

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.09.01

# 副流感病毒 5 型荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立

吴华伟, 秦义娴, 陈晓春, 高金源, 邓永, 刘丹\*, 苏佳, 薛青红, 陈延飞

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2021-04-03 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021) 09-0001-07 [中图分类号] S852.65

**[摘要]** 为建立检测副流感病毒 5 型(PIV5)的荧光定量 RT-PCR 方法, 针对 PIV5 L 基因设计筛选出一对特异性引物和探针, 对退火温度、引物浓度、探针浓度进行了优化, 并进行了敏感性、特异性和重复性试验。结果显示: 最适退火温度为 54.7 °C, 最适引物浓度为 0.5 μmol/L, 最适探针浓度为 0.1 μmol/L。检测灵敏度为 10 copies、0.8 TCID<sub>50</sub>, 特异性结果显示与 BPIV3 等 22 种常见病毒及原辅材料均无交叉, 重复性试验显示不同模板浓度重复检测变异系数均小于 1.5%, 重复性良好。

**[关键词]** 副流感病毒 5 型; 荧光定量; RT-PCR

## Development of Fluorescence Quantitative RT-PCR for the Detection of Parainfluenza Virus 5 (PIV5)

WU Hua-wei, QIN Yi-xian, CHEN Xiao-chun, GAO Jin-yuan, DENG Yong,

LIU Dan\*, SU Jia, XUE Qing-hong, CHEN Yan-fei

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: LIU Dan, E-mail: liudan813@163.com

**Abstract:** To establish a fluorescence quantitative RT-PCR method for detection of Parainfluenza virus 5 (PIV5), a pair of specific primers and probes were designed and screened for PIV5 L gene. The annealing temperature, primer concentration and probe concentration were optimized, and the sensitivity, specificity and repeatability tests were reevaluated respectively. The results showed that the optimal annealing temperature was 54.7 °C, the optimal primer concentration was 0.5 μmol/L, and the optimal probe concentration was 0.1 μmol/L. The detection sensitivity was 10 copies and 0.8 TCID<sub>50</sub>, the specificity results showed that there was no cross-over with 22 common viruses and raw materials such as BPIV3, and the repeatability test showed that the coefficient of variation of different template concentrations was less than 1.5%, and the repeatability was good.

**Key words:** Parainfluenza virus 5; fluorescence quantitative; RT-PCR

基金项目: 中国兽医药品监察所所级课题(201801)

作者简介: 吴华伟, 研究员, 从事兽用生物制品检验和研究工作。

通讯作者: 刘丹。E-mail: liudan813@163.com

副流感病毒 5 型 (Parainfluenza virus 5, PIV5) 为单股负链不分节段的 RNA 病毒, 属于副黏病毒科 (Paramyxoviridae) 副黏病毒亚科 (Paramyxovirinae) 腮腺炎病毒属 (Rubulavirus), 可引起犬、猫、猪、牛、仓鼠、豚鼠等多种动物及人呼吸道感染<sup>[1-2]</sup>。基因组大小为 15246 nt, 在副黏病毒科病毒中最小, 遵循“六碱基原则”, 其结构式为 3'-NP-V/P-M-F-(SH)-HN-L-5', 其中 NP、P、L 三种蛋白为 PIV5 病毒粒子的重要组成部分, 为核衣壳的装配和指导病毒转录复制所必须, 相互结合可形成核糖核蛋白体。L 蛋白为多功能大蛋白, 含有 2256 个氨基酸, 分子量最大, 常用作副黏病毒科遗传进化分析的靶基因或 PIV5 分子生物学检测的靶基因<sup>[3-4]</sup>。PIV5 的检测方法有病原学方法 (病毒分离、分子生物学检测和血凝试验等) 和血清学方法 (包括免疫荧光试验、中和试验、血凝抑制试验、酶联免疫吸附试验等)<sup>[5]</sup>。荧光定量 RT-PCR 具有特异性强、灵敏度高、检测时间短的优点, 并能有效解决普通 PCR 污染问题, 可作为常见病原核酸的检测方法。本研究针对 PIV5 L 基因保守区域筛选出一对特异性引物和探针, 建立了一种特异性检测 PIV5 的 Taqman 荧光定量 RT-PCR 方法, 以期为开展动物源性原辅材料中 PIV5 污染检测提供有效的技术手段。

