

多重反转录聚合酶链式反应检测 H5、H7 和 H9 亚型禽流感病毒的研究

张文慧¹, 王伟利², 郑 聪¹, 刘 明³, 钱爱东¹

(1 吉林农业大学 生命科学学院, 吉林 长春 130118; 2 吉林出入境检验检疫局, 吉林 长春 130062;

3 中国农业科学院 哈尔滨兽医生物技术国家重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要:利用多重反转录聚合酶链式反应同时检测 H5、H7 和 H9 亚型禽流感病毒. 在 GenBank 中搜索 H5、H7 和 H9 亚型禽流感病毒(AIV)的血凝素基因序列, 并利用 DNASTar 软件分析其相似性, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计 3 对分别针对 AIV H5、H7 和 H9 亚型的特异性引物. 这 3 对引物所扩增的 cDNA 片段大小分别为 427、228 和 830 bp. 结果表明, 通过对多重 RT-PCR 扩增条件的优化, 建立了同时检测 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 的多重 RT-PCR 技术. 该多重 RT-PCR 对 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 能同时扩增出 3 条大小分别为 427、228 和 830 bp 的 cDNA 片段, 与其他常见禽病病原的核酸不存在交叉反应. 该多重 RT-PCR 对 H5、H7 和 H9 亚型 AIV cDNA 的最低检出量分别为 10 pg、1 ng 和 10 pg.

关键词:多重反转录聚合酶链式反应; 禽流感病毒; H5 亚型; H7 亚型; H9 亚型

中图分类号: S852.659.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2009)03-0095-04

Study on Multiplex Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction for Detection of H5, H7 and H9 Subtypes Avian Influenza Virus

ZHANG Wen-hui¹, WANG Wei-li², ZHENG Cong¹, LIU Ming³, QIAN Ai-dong¹

(1 College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2 Jilin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of the People's Republic of China, Changchun 130062, China;

3 National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute of CAAS, Harbin 150001, China)

Abstract: Hemagglutinin gene sequences of H5, H7 and H9 subtypes avian influenza virus were searched in GenBankTM, and their similarity were analyzed using DNASTar. Three sets of specific oligonucleotide primers were designed. Specific cDNA bands of 427, 228 and 830 bp were observed simultaneously for RNA isolated from H5, H7 and H9 subtypes AIV. There was no cross-reaction with other avian pathogens after amplification. The minimal amount of cDNA as detected by this multiplex RT-PCR was 10 pg cDNA of H5, 1 ng cDNA of H7 and 10 pg cDNA of H9 subtypes AIV.

Key words: multiplex RT-PCR; avian influenza virus; H5 subtype; H7 subtype; H9 subtype

禽流感(Avian influenza, AI)是由正黏病毒科 A 了可感染禽类外, 还可感染人、猪和马等多种动物, 型流感病毒引起的一种禽类的急性、烈性传染病, 除 被 OIE 列为 A 类传染病^[1]. 禽流感病毒(AIV)属于

收稿日期: 2008-11-25

作者简介: 张文慧(1977—), 女, 讲师, 博士研究生; 通讯作者: 钱爱东(1960—), 男, 教授, 博士, E-mail: qianaidong0115@163.com

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(20065020); 吉林农业大学青年启动基金项目资助

A 型流感病毒,根据 HA 抗原性差异分为 16 个 HA 亚型^[2].高致病性禽流感主要是由 H5 或 H7 亚型 AIV 引起的,潜伏期极短,突然暴发,多不见任何临床症状而突然死亡,发病率和死亡率可高达 100%,给养禽业带来严重经济损失^[3],另外还可感染人,甚至导致死亡^[4-5].目前,我国部分地区以 H9 亚型为主的中低致病力禽流感的流行,已经并正在给我国养禽业造成很大的经济损失,已引起国内各界的广泛关注^[6].所以早期快速检测无疑是预防、控制禽流感的前提条件,尤其是针对 H5、H7 和 H9 亚型的 AIV.病毒分离、血清学试验至今仍是诊断 AI 和对 AIV 定型普遍采用的方法^[7].但这些方法操作繁琐,难以对 AI 进行快速诊断,十分不利于 AI 的防治.聚合酶链式反应(PCR)特异性强、敏感性高.多重 PCR 是一种特殊 PCR 形式,其最突出特点是一次 PCR 反应可同时检测、鉴别出多种病原体^[8-9],并能在数小时内检出病原,克服了传统的 AIV 诊断技术包括病毒分离鉴定试验周期长的缺点,为 AIV 早期快速诊断提供了敏感、快速、实用的方法.本试验根据 RT-PCR 技术原理,研究建立能同时检测 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 的多重 RT-PCR 技术.

