

应用半套式 RT-PCR 技术诊断番鸭呼肠孤病毒病

林锋强, 胡奇林, 陈少莺, 欧阳岁东, 陈仕龙, 朱小丽, 程晓霞

(福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福建福州 350003)

摘要: 参考 GenBank 中番鸭呼肠孤病毒 (muscovy duck reovirus, MDRV) S1 基因序列设计并合成 3 条引物 C1、HP11 和 HP12, 组成半套式 RT-PCR, 扩增片段为 300 bp。应用该半套式 RT-PCR 对 MDRV、禽呼肠孤病毒 (ARV)、番鸭细小病毒 (MPV)、鹅细小病毒 (GPV)、鸡胚成纤维细胞 (CEF) 和番鸭胚成纤维细胞 (MDEF) 培养物进行扩增。结果仅能从 MDRV 中扩增出 300 bp 特异片段, 而不能从 ARV、MPV、GPV、CEF 和 MDEF 细胞培养物中扩增出特异片段; 该方法检测灵敏度为 1 fg 核酸, 重复性好。对人工感染和临床疑似病例用病毒分离和半套式 RT-PCR 进行检测, 2 种方法符合率为 100%。因此, 该半套式 RT-PCR 可以用于番鸭呼肠孤病毒病的临床快速检测。

关键词: 半套式 RT-PCR; 诊断; 番鸭呼肠孤病毒

中图分类号: S852.659.4 文献标识码: A 文章编号: 1001-411X(2007)02-0107-03

Diagnosis of Muscovy Duck Reovirus Disease by Semi-Nested RT-PCR

LIN Feng-qiang, HU Qi-lin, CHEN Shao-ying, OUYANG Sui-dong,

CHEN Shi-long, ZHU Xiao-li, CHENG Xiao-xia

(Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China)

Abstract: According to the nucleotide sequence of the S1 gene of MDRV registered in GenBank, a set of primers C1, HP11 and HP12 were designed to amplify a specific 300 bp fragment by semi-nested RT-PCR. The specific product could only be amplified from MDRV, but not from ARV, GPV, MPV, CEF and MDEF cell cultures by this method. The detectable dsRNA amount by this method was 1 fg and which had high specificity and repeatability. Pathological tissues of artificial infection and suspicious clinical samples were diagnosed by virus isolation and semi-nested RT-PCR. The coincidence rate of the two methods was 100%. So this semi-nested RT-PCR could be used for rapid detection of the muscovy duck reovirus disease.

Key words: semi-nested RT-PCR; diagnosis; muscovy duck reovirus

番鸭呼肠孤病毒 (muscovy duck reovirus, MDRV) 病是近几年在福建、广东、浙江等地番鸭饲养区出现的一种新传染病, 能够引起番鸭、半番鸭和鹅发病, 其病原是 MDRV^[1-2]。对番鸭的发病日龄为 7~45 日龄, 发病率为 30%~90%, 病死率为 60%~80%, 临床上应用抗生素、磺胺类药物及卵黄抗体均无防治作用, 给养禽业造成巨大经济损失^[3-6]。目前该病广泛流行于法国、以色列、德国、意大利等国, 是影响番鸭业生产的主要疫病之一。快速诊断是有效预防该病的前提, 目前国内外 MDRV 病的诊断方法主要采用病毒分离鉴定^[2]、血清中和试验和 RT-PCR

方法^[3], 但病毒分离和鉴定及血清中和试验费时 (需 7 d 以上)、繁琐; RT-PCR 方法对临床样品的检出率不高^[7], 不适于本病的快速诊断。本试验建立了半套式 RT-PCR, 并用于 MDRV 病的诊断。

1 材料与方法

1.1 毒株

禽呼肠孤病毒 (ARV) 标准毒株 S1133 引自中国兽医监察所; 番鸭呼肠孤病毒 MDRV-MW9710、MDRV-MW9806、MDRV-MW9809、MDRV-MW9810 和 EF37 株于 1997—1998 年分离自福建省福州市、福清

收稿日期: 2006-05-30

作者简介: 林锋强 (1976—), 男, 助理研究员; 通讯作者: 胡奇林 (1963—), 男, 研究员, 硕士, E-mail: hql562712@sina.com

基金项目: 福建省自然科学基金 (B0510032); 福建省科技项目 (2001Z061)

市、莆田市和广东省湛江市,与番鸭细小病毒(MPV)福州株均由福建省农业科学院畜牧兽医研究所动物病毒室分离、鉴定和保存;鹅细小病毒(GPV)由扬州大学王永坤教授惠赠。