## 1 材料与方法

1.1 病毒株 PIV5/01 株、PIV5/02 株, 由中国兽医药品监察所分离、鉴定和保存。

1.2 主要试剂、试剂盒 AxyPrep Body Fluid Viral DNA/RNA Miniprep Kit, Axygen 公司产品; Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-), TaKaRa 公司; 快捷型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 II 型 (离心柱型), Bioteke 公司; KOD FX Neo, TOYOBO 公司; M-MLV III One-Step qPCR-PCR (Probe), 北京博迈德公司; pEasy Blunt Simple、DNA 分子量标准品 (DL2000)、50 × TAE 电泳缓冲液, 琼脂糖等, 北京全式金公司。

1.3 主要仪器 台式离心机; 旋涡振荡器; 水浴

锅; 微量移液器 1 套 (最大量程分别为 10 μL、100 μL、200 μL、1000 μL)。

1.4 引物的设计与合成 根据 GenBank 中副流感病毒 5 型 SER 株 (JQ743328.1) 基因序列, 针对 L 基因序列设计了一对引物和探针。上游引物 (L119-F): 5'-GACCAGAAAATTATTGAAT-3'; 下游引物 (L119-R): 5'-TACCAGGCACATGTGGGGT-3'。预期扩增片段长度为 119 bp。探针 (L119-P): 5'-FAM-TACTGAGTCGGGCCAAGTAGC-MGB-3'。引物和探针由华大基因公司合成。

1.5 标准质粒模板的制备 以提取的病毒总 RNA 为模板, 先反转录为 cDNA, 反转录体系为 20 μL: 总 RNA 10 μL, 10 μmol/L 下游引物 1 μL, 置 70 °C 水浴 5 min, 冰浴 2 min; 然后依次加入 5 × M-MLV Buffer 4 μL, dNTP Mixture (2.5 mmol/L each) 2 μL, RNase Inhibitor (40 U/μL 0.25 μL) 0.5 μL, RTase M-MLV (RNase H-) (200 U/μL) 0.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 2 μL。反应条件 42 °C 60 min, 70 °C 15 min。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应总体系 50 μL, 其中 2 × PCR Buffer for KOD FX Neo 25 μL, dNTPs (2 mmol/L each) 10 μL, L119-F (10 μmol/L) 1.5 μL, L119-R (10 μmol/L) 1.5 μL, KOD FX Neo 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 6 μL, cDNA 模板 5 μL。反应程序为: 94 °C 2 min; 98 °C 10 s, 52.9 °C 30 s, 68 °C 15 s, 30 个循环; 68 °C 10 min。将 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分离, 回收大小为 119 bp 的目的 DNA 片段, 连接至 pEasy Blunt Simple 载体, 经 PCR 和测序鉴定。质粒拷贝数计算公式  $\text{copies}/\mu\text{L} = 6.02 \times 10^{23} \times [\text{质粒浓度 ng}/\mu\text{L} \times 10^{-9} \div (\text{碱基数 bp} \times 660)]$ 。

1.6 荧光定量 RT-PCR 反应条件的优化 采用 M-MLV III One-Step qPCR-PCR (Probe) 说明书中推荐的反应体系, 对反应体系中的引物浓度, 探针浓度, 退火温度等进行优化, 以期找到最小的样本阈值循环数和最高荧光值, 以及熔解曲线特异、检测灵敏度高、稳定性好的最佳反应条件。

1.6.1 退火温度的优化 荧光定量反应体系:

One-Step qPCR Buffer(2 ×) 10 μL, 10 μmol/L 上下游引物各 0.8 μL, 10 μmol/L 探针 0.2 μL, 病毒 RNA 5 μL, 补 ddH<sub>2</sub>O 至 20 μL。反应程序: 45 °C 10 min; 95 °C 2 min; 95 °C 5 s, 温度梯度(62.0、61.6、60.6、59.2、57.1、55.7、54.7、54.0) °C 20 s, 40 个循环。在延伸时收集荧光信号, 报告基因设置为 FAM。

