

一步法多重 RT-PCR 禽流感病毒分型 诊断法的建立与应用

吕长荣^{1,2}, 乔海莲¹, 杨增岐¹, 陈 杰², 顾节清^{1,2}, 李晓成²

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 农业部动物检疫所国家动物流行病学研究中心, 山东 青岛 266032)

[摘 要] 根据禽流感病毒(AIV)的 *M* 基因序列设计合成了 1 对 AIV *M* 基因的通用诊断引物 AMD1/AMD2, 针对 H5N1、H9N2 两种亚型的 *HA* 基因分型设计合成了 2 对分型诊断引物 H5D1/H5D2, H9D1/H9D2。采用一步法多重 RT-PCR 技术建立了一种禽流感病毒快速分型诊断方法, 并对其特异性和灵敏度进行验证。结果表明, 该诊断方法速度快, 一般只需要 28~30 h 即可鉴定出结果, 比病毒分离鉴定(5~7 d)至少缩短 4~6 d; 特异性强, 试验组 53 株 AIV 全部扩增出与预期同样长度的目的条带, 与病毒分离及血清学鉴定方法的检测结果完全一致。对照组中新城疫病毒(NDV)、减蛋综合征病毒(EDS76V)、传染性支气管炎病毒(IBV)均未扩增出特异性基因条带, 灵敏度高, 试验组将 AIV 接种 SPF 鸡胚, 培养后的鸡胚尿囊液(AAF)进行 10^{-2} 稀释后, 仍可以检测到其中的 AIV。

[关键词] 禽流感病毒; *M* 基因; *HA* 基因; RT-PCR; 诊断方法

[中图分类号] S852.65+9.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)04-0063-05

Establishment and application of single-step multiplex RT-PCR for avian Influenza virus type and subtype detection

LV Chang-rong^{1,2}, QIAO Hai-lian¹, YANG Zeng-qi¹, CHEN Jie²,
GU Jie-qing^{1,2}, LI Xiao-cheng²

(1 College of Animal Science and Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 National Center of Animal Epizootiology, Institution of Animal Quarantine, Department of Agriculture, Qingdao, Shandong 266032, China)

Abstract: The pair of primer AMD1 and AMD2 were designed based on the strongly conservative region of the avian influenza virus(AIV) *M* gene, which hold specific property of A type AIV. The different subtype diagnosis primers H5D1/H5D2, and H9D1/H9D2 were respectively designed based on the *HA* gene of H5N1 and H9N2 subtype AIV. The single-step RT-PCR was established with three pairs of primers. The method of specificity and sensitivity were verified. The results showed that the specific electrophoresis stripes were 380 bp length for *M* gene, 431 bp length for *H5A* gene and 387 bp length for *H9A* gene by RT-PCR with the three sets of primers. The PCR products showed the same length with the expected one. But the controlled NDV, EDS76V, IBV were not amplified by the RT-PCR. The shortest time of diagnosis was 28 hours, which was much shorter than other AIV diagnosis methods. The AIV could also be detected after those allantoic-amniotic fluid (AAF) were diluted 100 times. Fifty-three AIV and fifty samples were detected successfully, which were completely consistent with the results tested by serum methods. So the AIV detection via RT-PCR is very specific, sensitive, safe and time-saving. Thus this RT-PCR method

[收稿日期] 2006-03-27

[基金项目] 国家科技攻关项目(2002BA514A-15-3)

[作者简介] 吕长荣(1972—), 男, 陕西三原人, 讲师, 在读博士, 主要从事分子病毒学和动物疫病防治研究。

is suited for application of AIV diagnosis in common laboratories.

