

梁晓珊, 宁鹏, 李小龙, 等. 牛呼吸道合胞体病毒一步法实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (3): 94-98.  
LIANG X S, NING P, LI X L, et al. Establishment and application of a one-step real-time fluorescence quantitative PCR assay for bovine respiratory syncytial disease [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (3): 94-98.

# 牛呼吸道合胞体病毒一步法实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用

梁晓珊, 宁鹏, 李小龙, 鲍显伟, 李昊, 石亚楠, 王雪妍, 郭雪莲, 许立华\*

(宁夏大学动物科技学院, 宁夏 银川 750021)

**摘要:** 为建立一种牛呼吸道合胞体病毒 (Bovine respiratory syncytial virus, BRSV) 快速简便的检测方法, 本研究基于 BRSV M 基因保守区序列, 设计特异性引物及探针, 通过优化反应条件, 建立用于 BRSV 检测的一步法实时荧光定量 PCR, 并验证了该方法的敏感性、特异性和重复性; 同时利用建立的检测方法对采集的临床样本进行检测。结果表明: 本研究所建立的 BRSV 荧光定量检测方法, 其特异性好, 仅对 BRSV 存在特异性扩增; 敏感性高, 最低可达 10 copies/ $\mu$ L; 稳定性好, 组内变异系数和组间变异系数小。使用所建立的 BRSV 一步法实时荧光定量 PCR 对宁夏地区 94 份临床样品进行检测, 阳性率为 5.3% (5/94)。上述结果表明, 本研究建立的检测方法可为 BRSV 的快速诊断提供有力的技术支持。

**关键词:** 牛呼吸道合胞体病毒; 实时荧光定量 PCR; M 基因; 诊断

中图分类号: S852.6 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)03-0094-05

## Establishment and application of a one-step real-time fluorescence quantitative PCR assay for bovine respiratory syncytial disease

LIANG Xiaoshan, NING Peng, LI Xiaolong, BAO Xianwei, LI Hao, SHI Yanan,

WANG Xueyan, GUO Xuelian, XU Lihua\*

(College of Animal Science and Technology, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

**Abstract:** To establish a rapid and simple method for the detection of bovine respiratory syncytial virus (BRSV), we designed specific primers and probes based on the sequence of the conserved region of the BRSV M gene, and established a one-step real-time fluorescence quantitative PCR assay for BRSV detection by optimizing the reaction conditions, and validated the sensitivity, specificity and stability of the assay. Finally, the method was also used to test clinical samples. The results showed that this study successfully established a BRSV fluorescence quantitative assay with good specificity and specific amplification only for BRSV, with high sensitivity at a minimum of 10 copies/ $\mu$ L, with good stability with low intra-group and inter-group coefficients of variation. The detection rate of 94 clinical samples collected in the Ningxia region using the established BRSV one-step real-time fluorescence quantitative PCR assay, the positive rate was 5.3% (5/94). The above results indicated that the method established in this study might serve as a powerful technical tool for rapid diagnosis of BRSV.

**Keywords:** bovine respiratory syncytial virus; real-time fluorescence quantitative PCR; M gene; diagnosis

牛呼吸道合胞体病 (bovine respiratory syncytial disease, BRSD) 是由牛呼吸道合胞体病毒 (bovine respiratory syncytial virus, BRSV) 引起的一种呼吸道传染病, 是牛呼吸道疾病综合征 (bovine respiratory disease complex, BRDC) 的主要疾病之一<sup>[1]</sup>。BRSV 主要通过空气飞沫传播, 可感染牛、羊等多种反刍动

物, 其中 2~6 月龄犊牛的发病率高, 但单独感染后死亡率较低<sup>[2-3]</sup>。牛感染 BRSV 后, 可继发细菌感染, 出现严重间质性肺炎、上呼吸道感染等多种严重临床症状, 引起泌乳奶牛产奶量下降或废绝、妊娠母牛流产和犊牛死亡。已有研究发现 BRSV 影响牛气管上皮细胞对多杀性巴氏杆菌的黏附作用, 使病原侵入下呼吸道后发生更为严重的继发感染<sup>[4-5]</sup>。BRSD 传染性强, 在全球范围内流行, 增加奶牛及肉牛养殖、治疗成本, 严重影响我国畜牧业经济稳定发展。