1.6.2 引物浓度优化 荧光定量反应体系: One-Step qPCR Buffer(2 ×) 10 μL, 10 μmol/L 上下游引物各 0.4、0.6、0.8、1.0 μL, 10 μmol/L 探针 0.5 μL, 病毒 RNA 5 μL, 补 ddH<sub>2</sub>O 至 20 μL。反应程序: 45 °C 10 min; 95 °C 2 min; 95 °C 5 s, 54.7 °C 20 s, 40 个循环。在延伸时收集荧光信号, 报告基因设置为 FAM。

1.6.3 探针浓度的优化 荧光定量反应体系: One-Step qPCR Buffer(2 ×) 10 μL, 10 μmol/L 上下游引物各 1.0 μL, 2 μmol/L 探针(1、2、3、4、5 μL), 病毒 RNA 5 μL, 补 ddH<sub>2</sub>O 至 20 μL。反应程序: 45 °C 10 min; 95 °C 2 min; 95 °C 5 s, 54.7 °C 20 s, 40 个循环。在延伸时收集荧光信号, 报告基因设置为 FAM。

1.7 标准曲线的绘制 将阳性标准品做 10 倍系列稀释, 分别稀释成  $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^1$  copies/μL 共 9 个梯度, 作为模板, 进行荧光定量 RT-PCR 扩增, 建立标准曲线。

1.8 特异性试验 将高致病性猪繁殖与呼吸综合症活疫苗(TJM-F92 株)、猪繁殖与呼吸综合症活疫苗(CH-1R 株)、伪狂犬病活疫苗(Bartha-K61 株)、山羊痘活疫苗(AV41 株)、小反刍兽疫活疫苗(Clone9 株)、猪瘟病毒活疫苗(兔源)、猪瘟活疫苗(细胞源)、鸡新城疫活疫苗(LaSota 株)、鸡传染性支气管炎活疫苗(H120 株)、鸭瘟活疫苗、鸡传染性法氏囊病活疫苗(NF8 株)、鸡传染性法氏囊病活疫苗(D-22 株)、鸡马立克氏病火鸡疱疹病毒活疫苗(FC-126 株)、鸡传染性喉气管炎活疫苗(K317 株)、鸡痘鹌鹑化弱毒疫苗、PIV5/01 株、牛副流感病毒 3 型、猪圆环病毒 2 型、猪传染性胃肠炎 SCJY-1 株、猪流行性腹泻 SCSZ-1 株、SIV-H1N1 LN 株、SIV-H3N2

HLJ 株、鸡新城疫病毒 Clone30 株、新生牛血清、胎牛血清、DMEM 培养基、MEM 培养基、199 培养基、胰酶、牛血清白蛋白、蔗糖、脱脂牛奶、明胶、海藻酸钠等 22 种兽用生物制品、毒株及原辅材料按商品化核酸提取试剂盒说明书提取 RNA 或 DNA(针对 DNA 病毒), 按优化的反应条件进行扩增, 以评估所建立方法的特异性。

1.9 敏感性试验 将阳性标准品 10 倍系列稀释为  $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^1$  copies/μL 作为模板, 用建立的副流感病毒 5 型 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 检测方法进行敏感性检测。将测定好病毒含量的 PIV5/02 株 10 倍系列稀释后作为模板, 提取 RNA 后用建立的副流感病毒 5 型 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 检测方法进行敏感性检测。

1.10 重复性试验 以  $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^6$  copies/μL 稀释的阳性标准品为模板, 每个浓度的样品做 3 次重复, 计算变异系数。分析所建立的荧光定量 RT-PCR 检测方法的重复性。

## 2 结果与分析

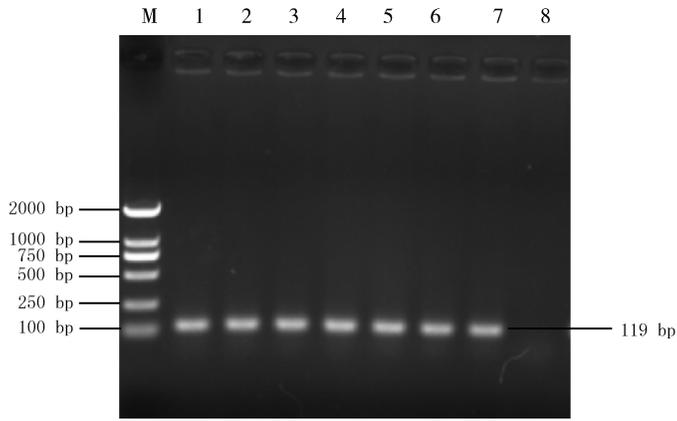
2.1 PCR 扩增和阳性重组质粒的鉴定 以制备的 PIV5 的 cDNA 为模板, 对 PIV5 L 基因进行 PCR 扩增, 大小为 119 bp, 与预期大小一致, 结果见图 1。目的片段阳性的重组质粒测序分析结果表明, 成功构建了 L 基因的 pEasy Blunt Simple 阳性重组质粒。

