

文章编号: 1002-2694(2005)07-0595-03

## 多重 RT-PCR 快速检测鉴别 H7 亚型禽流感病毒方法的建立\*

庞耀珊, 谢芝勋, 邓显文, 唐小飞, 刘加波

**摘要:**目的 参考 AIV M 基因和 HA 基因序列, 设计了两对引物。其中 XZ145-2 和 XZ146 为通用引物, 可以检测所有亚型 AIV, 跨幅 244 bp; XZ H7-1 和 XZ H7-2 为 H7 亚型特异性引物, 跨幅 634 bp。利用这两对引物, 通过对多重 RT-PCR 扩增条件的优化, 成功建立了快速检测鉴别 H7 亚型 AIV 的多重 RT-PCR 技术。特异性和敏感性试验结果表明, 该技术对 H7 亚型 AIV 同时扩增出两条大小分别为 244 bp 和 634 bp 的 cDNA 片段, 对其他亚型 AIV 只扩增出 244 bp 的 cDNA 片段, 对其他常见禽病病原无特异性扩增, 结果为阴性; 该多重 RT-PCR 对 AIV RNA 的最低检出量为 1pg, 对 H7 亚型 AIV RNA 的最低检出量为 10pg。

**关键词:** 多重; 反转录聚合酶链反应; 禽流感病毒; H7 亚型

**中图分类号:** R373.1 **文献标识码:** A

### Development of a multiplex reverse transcription polymerase chain reaction for the identification of subtype H7 avian influenza virus

PANG Yao-shan, XIE Zhi-xun, DENG Xian-wen, TANG Xiao-fei, LIU Jia-bo

(Guangxi Veterinary Research Institute, Nanning, 530001, China)

**ABSTRACT:** A multiplex reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was developed and optimized to detect the avian influenza virus (AIV) subtype H7. Two sets of specific oligonucleotide primers were designed in this test, of which one set of primer, XZ145-2 and XZ146, based on the highly conserved region of the matrix gene, was able to amplify cDNA of 244 bp for all subtypes of AIV, while the other set, XZ H7-1 and XZH7-2, based on the relatively conserved region of the hemagglutinin gene of subtype H7, could only be able to amplify cDNA of 634 bp for subtype H7. The results of specificity of this multiplex RT-PCR demonstrated that these two specific cDNA bands of 244 and 634 bp were observed simultaneously only for RNA isolated from H7 subtype, only one specific cDNA band of 244 bp was observed for RNA isolated from other subtype of AIV, and no specific cDNA bands of neither 244 bp nor 634 bp was observed for RNA/DNA isolated from other avian pathogens or tissues of SPF embryos after amplification. The sensitivity assay indicated that as little as 1 pg of RNA isolated from any subtypes of AIV and 10 pg of RNA isolated from H7 subtype of AIV could be identified by this multiplex RT-PCR.

**KEY WORDS:** multiplex; reverse transcription polymerase chain reaction; avian influenza virus; H7 subtypes

禽流感病毒(AIV)属于 A 型流感病毒,除了可感染禽类外,还可感染人、猪和马等多种动物,为 A 类动物传染病。流感病毒基因组由包括 M 基因和 HA 基因在内的 8 个负链单股 RNA 片段组成。其中 M 基因组序列高度保守,HA 基因组则可变性很强,其某些位点的变异可导致不同 HA 亚型的出现。目前 AIV 有 15 个 HA 亚型,根据致病性的不同可将其分为高致病性和低致病性毒株,其中 H7 亚型是潜在性的高致病亚型,除了给养禽业带来严重经济损失外<sup>[1-2]</sup>,还可感染人,甚至导致死亡<sup>[3]</sup>。病毒分离、血清学试验至今仍是诊断 AI 和对 AIV 进

行定型普遍采用的方法。但这些方法操作繁琐复杂,难以对 AI 进行快速诊断,十分不利于 AI 的有效防治。聚合酶链式反应(PCR)是一种基因体外扩增技术,可以在数小时内对某段基因进行扩大数百万倍。该技术特异性强、敏感性高,检测快速,已被广泛应用于生命医学的各个领域。多重 PCR 是一种特殊 PCR 形式,其最突出特点是一次 PCR 可同时检测、鉴别多种病原体,在临床多种病原混合感染的鉴别诊断上具有其独特优势和很高的实用价

\* 广西科技攻关项目(NO:0235001-4)和广西留学基金项目(NO:0236005)。

作者单位:广西壮族自治区兽医研究所,南宁 530001

值<sup>[3-4]</sup>。本研究根据 RT-PCR 技术原理,研究建立了 H7 亚型 AIV 的多重 RT-PCR 检测鉴别技术。现将结果报告如下。

## 1 材料与方 法

1.1 试验用毒株 H7N1 RNA, 由美国宾夕法尼亚州立大学禽病诊断研究室惠赠; H5 亚型和 H9 亚型 AIV 毒株, 本实验室从鸡、鸭、鹅等家禽中分离并鉴定; NDV F48、IBV M41、ILTV 及 MG S6, 为本实验室保存。

