

I 型鸭肝炎病毒 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 方法的建立及初步应用

刘海燕¹, 赵丽丽¹, 牛银杰¹, 祝明皓², 刘胜旺¹, 陈洪岩¹

(1. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室; 2. 东北农业大学生命科学学院; 哈尔滨 150001)

【摘要】 目的 建立快速诊断 I 型鸭肝炎病毒的荧光定量 RT-PCR 方法。**方法** 根据 NCBI 下载的 20 个来自我国不同省份的 I 型鸭肝炎病毒的基因序列, 找出其保守序列, 设计合成一对引物和一条 TaqMan 探针, 进行条件优化, 检测其特异性, 敏感性, 稳定性。**结果** 该方法敏感性达 20 拷贝, 比常规 PCR 敏感性高。其特异性强, 对番鸭细小病毒(MDPV), 鹅细小病毒(GPV), 新城疫病毒(NDV)和禽流感(AIV), 鸭减蛋综合征病毒(EDSV), 禽网状内皮组织增生症病毒(REV), 鸭坦布苏病毒(DTMUV), 禽呼肠弧病毒(ARV)8 种病毒的检测均为阴性, I 型鸭肝炎病毒检测结果为阳性。用建立的方法检测了江苏徐州采集 100 份样品, 阳性率为 92%。说明 I 型鸭肝炎病毒在江苏徐州地区的鸭群中普遍存在。**结论** 建立了 I 型鸭肝炎病毒荧光定量 PCR 方法。

【关键词】 I 型鸭肝炎病毒; 荧光定量 RT-PCR; 应用

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 12-0071-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2015.12.014

Development and application of a real-time TaqMan RT-PCR assay for detection of duck hepatitis virus type 1

LIU Hai-yan¹, ZHAO Li-li¹, NIU Yin-jie¹, ZHU Ming-hao², LIU Sheng-wang¹, CHEN Hong-yan¹

(1. State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences. 2. Northeast Agricultural University, Harbin 150001, China)

【Abstract】 Objective To develop a real-time RT-PCR assay (rRT-PCR) for efficient detection of duck hepatitis virus type 1 (DHV-I). **Method** According to the different gene sequences of DHV-I from different provinces download from NCBI and to find the conserved sequences. One pair of the specific primers and one TaqMan probe were designed. Then reaction parameters were optimized to develop a real-time RT-PCR assay (rRT-PCR). **Results** This developed rRT-PCR assay could detect 20 template copies of RNA, and its sensitivity was higher than that of the conventional RT-PCR. This rRT-PCR assay was found to be specific and able to detect DHV-I, and no positive results were observed when nucleic acid from Muscovy duck parvovirus, goose parvoviruses, Newcastle disease and avian influenza virus, egg drop syndrome virus, reticuloendotheliosis virus, duck Tembusu virus, poultry intestinal arc virus were used as rRT-PCR templates. The results of this developed rRT-PCR assay used for 100 duck clinical samples showed a positive rate of 92%, indicating that DHV exists in duck group of Jiangsu province in China. **Conclusion** This rRT-PCR assay can be used as a rapid tool for detection of DHV-I.

【基金项目】 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(No. 0302015013); 中国农业科学院科技创新工程创新经费(No. 2015118)。

【作者简介】 刘海燕(1990-), 女, 研究生。研究方向: 兽医微生物及其分子生物学。E-mail: 1151763886@qq.com。

【通讯作者】 陈洪岩(1963-), 男, 研究员。研究方向: 实验动物与比较医学。E-mail: chenhongyan@caas.cn。

【Key words】 Duck hepatitis virus, type I; Real-time RT-PCR; Virus detection; Application

