

小鹅瘟和雏鹅新型病毒性肠炎二联 PCR 检测试剂盒组装和初步应用

任科研,姚新华,苑淑贤,李琳,邵洪泽

(吉林省畜牧兽医科学研究所,吉林长春 130062)

摘要:本试验旨在研制小鹅瘟和雏鹅新型病毒性肠炎二联 PCR 检测试剂盒,观察临床应用效果。根据小鹅瘟和鹅病毒性肠炎基因序列,设计合成一对特异性引物,对 PCR 反应条件进行优化,并分别对试剂盒的特异性、敏感性、重复性和保存期进行研究,之后进行临床扩大试验。该二联 PCR 诊断试剂盒能扩增出预期的小鹅瘟 375 bp 核酸片段和鹅病毒性肠炎 223 bp 核酸片段,与鸭瘟病毒、鹅副黏病毒无交叉反应;最低能检测到小鹅瘟病毒 10^4 ELD₅₀/mL,雏鹅新型病毒性肠炎病毒 2.5×10^{-1} ELD₅₀;不同批次的试剂盒对同一样品检测结果一致;常温下至少可保存 5 个月;临床应用效果显著。该二联 PCR 检测试剂盒能够对小鹅瘟和雏鹅病毒性肠炎早期诊断、流行病学调查和卫生检疫提供了检测手段。

关键词:小鹅瘟;雏鹅新型病毒性肠炎;PCR 检测试剂盒;研制;应用

中图分类号:S854.4

文献标识码:A

文章编号:1671-7236(2012)01-0014-03

小鹅瘟(gosling plague,GP)和雏鹅新型病毒性肠炎(gosling new type viral enteritis,NGVE)发病率和死亡率很高,对养鹅业危害极大。本研究在建立了小鹅瘟和雏鹅病毒性肠炎二联 PCR 检测方法的基础上(孙健等,2010),进一步组装 PCR 快速检测试剂盒,从而为小鹅瘟和雏鹅病毒性肠炎检测的推广应用奠定基础。目前国内外已成功开发出了两种疫病的单重 PCR 检测试剂盒,且开始应用于快速检测诊断中,但检测种类单一且尚未能进行实地现场监测,给实际生产应用带来了困难。因此,针对服务对象的要求,本研究通过对两种疫病的二联 PCR

检测方法的条件优化,组装快速检测试剂盒,并通过临床使用对其进行了性能的初步验证分析,取得了较满意的结果。

1 材料与方法

1.1 毒种 小鹅瘟病毒 JLDA 株和雏鹅新型病毒性肠炎病毒 BC07 株,由吉林省畜牧兽医科学研究所分离、鉴定、保存。

1.2 PCR 常用试剂 试剂购自大连宝生物工程有限公司。

1.3 引物设计 根据小鹅瘟病毒和雏鹅新型病毒性肠炎基因序列,分别设计合成了两对引物(表 1)。

表 1 小鹅瘟病毒和雏鹅新型病毒性肠炎病毒 PCR 引物

病毒	引物序列	长度(bp)
小鹅瘟病毒	P1:5'-CCAAGCTACAACAACCACATCTAC-3'	375
	P2:5'-CTGCGGCAGGGCATAGACATCCGAC-3'	
雏鹅新型病毒性肠炎病毒	P3:5'-CAGCAGGTCAATAGCATCTCC-3'	223
	P4:5'-CGTTGTCCATCAGCCAGTA-3'	

1.4 模板制备 将毒种用灭菌生理盐水 10 倍稀释后,接种于 10 日龄鹅胚,每胚尿囊腔接种 0.2 mL。封闭接种后针孔,放 37 °C 继续孵育,取 5~7 d 之间死亡的鹅胚,经 4 °C 冷藏数小时后收获尿囊液,冷冻保存。将两种病毒的尿囊液 100 μL,沸水浴 5 min,