1.2 生化试剂 Trizol RNA 抽提试剂, 购自 GIBCO 公司; RT-PCR 试剂盒, 购自大连宝生物技术服务有限公司。

### 1.3 试验设计

1.3.1 引物设计及合成 利用基因库, 参考 AIV M 基因和 HA 基因序列, 设计合成了两对引物。其中 XZ145-2 和 XZ146 为通用引物, 可以检测所有 HA 亚型 AIV, 跨幅 244 bp; XZ H7-1 和 XZ H7-2 为 H7 亚型特异性引物, 跨幅 634 bp。引物序列如下:

XZ145-2: 5'-CTTCTAACCGAGGTCGAAAC-3'

XZ146: 5'-AGGGCATTTTGGACAAAKCGTCTA-3'

XZ H7-1: 5'-GGGATACAAAATGAAYACTC-3'

XZ H7-2: 5'-CCATABARYYTRGTCTGYTC-3'

(其中: B 代表 G, T, C; K 代表 G, T; Y 代表 C, T; R 代表 A, G;)

1.3.2 病原 RNA 提取 在 250  $\mu$ L 鸡胚尿囊液中加入 750  $\mu$ L Trizol RNA 抽提试剂, 参照该试剂使用方法提取病毒 RNA, 并按 Sambrook 方法<sup>[5]</sup>测定 RNA 的纯度及浓度, -20  $^{\circ}$ C 保存。

1.3.3 反转录 在 2  $\mu$ L RNA 模板中分别加入 25mmol/ $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> 4 $\mu$ L, 10 $\times$  RNA PCR buffer 2 $\mu$ L, 2.5mmol/ $\mu$ L dNTPs 2 $\mu$ L, 40 units/ $\mu$ L RNase Inhibitor 1 $\mu$ L, 5units/ $\mu$ L AMV Reverse Transcriptase 1 $\mu$ L, 25 pmol/ $\mu$ L 上游引物 XZ145-2 和 XZ H7-1 各 1 $\mu$ L, 用 DEPC H<sub>2</sub>O 补足体积至 20  $\mu$ L, 离心混匀后, 在 PCR 仪上设定程序进行反转录。

1.3.4 多重 PCR 在 20  $\mu$ L cDNA 溶液中继续加入: 25 mmol/ $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> 1 $\mu$ L, 10 $\times$  PCR buffer 3 $\mu$ L, 5 units/ $\mu$ L Taq 聚合酶 0.5 $\mu$ L, 25 pmol/ $\mu$ L 下游引物 XZ146 和 XZH7-2 各 1  $\mu$ L, 用 dH<sub>2</sub>O 补足总量至 50 $\mu$ L。离心混匀后, 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 RT-PCR 产物分析 取 10  $\mu$ L 多重

PCR 产物和 2 $\mu$ L 加样缓冲液混合, 以 5V/cm 电压在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 溴化乙锭染色后, 用凝胶成像系统拍照, 分析结果。

1.4 特异性试验 将从 H7N1、H5 和 H9 分离株、NDV F48、IBV M41、ILTV、MG S6 以及 SPF 鸡胚组织提取的 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。对其余 12 个 HA 亚型 AIV 的检测试验在美国宾夕法尼亚州立大学禽病诊断室进行。回收、纯化 244 bp 和 634 bp 的 cDNA 扩增片段, 由大连宝生物技术服务有限公司进行测序, 并用 Dnastar 基因分析软件分析测序结果, 检测该多重 RT-PCR 的特异性。

1.5 敏感性试验 测定 H7 亚型 AIV RNA 的含量, 10 倍系列稀释后进行多重 RT-PCR, 测定该多重 RT-PCR 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  $^{\circ}$ C 25 min, 96  $^{\circ}$ C 5 min, 4  $^{\circ}$ C 结束。多重 PCR 的最佳循环条件为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后, 进入 94  $^{\circ}$ C 变性 45 sec, 58  $^{\circ}$ C 退火 45 sec, 72  $^{\circ}$ C 延伸 105 sec 的循环, 共循环 35 次, 然后 72  $^{\circ}$ C 再延伸 10 min, 4  $^{\circ}$ C 结束。

2.2 特异性试验结果 该多重 RT-PCR 对 H7N1 RNA 分别同时扩增出两条与实验设计相符的 244 bp 和 634 bp 的 cDNA 片断, 对其余 HA 亚型 AIV RNA 只扩增出一条 244 bp 的 cDNA 片断, 对 NDV F48、IBV M41、ILTV、MG S6 及 SPF 鸡胚组织 RNA/DNA 不出现特异性扩增, 无 244 bp 和 634 bp 的 cDNA 片断出现, 结果呈阴性, 见图 1。对所回收的 244 bp 和 634 bp cDNA 扩增片断进行测序, 测序结果经 Dnastar 基因分析软件分析, 其中 244 bp cDNA 片断与 AIV M 基因有着高度同源性, 634 bp cDNA 片断则与 H7 亚型 HA 基因有着高度同源性。结果表明, 这些基因序列与原参考序列的基因来源相同, 分别来源于 AIV 的 M 基因和 H7 亚型的 HA 基因。结果略。