Key words; Avian Influenza Virus; *M* gene; *HA* gene; RT-PCR; diagnosis

禽流感(Avian Influenza, AI)是由正粘病毒科流感病毒属的特定 A 型流感病毒(Avian Influenza Virus, AIV)引起的一种家禽和野禽烈性传染病^[1]。家禽、水禽以及野鸟、海鸟、人等多种动物均可感染发病。世界动物卫生组织(OIE)将其划归为 A 类传染病,我国也将其列为一类动物疫病^[2]。根据 AIV 表面抗原血凝素(Hemagglutinin, HA)与神经氨酸酶(Neuraminidase, NA)的不同,可将病毒划分为不同的亚型,如 H5N1, H9N2。自从 1994 年我国首次分离到禽流感病毒以来,已经证实我国 AIV 主要有 H5N1 和 H9N2 两个亚型^[3-7]。禽流感病毒亚型众多,各亚型之间无交叉免疫保护性,而且毒株抗原变异极快,在很短时间内会由非致病性毒株或低致病性毒株变异为高致病性毒株。目前,禽流感的诊断主要依靠病毒分离、血凝试验与血凝抑制试验进行。由于禽流感病毒分离所需要的实验室条件非常严格,普通实验室很难达到要求,而且诊断时间较长,病毒分离与鉴定一般需要 5~7 d 才能完成,这种诊断方法已经不能满足 AI 的快速诊断和迅速扑灭疫情的需要。为了建立一种快速 AIV 的诊断方法,本试验依据 AIV 型特异性抗原基因 *M*, 设计合成了一对 A 型 AIV 通用诊断引物 AMD1 和 AMD2;再根据血凝素基因 *HA* 分别设计合成了 H5N1 和 H9N2 两个亚型分型诊断引物,通过巧妙调整 3 对引物的退火温度,使 3 个 PCR 反应在同一循环参数下同时完成,大大缩短了反应时间,加快禽流感的诊断速度,为禽流感的快速诊断奠定了基础。

表 1 不同亚型禽流感病毒的 PCR 引物

Table 1 Primers of PCR in different subtypes of AIVs

引物名称 Abbreviation	引物序列 Primer	预期扩增片断长度/bp Length of amplier	位置/nt Location	作用 Function
AMD1	5-AGGTCGAAACGTACGTTCT-3'	380	41~59	RT, PCR
AMD2	5-TATATGAGACCCATGCAACT-3'		401~420	PCR
H5D1	5-ATGGAGTTCTTCTGGACAAT-3'	431	724~743	RT, PCR
H5D2	5-ATTCTTTGTCTGCAGCGTAT-3'		1136~1155	PCR
H9D1	5-ATTGATCATGAGTTCAGCGA-3'	378	1241~1260	RT, PCR
H9D2	5-CATTGCAATCACAAGAGATG-3'		1600~1619	PCR

注: D1 表示上游诊断引物, D2 表示下游诊断引物。

Note: Forward diagnostic primer was represented by D1, Reverse diagnostic primer was represented by D2.

1.2 AIV 的增殖

将 H5N1、H9N2、NDV、EDS76V 和 IBV 的鸡胚尿囊液(AAF)做 10 倍稀释后,分别接种 9~10 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔,每枚鸡胚接种 0.2 mL, 37℃ 培

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 禽流感病毒株及对照毒株 禽流感病毒是农业部动物检疫所国家动物流行病学研究中心实验室鉴定保存的 H5N1 和 H9N2 亚型毒株^[8-9], 经过 SPF 鸡胚增毒后, -20℃ 保存备用;对照毒株鸡新城疫病毒(NDV)、减蛋综合征病毒(EDS76V)和传染性支气管炎病毒(IBV)均由农业部动物检疫所国家动物流行病学研究中心实验室提供。

1.1.2 主要试剂 TRIzolR LS Reagent RNA 提取试剂为美国 Invitrogen 公司产品; AccessQuick™ RT-PCR System 为 Promega 公司产品; DNA Marker DL2000 购自宝生物工程(大连)有限公司。其余试剂均为国产或进口分析纯级。

1.1.3 引物 参考 A/Chicken/Brescia/1902(H7N7)、A/FPV/Dobson/(H7N7) 和 A/FPV/Weybridge(H7N1)3 株禽流感病毒的 *M* 基因序列^[10] 设计 1 对 *M* 基因通用诊断引物 AMD1/AMD2; 参考 A/Chicken/Beijing/96(H9N2)的 *HA* 基因序列^[11], 设计 H9 亚型的分型诊断引物 H9D1/H9D2; 参考 A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1)、A/Goose/Guangdong/3/96(H5N1)和 A/HongKong/156/97(H5N1)的 *HA* 基因序列^[12], 设计 H5 亚型的分型诊断引物 H5D1/H5D2。各引物的序列、预期扩增长度、在参考序列中的位置以及作用见表 1。3 对引物均有宝生物工程(大连)有限公司合成。

