

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.04.01

H10 亚型和 N8 亚型禽流感病毒 三重 RT-PCR 检测方法的建立

罗思思, 谢芝勋*, 谢志勤, 谢丽基, 邓显文, 范 晴,
黄娇玲, 张艳芳, 王 盛, 曾婷婷, 张民秀

(广西壮族自治区兽医研究所, 广西兽医生物技术重点实验室, 南宁 530001)

[收稿日期] 2018-11-21 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 04-0001-05 [中图分类号] S852.65

[摘 要] 根据基因库中 H10 亚型禽流感病毒(AIV) HA 基因、N8 亚型 AIV NA 基因和所有亚型 AIV M 基因序列, 分别设计筛选出 3 对特异性引物, 优化引物之间的浓度, 建立了 H10 亚型和 N8 亚型 AIV 三重 RT-PCR 检测方法。该法对含有 H10 和 N8 亚型 AIV 的模板可特异性扩增出 267 bp (H10 亚型 AIV)、464 bp (N8 亚型 AIV) 和 693 bp (AIV) 目的条带, 对 H10 亚型 AIV 扩增出 267、693 bp 目的条带, 对 N8 亚型 AIV 扩增出 464、693 bp 目的条带, 对其他亚型 AIV 仅扩增出 693 bp 目的条带, 对常见禽病病原体均未扩增出任何条带。该法对 H10 亚型和 N8 亚型 AIV 检测下限为 10^3 拷贝/ μL 。120 份临床样品检测结果与病毒分离鉴定一致。研究建立的 H10 亚型和 N8 亚型 AIV 三重 RT-PCR 检测方法特异性强、灵敏度高, 为同时快速鉴别检测 H10 亚型和 N8 亚型 AIV 提供一种简便、快速和有效的方法。

[关键词] 禽流感病毒; H10 亚型; N8 亚型; 三重 RT-PCR

Development of a Triplex RT-PCR Assay for Detection of H10 and N8 Subtypes Avian Influenza Virus

LUO Si-si, XIE Zhi-xun*, XIE Zhi-qin, XIE Li-ji, DENG Xian-wen, FAN Qing,
HUANG Jiao-ling, ZHANG Yan-fang, WANG Sheng, ZENG Ting-ting, ZHANG Min-xiu

(Guangxi Veterinary Research Institute, Guangxi Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Nanning 530001, China)

Corresponding author: XIE Zhi-xun, E-mail: xiezhixun@126.com

Abstract: According to the sequences of HA, NA and M genes of H10, N8 and all subtypes Avian influenza virus (AIV) in GenBank, three pairs of specific primers were designed respectively, and the concentration of the primers were optimized to develop a triplex RT-PCR assay for detection H10 and N8 subtypes. It was shown that

基金项目: 广西科技重大专项(桂科 AA17204057); 广西科技基地和人才专项(桂科 AD16380009); “广西八桂学者”专项(2019.79); 国家“万人计划”领军人才专项(W02060083)

作者简介: 罗思思, 副研究员, 从事畜禽病原学和防控技术的研究。

通讯作者: 谢芝勋。E-mail: xiezhixun@126.com

the templates including H10 and N8 subtypes AIV could be amplified into three specific bands by this RT-PCR, the lengths of these bands were 267 bp (H10-AIV), 464 bp (N8-AIV) and 693 bp (all AIV), respectively. Samples containing H10 or N8 subtype AIV could be amplified into two specific bands, which were 267 and 693 bp, 464 and 693 bp, respectively. Samples containing other subtypes AIV could be amplified into a 693 bp specific band. No specific band was amplified from other avian pathogenic virus. The limit of detection for H10 and N8 subtypes AIV was 10^3 copies/ μ L. In the detection of one hundred twenty clinical samples, the results of triplex RT-PCR were accorded with the viral isolation completely. In conclusion, this triplex RT-PCR assay is a specific, sensitive method for the detection of H10, N8 and all subtypes AIV in the same tube. It can be applied in rapid detection for all subtype AIV, and also provide a rapid, simple and effective tool to simultaneously differential diagnosis for H10 and N8 subtype AIV.

