

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.2.01

鹅星状病毒、鹅细小病毒双重 PCR 检测方法的建立及初步应用

苗艳,朱庆贺,陈亮,兰世捷,冯万宇,李丹,黄宝银,沈思思,史同瑞

(黑龙江省农业科学院畜牧兽医分院,黑龙江齐齐哈尔 161000)

[收稿日期] 2020-08-17 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021) 02-0001-05 [中图分类号] S852.65

[摘要] 为快速鉴别诊断鹅星状病毒(GoAstV)和鹅细小病毒(GPV),根据GoAstV和GPV基因序列保守区域设计了两对特异性引物,通过PCR扩增目的片段并构建重组质粒,建立了一种可同时检测这两种病毒的PCR诊断方法。该方法能够特异性扩增出两种病毒的相应片段,而对鹅副粘病毒(GPMV)、鹅流感病毒(GAIV)、鹅腺病毒(GADV)、鹅圆环病毒(GoCV)均无扩增,对重组质粒的最低检测拷贝数分别为 1.25×10^3 copies和 1.25×10^5 copies。应用该方法对50份鹅临床脏器样品进行检测,结果检测出GoAstV 35份、GPV 2份,GoAstV和GPV混合感染2份。结果表明,研究建立的双重PCR检测方法快速、特异、敏感,可用于GoAstV和GPV的流行病学调查和疾病监测。

[关键词] 鹅星状病毒;鹅细小病毒;双重PCR

Establishment and Primary Application of a Duplex PCR Method for Detection of Goose Astrovirus and Goose Parvovirus

MIAO Yan, ZHU Qing-he, CHEN Liang, LAN Shi-jie, FENG Wan-yu,

LI Dan, HUANG Bao-yin, SHEN Si-si, SHI Tong-ru

(Branch of Animal Husbandry and Veterinary of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihar, Heilongjiang 161000, China)

Abstract: In order to quickly detect goose astrovirus (GoAstV) and goose parvovirus (GPV) simultaneously, a duplex PCR method was established by designing two pairs of specific primers targeting the conserved sequence of GoAstV and GPV, amplifying the target fragment and constructing recombinant plasmid. The results showed that the target fragments of these two viruses were amplified, but no amplification of goose paramyxovirus (GPMV), goose influenza virus (GAIV), goose adenovirus (GADV), goose circovirus (GoCV). The minimum detection copy number for recombinant plasmid of GoAstV and GPV were 1.25×10^3 and 1.25×10^5 , respectively. A total number of 50 fecal samples from goose were tested by the established duplex PCR, of which 35 samples were GoAstV positive, 2 samples were GPV positive, and 2 samples were GoAstV and GPV positive. The above results

indicate that the duplex PCR method established in this study is rapid, specific and sensitive, and can be used for epidemiological investigation and disease surveillance of the above two viruses.

Key words: GoAstV; GPV; duplex PCR

雏鹅痛风是一种由新型鹅星状病毒(Goose astrovirus, GoAstV)引起的以内脏尿酸盐沉积为主要特征的疾病^[1], 4~21日龄雏鹅易感, 发病率80%左右, 致死率30%~50%^[2-4]。该病首次于2017年爆发, 近年来在黑龙江、辽宁、江西、湖南、福建、河北、江苏、安徽、山东、河南、广东、四川等省都有爆发该病的报道, 目前尚无有效疫苗可用, 给养鹅业造成巨大经济损失^[5-7]。鹅细小病毒病是一种由鹅细小病毒(Goose parvovirus, GPV)引起的急性、接触性、致死性疾病, 以发生渗出性肠炎为主要特征, 主要侵害4~20日龄雏鹅。该病传播速度快, 发病率和致死率都较高, 对养鹅业威胁巨大, 严重限制了养鹅业的发展, 目前中国、英国、瑞典等多个国家和地区都对该病进行了报道^[8-10]。

