

犬瘟热病毒反转录—聚合酶链反应检测方法的建立及初步应用

乔军¹, 孟庆龄¹, 夏咸柱², 何宏彬³

(1.塔里木农垦大学动科院,新疆阿拉尔 843300; 2.解放军军需大学军事兽医研究所,长春 130062;

3.东北农业大学生命科学院,哈尔滨 150030)

摘要: 根据 GenBank 中 Barrett 报道的犬瘟热病毒弱毒株 Onderstepoort 的血凝蛋白基因序列,设计合成了一对能扩增 760 bp 基因片段的引物。用异硫氰酸胍-酚-仿一步抽提法提取细胞总 RNA 进行反转录,再以此产物为模板进行 PCR 扩增,筛选出最佳扩增条件。结果以此对引物进行 PCR 扩增能得到与设计片段大小相同的产物,并且不扩增犬细小病毒、犬 I 型腺病毒、犬冠状病毒、狂犬病病毒的核酸。敏感性试验证实,此法能扩增出稀释 1 000 倍的 CDV 强毒细胞培养物 ($10^{5.1}$ TCID₅₀/0.1 ml) 的反转录产物,其敏感性远高于电镜负染和荧光抗体染色法。经初步应用表明,此法可用于犬瘟热的临床诊断和实验研究。

关键词: 犬瘟热病毒; 反转录—聚合酶链反应

中图分类号: Q503 文献标识码: A 文章编号: 1004-1389(2001)01-0051-04

Establishment and Rudimentary Application of Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction for Detection of Canine Distemper Virus

QIAO Jun¹, MENG Qing-ling¹, XIA Xian-zhu², HE Hong-bin³

(1. Animal Science and Technology Institute, Tarim Agricultural University, Alar 843300; 2. Military Veterinary Institute,

University of Agricultural and Animal Science, Changchun 130062; 3. Department of Biological Science,

Northeastern Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract One pair of primers which may amplify 760bp fragment had been designed and synthesized based on the H protein gene of the Onderstepoort strain of canine distemper virus (CDV) according to GenBank. The total RNA were extracted from CDV infected DK cells or the tissues of infected animals by single step method of acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction and was used for reverse transcription. About 760bp cDNA fragment had been amplified from the product of RT-PCR. The conditions for PCR had been optimized. The length of cDNA fragment was examined as same as that of the CDV Onderstepoort strain. Not any gene fragments had been amplified from the cells that were infected by canine parvovirus, canine adenovirus, canine coronavirus, Rabies virus. The sensitivity of this experiment signifies that the method can amplify the specific cDNA fragment from RT product of cell cultures infected by CDV which its median dose of TCID was $10^{5.1}$ TCID₅₀/0.1ml. It showed that this method may be used in clinical diagnosis and laboratory research.

Key words Canine distemper virus; RT-PCR

犬瘟热 (Canine distemper, CD) 是由副粘病毒科麻疹病毒属的犬瘟热病毒 (CDV) 所引起的一种急性高度接触性传染病, 是当前对我国养犬

业、毛皮动物养殖业和野生动物保护业危害最大的疫病之一^[1], 每年都引起大批犬、貂、狐等动物发病, 病死率 30% ~ 80%, 雪貂高达 100%^[2], 经

济损失惨重 随着免疫学的发展,国外先后建立了 CDV 的中和试验^[3]、酶联免疫吸附试验^[4]、免疫荧光试验^[5]等诊断方法,国内也相继建立了许多免疫学诊断方法^[6-8],但其敏感性和特异性都不理想 为克服以上方法的缺点,笔者进行了 CDV 反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)诊断方法的研究

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 病毒 CDV 标准强毒株、LIU 株和 LP 株,犬细小病毒(CPV)、犬 I-型腺病毒(CAV-I)、犬冠状病毒(CCV)、狂犬病病毒(RV)均由犬病研究中心提供

1.1.2 病料 25份肝、脾、肺、肠内容物等病料来自于北京、沈阳、长春、哈尔滨、延边等地,4份 CDV 人工感染犬病料和 23份细胞培养物来自本室

1.1.3 细胞 犬肾传代细胞(DK),购自中国兽药监察所

1.1.4 试剂 AMV 5× Buffer、Rnase Inhibitor、AMV 反转录酶、dNTP、OligodT、Taq DNA 聚合酶、DNA marker 均购自华美生物工程公司;蛋白酶 K 购自上海生物工程公司;水饱和

