

H5 和 H7 亚型禽流感病毒多重反转录聚合酶链反应快速检测及鉴别方法的建立

谢芝勋, 庞耀珊, 邓显文, 唐小飞, 刘加波
(广西兽医研究所, 广西南宁 530001)

摘要: 参考禽流感病毒(AIV) M 基因和 HA 基因序列设计了 3 对引物, 其中 1 对为针对不同 HA 亚型 AIV 的通用引物, 另外 2 对为分别针对 AIV H5 和 H7 亚型的特异性引物。这些引物所扩增的 cDNA 片段大小分别为 244、860 和 634 bp。利用这 3 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 AIV H5、H7 亚型的多重 RT-PCR 技术。特异性和敏感性试验结果表明, 该技术对 AIV H5 亚型同时扩增出 2 条大小分别为 244 bp 和 860 bp 的 cDNA 片段; 对 AIV H7 亚型同时扩增出 2 条大小分别为 244 bp 和 634 bp 的 cDNA 片段; 对 AIV H5 和 H7 亚型混合样品能同时扩增出 3 条大小分别为 244、860 和 634 bp 的 cDNA 片段; 对其他 AIV HA 亚型只扩增出 1 条 244 bp 的 cDNA 片段; 对其他常见禽病病原扩增均为阴性; 该多重 RT-PCR 对 AIV RNA、AIV H5 和 AIV H7 亚型 RNA 的最低检出量分别为 10、100 和 100 pg。

关键词: 多重反转录聚合酶链反应; 禽流感病毒; H5 亚型; H7 亚型

中图分类号: S 852.659.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6419(2005)06-0437-04

Development of multiplex RT-PCR for identification of H5 and H7 subtypes of avian influenza virus

XIE Zhi-xun, PANG Yao-shan, DENG Xian-wen, TANG Xiao-fei, LIU Jia-bo
(Guangxi Veterinary Research Institute, Nanning 530001, China)

Abstract: A multiplex RT-PCR was developed to detect H5 subtypes of avian influenza virus (AIV). Three sets of specific oligonucleotide primers were designed for the detection of AIV H5 and H7 subtypes. The primers XZ145-2 and XZ146 based on the highly conserved region of the matrix gene could be used to amplify cDNA bands of 244 bp for all subtypes AIV, the primers XZ H5-1 and XZ H5-5 based on the relatively conserved region of the hemagglutinin gene of H5 subtype could only be used to amplify cDNA bands of 860 bp for H5 subtypes AIV, and the primers XZ H7-1 and XZ H7-2 based on the relatively conserved region of the hemagglutinin gene of H7 subtype could only be used to amplify cDNA bands of 634 bp for H7 subtypes AIV. Two specific cDNA bands of 244 bp and 860 bp were observed simultaneously only for RNA extracted from H5 subtypes AIV, two specific cDNA bands of 244 bp and 634 bp were observed simultaneously only for RNA extracted from H7 subtypes AIV, three specific cDNA bands of 244 bp, 860 bp and 634 bp were observed simultaneously only for the samples containing RNA extracted from both H5 and H7 subtypes AIV, one specific cDNA band of 244 bp was observed for RNA extracted from other subtypes of AIV and no specific cDNA bands were observed for RNA / DNA extracted from other avian pathogens or tissues of SPF embryos after amplification, and as little as 10 pg RNA of AIV, 100 pg RNA of H5 and H7 subtypes AIV could be identified by this multiplex RT-PCR.

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

收稿日期: 2005-02-18

基金项目: 广西科技攻关项目(桂科攻 0322004-2A, 桂科攻 0235001-A); 广西留学基金项目(桂科回 0236005)

作者简介: 谢芝勋(1963-), 男, 广西博白人, 研究员, 主要从事动物传染病分子生物学及分子免疫学研究, E-mail: pys6246@tom.com

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、猪和马等动物。AIV 引起的禽流感(AI)是一种严重危害养禽业发展的烈性传染病,被 OIE 列为 A 类传染病。AIV 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 基因组则变异性很强。HA 基因某些位点的变异可导致不同 HA 亚型^[1],目前发现 AIV 有 15 个 HA 亚型,其中 H5、H7 亚型常表现为高致病性,除了给养禽业带来严重经济损失外^[2-3],还可感染人,甚至导致死亡^[4,5]。目前,病毒分离、血清学试验仍是诊断 AI 和对 AIV 进行定型普遍采用的方法,但这些方法不仅操作繁琐、复杂和耗时,难以对 AI 进行快速诊断,还存在潜在散毒的危险。聚合酶链反应(PCR)是一种基因体外扩增技术,可以在数小时内对某段基因扩大数百万倍。该技术具有特异性强、敏感性高、检测快速等特点,已广泛应用于生物学、医学、兽医学的各个领域。多重 PCR 是一种特殊 PCR 形式,其最突出的特点是一次反应可同时检测、鉴别出多种病原体,在多种病原混合感染的鉴别诊断上具有独特优势和很高的实用价值^[6,7]。笔者根据 RT-PCR 技术的原理,研究建立了能同时检测