养。收集 24~72 h 死亡鸡胚 AAF, 于 4℃ 下 3 000 g 离心 30 min 后, 取上清液提取病毒总 RNA。

1.3 AIV RNA 的提取

按照 TRIzolR LS Reagent 试剂说明书提取禽

流感病毒总 RNA,每个病毒样品同时提取 3 份。

1.4 AIV RNA 的一步法多重 RT-PCR 扩增

在预先用 DEPC 水处理的 Eppendorf 管或薄壁 PCR 管中加模板 RNA 10 μL, AccessQuick™-Master Mixture (2 ×) 12.5 μL, 上、下游引物 (25 pmol/μL) 各 1 μL, AMV RTase (5 U/μL) 0.5 μL。轻轻混匀盖紧盖子后, 瞬时离心混匀。按照以下参数进行循环: 42 °C 反转录 45 min; 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 共循环 30 次; 然后 72 °C 再延伸 5 min。取 7~10 μL RT-PCR 产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶中电泳, 并在凝胶成像系统中观察照相。同时设阳性对照。

1.5 一步法多重 RT-PCR AIV 分型诊断方法的特异性试验

应用与 1.4 节相同的方法处理 NDV、EDS76V 和 IBV, 按照上述循环参数进行 RT-PCR, 取 7 μL 产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶中电泳, 分析结果。

1.6 一步法多重 RT-PCR AIV 分型诊断方法的灵敏度试验

将用于试验的禽流感病毒鸡胚 AAF, 作 10 倍连续稀释, 再提取病毒总 RNA 进行 RT-PCR, 产物

在 10 g/L 琼脂糖凝胶中电泳分析。

1.7 一步法多重 RT-PCR AIV 分型诊断方法的应用

AIV 的 RT-PCR 分型诊断方法建立后, 除对受试的 53 株 AIV 进行验证外^[8], 还对 2004 年送检的 2 393 份可疑 AIV 病料样品进行了检测^[9]。本试验在农业部动物检疫所国家动物流行病学研究中心的 P3 实验室完成, 符合生物安全的相关要求。

2 结果与分析

2.1 AIV 特异性 PCR 产物的鉴定结果

由图 1 可知, 所设计合成的 M 基因上、下游引物可扩增出 380 bp 的特异性单一条带, 与预期长度一致。而且 H5N1 与 H9N2 两种亚型 AIV 的 M 基因扩增结果完全一致, 说明本试验所设计合成的 M 基因 PCR 扩增引物具有很强的兼容性, 可用于 AIV 型特异性的鉴定。利用 H5D1 和 H5D2、H9D1 和 H9D2 两对诊断引物, 分别对 H5N1 和 H9N2 亚型 AIV 的 HA 基因进行扩增, 结果显示, H5N1 亚型分离株的扩增条带长度为 431 bp, H9N2 亚型扩增条带长度为 378 bp (图 2)。

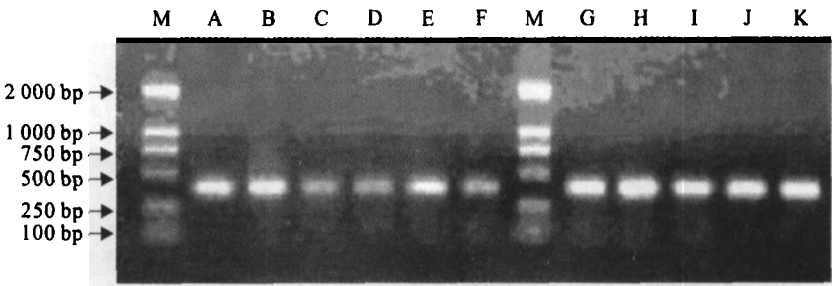


图 1 AIV M 基因 PCR 产物电泳图
M. DL2000 DNA Marker; A~F. H5N1 亚型 M 基因 PCR 产物; G~K. H9N2 亚型 M 基因 PCR 产物
Fig. 1 Results of RT-PCR in different subtype AIV M gene
M. DL2000 DNA Marker; A~F. PCR products of M gene of H5N1; G~K. PCR products of M gene of H9N2