### 2.2 荧光定量 RT-PCR 反应条件的优化

2.2.1 最佳退火温度的确定 由图 2 可知, 退火温度为 54.7 °C 时, 荧光定量扩增得到最小的 Ct 值及最高荧光值, 确定为荧光定量反应的最佳退火温度。

2.2.2 最适引物浓度的确定 以退火温度为 54.7 °C 进行荧光定量反应, 最佳反应条件以得到最小的 Ct 值及最高荧光值为指标, 最适引物浓度为 0.5 μmol/L(图 3)。

2.2.3 最适探针浓度 在确定最适退火温度和引物浓度的条件下, 探针浓度为 0.1 μmol/L 时, 荧光定量扩增得到最小的 Ct 值及最高荧光值, 确定为荧光定量反应的最适探针浓度(图 4)。



M; DL2000; 1-7; L 基因 PCR 产物; 8; 阴性对照

M; DNA Marker; 1-7; PCR - amplified L gene; 8; Negative control

图 1 PIV5 L 基因的 PCR 扩增及重组质粒的鉴定

Fig 1 PCR amplification of L gene and identification of the recombinant plasmid

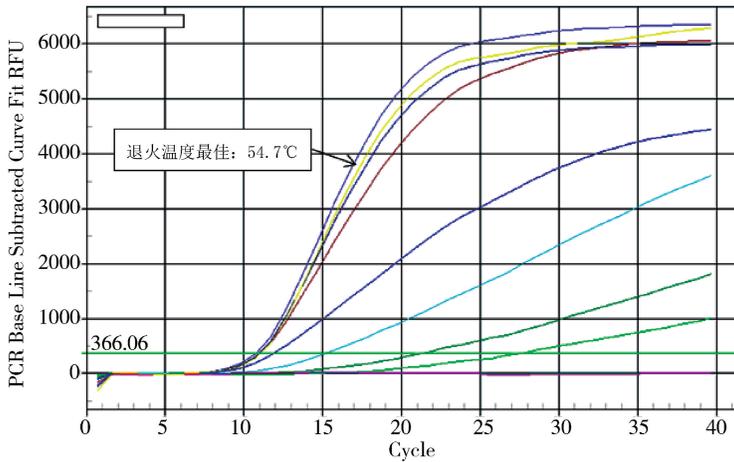


图 2 最佳退火温度

Fig 2 The optimal annealing temperature

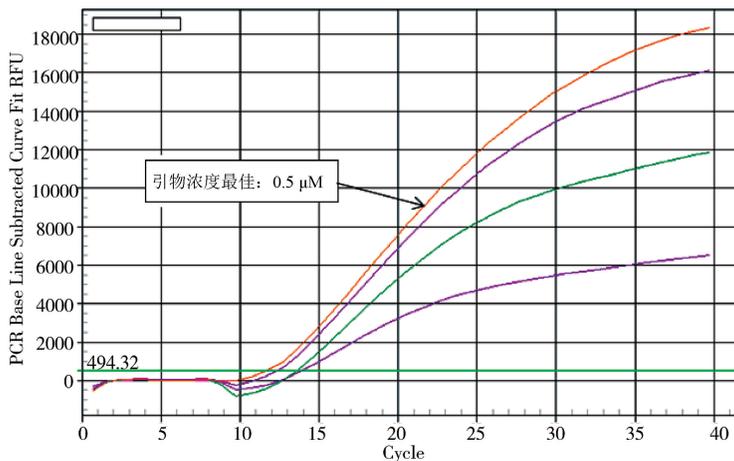


图 3 最适引物浓度

Fig 3 The optimum primer concentration

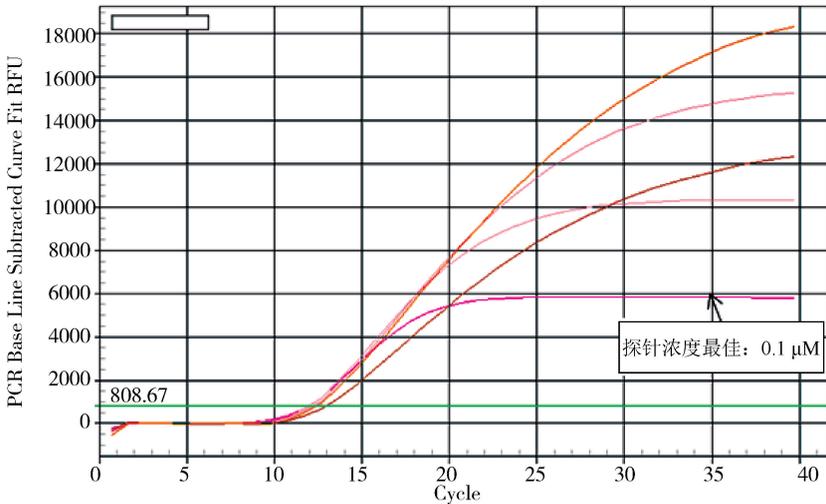


图 4 最适探针浓度

