, 目前主要分布在非洲、亚洲各地<sup>[4]</sup>。国际动物卫生组织(OIE)将该病列为 A 类重大传染病<sup>[5]</sup>, 1999 年我国农业部将山羊痘列为国家一类动物疫病; 临床上亦有人感染的病例, 是一种人畜共患病<sup>[6]</sup>。2000 年以来, 在贵州省晴隆、罗甸等养羊较为集中的地区相继暴发流行一种全身皮肤出现痘疹的高度接触性、发热性传染病<sup>[7]</sup>, 后经本实验室确诊为山羊痘, 此后, 该病在我省部分地区时有发生。为了降低该病带来的巨大经济损失和公共卫生安全问题, 迫切需要建立一种能及时快速确诊该病和深入研究该病临床发生、发展和转归的试验方法。

TaqMan-MGB 实时定量 PCR 技术, 相对于常规的 PCR、普通 TaqMan 荧光 PCR 技术而言, 具有更高的敏感性、特异性和重复性。而且还具有快速、高通量、污染少等特点, 国内尚未有将该技术用于山羊痘临床标本检测的报道。因此, 本试验设计一对特异性的荧光 PCR 引物和一条 TaqMan-MGB (Minor groove binder)探针, 通过制备标准样本首次建立了一种对山羊痘病毒高敏感性、特异性的实时定量 TaqMan-MGB-FQ-PCR 方法, 这为本病的早发现、早治疗提供了一种可靠的诊断手段。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本

山羊痘贵州分离毒 LD、QL 株为本实验室分离并保存; 山羊痘标准毒株(保藏编号: CVCC AV40)购自中国兽医药品监察所; 山羊痘疫苗弱毒株购自新疆天康生物制品厂; 病羊皮肤痘疹材料采集自贵州省不同地区养羊场; 羊健康皮肤采集自贵阳屠宰厂; 其他毒株样本均为本实验室保存。

### 1.2 主要试剂与仪器

DNA 提取试剂盒、Premix Ex Taq<sup>TM</sup>(Perfect Real Time)荧光 PCR 专用试剂盒、pMD18-T 载体、PCR

相关试剂等购自大连宝生物有限公司; 胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒购自 Omega 公司; 限制性内切酶 *EcoR* I、*Pst* I 购自 MBI 公司; Line-Gene 荧光 PCR 仪购自 Bioer 公司。

### 1.3 引物设计与合成

登录 GenBank(www.ncbi.nlm.nih.gov), 获得羊痘病毒的全基因序列: AY077835、AY077836、AY077832、AY077833、AY077834、AF325528、AF409137、AF409138, 利用 DNAStar 软件的 MegAlign 模块对上述序列进行同源性分析比较, 选出全基因组中相对保守且高度特异的核苷酸片段, 将选取的保守序列与 GenBank 数据库中所有生物核苷酸序列进行 Blast 比较分析, 验证所选基因片段的高度特异性。然后采用 Primer Express 2.0 软件设计一对特异性引物和一条 TaqMan-MGB 探针, 探针 5'端标记荧光报告基团 FAM, 3'端标记非荧光淬灭基团和 MGB, 上述引物和探针由上海基康生物技术有限公司合成。

### 1.4 病毒 DNA 模板的制备

将各种样本材料经研磨匀浆后, 按 Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver. 3.0 试剂盒说明提取病毒 DNA。

### 1.5 保守序列标准质粒的构建

以提取的山羊痘贵州分离毒 LD 株 DNA 为模板, 使用设计的特异性引物扩增保守基因片段。50  $\mu$ L 扩增体系: 10 $\times$ PCR Buffer(含  $MgCl_2$ )5  $\mu$ L、dNTP (10 mmol/L) 1  $\mu$ L、*Taq* DNA 聚合酶(2.5 U/ $\mu$ L)1  $\mu$ L、上下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 2.5  $\mu$ L、DNA 模板 1  $\mu$ L、灭菌双蒸水 37  $\mu$ L。反应条件为: 94 $^{\circ}C$  预变性 5 min; 94 $^{\circ}C$  变性 1 min, 55 $^{\circ}C$  退火 1 min, 72 $^{\circ}C$  延伸 1 min, 34 个循环; 最后 72 $^{\circ}C$  延伸 10 min。目的片段长度 64 bp, 胶回收目的片段, 回收产物与 pMD18-T 载体连接转化感受态细胞 DH5 $\alpha$ , 用含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 LB 琼脂平板筛选阳性克隆。挑取白色菌落培养增菌, 用 PCR 和双酶切鉴定筛选阳性克隆, 阳性克隆送大连宝生物有限公司测序, 测序结果与 GenBank 序列比对无误后, 用分光光度计测定提取质粒的浓度与纯度, -80 $^{\circ}C$  保存备用。

1.6 FQ-PCR 反应体系的建立、优化及重复性检测  
建立 25  $\mu$ L 反应体系, 采用正交试验法对上下

游引物、探针浓度进行优化。引物浓度和探针浓度按 50 nmol/L 的梯度从 50 nmol/L 增加到 400 nmol/L, 以获得最低的  $C_T$  值和较高的荧光强度增加值( $\Delta R_n$ )为判断标准。对不同稀释度的相同模板进行 4 个重复和对 4 个不同模板分别进行 4 个重复, 使用最佳反应条件, 分别来检验本试验建立的 FQ-PCR 方法的组内重复和组间重复稳定性。

