

禽网状内皮组织增殖病病毒 SYBR Green I 实时荧光 PCR 检测方法的建立

牛秀杰^{1,2}, 赵妍², 薛美², 王云峰^{1,2}

(1. 东北农业大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 中国农业科学院 哈尔滨兽医研究所, 兽医生物技术国家重点实验室/禽传染病研究室, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要:为了探究禽网状内皮组织增殖病的快速检测方法,根据禽网状内皮组织增殖病病毒(REV)LTR 和 *gag* 基因的保守区域各设计并合成一对引物,建立检测插入感染与全病毒感染的 SYBR Green I 模式的实时荧光 PCR 方法(Real-time PCR)。以 pMD-LTR, pMD-*gag* 重组质粒为标准品建立标准曲线,并对该方法的特异性、敏感性、重复性进行评价。结果表明:该方法线性关系良好;敏感性能检测到 10 拷贝标准品;能特异性检测 REV 样品,不与其它禽相关病原发生交叉反应;板内、板间重复试验的变异系数均低于 3%。应用该方法对人工感染 REV 的鸡的心、肝、脾、肺、肾、盲肠扁桃体、腺胃和法氏囊进行初步检测,结果显示法氏囊中的含量最高。

关键词:SYBR Green I; 实时荧光 PCR; 禽网状内皮增殖病毒; *gag* 基因; LTR 基因

中图分类号:S852.65⁺9.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2015)04-0047-06 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2015.04.0047

禽网状内皮组织增殖病(RE)其病原为正反转录病毒亚科 γ 反转录病毒属的成员,是指由禽网状内皮组织增殖病病毒(REV)引起禽类发生的一种病理综合征,包括急性网状细胞肿瘤形成、矮小综合征和淋巴组织与其它组织形成慢性肿瘤^[1]。REV 由两条相同的单股 RNA 以共价键连接组成,包括 *gag*、*pol* 和 *env* 3 个基因^[2]。该病呈世界性分布^[3]。REV 既可水平传播又可垂直传播,通过污染疫苗传播也是重要的传播途径^[4]。实际上,鸡自然感染 REV 的病例并不多见,大部分感染是由于接种污染 REV 的疫苗发生的^[5-6]。

目前由于仍没有成功研制并投入使用的 REV 疫苗,因此对其进行诊断尤为重要。常见的 RE 的诊断方法病毒分离^[7]、免疫荧光试验和病毒中和试验^[8]需对病毒进行分离培养,但 REV 在培养时不表现明显病变,为实验操作带来不便,耗时且对实验人员要求高;而进口的抗体检测 ELISA 试剂盒价格昂贵^[9],在临床上很难普及使

用。PCR 检测病毒核酸方法敏感度高,特异性好,但后续步骤繁琐^[10],荧光定量 PCR^[11-12] 技术快速、灵敏、特异性强、可定量,而且省去了常规 PCR 的后续步骤,非常适用于病毒感染的检测。因此,本研究旨在建立检测插入感染与全病毒感染的 SYBR Green I 实时 PCR,为 REV 的临床诊断、流行病学调查及禽源疫苗污染 REV 的监测提供切实可行的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试病毒株 REV 分离株(GQ375848)、禽传染性喉气管炎病毒(ILTV)、马立克氏病病毒(MDV)、新城疫病毒(NDV)疫苗、禽痘病毒(FPV)疫苗、禽传染性支气管炎病毒(IBV)、禽流感病毒(AIV)和大肠杆菌(*E. coli*)由实验室保存。禽白血病病毒(ALV)、禽传染性贫血病病毒(CAV)、禽传染性法氏囊病病毒(IBDV)由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所相关课题组提供。

1.1.2 主要试剂及仪器 SYBR Premix Ex Taq TM、Taq DNA 聚合酶,Ex Taq 聚合酶,pMD18-T Vector,Random Primer(9mer),Ribonuclease Inhibitor,Reverse Transcriptase XL(AMV)反转录酶,dNTP Mixture,均购自 Takara 公司。主要供试仪器为 Light Cycler 480II。

