

血清 3 型鸭甲型肝炎病毒实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立与初步应用

孙庆歌¹, 薛霜¹, 肖爱芳¹, 马慧慧¹, 朱薇^{1*}, 漆世华¹,
温文生¹, 舒银辉¹, 谢红玲¹, 苏敬良^{2*}

(1. 武汉中博生物股份有限公司, 武汉 430070; 2. 中国农业大学动物医学院 人畜共患病农业部重点开放实验室, 北京 10019)

[收稿日期] 2012-10-10 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2013) 04-0001-05 [中图分类号] S852.659.6

[摘要] 通过对 GenBank 公布的鸭甲型肝炎病毒全序列比对, 在 3 型鸭甲型肝炎病毒 (DHAV-3) 5' 非编码区的保守区, 设计了一对检测引物和一条特异性 TaqMan 探针, 以构建的阳性重组质粒经体外转录合成的 RNA 作为标准品绘制标准曲线, 建立了一种快速检测 DHAV-3 的实时荧光定量 RT-PCR 方法。该方法能特异性地检测出 DHAV-3, 而与血清 1 型鸭肝炎病毒 (DHAV-1)、鸭瘟病毒、新城疫病毒、禽流感病毒 (H9)、呼肠孤病毒、传染性支气管炎病毒无交叉反应。在 $1.8 \times 10^3 \sim 1.8 \times 10^8$ copies/ μL 的检测范围内标准曲线线性关系较好, R^2 为 0.992。敏感性试验表明, 最低检测限为 36 拷贝数 RNA。用该方法和胚半数致死量法对尿囊液中病毒含量进行检测, 表明二种方法检测结果呈正相关。本研究所建立的检测方法特异性好, 灵敏度高, 且操作方便, 可为该病毒的快速诊断和流行病学调查提供技术手段。

[关键词] 血清 3 型鸭甲型肝炎病毒; 实时荧光定量 RT-PCR

Establishment and Application of Real-time Fluorescent Quantitative RT-PCR to Detect Duck Hepatitis A Virus Serotype 3

SUN Qing-ge¹, XUE Shuang¹, XIAO Ai-fang¹, MA Hui-hui¹, ZHU Wei^{1*}, Qi Shi-hua¹,
WEN Wen-sheng¹, SHU Yin-hui¹, XIE Hong-ling¹, SU Jing-liang^{2*}

(1. Wuhan Chopper Biology Co. Ltd, Wuhan 430070, China; 2. Key Laboratory of Zoonosis of Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: In order to establish the fluorescent real-time quantitative RT-PCR assay for the rapid detection of duck hepatitis A virus serotype 3 (DHAV-3), a pair of primers and a TaqMan probe were designed based on conserved region of the 5' untranslated region (UTR) of DHAV-3 by comparing genome sequences of duck hepatitis A virus published by GenBank, and the standard positive template was prepared by the transcription of recombinant plasmid *in vitro* for the construction of standard curve. This detection assay was specific and had no cross-reaction with duck hepatitis A virus serotype 1, duck plague virus, newcastle disease virus, avian influenza virus (H9), duck reovirus and avian infectious bronchitis virus. The detection limit of the assay was 36 copies with the linear range from 1.8×10^3 to 1.8×10^8 copies/ μL , and the correlation coefficient was 0.992. Compared the real-time fluorescent quantitative RT-PCR with ELD₅₀ in detection of DHAV-3, the virus copies was positively correlated with virus titer in duck allantoic fluid. The developed method could be used for rapid diagnosis and epidemiological survey of DHAV-3, and also for the detection of virus titer in vaccine production as a reference method.

Key words: duck hepatitis A virus serotype 3; real-time fluorescent quantitative RT-PCR

