

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.11.03

鸭坦布苏病毒 RT-PCR 检测方法的建立及应用

邹敏¹, 张青¹, 王红¹, 刘东¹, 刘新文¹, 范根成^{1*}, 吴发兴^{2*}

(1. 青岛易邦生物工程有限公司 动物基因工程疫苗国家重点实验室, 山东青岛 266114;

2. 中国动物卫生与流行病学中心, 山东青岛 266032)

[收稿日期] 2018-09-05 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 11-0014-05 [中图分类号] S852.65

[摘要] 为建立一种能快速检测鸭坦布苏病毒 (Tembusu virus, TMUV) 的分子生物学方法, 从 GenBank 中下载了 51 个具有代表性的黄病毒全基因组序列及白洋淀病毒等 5 个禽源黄病毒株 E 基因序列, 进行了黄病毒 E 基因序列分析, 应用 Primer 5.0 软件设计了一对引物, 扩增目的片段为 549 bp, 进行了 TMUV RT-PCR 检测方法的特异性、敏感性、重复性试验, 建立了 TMUV RT-PCR 检测方法应用该方法对收集的 14 份临床疑似蛋鸭鸭坦布苏病毒病发病样品进行了检测, 共检出 6 份 TMUV 核酸阳性样品, 检出率达 42.86%。结果表明, 该方法可用于水禽坦布苏病毒病的临床快速诊断、检测及流行病学调查。

[关键词] 鸭坦布苏病毒; E 基因; RT-PCR

Establishment and Application of RT-PCR Detective Method for Duck Tembusu Virus

ZOU Min¹, ZHANG Qing¹, WANG Hong¹, LIU Dong¹, LIU Xin-wen¹,FAN Gen-cheng^{1*}, WU Fa-xing^{2*}

(1. Qingdao Yebio Bioengineering Co. Ltd., State Key Laboratory of Animal Genetic Engineering Vaccine, Qingdao, Shandong 266114, China;

2. China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao, Shandong 266032, China)

Corresponding authors: FAN Gen-cheng, E-mail: fgcheng@126.com; WU Fa-xing, E-mail: wufaxing@cahec.cn

Abstract: To provide a molecular biological method for rapid detection of the duck Tembusu virus (TMUV), the complete genome sequence of 51 representative Flavivirus, E gene of the BYD virus and 5 Avian Flavivirus were downloaded from the GenBank, multiple sequences analysis of Flavivirus E gene was carried out, and using the Primer 5.0 software, a pair of primers were designed, the motive fragment of amplification was 549 bp. A Tembusu virus RT-PCR detective method was established. The method had some advantages such as fast, specific, sensitive and repeatable. The method was used to detect 14 suspected clinic samples. There were 6 TMUV positive samples, the detection rate was 42.86%. The results showed that this method could be used for the rapid diagnosis, detect

基金项目: 青岛市动物保健品行业智库联合基金 (16-10-1-1-jch)

作者简介: 邹敏, 高级兽医师, 从事兽用生物制品研制工作; 张青, 从事兽用生物制品研发与质量管理工作, 为并列第一作者。

通讯作者: 范根成, E-mail: fgcheng@126.com; 吴发兴, E-mail: wufaxing@cahec.cn

and epidemiological investigation of the waterfowl Tembusu virus disease.

Key words: duck Tembusu virus; E gene; RT-PCR

2010 年 4 月以来,我国浙江、江苏、山东、福建、河北、北京等省份的蛋鸭发生一种以产蛋率急速下降甚至停产及不同程度死亡为特征的疫病,俗称鸭卵巢出血症,亦称为“鸭黄病毒感染”,现命名为鸭坦布苏病毒病(Duck Tembusu Virus Disease)^[1-2]。各品种蛋鸭、种鸭、鹅等家禽均有发生,但主要见于开产蛋鸭。产蛋鸭发病后出现长时间(40~60 d)的产蛋率低下,恢复后所产种蛋的受精率和孵化率出现下降。发病鸭群采食量显著下降,拉绿色稀便,精神沉郁,扎堆,羽毛逆立,眼球深陷,目光呆滞,体重减轻;少量病鸭出现站立不稳、震颤、行走困难和姿势异常;主要病变为出血性卵巢炎、间质性肝炎和非化脓性脑炎。该病近期成为危害中国养鸭业的重要疫病之一。产蛋率高的鸭群患病后 4~5 d 从产蛋高峰或高产蛋率迅速下降至 20%~30%,严重的于发病后 7 d 左右停产;刚开产蛋鸭产蛋率上升缓慢或减蛋,长时间低产蛋率或无产蛋高峰出现。不同地区、不同品种鸭群发病率高高低不一,群发病率几乎 100%,病死率 0%~12%^[3-5]。

