鸡 ILV、IBV、NDV 和 AIV 多重 RT-PCR 检测方法的初步建立

王 非[1,2],蒋建一[3],华炯刚[2],母安雄[3],云 涛[2],王桂军[1],魏建忠[1],刘光清[2]

(1 安徽农业大学 动物科技学院,安徽 合肥 230036;2 浙江农业科学院 病毒学与生物技术研究所,浙江 杭州 310021;3 杭州市畜牧兽医总站,浙江 杭州 310021)

[摘 要] 初步建立了鸡传染性喉气管炎(IL)、鸡传染性支气管炎(IB)、新城疫(ND)和禽流感(AI)的多重 RT-PCR 鉴别诊断方法,并对其特异性和敏感性进行了检测。结果表明,所设计的 4 对引物可对同一样品中的 ILV、IBV、NDV 和 AIV 进行特异性扩增,所扩增的目的片断的长度分别为 620 bp(ILV)、445 bp(IBV)、344 bp(NDV)和 240 bp(AIV);建立的 RT-PCR 检测方法能够检测出 10 pg AIV、1 ng NDV 和 10 ng IBV 的 RNA 及 100 pg ILV 的 DNA,说明该检测方法特异性强,敏感性较高。本研究所建立的多重 RT-PCR 方法可用于上述鸡 4 种病毒性呼吸道疾病的快速鉴别诊断,在临床诊断和流行病学调查方面具有较好的应用前景。

[关键词] 多重 PCR;鸡传染性喉气管炎;鸡传染性支气管炎;鸡新城疫;禽流感;鉴别诊断

[中国分类号] S858.312.65 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2007)04-0037-04

Initial establishment of multiple RT-PCR for detecting ILV、IBV、NDV and AIV

WANG Fei[1,2], JIANG Jian-yi[3], HUA Jiong-gang[2], MU An-xiong[3], YUN Tao[2], WANG Gui-jun[1], WEI Jian-zhong[1], LIU Guang-qing[2]

(1 *College of Animal Science and Technology, Anhui Agriculture University, Hefei, Anhui* 230036, *China*;
2 *Institute of Virology and Biotechnology, Zhejiang Academy of Agriculture Sciences, HangZhou, Zhejiang* 310021, *China*;
3 *Workstation of Veterinary of Hangzhou City, Hangzhou, Zhejiang* 310021, *China*)

Abstract: A multi-PCR technology for IL, IB, ND and AI identity ans diagnosis has been constructed. And its specificity and sensitivity have also been tested. The results show that ILV, IBV, NDV and AIV could be detected in one tube synchronously. The length of each specific product amplified by multi-PCR is 620 bp (ILV), 445 bp (IBV), 344 bp (NDV), and 240 bp (AIV), respectively. RNA contained in 10 pg AIV, 1 ng NDV and 10 ng IBV and DNA contained in 100 pg ILV also can be tested by RT-PCR, which demonstrates that the method has better specificity and sensitivity. In a word, we have constructed an efficient multi-PCR method for diagnosing and contyocing the above four virus respiratory diseases.

Key words: multiplex PCR; infectious laryngotracheitis virus; infectious bronchitis virus; newcastle diseases virus; avin infectious virus; identity and diagnosis

鸡传染性喉气管炎(Infectious laryngotrache- itis, IL)、鸡传染性支气管炎(Infectious bronchitis,

[收稿日期] 2006-03-07
[基金项目] 杭州市科技局项目(20051332B26)
[作者简介] 王 非(1980—),男,安徽宿州人,在读硕士,主要从事动物病毒分子生物学研究。
[通讯作者] 刘光清(1968—),男,安徽砀山人,副研究员,博士,主要从事动物病毒分子生物学研究。