收稿日期:2015-01-20
基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费项目(0302012009)
第一作者简介:牛秀杰(1986-),女,黑龙江省肇州县人,硕士,从事禽病病毒分离与鉴定的研究。E-mail:niuxiujie86@126.com。
通讯作者:王云峰(1968-),男,博士,研究员,从事禽病研究。E-mail:yfwang@hvri.ac.cn。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成 通过对 GenBank 登录的 HLJ07I(GQ375848)的基因序列进行分析比较,应用 Primer5.0 软件,设计 2 对荧光定量 PCR 引物。在 LTR 基因的保守区域设计 1 对扩增片段为 179 bp 的特异性引物;在 gag 基因的保守区域设计 1 对扩增片段为 233 bp 的特异性引物(见表 1)。引物由博仕生物有限公司合成。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物 Primers	引物序列(5'-3') Primer sequence	目的片段长度/ bp Fragment size
LTR-219	TGCACCATCCAATCACGAAC	179
LTR-397	CCGCACGTCAACAACATGTG	
gag-1495	GGTTAGAGTTCGGAGCACAAG	233
gag-1727	GAGGAGTTGCTGGCAATCATC	

1.2.2 REV 增殖和 RNA 的提取及反转录 按照常规方法,制备鸡胚成纤维细胞(CEF),待其长到 80%后,接种 REV 进行培养,7 d 后收获细胞。反复冻融后分装保存在-70℃备用。

按照 Simply P 总 RNA 提取试剂盒说明书,从攻毒鸡的病料样品中提取 RNA。并以该 RNA 为模板,加入随机引物和 AMV 进行反转录。反转录体系:5×Reverse Transcriptase Buffer 4 μL,dNTP Mixture (10 mmol·L⁻¹)2 μL,RNase Inhibitor 20 U,Random Primer 50 pmol,AMV Reverse Transcriptase 10 U,模板 RNA 溶液 10 μL,共 20 μL。

1.2.3 标准品的制备 以反转录的 cDNA 为模板,应用特异性引物进行常规 PCR 扩增,回收目的片段。经测序片段大小分别为 179 和 233 bp,将其克隆于 pMD18-T 载体中,获得 p-LTR 和 p-gag 重组质粒作为标准品。

1.2.4 荧光定量最佳反应模式的确定 以质粒标准品为模板,不同退火温度(55,57,59,61,63℃)下在梯度 PCR 仪上进行两步法 PCR。取扩增产物 5 μL,用 2%的琼脂糖凝胶电泳进行电泳分析,确定最佳引物退火温度。然后以质粒标准品为模板,不同引物浓度(0.1,0.3,0.5,0.7,0.9 pmol·μL⁻¹)进行两步法 PCR 反应。取扩增产物 5 μL,用 2%的琼脂糖凝胶电泳进行电泳分析,确定最佳引物浓度。得到最佳的反应体系和反应条件:反应体系为 20 μL,其中含 SYBR

Primix Ex Taq 10 μL,gag-a/s (0.5 pmol·μL⁻¹) 0.8 μL、无菌水 6.4 μL、cDNA 2 μL。反应条件:95℃ 30 s;95℃ 10 s,61℃ 45 s,40 个循环;95℃ 5 s,65℃ 1 min,97℃持续。退火延伸时检测荧光信号。

1.2.5 标准曲线、熔解曲线的绘制 在最佳的反应体系和反应条件下,用系列稀释的 10⁸~10¹拷贝·μL⁻¹的 p-LTR 和 p-gag 重组质粒为标准品进行 SYBR Green I 实时荧光 PCR 反应。采用 Light Cycler480_Software(1.5.0.39)软件进行分析。