GoAstV和GPV是对水禽养殖威胁严重的两种病毒, 目前已有二者混合感染的报道^[11-12], 因此急需一种能够快速、特异鉴别诊断这两种病毒的方法用于流行病学调查和疾病防控。目前用于检测GPV的方法有ELISA、TaqMan PCR和环介导等温PCR等^[13-15]; 用于检测GoAstV的方法主要是TaqMan PCR^[16]。PCR检测方法较ELISA、TaqMan PCR和环介导等温PCR等检测方法具有简单、易操作、检测时间短、成本低等特点, 而且也具有较高的特异性和敏感性; 而双重PCR可在同一体系中同时对两种病原进行检测。因此, 本研究根据GoAstV和GPV基因序列保守区域设计合成了两对特异性扩增引物, 对PCR反应体系及反应条件进行优化, 研究建立了一种可同时检测GoAstV和GPV的双重PCR检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒株 鹅星状病毒病、鹅细小病毒病阳性病料均由实验室分离并保存。

1.1.2 主要试剂 总RNA提取试剂盒购自元亨生

物技术有限公司; Taq酶、M-MLV、RNase Inhibitor购自宝日医生物技术(北京)有限公司; 质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司; PMD19-T购自大连宝生物工程有限公司。

1.1.3 主要仪器 多功能基因扩增仪, FlexCycler2型, 德国耶拿分析仪器股份公司; 电子分析天平, ME204/02型, 梅特勒-托利多(上海)有限公司; 电泳仪(DYY-6D型)、紫外仪(WD-9403D型), 北京六一生物科技有限公司; 双光速紫外可见分光光度计, UV-1900 PC型, 上海佑科仪器仪表有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成 根据GenBank上已发表的GoAstV和GPV的基因序列, 通过DNASar软件比对筛选出各自序列的相对保守区域, 利用Oligo7.0、primer5.0设计引物。引物由吉林省库美生物科技有限公司合成, 引物序列及扩增长度见表1。

表1 PCR引物设计结果

Tab 1 Results of primers design for PCR		
引物名称	引物序列(5'-3')	产物大小/bp
GoAstV-F	AGCATCAGGGAAAACGG	461
GoAstV-R	GCAGAGCCAGGTAATCG	
GPV-F	AATACCATTAGAGGACGCT	135
GPV-R	TCAGACACAACAGGAAGCTAG	

1.2.2 样品的处理和模板的制备 取GoAstV和GPV的组织病料样品放入研钵中充分研磨, 向研钵中加入适量0.9%的生理盐水稀释病料, 取稀释好的病料以8000 r/min离心5 min, 取上清150 μL于干净的EP管中备用。GoAstV和GPV总RNA和总DNA的提取分别按照RNA提取试剂盒和DNA提取试剂盒说明书上所述方法进行, 再将所提取的

GoAstV 总 RNA 按照反转录酶说明书上所述方法反转录为 cDNA, -20 °C 贮存备用。

1.2.3 阳性重组质粒的制备 取所制备的模板 DNA 进行 PCR, PCR 反应体系如下 (25 μL): 无菌水 16.3 μL, 10 × pfu buffer 2.5 μL; Taq DNA Polymerase 0.2 μL; dNTP (2.5 mmol/L) 2 μL; 上下游引物 (10 μmol/L) 各 1.0 μL; 模板 DNA 2 μL。反应条件为: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 47.9 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 循环 35 次; 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 胶回收试剂盒回收、纯化。将所回收的 PCR 产物与 PMD19-T 载体连接并转化至 Dh5α 感受态细胞中, PCR 鉴定为阳性的重组质粒送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序, 将测序结果显示正确的阳性重组质粒保存于 -20 °C 中备用。

1.2.4 PCR 反应条件的优化 (引物浓度和退火温度) 以所制备的 GoAstV 和 GPV 两种病毒的阳性重组质粒为模板, 按照 1.2.3 中的 PCR 反应体系和反应条件进行扩增, 对其中的退火温度和引物浓度进行优化, 即退火温度在 47 ~ 52 °C 之间选取了 7 个梯度进行优化, 两种病毒的引物浓度组合情况见表 2, 其他条件不变。

表 2 引物浓度优化组合

Tab 2 The different combination of primer concentration

引物	引物浓度 / (μmol · L ⁻¹)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
GoAstV - F/R	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6
GPV - F/R	0.3	0.6	0.9	1.2	1.5	1.8	2.1	2.4