Fig 4 The optimum probe concentration

经过试验条件的优化,最终确定了最佳荧光定量 PCR 的反应条件:One - Step qPCR Buffer(2 × ) 10 μL;酶 0.6 μL;上游引物(10 μmol/L)1 μL;下游引物(10 μmol/L)1 μL;探针(10 μmol/L) 0.1 μL;模板 5 μL;ddH<sub>2</sub>O 2.3 μL。反应条件:45 °C 10 min; 95 °C 2 min;95 °C 5 s,54.7 °C 20 s,40 个循环(PCR 扩增)。在 54.7 °C 延伸时收集荧光信号,报

告基因设置为 FAM。

2.3 标准曲线的绘制 将阳性标准品 10 倍系列稀释为  $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^1$  copies/μL 作为模板,以优化的特异性引物、探针、反应体系和反应条件进行荧光定量 RT - PCR 扩增,建立标准曲线。结果显示具有良好的线性关系。扩增效率  $E = 92.6\%$ ,  $R^2 = 0.995$ ,标准曲线方程  $Y = -3.514X + 41$ (图 5)。

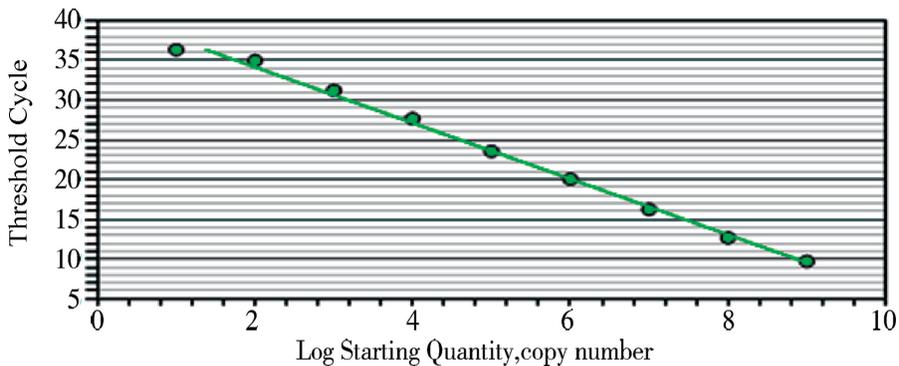


图 5 L 基因荧光定量 RT - PCR 的标准曲线

Fig 5 Standard curve of Taqman fluorescent quantitative RT - PCR for L gene

2.4 特异性试验 选取了 PIV5/01 株、高致病性猪繁殖与呼吸综合症活疫苗(TJM - F92 株)、猪繁殖与呼吸综合症活疫苗(CH - 1R 株)等 22 种兽用生物制品、毒株及原辅材料,用建立的方法,进行荧