作者简介: 孙庆歌, 硕士, 从事禽病的分子诊断技术研究。

通讯作者: 朱薇, E-mail: 13797088462@163.com; 苏敬良, E-mail: sujingl@cau.edu.cn

鸭病毒性肝炎 (Duck Viral Hepatitis) 是一种严重危害雏鸭的急性、烈性传染病, 主要危害 3 周龄以内的雏鸭, 成年鸭一般可感染但不发病, 所以又称为小鸭肝炎。该病以发病急、病程短、传播快、病死率高为特点, 通常发病日龄越小, 病死率越高^[1]。鸭病毒性肝炎可由小 RNA 病毒科禽肝病毒属鸭甲型肝炎病毒和星状病毒科禽星状病毒属的鸭星状病毒引起^[2]。鸭星状病毒感染地域性较为明显, 仅在英国和美国有发病报道^[2], 且鸭星状病毒致病性较鸭甲型肝炎病毒弱^[3]。鸭甲型肝炎病毒, 包括鸭甲型肝炎 1 型 (DHAV-1)、2 型 (DHAV-2) 和 3 型 (DHAV-3)。DHAV-1 即传统的 I 型鸭肝炎病毒, 我国台湾地区新分离株划分为 DHAV-2^[4-6], 我国和韩国新分离株被划分为 DHAV-3^[7]。苏敬良等在北京和广西等地发病鸭场中分离到 DHAV-3, 根据流行病学调查发现, 目前该血清型病毒感染在河北、山东、广东、重庆等地商品鸭群中呈流行态势^[8-9]。

目前, 已有多篇文献报道 DHAV-1 的检测方法, 包括 RT-PCR^[10-12]、逆转录环介导等温扩增 (RT-LAMP)^[13] 及荧光 RT-PCR 等^[14]。由于实时荧光定量 PCR 技术具有敏感、特异、简捷快速等优势, 在动物疫病诊断领域得到越来越广泛的应用。因此, 我们根据 DHAV 基因差异较大区域 5' UTR, 同时在 DHAV-3 相对的序列保守区设计引物与探针, 研究建立了一种可特异性检测 DHAV-3 的实时荧光定量 RT-PCR 方法, 以期对 DHAV-3 的临床检测和流行情况调查提供方便、快捷、高效的技术手段。

1 材料与方法

1.1 材料 DHAV-3 致弱疫苗毒 (B54 株)、DHAV-1 (ATCC 株)、禽呼肠孤病毒 (ARV)、5 份经鉴定的临床分离毒株 (北京 J 株、河北 R 株与 H 株、山东 SL 株、广西 GX 株) 由中国农业大学传染病实验室保存; 鸭瘟疫苗病毒 (DPV CVCC AV1222 株)、新城疫疫苗病毒 (NDV HB1 株)、禽流感病毒 (AIV-H9)、传染性支气管炎疫苗病毒 (IBV H120 株) 由武汉中博生物股份有限公司保存; 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 北京全式金生物公司。

1.2 主要试剂和仪器 病毒核酸提取试剂盒、BamH I 限制性内切酶、RT-PCR 试剂盒、RNA 酶

抑制剂、DNA 裂解酶 I、T7 体外转录试剂盒、胶回收纯化试剂盒、质粒快速提取试剂盒、荧光定量 RT-PCR 试剂盒 (探针法) (TAKARA, JEP)。pEASY-T1 克隆载体购自北京全式金公司 (Transgen, CHN)。荧光定量 PCR 仪为 ABI Stepone Plus (ABI, USA), 紫外分光光度计 UV-Visible Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)。

1.3 方法

1.3.1 引物与探针设计 根据 GenBank 所发表的鸭甲型肝炎病毒相关基因组序列, 利用生物学分析软件 BioEdit 进行同源性比对分析, 在 DHAV-3 和 DHAV-1 及 DHAV-2 核酸序列差异显著区 5' UTR (412~580 nt), 利用 Beacon Designer 7.0 设计引物和探针, 于 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 上对引物和探针进行 BLAST 分析, 初步检测引物和探针的特异性。引物和探针由大连宝生物工程有限公司合成。

1.3.2 标准品的制备

1.3.2.1 重组质粒的构建 提取鸭胚尿囊液病毒 RNA, 对目的基因片段进行 RT-PCR 扩增。将 PCR 产物经胶回收纯化后连接 pEASY-T1 载体, 再将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 经抗性筛选, 扩大培养后提取质粒。将正确插入目的片段的重组质粒送生物公司测序, 保存阳性菌液及质粒。

1.3.2.2 体外转录 将构建的阳性重组质粒经 BamH I 酶切线性化, 再进行胶回收纯化, 纯化产物在 T7 RNA 聚合酶于 37℃ 作用下体外转录 1 h, 然后加入 DNA 裂解酶 I, 继续作用 30 min, 消化去除模板 DNA, 将合成的 cRNA 按分子克隆实验指南再进行酚/氯仿/异戊醇抽取纯化。紫外分光光度计测定浓度, 用公式计算出每微升所含的拷贝数, 作为定量标准品, 加入 RNA 酶抑制剂置于 -70℃ 保存备用。

