

检测牛感染犬新孢子虫的 *TaqMan-MGB Real-time PCR* 方法的建立

陈千林¹ 刘梦丽¹ 许正茂¹ 王振宝² 吉尔格力³ 史亚明¹ 巴音查汗^{1*}

(1. 新疆农业大学 动物医学学院, 乌鲁木齐 830052;

2. 伊犁出入境检验检疫局综合技术服务中心, 新疆 伊宁 835000;

3. 新疆巴音郭楞职业技术学院 生物工程系, 新疆 库尔勒 841000)

摘要 为建立牛感染犬新孢子虫的 Real-time PCR 检测方法, 根据犬新孢子虫 *Nc2* 基因保守序列设计特异性检测引物和 *TaqMan-MGB* 探针, 建立新孢子虫病 *TaqMan-MGB Real-time PCR* 检测方法。PCR 扩增产物约为 150 bp, 与预期片段大小相符; Real-time PCR 扩增表明, *Ct* 值与梯度稀释的阳性质粒模板呈良好的线性关系; 当检测牛源性弓形虫、牛环形泰勒和牛巴贝斯等虫种阳性 DNA 时均为阴性; 经 3D 数字 PCR 判定, Real-time PCR 方法的最低有效检测量为 6.41 拷贝/ μL , 灵敏性是常规 PCR 的 1 000 倍; 重复性试验的组内平均变异系数为 1.108%, 组间为 2.732%; 本方法与《新孢子虫病检疫技术规范》(SN/T 3499-2013) 的检测符合率为 100% (46/46)。该 Real-time PCR 方法可用于早期诊断和日常监测家畜感染犬新孢子虫。

关键词 新孢子虫病; Real-time PCR; 3D 数字 PCR; *TaqMan-MGB* 探针; *Nc2* 基因

中图分类号 S 858.23; S 855.9

文章编号 1007-4333(2016)12-0058-07

文献标志码 A

Establishment of *TaqMan-MGB Real-time PCR* detection method of *Neospora caninum* in infected cattle

CHEN Qian-lin¹, LIU Meng-li¹, XU Zheng-mao¹, WANG Zhen-bao²,
GELI Ji-er³, SHI Ya-ming¹, CHAHAN Ba-yin^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China;

2. Synthesis Technique Service Center of Yili Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Yining 835000, China;

3. Department of Biological Engineering, Bayinguoleng Vocational and Technical College, Korla 841000, China)

Abstract To establish Real-time PCR detection method of *Neospora caninum* in infected cattle, specific primers and *TaqMan-MGB* probes were designed according to *N. caninum Nc2* conserved sequences. The size of PCR amplified fragment was about 150 bp and is consistent with the expected size; Real-time PCR amplification results showed that: The concentration of positive templates had a good linear relationship with the *Ct* value; The results were negative when detection positive DNA of *Toxoplasma gondii*, *Theileria annulata*, *Babesia bovis* and other parasites; Determination by 3D digital PCR, the lowest effective detection was 6.41 copy/ μL , which was 1 000 times of the conventional PCR; The average coefficient variation between groups was 2.732% and was 1.108% within groups; And the detection result of this method if the was 100% (46/46) coincidence to the quarantine protocol for *Neosporosis* (SN/T 3499-2013). In conclusion, this method can be used for early diagnosis and routine monitor of livestock infected by *Neospora caninum*.

Keywords *Neosporosis*; Real-time PCR; 3D digital PCR; *TaqMan-MGB* probes; *Nc2* gene

收稿日期: 2015-12-28

基金项目: 新疆维吾尔自治区科技成果转化专项项目(201454129); 巴音郭楞蒙古自治州科学技术研究“星火”项目(201403); 库尔勒市重点科技计划项目(2013051108)

第一作者: 陈千林, 硕士研究生, E-mail: 86871965@qq.com

通讯作者: 巴音查汗, 教授, 博士生导师, 主要从事预防兽医学研究, E-mail: bynch@hotmail.com

新孢子虫病 (*Neosporiasis*) 是由犬新孢子虫 (*Neospora caninum*) 寄生于多种哺乳动物有核细胞内的一种原虫病, 可导致妊娠母畜发生空怀、流产、死胎等, 新生仔畜发生运动障碍和神经系统疾病等, 牛对该病尤为敏感^[1]。其传播途径包括水平传播和垂直传播, 垂直传播是其主要的传播方式^[2]。感染后主要寄生于脑、脊髓、神经和内脏等组织中^[3]。目前还没有可用于防治犬新孢子虫各寄生阶段的有效疫苗和特效药物, 准确的检测、监控技术是综合防治的关键。