光定量 RT - PCR 扩增,结果显示除 PIV5/01 株外,其他样品均未检测到特异性扩增信号(图 6),说明所建立的检测方法具有良好的特异性。

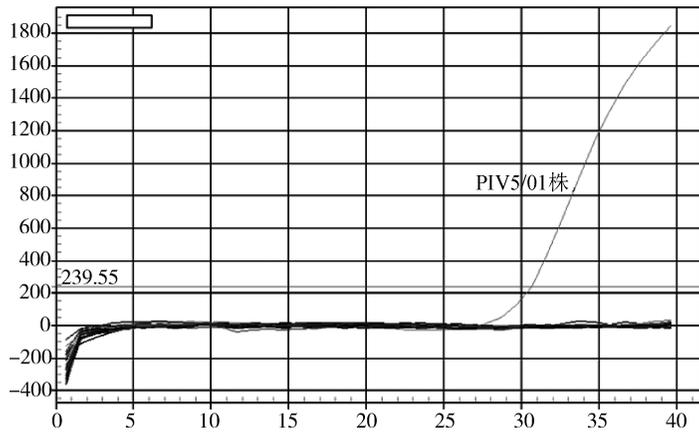


图 6 PIV5 L 基因荧光定量 RT-PCR 的特异性试验

Fig 6 The specificity test of the Taqman fluorescent quantitative RT-PCR for PIV5 L gene