1.2.6 特异性试验 分别以 ILTV、MDV、NDV、FPV、IBV、AIV、ALV、CAV 和 IBDV 病毒的 cDNA 以及 p-LTR 和 p-gag 阳性重组质粒为模板进行 SYBR Green I 实时荧光 PCR 检测,同时设无模板阴性对照。

1.2.7 敏感性试验 将病毒滴度为 5^{3.75} TCID₅₀/0.1 mL 的 HLJ07I 病毒按照 5¹~5⁹ 倍比稀释,以提取 RNA 反转录后的 cDNA 作为模板,进行 SYBR Green I 实时荧光 PCR 试验,确定检测下限。

1.2.8 重复性试验 将同一批次的阳性标准品稀释为 10⁸~10⁶拷贝·μL⁻¹,进行 SYBR Green I 实时荧光 PCR 检测,每个标准品 3 次重复,根据 Tm 值差异计算板内变异系数(CV%);将同批次标准品分别稀释为 10⁸~10⁶拷贝·μL⁻¹,分 3 次进行检测,根据其 Tm 值计算板间变异系数。

1.2.9 样品检测 将人工感染 REV 的鸡的心、肝、脾、肺、肾、盲肠扁桃体、腺胃、法氏囊各称取 0.2 g,研磨后加入 200 μL PBS,反复冻融 3 次。按照 Simply P 总 RNA 提取试剂盒说明书提取 RNA,以反转录后的 cDNA 为模板。利用本研究建立的 SYBR Green I 实时荧光 PCR 检测方法,对人工感染 REV 的鸡的心、肝、脾、肺、肾、盲肠扁桃体、腺胃、法氏囊进行检测。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的建立

以 LTR 基因和 gag 基因的重组质粒为模板,进行 SYBR Green I 实时荧光 PCR 检测,扩增结果显示(见图 1,图 3);绘制标准曲线(见图 2,图 4)。LTR 基因与 gag 基因动力学曲线呈现指数扩增,阴性对照无扩增,Tm 均在(85±0.5)℃出现特异性荧光信号(见图 5),如 LTR 单独出现荧光信号则判定为插入感染;如两基因均

出现荧光信号则判定为全病毒污染。

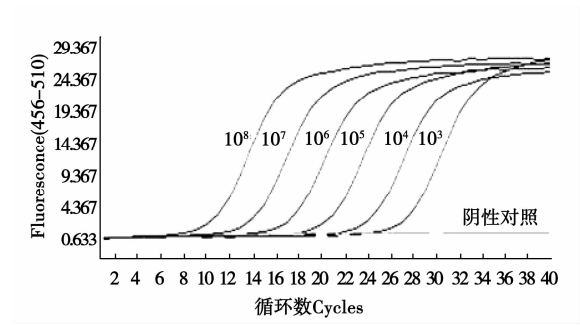


图1 SYBR Green I 实时 PCR LTR 基因扩增曲线
Fig. 1 Dynamic curve of fluorescent quantitative PCR of LTR

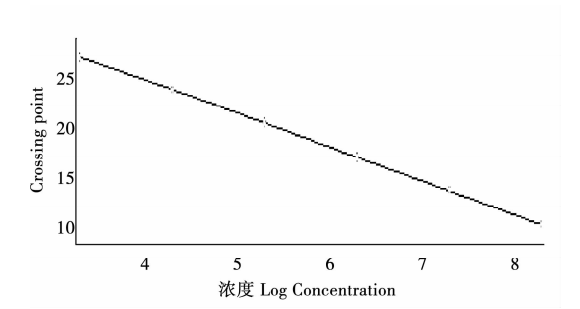


图2 SYBR Green I 实时 PCR LTR 基因标准曲线
Fig. 2 Standard curve of fluorescent quantitative PCR of LTR