该病在世界范围牛类动物中的感染率为 10%~40%, 最高达 82%^[4-5]; 我国新疆、青海、北京和吉林等地也有该病的报道^[6-7]。在众多检测技术中, Real-time PCR 方法具有灵敏度高、特异性强、稳定性好、方便快捷等特点, 已被广泛运用于各种病原的定性和定量检测^[8]。其中, TaqMan-MGB 探针 3' 端能有效地结合到 DNA 双链的小沟部, 因此具有更好的特异性、灵敏性和稳定性^[9]。3D 数字 PCR 是将稀释度很低的 DNA 模板均匀涂布于金属反应芯片上, 通过 PCR 扩增和收集阳性反应的荧光信号, 再根据泊松分布计算出参与阳性反应的模板 DNA 分子数^[10]。

结合数字 PCR 建立 Real-time PCR 检测方法, 无需依赖核酸标准品便可实现对扩增模板进行绝对定量分析^[11]。新孢子虫 Nc2 和 Nc5 基因同被认为是诊断新孢子虫病的保守型基因^[12]。目前, 同时以 Nc2 和 Nc5 作为靶基因建立 Real-time PCR 检测方法验证的报道还较少。本研究根据犬新孢子虫 Nc2 基因设计特异性检测引物和 TaqMan-MGB 探针, 建立一种特异、灵敏、快捷的新孢子虫病 Real-time PCR 检测方法用于犬新孢子虫感染的早期诊断、流行病学监测和甄选感染早期的临床用药提供科学的技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床核酸样品

牛源性犬新孢子虫、弓形虫, 牛环形泰勒、牛巴贝斯和牛双芽巴贝斯等虫种新疆株阳性 DNA 均采自新疆巴州和静地区, 保存于新疆农业大学寄生虫实验室。

1.1.2 主要试剂

Premix Ex TaqTM (Probe qPCR)、TaKaRa

TaqTM、DL 2000 DNA Marker、Plasmid Purification Kit 等均购自宝生物工程(大连)有限公司; QuantStudioTM 3D Master Mix 购自美国 ABI 公司; pEASY-Blunt Zero Cloning Kit 购自北京 Trans 公司; SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.1.3 主要仪器

7500 Real-Time PCR System、QuantStudioTM 3D Digital PCR System、ProFlexTM Base PCR 仪等均购自美国 ABI 公司; Qsep 100 全自动单通道毛细管电泳分析仪购自中国台湾 Biotopic Inc 公司; NanoDrop 2000c Software Installation Guide 购自美国 Thermo 公司; JY 1600C 电泳仪购自北京君意东方电泳设备有限公司; G:BOX EF 全自动凝胶成像分析仪购自英国 SYNGENE 公司。

1.1.4 引物与探针

利用 Primer Express 3.0 和 Oligo 6.24 软件根据 GenBank 中发布的犬新孢子虫 Nc2 基因(登录号: U93870.1) 保守序列设计引物 Nc2 F/R 和 TaqMan-MGB 探针 Nc2 P, 探针 5' 端标记 FAM, 3' 端标记 MGB, 扩增 146 bp 的目的片段; 《新孢子虫病检疫技术规范》(SN/T 3499-2013)^[13] 根据 Nc5 基因序列设计引物 Np、Nr 和探针 NTpro, 探针 5' 端标记 FAM, 3' 端标记猝灭基团, 扩增 138 bp 的目的片段(表 1)。引物、探针由北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司合成。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增

Nc2 F/R 常规 PCR 反应体系为 25 μ L: 10 \times PCR Buffer(Mg²⁺ plus) 2.5 μ L, dNTP(2.5 mmol/L) 2 μ L, 上、下游引物(10 pmol/L) 各 1 μ L, Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 0.15 μ L, 模板 DNA 1.5 μ L, ddH₂O 补足体系。循环条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 35 次循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