1 材料与方法

1.1 试验用毒株

禽流感病毒 H5、H7 和 H9 亚型标准毒株由哈尔滨兽医生物技术国家重点实验室保存.鸡传染性支气管炎病毒(IBV)H52、鸡传染性法氏囊病毒(IBDV)B87、鸡传染性喉气管炎病毒(ILTV)疫苗株、鸡新城疫病毒(NDV)Lasota 株、鸡白痢沙门氏菌(SP)CVCC528,由吉林农业大学兽医院保存.

1.2 生化试剂

Trizol RNA 抽提试剂、RNA 酶抑制剂、AMV、dNTP、*Taq* 酶、Marker DL2000 为宝泰克生物科技公司产品.

1.3 试验设计

1.3.1 引物设计与合成 打开网址: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>,在 GenBank 中查找,根据毒株分离的宿主、时间和区域等特点,最后选定 47 个 H5 亚型、45 个 H7 亚型和 49 个 H9 亚型 AIV 毒株的血凝素基因序列.参考上述基因序列,运用 DNASTar 软件分析其相似性.使用 Primer Premier 5.0 软件,在相似性高的区域设计了 3 对分别针对 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 的特异性引物(表 1).引物均由沈阳联星

生物技术有限公司合成.

表 1 多重 RT-PCR 引物
Tab.1 Multiplex RT-PCR primers

引物名称	引物寡核苷酸序列	产物大小/bp
ZH5-1	5'-CCAATCCAGCCAATGACC-3'	427
ZH5-2	5'-TCTATGGCAACCCTTCTT-3'	
ZH7-1	5'-AGGAGTCAATGGGCTTCA-3'	228
ZH7-2	5'-GTTTGGTCTGCTCGCTAA-3'	
ZH9-1	5'-TCTATGGCAACCCTTCTT-3'	830
ZH9-2	5'-TAACCCTGACCAACCTCC-3'	

1.3.2 病原 RNA 的提取 参照 Trizol RNA 抽提试剂使用说明书提取病毒 RNA, -20 ℃ 保存备用.

1.3.3 反转录 采用总体积为 10 μL 的反转录体系,即在 PCR 反应管中分别加入 RNA 模板 2 μL, 5 × RT Buffer 2 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 1 μL, 40 U/μL RNA 酶抑制剂 0.3 μL, 5 U/μL AMV 逆转录酶 0.5 μL, 25 pmol/μL 上游引物 ZH5-1、ZH7-1 和 ZH9-1 各 0.5 μL,用 DEPC 水补足体积至 10 μL,在 PCR 仪上设定程序进行反转录.

1.3.4 多重 PCR 采用总体积为 25 μL 的多重 PCR 反应体系,即在 PCR 管中加入 10 × PCR Buffer 2.5 μL, 5 U/μL *Taq* 聚合酶 0.25 μL, 25 pmol/μL 上下游引物 ZH5-1、ZH5-2 各 0.2 μL; ZH7-1、ZH7-2 各 0.4 μL; ZH9-1、ZH9-2 各 0.6 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL, RT 产物 2 μL,用 DEPC 水补足总量至 25 μL,在 PCR 仪上设定程序.对该多重 PCR 的变性、退火、延伸温度和时间、循环次数等进行优化.

1.3.5 多重 PCR 产物分析 取 PCR 产物 5 μL,用 0.8 kg/L 琼脂糖凝胶进行电泳,观察扩增结果.

