

I 群禽腺病毒通用nPCR检测方法的建立与应用

朱小甫

(咸阳职业技术学院畜牧兽医研究所, 动物疫病分子生物学诊断实验室, 陕西 咸阳 712000)

摘要: 建立一种能够检测 I 群禽腺病毒 (Fowl adenovirus, FAdV) 通用套式PCR方法, 为临床诊断 I 群禽腺病毒感染提供可靠技术手段。根据GenBank上发表的FAdV基因序列, 设计并合成了2对引物, 对反应体系和条件进行优化, 建立套式PCR方法。通过灵敏性试验、特异性试验、病料中FAdV检测对比等方法验证建立方法的适用性。试验结果表明, 建立的方法检测的极限为 $3.12 \times 10^{-6} \text{pg} \cdot \text{L}^{-1}$; 特异性试验发现该方法仅能从FAdV参考阳性株扩增出750 bp的预期目的条带, 其它5种常见禽病毒均为阴性。结果证实成功建立了一种灵敏度高、特异性好的检测 I 群禽腺病毒套式PCR方法。

关键词: I 群禽腺病毒; Hexon基因; 检测; 套式PCR

中图分类号: S852.65+1

文献标识码: A

文章编号: 94047- (2017) 03-030-03

自2015年下半年以来, 在我国部分省份如河南、安徽、辽宁、河北、北京、山东、山西、江苏、广东等地鸡场中出现了一种新发疾病, 该病以心包积液和肝脏肿大特征, 被称为“心包积液-肝炎综合征”, 目前认为其病原为 I 群禽腺病毒 (Fowl adenovirus, FAdV)^[1]。FAdV粒子直径为70-90nm, 无囊膜, 呈正二十面体对称结构, 核酸为双股DNA。I 群禽腺病毒分为A、B、C、D、E共5个禽腺病毒种, 每个种内的病毒主要根据交叉中和试验结果进一步分为不同的血清型^[2]。本病既能水平传播, 又能垂直传播, 种鸡群感染会造成商品鸡群质量严重下降, 死淘率上升, 经济损失巨大^[3]。2016年, 咸阳职业技术学院畜牧兽医研究所调查发现, 陕西部分鸡场亦存在疑似心包积液-肝炎综合征, 为了给临床提供快速、灵敏的诊断技术手段, 咸阳职业技术学院动物疫病分子生物学诊断实验室建立了 I 群禽腺病毒通用nPCR检测方法, 经过初步应用, 显示出了良好的灵敏性和特异性, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒 参考毒株中, FAdV HM15株为分离自陕

西商洛某蛋鸡场野毒株, 基因测序确定为血清4型腺病毒 (FAdV-4), 分离毒株由动物疫病分子生物学诊断实验室保存。新城疫病毒 (NDV)、传染性法氏囊炎病毒 (IBDV)、传染性喉气管炎病毒 (ILT)、马立克氏病病毒 (MDV)、鸡痘病毒 (FPV) 均为瑞普生物商品疫苗毒株。

1.1.2 病料 由动物疫病分子生物学诊断实验室采集或鸡场送检疑似心包积液-肝炎综合征病例的肝脏, 分别来自咸阳、铜川、宝鸡、渭南、和西安地区鸡场, 共计35份, 将组织材料研磨处理, 12000 r/min离心10 min, 收集上清液-70 °C保存备用。

1.1.3 主要试剂 DNAiso Reagent、RNAiso plus、rTaq酶、dNTP等分子生物学试剂均为宝生物工程 (大连) 有限公司产品。其他化学试剂为国产分析纯。

1.1.4 引物设计与合成 参考GenBank上发表的FAdV基因序列NC001720、EU979370、GU188428, 针对FAdV六邻体Hexon基因设计并合成了2对引物, FAdV-1F: 5' -TCAACCACCACCGTAACTG-3' (19802-19820); FAdV-1R: 5' -GGGAGTITGTTGTGTACAT-3' (20956-20938); FAdV-2F: 5' -CACTTACGAGTGGGTCTCAGA-3' (19935-19956); FAdV-2R: 5' -CCGGTGTCTTAACAACG-3' (20684-20667)。引物由生工生物工程 (上海) 有限公