1.2.2 重组质粒标准品的制备

回收、纯化 PCR 扩增片段连入 pEASY-Blunt Zero Clong Vector, 转入 Trans 1-T1 感受态细胞中, 经 Amp⁺/LB 培养基扩大培养后提取菌体质粒。并对重组质粒进行 PCR 鉴定, 将鉴定为阳性的重组质粒和克隆菌送至北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司进行测序, 测序结果与靶基因序列进行相似性比对。

表1 引物序列

Table 1 List of primers

靶基因 Target genes	引物序列(5'-3') Primer sequences	退火-延伸温度/℃ Annealing-Extension temperature	产物长度/bp Product length
Nc2	Nc2 F:TAGACGAATGTAAAGAACGCC	56	146
	Nc2 R:CAAATAGATGGTCTGTGCTGTC		
	Nc2 P:FAM-TTATTCGCCCGTGTTC-MGB		
Nc5	Np:GTGGTTTGTGGTTAGTCATTCG	57	138
	Nr:GCATAATCTCCCCGTCATCAG		
	NT _{pro} :FAM-CACGTTGAAATCAGCCTGCGTCAG-ECLIPSE		

1.2.3 优化 Real-time PCR 反应体系及循环条件

控制变量法优化 Real-time PCR 反应体系中的模板量(0.5~2.0 μL 进行优化,以 0.5 μL 为 1 个梯度);引物、探针量(工作浓度为 10 pmol/L,加入量为 0.5~1.5 μL ,以 0.5 μL 为 1 个梯度)。3D 数字 PCR 系统对阳性重组质粒(32.5 ng/ μL)的 10^{-6} 、 10^{-7} 和 10^{-8} 稀释进行扩增,以筛选最佳退火-延伸温度(55~65 $^{\circ}\text{C}$ 进行优化,以 1 $^{\circ}\text{C}$ 为 1 个梯度);延伸时间(35~60 s,以 5 s 为 1 个梯度);循环数(30~50 次循环,以 5 次循环为 1 个梯度)等参数。

1.2.4 Real-time PCR 标准曲线的建立及灵敏性试验

对该阳性重组质粒的 $10^0 \sim 10^{-9}$ 稀释的每一稀释度进行 Real-time PCR 扩增,建立标准曲线回归方程,并比较常规 PCR 和 Real-time PCR 的检测灵敏性。

1.2.5 特异性试验

运用优化的 Real-time PCR 反应条件分别扩增牛源性犬新孢子虫、弓形虫、牛环形泰勒、牛巴贝斯和牛双芽巴贝斯等虫种新疆株阳性 DNA,以评价其检测特异性。

1.2.6 稳定性试验

重复 3 次对 10^3 、 10^4 和 10^5 拷贝/ μL 稀释的重组质粒进行 Real-time PCR 扩增,每个浓度均设计 3 个平行,计算组内变异系数;重复 3 次组内扩增,计算组间变异系数,以评价其检测稳定性。

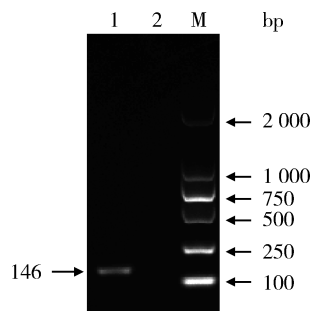
1.2.7 对比检测临床阳性样品

运用建立的 Real-time PCR 检测方法与中国出入境检验检疫行业标准^[13]共同对 46 份临床阳性样品进行检测,对比其检测符合率。

2 试验结果

2.1 常规 PCR 扩增结果

引物 Nc2 F/R 扩增 146 bp 的产物条带,与目的片段大小相符(图 1)。纯化的扩增产物经克隆、测序显示,片段序列与靶基因序列(登录号:U93870.1)的相似性为 100%(图 2)。NanoDrop 2000c 测得该阳性重组质粒的浓度为 7.23×10^9 拷贝/ μL 。