鸭病毒性肝炎(duck virus hepatitis, DVH)是由 I 型鸭肝炎病毒(duck hepatitis virus-I, DHV-I)引起雏鸭的一种急性、高度致死性的疾病。主要侵害 3 周龄以内的雏鸭,死亡率可达 95%,是危害养鸭业最为严重的传染病之一,给养鸭业造成巨大的经济损失^[1]。DHV 属于小 RNA 病毒科,病毒粒子小,呈球形或类球形,可在 9~11 日龄鸭胚尿囊腔中增殖。目前认为 DHV 有 3 个血清型,分别引起 I 型、II 型和 III 型鸭肝炎,3 个型之间无抗原相关性,没有交叉保护作用。其中 I 型 DHV 呈世界性分布,造成极大的经济损失,严重阻碍养鸭业的发展。在鸭的疫病研究、诊断检测、疫苗研制、检验、生产中特别需要 SPF 鸭及鸭胚,因此,建立快速检测鸭病的方法净化 SPF 鸭很有必要。目前,国内外已有多种检测 DHV-I 抗原的方法,如病毒中和试验、免疫电镜、ELISA 方法等^[2-4],这些方法存在过程繁琐,检测周期长,不易快速诊断等缺点。因此,建立快速、准确、灵敏、特异的检测鸭疫病病原的方法仍然是非常有意义的。荧光定量 PCR 方法将 PCR 与荧光检测方法相结合,具有操作简便、结果直观、敏感性高、特异性强、可定量检测等优点。目前常用的荧光定量方法有染料法和探针法。本研究根据 NCBI 上已发表的 DHV-I 保守序列,设计特异性引物和探针,建立了检测 DHV-I 的 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 方法,不仅可用于 DVH 的诊断与防治,也可用于 SPF 鸭的微生物学质量检测。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器

Bio-Rad IQ5 荧光定量 PCR 仪, DNA 片断回收试剂盒和质粒小量提取试剂盒购自 Axygen 公司, pMD18-T 连接载体, DL2000 maker, 荧光定量 Premix Ex Taq 酶, RNA 反转录试剂盒 Prime Script RT Kit 均购自 Takara 公司, RNA 体外提取试剂盒 Total RNA kit 购自 Omega 公司。

1.2 病毒

DHV-I 161/79/v 株由本实验室保存,禽流感病毒(AIV)、新城疫病毒(NDV)、鹅细小病毒(GPV)、鸭坦布苏病毒(DTMUV)、禽网状内皮增生病毒(REV)、禽呼肠弧病毒(ARV)、减蛋综合征病毒(EDSV)、番鸭细小病毒(MDPV)均由本实验室保存。

1.3 动物样品

来自于 HBK-SPF 鸭的肛拭子, 20 份, 鸭 10 月龄、体重 1.1~1.3 kg, 采自于哈尔滨兽医研究所实验动物中心(生产许可证号: SCXK(黑)2011-008, 使用许可证号 SYXK(黑)2011-022)。来自于樱桃谷鸭的肛拭子, 100 份, 鸭 5 月龄、体重 2.3~2.5 kg, 采自于江苏徐州某养鸭场。

1.4 引物和探针的设计与合成

根据 NCBI 中下载的 DHV-I 的保守序列, 采用 Primer 5 软件, 设计合成一对能扩增 516 bp 片段的引物(P1、P2), 其扩增产物用于制备标准品。在标准品序列中选取一段保守序列, 应用 Beacon Designer 7.5 软件设计合成一对能扩增 78 bp 的 rRT-PCR 引物(P3、P4)和 TaqMan 探针(Fp)。引物由哈尔滨博仕生物技术有限公司合成, 探针由上海英俊生物技术有限公司合成。

P1: 5'-GTTTTGGAAGGGAAGATACAGTGCT-3'

P2: 5'-GTAGGCTAGGGAATAGTAAAGTAAA-3'

P3: 5'-TGGGATACCCAGGAGTACACGTA-3'

P4: 5'-TGTTAAGCTGGGAGGTGTCTTGT-3'