1.3.3 实时荧光定量 RT-PCR 反应条件的建立 以制备的标准品 cRNA 为模板, 参考 One Step PrimeScript RT-PCR 试剂盒说明书, 对实时荧光定量 RT-PCR 反应条件进行优化, 包括引物与探针浓度的调整、退火温度。

1.3.4 标准曲线建立 以优化后确立的反应条件对梯度浓度 $1.8 \times 10^3 \sim 1.8 \times 10^8$ copies/ μ L 标准品进行检测, 建立不同模板浓度的动力学扩增曲线。

以标准品拷贝数作为横坐标,不同标准品浓度的检测 CT 值作为纵坐标,由检测仪器自带软件拟合出绝对定量标准曲线,根据标准曲线线性相关系数 R^2 检验标准曲线的可信度。

1.3.5 敏感性测定 对浓度 $1.8 \times 10^0 \sim 1.8 \times 10^3$ copies/ μL 的标准品进行检测,同时设立阴性对照。反应结束后,分析有特异性产物的最低起始模板浓度,该浓度即为所建立方法的最低检测灵敏度。

1.3.6 特异性试验 提取 DHAV-3 (B54 株)、DHAV-1 (ATCC 株)、DPV (CVCC AV1222 株)、NDV (HB1 株)、AIV (H9)、ARV、IBV (H120 株) 的 RNA,应用优化好的实时荧光定量 RT-PCR 反应体系和条件对上述样品进行检测,同时以标准品作为阳性对照、DEPC treated water 作为阴性对照。

1.3.7 重复性试验 对 1.8×10^7 、 1.8×10^5 、 1.8×10^3 copies/ μL 的标准品 RNA 进行检测,每份样品作 3 个复孔,所得检测 CT 值经统计学处理后,计算批内变异系数。

1.4 临床样本的检测

1.4.1 临床分离株的检测验证 通过对 5 份从临床上分离的、并经鉴定的尿囊液病毒进行检测,验证该检测方法的有效性 with 特异性。

1.4.2 ELD₅₀ 与实时荧光定量 RT-PCR 检测方法比较 分别收集接种病毒后 58、72、84、108 h 的死亡鸭胚尿囊液,每个时间点取等量的 5 份尿囊液进行混合,先对每份混合后的尿囊液进行鸭胚 ELD₅₀

测定,再各取等量尿囊液进行 RNA 的提取(按试剂盒说明书),用所建立的方法对样品 RNA 进行定量检测,研究 ELD₅₀ 与病毒拷贝数之间的对应关系。

2 实验结果

2.1 引物与探针设计 筛选后的引物与探针序列:

上游引物 5' - CCTTGTGTGAAACGGATTA - 3'

下游引物:5' - GGAACACCCARTAATACTRAAG - 3'

TaqMan 探针:5' - FAM - TAGCATCTAGTGTTTC - CAGTCCATAAC - BHQ1 - 3'

R 为兼并碱基,表示 A 或 G 两种碱基可能性。扩增产物大小为 120 bp。

2.2 反应条件优化 优化后的 PCR 反应体系为: $2 \times \text{One Step RT-PCR Buffer III}$ 10 μL 、上下游混合引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.4 μL 、TaqMan 混合探针 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL 、Ex Taq HS (5 U/ μL) 0.4 μL 、Prime-Script RT Enzyme Mix II 0.4 μL 、RNA 模板 2 μL 、DEPC treated water 补充到 20 μL 体系。反应程序为:42 $^{\circ}\text{C}$ 反转录 30 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s (收集荧光信号), 40 个循环。

2.3 标准曲线的建立 以 10 倍梯度稀释的标准品为模板进行检测,结果显示,在 $1.8 \times 10^8 \sim 1.8 \times 10^3$ copies/ μL 的范围内可得到良好的动力学曲线 (图 1a), 扩增效率为 97.5%。标准曲线相关系数 R^2 为 0.992, 提示误差较小,可信度较高 (图 1b)。