1.2 主要试剂及胚蛋

TRIZOL 试剂为 invitrogen 公司产品;RT-PCR 试剂盒和 1 kb DNA ladder 为大连宝生物工程(大连)有限公司产品;12~13 日龄番鸭胚来源于福建省莆田县克里莫种番鸭场。

1.3 引物设计和合成

根据 GenBank 已发表的 MDRV 89 026 株的 S1 基因序列(AJ278102)设计了 3 条引物 C1、HP11 和 HP12,组成半套式 RT-PCR,扩增长度为 300 bp. 引物由上海生物工程公司合成。

1.4 病毒培养及 RNA 提取

将 ARV 接种鸡胚成纤维细胞(CEF),GPV 和 MPV 接种番鸭成纤维细胞(MDEF). 当细胞病变达 80% 以上,收集细胞,按 TRIZOL 说明书提取病毒 RNA,用无 RNase 的灭菌双蒸水溶解 RNA 沉淀,将所提取的病毒 RNA 溶液于紫外分光光度计下测定 $D_{260\text{ nm}}$ 、 $D_{280\text{ nm}}$, 计算 RNA 浓度, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存。

1.5 反转录(cDNA 合成)

采用 10 μL 体系,在 PCR 反应管中分别加入 2 μL 25 mmol/L MgCl_2 , 2 μL 5 $\times$ AMV 缓冲液, 1 μL 10 mmol/L dNTP, 0.5 μL 随机引物, 0.5 μL 反转录酶, 0.25 μL RNA 酶抑制剂(40 U), 模板 RNA 1 μL , 用无 RNase 水调至总体积 10 μL , 瞬时离心混匀. 反应程序: $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min $\rightarrow$ $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 min $\rightarrow$ $99\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min。

1.6 PCR 扩增

采用 50 μL 体系,在 10 μL RT 产物管中分别加入 1 μL 25 mmol/L MgCl_2 , 5 μL 10 $\times$ PCR 缓冲液, 引物 C1 100 ng、HP11 100 ng 和 HP12 150 ng, 0.25 μL Taq 酶(5 U/ μL), 用无 RNase 水加至总体积 50 μL , 瞬时离心混匀. 反应程序: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min $\rightarrow$ ($94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min $\rightarrow$ $57\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min $\rightarrow$ $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1.5 min, 30 个循环) $\rightarrow$ $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min $\rightarrow$ $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min $\rightarrow$ ($94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min $\rightarrow$ $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min $\rightarrow$ $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1.5 min, 25 个循环) $\rightarrow$ $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min $\rightarrow$ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min。

1.7 RT-PCR 特异性测定

5 株 MDRV、MDEF、CEF、ARV S1133 株、MPV 在同一系统中进行 RT-PCR, 以评价该 RT-PCR 的特异性。

1.8 RT-PCR 敏感性测定

将所提取的 MW9710 株 RNA 进行定量, 作 10 倍梯度稀释后进行 RT-PCR, 测定其敏感性。

1.9 RT-PCR 重复性测定

利用引物对 MDEF 对照、ARV S1133 株、MDRV-

MW9710、MDRV-MW9806、MDRV-MW9809 和 MDRV-MW9810 株病毒 RNA 样品分别进行 3 次 RT-PCR 扩增。

1.10 人工感染样品采集和检测

取从莆田克里莫种番鸭场购入的 1 日龄番鸭 43 羽, 随机分成 2 组: 对照组 13 羽、试验组 30 羽, 对照组每羽腿部肌肉注射 Hank's 液 0.2 mL, 试验组每羽腿部肌肉注射 MDRV-MW9710 株细胞培养毒 (MW9710M5D2M5) 0.2 mL ($2 \times 10^{5.0}$ TCID₅₀), 隔离饲养, 对照组和试验组分别于接种后 7、9、11、13 d 扑杀健康鸭和病鸭, 取其心、肝、脾、肾、胰, 磨成匀浆后分成 2 份. 一份接种 12 日龄番鸭胚进行病毒分离和鉴定, 另一份参照谢芝勋等^[8]的方法提取核酸用于半套式 RT-PCR。