由于是新发传染病,人们对该病原及由其感染导致的发病认识很不充分。对病原的生物学性状、实验室检测、诊断、治疗和疫苗等的研究尚处于起步阶段,缺乏能够快速诊断或检测方法。2011 年 3 月,从临床表现产蛋骤降的病死蛋鸭的 7 份发病组织样品(卵巢、肝脏等)中,成功分离到 4 株坦布苏病毒地方流行毒株(另文发表),借鉴现代分子生物学技术,在查阅已公开发表的黄病毒快速检测方法以及分子流行病学研究文献基础上,开展了本病的实验室快速 RT-PCR 检测研究。

1 材料与方法

1.1 毒株 鸭坦布苏病毒(Duck Tembusu virus, DTMUV)JN 株、禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)、新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)、减蛋综合症病毒(Chicken egg down syndrome virus,

EDSV)、鸭肝炎病毒(Duck hepatitis virus, DHV)、传染性法氏囊病毒(Infectious bursal disease virus, IBDV)、传染性支气管炎病毒(Infectious bronchitis virus, IBV)、番鸭呼肠孤病毒(Muscovy duck reovirus, MDRV)以及禽网状内皮增生症病毒(Avian reticuloendotheliosis virus, REV),由青岛易邦生物工程有限公司动物基因工程疫苗国家重点实验室保存并提供。

1.2 临床发病样品及预处理 共 14 份,由青岛易邦生物工程有限公司技术服务部提供。每份样品主要包括发病鸭的肝脏、卵巢组织等。样品的预处理方法是:取每份样品约 5.0 g 并剪碎,再加入 4 倍体积的 PBS(pH7.2),混匀后研磨至糊状,在-20℃、室温条件下反复冻融 3 次,再经 4℃、12000 r/min 离心 10 min,收集上清液分装后-80℃冻存备用。

1.3 试剂 DNAzol、Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司;PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2 试剂盒、DL 2000 DNA Marker 均购自宝生物(大连)工程有限公司;DNA 胶回收试剂盒购自上海生工生物工程有限公司。

1.4 引物设计 登录 GenBank,分别下载了 51 个具有代表性的黄病毒全基因组序列及 5 个禽源黄病毒株的全部或部分 E 基因序列,经 DNASTAR7.0 软件比对分析后,利用 Primer5.0 软件自主设计了 1 对检测引物,DTMUV-TF:5'-TTACCATGGACAGGGT-CATCA-3',DTMUV-TR:5'-TCCAATTGTGCTC-CCACTTCT-3',扩增片段大小为 549 bp,交由生工生物工程上海(股份)有限公司合成,稀释成工作浓度(20 pmol/L)-20℃保存备用。

1.5 病毒核酸的提取 按照 Invitrogen 公司生产的 Trizol 或 DNAzol 说明书分别提取上述 9 种病毒及 14 份样品中可能含有的 TMUV 总 RNA 或其他 DNA 病毒总 DNA,-20℃保存备用。

1.6 RT-PCR 方法的建立

1.6.1 RT-PCR 反应体系及程序 总体系 25 μ L, 包括 Primescript 1 step enzyme mix 2 μ L、2 $\times$ 1step buffer 12.5 μ L、DTMUV-TF 和 DTMUV-TR 各 0.5 μ L、DTMUV-JN 株总 RNA 2.5 μ L,最后用 DEPC H₂O 补至 25 μ L,反应程序:50 $^{\circ}$ C 30 min、94 $^{\circ}$ C 5 min、35 $\times$ (94 $^{\circ}$ C 40 s、4/54.5/55/55.5 $^{\circ}$ C 40 s、72 $^{\circ}$ C 50 s)、72 $^{\circ}$ C 10 min ,最后 4 $^{\circ}$ C 冷却 10 min,PCR 结束后取 5 μ L 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶 100 V 45 min 电泳检查并成像。

1.6.2 特异性试验 用确定的最佳条件分别对阳性对照及其他相关的 8 种病毒进行 RT-PCR 检测,对其特异性进行评价。取 PCR 产物 5 μ L,在 1% 琼脂糖凝胶上电泳。回收 549 bp 的目的条带,用上海生工生物工程技术有限公司生产的 DNA 胶回收试剂盒回收目的片段进行测序,并与黄病毒代表成员的 E 基因相应核酸片断进行在线 Blast 分析,以进一步验证本方法的特异性。