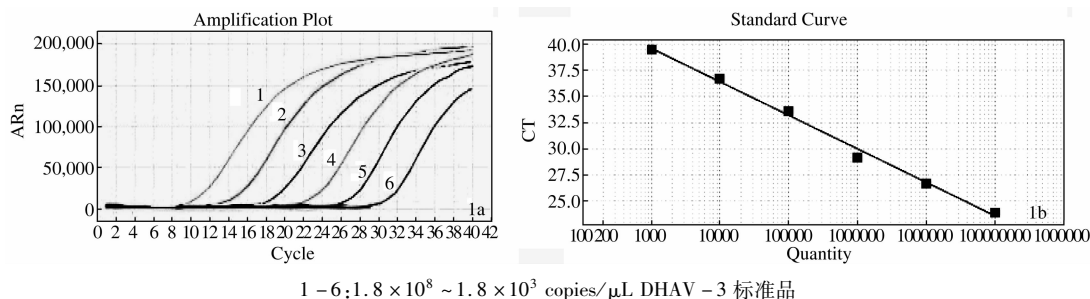


图 1 DHAV-3 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的动力学扩增曲线 (1a) 和标准曲线 (1b)

2.4 敏感性试验 对 $1.8 \times 10^3 \sim 1.8 \times 10^0$ copies/ μL 的标准品进行检测,其 CT 值分别为 29.72、32.15、35.72、38.00,阴性对照无 CT 值。根据扩增曲线得出本方法最低可检测至 36 拷贝数的目标 RNA 量 (图 2)。根据最低检测样本的 CT 值,并对检测结果的判断标准进行设定,CT 值在 38 以下为阳性,

在 38 ~ 40 之间为可疑,需进行重复检测。

2.5 特异性试验 结果表明,只有 DHAV-3 致弱疫苗株和阳性对照为阳性,其他病毒及阴性对照均为阴性,证明所建立的方法特异性良好 (图 3)。

2.6 重复性试验 所得检测结果经统计学处理后,计算批内变异系数分别为 2.36%、1.68% 和 1.36%,

均小于3%,说明离散程度在正常范围内,表明该检测方法重复性较好,检测结果可靠性高(图4)。

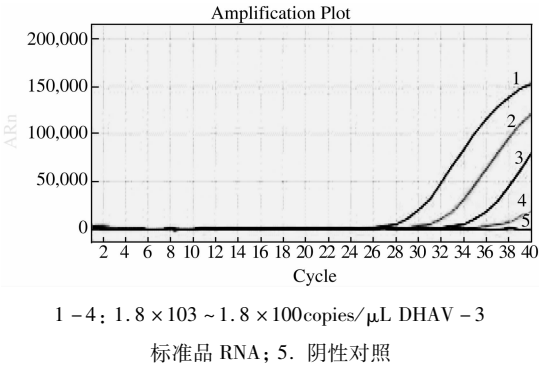


图2 DHAV - 3 实时荧光定量 RT - PCR
检测方法的敏感性试验

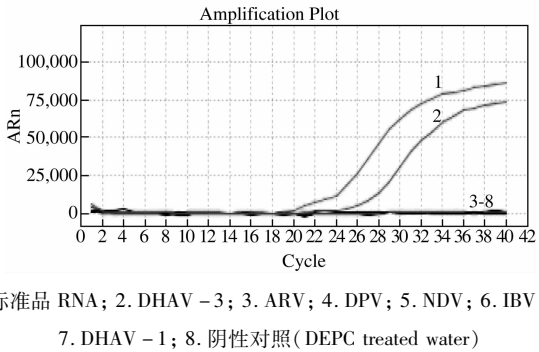


图3 DHAV - 3 实时荧光定量 RT - PCR
检测方法的特异性试验

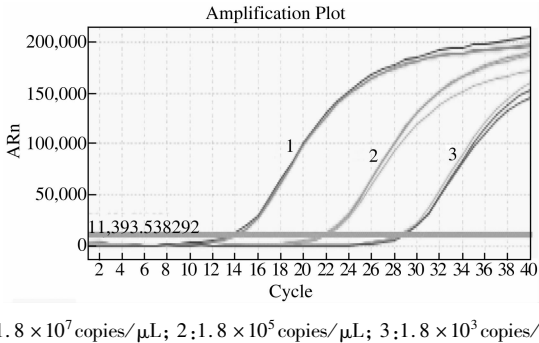


图4 DHAV - 3 实时荧光定量 RT - PCR
检测方法的重复性试验

2.7 临床样本的检测

2.7.1 临床分离株的检测验证 广西GX株和河北R株与H株(三株均为3型)的检测结果为阳性,而北京J株和山东SL株(二者均为1型)的检测结果均为阴性。进一步表明该检测方法可对不同地区分离DHAV - 3实现有效检测,而与DHAV - 1无交叉反应。