BRSV 的荧光定量 PCR 检测方法靶基因多为 N 基因及部分 F 基因, 而随着病毒的传播变异, 这些检测技术具有一定的局限性<sup>[6-8]</sup>。近期, 郭兵等<sup>[8]</sup>根

收稿日期: 2023-03-04; 修回日期: 2023-12-22

基金项目: 宁夏奶牛育种专项 (2019NYYZ0503); 宁夏动物疫病净化科技创新团队项目 (2020CXDXLX05)

第一作者: 梁晓珊, 女, 硕士

\* 通信作者: 许立华, 教授, 研究方向: 兽医微生物学与免疫学、动物疫病诊断与防控技术, E-mail: littlezhe99@163.com。

据 BRSV 的 F 基因建立 TB Green II 荧光定量 PCR 检测方法, 该方法特异性良好且最低检测限达 39 copies/ $\mu\text{L}$ 。常益铭等<sup>[9]</sup>根据 N 基因建立恒温隔绝式荧光 RT-PCR 检测方法, 该方法敏感性高, 最低检测限为 3.45 copies/ $\mu\text{L}$ 。上述的检测方法可为 BRSV 的检测提供新的技术支撑, 但在检测中, 反转录过程中反复开盖容易造成污染, 影响结果的准确性。

综上, 本研究基于 BRSV M 基因保守序列, 建立检测 BRSV 的一步法实时荧光定量 PCR, 并初步应用于牧场临床样品检测, 旨在为宁夏地区 BRSD 的流行病学调查提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 核酸及临床样品

BRSV 阳性样品, 牛传染性鼻气管炎病毒 (IBRV)、牛支原体、牛冠状病毒、牛细小病毒、金黄色葡萄球菌、牛病毒性腹泻病毒 (BVDV)、牛源肠球菌等病原的核酸样品均由本实验室保存。94 份临床样品采自宁夏各规模化牧场。

### 1.2 主要试剂

病毒 RNA 提取试剂盒 (Kit R6874)、琼脂糖胶回收试剂盒 (Kit D2500) 购自广州飞扬生物工程有

限公司; 逆转录试剂盒 (6210A)、pMD18-T (6011) 等购自宝生物工程 (大连) 有限公司;  $2 \times \text{Taq Plus Master Mix}$  (P211)、HiScript II U<sup>+</sup> One Step qRT-PCR Probe Kit (Q223) 购自诺唯赞生物科技股份有限公司; 氨苄青霉素、琼脂糖购自大连美仑生物技术有限公司; LB 液体培养基、LB 固体培养基购自生工生物工程有限公司;  $5 \times \text{Prestained Loading Dye}$ 、Prestained DL2000 DNA Marke 购自礼美生物科技 (上海) 有限公司;  $50 \times \text{TAE}$  缓冲液购自北京雷根生物技术有限公司; DH5 $\alpha$ 、质粒小提试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 引物及探针设计与合成

基于 GenBank 数据库中 BRSV 现有病毒基因组序列, 使用 MAFFT 对序列进行比对, 选择 BRSV M 蛋白基因保守区域, 使用 NCBI Primer designing Tool 引物设计工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) 设计 BRSV 通用型引物及探针 (表 1)。其中, *TaqMan* 探针使用 5'-FAM、BHQ1-3' 修饰, 扩增后的目的片段大小为 141 bp。引物及探针交由生工生物工程有限公司合成。

表 1 BRSV 引物、探针序列信息

引物/探针名称	序列 (5'→3')	片段长度/bp
BRSV-F	GGCAAATATGGAGACATACCTGAA	
BRSV-R	GCAGAGATGGAYGATTGGAAC	141
BRSV-Probe	FAM-CTCCATGAAGGATCRACHTACACAGC-BHQ1	

#### 1.3.2 标准质粒构建

使用 BRSV-F、BRSV-R 对 BRSV 的 cDNA 进行扩增及胶回收后, 与 pMD18-T 在 16 °C 条件下进行过夜连接, 并转化至 DH5 $\alpha$ , 获得重组质粒 pMD18-T-BRSV。经测序验证正确后使用质粒小提试剂盒进行质粒提取, 使用 NanoDrop One 测质粒浓度后分装至于 -80 °C 冰箱保存。