## 1.7 定量标准曲线的建立及敏感性检测

### 1.7.1 以质粒拷贝数为单位的绝对定量标准曲线的建立

应用紫外分光光度计测定阳性重组质粒的  $OD_{260}$  值, 根据重组质粒的分子量与质量浓度, 计算其拷贝数浓度。计算公式为: 拷贝浓度(copies/ $\mu$ L) =  $(OD_{260} \times 50 \times \text{稀释倍数} \times 10^{-8} / (324.5 \times \text{碱基数}) \times (6.02 \times 10^{23})$ 。将标准质粒 10 倍梯度稀释取其中 4 个梯度, 利用优化的 FQ-PCR 反应体系检测每个反应管的循环阈值, 每个稀释度分别做 2 个重复, 并设立阴性对照, 建立质粒拷贝浓度与  $C_T$  值对应的绝对定量标准曲线; 在对不同稀释度标准品的检测中, 确定该 FQ-PCR 能检出的最低质粒 DNA 拷贝数, 并由此得出该方法的检测极限。

### 1.7.2 以病毒 $TCID_{50}$ 为单位的绝对定量标准曲线的建立

测定山羊痘病毒细胞培养物的  $TCID_{50}$ , 提取病毒 DNA, 10 倍系列稀释, 取其中 5 个稀释度进行 FQ-PCR, 每个稀释度做 2 个重复, 并设立阴性对照, 以  $TCID_{50}$  的对数为 X 轴,  $C_T$  值为 Y 轴建立以病毒  $TCID_{50}$  为单位的定量标准曲线; 在对不同稀释度病毒 DNA 的检测中, 确定该 FQ-PCR 能检出的最低  $TCID_{50}$  值, 并由此得出该方法的检测极限。

## 1.8 FQ-PCR 的特异性检测

按 DNA 提取试剂盒说明书分别提取本实验室保存的山羊痘贵州 LD 株分离毒、禽痘病毒(Avipoxvirus)、羊接触传染性脓疱皮炎病毒(Orfvirus)、猪痘病毒(Suipoxvirus)的 DNA, 并以此为 FQ-PCR 模板, 检测该方法的特异性, 并设立去离子水阴性对照。

## 1.9 FQ-PCR 的应用

### 1.9.1 临床样本的检测

采用上述 FQ-PCR 的最佳反应条件, 对采集自贵州省不同地区 5 份发病羊皮肤痘疹材料进行山羊

痘病毒核酸检测, 并以去离子水作阴性对照, 以检验该方法的临床适用性。

### 1.9.2 动物感染试验及 FQ-PCR 检测

购买 4 只健康的 3 月龄左右的贵州黑山羊, 任选 3 只以山羊痘贵州 LD 株分离毒进行动物感染试验, 另一只作正常对照。感染后每天观察羊只临床表现, 并采集全血(取其中的血沉棕黄层)、口腔拭子、鼻拭子、眼结膜拭子, 置于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱备用; 最后采集病死或人为处死羊只的各种脏器(心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、淋巴结、皮肤和肌肉等)组织, 置于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。提取上述采集的各种试验材料中的病毒 DNA, 使用 FQ-PCR 最佳反应条件检测各种材料中是否含有山羊痘病毒及含量, 并用健康羊的相同材料作阴性对照。

### 1.9.3 三带喙库蚊中 GPV 的检测

为检测三带喙库蚊是否可能为山羊痘在夏秋季节的吸血昆虫传播媒介, 分别采集感染山羊痘羊圈中的三带喙库蚊和健康羊场中的三带喙库蚊, 经研磨和反复冻融后按试剂盒说明书提取 DNA, 以 FQ-PCR 的最佳条件进行山羊痘病毒部分核酸扩增。

## 2 结果

### 2.1 引物设计与合成

选取了 GenBank 中公布的所有 8 株羊痘病毒的全基因序列进行序列比较, 并对可能的保守、特异基因片段与 GenBank 中公布的所有生物基因序列进行序列特异性比较, 最终选择位于山羊痘病毒基因组(AY077835)gp064 区域长度约 64 bp(57996~58029)基因片段为目标基因。序列比较显示, 该基因片段高度保守, 除 2 株牛疙瘩皮肤病毒(AF325528、AF409137)在基因片段 20 位碱基处有一个碱基差异外, 其他同源性达 100%(图 1)。通过 Primer Express 2.0 软件设计一对特异性引物和一个 TaqMan-MGB 探针, 引物和探针序列见表 1。

### 2.2 标准质粒的构建

白色菌落经增菌后, 使用质粒小量提取试剂盒提取质粒, 进行 PCR 和 *EcoR* I、*Pst* I 双酶切鉴定, 结果见图 2、3。并对质粒进行测序, 测序序列与 GenBank 公布的羊痘病毒株(AY077835)的基因序列完全相同。