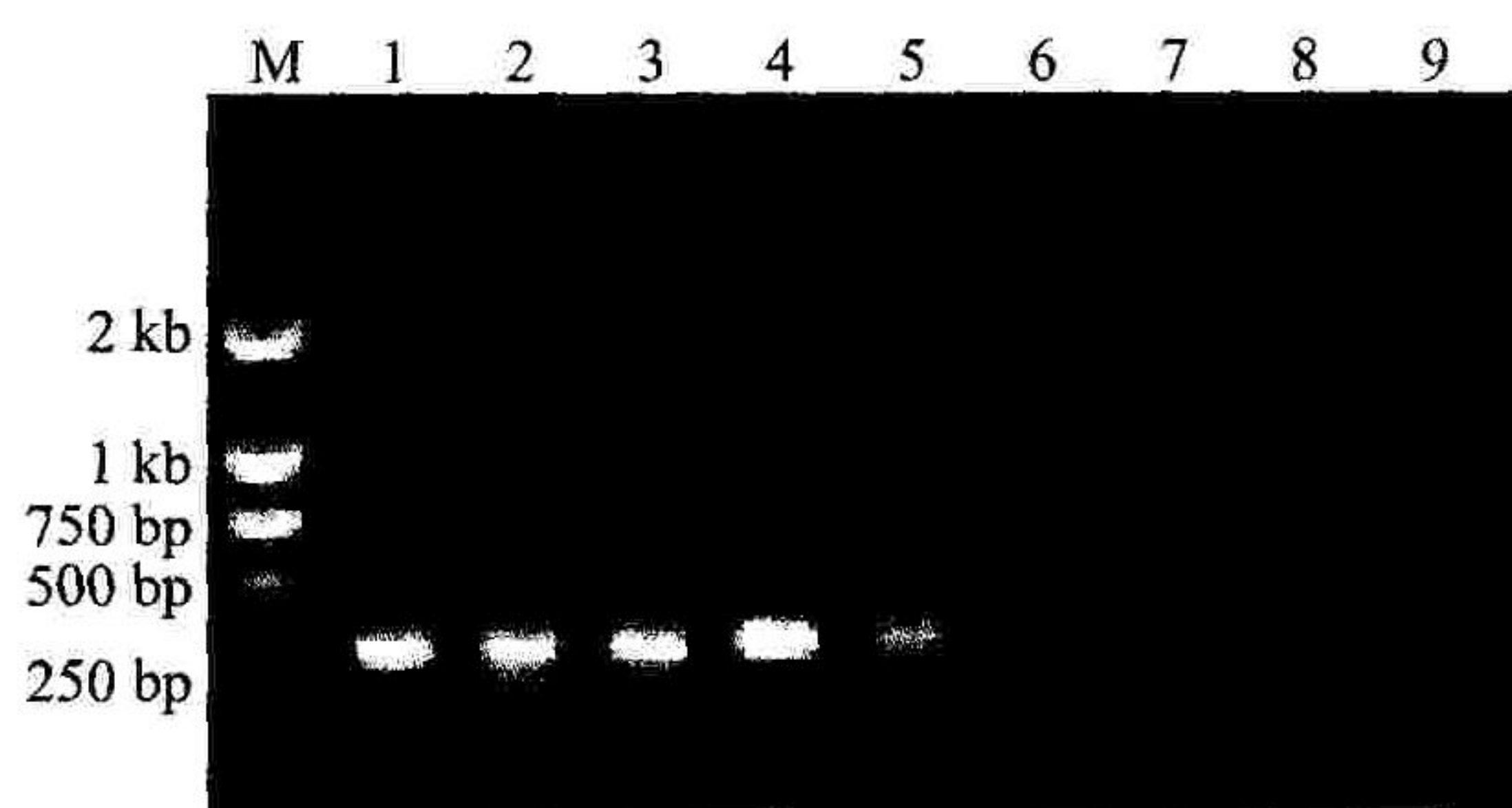
1.11 对临床疑似病例的检测

对来自福州、莆田、福清、长乐等地 32 例(覆盖鸭群 2 万余羽)临床上疑似 MDRV 病病例无菌取其心、肝、脾、肾、胰, 磨成匀浆后分成 2 份. 一份接种 12 日龄番鸭胚进行病毒分离和鉴定, 另一份参照谢芝勋等^[8]的方法提取核酸用于半套式 RT-PCR 方法进行诊断。

2 结果

2.1 半套式 RT-PCR 特异性测定

该半套式 RT-PCR 从 5 株 MDRV 均能扩增出 1 条 300 bp 的特异条带, 不能从 MDEF、CEF、ARV S1133 株、GPV、MPV 扩增出任何条带, 表明该半套式 RT-PCR 对 MDRV 是特异的(图 1)。