#### 1.3.3 反应条件优化

基于 HiScript II U<sup>+</sup> One Step qRT-PCR Probe Kit 的推荐体系, 以  $10^7$  copies/ $\mu\text{L}$  的 pMD18-T-BRSV 标准质粒为模板。使用梯度温度法对反应体系的温度进行优化, 其中, 梯度温度分别为 58 °C、57.4 °C、56.2 °C、54 °C、51.3 °C、49.2 °C、47.7 °C、47 °C 等 8 种; 使用棋盘法对引物及探针浓度进行优化, 其中引物的浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 和 0.9  $\mu\text{mol/L}$ , 探针浓度设计为 0.05、

0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40 和 0.45  $\mu\text{mol/L}$ , 确定该引物探针最佳扩增条件。

#### 1.3.4 标准曲线的建立

以  $10^2 \sim 10^9$  copies/ $\mu\text{L}$  重组质粒为模板, 每个稀释度的标准质粒使用 1.3.3 中优化后的最佳条件进行 3 次重复检测, 绘制该检测方的标准曲线。

#### 1.3.5 敏感性检测

选取浓度为  $10^0 \sim 10^9$  copies/ $\mu\text{L}$  10 个不同的浓度 pMD18-T-BRSV 重组质粒为模板, 对检测方法的敏感性进行验证。

#### 1.3.6 特异性检测

采用 1.3.1 设计的引物探针及优化后的反应条件对 IBRV、牛支原体、牛冠状病毒、牛细小病毒、金黄色葡萄球菌、BVDV、牛源肠球菌、BRSV 等 8 种病原的核酸进行扩增, 以 ddH<sub>2</sub>O 为阴性对照, 以  $10^7$  copies/ $\mu\text{L}$  标准质粒为阳性对照; 采用优化后的最优

反应条件进行该方法的特异性验证。

### 1.3.7 重复性检测

将 pMD18-T-BRSV 重组质粒进行 10 倍倍比稀释，选取  $10^5$ 、 $10^6$  和  $10^7$  copies/ $\mu\text{L}$  的 pMD18-T-BRSV 重组质粒为模板，对该检测方法的组内重复性及组间重复性进行验证，使用变异系数评估该检测方法的重复性。

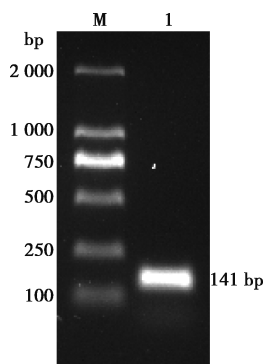
### 1.4 临床样品检测

对收集到的 94 份血清样品，使用病毒 RNA 提取试剂盒提取核酸后进行检测，并使用魏硕佟等<sup>[10]</sup>建立的 BRSV 单一 PCR 检测方法进行检测，比较两种检测方法的检测结果，评估建立的 BRSV 一步法实时荧光定量 PCR 检测方法在实际生产应用中的可行性。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组质粒标准品的构建

以 BRSV 核酸为模板，逆转录后使用表 1 中引物 BRSV-F、BRSV-R 进行 PCR 扩增，扩增产物经电泳纯化回收后与 pMD18-T 载体连接，构建重组质粒标准品。以 pMD18-T-BRSV 重组质粒为模板，使用 BRSV 特异性引物 BRSV-F、BRSV-R 对质粒 pMD18-T-BRSV-F 进行扩增，扩增产物大小为 141 bp，与预期目的片段大小一致，结果见图 1。



M. DL-2000 Marker; 1. pMD18-T-BRSV-重组质粒。

图 1 pMD18-T-BRSV 重组质粒 PCR 验证

### 2.2 BRSV 荧光定量 PCR 检测方法的反应条件优化

#### 2.2.1 温度优化

使用 58 °C、57.4 °C、56.2 °C、54 °C、51.3 °C、49.2 °C、47.7 °C、47 °C 8 种不同温度对扩增反应的退火温度进行优化，试验结果表明，该反应体系最优扩增条件为：55 °C 15 min 逆转录；95 °C 30 s 预变