表 1 引物序列及其在 CDV mRNA 上的位置

Table 1 The sequences of the primers and sites in mRNA sense

引物 Primer	位置 Site	序列(5'→3'), Sequence(5'→3')	引物长度(nt) Primer length(nt)	G+ C 含量(%) G+ C content(%)	扩增片段长度 Length of amplified fragment
P ₁	H(901- 902)	CCTTG TGTG TAGAAGAGAGC	20	50	760bp
P ₂	H(1661- 1642)	ATAAGAAATCGTCCG GATTG	20	50	

1.2.3 细胞总 RNA 的提取 参照 Chomcyski R. 和 Sachi N.^[9]报道的“异硫氰酸胍 酚 仿抽提分离 RNA 的一步法”进行

1.2.4 反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)的建立 RT 反应 采用 20 μ l 反应体系,取抽提的细胞总 RNA 2 μ l, 5× AMV 反转录缓冲液 4 μ l; 2.5 mmol/L 的 dNTP (dATP、dGTP、dCTP、dTTP) 4 μ l; RNase Inhibitor (10 U μ l) 1 μ l; 2.5 U μ l 的 AMV 反转录酶 2 μ l; OligodT (10 pmol μ l) 1 μ l 于 1.5 ml 灭菌的 Eppendorf 管中,补 dH₂O 至 20 μ l,瞬间离心后,于 42℃ 水浴中反应 1~ 1.5 h

PCR 经反复试验,笔者确定 50 μ l PCR 反应体系的组成为: 10× PCR 缓冲液 5 μ l, 25 mmol/L MgCl₂ 5 μ l, 2.5 mmol/L dNTP 4 μ l,

酚及 PCR 常规试剂均购自宝泰克生物工程公司

1.1.5 仪器 4800 型 PCR 扩增仪(美国 PE 公司生产); UNIVERSAL 16R 台式高速冷冻离心机(西德生产);电泳仪、电泳槽(北京六一仪器厂生产);紫外透射分析仪(上海长兴机械厂生产)

1.2 方法

1.2.1 CDV 的培养 CDV 强毒 LIU 株和 LP 株均用 DK 细胞培养。用含 8% 犊牛血清的 MEM 作为生长液,维持液为含 2% 犊牛血清的 MEM 培养液。当细胞长成单层时接毒,细胞病变(CPE)达 70% 时收毒,收毒后反复冻融 3 次,3 000 g 离心 10 min,取上清作为 CDV RT-PCR 的检测毒种,阴性对照则用正常的 DK 细胞

1.2.2 引物的设计与合成 根据 GenBank 和 EMBL 中已发表的 16 个 CDV 野毒株血凝蛋白基因(H 基因)序列,用分子生物学软件 DNASIS 进行核苷酸同源性分析。结果表明,16 个 CDV 不同毒株的 H 基因总体同源性高达 95.3%,表明该基因高度保守,适合作为 PCR 扩增的靶序列 笔者根据 Barrett 报道的 CDV Onderstepoort 弱毒株 H 蛋白基因序列,遵循引物设计的一般原则,用 Goldkey 软件设计了一对能扩增 760bp 的引物(表 1)

P₁ 和 P₂ (12.5 pmol μ l) 各 1 μ l, CDV RT 产物 2 μ l, Taq DNA 聚合酶 (1.5 U μ l) 1 μ l, 补加去离子水至 50 μ l 最佳循环参数为 96℃, 60 s; 94℃, 40 s; 72℃, 80 s; 52℃, 50 s, 最后 72℃ 延伸 10 min

1.2.5 特异性试验 分别对 CPV、CAV-I、CCV 和 RV 的核酸进行 PCR 扩增,以检测其特异性

1.2.6 敏感性试验 将 CDV 强毒 LIU 株细胞培养物按 Reed-Muench 两氏法测定该病毒的半数组织细胞感染量(TCID₅₀),并将其反转录产物作 10⁻¹ 至 10⁻⁵ 倍稀释,每一稀释度取 2 μ l 作为 PCR 模板进行扩增,电泳后紫外灯下观察,确定 PCR 的最高敏感度

1.2.7 CDV RT-PCR 产物的检测 取 10 μ l RT-PCR 产物加在 2% 琼脂糖凝胶上,75 V 电

泳 45~ 60 min,用溴化乙锭染色,然后在紫外光透射仪下观察,以标准 DNA marker作参考,记录并分析结果;与此同时,直接对 PCR产物进行测序。

1.2.8 不同影响因素对联合 RT-PCR的影响

紫外线 取 CDV RT-PCR检测为阳性的发病犬粪便上清 4份,3份置紫外灯管(30W)正下方 20 cm处,分别照射 1 min 5 min 10 min,1份未照射作对照,再进行 RT-PCR扩增,电泳后观察并记录实验结果