M: 1 kb DNA ladder; 1~5: 分别为呼肠孤病毒 MW9710、MW9806、MW9809、MW9810 和 EF37 株; 6: ARV S1133 毒株; 7: MDEF 对照; 8: CEF 对照; 9: MPV 对照

M: 1 kb DNA ladder; 1-5: MDRV-MW9710, MDRV-MW9806, MDRV-MW9809, MDRV-MW9810 and EF37 strain respectively; 6: ARV S1133 strain; 7: MDEF culture control; 8: CEF culture control; 9: MPV

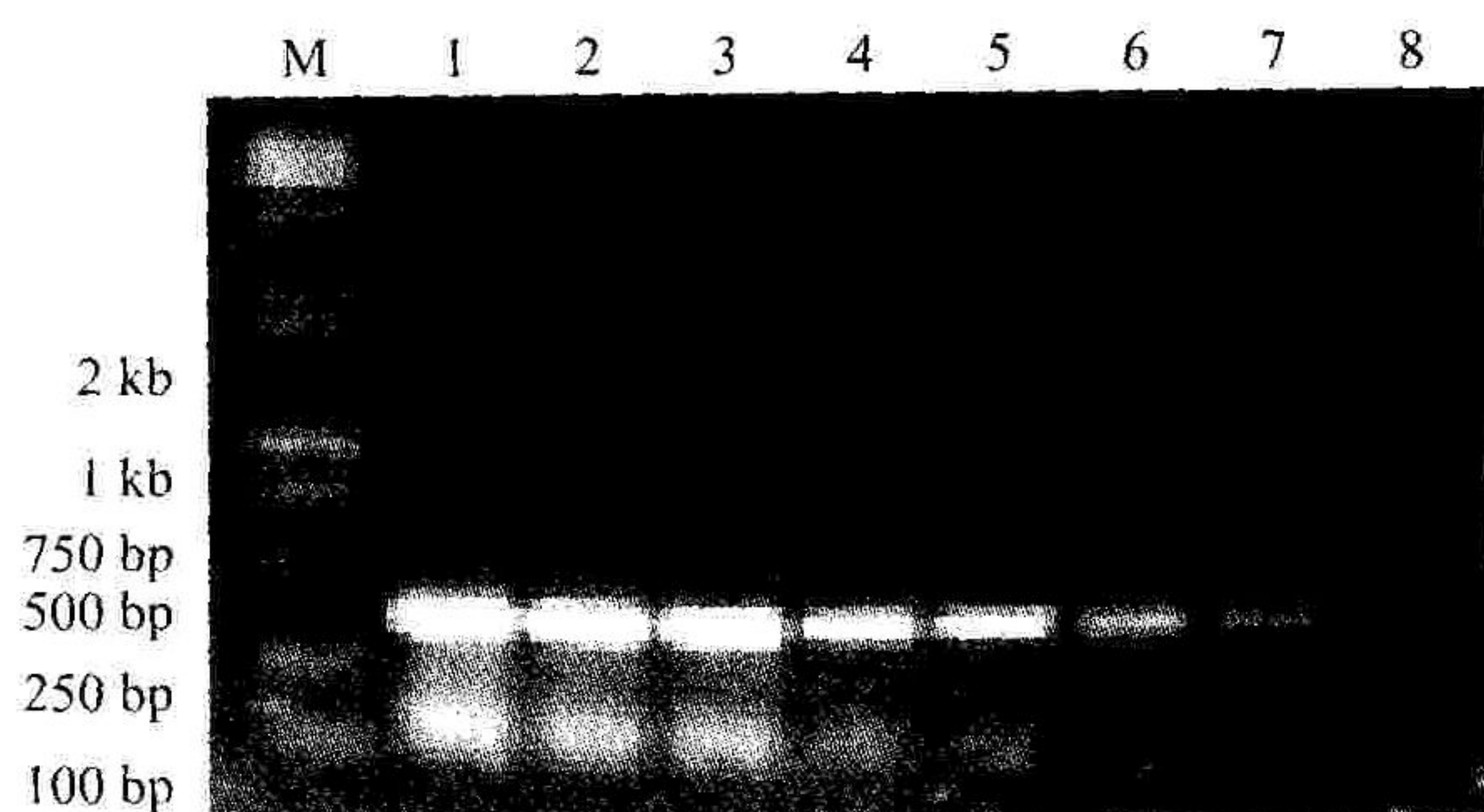
图 1 半套式 RT-PCR 特异性扩增图谱

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of specific products amplified by semi-nested RT-PCR

2.2 RT-PCR 敏感性测定

对不同浓度的 MDRV 核酸进行半套式 RT-PCR 扩增, 结果表明该 RT-PCR 能检测出 1 fg 的病毒

RNA,说明该 RT-PCR 方法用于检测 MDRV 具有很高的敏感性,见图2.