© 1994-2007 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

IB)、鸡新城疫(Newcastle disease, ND)和禽流感(Avian influenza, AI)是一类在临床上有共同的呼吸道症状、均可给养鸡业造成重大经济损失的病毒性呼吸道疾病。在临床中常表现为两种或两种以上病原混合感染,很难防治。常规的诊断方法是病原分离鉴定和血清学方法,但这些方法存在敏感性低、特异性差,操作费时费力等局限性。因此,建立一种针对IL、IB、ND和AI的快速、特异、敏感的分子流行病学检测方法具有重要意义。多重PCR技术是近年来发展起来的一种可用于多种病原体检测的PCR技术,不仅具有特异性强、敏感性高的特点,而且能在较短时间内同时完成若干种病原的检测,尤其适合于临床上一些容易混淆又常常混合感染的疾病的鉴别诊断[1-3]。韦平等[4]建立了三重PCR快速鉴别诊断鸡肿瘤病的方法。谢芝勋等[5]和邓显文等[6]建立了应用多重PCR检测NDV、IBV、ILV的方法。为了满足对鸡IL病毒(ILV)、IB病毒(IBV)、ND病毒(NDV)和AI病毒(AIV)进行快速鉴别诊断的需要,本研究建立一种可用于上述4种病毒性呼吸道疾病的多重RT-PCR诊断方法,以为快速鉴别诊断鸡呼吸道病毒病奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 毒 株 NDV Lasota株、IBV H120疫苗株、ILV K317疫苗株、番鸭呼肠孤病毒(ARV)、禽减蛋综合症病毒(EDSV)和鸡法氏囊病毒(IBDV)均由浙江农业科学院病毒学与生物技术实验室提供,H5型AIV毒株由浙江省疾病控制中心提供。

1.1.2 主要试剂 UNIQ-10柱式Trizol总RNA抽提试剂盒购自上海生物工程有限公司,MiniBEST viral RNA/DNA Extraction Kit Ver3.0、rTaq DNA聚合酶、禽源反转录酶(AMV)、dNTP(2.5 mmol/L)、RNA酶抑制剂和DNA Marker均购自宝生物工程有限公司。

1.1.3 引 物 根据GenBank已发表的ILV(登录号为DQ8I2546)、NDV(登录号:DQ904250)、IBV(登录号:AY363965)、AIV(登录号:CY014480)毒株的序列,用Oligo 4.0软件设计了4对特异引物(表1)。引物由北京奥科生物技术有限责任公司合成。

1.2 4种病毒基因组的抽提

按照UNIQ-10柱式Trizol总RNA抽提试剂盒说明方法,提取NDV、IBV和AIV的总RNA。ILV基因组DNA按MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit说明方法进行提取。NDV、IBV和AIV的RNA立即进行下述反转录合成cDNA,ILV DNA置-20 ℃保存备用。

表1 ILV、NDV、BV和AIV基因扩增引物核苷酸序列

Table 1 The nucleotide sequence of primer for ILV, NDV, IBV, AIV

病毒 Virus	引物序列 Primer sequence	预期扩增产物大小/bp Size of expected product
ILV	F:5′-CCT GAT CCC ATC TAC CCT ATC-3′	618
	R:5′-TAG CCT GTA GAT ATT CCA CAA-3′	
NDV	F:5′-TTG ATG GCA GGC CTC TTG C-3′	344
	R:5′-GGA GGA TGT TGG CAG CAT T-3′	
IBV	F:5′-TGG ATA GTG TGG GTT GCT G-3′	445
	R:5′-CCA TCC TTA ATA CCT TCC TC-3′	
AIV	F:5′-ACA TGG AAG CAA TGG ACT CC-3′	240
	R:5′-ATA TCT TCT GGT CTG GCA CT-3′	

1.3 IBV、NDV和AIV基因组cDNA的合成

取上述抽提的NDV、IBV和AIV的RNA样品各4 μL,分别加入5×RT buffer 5 μL,dNTP(10 mmol/L) 2 μL,AMV (5 U/μL) 2 μL,Rnasin(40 U) 0.5 μL、50 pmol/μL随机引物1 μL,最后加DEPC水至25 μL,混匀后室温放置10 min,42 ℃水浴1 h后置冰中2 min终止反转录,所得cDNA直接用于PCR或置-20 ℃保存备用。