Key words: Avian influenza virus; H10 subtype; N8 subtype; triplex RT-PCR

禽流感病毒 (Avian influenza virus, AIV) 根据表面糖蛋白 (hemagglutinin, HA) 和神经氨酸酶 (neuraminidase, NA) 抗原性差异分为不同的亚型, 目前已发现有 18 种 HA 亚型 (H1-H18) 和 11 种 NA 亚型 (N1-N11)^[1-2]。2013 年 12 月 6 日, 江西省南昌市一名 73 岁女子罹患 H10N8 甲型禽流感, 因呼吸衰竭、休克死亡, 全球首次发现人类感染 H10N8 亚型 AIV 可导致死亡。截至 2014 年 2 月 15 日, 在江西共确诊 3 人感染 H10N8 亚型 AIV, 其中 2 人死亡^[3-4]。H10 和 N8 亚型 AIV 在家禽和野鸟散发, 主要是 H10N7 和 H3N8^[5]。H10N8 亚型 AIV 感染人虽散发, 但是否存在后续的感染, 或是否存在 H10 亚型和其他 N 亚型、其他 H 亚型和 N8 亚型的感染, 均需监测 H10 和 N8 亚型 AIV 的感染情况, 因此, 十分有必要建立一种同时鉴定 H10 亚型和 N8 亚型 AIV 的检测方法, 为这两个亚型的检测提供有效方法和技术储备。

目前, 诊断 H10 亚型和 N8 亚型 AIV 的方法主要是病毒分离鉴定, 作为诊断的金标准, 结果准确可靠, 但存在检测周期长的缺点; 免疫荧光和酶联免疫吸附试验均需特定的阳性血清, 在实际应用中有一定的局限性。多重 RT-PCR 是在普通 RT-PCR 基础上发展而来的, 已成功应用于很多病原体的检测^[6-8]。H10 亚型和 N8 亚型的分子生物学检测方法十分欠缺, 本研究旨在建立一种同时检测

H10 亚型、N8 亚型和所有亚型 AIV 的三重 RT-PCR 方法, 同时对 3 个目的基因进行扩增, 以节约检测试剂, 简化反应程序。

1 材料与方法

1.1 毒株和主要试剂 AIV 毒株 (H3N8、H6N8、H1N1、H3N2、H4N6、H6N1、H9N2 和 H11)、新城疫病毒 (NDV)、传染性支气管炎病毒 (IBV)、传染性喉气管炎病毒 (ILTV) 和传染性法氏囊病毒 (IBDV) 由广西兽医研究所分离鉴定保存; AIV 毒株 (H2N3、H8N4、H10N3、H12N5) 由香港大学惠赠; AIV 毒株 (H10N7、H5N1、H7N2、H13N6、H14N5、H15N9 和 H16N3) cDNA 由美国康涅狄格大学惠赠; AIV 毒株 (H1N7 和 H11N9) 由美国宾夕法尼亚州立大学惠赠。Minibest viral RNA/DNA extraction kit ver.4.0 和反转录试剂和 PCR premix 购自大连宝生物公司。

1.2 引物设计 根据基因库中 H10 亚型 AIV 的 HA 基因、N8 亚型 AIV 的 NA 基因和所有亚型 AIV 的 M 基因, 用 DNASTar 软件比对序列找出保守区域, 用 primer 5.0 软件分析引物的扩增条件, 每个基因均设计了 3 对特异性引物, 并用 NCBI Blast 初步验证引物的特异性。序列送至广州 invitrogen 公司合成。引物合成后, 通过实际试验进行平行筛选, 最终各自筛选出最佳的 1 对引物 (表 1), 用于 H10 亚型、N8 亚型和所有亚型 AIV 的检测。

表 1 引物信息

Tab 1 The information of primers

引物 Primer	引物序列 (5'-3') Sequences of primers	产物大小/bp Size of PCR product	Genbank 登录号 Genbank accession	位置 Position
H10-F	GAARATWATGGARAGTGGAGG	267	KM392411.1	351-371
H10-R	CCATAYAGATCATTCCTTYTCTTG			617-595
N8-F	AAYTGGACHGGAACCAACAG	464	KM392405.1	882-901
N8-R	CCACACATCACAATGGAGCT			1345-1326
M-F	GCCCAGTGAGCGAGGACTGC	693	KM392406.1	229-248
M-R	CAGGCACTCCTTCCGTAGAAG			921-901