Fp: 5'-HEX-CACCCACTGGCTTTGGAGCTGTGC-TAMRA3'。

1.5 核酸的提取和标准品制备

DHV-I 的 RNA 从 DHV-I 尿囊液中提取, 提取方法参照 Total RNA kit 提取试剂盒说明书。提取的核酸 RNA 进行反转录合成 cDNA; 模板为提取的病毒 RNA, 引物为 random primers(Takara), 进行反转录合成 cDNA, 反转录体系(40 μ L)为 RNA 模板 20.0 μ L, 随机引物 2.0 μ L, 65 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 冰浴 5 min, 短暂离心后, 依次加入 5 $\times$ 反转录 Buffer 8.0 μ L, dNTP(10 mmol/L)4.0 μ L, Ribonuclease Inhibitor (40 U/ μ L)1.0 μ L, PrimeScript 反转录酶(200 U)1.0 μ L, DEPC 水 4.0 μ L。42 $^{\circ}$ C 水浴 1h, 70 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 冰浴 5 min, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

DHV-I 反转录 cDNA 的克隆、连接、转化和鉴定均按常规方法进行^[5-6]。提取质粒进行 PCR 鉴定及测序分析。取含 DHV-I 基因组的重组质粒作为标准品, 用微量核酸蛋白检测仪测定质粒浓度及纯度, 计算质粒标准品的拷贝数。-70 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.6 荧光定量 PCR 反应条件的优化

应用 DHV-I 重组质粒作为标准品, 引物和探针的终浓度在 0.04~0.4 μ mol/L 之间优化, 进行荧光

定量 RT-PCR。以最小的样本阈值循环数 (ct 值) 和最高的荧光值为标准, 分别对引物浓度、退火温度进行优化。选择引物和探针的最佳浓度和退火的最佳温度。

1.7 荧光定量 RT-PCR 的敏感性试验

将标准品质粒 10 倍倍比稀释进行荧光定量 RT-PCR 扩增, 取 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^1$ 拷贝/ μL 标准品质粒各 2 μL 作为模板进行检测, 确定最低检出量并设立阴性对照。

1.8 荧光定量 RT-PCR 的特异性和重复性试验

用本研究建立的荧光定量 RT-PCR 检测方法, 对 DHV-I 的基因组 RNA, 以及对照病原 (MDPV、ARV、GPV、AIV、DTMUV、NDV、REV、EDSV) 的核酸同时扩增, 进行特异性检测。为检测其重复性, 用 1×10^6 拷贝/ μL 的 DHV-I 标准品, 做三个重复, 通过计算 Ct 值的标准差 (S) 和变异系数 (CV) 来验证荧光定量 RT-PCR 的批内重复性。每隔 3 d 重复检测保存于 -20°C 的模板, 连续检测 3 次, 验证批间重复性, 并设立 NTC。

1.9 临床样品及 SPF 鸭群的检测

利用建立的检测 DHV-I 的荧光定量 RT-PCR 方法, 分别对 2015 年于江苏徐州地区某鸭场鸭群收集的 100 份肛拭子和 HBK-SPF 鸭 20 份肛拭子进行检测。并同时用普通 RT-PCR 的方法与其进行比较。

2 结果

2.1 引物、探针浓度和退火温度

引物和探针浓度优化结果显示, 不同的引物和探针终浓度对试验结果影响比较大, 当上、下游引物、探针终浓度分别为 0.28 $\mu\text{mol/L}$, 退火温度为 60°C 时对质粒标准品的检测可获得较小的 Ct 值。

2.2 荧光定量敏感性试验

以 10 倍倍比系列稀释的 DHV-I 质粒 ($1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^1$ 拷贝/ μL) 为模板进行扩增, 敏感性结果见图 1。从图中的荧光曲线可见, 对 DHV-I 1×10^1 拷贝/ μL 模板的检测仍有荧光曲线, 表明该检测方法对 DHV-I 的灵敏度为 20 拷贝。

2.3 荧光定量 RT-PCR 的特异性和重复性

特异性试验结果表明, 只有 DHV-I 的 RNA 能出现荧光曲线, 对其他 8 种病毒核酸的检测结果均为阴性 (图 2)。说明此方法特异性良好。用 1×10^6 拷贝/ μL 的 DHV-I 的阳性样品, 做三个重复同时检测, 检测结果见图 3, 3 d 后重复检测保存于 -20°C