2.3 敏感性试验结果 经测定, 该多重 RT-PCR 对 AIV RNA (通用引物 XZ145-2、XZ146) 的最低检测量为 1pg, 对 H7 亚型 AIV RNA (特异性引物 XZ H7-1、XZ H7-2) 的最低检测量为 10pg。结果见图 2。

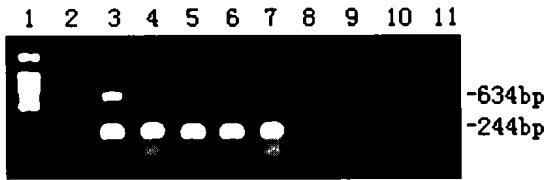


图1 多重 RT-PCR 特异性试验

1. 100 bp DNA ladder marker; 2. SPF 鸡胚组织阴性对照; 3. H7 亚型 AIV; 4-5. H5 亚型 AIV; 6-7. H9 亚型 AIV;

Fig.1 Specificity of multiplex RT-PCR

1. 100bp DNA ladder marker; 2. Negative control; 3. H7 subtypes AIV; 4-5. H5 subtype AIV; 6-7. H9 subtype; 8. NDV; 9. IBV M41; 10. ILTV; 11. MG S6



图2 多重 RT-PCR 敏感性试验

1. 100bp DNA ladder marker; 2. SPF 健康鸡胚组织阴性对照; 3. 10ng; 4. 1ng; 5. 100pg; 6. 10pg; 7. 1pg; 8. 100fg; 9. 10fg; 10. 1fg

Fig.2 Sensitivity of multiplex RT-PCR

1. 100bp DNA ladder marker; 2. Negative control; 3. 10ng; 4. 1ng; 5. 100pg; 6. 10pg; 7. 1pg; 8. 100fg; 9. 10fg; 10. 1fg.

### 3 讨论

3.1 禽流感是一种可感染多种动物和人的烈性传染病,其血清型众多,并且很容易发生变异。传统的病毒分离和血清学试验难以对流行的亚型快速鉴别。多重 PCR 是一种特殊形式的 PCR,它可同时扩增多个目的片段。本试验根据这一原理和多重 PCR 引物设计原则,参考基因库中 AIV 高度保守的 M 基因序列和变异性很强的 HA 基因序列,分别设计了一对 AIV 通用引物(XZ145-2、XZ146)和一对 H7 亚型 AIV 特异性引物(XZ H7-1、XZ H7-2),通过对多重 RT-PCR 扩增条件的优化,成功建立了快速检测 H7 亚型 AIV 的多重 RT-PCR 技术。该技术只需数小时就能对 H7 亚型进行检测鉴别,这

对具有潜在高致病性并可感染人的 H7 亚型 AIV 的有效防治有着十分重要的意义。

3.2 特异性结果显示,该多重 RT-PCR 对 H7 亚型 AIV 可以同时扩增出 244 bp 和 634 bp 两条 cDNA 片段,对其余 HA 亚型 AIV 只扩增出一条 244 bp cDNA 片段,对其他病原;如:NDV、IBV、ILTV、MG 及 SPF 鸡胚组织无特异性扩增,结果为阴性。回收的 244 bp 和 634 bp 两片段的测序结果与原参照序列的同源性分析结果也显示这些序列来源相同,这进一步说明该多重 RT-PCR 具有高度特异性。由于该多重 RT-PCR 不但可以特异性地检测不同 HA 亚型 AIV,而且不需要进行二次 PCR,就可在几小时内直接对 H7 亚型进行鉴定,这十分有利于 H7 亚型 AIV 的快速诊断和争取有效控制该病的宝贵时间。

3.3 敏感性试验结果也显示,该多重 RT-PCR 对 AIV RNA 的最低检测量为 1pg,对 H7 亚型 AIV RNA 的最低检测量为 10pg。如此高的灵敏度,提示不用对病毒进行分离繁殖,就可直接对临床样品进行检测鉴别。可见,该方法可以作为 H7 亚型 AIV 检测与鉴定的有效手段。

### 参考文献:

- (1) Alexander D J. A review of avian influenza in different bird species [J]. *Vet Microbiol*, 2000, 74: 3-13.
- (2) Alexander D J. The epidemiology and control of avian influenza and Newcastle disease [J]. *J. Comp. Pathol.* 1995, 112: 105-126.
- (3) Koopmans M, Wilbrink B, Conyn M, et al. Transmission of H7N9 avian influenza A virus to human being during a large outbreak in commercial poultry farm in the Netherlands [J]. *Lancet*, 2004, 363: 587-593.
- (4) Pang Y, Wang H, Girshick T, Xie Z, et al. Development and application of a multiplex polymerase chain reaction for avian respiratory agents [J]. *Avian Dis.* 2002, 46(3): 691-699.
- (5) 谢芝勋, 谢志勤, 庞耀珊, 等. 应用三重聚合酶链反应同时检测 NDV、IBV、MG 的研究 [J]. *中国动物检疫*, 2000, 17(11): 20-22.
- (6) Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual* [M], 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 9880-9898.

收稿日期: 2005-01-26; 修回日期: 2005-03-21