2.7.2 尿囊液病毒含量测定 ELD₅₀和RT - PCR两种检测方法均表明,在58~84 h时病毒量逐渐升高,但在102 h时病毒含量较低,且低于58 h死亡鸭胚尿囊液病毒含量(图5),说明ELD₅₀测定与所建立的实时荧光定量RT - PCR检测结果存在正相关。同时两种方法都提示此疫苗毒株接种后在84 h左右病毒含量达到最大值,过早或过晚死亡鸭胚尿囊液病毒量都会受到影响。

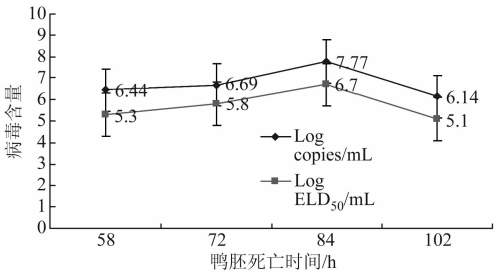


图5 不同时间段死亡鸭胚的尿囊液病毒含量

3 讨论

DHAV - 3是近年来在我国和韩国等国家和地区出现的一种新型病毒,这也是免疫了传统的DHAV - 1型疫苗和卵黄抗体后,鸭肝炎病毒病时有发生,以及发病后很难控制的主要原因^[8,11]。虽然中和试验为鸭肝炎确诊的可靠方法,但该方法操作繁琐,耗时费力,不利于疾病的早期快速诊断。另外还有琼脂扩散试验、间接血凝试验、免疫胶体金电镜技术、间接ELISA和DOT - ELISA以及RT - PCR等,但基本是对DHAV - 1型病毒进行检测^[15]。由于DHAV - 3在分子遗传学和抗原性上与DHAV - 1差异性较大,故以上报道的方法能否适合DHAV - 3的检测还是未知。而目前报道的关于DHAV - 3检测方法相对较少,对DHAV - 3引起的鸭肝炎的预防和控制带来很大的难度。

实时荧光定量PCR技术是在传统PCR基础上发展起来的分子检测技术,通过在反应体系中加入荧光基因,检测反应过程中荧光信号值的变化情况,实时判断模板中有无靶基因以及靶基因的扩增情况。近几年来实时荧光定量PCR技术在动物疫病的诊断中也得到了越来越广泛的应用^[16~18]。TaqMan探针法实时荧光PCR是一种应用比较广泛的荧光PCR技术,检测特异性相对较高,但该方法对引物和探针的要求也相对较高,尤其是探针的设计必须要保守、特异。DHAV虽然在3D区域十分保

守,但是该区域内设计出特异性检测 DHAV-3 的引物与探针,极为困难。参考文献[19],对 DHAV-3 5' UTR 区域进行序列比对,选择对于 DHAV-3 相对保守、特异区域进行引物与探针的设计。针对于有些 DHAV-3 毒株,可能有些碱基发生变异,因此在引物设计上采用兼并引物,以最大限度防止假阴性的产生。

我们所建立的实时荧光定量 RT-PCR 检测方法,可在 90 min 内完成样品中 RNA 的检测,相比传统的 RT-PCR、套式 PCR 等分子诊断方法,更加快捷、方便,且灵敏度更高。本研究为 DHAV-3 的快速诊断和流行病学调查提供了新的方法。对构建的重组质粒进行体外转录合成标准品 cRNA,通过建立标准曲线,可对检测样品中的病毒拷贝数进行绝对定量。通过该方法可以对鸡(鸭)胚培养的 DHAV-3 进行定量检测,为繁琐、耗时的 ELD₅₀测定提供了一种参考检测方法。不足之处是该方法所检测的病毒拷贝数为样品中总核酸拷贝数,而 ELD₅₀测定的是样品中活病毒量。如果病毒培养条件一致,收获及时,病毒保存条件适当,使用荧光定量 RT-PCR 检测出的病毒拷贝数与 ELD₅₀测定数值理论上呈正相关。因此通过检测所收获尿囊液病毒拷贝数,就可对 ELD₅₀进行初步估计,为疫苗的生产提供了一种质量快速检测手段。