性；95 °C 10 s、54 °C 30 s，共 40 个循环。

#### 2.2.2 引物及探针浓度优化

采用棋盘法对扩增体系中的引物及探针浓度进行优化，试验结果表明，该引物及探针的最优反应体系 (20  $\mu\text{L}$ ): 2  $\times$  One Step U<sup>+</sup> Mix 10  $\mu\text{L}$ , One Step U<sup>+</sup> Enzyme Mix 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 5.8  $\mu\text{L}$ , 上下游引物各 0.4  $\mu\text{L}$ , 探针 0.4  $\mu\text{L}$ , 模板 RNA 2  $\mu\text{L}$ 。

### 2.3 标准曲线的建立

使用优化后的最佳反应条件，以  $10^2 \sim 10^9$  copies/ $\mu\text{L}$  8 种浓度的重组质粒为模板进行扩增，每个浓度的模板进行 3 个重复；扩增后对 Ct 值求取平均值后结合模板质粒浓度绘制标准曲线；根据扩增结果及模板拷贝数绘制的标准曲线为  $y = -0.2998x + 11.724$ ,  $R^2 = 0.9974$ , 斜率  $k = -0.2998$ , 表明该标准曲线线性关系良好 (见图 2)。

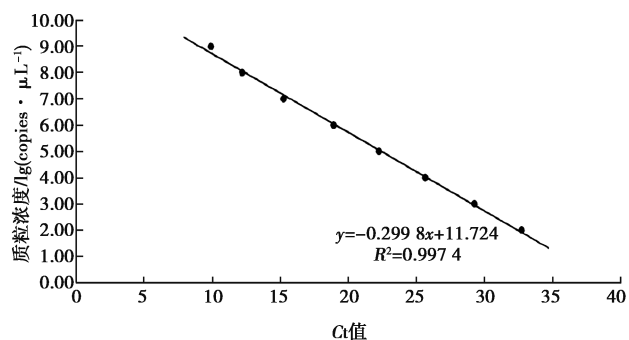
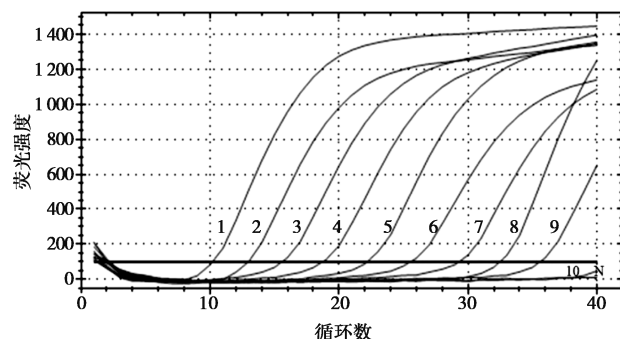


图 2 pMD18-T-BRSV 荧光定量 PCR 标准曲线

### 2.4 敏感性试验

采用优化后的反应体系及扩增条件，以  $10^0 \sim 10^9$  copies/ $\mu\text{L}$  10 个不同的浓度 pMD18-T-BRSV 重组质粒为模板进行扩增。试验结果表明，该反应体系阴性对照无扩增，检测下限为 10 copies/ $\mu\text{L}$  (图 3)。



N. ddH<sub>2</sub>O; 1~10. pMD18-T-BRSV 质粒浓度分别为  $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ , 10 和 1 copies/ $\mu\text{L}$ 。

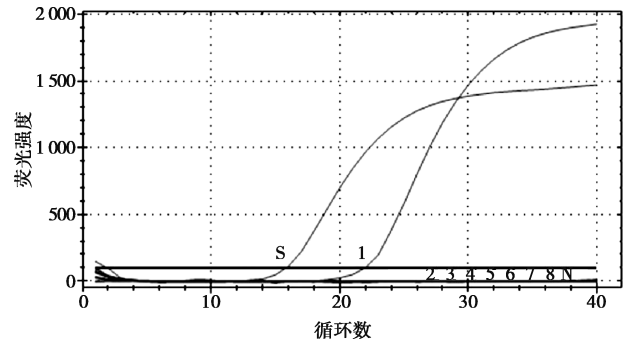
图 3 实时荧光定量 PCR 的敏感性试验

## 2.5 特异性试验

使用表1的引物及探针对IBRV、牛支原体、牛冠状病毒、牛细小病毒、金黄色葡萄球菌、BVDV、牛源肠球菌、BRSV 8种病原的核酸进行扩增。试验结果表明，除阳性对照及BRSV核酸正常扩增外，阴性对照及其他病原无扩增（图4），即检测方法可与其他呼吸道病原进行鉴别，表明该方法特异性较好。