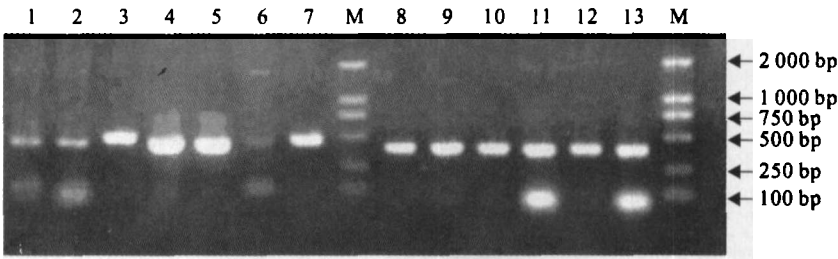


图 2 AIV HA 基因 RT-PCR 产物电泳图
M. DL2000 DNA marker; 1~7. H5N1 亚型 HA 基因 PCR 产物; 8~13. H9N2 亚型 HA 基因 PCR 产物
Fig. 2 Results of RT-PCR in H5N1 and H9N2 subtype AIV HA gene
M. DL2000 DNA marker; 1~7. PCR products of HA gene of H5N1; 8~13. PCR products of HA gene of H9N2

2.2 一步多重法 RT-PCR AIV 分型诊断方法的特异性

结果显示, NDV、EDS76V 和 IBV 均未扩增到特异性基因条带,表明所设计引物对 AIV 具有很强的特异性,而对其他家禽病毒无交叉反应。

2.3 一步法多重法 RT-PCR AIV 分型诊断方法的灵敏度

结果表明,本试验建立的 RT-PCR AIV 分型诊断方法,可以检测出 10^{-2} 倍稀释的病毒液中的 AIV。表明建立的 RT-PCR 分型诊断方法灵敏度较高。

2.4 AI 病料样品检测结果

经过 RT-PCR 检测,2 393 份病料样品中 AIV 阳性者共 50 份,与 HA/HI 试验结果完全一致^[2],表明所建立的 AIV 分型诊断方法有很强的特异性。

3 讨论

AIV 目前已知有 15 个 HA 亚型和 9 个 NA 亚型,组合后共有 135 个亚型,加之基因突变、重组、重排等原因,使得禽流感病毒变异极快。因此,禽流感病毒的分型快速诊断非常重要。RT-PCR 技术因其敏感、特异、快速等优点,而成为近年来应用最为广泛的技术之一,已经在动物分子流行病学研究中显示出巨大的优势和潜力^[13]。以前,有关 AIV 型特异性的诊断引物均以 NP 基因作为靶基因进行设计^[14-16],然而最新的研究结果表明,NP 基因具有极强的宿主特异性和地域特异性,往往不同地域和不同宿主的 NP 基因序列具有很大的差异^[17-18]。因此,以 NP 基因作为鉴定 AIV 型特异性的靶基因存在一定的缺陷。由于不同宿主、不同地域所分离 AIV M 基因的同源性很高、又具有型特异性的优点^[19-20],所以本研究以 M 基因为 AIV 诊断的型特异性靶基因,从而避免了应用 NP 基因作为靶基因时 NP 基因自身的缺陷。我国目前 AIV 主要以 H5N1 和 H9N2 两个亚型为主。因此,本研究在比较了多株不同亚型 AIV 的 M 基因和 H5N1、H9N2 两个亚型 HA 基因序列后,设计了扩增 M 基因的通用引物和扩增 HA 基因的分型引物。H5 亚型 HA 基因的 PCR 扩增序列中已经包含了 HA 基因蛋白酶裂解位点在内。如果怀疑 H5 亚型 AIV 是高致病性禽流感病毒(HPAIV),将 PCR 产物进行测序并分析其酶切位点氨基酸结构与特征,很容易判断 AIV 致病性的高低。

