

鸭出血性卵巢炎病毒 RT-PCR 检测方法的建立

万春和, 施少华, 程龙飞, 陈红梅, 傅光华, 彭春香, 林芳, 林建生, 黄瑜

(福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福建 福州 350013)

摘要: 参照 GenBank 上登录的黄病毒科黄病毒属 *NS5* 基因片段序列设计引物, 建立能检测引起鸭出血性卵巢炎病毒的 RT-PCR 方法。该方法能从鸭出血性卵巢炎病毒扩增出 1 条约 470 bp 的特异性片段, 从 H9 亚型禽流感病毒、鸭呼肠孤病毒、鸭瘟病毒、鸭肝炎病毒、鸭源禽 I 型副粘病毒均不能扩增出目的片段; 敏感性试验显示建立的 RT-PCR 方法最低可检出 20 pg 病毒核酸。以上结果表明建立的 RT-PCR 方法具有较好的特异性、敏感性和准确性, 可用于该病的临床诊断和流行病学调查。

关键词: 鸭出血性卵巢炎; 黄病毒; RT-PCR

中图分类号: S 855. 3; S858. 32

文献标识码: A

Establishment of RT-PCR for detecting duck hemorrhagic ovaritis causing abrupt egg laying reduction in ducks

WAN Chun he, SHI Shao hua, CHENG Long fei, CHEN Hong mei, FU Guang hua, PENG Chun xiang,
LIN Fang, LIN Jian sheng, HUANG Yu

(Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences,
Fuzhou, Fujian 350013, China)

Abstract: A pair of primers based on *NS5* gene sequences of different strains of genus *Flavivirus* was designed for amplification of 470 bp fragments. No positive target fragment was available from H9 subtype influenza virus, Muscovy duck reovirus, duck plague, duck hepatitis virus (DHV- I) or duck origin avian paramyxovirus type I . The detection limit reached 20 pg under the optimized conditions. The results showed that the RT-PCR was sensitive, specific and applicable for rapid laboratory diagnosis and epidemiologic surveillance.

Key words: ducks hemorrhagic ovaritis; *Flavivirus*; RT-PCR

自 2010 年 4 月初以来, 我国江苏、浙江、山东、福建等省的种鸭、蛋鸭发生一种以采食量迅速下降、产蛋率急速下降、甚至停产及不同程度死亡为特征的疫病, 俗称种 (蛋) 鸭产蛋骤降、卵巢出血症, 现命名为鸭出血性卵巢炎 (Duck Hemorrhagic Ovaritis, DHO)。各品种蛋鸭、樱桃谷种鸭和台湾白改种鸭均有发生, 但主要见于开产蛋鸭。产蛋率高的鸭群患病后 4~ 5 d 从产蛋高峰或高产蛋率迅速下降至 20%~ 30%, 严重的于发病后 7 d 左右停产; 刚开产种 (蛋) 鸭产蛋率上升缓慢或减蛋, 长时间低产蛋率或无产蛋高峰出现。不同地区、不同品种鸭群发病率高高低不一, 群内发病率几乎 100%, 病死率为 0%~ 12%。

本试验从表现产蛋骤降的病死种鸭中以番鸭胚分离到病毒, 并明确其为黄病毒科黄病毒属的一个新成员^[1], 旨在建立一种检测该类病毒的 RT-PCR 的诊断方法。

1 材料与方 法

1. 1 毒株

产蛋异常鸭 H9N2 亚型禽流感病毒、鸭呼肠孤病毒 (DRV)、I-型鸭肝炎病毒 (DHV- I)、鸭源禽 I 型副粘病毒 (APMV-1)、鸭瘟病毒 (DPV), 鸭出血性卵巢炎病毒均由本实验室分离鉴定并保存。

收稿日期: 2011- 01- 05 初稿; 修改稿 2011- 01- 26

作者简介: 万春和 (1982-), 男, 助理研究员, 主要从事水禽病毒分子生物学研究 (E mail: chunhewan@126.com)

通讯作者: 黄瑜 (1966-), 男, 研究员, 博士, 主要从事动物传染病研究 (E mail: huangyu_815@163.com)

基金项目: “十二五” 国家水禽产业技术体系 (CARS-43-01A); 科技部科技人员服务企业行动项目 (2009GJC40037); 福建省星火科技计划项目 (2009S0110); 福建省农业科学院科技创新团队建设基金 (STIFY02)

1.2 试剂

Trizol Reagent 购自 Invitrogen 上海有限责任公司, AMV 反转录酶、HPRI、dNTPs (2.5 mmol·L⁻¹ each) 和 pMD18-T 载体均购自宝生物工程 (大连) 有限公司, GoTaq Master Green Mix 购自 Promega 公司, 琼脂糖凝胶回收小量试剂盒、质粒小量抽提试剂盒购自 Omega 公司。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5α 感受态细胞自制。

1.3 病毒核酸的提取

参考文献 [2] 提取鸭瘟病毒的 DNA, 参考文献 [3] 提取产蛋异常鸭 H9N2 亚型禽流感病毒、鸭呼肠孤病毒 (DRV)、I-型鸭肝炎病毒 (DHV-I)、鸭源禽 I 型副粘病毒 (APMV-I)、鸭出血性卵巢炎病毒的 RNA, 按照反转录酶使用说明书进行反转录合成 cDNA, -20℃保存备用。