鉴别 AIV H5、H7 亚型的多重 RT-PCR 技术。

1 材料与方法

1.1 试验用毒株

AIV H5 和 H9 亚型毒株,系笔者所在实验室科研人员从鸡、鸭、鹅等家禽分离并鉴定;H7N1 RNA 为美国宾夕法尼亚州立大学禽病诊断研究室惠赠;新城疫病毒(NDV)F48、传染性支气管炎病毒(IBV)M41、传染性喉气管炎病毒(ILTV)北京株及鸡毒霉形体(MG)S6,系笔者所在实验室保存。

1.2 生化试剂

Trizol RNA 抽提试剂,购自 GIBCO 公司;RT-PCR 试剂盒,购自大连宝生物工程有限公司。

1.3 试验设计

1.3.1 引物设计及合成 参考基因库中 AIV M 基因和 HA 基因序列,设计并合成了 3 对引物(见表 1)。其中 XZ145-2 和 XZ146 为通用引物,可以检测所有 AIV HA 亚型,跨幅 244 bp;XZ H5-1 和 XZ H5-5 为 AIV H5 亚型特异性引物,跨幅 860 bp;XZ H7-1 和 XZ H7-2 为 AIV H7 亚型特异性引物,跨幅 634 bp。上述引物均由大连宝生物工程有限公司合成。

表 1 多重 RT-PCR 引物

Table 1 Multiplex RT-PCR primers

引物名称 Primer's names	引物寡核苷酸序列 Primer's oligonucleotide sequence	产物大小/bp Product length
XZ145-2	5-CTTCTAACCGAGGTCGAAAC-3	
XZ146	5-AGGGCAATTTGGACAAA KCGTCTA-3	244
XZ H5-1	5-ACACA TGCYCAR GACA TACT-3	
XZ H5-5	5-GTCCTTGCRACWGGACTMAGA-3	860
XZ H7-1	5-GGGA TACAAAA TGAAYACTC-3	
XZ H7-2	5-CCATABARYYTRGTCTGYTC-3	634

表中 Y 代表 C、T;R 代表 A、G;W 代表 A、T;M 代表 A、C;B 代表 G、C、T;K 代表 G、T。

Y=C,T;R=A,G;W=A,T;M=A,C;B=G,C,T;K=G,T

1.3.2 病原 RNA 的提取 在 250 μ L 鸡胚尿囊液中加 750 μ L Trizol RNA 抽提试剂,参照该试剂使用说明提取病毒 RNA,并按 Sambrook 等^[8]报道的方法测定 RNA 的纯度及浓度,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3.3 反转录 采用总体积为 20 μ L 的反转录体系,即在 PCR 反应管中分别加入 RNA 模板 2 μ L,25 mmol/L MgCl₂ 4 μ L,10 \times RNA PCR 缓冲液 2 μ L,2.5 mmol/L dNTPs 2 μ L,40 U/ μ L RNA 酶抑制剂 1 μ L,5 U/ μ L AMV 逆转录酶 1 μ L,25 pmol/L 上游引物 XZ 145-2、XZ H5-1 和 XZ H7-1 各 1 μ L,用焦碳酸二乙酯(DEPC) H₂O 补足体积至 20 μ L,

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 50 μ L 的多重 PCR 反应体系,即在 20 μ L cDNA 溶液 PCR 管中继续加入 25 mmol/L MgCl₂ 1 μ L,10 \times PCR 缓冲液 3 μ L,5 U/ μ L Taq 聚合酶 0.5 μ L,25 pmol/L 下游引物 XZ146、XZ H5-5 和 XZ H7-2 各 1 μ L,用 dH₂O 补足总量至 50 μ 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 PCR 产物分析 取 10 μ L 多重 PCR 产物与 2 μ L 加样缓冲液混合,在 10 g/L 琼脂糖凝

胶上以 80 V 电压进行电泳,用溴化乙锭染色后,置紫外线上观察拍照,以标准分子质量作参考,分析记录结果。

1.4 特异性试验

将 AIV H5、H7N1 和 H9 RNA 以及 NDV F48、IBV M41、ILTV 北京株、MG S6 和 SPF 鸡胚组织的 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。回收、纯化 244、860 和 634 bp 的 cDNA 扩增片段,送大连宝生物工程有限公司进行测序,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。其余 12 个 AIV HA 亚型的检测试验由广西兽医研究所赴美访问学者在美国宾夕法尼亚州立大学禽病诊断室进行。