本研究经过反复试验,调整 3 对引物的退火温

度,使其能够同时应用同一 RT-PCR 参数进行循环,从而建立了禽流感病毒的 RT-PCR 快速分型诊断方法。结果表明,应用 3 对引物均可扩增出特异性单一条带,其长度与理论预期结果完全一致,而对照试验的 NDV、EDS76、IBV 均未扩增出目的条带,表明本试验所设计的 3 对引物具有很强的特异性,适宜于 AIV 的分型鉴别诊断;病毒 AAF 10^{-2} 稀释后仍然可以检测出禽流感病毒的存在,表明所建立的 RT-PCR 诊断方法具有非常高的灵敏度。AIV 传统的诊断方法均较费时,病毒分离需 4~5 d、电镜观察需 7 d、琼扩检出需 7 d^[1-2,21],因此这些诊断方法均很难满足 AIV 快速、准确的诊断要求。本研究建立的 AIV RT-PCR 分型诊断方法,从收到可疑病料到给出结果,总共约需要 24~30 h,大大缩短了诊断时间,而且该方法是以病毒总 RNA 为试验材料,不存在人为扩散禽流感病毒的潜在危险。

应用建立的 RT-PCR 诊断方法,对 2004 年全国送检的 2 393 份 AIV 可疑病料样品进行检测,结果共有 50 份为 AIV 阳性,与病毒分离以及 HA/HI 的检测结果完全一致。说明本研究所建立的禽流感 RT-PCR 分型诊断方法具有特异性强、灵敏度高、安全快速的特点,在禽流感病毒的快速诊断方面具有很好的应用价值。

参考文献

- [1] 甘孟侯. 禽流感[M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2002: 108-172.
- [2] 世界动物卫生组织. 哺乳动物、禽、蜜蜂 A 和 B 类疾病诊断试验和疫苗标准手册[S]. 4 版. 农业部畜牧兽医局译. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2002: 197-206.
- [3] 于康震, 陈化兰, 唐秀英. 1997 香港禽流感病毒重大疫病生物技术防制研究[M]. 白新盛, 卢景良, 著. 北京: 中国农业出版社, 1998: 307-314.
- [4] 魏凤祥, 屈连东, 周琦, 等. 要正视禽流感的综合预防[J]. 中国预防兽医学报, 2001, 23(5): 399-401.
- [5] Li K S, Xu K M, Peiris J S M, et al. Characterization of H9 subtype influenza viruses from the duck of Southern China: a candidate for the next influenza pandemic in human[J]. J Virol, 2003, 77(12): 6988-6994.
- [6] 陈伯伦, 张纪泽, 陈伟斌. 禽流感研究 - 鸡 A 型禽流感病毒的分离与血清学初步鉴定[J]. 中国兽医杂志, 1994, 20(10): 3-5.
- [7] 张纪泽, 陈伯伦, 陈伟斌. 禽流感研究 - 禽流感的发生与血清学调查[J]. 中国兽医杂志, 1994, 10(20): 6-7.
- [8] 吕长荣. 我国部分地区禽流感病毒的分离鉴定与分子流行病学研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2004.
- [9] 顾节清. 2004 年我国禽流感流行病学调查及病毒分子遗传演化分析[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2005.