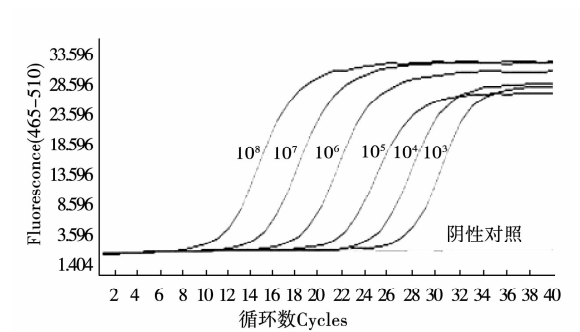


图3 SYBR Green I 实时 PCR gag 基因扩增曲线
Fig. 3 Dynamic curve of fluorescent quantitative PCR of gag

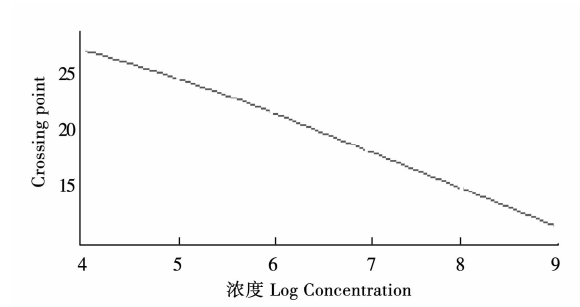


图4 SYBR Green I 实时 PCR gag 基因标准曲线
Fig. 4 Standard curve of fluorescent quantitative PCR of gag

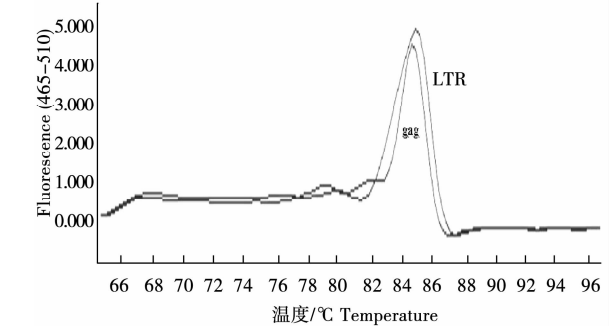


图5 SYBR Green I 实时 PCR 溶解曲线
Fig. 5 Melting curve of the SYBR Green I real-time PCR

2.2 特异性试验

以 ILTV、MDV、NDV、FPV、IBV、AIV、ALV、CAV、IBDV 的病毒核酸 cDNA 以及 *LTR* 基因和 *gag* 基因的标准品作为模板,进行 SYBR Green I 实时荧光 PCR 特异性检测。结果表明,仅 *LTR* 基因和 *gag* 基因阳性标准品呈现阳性信号,其它样品检测结果均为阴性(见图 6,图 7)。

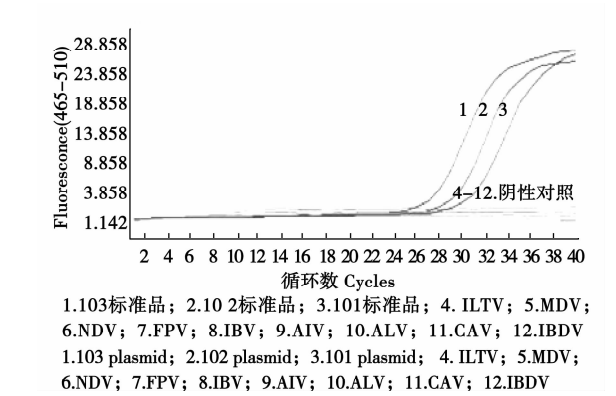


图6 SYBR Green I 实时 PCR LTR 基因特异性实验结果
Fig. 6 Specific test of the real-time PCR assay of LTR