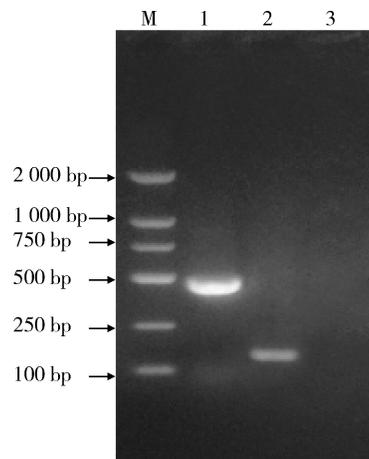
1.2.5 特异性检测 以 GoAstV 和 GPV 阳性重组质粒为标准阳性, 用上述所建立的双重 PCR 检测方法对 GPMV、GAIV、GADV 和 GoCV 的 DNA 或 cDNA 模板进行扩增, 以检测所建立双重 PCR 方法的特异性。

1.2.6 敏感性检测 分别用紫外分光光度计测定 GoAstV 和 GPV 阳性重组质粒的浓度, 计算模板质粒的拷贝数, 将阳性重组质粒进行 10 倍梯度稀释, 共 9 个梯度, 即 1.25 × 10⁸ copies ~ 1.25 × 10⁰ copies。

1.2.7 临床样品的检测 共采集 50 份临床鹅组织样品, 按照 1.2.2 中的方法处理样品, 并提取和制备模板, 用上述实验中所建立的 PCR 检测方法对临床样品进行检测, 其中人工混合的两种病毒的阳性样品作为阳性标准品对照。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增和阳性重组质粒的鉴定 以所制备的 GoAstV 病毒的 cDNA 和 GPV 病毒的 DNA 为模板, 按照 1.2.3 中的方法对 GoAstV 和 GPV 进行 PCR 扩增, 结果分别特异性扩增出目的片段, 大小分别为 461 bp 和 135 bp, 与预期大小一致。扩增产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 结果见图 1。两种病毒目的片段阳性的重组质粒测序分析结果表明, 成功构建了以上两种病毒的 pMD19-T 阳性重组质粒。



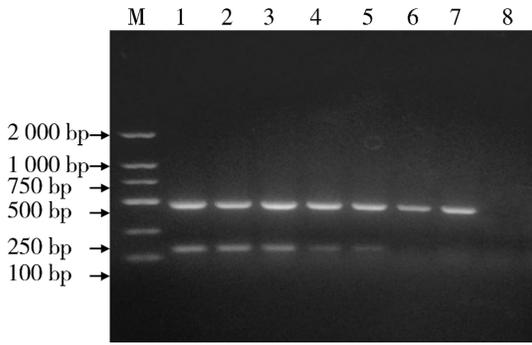
M: DL2000 Marker; 1: GoAstV PCR 产物; 2: GPV PCR 产物; 3: 阴性对照

M: DL2000 Marker; 1: PCR product of GoAstV; 2: PCR product of GPV; 3: Negative control

图 1 单一 PCR 扩增

Fig 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products of the single PCR

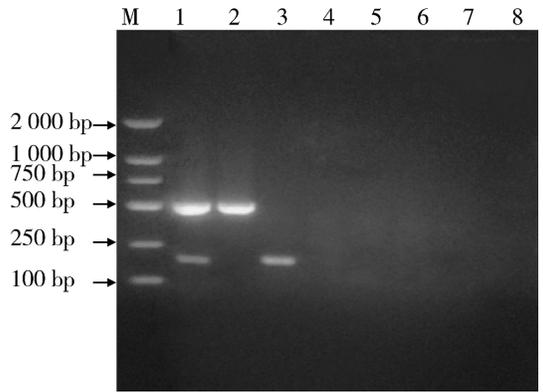
2.2 PCR 反应条件的优化 当退火温度为 47.9 °C, GoAstV 和 GPV 引物浓度分别为 1.0 μmol/L 和 1.5 μmol/L 时, 各目的基因片段均能得到较好的扩增, 优化产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳, 结果见图 2 和图 3。



M: DL2000 Marker;1: 47.0 °C;2: 47.3 °C;3:47.9 °C;
4: 48.9 °C;5: 50.1 °C;6: 51.1 °C;7: 51.7 °C;8: Negative control