1.4 特异性试验

将 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 的 RNA 以及 IBV、IBDV、ILTV、NDV、SP 的 RNA、DNA 分别加入到该多重 RT-PCR 反应体系中,在相同条件下进行扩增,检测该多重 RT-PCR 的特异性,即与其他禽病病原的核酸之间是否存在交叉反应.回收、纯化 PCR 产物,送上海生工生物工程技术有限公司进行测序,并分析测序结果.

1.5 敏感性试验

将 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 的反转录产物(10 μg/mL)做 10 倍系列稀释后进行多重 RT-PCR,测定该多重 RT-PCR 对 cDNA 的最低检测量.

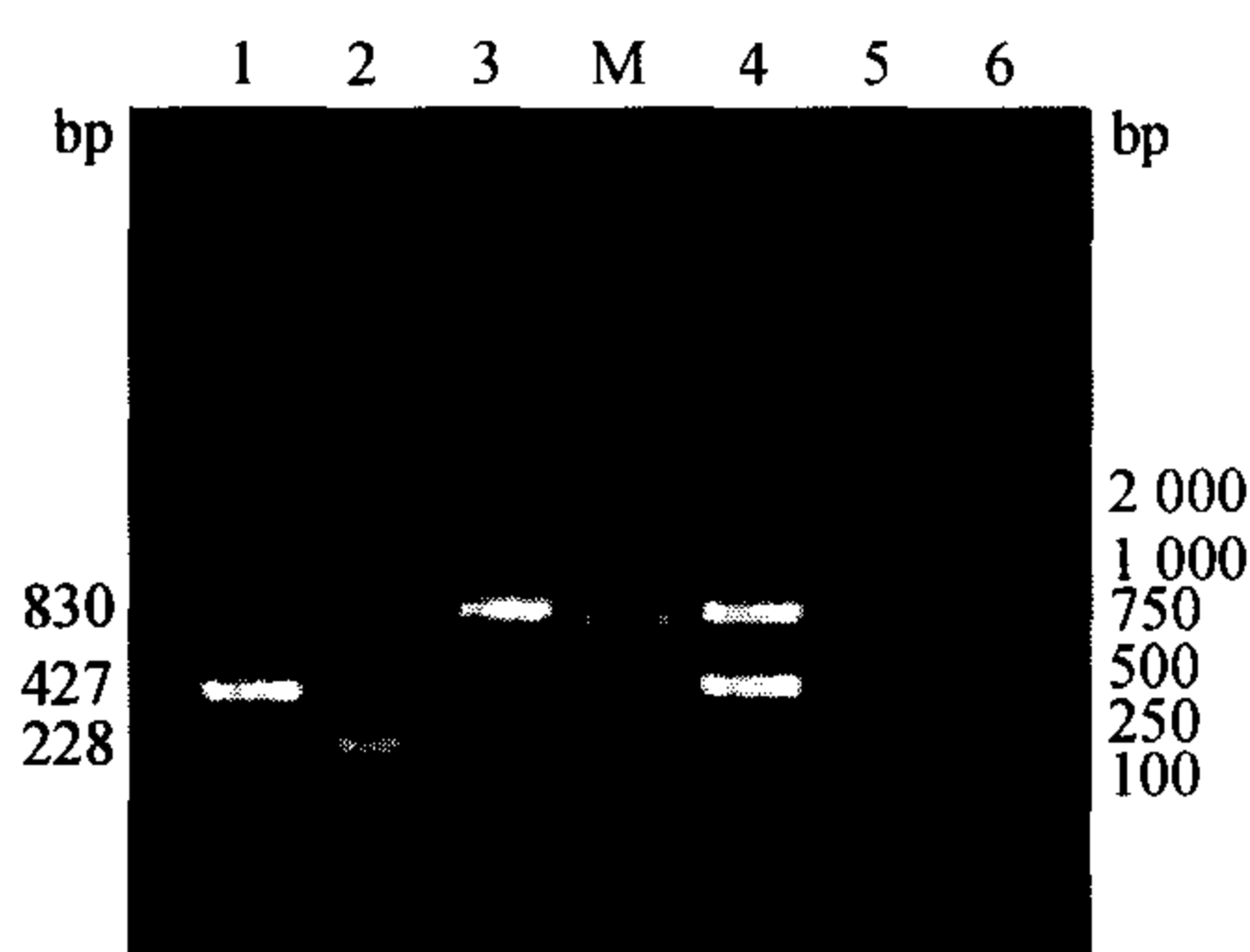
2 结果

2.1 多重 RT-PCR 的建立