1.4 多重RT-PCR最佳反应条件的确定

将抽提的ILV基因组DNA和NDV、IBV、AIV的cDNA混合作为多重RT-PCR的模板,在不同引物比例、Mg^{2+}浓度及退火温度条件下进行PCR反应,以确定最佳PCR反应条件。

1.5 多重RT-PCR的特异性试验

用1.4节确定的最佳PCR反应条件,分别对ILV、NDV、IBV、AIV、IBDV、ARV和EDSV基因组进行扩增,以检测多重RT-PCR方法的特异性。

1.6 多重RT-PCR的敏感性试验

使用GENE QUANT核酸定量仪测定NDV、AIV、IBV基因组抽提物中的RNA含量和ILV基因组抽提物中的DNA含量。然后将核酸作10倍梯度稀释,采用1.4节优化的多重RT-PCR反应条件分别对上述RNA模板进行cDNA合成,之后加入ILV的DNA模板进行多重RT-PCR扩增,以检测建立的多重RT-PCR的敏感性。

1.7 多重RT-PCR产物的鉴定

取8 μL多重PCR产物与2 μL Loading buffer混合,在1.5 g/L的琼脂糖凝胶上以90 V/cm电压进行电泳,置凝胶紫外成像系统观察并拍照,分析结

© 1994-2007 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

果。

2　结果与分析

2.1　多重 RT- PCR 的最佳反应条件

筛选出的最佳的 PCR 扩增体系为：10×PCR 缓冲 3 μL，dNTP(2.5 mmol/L)4 μL，上、下游引物用量为：ILV 30 pmol/μL，IBV 25 pmol/μL，NDV 12.5 pmol/μL，AIV 10 pmol/μL，$MgCl_2$(25 mmol/L) 2 μL，rTaq(5 U/μL)0.35 μL，cDNA/DNA 混合模板 2.5 μL，DNA 2.0 μL，用超纯水补充至 30 μL。

最佳 PCR 循环参数：94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 1 min，50 ℃退火 1 min，72 ℃延伸 1 min，共 30 个循环；最后于 72 ℃延伸 10 min。

2.2　多重 RT-PCR 的特异性

采用建立的 PCR 方法对 ILV、IBV、NDV 和 AIV 核酸及其他对照毒株在同等条件下扩增。结果显示，ILV、IBV、NDV 和 AIV 的 PCR 产物的片断长度分别为 618，445，344 和 240 bp，与预期长度一致，而 IBDV、ARV、EDSV 的核酸不能扩增出任何条带(图 1)，说明本研究建立的多重 RT-PCR 方法特异性强。

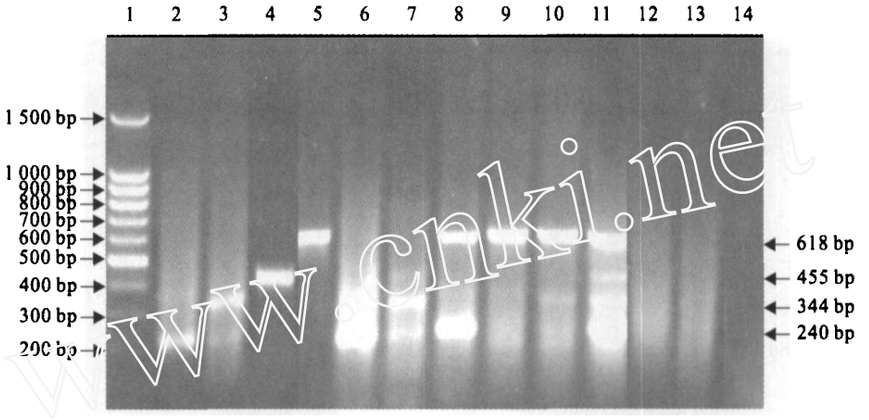

图 1　多重 RT-PCR 扩增产物的电泳结果

Fig. 1　Result of specific products amplified by multiplex PCR

1. DNA Marker; 2. AIV; 3. NDV; 4. IBV; 5. ILV; 6. AIV+NDV; 7. IBV+NDV; 8. ILV+AIV; 9. ILV+AIV; 10. ILV+NDV+AIV; 11. ILV+NDV+IBV+AIV; 12. ARV; 13. EDSV; 14. IBDV