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----
      5       15      25      35      45      55      -----
AY077836 GCGGATGTC ATTCCCTGAT CAATGGGTAA AAGATTTCCTA TATTCCTCAC GGAATGAAA TGCT
AY077835 GCGGATGTC ATTCCCTGAT CAATGGGTAA AAGATTTCCTA TATTCCTCAC GGAATGAAA TGCT
AY077834 GCGGATGTC ATTCCCTGAT CAATGGGTAA AAGATTTCCTA TATTCCTCAC GGAATGAAA TGCT
AY077833 GCGGATGTC ATTCCCTGAT CAATGGGTAA AAGATTTCCTA TATTCCTCAC GGAATGAAA TGCT
AY077832 GCGGATGTC ATTCCCTGAT CAATGGGTAA AAGATTTCCTA TATTCCTCAC GGAATGAAA TGCT
AF409138 GCGGATGTC ATTCCCTGAT CAATGGGTAA AAGATTTCCTA TATTCCTCAC GGAATGAAA TGCT
AF325528 GCGGATGTC ATTCCCTGAT CAATGGGTAA AAGATTTCCTA TATTCCTCAC GGAATGAAA TGCT
AF409137 GCGGATGTC ATTCCCTGAT CAATGGGTAA AAGATTTCCTA TATTCCTCAC GGAATGAAA TGCT

```

图 1 8 株羊痘病毒毒株的基因序列比较

Fig. 1 The alignment of gene sequences of eight capripoxvirus strains.

表 1 引物和探针的名称、序列及位置

Table 1 The name, sequence, location of primers and probe

Primer and probe	Sequence (5'-3')	Location (AY077835)
Forward primer	gcgatgctccattccctg	57966-57983
Reverse primer	agcatttcattccgtgagga	57986-58005
TaqMan-MGB probe	caatgggtaaaagatttcta	58029-58009

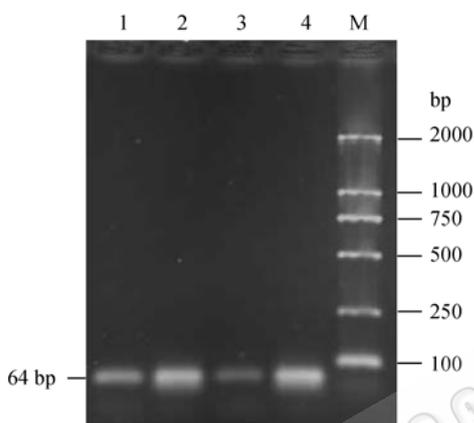


图 2 重组质粒 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR identification of the recombinant plasmid. 1-4: PCR products of 4 different recombinant plasmids; M: D2000 marker.

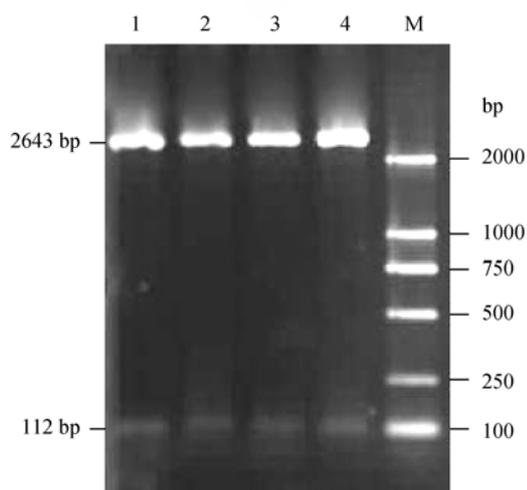


图 3 重组质粒酶切鉴定

Fig. 3 Restricted endonuclease digestion of recombinant plasmid. 1-4: recombinant plasmids digestion by *EcoR* I and *Pst* I; M: D2000 marker.

### 2.3 FQ-PCR 反应体系优化和重复性检测

采用正交法对体系中的引物浓度和探针浓度进行 64 种组合的比较优化, 结果显示, 以引物浓度为 200 nmol/L、探针浓度为 200 nmol/L, 反应条件为 95°C 2 min, 95°C 2 s, 60°C 60 s(检测荧光强度), 45 个循环时检测结果最好。

在最佳反应条件下, 检验本试验建立的 FQ-PCR 方法的组内重复和组间重复稳定性, 结果如表 2、3 所示, 组内重复试验和组间重复试验变异系数均低于 5%, 说明试验稳定, 重复性好<sup>[9]</sup>。

