

禽流感基因诊断技术研究进展*

田丽娜^{1,2}, 王秀荣^{2*}, 杨忠苹², 石霖², 陶启蒙², 陈化兰²

(1. 东北农业大学动物医学院, 黑龙江哈尔滨 150030; 2. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所
农业部动物流感重点开放实验室 兽医生物技术国家重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150001)

摘要: 禽流感是由流感病毒引起的一种人和动物的高度传染性疾病, 不但造成养禽业的巨大经济损失, 还对人类公共卫生安全存在威胁。因此, 快速、准确的基因诊断技术对于禽流感的防控显得非常重要。近年来, 主要有 RT-PCR 技术、荧光定量 RT-PCR 技术、核酸依赖扩增技术 (NASBA) 以及基因芯片等基因诊断技术。文章就这些方法的基本原理、检测优点以及应用现状进行综述, 以期有效控制禽流感的发生与流行提供有力技术支撑。

关键词: 禽流感; 反转录-聚合酶链反应; 核酸依赖扩增技术; 基因芯片

中图分类号: S852.659.5

文献标识码: A

文章编号: 1007-5038(2008)08-0060-03

禽流感病毒 (Avian influenza virus) 属于正黏病毒科 A 型流感病毒属, A 型流感病毒感染的范围最广, 危害最大, 可以感染人、猪、马、海洋哺乳动物、禽类等, 是人和畜禽呼吸道疾病的重要病原^[1]。A 型流感病毒感染家禽后根据致病力不同可以分为高致病性病毒和低致病性病毒。高致病性禽流感可导致禽类大批死亡, 并严重威胁着人类公共卫生安全; 低毒力株能明显降低家禽的生产性能, 并在禽类间隐性传播, 经抗原漂移或抗原转变成新毒株或毒力增强, 故世界各国对禽流感的早期、快速、准确诊断极为重视。禽流感病毒的基因检测技术也因此而得到越来越广泛的应用。

1 RT-PCR 技术

RT-PCR 技术从基因水平检测禽流感, 具备高度敏感性和特异性^[2]。应用 RT-PCR 方法对流感病毒进行诊断的报道很多, 根据细节不同分出多种 RT-PCR 技术, 常见的有常规 RT-PCR、套式 RT-PCR (nested RT-PCR)、多元 PCR (multiplex PCR) 等。

现在仍以常规 RT-PCR 应用较为广泛, 此方法可以利用基因扩增的方法直接检出病毒基因, 较病毒分离快。另外, Starick E 等^[3]认为, 用 RT-PCR 方法可以鉴别高低致病力 AIV。需要注意的是控制好环境污染问题, 核酸的提取和凝胶电泳要在不同的环境中操作, 要及时清理 PCR 产物和电泳后的废胶。

套式 RT-PCR 在许多病毒的诊断中都有应用。这种方法的特点是需要设计两对引物, 一对引物扩增稍长片段, 在这一扩增范围内再设计一对引物, 扩增的产物是以第一对引物的产物为模版, Starick E 等^[3]报道, 设计了一个 H7 亚型特异性的巢式 RT-PCR, 扩增片段包括了血凝素裂解位点, 可以依据裂解位点变化确定强弱毒株, 该方法与病毒的分离鉴定具有同样的灵敏性, 但也要注意假阳性的产生。

多元 RT-PCR 可以在一个反应体系中同时设立 2 对或 2 对以上的引物来同时扩增不同的目的片段, 谢芝勋等^[4]建立了鉴别 H5 和 H7 亚型 AIV 的多重 RT-PCR 方法, 它不仅能够定性而且还能够定量分析病原的含量, 是一个很好的禽流感病毒亚型鉴别检测方法。

2 实时荧光定量 RT-PCR

实时荧光定量 RT-PCR 是通过计算机记录并分析 PCR 反应过程中每一个产物的荧光信号从而实现起始模板定性和定量的研究。实现了对扩增过程实时监测, 无需电泳检测, 彻底杜绝了 PCR 产物的气溶胶污染和 EB 对环境的污染, 因此得到较广泛的应用^[5-7]。主要分为利用与靶序列特异杂交的探针来指示扩增产物增加的探针类, 利用荧光染料或者特殊设计的引物来指示扩增的增加非探针类两种。

现已应用于流感检测的主要是基于 TaqMan 探针 RT-PCR^[8-9], 其原理是 TaqMan 探针的 5 端标记

* 收稿日期: 2008-04-23

基金项目: 防制禽流感高效生物制剂生产开发项目 (2007DFR30360)