冰水浴 3 min,重复 3 次,3000 r/min 离心 20 min,收集上清液,作为 PCR 模板(程安春,2000)。

1.5 优化小鹅瘟和雏鹅新型病毒性肠炎二联 PCR 检测条件 PCR 反应体系: Buffer 5 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL, P1、P2、P3 和 P4 各 1 μL,模板 5 μL, Taq DNA 酶 1 μL,加 ddH₂O 补足 50 μL。PCR 反应条件:96 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 40 s, 54 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 40 s,30 个循环;72 °C 延伸 10 min;4 °C 保存。将 PCR 产物各取 9 μL,在 1.0% 琼脂糖凝胶中电泳,在凝胶成像仪下观察结果

修回日期:2011-06-21

作者简介:任科研(1980—),男,吉林人,硕士生,助理研究员,研究方向:预防兽医学。

通信作者:姚新华,男,研究员。E-mail:jlyxh168@163.com

基金项目:吉林省科技发展计划应用基础项目(20080561)。

(胡桂学等,2003)。

1.6 检测试剂盒的组装 试剂盒包括试剂 A 管(反应管)、B 管(阳性对照管)见表 2。B 管组成成分:小鹅瘟和雏鹅新型病毒性肠炎灭活病毒混合物。

表 2 A 管组成成分

组成成分(20T)	体积(μ L)
Taq DNA 聚合酶	20
10 $\times$ Taq Buffer(含 Mg^{2+})	100
dNTPs	40
引物(P1、P2、P3、P4)	各 20
超纯水	660

1.7 小鹅瘟和雏鹅新型病毒性肠炎 PCR 检测试剂盒性能试验

1.7.1 特异性试验 将鸭瘟病毒、鹅副黏病毒、小鹅瘟病毒、雏鹅新型病毒性肠炎病毒以及小鹅瘟病毒和雏鹅新型病毒性肠炎病毒混合液一起进行 PCR 检测。

1.7.2 敏感性试验 取小鹅瘟尿囊液稀释病毒液每 1 mL 含 10^6 ELD₅₀、 10^5 ELD₅₀、 10^4 ELD₅₀、 10^3 ELD₅₀、 10^2 ELD₅₀、 10^1 ELD₅₀ 六个浓度制作模板,进行 PCR 扩增;将浓度为 5×10 ELD₅₀/μL 雏鹅新型病毒性肠炎稀释。采用本试验的 PCR 方法对 1、10、100、1000、10000 倍稀释的样品进行 PCR 检测。将雏鹅新型病毒性肠炎病毒液 10 倍递进稀释,进行 PCR 检测。

1.7.3 重复性试验 分别研制出 4 批次诊断试剂盒,将试剂盒保存于 -20°C 。之后对同一样品检测,测定 PCR 试剂盒的稳定性。

1.7.4 保存期试验 将试剂盒保存于 4°C 。分别在保存 1、2、3、4、5 月后取出一组试剂盒对阳性样品检测,进行保存期试验。

1.8 二联 PCR 检测试剂盒临床应用 于 2009 年 5 月—2010 年 6 月,在白城、大安和前郭等地区进行大量的临床试验应用,进行数据统计。

2 结果

2.1 特异性试验 如图 1 所示,鸭瘟病毒、鹅副黏病毒无条带产生;小鹅瘟 JLDA 株出现一条约 375 bp 条带;雏鹅新型病毒性肠炎病毒 BC07 株出现一条约 223 bp 条带;小鹅瘟和雏鹅新型病毒性肠炎混合液出现两条条带分别能与小鹅瘟 JLDA 株和雏鹅新型病毒性肠炎病毒 BC07 株产生条带相对应。

2.2 敏感性试验 分别对小鹅瘟尿囊液稀释病毒液每 1 mL 含 10^6 ELD₅₀、 10^5 ELD₅₀、 10^4 ELD₅₀、 10^3

ELD₅₀、 10^2 ELD₅₀、 10^1 ELD₅₀ 六个浓度制作模板,进行 PCR 扩增,试验结果显示 PCR 方法可以检测到 10^4 ELD₅₀/mL 病毒(图 2);将雏鹅新型病毒性肠炎病毒液 10 倍递进稀释,进行 PCR 检测,试验结果显示在 1、10、100、1000、10000 倍稀释样品中,10000 倍稀释后 NGVEV 条带消失。即 NGVEV 最小检出量为 2.5×10^{-1} ELD₅₀(图 3)。