### 2.4 标准曲线的构建

#### 2.4.1 以质粒拷贝数为单位的绝对标准曲线的建立

测定重组质粒的  $OD_{260}=0.029$ , 根据重组质粒的分子量与质量浓度, 计算其拷贝数浓度  $9.75 \times 10^{10}$  copies/ $\mu$ L, 并将标准质粒按 10 倍梯度稀释, 取其中 4 个梯度 ( $1 \times 10^3$  copies/ $\mu$ L、 $1 \times 10^4$  copies/ $\mu$ L、 $1 \times 10^5$  copies/ $\mu$ L、 $1 \times 10^6$  copies/ $\mu$ L) 以质粒拷贝数的对数为 X 轴,  $C_T$  值为 Y 轴, 建立了质粒拷贝浓度与  $C_T$  值相对应的绝对定量标准曲线, 如图 4 所示, 在所测定的浓度范围内, 标准品的浓度与对应的  $C_T$  值呈现明显的线性相关关系, 其回归曲线的斜率为 -6.38, 截距为 57.18, 相关系数为 -0.997。所建立方法的检测极限为  $1 \times 10^2$  copies (约 0.29 fg)/每次反应, 同时在对阴性样品的扩增中没有出现非特异的荧光反应。

#### 2.4.2 相对标准曲线的建立

经对病毒样本进行  $TCID_{50}$  测定得知 1 mL 病毒样本含有  $3.8 \times 10^9$   $TCID_{50}$ , 用 1 mL 病毒样本提取病毒 DNA, 经紫外分光光度计测其  $OD_{260}=0.109$ ; 把病毒 DNA 样本浓度首先稀释为相当于  $1 \times 10^8$   $TCID_{50}/\mu$ L, 然后对病毒 DNA 模板浓度进行 10 倍稀释, 取其中 5 个稀释度  $1 \times 10^3$   $TCID_{50}/\mu$ L、 $1 \times 10^4$   $TCID_{50}/\mu$ L、 $1 \times 10^5$   $TCID_{50}/\mu$ L、 $1 \times 10^6$   $TCID_{50}/\mu$ L、

表 2 同一样本不同浓度的组内重复性试验数据

Table 2 The experimental data of replicates of the same sample with different concentration

Different concentration of the same sample	Intra-assay result ( $C_T$ value)				Statistic results		
	1	2	3	4	Avg.	SD	CV
1	18.15	18.50	18.32	18.63	18.40	0.2096	1.139%
2	22.42	22.13	22.35	22.51	22.35	0.1621	0.725%
3	25.12	25.37	25.55	25.27	25.33	0.1804	0.712%
4	28.08	28.17	28.11	28.32	28.17	0.1069	0.380%

表 3 四个不同样本的组间重复性试验数据

Table 3 The experimental data of four replicates of different samples

Different samples	Inter-assay result ( $C_T$ value)				Statistic results		
	1	2	3	4	Avg	SD	CV
1	19.45	19.72	19.78	19.43	19.60	0.181	0.923%
2	18.33	18.57	18.24	18.11	18.31	0.194	1.059%
3	19.07	18.93	19.13	19.05	19.05	0.084	0.440%
4	20.93	20.87	20.79	20.85	20.86	0.058	0.277%

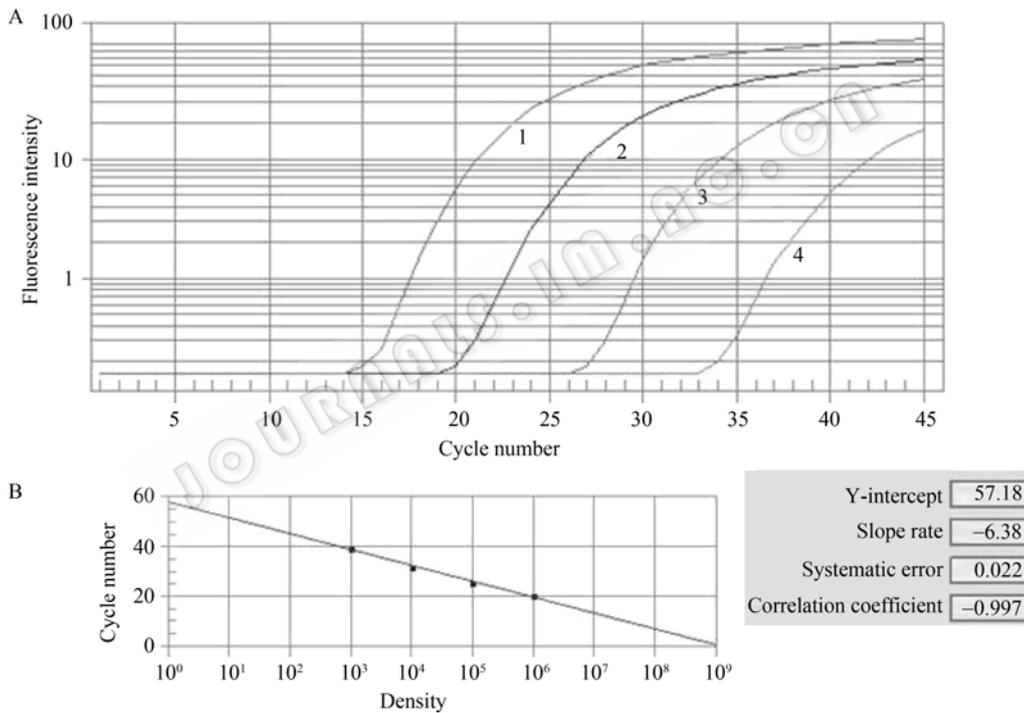


图 4 重组质粒的扩增曲线及标准曲线

Fig. 4 Fluorescence amplification curves (A) and corresponding standard curve (B) of the recombinant plasmid. (A) The curves 1 to 4 represent  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  copies/ $\mu\text{L}$  of recombinant plasmid respectively. (B) The standard curve and the 4snots represent the corresponding standard dilution.