的模板, 变异系数均小于 2% (表 1)。说明此方法具有较好的准确性和重复性。

表 1 批间重复性检测结果
Tab. 1 The variability between experiments

样品	Ct 值				
Samples	1 d	4 d	7 d	SD	CV
DHV-I	21.11	21.62	21.91	0.401	1.86%

2.4 荧光定量 RT-PCR 检测临床样品

利用建立的荧光定量 RT-PCR 方法, 对江苏徐州地区某鸭场鸭群收集的 100 份肛拭子进行检测, 结果检出 DHV-I 阳性 92 份 (阳性率为 92%), 并同时用普通 RT-PCR 的方法与其进行比较, 检出 DHV-I 阳性 16 份, 阳性率为 16%。对 20 只 HBK-SPF 鸭的肛拭子进行初步检测, 结果均为阴性 (图 4)。

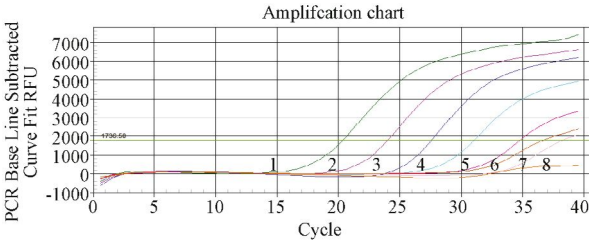
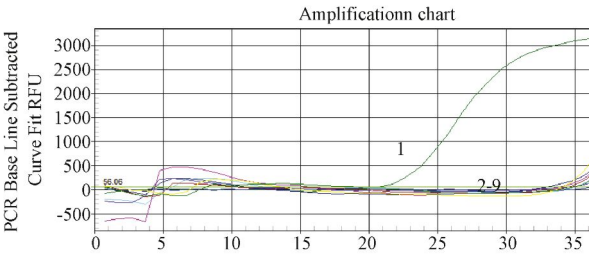


图 1 荧光定量 RT-PCR 检测 DHV-I 的敏感性 $1 \sim 7.1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^1$ 拷贝/ μL ; 8. 空白对照
Fig. 1 Sensitivity of rRT-PCR detection. 1 ~ 7: $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^1$ copies/ μL ; 8: Negative control



1. DHV-I; 2. AIV; 3. DTMUV; 4. EDSV; 5. GPV; 6. MDPV; 7. NDV; 8. REV; 9. ARV。
图 2 荧光定量 RT-PCR 检测 DHV-I 的特异性
Fig. 2 Specificity of the rRT-PCR detection. 1: DHV-I; 2: AIV; 3: DTMUV; 4: EDSV; 5: GPV; 6: MDPV; 7: NDV; 8: REV; 9: ARV.

3 讨论

DHV-I 1945 年在美国长岛被首次发现以来, 世界各国陆续报道了该病的流行。在我国黄均建^[7] 1963 年首次报道了上海地区某些鸭场 DHV-I 的流行情况, 此后该病在全国广泛流行。本病是危害维

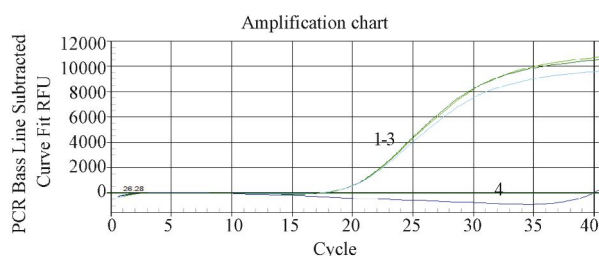


图3 批内重复性检测结果

1~3. 1×10^6 拷贝/ μL ; 4. 空白对照

Fig. 3 The reproducibility of rRT-PCR. $1 \sim 3. 1 \times 10^6$ copies/ μL ; 4. Negative control

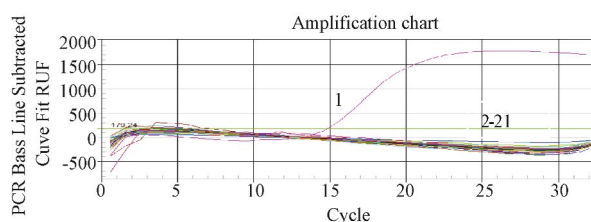


图4 SPF 鸭检测结果 1. 阳性对照; 2~21. SPF 鸭肛拭子

Fig. 4 Detection of the SPF ducks.