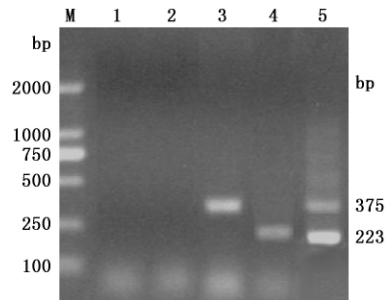


图 1 PCR 特异性结果

注:M,DL2000 DNA Marker;1,鸭瘟病毒;2,鹅副黏病毒;3,小鹅瘟;4,雏鹅新型病毒性肠炎;5,混合液。

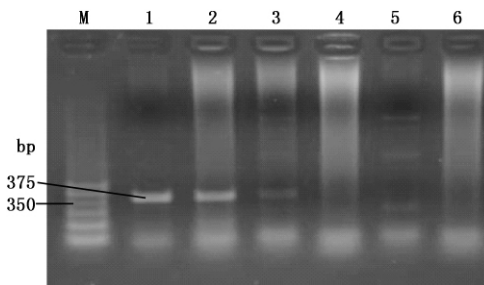


图 2 小鹅瘟 PCR 敏感试验电泳结果

注:M,50 bp DNA Ladder;1, 10^6 ELD₅₀;2, 10^5 ELD₅₀;3, 10^4 ELD₅₀;4, 10^3 ELD₅₀;5, 10^2 ELD₅₀;6, 10^1 ELD₅₀。

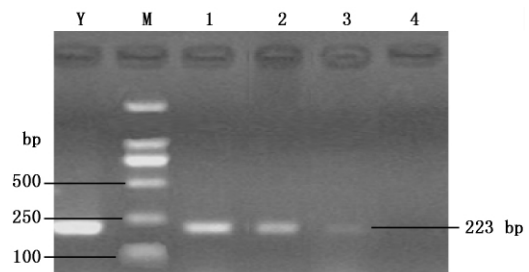


图 3 雏鹅新型病毒性肠炎 PCR 敏感性试验结果

注:Y,原倍;M,DL2000 DNA Marker;1,10 倍稀释;2,100 倍稀释;3,1000 倍稀释;4,10000 倍稀释。

2.3 重复性试验 4 批次 PCR 诊断试剂盒同一样品进行检测,试验结果表明,均能扩增出小鹅瘟病毒和鹅病毒性肠炎病毒特异性片段,说明小鹅瘟病毒和鹅病毒性肠炎病毒二联 PCR 诊断试剂盒具有较强的重复性(图 4)。

2.4 保存期试验 对保存于 4°C 的诊断试剂盒,分

别于保存1、2、3、4、5月后取出一组试剂盒对阳性样品进行检测,均能扩增出小鹅瘟病毒和鹅病毒性肠炎病毒目的条带。结果表明,该试剂盒具有较好的稳定性(图4)。

2.5 应用检测效果的统计与分析结果 在白城、大安和前郭等地区对临床症状疑似小鹅瘟或雏鹅病毒性肠炎的病例进行了大量的实际应用,并且对收回数据进行统计,结果表明,该二联PCR检测试剂盒能够快速地检测出小鹅瘟或雏鹅病毒性肠炎病毒(表3)。

表3 临床应用数据

地区	临床试验样品总数	检测出 GPV 数量	检测出 NGVEV 数量	检测出 GPV 和 NGVEV 数量	未检测出 GPV 或 NGVEV 数量
白城	2000	537	275	1187	1
大安	800	331	40	427	2
前郭	150	150	0	0	0