M:1 kb DNA ladder; 1~8: 分别为1 ng、100、10、1 pg、100、10、1、0.1 fg 核酸样品

M:1 kb DNA ladder, 1-8: 1 ng, 100, 10, 1 pg, 100, 10, 1, 0.1 fg nucleic acid samples respectively

图2 半套式 RT-PCR 敏感性扩增图谱

Fig. 2 Sensitivity of semi-nested RT-PCR

2.3 RT-PCR 的重复性

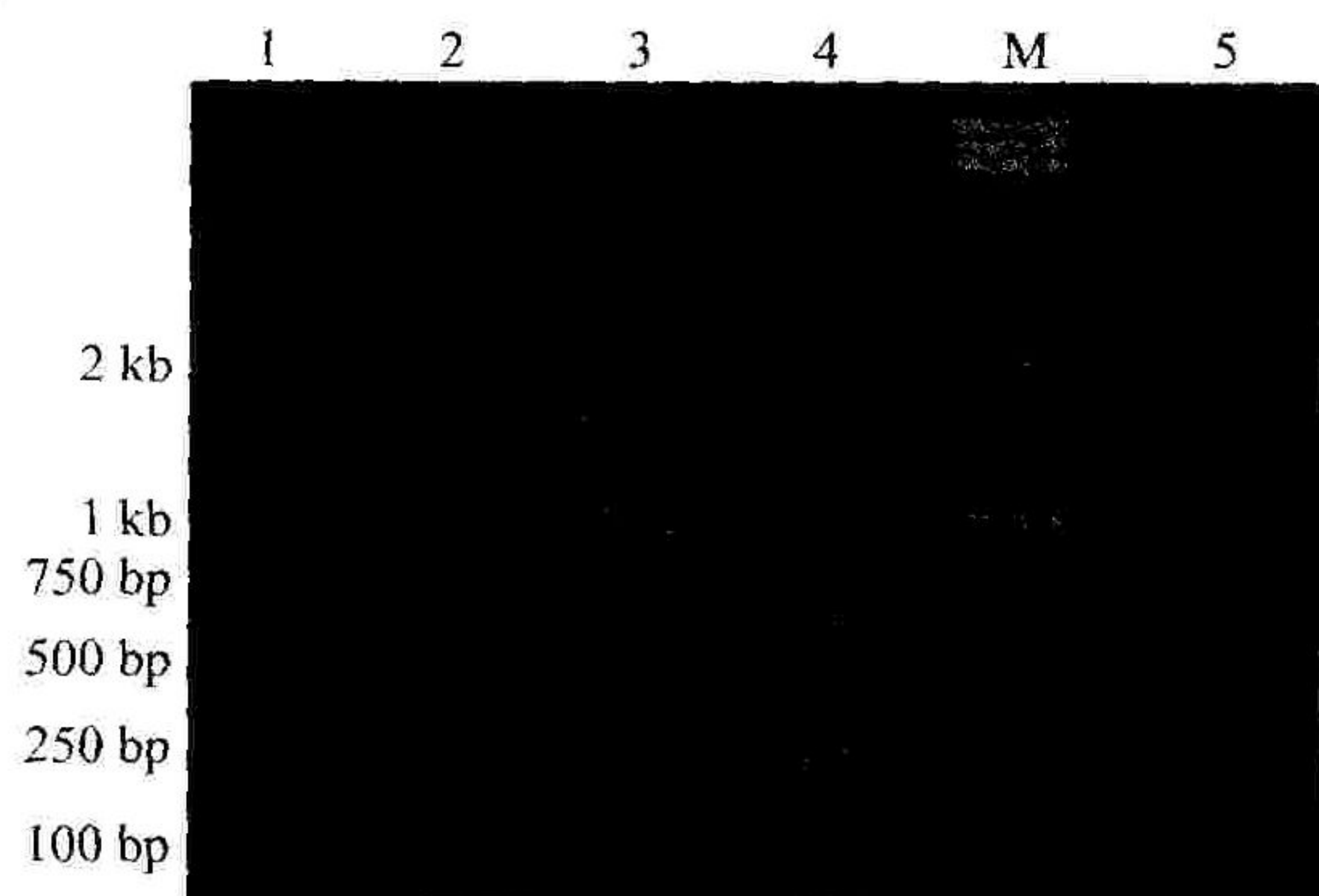
对 MDEF、CEF、GPV、MPV、ARV S1133、MDRV-MW9710、MDRV-MW9806、MDRV-MW9809 和 MDRV-MW9810 株病毒 RNA 经过3次重复该 RT-PCR,结果均一致,表明该 RT-PCR 系统重复性好.