1: Positive control; 2~21: SPF ducks

鸭的最重要病原,感染后死亡率非常高,给我国养鸭业造成了巨大的经济损失。目前,I型鸭肝炎的诊断方法有病毒的分离鉴定以及实验室诊断方法。实验室检测方法主要包括中和试验、凝胶扩散试验、琼脂免疫扩散试验、间接血凝试验、RT-PCR方法^[8-10]等。这些方法各有其优缺点,但都需要耗费较长的时间,不利于临床上对DHV-I的快速诊断检测和监控。随着DHV-I基因组序列被破译,DHV-I RT-PCR方法建立起来,具有简便、快速的优点,但存在假阳性和PCR污染等弊端。由于DHV-I感染成年鸭后,感染鸭可长期带毒和排毒而不表现出临床症状,在这些情况下,病鸭体内病毒含量较低,普通PCR方法无法检测出病毒,易出现假阴性。在SPF鸭群的检测和培育中,需要建立一种及时、快速、准确的方法检测出病毒,以便更快地淘汰病鸭,净化鸭群。

实时荧光定量PCR方法具有高灵敏度和特异性等无可比拟的优越性而迅速应用于核酸的定量检测。与传统PCR方法相比,实时荧光定量PCR更加快速、灵敏和特异,并能有效减少实验过程中的污染^[11]。TaqMan探针法是高度特异的定量PCR技术。具有模板序列特异的TaqMan探针在引物特异的基础上进一步提高定量PCR的专一性,每扩增

一个特异产物只释放一个分子的荧光染料,仪器检测的是特异扩增的结果,非特异产物对检测信号没有影响,有效提高检测的专一性。有多种不同波长的荧光基团对可供选择,使得TaqMan探针法可以实现在同一管内检测多重PCR,降低成本也提高效率和准确性避免了荧光染料对PCR反应的影响。相比于染料法,探针法具有更高的特异性和灵敏度,但费用相对较高。

本研究根据NCBI下载的来自20个不同省份的DHV-I基因组,找出其保守区序列,通过Beacon Designer 7.5软件在保守序列区设计并合成了一对特异性引物和一条TaqMan探针,并且对探针和引物的浓度进行优化,建立了I型鸭肝炎病毒荧光定量RT-PCR检测方法。该方法呈现出良好的S型扩增曲线,灵敏度达20拷贝。能够特异性地扩增出78 bp的目的片段,而对MDPV、ARV、GPV、AIV、DTMUV、NDV、REV、EDSV病原的检测呈阴性,说明具有良好的特异性。并对3份不同批次的阳性标准品进行批内和批间重复试验,Ct值均小于2%,具有良好的重复性和稳定性。本研究利用建立的TaqMan荧光定量RT-PCR方法,对江苏徐州地区鸭群收集的100份样品进行检测,结果检出I型鸭肝炎病毒阳性样品92份,同时用普通RT-PCR方法进行检测,检出阳性样品16份。说明荧光定量RT-PCR方法灵敏度高于普通RT-PCR,能够检测出普通RT-PCR检测不到的病毒含量。对哈尔滨兽医研究所SPF鸭进行检测,结果均为阴性。目前,国外关于SPF鸭研究报道资料极少,国内仅有中国农业科学院哈尔滨兽医研究所正在开展SPF鸭的培育研究工作,建立了HBK-SPF鸭的基础群^[12]。确定了排除11种病毒病(DHV-I是重点排出对象)和5种细菌病病原和抗体的SPF鸭质量内控标准,建立了相应的质量检测方法。由于对鸭疫病抗体检测难度较大,传统方法检测抗原又较繁琐。因此,建立快速、准确、灵敏的检测鸭病的方法对培育SPF鸭十分必要。

综上所述,本研究建立了快速、准确、可靠的I型鸭肝炎病毒TaqMan荧光定量RT-PCR检测方法,适用于传染性病原体的快速检测与鉴定。

参考文献:

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学(第2版)[M]. 北京:科学出版社, 1997. 1: 996-997.