1.4 引物的设计

根据 GenBank 上登录的黄病毒科黄病毒属成员的序列和其基因组结构特征, 应用 Oligo 7.0 设计引物, 上游引物 Fla 检测 F1: 5'-CTA (T/C) CA (T/C) GGAAG (T/C) TACGAAGT-3'; 下游引物 Fla 检测 R469: 5'-CTTTTCTCGCTT (T/C) CCCATCAT-3'; 预计目的片段为 469 bp, 引物由宝生物工程 (大连) 有限公司合成。

1.5 RT-PCR 方法的建立

1.5.1 退火温度的优化 用所设计的特异性引物进行 PCR 扩增, 扩增体系为 50 μL, 其中其中 2×GoTaq Master Green Mix 25 μL、上下游引物 (20 μm·mL⁻¹) 各 1 μL、cDNA 模板 1 μL, 补充灭菌去离子水至终体积 50.0 μL。反应条件为 94℃ 5 min 预变性后进入循环, 循环参数为 94℃ 50 s, (ΔT)℃ 30 s, 72℃ 45 s, 35 个循环后, 72℃延伸 10 min。退火温度 (ΔT) 在 48~64℃进行优化。

1.5.2 特异性试验 用 1.5.1 中优化的最佳条件分别检测, 对产蛋异常鸭 H9N2 亚型禽流感病毒、鸭呼肠孤病毒 (DRV)、I-型鸭肝炎病毒 (DHV-I)、鸭源禽 I 型副粘病毒 (APMV-I) 病毒和鸭出血性卵巢炎病毒的 cDNA 及鸭瘟病毒 (DPV) 的 DNA 进行检测, 对其特异性进行评价。取 PCR 产物 5 μL, 在 1% 琼脂糖凝胶上电泳。将 PCR 产物经胶回收试剂盒纯化后与 pMD18-T 载体连接, 转化 DH5α 感受态细胞, 用 PCR 和双酶切方法鉴定重组质粒, 阳性重组质粒送由上海生工生物工程技术有限公司进行序列测定。

1.5.3 敏感性试验 将所提取的鸭出血性卵巢炎病毒的 RNA 进行定量, 10 倍梯度连续稀释, 按上

述 PCR 反应进行扩增, 测定模板最低检出量, 判定该 RT-PCR 方法的敏感度。

1.5.4 临床样品的检测 对 9 份疑似鸭出血性卵巢炎病毒感染的样品按照建立并优化的 RT-PCR 方法进行检测, 阳性样品进行克隆测序分析。

2 结果与分析

2.1 退火温度的优化

通过梯度 PCR, 筛选出最佳的 PCR 退火温度为 53.5℃, PCR 产物经克隆后测序, 所得序列通过 BLAST 进行比对, 结果显示与预计结果一致。

2.2 特异性试验

从鸭出血性卵巢炎病毒样本中检测阳性扩增, 克隆测序结果分析表明其属于黄病毒属成员; 而从产蛋异常鸭 H9N2 亚型禽流感病毒、鸭呼肠孤病毒 (DRV)、I-型鸭肝炎病毒 (DHV-I)、鸭源禽 I 型副粘病毒 (APMV-I) 和鸭瘟病毒 (DPV), 均未见阳性扩增 (图 1)。

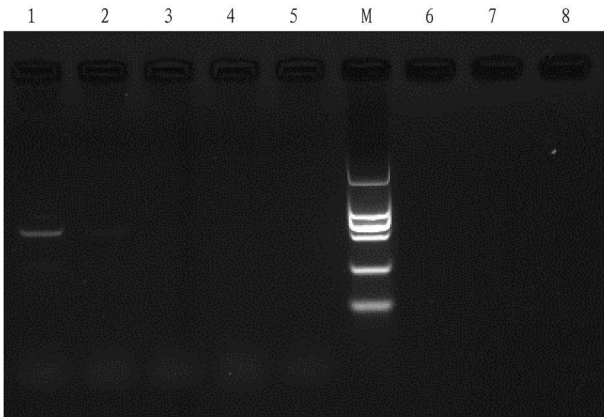


图 1 RT-PCR 特异性试验结果

Fig 1 Specificity of RT-PCR assay

1: 鸭出血性卵巢炎病毒, 2: 产蛋异常鸭 H9N2 亚型禽流感病毒, 3: 鸭呼肠孤病毒 (DRV), 4: I-型鸭肝炎病毒 (DHV-I), M: DL 2 000DNA Marker, 5: 鸭源禽 I 型副粘病毒 (APMV-I), 6: 鸭瘟病毒 (DPV), 7~8: 阴性对照

2.3 敏感性试验

用 Fla 检测 F1、Fla 检测 R469 引物对不同浓度的鸭出血性卵巢炎病毒 RNA 反转录的 cDNA 进行扩增, 结果可检测出 20 pg (第 8 道) 病毒核酸 (图 2)。