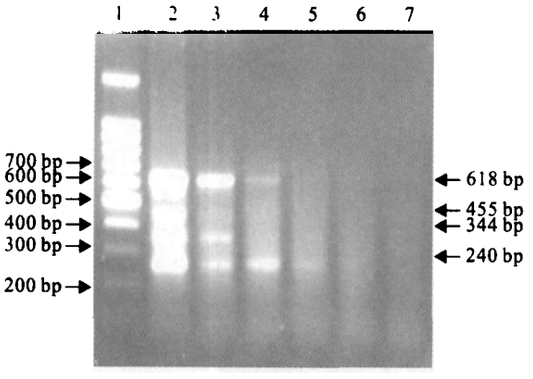

图 2　多重 RT-PCR 敏感性的检验结果

Fig. 2　Result of sensitivity detection of multiplex PCR

1. Marker; 2. 10 ng ILV, 10 ng IBV, 10 ng NDV, 10 ng AIV; 3. 1 ng ILV, 1 ng IBV, 1 ng NDV, 1 ng AIV; 4. 100 pg ILV, 100 pg IBV, 100 pg NDV, 100 pg AIV; 5. 10 pg ILV, 10 pg IBV, 10 pg NDV, 10 pg AIV; 6. 1 pg ILV, 1 pg IBV, 1 pg NDV, 1 pg AIV; 7. 100 fg ILV, 100 fg IBV, 100 fg NDV, 100 fg AIV;

2.3　多重 RT-PCR 的敏感性

结果显示，用 10 pg AIV，1 ng NDV 和 10 ng IBV 的 RNA 及 100 pg ILV 的 DNA 可以扩增出特异性条带(图 2)，表明该多重 RT-PCR 系统敏感性强。

3　讨　论

本试验建立了可对 ILV、IBV、NDV 和 AIV 4 种禽病毒性呼吸道疾病进行鉴别诊断的多重 RT-PCR 技术，从病毒核酸的抽提到确定结果仅需要 5 h 左右，与常规检测技术相比，不仅大大缩短了检测时间，而且节约人力、物力，提高了工作效率，为疫情的快速诊断提供了一个较好的方法，有利于及时制定应对紧急疫情的措施[7-8]。值得注意的是，有些鸡场在免疫接种时可能会使用弱毒苗防控疾病，如 ND Ⅰ系苗、鸡传喉弱毒疫苗等。由于弱毒疫苗株在宿主体内的复制，有可能造成多重 RT-PCR 出现假阳性结果，对疫情的准确判定造成影响[9-10]。事实