1.5 敏感性试验

测定 AIV 的 H5、H7 亚型的 RNA 含量,做 10 倍系列稀释后进行多重 RT-PCR,测定该多重 RT-PCR 对 RNA 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、延伸的温度和时间以及循环次数等的优化,最后确定反转录的最佳条件为 42 35 min,96 5 min,4 结束。该多重 PCR 的最佳循环条件为 94 预变性 5 min 后,进入 94 变性 45 s,58 退火 45 s,72 延伸 105 s,共循环 35 次,然后 72 再延伸 10 min,于 4 结束多重 PCR 扩增。

2.2 特异性试验

AIV H5 和 H7 亚型 RNA 经多重 RT-PCR 扩增,结果所有 AIV H5 亚型分别在 244 bp 和 860 bp 位置同时出现 2 条 cDNA 扩增带,AIV H7 亚型则在 244 bp 和 634 bp 位置同时出现 2 条 cDNA 扩增带,其他 AIV HA 亚型只在 244 bp 处出现 cDNA 扩增带,在 860 bp 和 634 bp 处无扩增带出现,与试验设计相符;而 NDV F48、IBV M41、ILTV 北京株、MG S6 及 SPF 鸡胚组织无论在 244 bp 还是在 860 bp 或 634 bp 处均无 cDNA 扩增带出现,即为阴性(见图 1)。对所回收的 244、860 和 634 bp cDNA 扩增片段进行测序,并对测序结果经 DNAStar 基因分析软件分析,这些 cDNA 片段分别与 AIV M 基因、H5 亚型 HA 基因和 H7 亚型 HA 基因有着高度同源性,提示这些扩增基因的序列与原参考序列的基因来源完全一致,分别来源于 AIV M 基因、H5 亚型 HA 基因和 H7 亚型 HA 基因。

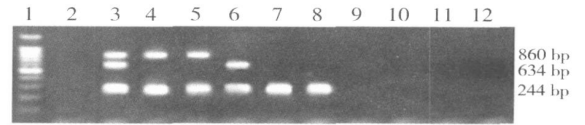


图 1 多重 RT-PCR 的特异性试验

Fig. 1 Specificity test of the multiplex RT-PCR

1. DNA 分子质量标准; 2. SPF 鸡胚组织阴性对照; 3. 同时含有 AIV H5、H7 亚型的样品; 4、5. AIV H5 亚型; 6. AIV H7 亚型; 7、8. AIV H9 亚型; 9. NDV; 10. IBV; 11. ILTV; 12. MG

1. For 100 bp DNA Ladder Marker; 2. Negative control; 3. Samples containing H5 and H7 subtypes AIV; 4,5. H5 subtype AIV; 6. H7 subtype AIV; 7,8. H9 subtype AIV; 9. NDV; 10. IBV; 11. ILTV; 12. MG

2.3 敏感性试验

经测定,该多重 RT-PCR 对 AIV、AIV H5 亚型和 AIV H7 亚型 RNA 的最低检测量分别为 10、100 和 100 pg。结果见图 2。

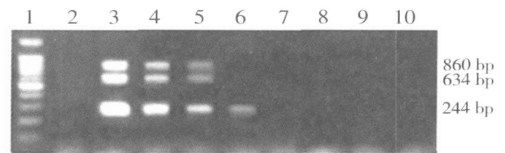


图 2 多重 RT-PCR 敏感性试验

Fig. 2 Sensitivity test of the multiplex RT-PCR

1. DNA 分子质量标准; 2. SPF 鸡胚组织阴性对照; 3. 为 10 ng; 4. 为 1 ng; 5. 为 100 pg; 6. 为 10 pg; 7. 为 1 pg; 8. 为 100 fg; 9. 为 10 fg; 10. 为 1 fg

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

3 讨论

AIV H5、H7 亚型不仅感染家禽,引起大批死亡,导致严重的经济损失,还可感染其他动物和人,有重要的公共卫生意义。传统的病毒分离和血清学试验无法对流行的 AIV 亚型进行快速检测鉴别。本试验根据多重 PCR 引物设计原则,利用基因库中 AIV M 基因和 HA 基因组序列,分别针对不同亚型 AIV 以及 AIV H5、H7 亚型设计了 3 对特异性引物。其中 XZ145-2、XZ146 是所有 AIV 亚型的通用引物,可以检测所有 HA 亚型 AIV; XZ H5-1、XZ H5-5 和 XZ H7-1、XZ H7-2 则分别为 H5 和 H7 亚型的特异性引物,只能分别特异性地检测 AIV H5 和 H7 亚型。利用这 3 对引物,通过对多重 RT-PCR 扩增条件的优化,建立了可同时快速检测鉴别 AIV H5 和 H7 亚型的多重 RT-PCR 技术。