2.4 临床样品的检测

将所建立的对 9 份鸭出血性卵巢炎病毒按照建立并优化的 RT-PCR 方法进行检测, 有 5 份阳性, 经克隆测序表明均是阳性目的判断扩增, 阳性率为 55.56%。

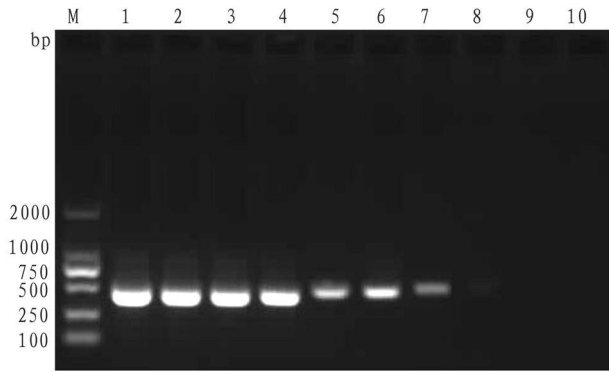


图 2 RT-PCR 敏感性试验结果
Fig 2 Sensitivity of RT-PCR assay

M: DL 2 000DNA Marker; 1-9: 样品溶液; 10: 阴性对照。

3 讨 论

3.1 准确、快速地诊断疫病是控制疫病在畜禽中流行的重要环节，然而传统的实验室诊断方法如病毒分离、免疫荧光法和免疫组化法，不仅操作繁琐，耗时费力，而且对于已经灭活、自溶的样品无能为力。PCR（RT-PCR）技术检测的是样品中病原体核酸，即使对病原体灭活样品和自溶样品，也具有良好的敏感性和特异性，已应用于多种病原体的检测和疾病的流行病学调查。

3.2 目前，多种 PCR 技术已广泛应用于黄病毒属特异性诊断^[4-7]。检测的基因主要针对其 NS5 蛋白，其是黄病毒科病毒基因组编码的多聚蛋白 C 端的一个非结构蛋白。以其为参照序列设计引物，建立检测的 RT-PCR，敏感性、特异性和临床样品检测结果表明，该方法具有较好的特异性，能最低检测到 20 pg 黄病毒，并可对临床病料中的 9 份疑似病例进行检测，结果表明该种黄病毒感染阳性率达 55.56%，说明鸭出血性卵巢炎病毒感染在产蛋骤降种鸭中相当普遍，应引起重视。

3.3 临床上，导致种（蛋）鸭发生产蛋异常的病因较多，除了饲养管理和环境因素等诱因外，疾病感染是一个十分重要的影响因素^[3,8-10]。有关引起

种鸭和蛋鸭出现产蛋异常的病原研究报道日渐增多，但以禽流感病毒和减蛋综合征病毒为主。此次我国种（蛋）鸭发生产蛋骤降疫病，给我国养鸭业尤其是对种鸭和蛋鸭业造成十分严重的经济损失。本 RT-PCR 检测方法的建立为研究控制该类黄病毒在我国的流行，甚至消灭该类黄病毒都具有重要意义。

参考文献:

[1] 万春和, 施少华, 程龙飞, 等. 一种引起种（蛋）鸭产蛋骤降新病毒的分离与初步鉴定 [J]. 福建农业学报, 2010, 25 (6): 663- 666.

[2] 万春和, 施少华, 程龙飞, 等. 朗德鹅圆环病毒全基因组序列测定和遗传演化分析 [J]. 中国动物传染病学报, 2010, 18 (4): 6- 12.

[3] 傅光华, 程龙飞, 施少华, 等. 产蛋异常蛋鸭 H9N2 亚型禽流感病毒的分离鉴定 [J]. 中国农学通报, 2009, 25 (22): 21- 24.

[4] LANCIOTTI R S. Molecular Amplification assays for the detection of Flaviviruses [J]. Adv virus Res, 2003, 61: 67- 99.

[5] ELDADAH Z, ASHER D, GODEC M, et al. Detection of Flavivirus by reverse transcriptase polymerase chain reaction [J]. J Med Virol, 1991, 33: 260- 267.

[6] JACKSON G, MCNICHLOS R, FOX G, et al. Toward universal Flavivirus identification by mass cataloging [J]. Journal of Molecular Diagnostics, 2008, 10 (2): 135- 141.

[7] TREPO C, VIERLING J, ZEYTIN F, et al. The first Flaviviridae symposium [J]. Intervirology, 1997, 40 (4): 279 - 288.

[8] 黄瑜, 李文杨, 程龙飞, 等. 种（蛋）鸭产蛋异常研究 [J]. 福建畜牧兽医, 2001, 23 (3): 8.

[9] COUDERT F, CAKALA A, SALAMONOWICZ E, et al. Effect of a preliminary infection of ducks with EDS- 76 virus on the Derzsy's disease pathology [J]. Ann Rech Vet, 1987, 18 (1): 79- 84.

[10] Center for Food Security and Public Health [EB/OL]. [2006 - 03 - 28]. http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/egg_drop_syndrome.pdf.

(责任编辑: 翁志辉)