收稿日期: 2017-07-03

基金项目: 咸阳市科学技术研究计划项目 (2015k03-21)

作者简介: 朱小甫 (1977—), 男, 陕西眉县人, 执业兽医师, 硕士, 主要从事动物疫病分子病原学与免疫学研究工作。

司合成, 均用DEPC处理水稀释到 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.2 方法

1.2.1 FAdV DNA的提取 取FAdV HM15株鸡胚培养物 $100 \mu\text{L}$ 置于无菌EP管, 加入DNAiso Reagent $800 \mu\text{L}$, 上下颠倒混匀, 室温静置裂解10min, 4°C 、 $12000\text{r}/\text{min}$ 离心5min, 吸取 $600 \mu\text{L}$ 上清液转移至另一无菌EP管, 加入等体积冰冷无水乙醇沉淀10min, 4°C 、 $12000\text{r}/\text{min}$ 离心10min, 弃去上清液, 加入 1mL 冰冷的70%乙醇清洗2次, 倒置干燥, 用 $40 \mu\text{L}$ $8\text{mmol}/\text{L}$ NaOH充分吹打溶解, 在微量分光光度计上测定DNA的含量。

1.2.2 FAdV nPCR方法的建立 取已知浓度的DNA溶液做为模板, 摸索扩增条件。第1次扩增反应体系中DNA $2.0 \mu\text{L}$, $10\times$ Buffer $2.5 \mu\text{L}$, dNTP $1.0 \mu\text{L}$, FAdV -1F、FAdV -1R各 $0.5 \mu\text{L}$, 改变rTaq DNA聚合酶用量 ($0.25\sim 1.0 \mu\text{L}$), 用超纯水补足总体积 $25.0 \mu\text{L}$ 。条件设定为 95°C 预变性5min; 94°C 变性50s, 退火温度由 $52^\circ\text{C}\sim 58^\circ\text{C}$ 按 1°C 递增设定退火1min, 72°C 延伸1min, 共进行35个循环; 最后 72°C 延伸10min。第2次扩增时取 $2.0 \mu\text{L}$ 第1次扩增产物作为模板, 其他成分同第1次扩增进行设定摸索, 引物更换为FAdV-2F、FAdV-2R。条件设定为 95°C 预变性5min; 94°C 变性50s, 退火温度由 $55\sim 58^\circ\text{C}$ 按 1°C 递增设定退火1min, 72°C 延伸1min, 共35个循环; 最后 72°C 延伸10min。摸索出反应体系和反应条件的最佳组合。

1.2.3 FAdV nPCR方法灵敏性试验 将DNA溶液做10倍梯度稀释至 10^{-10} 倍, 分别以建立的nPCR方法对各稀释后DNA溶液作为模板进行nPCR扩增, 扩增完毕后取 $5.0 \mu\text{L}$ 扩增产物, 1.5%琼脂糖凝胶中电泳, 凝胶成像系统中照相观察。

1.2.4 FAdV nPCR方法特异性试验 按照RNAiso plus操作说明提取NDV与IBDV两种RNA病毒的核酸并反转录获得cDNA; 提取ILTV、MDV、FPV等DNA病毒DNA模板, 用建立的nPCR方法检测, PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳, 成像系统中观察照相。

1.2.5 病料中FAdV的检测 用以上建立的检测方法对收集的35份疑似心包积液-肝炎综合征病料进行

检测验证。

2 结果与分析

2.1 FAdV nPCR方法的建立

通过改变反应体系和反应条件, 最终确定最优体系和条件为: 第1次扩增DNA $2.0 \mu\text{L}$, $10\times$ Buffer $2.5 \mu\text{L}$, 超纯水 $17.0 \mu\text{L}$, dNTP $2.0 \mu\text{L}$, FAdV-1F、FAdV-1R各 $0.5 \mu\text{L}$, rTaq DNA聚合酶 $0.5 \mu\text{L}$, 总体积 $25.0 \mu\text{L}$ 。条件为: 95°C 预变性5min; 94°C 50s, 52°C 1min, 72°C 1min, 共进行35个循环; 最后 72°C 延伸10min。第2次扩增反应体系: 取 $2.0 \mu\text{L}$ 第1次扩增产物作为模板, 体系其余组分同第1次扩增, 引物为FAdV-2F、FAdV-2R。条件为: 95°C 预变性5min; 94°C 50s, 58°C 1min, 72°C 1min, 共进行35个循环; 最后 72°C 延伸10min。