$1 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/ $\mu\text{L}$ , 以最优条件进行 FQ-PCR, 测定每一稀释度的  $C_T$  值, 与对应模板量的 TCID<sub>50</sub> 的对数值作线性回归图, 结果如图 5 所示, 在所测定的浓度范围内, 病毒 DNA 的浓度与对应的  $C_T$  值呈现明显的线性相关关系, 其回归曲线的斜率为 -3.71, 截距为 42.86, 相关系数为 -0.999. 所建立方法的检测极限为 0.1 个 TCID<sub>50</sub>(约 1.09 fg)/每次反应, 同时在

对阴性样品的扩增中没有出现非特异的荧光反应。

### 2.5 FQ-PCR 的特异性

分别以山羊痘贵州 LD 株分离毒、羊传染性脓疱皮炎病毒、禽痘疫苗毒、猪痘病毒作为待检样品, 以去离子水为阴性对照, 进行 FQ-PCR 特异性检测. 结果如图 6 所示, 除山羊痘贵州 LD 株分离毒样品呈阳性结果外, 其他毒株均为阴性, 这说明本试验建

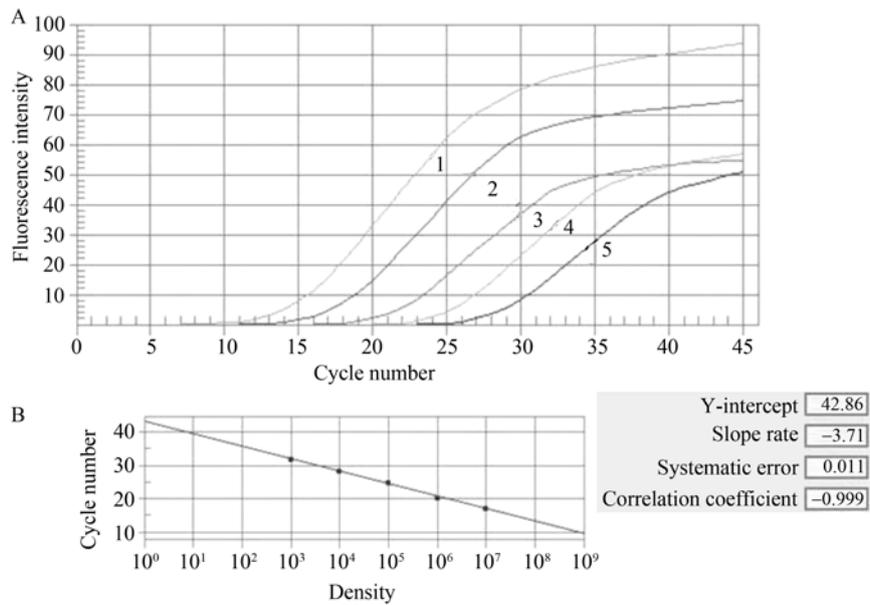


图 5 山羊痘病毒 DNA 的扩增曲线及标准曲线

Fig. 5 Fluorescence amplification curves (A) and corresponding standard quantization curve (B) of dilution gradients of GPV DNA. (A) The curves 1 to 5 represent  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  copies/ $\mu\text{L}$  of GPV DNA respectively. (B) The standard curve and the 5 spots represent the corresponding standard dilution.

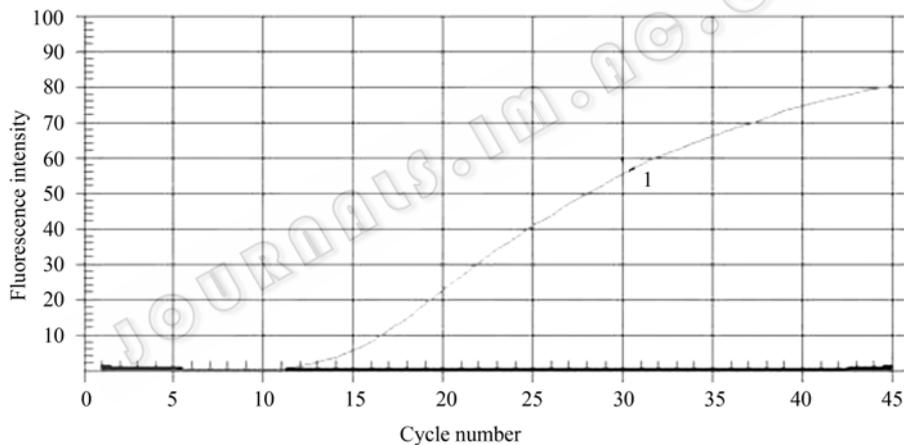


图 6 FQ-PCR 特异性试验

Fig. 6 The specific experiment of FQ-PCR assay. The curve 1 represent the goat pox virus, the others respectively represent Avipoxvirus, Orfivirus and Suipoxvirus which are negative.

立的实时定量 PCR 方法具有良好的特异性。

## 2.6 FQ-PCR 的应用

### 2.6.1 临床样本中 GPV 的检测

提取分别来自不同地区的 5 份皮肤痘疹材料中的山羊痘病毒 DNA 模板, 使用上述 FQ-PCR 最佳反应条件, 测定每个样本的  $C_T$  值, 结果如图 7 所示, 该方法能准确检测到临床样本中羊痘病毒的存在, 阴性对照无荧光存在, 整个检测过程在 3~4 h 内完成, 大大缩短了检测时间, 为山羊痘的临床诊断提供了一种快速可靠的诊断方法。

### 2.6.2 人工感染动物试验及动物组织中 GPV 的定量检测

三只黑山羊于感染后均出现体温升高、流涕、眼分泌物增多等临床症状, 于感染 13 d 后在尾根、嘴角等少毛处出现痘斑, 有 2 只分别于接种后 14 d、27 d 自然死亡, 另一只于 45 d 人为处死; 采集 3 只羊的各种组织材料, 提取其中 GPV DNA、进行 FQ-PCR 扩增, 结果显示, 各种组织脏器中的 GPV 含量不同, 其中以皮肤、肺脏、胃脏、淋巴结中的含量较高, 其他组织中的含量较低。3 只不同时间死

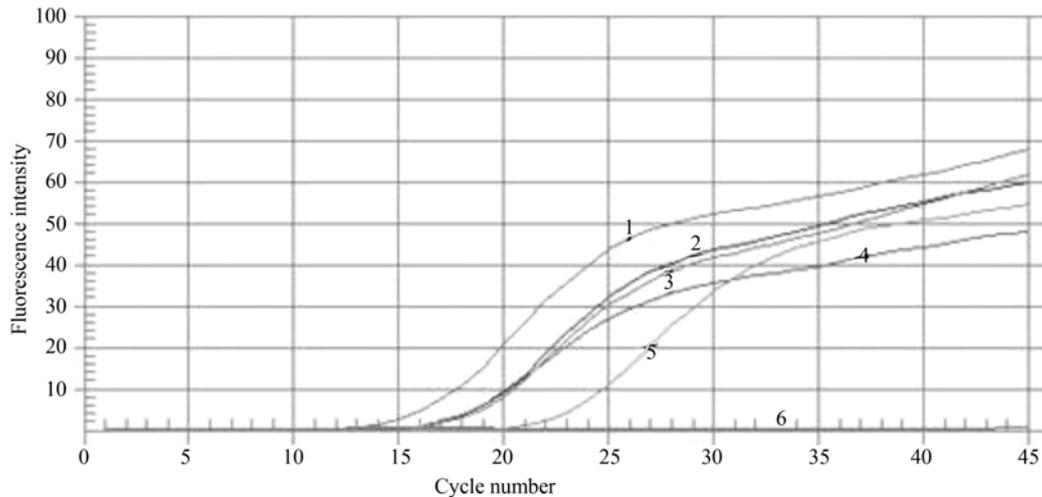


图7 山羊痘病毒 DNA 的扩增曲线

Fig. 7 Fluorescence amplification curves of GPV DNA samples by the FQ-PCR assay. The curves 1 to 5 respectively represent five different goat pox skin samples, the curve 6 represent the negative control.

亡的羊只, 组织中相对病毒含量为 27 d>14 d>45 d。