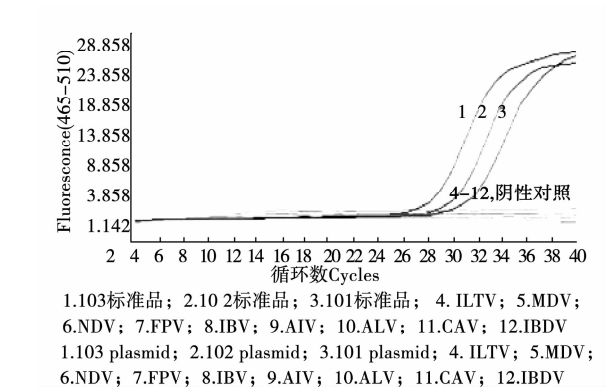


图7 SYBR Green I 实时 PCR gag 基因特异性实验结果
Fig. 7 Specific test of the real-time PCR assay of gag

2.3 敏感性试验

将 10 倍($10^{10} \sim 10^0$)倍比稀释的 p-LTR 和 p-gag 重组质粒作为模板,进行 SYBR Green I 实时荧光 PCR 检测,结果显示能够检测到最低量为 10 拷贝。是普通 PCR 的 1 000 倍(见图 8~图 11)。将病毒滴度为 $5^{3.75}$ TCID₅₀/0.1 mL 的 HLJ07I 病毒按照 $5^1 \sim 5^9$ 倍比稀释,以提取 RNA 反转录后的 cDNA 作为模板,进行 SYBR Green I 实时荧光 PCR 试验,确定该检测的最低限为 0.001TCID₅₀(见图 12,图 13)。

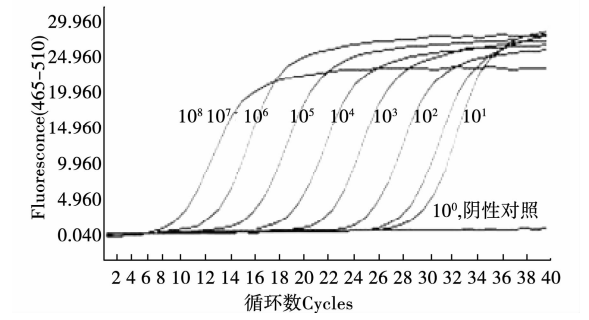


图 8 SYBR Green I 实时 PCR LTR 基因检测最低拷贝数敏感性实验结果

Fig. 8 Sensitivity test of the fluorescent quantitative PCR for lowest plasmid of LTR

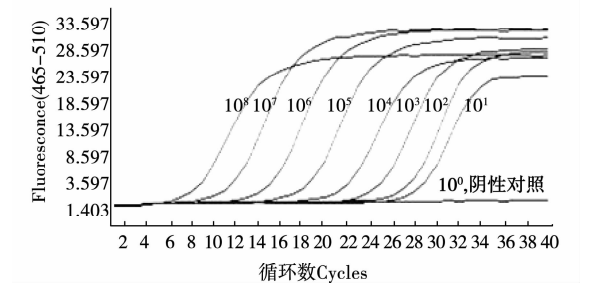


图 9 SYBR Green I 实时 PCR gag 基因检测最低拷贝数敏感性实验结果

Fig. 9 Sensitivity test of the fluorescent quantitative PCR for lowest plasmid of gag

2.4 重复性试验

板内板间重复试验结果显示,LTR 基因板内变异系数在 1.79%~2.89%;板间变异系数在 1.97%~2.40%。*gag* 基因板内变异系数在 0.87%~2.33%;板间变异系数在 1.73%~2.80%。两基因板内、板间重复试验的变异系数均低于 3%(见表 2)。