图 2 双重 PCR 退火温度的优化

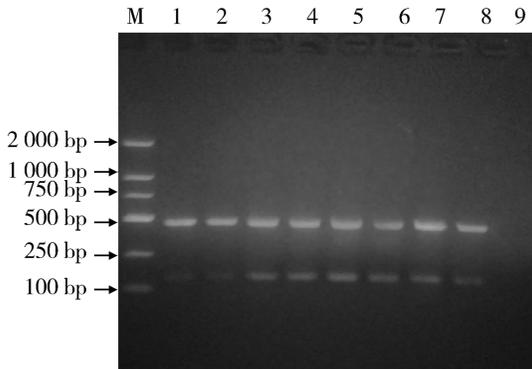
Fig 2 Optimization of annealing temperature for the duplex PCR



M: DL2000 Marker;1: GoAstV + GPV;2:GoAstV;3: GPV;
4: GPMV;5: GAIV;6: GADV;7:GoCV;8: Negative control

图 4 双重 PCR 的特异性扩增结果

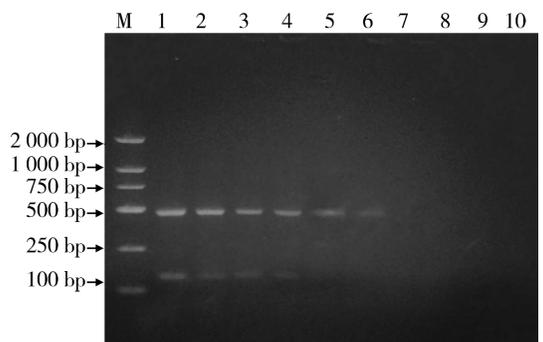
Fig 4 Specific amplification results of the duplex RT-PCR



M: DL2000 Marker;1-8:组合 1-组合 8;9: 阴性对照
M: DL2000 Marker;1-8: Combination 1-8;9: Negative control

图 3 双重 PCR 引物浓度的优化

Fig 3 Optimization of primer concentration for the duplex PCR



M: DL2000 Marker;1: 1.25×10^8 copies;2: 1.25×10^7 copies;
3: 1.25×10^6 copies;4: 1.25×10^5 copies;5: 1.25×10^4 copies;
6: 1.25×10^3 copies;7: 1.25×10^2 copies;8: 1.25×10^1 copies;
9: 1.25×10^0 copies;10: Negative control

图 5 双重 PCR 敏感性扩增结果

Fig 5 Sensitivity amplification results of the duplex PCR

2.3 PCR 的特异性 所建立的双重 PCR 检测方法能够特异性扩增 GoAstV 和 GPV 两种病毒的单一阳性样品和混合阳性样品,而对 GPMV、GAIV、GADV 和 GoCV 阳性样品均无扩增(图 4),表明所建立的双重 PCR 检测方法具有较好的特异性。

2.4 PCR 的敏感性 所建立的双重 PCR 检测方法对 GoAstV 和 GPV 的最低检测拷贝数分别为 1.25×10^3 copies 和 1.25×10^5 copies,结果如图 5 所示,表明所建立的双重 PCR 检测方法敏感度较高。

2.5 PCR 对临床样品的检测 对所采集的 50 份临床鹅组织样品进行检测,共检测出 GoAstV 35

份、GPV 2 份,GoAstV 和 GPV 混合感染 2 份,结果如表 3 所示,表明所建立的双重 PCR 检测方法能够用于 GoAstV 和 GPV 临床样品的检测。

表 3 临床样品检测结果

Tab 3 Detection results of clinical samples		
病原	阳性样品数/份	阳性率/%
GoAstV	35	70.00
GPV	2	4.00
GoAstV + GPV	2	4.00
合计	35	70.00

3 讨论与小结

GoAstV 是一种 2017 年新出现的病毒,自发现以来已被广泛报道;GPV 是一种引起水禽(鸭、鹅)高发病率和死亡率的病毒。本研究根据 GoAstV 和 GPV 在相应文献中提到的最保守基因进行设计两对特异性引物,所扩增出的条带大小相差在 200 bp 以上,易于区分,成功建立了一种可以同时检测 GoAstV 和 GPV 进行检测的双重 PCR 检测方法,且特异性强、敏感性高,对 GoAstV 和 GPV 阳性重组质粒的最低检测拷贝数分别为 1.25×10^3 copies 和 1.25×10^5 copies。临床样品的检测结果显示,GoAstV 的检出率达 70% 以上,说明 GoAstV 的感染率较高,危害严重。所检出的两份 GPV 都与 GoAstV 呈混合感染,说明 GPV 和 GoAstV 可能常易伴发感染。由于目前样品检测数目的限制,还需进一步进行临床样品的收集和检测。本研究中所建立的双重 PCR 检测方法能够用于监测 GoAstV 和 GPV 在中国的流行情况,并可作为诊断这两种疾病的工具。

参考文献:

[1] Wan C H, Chen C T, Cheng L F, *et al.* A novel group of avian Avastrovirus in domestic geese, China [J]. *J Vet Med Sci*, 2018, 80(5): 798–801.