提取采集自 3 只羊不同感染时间的血沉棕黄层、鼻拭子、口腔拭子、眼结膜拭子中的 GPV DNA, 使用上述建立的 FQ-PCR 方法进行 GPV 检测, 结果显示, 在感染后 7~15 d 期间的鼻拭子样本和 9~14 d 期间的血沉棕黄样本中检测到 GPV 核酸的存在。口腔拭子、眼结膜拭子检测结果不稳定。

### 2.6.3 三带喙库蚊体内 GPV 的定量检测

按 FQ-PCR 的反应体系及条件对分别采集自病羊圈和健康羊场的三带喙库蚊体内山羊痘病毒进行核酸检测, 结果发现来自病羊圈的三带喙库蚊检测为阳性, 而来自健康羊场的三带喙库蚊检测为阴性, 这说明病羊圈中吸血昆虫蚊子体内含有山羊痘病毒, 本试验结果初步证实了三带喙库蚊可能为该病的一种传播媒介。

## 3 讨论

山羊痘病毒为双链 DNA 病毒, 长度约 150 kb 左右, 其中碱基 A、T 均匀分布于整个基因组, 含量约为 75%, 是 A+T 含量最高的痘病毒<sup>[8]</sup>, 如此高的 A+T 含量为荧光 PCR 引物和探针的设计增加了难度。本研究采用新一代 TaqMan-MGB 探针, 其淬灭基团采用了非荧光淬灭基团 (Non-fluorescent Quencher), 本身不产生荧光, 这比普通 TaqMan 探针降低了 PCR 反应荧光本底信号的强度, 进一步增强方法的特异性; 同时探针末端还连接着 MGB (Minor groove binder) 修饰基团, 可以将探针  $T_m$  温度

提高 10°C 左右, 在获得相同  $T_m$  值的条件下, MGB 探针所需的碱基序列比普通 TaqMan 探针更短, 在目标序列中可选择范围更广, 这尤其有利于在 A+T 含量高的目标序列中设计出灵敏度、特异性更好的探针, 这也是本方法最大的优点<sup>[9]</sup>, 因此, TaqMan-MGB 探针相比其他探针更适合于 GPV 的检测。

山羊痘最早主要通过临床症状、血清学试验和电子显微镜观察等来最终确诊<sup>[10,11]</sup>, 随着 PCR 技术的发展, 国内外研究者建立了针对山羊痘病毒基因组不同片段的 PCR 方法<sup>[12,13]</sup>, 这为山羊痘的快速诊断奠定了基础。本试验首次采用 TaqMan-MGB 探针建立了检测山羊痘病毒的实时定量 PCR 方法, 该方法的 DNA 最小检出量为 1 fg 左右, 这比此前作者建立的普通 PCR 方法<sup>[14]</sup>的最小 DNA 检出量提高了大约  $10^4$  倍, 该方法的建立大大提高了该病的检出率, 为山羊痘的及时发现尽早治疗提供条件。分别利用标准质粒和病毒 DNA 建立了该方法的标准曲线, 实现了样本中病毒 DNA 的绝对定量和间接反映不同病毒样本中病毒毒力的差异。但在检验该方法的特异性时, 没能收集到痘病毒科全部各属的病毒株, 只与禽痘病毒属(禽痘病毒疫苗株)、猪痘病毒属(猪痘病毒)、副痘病毒属(羊接触传染性脓疱皮炎病毒)和羊痘病毒属(山羊痘病毒)的病毒进行了比较, 并结合目的基因序列与 GenBank 中其他痘病毒属相应序列的 Blast 分析结果对该 PCR 方法的特异性作出了综合判断, 还有待收集更多痘病毒株, 进一步完

善该方法的特异性试验。

采用 TaqMan-MGB-FQ-PCR 方法成功检测到实验室保存的已知山羊痘皮肤痘疹材料中的 GPV 核酸, 验证了本方法的临床可靠性。本研究首次应用该方法检测了山羊痘人工感染羊组织脏器、血液、眼拭子、鼻腔拭子、口腔拭子中的病毒含量, 以此来分析该病的发生、发展和转归情况。试验结果表明, 山羊病毒在皮肤、肺脏、胃脏以及淋巴结组织中的含量较高, 其他组织脏器中的含量较低, 说明山羊痘病毒对组织脏器的嗜性不同, 尤其易于侵害皮肤、呼吸系统、消化系统和淋巴系统, 这也验证了山羊痘临床病例典型病变表现为皮肤痘疹、流涕和肺、气管、胃粘膜表面痘斑等症状; 而不同时间死亡的羊只组织中 GPV 总体表现为 27 d>14 d>45 d, 这些结果为该病的流行特点(潜伏期 7~15 d、病程约 30 d 等) 提供了依据; 应用该方法检测血沉棕黄层、鼻腔拭子、眼结膜拭子、口腔拭子中的病毒含量时发现, 在接种后第 7 天就可以从鼻腔拭子中检测到病毒的存在, 一直持续到第 16 天病毒检测结果为阴性, 病羊流涕症状也已消失; 接种后 9 d 首先在血液中检测到病毒存在, 一直持续到 15 d 检测结果为阴性, 这说明病羊在感染病毒后 9 d 左右出现病毒血症, 一直持续约 5 d, 这与殷震等<sup>[1]</sup>讲述的病毒血症过程基本相符; 眼结膜拭子和口腔拭子直到病羊眼分泌物明显增多和嘴角、舌表面出现痘斑时才时而能检出, 这说明病羊通过眼、口腔排除的病毒较少。本试验在对上述样本进行 GPV 核酸检测时, 同时使用普通 PCR 方法对其进行检测, 结果只有在皮肤痘疹材料中检测到。综上所述, 本研究首次应用 TaqMan-MGB-FQ-PCR 方法研究了 GPV 对不同组织的嗜性、不同时间死亡羊组织中的病毒含量, 为本病的发生、发展及转归提供了科学依据; 在山羊感染 GPV 后出现典型临床病变(肉眼可见的皮肤痘斑)前(13 d), 该 TaqMan-MGB-FQ-PCR 方法可提前 5 d、3 d 分别从鼻拭子、血沉棕黄层中检测到病毒的存在, 这为该病的早期快速诊断、及时治疗提供了可靠的手段, 而普通 PCR 方法无法达到此目的。