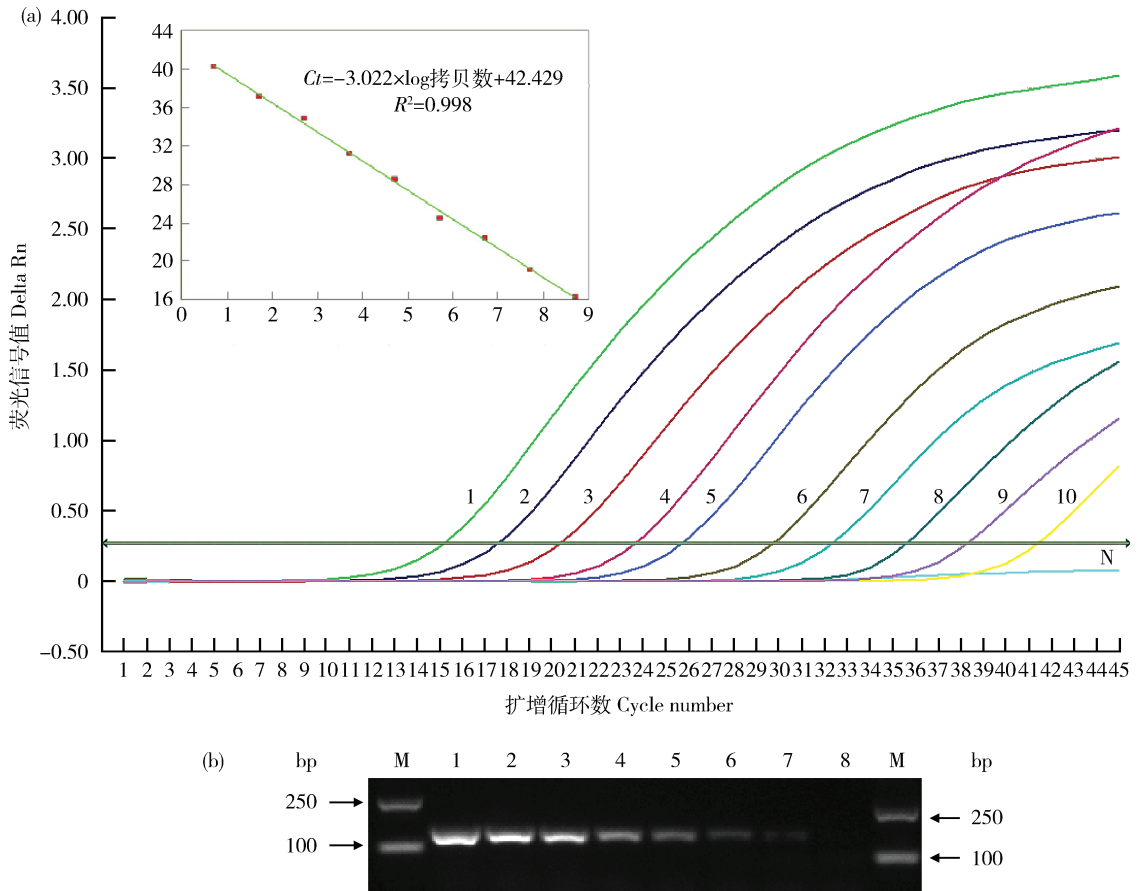
M, DL 2000 DNA Marker; 1, 阳性检测; 2, 阴性对照。
M, DL 2000 DNA marker; 1, positive test; 2, negative control.

图 1 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification results

2.2 Real-time PCR 反应体系及循环条件优化结果

3D 数字 PCR 扩增 10^{-6} 稀释模板的最佳退火-延伸温度为 58 $^{\circ}\text{C}$, 扩增结果呈明显的泊松分布曲线(图 3)。左图黄色区代表 ROX 涂布, 起本底指示的作用; 蓝色区代表各反应小室内发生阳性扩增的 FAM 信号。该芯片共有 18 262 个反应小室得到涂布, 其中 17 611 个发生了阳性扩增。结果表明该重组质粒 10^{-6} 稀释的浓度为 6.41×10^3 拷贝/ μL , 由此计算出该质粒的浓度为 6.41×10^9 拷贝/ μL 。



M; DL2000 DNA marker; 1~10, $6.41 \times 10^9 \sim 6.41 \times 10^0$ 拷贝/ μL 的稀释质粒; N, 阴性对照。

M; DL2000 DNA marker; 1~10, dilute the plasmid of $6.41 \times 10^9 \sim 6.41 \times 10^0$ copy/ μL ; N, negative control.