1.6.3 敏感性试验 将所提取的 DTMUV-JN 株总 RNA 进行定量,10 倍梯度连续稀释,按上述 PCR 反应进行扩增,测定模板最低检出量,判定该 RT-PCR 方法的敏感度。

1.6.4 重复性平行检测 将所提取的 DTMUV-JN 株总 RNA 平分为 5 份,分别交给 5 位实验室技术人员,按照 1.6.1 项下的条件进行 RT-PCR,验证该方法的可重复性。

1.6.5 临床样品的检测 对 14 份疑似鸭坦布苏病毒感染的样品按照建立并优化的 RT-PCR 方法进行检测。

2 结 果

2.1 反应条件的确定 按 1.6.1 项配制好反应体系进行梯度 PCR,电泳检测结果见图 1。筛选出 DTMUV 的最佳一步法 RT-PCR 检测退火温度是 55 $^{\circ}$ C,时长 40 s。

2.2 特异性试验 用确定的 RT-PCR 条件对阳性对照 JN 分离株、8 个参考毒株进行了 RT-PCR 扩增,结果仅有阳性对照有预期目的条带出现,其他 8 个参考毒株没有目的条带(图 2),说明本方法的特

异性极佳。回收目的条带测序获得 549 bp 的特异性核酸序列(图 3)。

2.3 敏感性试验 用设计的特异性引物对不同浓度的 DTMUV-JN 株 RNA 直接进行 RT-PCR 扩增,结果可检测出即使是将提取的核酸稀释至 10⁻⁶,仍能检出目的条带(图 4)。

2.4 临床样品的检测 应用建立的方法对 14 份临床疑似发病样品按照优化的 RT-PCR 条件进行检测,有 6 份阳性(图 5),经克隆测序表明均是阳性目的判断扩增,检出率为 42.86%。

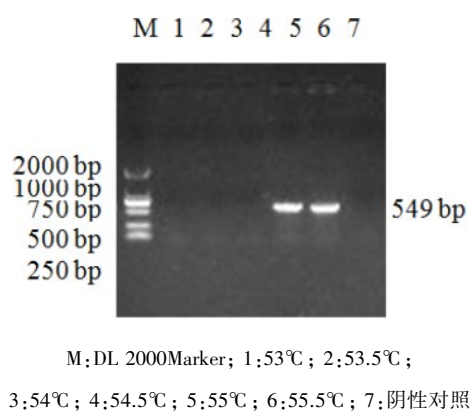


图 1 DTMUV RT-PCR 检测条件的确定
Fig 1 Determination of RT-PCR assay for DTMUV

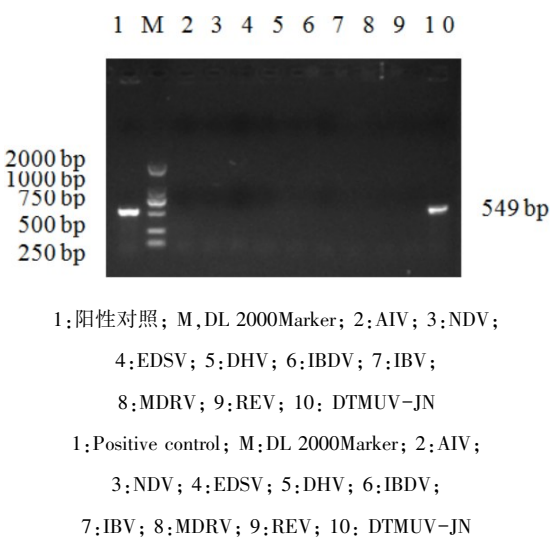
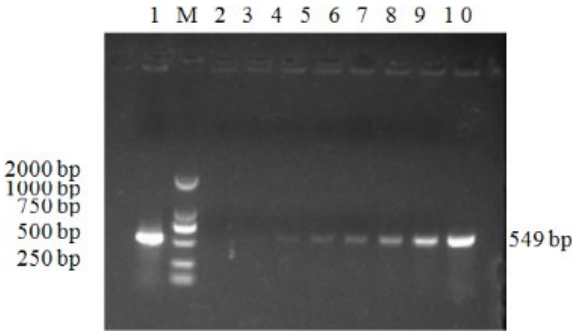