2.4 对人工感染病例的诊断结果

人工感染病例病毒分离和鉴定检出率 100% (30/30),对照组全部阴性(0/13);该 RT-PCR 法检出率 100% (30/30),对照组全部阴性(0/13),2种方法的符合率为 100%.

2.5 对临床疑似病例的诊断结果

应用半套式 RT-PCR 法对临床疑似病例进行诊断结果显示阳性病例 20 例;阴性病例 12 例.对部分病例(阳性 5 例、阴性 4 例)同时用病毒分离和鉴定进行诊断,结果与 RT-PCR 方法吻合,表明该半套式 RT-PCR 适用于 MDRV 病的临床诊断(图3).



1~4:临床病死鸭样品;M:1 kb DNA ladder;5:对照鸭样品

1-4: samples of clinically dead duck; M:1 kb DNA ladder; 5: sample of control duck

图3 半套式 RT-PCR 检测临床样品图谱

Fig. 3 Detection of clinical samples by semi-nested RT-PCR

3 讨论

RT-PCR 方法已经广泛用于呼肠孤病毒的检测.谢芝勋等^[8]建立 RT-PCR 检测 ARV.胡奇林等^[7]先前建立了 RT-PCR 方法诊断 MDRV 病,诊断的样品为细胞毒和尿囊液,而不是组织病料,病毒培养需要 7 d 时间,因此不适合作为临床快速诊断的手段.本研究在文献[7]基础上再设计了 1 条引物,组成半套式 RT-PCR,试验证明该方法特异性好,仅能从 MDRV 中扩增出特异性条带,灵敏度高,能够检测出 1 fg 的核酸;测定过程在 7 h 内就可完成.同时,经对人工感染试验和临床病例样品用病毒分离及鉴定和该半套式 RT-PCR 两种方法的平行诊断,符合率为 100%,证明该半套式 RT-PCR 可用于 MDRV 病的临床快速诊断、口岸检疫和 MDRV 病的分子流行病学调查,为建立该病的临床快速诊断方法奠定了基础.

鉴于应用 MDRV 活疫苗后禽体内 MDRV 弱毒株的排毒规律尚未明确,该半套式 RT-PCR 方法不能鉴别强毒株和弱毒株.要进行番鸭呼肠孤病毒病临床快速诊断,尚需建立能区别强、弱毒株的诊断方法.

参考文献:

- [1] 胡奇林,陈少莺,江斌,等.一种新的番鸭疫病(暂名番鸭肝白点病)病原的发现[J].福建畜牧兽医,2000,22(6):1-3.
- [2] 胡奇林,陈少莺,林锋强,等.番鸭呼肠孤病毒的鉴定[J].病毒学报,2004,20(3):241-248.
- [3] MALKINSON M, PEAK P, WEISMAN Y. Reovirus infection of young muscovy ducks (*Cairina moschata*) [J]. Avian Pathology, 1981, 10:433-440.
- [4] URSULA Heffels-redmann, MULLER H, KALETA E F. Structural and biological characteristics of reoviruses isolated from muscovy ducks (*Cairina moschata*) [J]. Avian Pathology, 1992, 21:481-491.
- [5] KUNTZ-SIMON G, LE GALL-RECULE G, DE BOISSE-SON C, et al. Muscovy duck reovirus sigma C protein is atypically encoded by the smallest genome segment [J]. J Gen Virol, 2002, 83 (5): 1189-1200.
- [6] LE GALL-RECULE G, CHERBONNEL M, ARNAULD C, et al. Molecular characterization and expression of the S3 gene of muscovy duck reovirus strain 89026 [J]. J Gen Virol, 1999, 80(1): 195-203.
- [7] 胡奇林,林锋强,陈少莺,等.应用 RT-PCR 技术检测番鸭呼肠孤病毒[J].中国兽医学报,2004,24(3):231-232.
- [8] 谢芝勋,庞耀珊,刘加波,等.用反转录聚合酶链反应检测禽呼肠孤病毒的研究[J].中国预防兽医学报,1999,21(5):365-367.

【责任编辑 柴 焰】