3 讨论与小结

本研究成功地应用自行分离、选育及分子生物学鉴定的小鹅瘟病毒地方株 JLDA 株和雏鹅病毒性肠炎病毒 BC07 株建立了小鹅瘟和雏鹅新型病毒性肠炎 PCR 检测试剂盒,该试剂盒能从阳性参考毒株和临床感染小鹅瘟与雏鹅新型病毒性肠炎病变样品扩增出与预期大小一致的目的片段,对鹅的其他常见病原和正常的组织样品未扩增出任何片段。因此,该项 PCR 技术具有特异、快速和敏感的特点,可以用于鹅病临床快速鉴别诊断和流行病学调查研究。田间试验结果表明,该试剂盒具有很好的特异性和稳定性,与一般 PCR 方法相比可最大限度地降低劳动强度和出错几率。该试剂盒在-20℃条件下至少可以保存一年以上,即使多次冻融,也能保持反应活性。

由于小鹅瘟和雏鹅病毒性肠炎是严重威胁中国

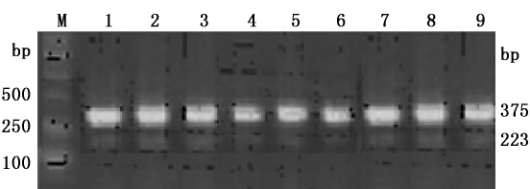


图4 小鹅瘟和雏鹅新型病毒性肠炎二联PCR检测试剂盒重复性、保存期试验结果

注:M, DL2000 DNA Marker;1~4分别为4个批次的诊断试剂盒;5~9分别为保存1、2、3、4、5月的试剂盒。

养鹅业的主要两种重要疫病,因此该试剂盒的推出,为两种疫病的早期诊断、流行病学调查和卫生检疫提供了检测手段,具有较好的应用前景。本研究为进一步研究 GPV 的基因功能、遗传变化规律及病毒分子致病机理提供了一定的分子基础,为基因工程疫苗的研制提供了可行性。

参考文献

- 1 孙健,毛文智,邵洪泽,等.小鹅瘟和雏鹅新型病毒性肠炎二联PCR检测方法的建立[J].甘肃畜牧兽医,2010,5:1~4.
- 2 胡桂学,逢博,高凤山,等.小鹅瘟PCR诊断方法的建立和初步应用[J].经济动物学报,2003,7(2):50~53.
- 3 葛晨霞,王龙涛,张加力,等.小鹅瘟的PCR诊断及病理观察[J].中国畜牧兽医,2010,37(12):210~211.
- 4 程安春.雏鹅新型病毒性肠炎的分离、鉴定及病原特性的研究[J].畜牧兽医学报,2000,31(6):648~656.

Development and Preliminary Application of a Duplex PCR Detection Kit for Gosling Plague and Gosling New Type Viral Enteritis

REN Ke-yan, YAO Xin-hua, YUAN Shu-xian, LI Lin, SHAO Hong-ze

(Animal Husbandry and Veterinary Science Research Institute of Jilin Province, Changchun 130062, China)

Abstract: To develop a duplex PCR detection kit for gosling plague (GP) and gosling new type viral enteritis (NGVE), and observe the effects of clinical appliance. The gene sequences of gosling plague virus (GPV) and gosling new type viral enteritis virus (NGVEV) was chosen to design the species-specific primers. The PCR amplification conditions were optimized and series of tests were conducted respectively in the specificity, sensitivity, stability, reproducibility, and stored period of the kit, and expanded clinical trials were also carried out. This kit could specifically amplify the expected 375 bp DNA fragment of GPV virus and 223 bp DNA fragment of NGVEV. There was no cross-reaction with other virus, such as DPV, GPMV, NGVEV and GPV. It was able to detect the presence of GPV as low as 10^4 ELD₅₀/mL and NGVEV as low as 2.5×10^{-1} ELD₅₀. The test results of different batches of kits of the same sample were consistent. The kit worked well after being stored at room temperature for at least six months. Its effect of clinical application was significant. The results turned out that this duplex PCR detection kit could provide a means for early diagnosis, epidemiological investigation and quarantine of GP and NGVE.

Key words: GP; NGVE; PCR detection kit; development; application