该多重 RT-PCR 的检测结果显示, AIV 所有 H5 亚型在 244 和 860 bp 位置上均分别同时出现 2 条 cDNA 扩增带, AIV H7 亚型在 244 和 634 bp 位置上也同时出现 2 条 cDNA 扩增带, 而同时含有 H5 和 H7 RNA 的样品则分别在 244、860 和 634 bp 位置同时出现 3 条 cDNA 扩增带; AIV H9 及其余 12 个不同 HA 亚型只在 244 bp 处出现 cDNA 扩增带, 在 860 和 634 bp 处无扩增带出现。其他禽病病原体和 SPF 鸡胚组织的 RNA, 无论是在 244 bp, 还是 860 bp 或 634 bp 处均无扩增带出现。回收多重 PCR 扩增的 244、860 和 634 bp 片段的测序结果, 与原参照序列的同源性分析结果也显示, 它们分别来源于 AIV 的 M 基因和 AIV H5 和 H7 亚型的 HA 基因, 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 不需要进行多次 PCR 扩增, 在数小时内就可完成对 AIV H5 和 H7 亚型的快速检测鉴定, 在临床上不能确定是什么亚型 AIV 感染时, 利用该多重 RT-PCR 可快速检测鉴别是否为 AIV H5 和或 H7 亚型感染, 达到快速诊断和鉴别 AIV 的双重目的, 对及时有效控制高致病性 AIV 亚型感染具有重要意义。

该多重 RT-PCR 对 AIV 不同亚型 RNA 的最低检测量为 10 pg, 对 AIV H5 和 H7 亚型 RNA 的最低检测量为 100 pg。能检测到如此低的 AIV RNA, 说明该多重 RT-PCR 是具有高灵敏度的病原检测诊断方法, 不需要对病原体进行分离增殖, 就可对临床疑似 AIV 感染的样品或环境样品进行直接检测鉴别, 避免了进行 AIV 分离增殖过程中散毒和传播等风险。该多重 RT-PCR 快速检测鉴别 AIV H5、H7 亚型技术的建立, 对 AIV 高致病性 H5、H7 亚型感染的诊断及制定有效的防控措施具有实用价值和指导意义。

参考文献(References)

- [1] Senne D A, Panigrahy B, Kawaoka Y, *et al.* Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential [J]. *Avian Dis*, 1996, 40:425-437.
- [2] Alexander D J. A review of avian influenza in different bird species [J]. *Vet Microbiol*, 2000, 74:3-13.
- [3] Alexander D J. The epidemiology and control of avian influenza and Newcastle disease [J]. *J Comp Pathol*, 1995, 112:105-126.
- [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] Pang Y, Wang H, Grshick T, *et al.* Development and application of a multiplex polymerase chain reaction for avian respiratory agents [J]. *Avian Dis*, 2002, 46(3):691-699.
- [7] 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.
Xie Z X, Xie Z Q, Pang Y S, *et al.* Study on the detection of Newcastle disease virus, infectious bronchitis virus and *Mycoplasma gallisepticum* [J]. *China Animal Quarantine*, 2000, 17(11):20-22. (in Chinese)
- [8] 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.

《牛羊病诊治彩色图谱》出版

由甘肃农业大学陈怀涛教授主编, 谢庆阁、才学鹏等 40 余位兽医学领域的专家参加编写、审定的《牛羊病诊治彩色图谱》一书, 近期已由中国农业出版社出版。其内容包括牛、羊主要传染病、寄生虫病、普通病、肿瘤和其他疾病 100 多种, 计 30 万字, 图片 648 幅。每种疾病基本按照病原、流行病学、发病机理、症状、病理变化、诊断与防治等内容叙述。本书资料丰富, 图文并茂, 编排有序, 文字精炼, 图片真实, 理论结合实际, 有重要的科学和实用价值。本书既可作为农业院校预防兽医学、临床兽医学、兽医病理学等相关学科与专业研究生和大学生的教材, 又可供兽医科研工作者, 基层畜牧、兽医、食品检验人员和医学工作者研究与临床参考。本书为精装, 定价 100 元, 需要者可于近期到各地主要新华书店购买或与中国农业出版社薛允平联系, 电话: 010-64194932, 地址: 北京市朝阳区农展馆北路 2 号, 邮编: 100026。

本刊讯