温度 取 4份 CDV RT-PCR检测为阳性的粪便上清,3份分别在 100°C 水浴中加热 1 min 3 min 5 min,1份未加热,然后 RT-PCR扩增

反复冻融试验 取 CDV 为阳性的病死犬肺脏反复冻融,并在每次冻融后进行 RT-PCR扩增,以研究冻融对 RT-PCR反应的影响。

保存液对 CDV RT-PCR反应的影响 取 CDV RT-PCR检测为阳性的病死犬肝脏 3份,2份分别浸泡在 50%的甘油磷酸盐缓冲液和加双抗的生理盐水(青、链霉素各 1 000 IU/ml)中,一

份装在青瓶中不处理作对照,4°C 保存 30 d后再次进行 RT-PCR检测。

1.2.9 CDV RT-PCR检测法的初步应用 对 23份细胞培养物 4份 CDV 人工感染犬病料及 25份临床发病犬病料进行了 CDV RT-PCR检测,与此同时进行了电镜负染检查和荧光抗体染色法的检查(按本室建立的方法进行)。

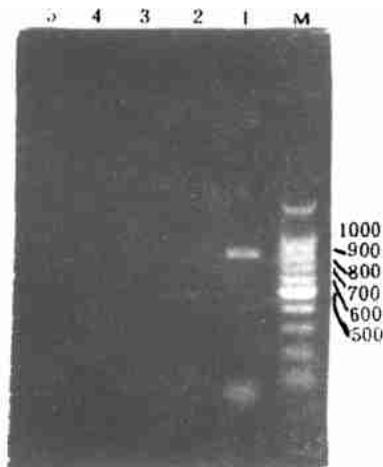
2 结果

2.1 CDV RT-PCR特异性试验

如图 1所示,CDV的引物 P₁和 P₂只能扩增出 CDV 的特异性产物,对 CPV CAV-I CCV RV 这些病毒的扩增均为阴性结果,表明此法具有很强的特异性

2.2 CDV RT-PCR敏感性试验

如图 2所示,此法能扩增出稀释 1 000 倍的 CDV 强毒株细胞培养物(毒价为 10^{5.1} TCID₅₀/0.1 ml)的反转录产物,表明此法具有很高的敏感性。



M. DNA marker (100bp DNA Ladder), 1. CDV LIU株, 2. CPV, 3. CAV-I, 4. CCV, 5. RV

图 1 CDV RT-PCR特异性扩增产物
Fig. 1 Specific amplified product of CDV RT-PCR



M. DNA marker (100bp DNA Ladder), 1. CDV RT产物 10⁻¹稀释, 2. CDV RT产物 10⁻²稀释, 3. CDV RT产物 10⁻³稀释, 4. CDV RT产物 10⁻⁴稀释, 5. CDV RT产物 10⁻⁵稀释

图 2 CDV RT-PCR敏感性试验
Fig. 2 Sensitivity of CDV amplified by RT-PCR



M. DNA marker (λ DNA/EcoRI+HindIII), 1. CDV LIU株, 2. CDV LP株

图 3 CDV RT-PCR产物鉴定
Fig. 3 Identification of RT-PCR products of CDV

2.3 CDV RT-PCR产物鉴定

如图 3所示,CDV RT-PCR产物大小约 760 bp,与设计理论值完全相符。对 PCR产物纯化后直接进行了测序,测序结果证实所扩增的核

酸带为 CDV 特异的核酸带(测序结果另文发表)。

2.4 不同因素对 CDV RT-PCR的影响(表 2)

表 2 不同因素对 CDV RT- PCR的影响
Table 2 Effects of different factors to CDV RT- PCR

紫外照射 Ultraviolet radiation	1 min		5 min		10 min					
结果 Results	+		-		-					
加温 (100°C) Heating	1 min		3 min		5 min					
结果 Results	+		+		-					
反复冻融 (次) Continual freeze-thaw	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
结果 Results	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
50% 甘油磷酸缓冲液 (4°C) 50% glycerines PBS					a month later					
结果 Results					+ (带亮)					
双抗生理盐水 (4°C) Salt solution added dual antibiotic					+ (带暗)					
结果 Results					-					
对照样品 Control sample										
结果 Results										