通过对反转录条件和多重 PCR 的变性、退火、延伸温度和时间以及循环次数等的优化,最后确定反转录最佳条件为 42 °C 45 min, 99 °C 5 min, 4 °C 5 min 结束. 该多重 PCR 的最佳循环条件为 94 °C 预变性 3 min 后, 94 °C 变性 45 s, 53 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共循环 30 次, 然后 72 °C 再延伸 10 min, 于 4 °C 结束多重 PCR 扩增.

2.2 琼脂糖凝胶电泳检测结果

取多重 PCR 产物 5 μ L, 用 0.8 kg/L 琼脂糖凝胶进行电泳, 结果见图 1.



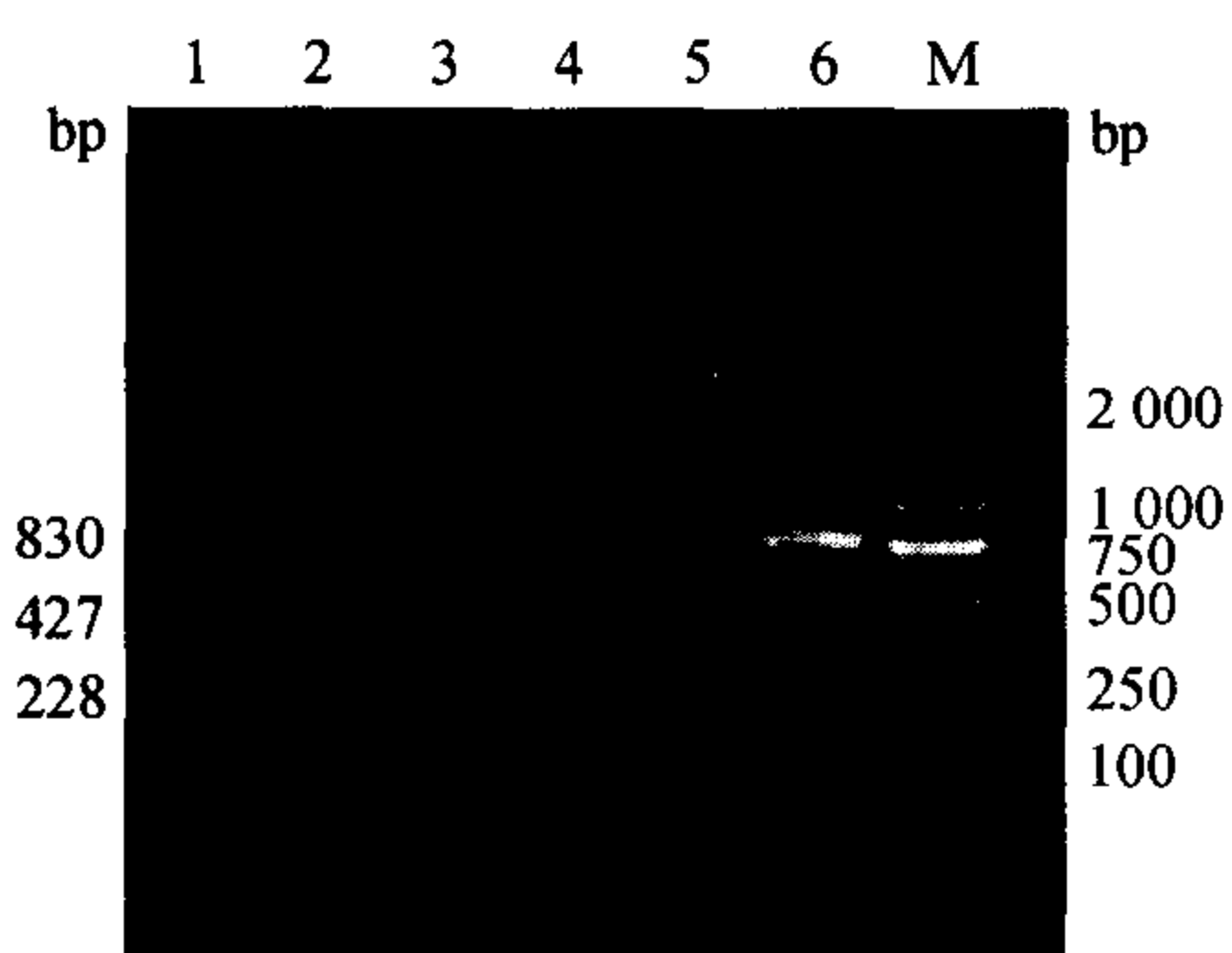
M: DNA Maker DL2000; 1: H5 亚型; 2: H7 亚型; 3: H9 亚型; 4: H5、H7 和 H9 亚型; 5: 水对照; 6: 空白对照