2.2 FAdV nPCR方法的灵敏度试验

提取HM15株DNA, 微量紫外分光光度计测定浓度为 $312\text{pg} \cdot \text{L}^{-1}$, 按照10倍浓度梯度稀释至 10^{-10} , 用建立的方法进行套式复合PCR, 扩增完毕后电泳观察。结果显示, HM15株出现750bp特异性条带, 建立方法的检测的极限为 $3.12 \times 10^{-6} \text{pg} \cdot \text{L}^{-1}$, 提示本方法灵敏度高(见图1)。

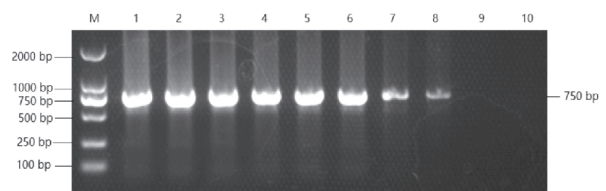


图1建立的FAdV nPCR检测方法灵敏度试验结果
M: DNA分子质量标准; 1~10: 依次为DNA浓度
 $312 \times 10^{-1} \sim 312 \times 10^{-10} \text{pg} \cdot \text{L}^{-1}$ 10倍梯度稀释

Fig.1 The result of sensitivity test for FAdV by nPCR
M: DNA Marker; 1~10: $312 \times 10^{-1} \sim 312 \times 10^{-10} \text{pg} \cdot \text{L}^{-1}$ of FAdV DNA

2.3 FAdV nPCR检测方法特异性试验结果

用所建立的方法对NDV、IBDV、ILTV、MDV、FPV和HM15株 cDNA/DNA进行扩增, 结果发现, 仅有HM15株扩增出了750bp的预期目的条带, 其它5种常见禽病毒均为阴性, 提示所建立的方法特异性好。电泳结果见图2。

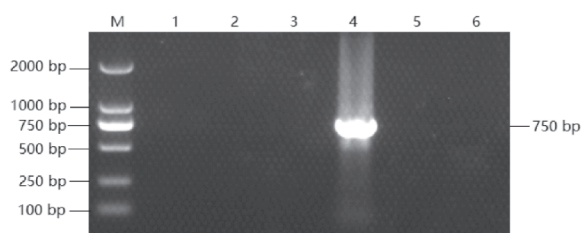


图2 FAdV nPCR检测方法特异性试验结果

M: DNA分子质量标准; 1: NDV; 2: IBDV;

3: ILTV; 4: HM15; 5: MDV; 6: FPV

Fig.2 The result of specialization test for FAdV by nPCR

M: DNA Marker; 1: NDV; 2: IBDV; 3: ILTV;

4: HM15; 5: MDV; 6: FPV

2.4 病料中FAdV的检测对比结果

提取收集的35份疑似感染心包积液-肝炎综合征的组织病料总DNA,用建立的nPCR方法进行检測,结果建立的nPCR方法在26份材料中扩增出了目的条带,阳性率为74.3%。(见图3)。

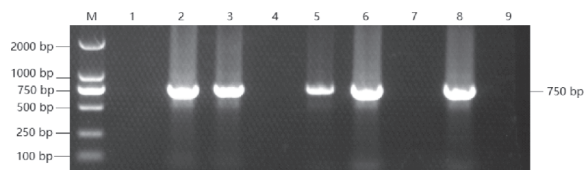


图3 部分组织材料检测结果

M: DNA分子质量标准; 2,3,5,6,8: 组织中
FAdV阳性结果; 1,4,7,9: 组织中FAdV阴性结果

Fig.2 The result of detection FAdV from some samples

M: DNA Marker; 2,3,5,6,8: positive results of FAdV
of tissue ; 1,4,7,9: negative results of FAdV of tissue