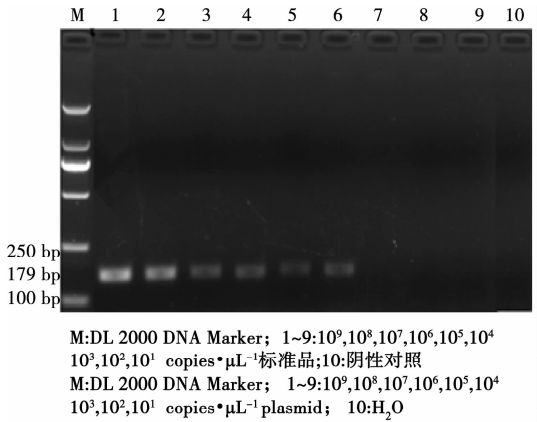


图 10 LTR 基因敏感性实验普通 PCR 检测最低拷贝数凝胶电泳结果

Fig. 10 Sensitivity test of the conventional PCR for lowest plasmid of LTR

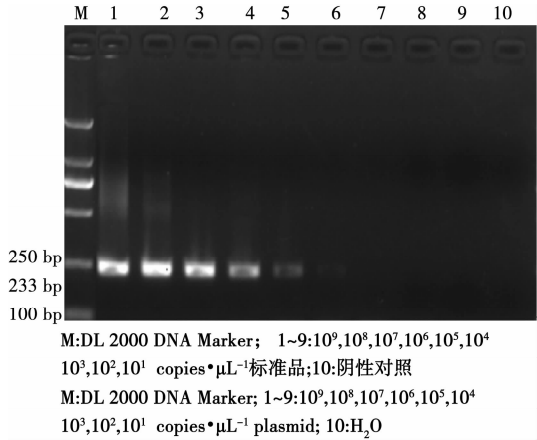


图 11 gag 基因敏感性实验普通 PCR 检测最低拷贝数凝胶电泳结果

Fig. 11 Sensitivity test of the conventional PCR for lowest plasmid of gag

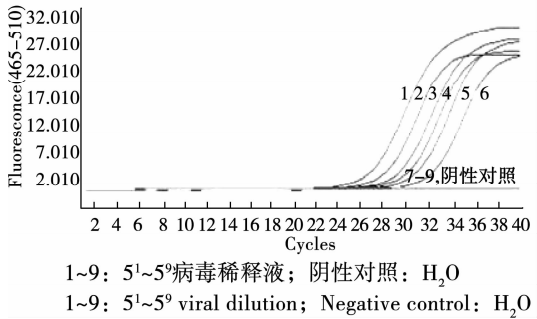


图 12 SYBR Green I 实时 PCR LTR 基因检测 TCID₅₀ 敏感性实验结果

Fig. 12 Sensitivity test of the fluorescent quantitative PCR for TCID₅₀ of LTR

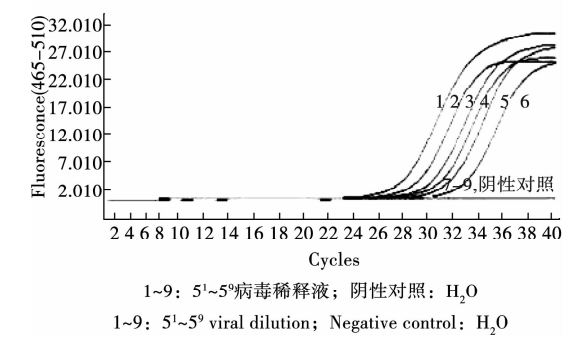


图 13 SYBR Green I 实时 PCR gag 基因检测 TCID₅₀ 敏感性实验结果

Fig. 13 Sensitivity test of the fluorescent quantitative PCR for TCID₅₀ of gag

2.5 样品检测

利用本研究建立的 SYBR Green I 实时荧光 PCR 方法,对采集攻毒后 38 日龄的 4 只鸡的脏器(心、肝、脾、肺、肾、盲肠扁桃体、腺胃、法氏囊)进行检测,将所得的病毒载量数据取平均值的对数作图。结果显示法式囊中的含量最高,是其它脏器的 10~100 倍(见图 14)。

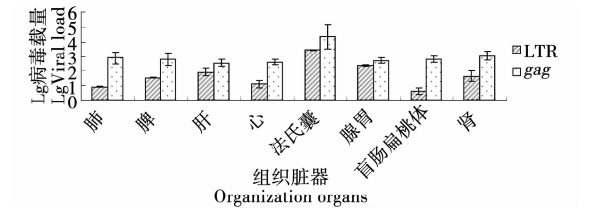


图 14 鸡脏器病毒载量

Fig. 14 Chicken viscera viral load

表 2 SYBR Green I 实时荧光 PCR 的板内、板间重复性试验结果(n=3)