图 2 特异性实验
Fig 2 Specificity of RT-PCR assay

TTACCATGGA CAGGGTCATC AGCGGGGACG TGGCAAAACA AAGAGTCATT GACAGAGTTT GAGGAGGCCC
ACGCCACCAA ACAATCAGTG GTGGCTTTGG CATCACAAGA GGGAGCCCTC CATGCAGCAT TGGCGGGAGC
TATCCCAGTG AAGTACTCTG GAAGCAAATT GGAAATGACC TCAGGTCATC CTAATGCAG GGTAAATATG
CAGGGTTTGA AGCTGAAAGG AATGACCTAC CCGATGTGTA GCAATACATT TTCCTAGTG AAGAATCCTA
CCGACACTGG GCATGGCACT GTCGTGGTGG AATTGTCTTA TGCAGGCACC GATGGGCCCT GTAGAGTTCC
CATATCCATG TCGGCAGATC TGAATGACAT GACACCAGTT GGACGCTTGA TAACAGTCAA CCCATACGTG
TCGACCTCCT CCACGGGTGC CAAGATAATG GTGGAAGTGG AACCTCCATT CGGGGATTCA TTCATCTTAG
TAGGAAGTGG AAAAGGACAG ATTAGGTACC AGTGGCATAG AAGTGGGAGC ACAATTGGA

图 3 DTMUV-JN 株 E 基因扩增区域基因序列

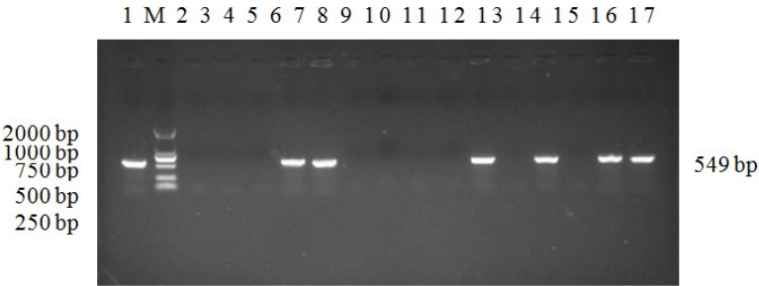
Fig 3 Gene sequence of E gene amplification region of DTMUV-JN strain



1: 阳性对照; M: DL 2000 Marker; 2: 10^{-9} ; 3: 10^{-8} ; 4: 10^{-7} ;
5: 10^{-6} ; 6: 10^{-5} ; 7: 10^{-4} ; 8: 10^{-3} ; 9: 10^{-2} ; 10: 10^{-1}
1: Positive control; M: DL 2000 Marker; 2: 10^{-9} ; 3: 10^{-8} ; 4: 10^{-7} ;
5: 10^{-6} ; 6: 10^{-5} ; 7: 10^{-4} ; 8: 10^{-3} ; 9: 10^{-2} ; 10: 10^{-1}

图 4 敏感性分析

Fig 4 Sensitivity of RT-PCR assay



1: 阳性对照; M: DL 2000Marker; 2-17: 待检疑似 DTMUV 发病样品
1: Positive control; M: DL 2000 Maker; 2-17: Suspected DTMUV samples

图 5 应用性检测

Fig 5 Application detection

3 讨 论

在前期调查研究以及曹贞贞等人研究基础上,已基本明确该病毒可能属于黄病毒科成员^[6]。根据国际病毒分类委员会第五次病毒分类报告,黄病毒科黄病毒属分为蜱传病毒、蚊媒病毒和节肢动物

媒介未知的病毒,其中,蚊媒病毒类又分为 Aroa 病毒群、登革热病毒群、日本脑炎病毒群、科科贝拉病毒群、恩塔亚病毒群、斯庞德温尼病毒群和黄热病病毒群^[7]。依据现有研究结果,黄病毒的基因组为单股正链 RNA,全基因组长约 10990 bp,分别编码

3 种结构蛋白(Capsid、PrM 和 Envelop)、8 种非结构蛋白(NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、2K、NS4B 和 NS5),另外在其基因组 5'端和 3'端均有一段非翻译区^[8]。为此,我们在设计检测引物时为便于今后开展分子流行病学研究,以 E 基因为检测靶基因,从 NCBI 上下载了 51 个黄病毒的全基因序列以及率先发表的白洋淀病毒(BYD virus)及相关水禽黄病毒的 E 基因进行了多序列比较,设计了一对黄病毒通用检测引物,以期获得较好的检测结果。结果证实,该方法是成功的,具有极佳的扩增效果。