## 2.6 重复性试验

使用最优体系及最佳扩增条件对 $10^5$ 、 $10^6$ 和 $10^7$  copies/ $\mu\text{L}$ 的pMD18-T-BRSV重组质粒为模板，对该检测方法的组内重复性及组间重复性进行验证。结果如表2所示，该检测方法的组内及组间的变异系数均小于2%，表明方法的重复性较好。



S. pMD18-T-BRSV 标准质粒；N. ddH<sub>2</sub>O；1. BRSV；2. IBRV；3. 牛支原体；4. 牛冠状病毒；5. 牛细小病毒；6. 金黄色葡萄球菌；7. BVDV；8. 牛源肠球菌。

图4 实时荧光定量PCR的特异性试验

表2 实时荧光定量PCR组内及组间重复性试验

质粒浓度/ (copies · $\mu\text{L}^{-1}$ )	组内重复			组间重复		
	Ct 值平均数	Ct 值标准差	变异系数/%	Ct 值平均数	Ct 值标准差	变异系数/%
$1 \times 10^5$	22.16	0.03	0.12	22.05	0.28	1.28
$1 \times 10^6$	18.90	0.17	0.88	18.90	0.10	0.50
$1 \times 10^7$	15.11	0.23	1.53	15.25	0.24	1.60

## 2.7 临床样品检测

用本研究建立的BRSV一步法实时荧光定量PCR检测方法，对取自宁夏不同牧场的94份血清样本进行检测，同时使用魏硕佟等<sup>[10]</sup>建立的BRSV普通PCR检测方法检测，结果如表3所示。BRSV一步法实时荧光定量PCR方法检出阳性样品5份，检出率为5.3%；普通PCR方法检出0份。说明本研究建立的方法比普通PCR方法能更灵敏地检测到BRSV。

表3 实时荧光定量PCR组内及组间重复性试验结果

检测方法	样品总数/份	阳性样品数/份	检出阳性率/%
荧光定量PCR	94	5	5.3
普通PCR	94	0	0.0

## 3 讨论

近年来，我国多地区存在BRSV的流行，严重困扰养牛业的健康发展。魏硕佟等<sup>[10]</sup>发现宁夏地区BRSV阳性率为15.05%；姜利霞等<sup>[11]</sup>发现湖南省BRSV阳性率为0.84%；赵毅等<sup>[12]</sup>发现东北三省BRSV感染率为32.75%。预防BRSD及其他呼吸道传染病的主要措施是加强饲养管理和疫苗接种。疫苗接种虽然取得了较好的防控效果，但目前依然存在局

限性，影响疫苗的整体免疫效果<sup>[13]</sup>。因此对该病的主动高效检测及监测，对BRSD的防控有重要意义。

荧光定量PCR技术已被应用于多种疾病的检测诊断。研究人员已采用SYBR Green I染料法和TaqMan探针基于N基因建立多种针对BRSV的检测方法，如孙晓波等<sup>[14]</sup>基于SYBR Green I染料法建立N基因荧光定量PCR；韦佳塔等<sup>[15]</sup>与齐力格尔等<sup>[16]</sup>建立N基因荧光探针PCR检测方法。在荧光定量PCR检测中，探针和引物的选择对检测方法建立至关重要，对检测灵敏度和准确性影响很大<sup>[17]</sup>。本研究以BRSV M蛋白为靶标基因，设计特异性引物探针，通过对优化反应条件、引物和探针浓度等多种条件进行优化，选取最适引物探针浓度及反应条件，建立一步法实时荧光定量PCR。

本研究建立的BRSV一步法荧光定量PCR检测方法具有特异性强、敏感性高的特点，检测下限可以达到10 copies/ $\mu\text{L}$ ，且可有效减少反复开盖导致的交叉污染。此外，该检测方法重复性好，组内及组间的变异系数均小于2%。对本实验室2023年第一季度收集的94份血清样本进行检测，发现BRSV阳性率为5.3%，提示BRSD在宁夏地区存在一定的流行，该检测结果对了解宁夏地区BRSD的流行病学信息具有一定意义。