图4 Real-time PCR(a)与常规PCR(b)敏感性试验

Fig. 4 Sensitivity tests of Real-time PCR (a) and traditional PCR (b)

2.4 特异性试验结果

毛细管电泳仪对常规PCR产物进行分析显示,扩增产物仅出现与目的条带大小相符的单一吸收峰(图5(a))。毛细管电泳仪选择的Marker为0~1000 bp,当产物吸收峰高于Lower Marker激光频率值(RFU)时方可判定为有效扩增,且产物量与RFU值呈正相关。

同时对牛源性犬新孢子虫、弓形虫、牛环形泰勒、牛巴贝斯和牛双芽巴贝斯等虫种新疆株阳性DNA进行Real-time PCR扩增,仅新孢子虫阳性DNA出现了扩增曲线,表明该方法的特异性良好,(图5(b))。

2.5 稳定性试验结果

重复对 $6.41 \times 10^3 \sim 6.41 \times 10^5$ 拷贝/ μL 稀释的重组质粒进行Real-time PCR扩增,结果显示:组内重复性试验平均变异系数为1.108%,组间平均变异系数为2.732%。各试验组变异系数均小于5%,证明建立的Real-time PCR检测方法具有很好

的稳定性(表2)。

2.6 临床样品检测结果

本研究建立的新孢子虫病Real-time PCR检测方法,与检验检疫行业标准的检测符合率为100%(46/46),证明该方法与检验检疫标准的检测准确性相一致。

3 讨论与结论

新孢子虫病作为多种家畜共患的一种繁殖障碍性寄生虫病,给畜牧业生产造成了巨大的经济损失。目前还没有可用于防治的特效疫苗和有效药物,准确、快速的检测方法结合严格的隔离、淘汰措施是综合防控的关键^[14]。

与常规PCR检测技术相比,Real-time PCR检测方法更特异、灵敏、准确,已被广泛运用于各种病原的检测。与Real-time PCR检测方法的其他探针相比较,TaqMan-MGB探针连接了MGB修饰基