- [10] Klimov A, Prosch S, Schafer J, et al. Subtype H7 Influenza viruses comparative antigenic and molecular analysis of the HA, M, NS gene[J]. Archives virol, 1992, 122: 143-161.
- [11] 杨爱梅, 陈福水, 赵西星. 禽流感病毒 HA 基因的分子克隆和测序[J]. 中国预防兽医学报, 2001, 23(2): 91-94.
- [12] 贾永清, 陈化兰, 邓国华, 等. 禽流感病毒分离株 A/Goose/Guangdong/3/96(H5N1) HA 基因序列分析[J]. 中国预防兽医学报, 2000, 22(1): 25-31.
- [13] Zhao J M, Wei R, Wang ZH L, et al. Study on application of one step multiple RT-PCR technique for detection of NDV and AIV and IBV[J]. Chinese J of animal Quarantine, 2003, 20(1): 22-24.
- [14] 刘明. H5 和 H7 亚型禽流感分子控制技术的研究[D]. 黑龙江哈尔滨: 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 2000.
- [15] Lee M, Shiu H, Chang P C H, et al. Identification and subtype of avian influenza viruses by RT-PCR[J]. J of Virological Methods, 2001, 97(1): 13-22.
- [16] Munch M, Nielsen L P, Handberg K J, et al. Detection and subtype H5 and H9 of avian type A influenza virus by RT-PCR and PCR-ELISA[J]. Archives of virol, 2001, 146(1): 87-97.
- [17] Semenova N P, Prokudina Y N, Chumakov V M, et al. Relationship between influenza viruses NP oligomerization and species appurtenance of the virus[J]. Voprosy Virusologii, 2000, 45(6): 12-17.
- [18] Gammelin, Mandler J, Sholtissek C. Two subtype of NP gene of influenza A viruses[J]. Virology, 1989, 170: 71-80.
- [19] Owen T G, William J B, Yoshihiro K, et al. Evolution of the NP gene of influenza A viruses[J]. J Virol, 1990, 4: 1487-1497.
- [20] Fouchier R A M, Bestebroer T M, Herfst S, et al. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the M gene[J]. J of clinical microbiology, 2000, 38(11): 4096-4101.
- [21] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 1997: 704-735.

(上接第 62 页)

【参考文献】

- [1] Fetrow J, Stewart S, Eicker S, et al. Mastitis: An economic consideration[C]//Proceedings of the 39th Annual Meeting of the National Mastitis Council, Atlanta: [s. n.], 2000: 3-47.
- [2] Neuenschwander T, Kadarmideen H N, Wegmann S, et al. Genetics of parity-dependant production increase and its relationship with health, fertility, longevity, and conformation in Swiss Holsteins[J]. Journal of Dairy Science, 2005, 88: 1540-1551.
- [3] Daniel Z. Selection for clinical mastitis and somatic cell count[J]. Dairy Updates, 2004, 613: 1-6.
- [4] Sattler C. Adjust your selection standards in 2005[J]. Selections, 2005, 1: 3.
- [5] Rupp R, Boichard D. Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell score, production, udder type traits, and milking ease in first lactation Holsteins[J]. Journal of Dairy Science, 1999, 82: 2198-2204.
- [6] 唐淑珍, 张月周. DH1 的组织实施及应用[J]. 中国奶牛, 1999(2): 35-37.
- [7] 储明星, 石万海, 卞霞, 等. 奶牛乳房炎的遗传学及遗传评定[J]. 中国奶牛, 2003(3): 42-44.
- [8] Wiggins G R, Shook G E. A lactation measure of somatic cell count[J]. Journal of Dairy Science, 1987, 70: 2666-2672.
- [9] Qdegard J, Klemetsdal G, Heringstad B. Genetic improvement of mastitis resistance: Validation of somatic cell score and clinical mastitis as selection criteria[J]. Journal of Dairy Science, 2003, 86: 4129-4136.
- [10] 张勤, 张沅. 北京市荷斯坦牛头胎产奶量的遗传统计分析[J]. 中国农业大学学报, 1995, 21(4): 435-440.
- [11] Lassen J, Hansen M, Sorensen M K, et al. Genetic relationship between body condition score, dairy character, mastitis, and diseases other than mastitis in first-parity Danish Holstein cows[J]. Journal of Dairy Science, 2003, 86: 3730-3735.
- [12] Heringstad B, Chang Y M, Gianola D, et al. Genetic analysis of longitudinal trajectory of clinical mastitis in first-lactation Norwegian cattle[J]. Journal of Dairy Science, 2003, 86: 2676-2683.
- [13] Oleggini G, Ely L O, Smith J W. Effect of region and herd size on dairy herd performance parameters[J]. Journal of Dairy Science, 2001, 84: 1044-1050.
- [14] Miller R H, Norman H D, Wiggins G R, et al. National survey of herd somatic cell counts on DH1 test days[C]//Proceedings of the 38th Annual Meeting of the National Mastitis Council, Arlington: [s. n.], 1999: 161-162.
- [15] Granie C R, Foulley J L, Maza E, et al. Statistical analysis of somatic cell scores via mixed model methodology for longitudinal data[J]. Animal Research, 2004, 53: 259-273.