© 1994-2007 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

上,这也是许多畜禽传染病流行病学调查的一个难题。因此,在该技术使用时应该紧密结合流行病学调查资料和其他免疫指标,以达到对疫情的正确判断。

与常规单一PCR技术相比,建立多重RT-PCR技术的关键在于以下几个方面:(1)设计特异性引物,尽量避免引物二聚体的产生,防止因引物与不同模板之间的非特异性结合而造成非特异性扩增,干扰结果的判定。另外,为使各片段得到最佳扩增,还要适当调整各引物的使用浓度。本试验中,ILV、IBV、NDV、AIV 4种病原的扩增产物大小分别为620,445,344和240 bp,其相应的引物使用浓度分别为30,25,12.5和10 pmol/L,表明扩增片段的长度与引物的浓度成正比,即扩增片段愈长所需引物量愈大。(2)反复优化多重PCR的反应参数,尤其要注意PCR反应的退火温度要足够高,因为多重RT-PCR反应体系中有多对引物,退火温度过低往往会导致非特异性扩增产物出现,提高退火温度则可有效减少非特异性扩增产物的生成。另外循环次数应尽量少,以利于检测扩增产物,循环次数增加会导致非特异性扩增的机率增大。(3)在多重RT-PCR反应体系中要加入多种模板,其扩增效率并不完全相同,常常是片段较小的优先扩增,因此模板的使用量要多次试验,反复优化,以找出其最佳比例,保证各个目的条带都能得到很好的扩增。因此,在多重RT-PCR反应体系中,选择适当引物浓度,是确保多重RT-PCR成功的关键因素之一。

[参考文献]

[1] 余丽芸,刘建柱,侯喜林.多重PCR检测猪瘟病毒、猪细小病毒和猪伪狂犬病病毒的研究[J].动物医学进展,2004,25(6):75-77.

[2] Paula B M S,Cristiane D,Luiz S,et al. Standardization of a duplex RT-PCR for the detection of Influenza A and Newcastle disease viruses in migratory birds[J]. Journal of Virological Methods,2005,123:125-130.

[3] Sung G K,Edward J D. A novel simple one-step single-tube RT-duplex PCR method with an internal control for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk,blood,and follicular fluid samples[J]. Biologicals,2003,31:103-106.

[4] 韦 平,何秀苗,王桂军.鸡肿瘤病快速鉴别诊断技术的建立[J].扬州大学学报:农业与生命科学版,2002,2(32):1-5.

[5] 谢芝勋,谢志勤,庞耀珊,等.应用三重聚合酶链反应同时检测鉴别鸡3种病毒性呼吸道传染病的研究[J].中国兽医科技,2001,31(1):11-14.

[6] 邓显文,谢芝勋,谢志勤,等.应用多重聚合酶链反应检测四种霉形体的研究[J].中国兽医科技,2003,33(6):14-17.

[7] 王桂军,韦 平,李康然,等.PCR和核酸探针技术诊断MD和RE的比较研究[J].中国预防兽医报,2003,25(6):479-481.

[8] 韦 平,何秀苗,王桂军,等.鸡肿瘤病快速鉴别诊断试剂盒及其应用研究[J].广西科学,2005,12(1):62-67.

[9] 谢芝勋,邓显文,谢志勤,等.多重聚合酶链反应快速检测鉴别鸡毒支原体强毒株和弱毒疫苗株的研究[J].中国预防兽医学,2003,25(6):476-479.

[10] 刘丽娜,何启盖,陈焕春,等.用多重PCR鉴别猪伪狂犬病野毒与疫苗毒的研究[J].中国兽医科技,2005,35(2):95-98.

(上接第36页)

[12] 王宏俊,陈福勇.利用IBV重组N蛋白建立ELISA抗体检测试剂盒的研究[J].中国兽医杂志,2003,39(9):3-6.

[13] 杜恩岐,刘胜旺,孔宪刚,等.鸡传染性支气管炎病毒核蛋白基因在大肠杆菌中的表达及抗原性初步研究[J].病毒学报,2003,19(4):342-347.

[14] Van M Y,Snijder E J,Dobbe J C,et al. Localization of mouse hepatitis virus nonstructural proteins and RNA synthesis indicates a role for late endosomes in viral replication[J]. J Virol,1999,73:7641-7657.

[15] Denison M R,Spaan W J,Vander M Y,et al. The putative helicase of the coronavirus mouse hepatitis virus is processed from the replicase gene polyprotein and localizes in complexes that are active in viral RNA synthesis[J]. J Virol,1999,73:6862-6871.

[16] Seah J N,Yu L,Kwang J. Localization of linear Bcell epitopes on infectious bronchitis virus nucleocapsid protein[J]. Veter Microbiol. 2000,75:11-16.

© 1994-2007 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net