参考文献:

- [1] 施少华,陈珍,黄瑜. 新型鸭病毒性肝炎最新研究进展[J]. 福建畜牧兽医,2008,30(4):33-34.
- [2] Fauquet C M, Mayo A, Maniloff J, *et al.* Virus taxonomy [M]. Eighth Report of International Committee on Taxonomy of Viruses, Calif: Elsevier Academic Press, 2005: 757-778.
- [3] 张艳芳,罗薇,刘群,等. 鸭肝炎病毒研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2011,7(38):171-175.
- [4] 袁率珍,范书才,李虹,等. 鸭肝炎病毒分子流行病学分析[J]. 中国预防兽医学报,2010,11(32):849-853.
- [5] Kim M C, Kwon Y K, Joh S J, *et al.* Recent Korean isolates of duck hepatitis virus reveal the presence of a new geno- and sero-type when compared to duck hepatitis virus type 1 strains[J]. Arch Virol, 2007, 152: 2059-2072.
- [6] Tseng C H, Tsai H J. Molecular characterization of a new serotype of duck hepatitis virus [J]. Virus Res, 2007, 126 (1-2): 19-31.
- [7] Fu Y, Pan M, Zhang D, *et al.* Molecular detection and typing of duck hepatitis A virus directly from clinical specimens [J]. Vet Microbiol, 2008, 131 (3/4): 247-257.
- [8] 刘建,苏敬良,张克新,等. 新型鸭肝炎病毒流行病学调查及免疫防治试验[J]. 中国兽医杂志, 2006, 42 (2): 3-6.
- [9] 苏敬良,黄瑜,贺荣连,等. 新型鸭肝炎病毒的分离及初步鉴定[J]. 中国兽医科技, 2002, 1: 15-16.
- [10] 罗玉均,张桂红,陈建红,等. I 型鸭肝炎病毒 R 株全基因组分析与检测技术的研究[J]. 中国农业科学, 2008, 41 (9): 2835-2842.
- [11] Kim M C, Kwon Y K, Joh S J, *et al.* Differential diagnosis between type-specific duck hepatitis virus type 1 (DHV-1) and recent Korean DHV-1-like isolates using a multiplex polymerase chain reaction [J]. Avian Pathology, 2008, 37 (2): 171-177.
- [12] Kim M C, Kwon Y K, Joh S J, *et al.* Development of one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction to detect duck hepatitis virus type 1 [J]. Avian Disease, 2007, 51 (2): 540-545.
- [13] Yang L, Li J, Bi Y, *et al.* Development and application of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of Duck hepatitis A virus type 1 [J]. Virus Genes, 2012, 45 (3): 585-589.
- [14] Yang M, Cheng A, Wang M. *et al.* Development and application of a one-step real-time Taqman RT-PCR assay for detection of Duck hepatitis virus type 1 [J]. Journal of Virological Methods, 2008, 153: 55-60.
- [15] Liu M, Zhang T, Meng F, *et al.* Development and evaluation of a VP1-ELISA for detection of antibodies to duck hepatitis type 1 virus [J]. Journal of Virological Methods, 2010, 169 (1): 66-69.
- [16] Wilhelm S, Zimmermann P, Selbitz H J, *et al.* Real-time PCR protocol for the detection of porcine parvovirus in field samples [J]. Journal of Virological Methods, 2006, 134 (1/2): 257-260.
- [17] Paul F H, Timothy J M. Multiplex real-time RT-PCR detection of three viruses associated with the bovine respiratory disease complex [J]. Journal of Virological Methods, 2011, 171: 360-363.
- [18] Meir R, Maharat O, Farnushi Y, *et al.* Development of a real-time TaqMan RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus in chickens, and comparison of RT-PCR and virus isolation [J]. Journal of Virological Methods, 2010, 163 (2): 190-194.
- [19] 杨利,曹三杰,文心田,等. 实时荧光定量 PCR 检测胸膜肺炎放线杆菌方法的建立及应用[J]. 农业生物技术学报, 2010, 18 (5): 1024-1030.

(责任编辑:李文平)