作者简介: 田丽娜 (1980 -) 女, 河北定州人, 硕士研究生, 主要从事禽流感分子诊断技术研究。* 通讯作者

一个荧光分子,3'端标记一个荧光淬灭分子,当探针完整时,两者可发生荧光共振能量传递(FRET)。当PCR扩增时,由于Taq酶的5'~3'外切酶活性将探针水解,使荧光分子与淬灭分子间距增大,从而破坏其FRET,则荧光监测系统能检测到荧光信号。张然等^[8]利用TaqMan原理建立的荧光定量RT-PCR技术可以准确检测A型流感病毒,不仅灵敏度高、稳定性好,而且可以对病毒滴度进行定量检测。赖平安^[9]建立的快速检测高致病性禽流感病毒H5亚型的实时荧光RT-PCR方法特异性强,与禽类养殖过程中常用的疫苗和可能污染的其他病原不出现交叉反应;对常见临床样品的检测,其敏感性与OIE推荐的鸡胚病毒分离培养方法基本一致,检测时间从原来至少需要21d缩短到4h。研究方法已作为国家标准发布,研究成果已产业化,已成功用于出入境检验检疫系统和大型禽肉出口企业。

与TaqMan方法相比,SYBR-Green的优势在于能监测任何双链DNA的序列扩增,不需要设计序列特异性探针和新的引物对,试验设计更为简便,同时也降低了检测的成本,得到较为广泛的应用,刘丽玲等^[10]建立的SYBR-Green I荧光RT-PCR检测禽流感的方法操作简便快速,PCR过程只需要1.5h,连同RNA的提取4h左右就可以做出诊断,具有广泛的应用前景。

3 依赖核酸序列的扩增技术

依赖核酸序列的扩增技术(NASBA)是一项以RNA为模板的快速等温扩增技术^[11],这项技术特别适用于RNA分子的检测。其特点是整个反应在恒温条件下进行,不需特殊仪器,不需温度循环,大大避免了PCR过程中复杂的温度变化。该技术使用三种酶(AMV反转录酶、RNA酶H、T7RNA聚合酶)以及2条特定引物共同协作完成。在设计NASBA引物时,使一个引物的5'端带有T7RNA聚合酶识别的启动子序列,另一个引物的5'端序列含有与钉标的电化学检测探针(ECL probe)互补的序列^[12],通过光电信号的检测作出靶RNA的定性、定量研究。

与RT-PCR比较,在同一时间内NASBA拥有更高的扩增效率,并且可减少样品中抑制性物质的影响,降低核酸污染的可能性,大大缩短检测产生结果的时间。这个分析检测方法灵敏度高、特异性强、易于操作,而且在检测过程中与系统发育学或临床相关的病毒无交叉反应能力,为确定疫情和采取防范措施争取了宝贵时间。现已成功开发出可检测禽流感群特异性(H1-H15)(NASBA-AIV)、H5亚型

(NASBA-H5)、H7亚型(NASBA-H7)的NASBA检测试剂盒^[13-14]。

4 基因芯片技术

由于流感病毒拥有众多的型和亚型,无论是现存的那一种诊断方法,都无法同时对所有的流感病毒进行精确的分型。基因芯片技术可以对成千上万个基因进行检测,它的出现为同时对流感病毒进行检测和分型提供了可能的途径。禽流感基因芯片技术是一种比较系统、完善的检测技术,该方法的建立不仅有助于禽流感疫情各种亚型的有效监控,而且可以在第一时间内准确的发现新变异或基因重排的新亚型病毒,为应对新疫情暴发提供可靠的技术储备。

基因芯片技术根据探针类型分为cDNA芯片、DNA芯片和寡核苷酸芯片。Li J等^[15-17]建立了用以鉴别流感病毒型和亚型的基因芯片检测方法,设计的26个引物对可从A型流感病毒HA(H1,H2,H3)、NA(N1,N2)和NP基因,以及B型流感病毒的HA(H1,H2,H3)、NA(N1,N2)和NP基因上的目的基因杂交,从而达到鉴别型和亚型的目的;王秀荣等^[18-19]通过RT-PCR获得500bp的AIV基因的cDNA片段,经克隆获得重组质粒,以其为模板扩增的DNA片段作为探针,点到玻璃载体上制成芯片,在病毒RNA反转录过程中,用cy5荧光标记做靶cDNA,杂交之后扫描芯片上探针结合位点获得杂交信号,从而在基因芯片平台上,建立一种可靠的检测H5、H7、H9亚型的AIV快速检测技术。徐秋林等^[20-21]在利用寡核苷酸芯片检测流感病毒时发现寡核苷酸芯片比cDNA、DNA芯片有着更高的特异性,同时其灵敏度也能满足目前病原体检测的要求。

5 结语

自1878年意大利鸡群暴发禽流感以来,禽流感的发生和流行已有100多年的历史。由于禽流感病毒亚型或血清型众多,不同亚型或血清型之间交叉反应性低,给禽流感的及时诊断和预防带来很大困难,因此给人类社会和自然资源的安全构成潜在的威胁。对于禽流感,现在只能采取预防控制的方法,而预防控制禽流感就必须加强生物安全管理,研究和利用更先进、更科学的基因诊断技术进行禽流感早期监测,建立全国性监测网络,严格检疫,并有选择地将降低合群数量与疫苗接种等措施结合起来,以避免其潜在危害,确保我国养禽业的快速稳定发展。禽流感的传统检测诊断技术与现代基因诊断技术结合,或者现代基因诊断技术与其他学科研究技术有机结合,一定会实现诊断的快捷、方便、准确、灵