2.5 CDV RT- PCR检测方法的初步应用结果 及在临床上对检测样品的选择 (表 3 表 4)

表 3 CDV RT- PCR检测法的初步应用结果
Table 3 Results of rudimentary application of CDV RT- PCR

检测方法 Detected methods	23份细胞培养物 23 cell cultures		4份人工感染犬病料 4 experimental pathological samples		25份临床犬病料 25 clinical pathological samples	
	阳性 Positive	阴性 Negative	阳性 Positive	阴性 Negative	阳性 Positive	阴性 Negative
电镜负染 Electro microscopy	4	19	2	2	5	20
荧光抗体法 Fluorescent staining	6	17	3	1	8	17
犬瘟热病毒 RT- PCR CDV RT- PCR	12	11	4	0	16	9

表 4 CDV RT- PCR检测法在临床上检测样品的选择
Table 4 The best detected samples of CDV for clinical diagnosis

首选检测样品 The best detected samples	犬瘟热病毒 CDV	
	生前 Before death 白细胞 White blood cell	死后 After death 肺脏 Lung

3 讨论与小结

3.1 PCR作为一种体外扩增 DNA片段的技术已广泛用于 DNA病毒特异性核酸的检测,且具有省时、省力、高度的敏感性和特异性等优点,加之耐热 Taq DNA聚合酶和自动 PCR仪的出现,使之更加简便快速^[10]。但在检测 RNA病毒时其敏感性却受到众多因素的影响,如 RNA的提取效率,AMV 反转录酶效率及所要扩增片段在病毒复制过程中的拷贝数、扩增片段的长度等影响。其特异性主要取决于引物的特异性和退火温度。在多次反复试验的基础上,我们尽可能排除一切不利因素,使此法具有较高的敏感性和特异性。但若要进一步提高本法的敏感性,尚需继续研究。

3.2 提取总 RNA的好坏是本试验成功与否的关键一环。本试验证明,利用异硫氰酸胍-酚-仿一步法提取 RNA质量较高,不但对 CDV 细胞培养物,而且对病料(包括久置冻箱中的陈旧病料)都能使病毒基因组 RNA和 mRNA保持较好的完整性。另外,在 RT反应中,笔者除了使用通用引物 OligodT外,还加入了特异性引物,这样能充分利用病毒基因组 RNA,提高检测组织中特异的 cDNA 浓度,进而提高诊断敏感性。

3.3 PCR反应体系的稳定性和重复性也是衡量所建检测方法成功与否的一个重要标志。除试剂质量、操作是否规范等因素外,病料的保存和处理方法是否得当也是影响 PCR稳定性和重复性的一个重要方面,尤其在检测疑似 CDV 病料的过程中,为能在兽医临床中应用此种检测方法,笔者专门研究了紫外线、温度、反复冻融及不同保存液等因素对 CDV RT- PCR的影响。结果表明,紫外线、温度、反复冻融均对 CDV RNA模板有一定的损伤作用。紫外线损伤 RNA模板可能与其能使模板 RNA链上相邻的尿嘧啶之间形成二聚体使反转录不能进行有关。高温损伤 RNA模板可能与其能使病毒 RNA暴露,结果被周围的核酸酶降解有关。反复冻融对病毒 RNA的损伤作用,笔者推测可能与组织细胞中 RNase的大量释放有密切关系。通过对病料保存液的选择,发现 50% 甘油磷酸盐缓冲液保存病料较好,在 4°C 保存一个月后仍可扩出明亮的特异性扩增带。在对 25份临床疑似 CDV 的病料和 4份 CDV 人工感染病料的检测时发现,CDV 生前 RT- PCR的最佳检测样品为白细胞,死后最佳检出样品为肺脏。

3 结论

综上所述,土壤脲酶活性与底物浓度间的关系可采用 Langmuir 模型予以定量表征,表明酶促反应中存在吸附机制,并得到了土壤最大表观脲酶活性值 (U_{max}) 这一参数,其是当尿素浓度极大时的脲酶活性;除水稻土和黄褐土外高肥力土壤的 U_{max} 大于低肥力;在不同生态环境中土壤脲酶特征截然不同,只有在同一生态区中 U_{max} 才与土壤肥力因子显著或极显著相关,可作为土壤肥力的指标之一。

参考文献:

- [1] Terman G L. Volatilization losses of nitrogen as ammonia from surface applied fertilizers, organic amendments and crop residues [J]. *Advances in Agronomy*, 1979, 31: 189-223.
- [2] Pettit N M, Smith A R, Freedman R B, *et al.* Soil urease activity, stability and kinetic properties [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1976, 8: 479-484.
- [3] Ber V, Brar S S. Urease activity in subtropical alkaline soils of India [J]. *Soil Sci.*, 1978, 126: 330-335.
- [4] 关松荫. 我国主要土壤剖面酶活性状况 [J]. *土壤学报*, 1984, 21: 368-381.
- [5] Manunza B, Deiana S, Pintore M, *et al.* The binding mechanism of urea, hydroxamic acid and N-(N-butyl)-phos-

- phoric triamide to the urease active site. A comparative molecular dynamics study [J]. *Soil Biol & Biochem*, 1999, 31: 789-796.
- [6] Gianfreda L, Rao M A, Violante A. Adsorption, activity and kinetic properties of urease on montmorillonite aluminium hydroxide and $Al(OH)_x^-$ Montmorillonite complexes [J]. *Soil Biol. & Biochem*, 1992, 24(1): 51-58.
- [7] Lai C M, Tabatabai M A. Kinetic parameters of immobilized urease [J]. *Soil Biol & Biochem*, 1992, 24(3): 225-228.
- [8] 和文祥, 朱铭莪, 童江云, 等. 有机肥对土壤脲酶活性特征的影响. *西北农业学报*, 1997, 6(2): 73-75.
- [9] 韦革宏, 和文祥, 毕银丽, 等. 不同条件下脲酶磁效应研究. *西北农业学报*, 1999, 8(2): 94-96.
- [10] 陈会明, 马耀华, 和文祥, 等. 外源铜作用下土壤脲酶活性与缓冲性及时间关系的模型研究. *西北农业学报*, 2000, 9(3): 59-62.
- [11] 南京农学院主编. 土壤农化分析 [M]. 北京: 农业出版社, 1982.
- [12] 关松荫. 土壤酶及其研究方法 [M]. 北京: 农业出版社, 1987. 274-328.
- [13] 蒋以超, 张一平编著. 土壤化学过程的物理化学 [M]. 北京: 中国科技出版社, 1993. 347-362.
- [14] 和文祥, 朱铭莪. 陕西土壤脲酶活性与土壤肥力关系研究 II 土壤脲酶的动力学特征 [J]. *土壤学报*, 1997, 34(1): 42-52.
- [15] Moyo C C, Kissel D E, Cabrera M L. Temperature effects in soil urease activity [J]. *Soil Biol & Biochem*, 1989, 21: 935-938.
- [16] 中国科学院南京土壤研究所主编. 中国土壤 [M]. 北京: 科学出版社, 1979.

(上接第 54 页)

参考文献:

- [1] 殷震, 刘景华著. 动物病毒学 (第二版) [M]. 北京: 科学出版社, 1997. 757-762.
- [2] Sieglind L, Friedrich L, Francois L *et al.* Anteraspan transmembrane protein, renders cells susceptible to canine distemper virus [J]. *Virology*, 1997, 219: 10-15.
- [3] Appel M J G, Robson D S. A microneutralization test for canine distemper [J]. *Am J Vet Res*, 1973, 34: 1459-1463.
- [4] Potgieter L N, Ajidagba P A. Quantitation of canine distemper virus and antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay using protein A and monoclonal antibody capture [J]. *J Vet Diagn Invest*, 1989, 1: 110-115.
- [5] Wright N G, Cornwell H J, Thompson H J, *et al.* Canine

- distemper: current concepts in laboratory and clinical diagnosis [J]. *Vet Res.*, 1974, 94: 86-92.
- [6] 袁书智, 夏咸柱. 犬瘟热荧光抗体技术的应用研究 [J]. *中国兽医学报*, 1994, 14: 146-149.
- [7] 刘鼎新, 华国荫, 李君阁, 等. 应用酶标 SPA 染色法对犬瘟热快速诊断的研究 [J]. *家畜传染病*, 1986, (1): 22-24.
- [8] 乔贵林, 夏咸柱. 犬瘟热病毒抗体检测方法的比较研究 [J]. *中国兽医学报*, 1997, 17: 26-29.
- [9] Chomezynski, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. *Analytical Biochemistry*, 1987, 162: 156-159.
- [10] Innis M A, Gelfand D H. PCR protocols: A guide in methods and applications [M]. Academic Press, INC, 1990. 3-12.