Table 2 Intra-assay and inter-assay reproducibility test of he SYBR Green I real-time PCR(n=3)					
基因 Gene	质粒浓度/ (copies·μL ⁻¹) Concentration of standard plasmid	板内变异试验 Intra-assay variability(Ct)		板间变异试验 Inter-assay variability(Ct)	
		平均数 \bar{x}	变异系数/% CV	平均数 \bar{x}	变异系数/% CV
LTR	10 ⁸	13.77±0.43	2.22	22.57±0.12	2.34
	10 ⁷	15.23±0.43	2.89	21.37±0.67	2.40
	10 ⁶	16.80±0.30	1.79	23.63±0.30	1.97
gag	10 ⁸	17.53±0.17	2.33	19.42±0.17	2.80
	10 ⁷	17.86±0.12	1.79	19.57±0.08	2.01
	10 ⁶	22.40±0.40	0.87	19.87±0.57	1.73

3 结论与讨论

REV 对世界各地养禽业来说是个严重的威胁,特别是在中国,并且地域分布越来越广感染禽群数量不断增加^[3-5]。因禽群感染 REV 后造成免疫抑制,使生长发育受阻,生产性能降低,禽群死淘率升高,严重影响养殖业的经济效益,然而由于本病毒的致病特性,感染禽群往往容易表现出继发或并发感染症状致使整个疾病诊断复杂化,目前没有 REV 疫苗成功研制并投入使用,这就需要一种准确、快速、灵敏的检测方法。实时荧光定量 PCR 具有特异性好、灵敏度高、快速简便、高精度、高通量、易于标准化等优点,已经成为病原快速检测的金标准^[13]。本研究建立的 SYBR Green I 实时 PCR 具有扩增效率高、线性范围广、检测周期短、高通量等特点。此方法敏感性能够检测到 0.001TCID₅₀,最低量为 10 拷贝标准品,比常规 PCR 高 1 000 倍,克服了常规 PCR 因灵

敏度不够而导致假阴性的不足,为 REV 的检测、临床诊断及分子流行病学调查提供了有价值的方法。

由于针对 REV 的长末端重复序列设计引物建立实时荧光 PCR,无法鉴别样本中检出 REV 核酸序列是来自全病毒还是插入病毒感染^[14],因此,本研究又针对 gag 基因设计引物,对临床样本的检测更有针对性。

试验中对 REV 人工感染鸡只的不同组织进行了检测,初步探讨病毒在鸡体内的分布情况,荧光定量 PCR 检测结果表明:法式囊中的含量最高,其它脏器的病毒含量并无明显差异。李凯等^[11],在感染后第 7~42 d 的鸡肝、脾、法氏囊、胸腺以及腺胃中均能检测到病毒,组织器官中病毒载量的变化趋势无显著差异。该报道与本试验检测结果存在差异,可能是鸡个体的免疫水平存在差异,也可能与试验取材的时间等有关。赵丽青等^[12]曾对临床上的 REV 患病鸡进行检测,其试

验表明在感染鸡肝、脾、腺胃、肾、肌胃、肺中的病毒含量依次减少,与本试验检测结果存在差异,可能与攻毒剂量、试验取材的时间等有关,也有可能是使用的仪器不同而造成的差异。

综上所述,本检测方法特异性高,敏感性好,并能够对临床 REV 感染鸡的病毒含量及其分布进行检测,同时为禽源疫苗的 REV 污染监测提供了可靠的快速定量检测方法。

参考文献:

- [1] Witter R L, Fadly A M. Diseases of poultry [M]. 11th ed. Ames, IA: Iowa State University Press, 2003: 517-535.
- [2] Bohls R L, Collisson E W, Gross S L, et al. Experimental infection of Attwater's/greater prairie chicken hybrids with the reticuloendotheliosis virus [J]. Avian Disease, 2006, 50(4): 613-619.
- [3] Witter R L. Reticuloendotheliosis virus in bolder turkeys [J]. Avian Disease, 1987, 28: 742-750.
- [4] Mays J K, Silva R F, Lee L F, et al. Characterization of reticuloendotheliosis virus isolates obtained from broiler breeders, turkeys, and prairie chickens located in various geographical regions in the United States [J]. Avian Pathology, 2010, 39(5): 383-389.
- [5] Bagust T J, Grimes T M, Dennett D P. Infection studies on a reticuloendotheliosis virus contaminant of commercial Marek's disease vaccine [J]. Journal of Veterinary Science, 2004, 5(1): 41-49.
- [6] 杜岩, 崔治中. 禽网状内皮增生病感染引起的鸡群免疫抑制 [J]. 中国兽医学报, 2001, 21(2): 122-124.

- [7] Zheng Y S, Cui Z Z, Zhao P, et al. Effects of reticuloendotheliosis virus and Marek's disease virus infection and co-infection on IFN-gamma production in SPF chickens [J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2007, 69(2): 213-216.
- [8] Gautier R, Jiang A, Rousseau V, et al. Avian reticuloendotheliosis virus strain A and spleen necrosis virus do not infect human cells [J]. Journal of Virology, 2000, 74(1): 518-522.
- [9] Lin C Y, Chen C L, Wang C C, et al. Isolation, identification, and complete genome sequence of an avian reticuloendotheliosis virus isolated from geese [J]. Vet Microbiol, 2009, 136(3-4): 246-249.
- [10] 翟新宴, 王兴龙, 卢胜明, 等. 聚合酶链反应技术检测禽网状内皮组织增殖病病毒 [J]. 中国实验动物学报, 2007, 15(6): 444-448.
- [11] 李凯, 高宏雷, 王笑梅, 等. 禽网状内皮组织增生病病毒 TaqMan 探针荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用 [J]. 中国兽医科学, 2010, 40(11): 1137-1141.
- [12] 赵丽青, 王树峰, 吴延功, 等. 禽网状内皮组织增殖病病毒的实时荧光定量 PCR 检测 [J]. 中国兽医学报, 2007, 27(6): 795-798.
- [13] Levin R E. The application of real time PCR to food and agricultural systems [J]. A Review Food Biotechnology, 2004, 18(1): 97-133.
- [14] Jody K Mays, Robert F Silva, Taejoong Kim, et al. Insertion of reticuloendotheliosis virus long terminal repeat into a bacterial artificial chromosome clone of a very virulent Marek's disease virus alters its pathogenicity [J]. Avian Pathology, 2012, 41(3): 259-265.

Development of SYBR Green I Real-time PCR for the Detection of Avian Reticuloendotheliosis Virus

NIU Xiu-jie^{1,2}, ZHAO Yan², XUE Mei², WANG Yun-feng^{1,2}

(1. College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030;
2. State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology/Division of Avian Infectious Diseases,
Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin,
Heilongjiang 150001)

Abstract: In order to develop rapid detection method for Avian Reticuloendotheliosis Virus (REV), According to the REV *gag* gene sequence deposited in GenBank, a pair of specific primers were designed which target to the conserved region of LTR gene and *gag* gene, a SYBR Green I-based real-time PCR method was established. The standard curve was constructed by using the pMD-18T-LTR and pMD-18T-*gag* plasmid. The results showed that high specificity as only the REV positive samples were amplified, and no cross-reaction was found with other avian pathogens. The coefficients of variation of intra- and inter-assay reproducibility were both less than 3%. The virus loads in these organs showed no evidently difference except bursa.

Keywords: SYBR Green I; real-time PCR; reticuloendotheliosis virus; *gag* gene; LTR gene