1.3 病毒 RNA 提取与 RT-PCR 反应条件的优化

按照 Minibest viral RNA/DNA extraction 试剂盒说明书抽提病毒 RNA,并将 RNA 反转录为 cDNA。PCR 反应体系 25 μ L:2 $\times$ PCR premix 12.5 μ L,正、反引物终浓度在 0.1~0.6 μ mol/L 之间调整,cDNA 2 μ L,以无 RNA 酶的超纯水补足 25 μ L。反应程序如下:94 $^{\circ}$ C 5min;94 $^{\circ}$ C 40 s, 50~57 $^{\circ}$ C 之间调整 40 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.4 标准品的制备 用 HA、NA 和 M 基因全长引物,分别以 H10 亚型、N8 亚型 AIV 和任一亚型 AIV 的 RNA 为模板进行 RT-PCR 扩增,得到基因全长的目的片段,将这 3 个基因片段分别连接至 pGEM T-easy 载体上,将含有 HA、NA 和 M 基因片段的正确序列的重组质粒分别命名为 H10、N8 和 M。

1.5 特异性试验 按照优化好的反应条件,用所建立 H10 亚型和 N8 亚型 AIV 三重 RT-PCR 检测方法对 1.1 项所列毒株的 RNA/DNA 进行检测,检验其特异性。

1.6 敏感性试验 将“1.4”构建好的重组质粒进行等比例混合,并将混合质粒 10 倍梯度稀释,按照优化好的反应条件,用所建立的方法对其进行 PCR 扩增,检验其敏感性。

1.7 临床样品检测 用所建立的方法对 120 份活禽市场棉拭子(同一只家禽的咽喉、泄殖腔拭子为一份)样品进行检测,同时将这 120 份样品接种 10 日龄 SPF 鸡胚增殖病毒,用血凝试验(HA)和血凝抑制试验(HI)对尿囊液进行 HA 亚型的鉴定,将鉴定过的 HA 毒株,用 NA 基因全长引物 PCR 扩增和

测序,确定 NA 亚型。

2 结果与分析

2.1 反应条件的优化 通过引物之间浓度的优化,H10-F 和 H10-R 引物终浓度为 0.2 μ mol/L, N8-F和 N8-R 引物终浓度为 0.4 μ mol/L, M-F 和 M-R 引物终浓度为 0.2 μ mol/L。通过退火温度的优化,确定最佳退火温度为 52 $^{\circ}$ C。

2.2 特异性试验 该法对 H10 和 N8 亚型 AIV 的混合模板扩增出 3 条特异性条带,分别为 267、464 和 693 bp;对 H10Ny(如 H10N7、H10N3,y $\neq$ 8)亚型 AIV 扩增出 2 条特异性条带,片段大小为 267 和 693 bp;对 HxN8(如 H6N8、H3N8,x $\neq$ 10)亚型 AIV 扩增出 2 条特异性条带,片段大小为 464 和 693 bp;对其他亚型 AIV 扩增出 693 bp M 基因通用检测的条带;而常见禽病病原体均未扩增出任何条带。所有毒株的扩增结果均与实际相符,表明该法特异性强。部分毒株的扩增结果见图 1。

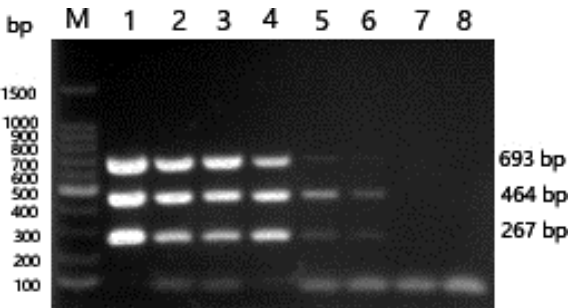
2.3 敏感性试验 该法对浓度为 10⁸~10 拷贝/ μ L 的 H10、N8 和 M 混合质粒进行敏感性测定,图 2 结果显示:浓度为 10⁸~10⁴ 拷贝/ μ L 的混合质粒均有 3 条明显的扩增条带出现,片段大小分别为 267 bp (H10)、464 bp(N8)、693 bp(M);浓度为 10³ 拷贝/ μ L 的混合质粒有 2 条明显的扩增条带出现,片段大小分别为 267 bp (H10)、464 bp(N8),已检测不到 693 bp M 基因条带;浓度为 100 拷贝/ μ L 混合质粒的检测均无扩增条带。结果表明,H10 和 N8 亚型 AIV 的最低检测限为10³ 拷贝/ μ L,AIV M 基因引物最低检测限为 10⁴ 拷贝/ μ L。