3 讨论

心包积液-肝炎综合征是新近流行的鸡群传染病,3-4周龄肉鸡发病较多,在蛋鸡中主要发生于3-10周龄,甚至300日龄蛋鸡也有感染的报道^[4]。由于育雏阶段感染死亡率较高,引起较大的经济损失,现已成为禽病研究的热点。研究认为,引起心包积液-肝炎综合征的病原为I群禽腺病毒血清4型(FAdV-4),1987年巴基斯坦安卡拉地区最早发现本病,因而又名安卡拉病^[5]。为防控心包积液-肝炎综合征,准确诊断是前提条件,必需开发相应的技术手段。智海东等^[6]研制了禽腺病毒I型琼脂扩散抗原,检测了该抗原的效价和特异性,并用该抗原对人工感染鸡沉淀抗体的变化以及现地血清样本进行了检测,为禽腺病毒感染的血清学检测提供了一种简便易行的方法。韦悠等^[7]采用过滤法及蔗糖梯度密度离心法

制备禽腺病毒1型,以全病毒作为ELISA包被抗原,建立了2种检测腺病毒抗体的ELISA检测方法。

病原诊断是传染病确诊的最确切的方法,PCR技术现已广泛应用于动物传染病的诊断。张明明等^[8]采用PCR方法扩增了禽腺病毒基因组右末端ITR片段和ORF 8片段,对鸡鸭鹅A型禽腺病毒进行了PCR检测和分析。袁万哲等^[9]根据禽腺病毒4型Hexon基因核苷酸序列,设计用于扩增FAdV-4的PCR引物,建立了FAdV-4 PCR检测方法,最低核酸检出量为12.9 pg。由于临床组织样品中病毒含量较低,单PCR扩增检测灵敏度较低可能会出现假阴性,本研究针对I群禽腺病毒六邻体Hexon基因设计了2对引物,建立了检测I群禽腺病毒的通用nPCR方法。灵敏度试验结果表明,建立方法的检测的DNA浓度极限为 $3.12 \times 10^{-6} \text{ pg} \cdot \text{L}^{-1}$,特异性试验结果显示,该方法扩增NDV、IBDV、ILTV、MDV和FPV cDNA/DNA均为阴性,仅能从参考阳性HM15株扩增出目的条带,特异性良好。用该方法对陕西省35份疑似病例组织进行了检测,结果26份组织为阳性,阳性率74.3%,提示在陕西鸡场中同样存在I群禽腺病毒的感染。

参考文献

- [1]袁万哲,李玉保,王建昌,等.鸡心包积液-肝炎综合征的初步研究[J].中国兽医科学,2016,46(2):157-160.
- [2]殷震,刘景华.动物病毒学[M].第2版.北京:科技出版社,1997.
- [3]刘东,刘红祥,于静,等.I亚群腺病毒在我国鸡群的流行病学调查[J].中国家禽,2015,37(15):70-73.
- [4]张磊,张宇,李巧,等.禽腺病毒4型感染的诊断与防治[J].安徽农学通报,2016,22(10):116-122.
- [5]罗思思,谢芝勋,邓显文,等.I群禽腺病毒分离鉴定及hexon基因的序列分析[J].畜牧与兽医,2012,44(1):52-56.
- [6]智海东,解生亮,杨志,等.禽腺病毒I型琼脂扩散抗原的研制及应用[J].中国兽医科学,2009,39(8):718-722.
- [7]韦悠,谢芝勋,刘加波,等.禽腺病毒1型抗体间接ELISA检测方法的建立[J].畜牧与兽医,2011,43(10):50-53.
- [8]张明明,钱琨,王小辉,等.鸡鸭鹅A型禽腺病毒的PCR检测和分析[J].中国动物传染病学报,2009,17(3):39-43.
- [9]袁万哲,张姍,陈萍,等.禽腺病毒4型PCR检测方法的建立与应用[J].中国动物检疫,2016,33(5):72-74.

[责任编辑、校对:王军利]

(下转第36页)