2.5 敏感性试验 以 10 倍稀释的标准品作为模板,按优化好的荧光定量 RT-PCR 反应条件进行扩增,其最小检出模板浓度为 10 copies (图 7)。

将测定好病毒含量的 PIV5/02 株进行 10 倍系列稀释后作为模板,进行敏感性检测,其最小检出量为 0.8 TCID<sub>50</sub> (图 8)。

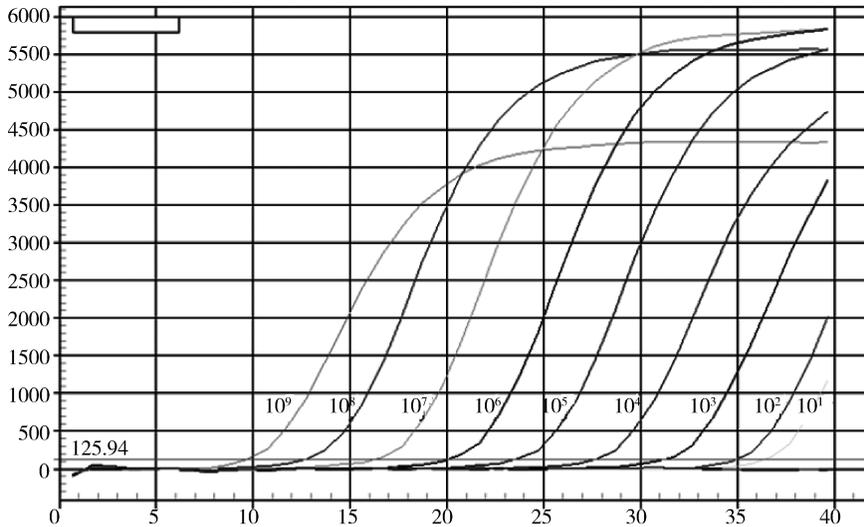


图 7 敏感性分析的扩增曲线

Fig 7 Amplification plots of the sensitivity test

2.6 重复性试验 如表所示,不同模板浓度其变异系数均小于 1.5%,表明所建立的荧光定量 RT-PCR 检测方法具有良好的稳定性(表 1)。

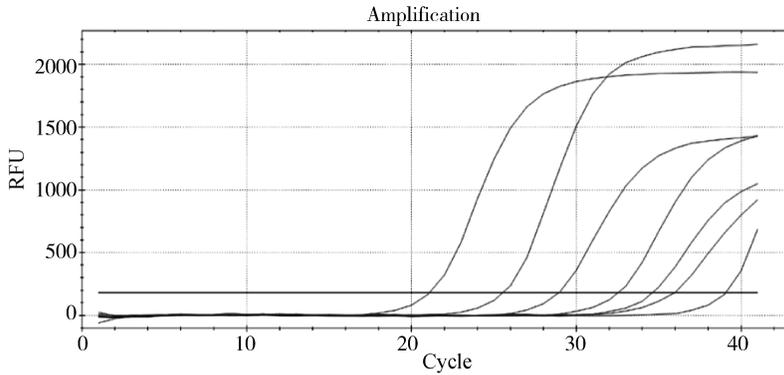
表 1 稳定性试验

Tab 1 Stability test of the Taqman fluorescent quantitative RT-PCR for L gene

模板浓度/ (copies · μL <sup>-1</sup> )	Ct 值			均值 $\bar{x}$	标准差 <i>s</i>	变异系数 CV/%
	1	2	3			
1 × 10 <sup>8</sup>	12.801	12.686	12.943	12.81	0.105	0.82
1 × 10 <sup>7</sup>	16.336	16.838	16.546	16.57	0.206	1.24
1 × 10 <sup>6</sup>	19.765	19.901	19.648	19.77	0.103	0.52

### 3 讨论

PIV5 是近年来兽用生物制品用细胞和牛血清外源病毒检验中新发现的外源病原<sup>[6]</sup>,具有血凝特



从左到右:分别代表 800,80,8,0.8,0.08,0.008 TCID<sub>50</sub> PIV5/02 株以及阴性对照的扩增曲线

The curves from left to right represent 800,80,8,0.8,0.08,0.008 TCID<sub>50</sub> PIV5/02 strain and negative control

图 8 对 PIV5/02 株检测灵敏度试验结果

Fig 8 Amplification plots of the PIV5/02 strain

性,可在 Vero 等细胞引起典型细胞病变,可作为该病原诊断的参考方法。目前用于诊断该病的方法有病毒分离鉴定、血清学方法和 PCR 等,上述方法存在费时、操作繁琐、无法定量等缺点,影响了对该病原的质量控制,成为目前兽用生物制品质量的潜在威胁,所以亟需建立一种特异、敏感、快速、简便、可定量检测 PIV5 的实时荧光 RT-PCR 方法,作为兽用生物制品企业加强动物源性材料控制的内控方法。国内已有商品化的 PIV5 荧光定量检测试剂盒,但大多都是染料法和两步法,为此本研究根据 PIV5 保守基因 L 基因进行设计一对特异性引物和一条探针,成功建立了一种一步法 Taqman 荧光定量 RT-PCR 检测方法,对 PIV5 L 基因重组质粒和 PIV5/02 株的最低检测限分别为 10 copies 和 0.8 TCID<sub>50</sub>,对 22 种常见猪病病毒、牛羊病病毒、禽病病毒和各种原辅材料均无交叉。在验证荧光定量检测方法的特异性时,DNA 病毒直接提取 DNA 进行荧光定量检测,RNA 病毒需要先提取 RNA 进行反转录然后再进行荧光定量检测。该方法显示出良好的敏感性和特异性,有望为保障我国兽用生物制品质量提供重要技术支撑。

#### 参考文献:

- [1] Hierweger M M, Werder S, Seuberlich T. Parainfluenza virus 5 infection in Neurological disease and encephalitis of cattle [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(2): 498.
  - [2] Jiang N, Wang E Y, Guo D H, *et al.* Isolation and molecular characterization of parainfluenza virus 5 in diarrhea - affected piglets in China [J]. *J Vet Med Sci*, 2018, 80(4): 590 - 593.
  - [3] Wang X H, Chen W, Xiang R, *et al.* Complete genome sequence of parainfluenza virus 5 (PIV5) from a Sunda Pangolin (*Manis javanica*) in China [J]. *J Wildl Dis*, 2019, 55(4): 947 - 950.
  - [4] Sun D Y, Xu P, He B. Sumoylation of the P protein at K254 plays an important role in growth of parainfluenza virus 5 [J]. *J Virol*, 2011, 85(19): 10261 - 10268.
  - [5] Connolly S A, Lamb R A. Paramyxovirus fusion: real - time measurement of parainfluenza virus 5 virus - cell fusion [J]. *Virology*, 2006, 355(2): 203 - 212.
  - [6] 吴华伟, 秦义娟, 陈晓春, 等. 首例兽用活疫苗种污染副流感病毒 5 型的检测 [J]. *中国兽药杂志*, 2018, 52(12): 16 - 23.
- Wu H W, Qin Y X, Chen X C, *et al.* The first case of contamination with parainfluenza virus 5 in veterinary live vaccine [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2018, 52(12): 16 - 23.

(编辑:李文平)