M. 100 bp Marker; 1. H10+N8; 2. H10N7; 3. H6N8; 4. H1N1; 5. H1N7; 6. H2N3; 7. H3N2; 8. H4N6; 9. H5N1; 10. H6N1; 11. H7N2; 12. H8N4; 13. H9N2; 14. H11N9; 15. H12N5; 16. H13N6; 17. H14N5; 18. H15N9; 19. H16N3; 20. NDV; 21. IBV; 22. ILTV; 23. IBDV; 24. 空白对照

图 1 特异性试验结果

Fig 1 The results of specificity test



M. 100 bp Marker; 1. 10^8 拷贝/ μL ; 2. 10^7 拷贝/ μL ; 3. 10^6 拷贝/ μL ; 4. 10^5 拷贝/ μL ; 5. 10^4 拷贝/ μL ; 6. 10^3 拷贝/ μL ; 7. 100 拷贝/ μL ; 8. 阴性对照

图 2 敏感性试验结果

Fig 2 The results of sensitivity test

2.4 临床样品检测 用所建立的 H10N8 亚型 AIV 三重 RT-PCR 方法对 120 份活禽市场样品进行检测,结果检出 2 份 H10N_y 亚型 AIV ($y \neq 8$), 3 份 H_xN8 (如 $x \neq 10$), 与 HI 和测序结果一致。

3 讨论与结论

在 2013 年 12 月江西发现人类感染 H10N8 之前,公共资源只能查到 26 株 H10N8 的序列;H10 亚型曾有感染人的报道,分别是 2004 年埃及 H10N7 和 2010 年澳大利亚 H10N7,病人出现结膜炎和轻度呼吸道症状,N8 亚型未有感染人的报道^[5];我国仅有两例 H10N8 亚型 AIV 感染家禽的报道,一株是 2007 年从湖南洞庭湖湿地抽检的水样中分离到的^[9],被命名为 A/environment/Dongting Lake/Human/

3-9/2007(H10N8),另一株则是于 2012 年 1 月从广东活禽市场的鸭中分离出来^[10],被命名为 A/Duck/Guang-dong/E1/2012(H10N8)。此次江西人类感染株与之前的 H10N8 不同,尤其 6 个内部基因均来源于 H9N2。2013 年爆发的 H7N9 毒株的 6 个内部基因也来源于 H9N2,但 H10N8 的 6 个内部基因与 H7N9 不同。有报道对江西第一例 H10N8 亚型 AIV 人类感染株(A/Jiangxi-Donghu/346/2013)的受体结合特性进行了研究,结果表明对人源受体亲和力极弱,并不具备在人群中传播的能力^[4]。

目前,H10N8 感染人有 3 个病例,在人类属于散发,但已能在活禽市场中分离出鸡 H10N8^[11]。我们对广西活禽市场进行 AIV 调查,H10 较多与其他亚型混合感染,尚未单独分离出 H10 亚型,N8 亚型鉴定出的有 H3N8、H4N8、H6N8,尚未分离出 H10N8 毒株^[12]。由于样品限制,并未用 H10N8 毒株对该法进行验证,在特异性试验中,只用 H10 和 N8 亚型混合模板来验证该三重 RT-PCR 的特异性,还需更多临床样品对该法进行验证。基于我们对 AIV 的日常监测,发现相比以前,H10 亚型和 N8 亚型分离率有所增加,并鉴于发生了 H10N8 感染人的案例,且之前就有 H10 亚型与其他 N 亚型(H10N7、H10N2、H10N1)^[13-15],其他 H 亚型与 N8 亚型的报道(H3N8、H4N8、H6N8),因此本研究想建立同时鉴定 H10 亚型和 N8 亚型 AIV 检测方法,