三带喙库蚊(*Culex tritaeniorhynchus*)在我国分布于新疆以外的省市, 普遍在沼泽、池塘、洼地积水等地滋生, 是本地区主要的蚊种。该种蚊人畜禽血兼吸而偏嗜猪、牛、羊血, 多于晨昏活动, 是羊场

的优势蚊种, 除吸食血液外, 三带喙库蚊还是多种疾病的生物媒介, 是环境生物安全上不可忽略的蚊种。羊痘主要发生在夏秋季节, 正是三带喙库蚊高度繁殖期, 而且 GPV 环境存活能力强, 因此吸血昆虫的机械传播可能为该病的主要传播途径<sup>[1]</sup>。为了验证吸血昆虫带毒的可能性, 本试验采集了病羊羊圈中的主要吸血昆虫三带喙库蚊用灭菌三蒸水漂洗后, 提取 DNA, 应用本试验建立的 TaqMan-MGB-FQ-PCR 方法检测了病羊羊圈中三带喙库蚊的带毒现象, 本试验首次从吸血昆虫蚊子体内检测到了山羊痘病毒核酸的存在, 而采集自健康羊场中的蚊子检测结果阴性, 这为吸血昆虫可能为山羊痘的传播媒介<sup>[1]</sup>提供了科学依据。

## REFERENCES

- [1] Yin Z, Liu JH. *Animal Virology*. 2nd Ed. Beijing: Science Press, 1997: 939-963.  
殷震, 刘景华主编. *动物病毒学*. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1997: 939-963.
- [2] Gershon PD, Black DN. The nucleotide sequence around the capripoxvirus thymidine kinase gene reveals a gene shared specifically with leporipoxvirus. *J Gen Virol*, 1989, **70**(3): 525-533.
- [3] Rafiyi A, Ramyar H. Goat pox in Iran, serial passage in goats and the developing eggs and relationship with sheep pox. *J Comp Pathol*, 1959, **69**(2): 141-147.
- [4] Rao TVS, Bandyopdhyay SK. A comprehensive review of goat pox and sheep pox and their diagnosis. *Anim Health Res Rev*, 2000, **1**(2): 127-136.
- [5] World Animal Health, Reports on the animal health status and disease control methods and list A disease outbreaks, 1996-1997. Paris, France: Statistics OIE, 1997.
- [6] Hong Y, Xie ZW, Shi HY. Five persons infected capripoxvirus. *Chin J Infect Dis*, 2005, **23**(2): 143.  
洪燕, 谢忠文, 施恒豫. 人感染山羊痘五例. *中华传染病杂志*, 2005, **23**(2): 143.
- [7] Wang KG, Yu TD, Zhang DQ. The first outbreak of goat pox in Guizhou. *Prog Vet Med*, 2003, **24**(4): 116-118.  
王开功, 虞天德, 张大权. 贵州省首次暴发山羊痘的诊断研究. *动物医学进展*, 2003, **24**(4): 116-118.