(下转第80页)

- obesity and effects of weight loss [J]. *Mol Med*, 2011, 17(7-8): 840-845.
- [25] Ballak DB, Van Diepen JA, Moschen AR, et al. IL-37 protects against obesity-induced inflammation and insulin resistance [J]. *Nat Commun*, 2014, 3: 1-12.
- [26] Bulau AM, Fink M, Maucksch C, et al. In vivo expression of interleukin-37 reduces local and systemic inflammation in concanavalin A-induced hepatitis [J]. *Sci World J*, 2011, 11: 2480-2490.
- [27] Sakai N, Van Sweringen HL, Belizaire RM, et al. IL-37 reduces liver inflammatory injury via effects on hepatocytes and non-parenchymal cells [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2012, 27(10): 1609-1616.
- [29] Kiriya S, Gabata T, Takada TJ, et al. New diagnostic criteria of acute pancreatitis [J]. *Hepatobiliary Pancreat Sci*, 2010, 17: 24-36.
- [30] Malmstrom ML, Hansen MB, Andersen AM, et al. Cytokines and organ failure in acute pancreatitis: inflammatory response in acute pancreatitis [J]. *Pancreas*, 2012, 41: 271-277.
- [31] 林江涛, 祝塘珠, 王家骥, 等. 支气管哮喘防治指南(支气管哮喘的定义、诊断、治疗和管理方案) [J]. *柳州医学*, 2012, 25(3): 171-179.
- [修回日期]2015-09-16

(上接第 74 页)

- [2] Wool cock PR. Duck hepatitis. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, et al. (Ed.). *Diseases of Poultry* [M]. Ames, Iowa State Press, 2003: 343-354.
- [3] Levine PP, Fabricant J. A hitherto-undescribed virus disease of ducks in North America [J]. *Cornell Vet*, 1950, 40: 71-86.
- [4] Murty DK, Hanson LE. A modified microgel diffusion method and its application in the study of the virus of duck hepatitis [J]. *Am J Vet Res*, 1961, 22: 274-278.
- [5] 陈海军, 程安春, 汪铭书, 等. I 型鸭肝炎病毒间接免疫酶染色检测方法的建立 [J]. *中国兽医科学*, 2007, 37(5): 369-373.
- [6] Hansen WR, Brown SE, Nashold SW, et al. Identification of duck plague virus by polymerase chain reaction [J]. *Avian dis*, 1999; 106-115.
- [7] 黄均建, 主编. 小鸭病毒性肝炎研究 [M]. 上海市农业科学院畜牧兽医研究所, 1963: 21-25.
- [8] 马秀丽, 宋敏训, 黄兵, 等. I 型鸭病毒性肝炎病毒 RT-PCR 检测方法的建立 [J]. *家禽科学*, 2006, (11): 11-13.
- [9] 孙涛, 肖西志, 徐彪, 等. I 型鸭肝炎病毒 PCR-DHPLC 检测方法的建立 [J]. *动物医学进展*, 2011, 32(7): 13-18.
- [10] 魏雪涛, 张晓勇, 李银, 等. I 型鸭肝炎病毒 RT-PCR 检测方法的建立 [J]. *浙江农业学报*, 2010, 22(1): 0-13.
- [11] Xie ZX, Xie LJ, Pang Y S, et al. Development of a real-time multiplex PCR assay for detection of viral pathogens of penaeid shrimp [J]. *Arch Virol*, 2008, 153: 2245-2251.
- [12] 文力正, 任文陟. 我国禽类实验动物研究进展 [J]. *现代农业科技*, 2008, (13): 258-259.
- [修回日期]2015-10-21