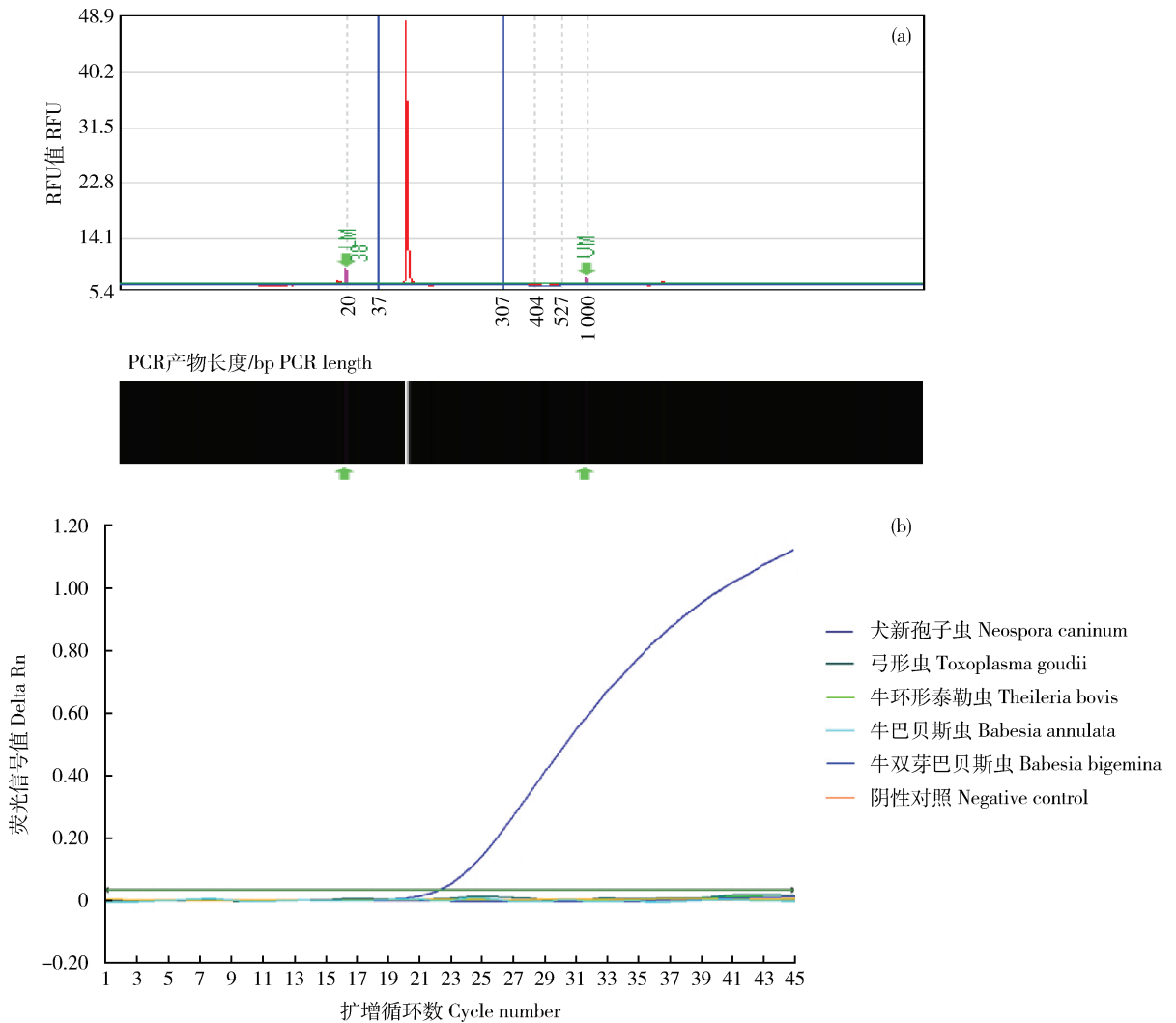


图 5 常规 PCR 和 Real-time PCR 特异性试验结果
 Fig. 5 Results of specificity test by PCR and Real-time PCR

表 2 稳定性试验结果
 Table 2 Stability test results of Real-time PCR

模板浓度/ (copies/ μ L) Concentration	组内 Intra-assay				组间 Inter-assay			
	平行数 No. Parallel	平均数 \bar{x}	标准差 S	变异 系数/% C.V	重复数 Repeats	平均数 \bar{x}	标准差 S	变异 系数/% C.V
6.41×10^3	3	31.71	0.306	0.965	3	31.53	0.682	2.164
6.41×10^4	3	28.84	0.295	1.024	3	28.69	0.732	2.552
6.41×10^5	3	25.84	0.345	1.335	3	26.03	0.905	3.479

(Minor Groove Binder) 和非荧光猝灭基 (Non-fluorescent Quencher), 探针自身不产生荧光, 避免了非特异性荧光信号的干扰; 此外, MGB 修饰基将探针 Tm 值提升约 10 °C, 有效提高了检测特异

性^[15]。数字 PCR 不依赖扩增曲线的循环阈值 (Ct 值) 和扩增效率的影响, 便可实现对扩增模板进行绝对定量分析, 具有很好的准确度和重现性, 在疫病的早期诊断中具有很好的应用前景^[16]。

本试验根据犬新孢子虫 *Nc2* 基因保守序列设计检测引物和 *TaqMan*-MGB 探针,通过灵敏性、特异性、稳定性和对比检测等试验探究,最终建立了新孢子虫病 Real-time PCR 检测方法。经 3D 数字 PCR 系统分析,该方法的最低有效检测量为 6.41 拷贝/ μL ,灵敏性是常规 PCR 检测的 1 000 倍;检测效果与检验检疫标准相一致,检测符合率为 100%。

综上所述,本试验建立的新孢子虫病 Real-time PCR 检测方法特异、灵敏、快捷、准确,为诊断犬新孢子虫早期感染和流行病学监控“带虫宿主”提供了切实可行的技术支持。