[2] Zhang X Y, Ren D, Li T F, *et al.* An emerging novel goose Astrovirus associated with gosling gout disease, China [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2018, 7(1): 152.

[3] Yuan X Y, Meng K, Zhang Y X, *et al.* Genome analysis of newly emerging goose – origin nephrotic Astrovirus in China reveals it belongs to a novel genetically distinct Astrovirus [J]. *Infect Genet Evol*, 2019, 67: 1–6.

[4] Niu X Y, Tian J J, Yang J, *et al.* Novel goose Astrovirus associated gout in Gosling, China [J]. *Vet Microbiol*, 2018, 220(7): 53–56.

[5] 章丽娇,黄欣梅,刘飞,等. 新型鹅星状病毒 AHQJ18 株的分离鉴定 [J]. *江苏农业学报*, 2019, 35(5): 1262–1264.

Zhang L J, Huang X M, Liu F, *et al.* Isolation and identification of a novel goose Astrovirus AHQJ18 [J]. *Journal of Jiangsu Agri-*

culture, 2019, 35(5): 1262–1264.

- [6] 邵骞骏,李阁,张思旺,等. 一例鹅痛风病的诊断 [J]. *兽医科学*, 2019(6): 86–87.
- Shao A J, Li G, Zhang S W, *et al.* Diagnosis and treatment of a case of goose gout [J]. *Veterinary Science*, 2019(6): 86–87.
- [7] Yang J, Tian J J, Tang Y, *et al.* Isolation and genomic characterization of gosling gout caused by a novel goose Astrovirus [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2018, 65(6): 1689–1696.
- [8] Irvine R, Ceeraz V, Cox B, *et al.* Goose parvovirus in Great Britain [J]. *Vet Rec*, 2008, 163(15): 461–461.
- [9] Jansson D S, Feinstein R, Kardi V, *et al.* Epidemiologic investigation of an outbreak of goose parvovirus infection in Sweden [J]. *Avian Dis*, 2007, 51(2): 609–613.
- [10] Niu Y J, Zhao L L, Liu B H, *et al.* Comparative genetic analysis and pathological characteristics of goose parvovirus isolated in Heilongjiang, China [J]. *Virol J*, 2018, 15(1): 27.
- [11] 刘苗苗,赵宇,黄学婷,等. 雏鹅星状病毒与鹅细小病毒混合感染的病理诊断 [C]. 中国会议, 2019.
- Liu M M, Zhao Y, Huang X T, *et al.* Pathologic diagnosis of goose Astrovirus and goose parvovirus mixed infection [C]. *China Meeting*, 2019.
- [12] Liu H M, Hu D M, Zhu Y Q, *et al.* Coinfection of parvovirus and Astrovirus in gout – affected goslings [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2020. Online ahead of print.
- [13] Fan J H, Zuo Y, Yang Z, *et al.* The development of an indirect ELISA for the detection of antibodies to goose parvovirus in blood serum [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2013, 57(1): 26–32.
- [14] Wan C H, Chen C T, Cheng L F, *et al.* Specific detection and differentiation of classic goose parvovirus and novel goose parvovirus by TaqMan realtime PCR assay, coupled with host specificity [J]. *BMC Vet Res*, 2019, 15(1): 1–8.
- [15] Yang J L, Yang R, Cheng A C, *et al.* A simple and rapid method for detection of goose parvovirus in the field by loop – mediated isothermal amplification [J]. *Virol J*, 2010, 7: 14.
- [16] Yuan X Y, Meng K, Zhang Y X, *et al.* Establishment and application of rapid diagnosis for reverse transcription – quantitative PCR of newly emerging gooseorigin nephrotic Astrovirus in China [J]. *mSphere*, 2018, 3(6): e00380–18.

(编辑:李文平)