综上,在今后的疫病监测工作中,应加强对包括 BRSD 在内的牛呼吸道疾病的检测与监测,防范 BRSD 在我国发生大范围流行。此外,要进一步加强 BRSV 的致病机制研究,为研发有效疫苗以防范 BRSD 发生大规模流行提供理论支撑。

## 参考文献:

- [1] 张准瑜,宋阿北,马小静,等.牛呼吸道合胞体病流行病学及疫苗研究近况[J].动物医学进展,2020,41(4):115-118.
- [2] JOHNSTON D, EARLEY B, MCCABE M S, et al. Elucidation of the host bronchial lymph node miRNA transcriptome response to bovine respiratory syncytial virus [J]. *Front Genet*, 2021, 12: 633125.
- [3] İNCE Ö B, ŞEVIK M, ÖZGÜR E G, et al. Risk factors and genetic characterization of bovine respiratory syncytial virus in the inner Aegean Region, Turkey [J]. *Trop Anim Health Prod*, 2021, 54(1): 4.
- [4] SUDARYATMA P E, SAITO A, MEKATA H, et al. Bovine respiratory syncytial virus decreased *Pasteurella multocida* adherence by downregulating the expression of intercellular adhesion molecule-1 on the surface of upper respiratory epithelial cells [J]. *Vet Microbiol*, 2020(246): 108748.
- [5] KLEM T B, SJURSETH S K, SVILAND S, et al. Bovine respiratory syncytial virus in experimentally exposed and rechallenged calves; viral shedding related to clinical signs and the potential for transmission [J]. *BMC Vet Res*, 2019, 15(1): 156.
- [6] ZHANG J, WANG W, YANG M, et al. Development of a one-step multiplex real-time PCR assay for the detection of viral pathogens associated with the bovine respiratory disease complex [J]. *Front Vet Sci*, 2022, 9: 825257.
- [7] LIU Z, LI J, LIU Z, et al. Development of a nanoparticle-assisted PCR assay for detection of bovine respiratory syncytial virus [J]. *BMC Vet Res*, 2019, 15(1): 110.
- [8] 郭兵,王海凤,李妍,等.基于牛呼吸道合胞体病毒 F 基因 TB Green II 荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. *中国兽医学报*, 2023, 43(4): 648-653.
- [9] 常益铭,岳华,汤承.牛呼吸道合胞体病毒的恒温隔绝式荧光 RT-PCR 检测方法的建立及应用 [J]. *中国预防兽医学报*, 2023, 45(2): 144-149.
- [10] 魏硕佟,谢婧,熊新雪,等.牛呼吸道病毒多重 PCR 检测方法的建立及应用 [J]. *中国兽医学报*, 2021, 41(11): 2126-2131.
- [11] 姜利霞.牛呼吸道病毒病的四重荧光 PCR 检测方法的建立与应用 [D].长沙:湖南农业大学,2021.
- [12] 赵毅.牛病毒性呼吸道疾病主要病原快速检测方法的建立与应用 [D].哈尔滨:东北农业大学,2021.
- [13] ELLIS J A, GOW S P, GOJI N. Response to experimentally induced infection with bovine respiratory syncytial virus following intranasal vaccination of seropositive and seronegative calves [J]. *J Am Vet Med Assoc*, 2010, 236(9): 991-999.
- [14] 孙晓波,姜晓霞,王以欣,等.牛呼吸道合胞体病毒通用型实时荧光 RT-PCR 检测方法的建立与应用 [J]. *中国兽医科学*, 2022, 52(5): 554-563.
- [15] 韦佳塔,侯广争,伍钢,等.牛呼吸道合胞体病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. *畜牧与兽医*, 2020, 52(12): 121-126.
- [16] 齐力格尔.牛呼吸道合胞体病毒荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及应用 [D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2018.
- [17] 王盛,万丽军,谢芝勋,等.禽呼肠孤病毒 TaqMan MGB 探针实时荧光定量 PCR 快速检测方法的建立 [J]. *中国兽医科学*, 2022, 52(11): 1385-1390.