参 考 文 献

- [1] Dubey J P, Carpenter J L, Speer C A, Topper M J, Uggla A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs[J]. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1988, 192(9):1269-1285
- [2] Dubey J P. *Neosporosis* in cattle; biology and economic impact [J]. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1999, 214(8):1160-1163
- [3] Gondim L F, Mcallister M M, Pitt W C, Zemlicka D E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*[J]. *International Journal for Parasitology*, 2004, 34(2):159-161
- [4] Jenkins M, Baszler T, Bjorkman C, Schares G, Williams D. Diagnosis and Seroepidemiology of *Neospora caninum* associated bovine abortion [J]. *International Journal for Parasitology*, 2002, 32(5):631-636
- [5] Cramer G, Kelton D, Duffield T F, Hobson J C, Lissemore K, Hietala S K, Peregrine A S. *Neospora caninum* serostatus and culling of Holstein cattle[J]. *American Veterinary Medical Association Journal*, 2002, 221(8):1165-1168
- [6] 刘群, 李博, 齐长明, 朱引洁. 奶牛新孢子虫病血清学检测初报[J]. 中国兽医杂志, 2003, 39(2):8-9
- Liu Q, Li B, Qi C, Zhu Y. Preliminary report of *Neosporosis* serology in cow[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2003, 39(2):8-9 (in Chinese)
- [7] Chahan B, Gaturaga I, Huang X, Liao M, Fukumoto S, Hirata H, Nishikawa Y, Suzuki H, Sugimoto C, Nagasawa H, Fujisaki K, Igarashi I, Mikami T, Xuan X. Serodiagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle by enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant truncated *NcSAG1* [J]. *Veterinary Parasitology*, 2003, 118:177-185
- [8] 李佳, 张杨, 王振宝, 李永畅, 巴音查汗. 马泰勒虫荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2014, 36(9):720-722
- Li J, Zhang Y, Wang Z, Li Y, Chahan B. Establishment of *TaqMan* based real-time PCR assay for detection of *Theileria equi*[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2014, 36(9):720-722(in Chinese)
- [9] Feng Y, Yang T, Xu Q, Sun E, Li J, Lv S, Wang H, Zhang Q, Zhang J, Wu D. Detection, discrimination and quantitation of 22 bluetongue virus serotypes using real-time RT-PCR with *TaqmanMGB* probes[J]. *Archives of Virology*, 2015, 160(9):2249-2258
- [10] 李亮, 隋志伟, 王晶, 臧超, 余笑波. 基于数字 PCR 的单分子 DNA 定量技术研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2012, 39(10):1017-1023
- Li L, Sui Z, Wang J, Zang C, Yu X. Progress of digital PCR for single DNA quantification[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2012, 39(10):1017-1023 (in Chinese)
- [11] Bosman K J, Nijhuis M, Van Ham P M, Wensing A M, Vervisch K, Vandekerckhove L, De Spiegelaere W. Comparison of digital PCR platforms and semi-nested qPCR as a tool to determine the size of the HIV reservoir [J]. *Scientific Reports*, 2015, 9(5):621-628
- [12] Nishikawa Y, Tragoolpua K, Makala L, Xuan X, Nagasawa H. *Neospora caninum* *NcSRS2* is transmembrane protein that contains a glycosylphosphatidylinositol anchor insect cells[J]. *Veterinary Parasitology*, 2002, 109:191-201
- [13] SN/T 3499-2013. 新孢子虫病检疫技术规范[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013
- SN/T 3499-2013. Quarantine protocol for *Neosporosis* [S]. Beijing: China Standard Publishing House, 2013 (in Chinese)
- [14] 闫双, 陈千林, 郭庆勇, 王真, 张玉婷, 巴音查汗. 用重组抗原与商品化试剂盒对比检测牦牛的新孢子虫与弓形虫感染[J]. 中国动物传染病学报, 2013, 21(1):71-74
- Yan S, Chen Q, Guo Q, Wang Z, Zhang Y, Chahan B. Detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in yaks using in-house relisa and commercial elisa[J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Disease*, 2013, 21(1):71-74 (in Chinese)
- [15] Lew A E, Bock R E, Molloy J B, Minchin C M, Robinson S J, Steer P. Sensitive and specific detection of proviral bovine leukemia virus by 5' *Taq* nuclease PCR using a 3' minor groove binder fluorogenic probe[J]. *Journal of Virological Methods*, 2004, 115(2):167-175
- [16] 林彩琴, 姚波. 数字 PCR 进展[J]. 化学进展, 2012, 24(12):2415-2423
- Lin C, Yao B. Recent advance in digital PCR[J]. *Progress in Chemistry*, 2012, 24(12):2415-2423 (in Chinese)