图 1 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 多重 RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 Multiplex RT-PCR products for H5, H7 and H9 subtypes AIV

2.3 特异性试验

H5、H7 和 H9 亚型 AIV RNA 经多重 RT-PCR 扩增, 在 427、228 和 830 bp 分别出现了扩增条带, 而 IBV、IBDV、ILTV、NDV、SP 无论在 427、228 bp 还是在 830 bp 处均无 cDNA 扩增条带出现, 即为阴性 (图 2), 表明 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 与其他禽病病原的



M: DNA Maker DL2000; 1: 鸡传染性支气管炎病毒; 2: 鸡传染性法氏囊病毒; 3: 鸡传染性喉气管炎病毒; 4: 鸡新城疫病毒; 5: 鸡白痢沙门氏菌; 6: H5、H7 和 H9 亚型禽流感病毒

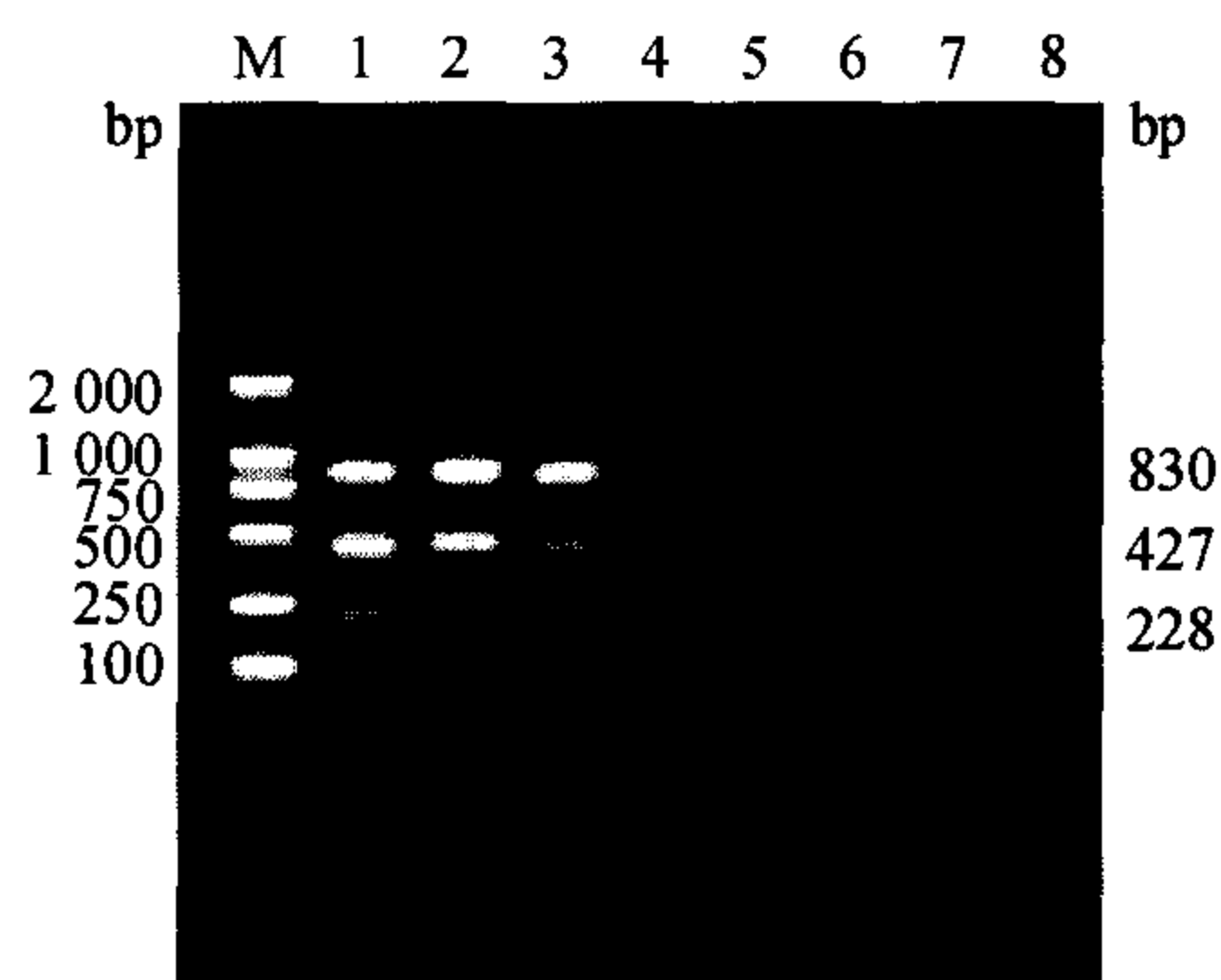
图 2 多重 RT-PCR 的特异性试验

Fig. 2 Specificity test of the multiplex RT-PCR

核酸不存在交叉反应, 特异性强. 对所回收的 427、228 和 830 bp cDNA 扩增片段进行测序, 并同 GenBank 的注册序列和引物设计时的参考序列分别进行相似性分析. 同 GenBank 的注册序列进行相似性分析, 最高相似性分别为: 427 bp 扩增片段的测序结果与序列注册号为 CY028946 的 Influenza A virus [A/quail/Shantou/3054/2002 (H5N1)] 相似性为 99%; 228 bp 扩增片段的测序结果与序列注册号为 AY724257 的 