准确、快速地诊断疫病是畜禽疫病防控工作的首要环节。传统的实验室诊断方法如病毒分离、免疫荧光法等不仅操作繁琐,而且耗时费力,而 PCR 或 RT-PCR 技术主要针对病原体的基因组,具有良好的敏感性和特异性,对样品的要求不高,已广泛应用于多种病原体的检测和流行病学调查^[9-11]。本研究设计了具有通用性的针对黄病毒 E 基因核酸序列的特异性引物对,建立的 DTMUV RT-PCR 方法具有较好的特异性,即使将阳性对照模板稀释至 10^{-6} 仍能够检测到目的片段,具有极好的重复性;对临床病料中的 14 份疑似病例进行检测,检出阳性样品 6 份,该种黄病毒感染阳性率达 42.86%,表明试验建立的 RT-PCR 方法可用于该病的实验室检测/诊断。

参考文献:

- [1] Su J, Li S, Hu X, *et al.* Duck egg-drop syndrome caused by BYD virus, a new Tembusu-related flavivirus[J]. PLoS ONE, 2011, 6(3): e18106.
- [2] 范根成, 刘东, 栾栋祖, 等. 一种新发鸭病的流行病学调查报告[J]. 中国动物检疫, 2011, 28(1): 68-69.
Fan G C, Liu D, Luan D Z, *et al.* An epidemiology survey of a new duck disease[J]. Chinese Journal of Animal Quarantine, 2011, 28(1): 68-69.
- [3] 滕巧泐, 颜丕熙, 张旭, 等. 一种新的黄病毒导致蛋鸭产蛋下降及死亡[J]. 中国动物传染病学报, 2010, 18(6): 1-4.
Teng Q Y, Yan P X, Zhang X, *et al.* An novel flavivirus causing

duck egg drops and death[J]. Chinese Journal of Veterinary Parasitology, 2010, 18(6): 1-4.

- [4] 张大丙. 鸭出血性卵巢炎发生的本质与危害[J]. 中国禽业导刊, 2012, 29(6): 8-9.
Zhang D B. Essence and damage of duck hemorrhagic otis[J]. Guide of Chinese Poultry, 2012, 29(6): 8-9.
- [5] 韦天超, 农海连, 磨美兰, 等. 鸭出血性卵巢炎病原学研究进展[J]. 广西畜牧兽医, 2012, 28(3): 182-184.
Wei T C, Nong H L, Mo M L, *et al.* Research progress on etiology of duck hemorrhagic otis[J]. Guangxi Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2012, 29(3): 182-184.
- [6] 曹贞贞, 张存, 黄瑜, 等. 鸭出血性卵巢炎的初步研究[J]. 中国兽医杂志, 2010, 46(12): 3-7.
Huang Z Z, Zhang C, Huang Y, *et al.* Preliminary studies on duck hemorrhagic ovaritis[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2010, 46(12): 3-7.
- [7] 李泽君. 鸭坦布苏病毒病原的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 中国家禽, 2011, 33(17): 34-35.
Li Z J. Isolation, identification and biological characteristics of the pathogen of duck tembusu virus disease[J]. China Poultry, 2011, 33(17): 34-35.
- [8] Yan P, Zhao Y, Zhang X, *et al.* An infectious disease of ducks caused by a newly emerged Tembusu virus strain in mainland China[J]. Virology, 2011, 417(1): 1-8.
- [9] Lanciotti R S. Molecular Amplification assays for the detection of Flaviviruses[J]. Adventure Virus Research, 2003, 61: 67-99.
- [10] 万春和, 施少华, 程龙飞, 等. 鸭出血性卵巢炎病毒 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 福建农业学报, 2011, 26(1): 10-12.
Wan C H, Shi S H, Cheng L F, *et al.* Establishment of RT-PCR for detecting duck hemorrhagic ovaritis[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2011, 26(1): 67-69.
- [11] 王林川, 李庆阳, 陈瑞爱, 等. 鸭出血性卵巢炎广东病例报道及其 RT-PCR 方法的建立[J]. 广东畜牧兽医科技, 2011, 36(6): 27-29.
Wang L C, Li Q Y, Chen R A, *et al.* Duck hemorrhagic ovaritis in Guangdong province and the construction of a RT-PCR detection method[J]. Guangdong Animal Husbandry and Veterinary Medicine Science, 2011, 36(6): 27-29.

(编辑:李文平)