敏、经济、易操作,为禽流感的防控做出重大贡献。

参考文献:

- [1] 甘孟侯. 禽流感[M]. 2版. 北京:中国农业出版社,2002.
- [2] 王秀荣,刘丽玲,熊永忠. 禽流感病毒几种 RT-PCR 诊断技术[J]. 动物医学进展,2004,25(4):53-55.
- [3] Starick E,Werner O. Detection of H7 avian influenza virus directly from poultry specimens[J]. Avian Dis,2003,47(3):1187-1189.
- [4] 谢芝勋,庞耀珊,邓显文,等. 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[J]. 中国兽医科技,2005,35(6):437-440.
- [5] Smith A B,Mock V,Melear R,et al. Rapid detection of influenza A and B viruses in clinical specimens by Light Cycler real-time RT-PCR[J]. J Clin Microbiol,2003,28:51-58.
- [6] Chen W,He B,Li C,et al. Real-time RT-PCR for H5N1 avian influenza A virus detection[J]. J Med Microbiol,2007,56:603-607.
- [7] Trani L,Bedini B,Donatelli I,et al. A sensitive one-step real-time PCR for detection of avian influenza using a MGB probe and an internal positive control[J]. BMC Infectious Disease,2006,6:87.
- [8] 张然,程小雯,吴春利,等. 荧光定量 RT-PCR 快速检测 A 型流感病毒的研究[J]. 中国热带医学,2006,6(1):33-35.
- [9] 赖平安. 实时荧光 RT-PCR 快速检测高致病性禽流感病毒(HPAIV) H5 亚型[D]. 北京:中国农业大学,2004:7-11.
- [10] 刘丽玲,姜永平,王秀荣,等. SYBR-Green I 荧光 RT-PCR 检测禽流感[J]. 畜牧兽医学报,2006,37(11):1189-1193.
- [11] Brown I H. Advances in molecular diagnostics for avian influenza[J]. Developments in Biological,2006,124:93-97.
- [12] 刘庭乐,刘爽,封燕芸. NASBA 一种新型禽流感病毒检测方法[J]. 中国生物工程杂志,2005,25(11):91-94.
- [13] Lau L T,Banks J,Aherne R,et al. Nucleic acid sequence-based amplification methods to detect avian influenza virus[J]. Biochem Bioph Res Commun,2004,313(2):336-342.
- [14] Collins R A,Ko L S,Fung K Y,et al. Rapid and sensitive detection of avian influenza virus subtype H7 using NASBA[J]. Biochem Biophy Res Commun,2003,300:507-515.
- [15] Li J,Chen S,Evans D H. Typing and subtyping influenza virus using DNA microarrays and multiple exreverse transcriptase PCR[J]. J Clin Microbiol,2001,39(2):696-704.
- [16] Kessler N,Ferraris O,Palmer K,et al. Use of the DNA Flow-Thru Chip, a three-dimensional biochip, for typing and subtyping of influenza virus[J]. J Clin Microbiol,2004,(42):2173-2185.
- [17] Townsend M B,Dawson E D,Mehlmann M,et al. Experimental evaluation of the Flu Chip diagnostic microarray for influenza virus surveillance[J]. J Clin Microbiol,2006,(44):2863-2871.
- [18] 王秀荣,邓国华,于康震,等. 在 DNA 芯片平台上探测 AIV 不同亚型 cDNA[J]. 中国农业科学,2005,38(2):394-398.
- [19] Dawson E D,Moore C L,Dankbar D M,et al. Identification of A/H5N1 influenza virus using a single gen diagnostic microarray[J]. Analytical Chemistry,2007,79(1):378-384.
- [20] 徐秋林. 流感病毒寡核苷酸检测芯片的初步研究[D]. 广东广州:第一军医大学,2005:68-72.
- [21] Sengupta S,Onodera K,Lai A,et al. Molecular detection and identification of influenza viruses by oligonucleotide microarray hybridization[J]. J Clin Microbiol,2003,(41):4542-4550.

Progress on Avian Influenza Gene Diagnosis Technology

TIAN Li-na^{1,2}, WANG Xiu-rong², YANG Zhong-ping², SHI Lin², TAO Qi-meng², CHEN Hua-lan²

(1. College of Animal Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang, 150030, China;

2. National Avian Influenza Reference Laboratory, Animal Influenza Laboratory of the Ministry of Agriculture,

National Key Laboratory of Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agriculture Sciences, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

Abstract: Avian influenza is caused by the avian influenza virus and is a highly contagious disease of humans and animals, not only caused poultry industry huge economic losses, but also caused human security presence in public health threat. Therefore, rapid and accurate diagnosis of gene technology for the prevention and control of avian influenza is very important. At present, there are genetic diagnosis such as RT-PCR technique, fluorescence quantitative RT-PCR technology, reliance on the nucleic acid amplification technology (NASBA) and the new microarray technology. The paper reviewed the basic principles of these methods, testing and application of their merits, with a view to effectively control the avian influenza pandemic outbreak and to provide effective technical support.

Key words: Avian influenza virus; RT-PCR; NASBA; microarray