Influenza A virus [A/chicken/Hebei/1/2002 (H7N2)] 相似性为 98%; 830 bp 扩增片段的测序结果与序列注册号为 DQ465400 的 Influenza A virus [A/duck/Hubei/W1/2004 (H9N2)] 相似性为 99%; 同引物设计时的参考序列进行相似性分析: 与 H5 亚型、H7 亚型和 H9 亚型 AIV 的 HA 基因相似性分别为 98% ~ 99%、92% ~ 98%、96% ~ 99%. 提示这些扩增基因的序列分别是 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 的 HA 基因.

2.4 敏感性试验

经测定, 该多重 RT-PCR 对 H5、H7 和 H9 亚型 AIV cDNA 的最低检测量分别为 10 pg、1 ng 和 10 pg (图 3).



M: DNA Maker DL2000; 1: 10 ng; 2: 1 ng; 3: 100 pg; 4: 10 pg; 5: 1 pg; 6: 100 fg; 7: 10 fg; 8: 空白对照

图 3 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 的多重 RT-PCR 敏感性试验

Fig. 3 Sensitivity test of the multiplex RT-PCR for H5, H7 and H9 subtypes AIV

3 讨论

PCR 技术现已成为分子生物学领域最基本也是最重要的技术手段之一. 然而, 找到一对合适的核苷酸片段作为引物, 使其有效地扩增模板 DNA 序列, 决定着 PCR 的成败. 多重 PCR 对引物的要求则更为严格, 但它可以同时检测出多种病原微生物, 具有高效性. 本试验在进行多重 PCR 引物设计时, 确保了 3 对引物具有相近的退火温度, 使得所有的靶位点可以用相同的 PCR 程序在单个的反应中得到有效的扩