对这两个亚型进行追踪检测,为 AIV 的有效防控提供参考资料。

本研究将 M 基因通用检测所有亚型 AIV 的引物,与 H10 亚型、N8 亚型 AIV 的引物混合在同一反应体系中,对样品中含有 H10 亚型和 N8 亚型的,多一道验证其确属 AIV 的感染,对样品中含有其他亚型 AIV 的,也能检测出,让我们了解到是否存在 AIV 的感染,为是否需要进一步确认其他亚型 AIV 提供参考。引物设计和浓度的优化是该法成功建立的关键。本研究针对 H10、N8 和 M 基因序列保守区域,结合 primer 5.0 软件的引物参数,初步筛出候选引物,再用 NCBI-BLAST 模拟检查引物的特异性,但引物是否真正可行,还需经过实际的试验来验证。通过优化 3 对引物之间的浓度,用单一模板(H10 亚型、N8 亚型、不同亚型 AIV)、混合模板(H10 和 N8 亚型)和常见禽病病原体作为模板对该法进行特异性的验证,用含有 H10、N8 和 M 基因的质粒标准品进行敏感性测定,结果表明所建立的 H10 亚型和 N8 亚型 AIV 三重 RT-PCR 检测方法特异性强、敏感性高,一管即可检测 H10、N8 和 M 三个目的基因,具有有效、简便、快速、省时省力的优点,为 H10 亚型和 N8 亚型 AIV 调查监测提供技术支持。

参考文献:

- [1] Tong S, Zhu X, Li Y, *et al.* New world bats harbor diverse influenza A viruses[J]. PLoS Pathog, 2013, 9(10): e1003657.
- [2] Chan J F, To K K, Tse H, *et al.* Interspecies transmission and emergence of novel viruses: lessons from bats and birds[J]. Trends Microbiol, 2013, 21: 544-555.
- [3] Qi W, Zhou X, Shi W, *et al.* Genesis of the novel human-infecting influenza A(H10N8) virus and potential genetic diversity of the virus in poultry, China[J]. Euro Surveil, 2014, 19(25): pii: 20841.
- [4] Wang M, Zhang W, Qi J, *et al.* Structural basis for preferential avian receptor binding by the human-infecting H10N8 Avian influenza virus[J]. Nat Commun, 2015, 6: 5600.
- [5] Chen H, Yuan H, Gao R, *et al.* Clinical and epidemiological characteristics of a fatal case of Avian influenza A H10N8 virus infection; a descriptive study[J]. Lancet, 2014, 383 (9918):

714-721.

- [6] 刘婷婷, 谢芝勋, 宋德贵, 等. H3N2 亚型禽流感病毒三重 RT-PCR检测方法的建立[J]. 动物医学进展, 2015, 2: 7-11. Liu T T, Xie Z X, Song D G, *et al.* Simultaneous detection of H3N2 subtypes and M gene of Avian influenza virus by triplex PCR[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2015, 2: 7-11.
- [7] 罗思思, 谢芝勋, 刘加波, 等. H7N9 亚型禽流感病毒三重 PCR 检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(2): 61-64. Luo S S, Xie Z X, Liu J B, *et al.* Development of a triplex PCR assay for detection of H7N9 subtype Avian influenza virus[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2014, 41(2): 61-64.
- [8] 罗思思, 谢芝勋, 刘加波, 等. H7N9 亚型 AIV 双重实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 动物医学进展, 2013, 12: 1-5. Luo S S, Xie Z X, Liu J B, *et al.* Development of a duplex real-time PCR for detection of H7N9 Avian influenza virus[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2013, 12: 1-5.
- [9] Zhang H, Xu B, Chen Q, *et al.* Characterization of an H10N8 influenza virus isolated from Dongting lake wetland[J]. Virol J, 2011, 8: 42.
- [10] Jiao P, Cao L, Yuan R, *et al.* Complete genome sequence of an H10N8 Avian influenza virus isolated from a live bird market in Southern China[J]. J Virol, 2012, 86 (14): 7716.
- [11] Ni X, He F, Hu M, *et al.* Investigation of Avian influenza virus in poultry and wild birds due to novel avian-origin influenza A (H10N8) in Nanchang City, China[J]. Microbes Infect, 2015, 17(1): 48-53.
- [12] Luo S, Xie Z, Xie Z, *et al.* Surveillance of live poultry markets for low pathogenic Avian influenza viruses in Guangxi province, Southern China, from 2012-2015[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 17577.
- [13] Wu H, Lu R, Wu X, *et al.* Novel reassortant H10N7 avian influenza viruses isolated from chickens in Eastern China[J]. J Clin Virol, 2015, 65: 58-61.
- [14] Wu H, Lu R, Wu X, *et al.* Isolation and characterization of a novel H10N2 Avian influenza virus from a domestic duck in Eastern China[J]. Infect Genet Evol, 2015, 29: 1-5.
- [15] Bonfante F, Fusaro A, Zanardello C, *et al.* Lethal nephrotropism of an H10N1 Avian influenza virus stands out as an atypical pathotype[J]. Vet Microbiol, 2014, 173(3/4): 189-200.