- [8] Tulman ER, Afonso CL, Lu Z, et al. The genomes of sheeppox and goatpox viruses. *J Virol*, 2002, **76**(12): 6054-6061.
- [9] Han JF, Ning YB, Song L. Research of real-time fluorescent PCR in the rapid differential detection of H5, H9, H7 subtype avian influenza inactivated vaccines. *Chin J Biotech*, 2007, **23**(5): 953-957.

- 韩剑锋, 宁宜宝, 宋立. 实时荧光 PCR 技术快速鉴别检测 H5、H9、H7 亚型禽流感灭活疫苗的研究. 生物工程学报, 2007, 23(5): 953-957.
- [10] Wang KG, Yu TD, He GZ. The detection of goat pox virus antigen by reverse passive hem aghtination. *J Mount Agri Biol*, 2005, 24(1): 29-32.  
王开功, 虞天德, 何光志. 应用反向间接血凝试验检测山羊痘病毒抗原. 山地农业生物学报, 2005, 24(1): 29-32.
- [11] Xu LR, Zhou BJ, Yin ZX. Ultra-structural pathological observation on the lesions of goat pox. *Acta Vet Zootech Sin*, 2005, 36(5): 492-497.  
许乐仁, 周碧君, 阴正兴. 山羊痘病变的超微病理学研究. 畜牧兽医学报, 2005, 36(5): 492-497.
- [12] Mangana-Vougiouka O, Markoulatos P, Koptopoulos G, et al. Sheep poxvirus identification by PCR in cell cultures. *J Virol Methods*, 1999, 77(1): 75-79.
- [13] Markoulatos PO, Manganal-Vougiouka. Detection of sheep poxvirus skin biopsy samples by a multiplex polymerase chain reaction. *J Virol Methods*, 2000, 84(2): 161-167.
- [14] Cheng ZT, Xu CZ, Yue J, et al. Research of PCR method of diagnosing goat poxvirus to different gene. *Heilongjiang Anim Sci Vet Med*, 2008, 33(3): 63-64.  
程振涛, 徐春志, 岳筠, 等. 山羊痘病毒不同基因片段 PCR 诊断方法的研究. 黑龙江畜牧兽医, 2008, 33(3): 63-64.



## 科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

### 动物病毒反向遗传学

刘光清 等著

978-7-03-022695-2 ¥75.00 2009年2月 出版

#### 内容简介

反向遗传学技术是 20 世纪末发展起来的一门新兴学科, 已广泛应用于生命科学研究的各个领域, 极大地推动了许多相关学科快速发展, 病毒学科的发展更是得益于此。

本书系统介绍了动物病毒反向遗传学的原理、发展历程、研究方法以及在病毒学研究领域中的应用等; 并详细介绍了各科动物病毒反向遗传操作系统构建的一般原理或策略, 并结合具体实例进行了详细阐述。此外, 本书还反映了近年来动物病毒反向遗传学的最新研究进展, 为读者了解相关病毒的最新研究动态提供了有益资料。

本书适用于从事病毒学基础研究的科研人员, 也适于从事抗病毒药物与新型疫苗研发的技术人员, 以及高等院校从事病毒学及相关专业教学和科研的广大师生。

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书 (免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 周文字 联系电话: 010-64031535

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目