增,而且利用 DNASTar 软件分析了 3 对引物,其之间不能形成稳定二聚体和发夹结构,同时保证了扩增产物能够通过电泳分开。

综合多种禽流感病毒检测的方法,RT-PCR 技术同时具有敏感性强、操作时间短及实用性强等特点^[10]。本试验根据多重 PCR 引物设计原则,利用基因库中 AIV HA 基因组序列,分别针对 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 设计了 3 对特异性引物。利用这 3 对引物,通过对多重 RT-PCR 扩增条件的优化,建立了可同时检测鉴别 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 的多重 RT-PCR 技术,即可直接定位到亚型。通过试验表明 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 与其他禽病病原的核酸无交叉反应,该多重 RT-PCR 具有高度的特异性和敏感性。因此,本研究建立的多重 RT-PCR 同时检测鉴别 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 的方法,对这 3 种亚型 AIV 感染的诊断具有实用价值,也可以为禽流感的流行病学调查提供手段,为防止禽流感病毒的传播起到重要作用。

参考文献:

- [1] 甘孟侯. 禽流感[M]. 北京:中国农业出版社,2002:1-10.
- [2] FOUCHIER R A, MUNSTER V, WALLENSTEN A, et al. Characterisation of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype(H16) obtained from black-headed gulls[J]. J Virol, 2005, 79: 2814-2822.
- [3] 许金俊,陶建平. 禽流感的发病特点及其防制[J]. 畜牧业, 2000 (9): 21-24.
- [4] HIEN T T, LIEM N T, DUNG N T, et al. Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam [J]. N Engl J Med, 2004, 350: 1179-1188.
- [5] KOOPMANS M, WILBRINK B, CONYN M, et al. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human being during a large outbreak in commercial poultry farm in the Netherlands [J]. Lancet, 2004, 363: 587-593.
- [6] 于康震. 我国禽流感防制研究进展[J]. 中国兽医学报, 2001, 21(1): 103-104.
- [7] ZAMBON M, HAYS J, WEBSTER A, et al. Diagnosis of influenza in the community relationship of clinical diagnosis to confirmed virological serologic or molecular detection of influenza[J]. Arch Intern Med, 2001, 161(17): 2116-2122.
- [8] STOCKTON J, ELLIS J S, SAVILLE M, et al. Multiplex PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses [J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(10): 2990-2995.
- [9] ELFATH M E, AHMED M A, ROBERT J C, et al. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology[J]. Clin Microbiol Rev, 2000, 13: 559-570.
- [10] 张文慧,郭华,钱爱东. 禽流感病毒检测方法的研究进展[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2007(6): 10-11.

【责任编辑 柴 焰】

欢迎订阅 2010 年《华南农业大学学报》

《华南农业大学学报》是华南农业大学主办的综合性农业科学学术刊物。本刊主要报道农业各学科的科研学术论文、研究简报、综述等,设有农学·园艺·土壤肥料、植物保护、生物学、林业科学、动物科学与兽医学、农业工程与食品科学、信息科学、基础科学、综述、简报等栏目。本刊附英文目录和英文摘要。读者对象主要是农业院校师生、农业科研人员和有关部门的专业干部。

本刊为《中国科学引文数据库》、《中国科技论文统计源(中国科技核心期刊)》及《中国学术期刊综合评价数据库》等固定刊源,并排列在中国科学引文数据库被引频次最高的中国科技期刊 500 名以内。被《中文核心期刊要目总览》遴选为综合性农业科学核心期刊、植物保护类核心期刊。为美国《化学文摘》、美国《剑桥科学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、英国《CABI》、英国《动物学记录》、《中国生物学文摘》及国内农业类文摘期刊等国内外多家著名文摘固定刊源。

国内外公开发行、季刊、A4 幅面。每期 124 页,定价 5.00 元,全年 20.00 元、自办发行,参加全国非邮发报刊联合征订发行,非邮发代号:6573。

订阅办法:订阅款邮汇至:300385 天津市大寺泉集北里别墅 17 号,全国非邮发报刊联合征订服务部。

《华南农业大学学报》编辑部