

## 鸭黄病毒荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及应用

高 凤<sup>1</sup>, 于可响<sup>2</sup>, 马秀丽<sup>2</sup>, 李玉峰<sup>2</sup>, 王友令<sup>2,3</sup>, 李建亮<sup>1</sup>, 崔言顺<sup>1\*</sup> (1. 山东农业大学 动物科技学院, 山东泰安 271018; 2. 山东省农业科学院 家禽研究所, 山东 济南 250023; 3. 华南农业大学 动物医学院, 广东 广州 510642)

**摘要:**根据鸭黄病毒 E 蛋白基因序列设计了 1 对特异性引物和 TaqMan 探针, 建立了实时荧光定量 RT-PCR 检测鸭黄病毒的方法。根据含鸭黄病毒目的扩增片段的质粒拷贝数与定量反应 Ct 值的关系, 绘制了标准曲线( $Y = -3.39 X + 43.18, r = 0.973$ )。该方法具有特异性, 对鸭病毒性肝炎病毒、禽流感病毒、新城疫病毒、腺病毒、鸭瘟病毒、猪乙脑病毒的核酸都没有扩增反应。敏感性试验显示, 建立的此方法最低可检出 1.9 个 TCID<sub>50</sub> 病毒核酸。该方法对 5 只健康雏鸭人工感染 86 h 后的组织器官样品(盲肠扁桃体除外)的检测结果均为阳性, 与病毒分离鉴定的阳性符合率为 100%。结果表明, 该方法真实可靠, 而且从核酸提取到报告检测结果耗时不超过 3 h, 为鸭黄病毒病提供了一种敏感特异的定量检测方法。

**关键词:**鸭黄病毒; 实时荧光定量 RT-PCR; TaqMan 探针

中图分类号: S852.657

文献标志码: A

文章编号: 1005-4545(2013)01-0016-04

## Development and application of real-time RT-PCR assay for duck flavivirus

GAO Feng<sup>1</sup>, YU Ke-xiang<sup>2</sup>, MA Xiu-li<sup>2</sup>, LI Yu-feng<sup>2</sup>, WANG You-ling<sup>2,3</sup>, LI Jian-liang<sup>1</sup>, CUI Yan-shun<sup>1\*</sup> (1. College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China; 2. Immunology of Institute of Poultry Science, Shandong Academy of Agricultural Science, Jinan 250023, China; 3. College of Veterinary Medicine, Huannan Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** A real-time RT-PCR method was developed for the detection of duck flavivirus (DFV). The specific primers and TaqMan probe were designed and synthesized according to the E gene sequence of duck flavivirus. The standard curve ( $Y = -3.39 X + 43.18, r = 0.973$ ) was plotted based on the linear relationship between the amount of plasmid DNA and cycle threshold (Ct). This method was specific for duck flavivirus (DFV) but not for duck hepatitis virus, avian influenza virus, Newcastle disease virus, adenovirus, duck plague virus and porcine Japanese encephalitis virus. The detection limit reached 1.9 TCID<sub>50</sub> of the virus under the optimized conditions. Tissues in five ducks after 86 h artificial infected with DFV were tested positive by this method, without parts of cecal tonsils. And the positive detection rate of the method was consistent with routine virus isolation method. These results indicated that the real-time RT-PCR approach provides a powerful diagnostic tool with high sensitivity and specificity for the identification and quantitation of DFV and the whole process of the test could be completed within 3 hours.

**Key words:** duck flavivirus; real-time RT-PCR; TaqMan probe

\* Corresponding author

自 2010 年 4 月以来, 在我国大部分养鸭地区陆续发生了一种以感染种鸭和雏鸭为主的新疫病。产

蛋鸭表现以产蛋严重下降为主, 随着病程的延长在发病后期出现一定比例神经症状的鸭, 雏鸭表现以站立不稳、倒地不起等神经症状为主。本实验室通过临床剖检和病理组织切片分析, 结合病原分离鉴定、血清学检测和分子序列测定等, 已初步确定危害

收稿日期: 2011-11-23

作者简介: 高 凤(1986-), 女, 硕士。

\* 通讯作者

种鸭和雏鸭的病原为同一种新病毒即鸭黄病毒<sup>[1]</sup>。与相关领域的学者命名的鸭出血性卵巢炎(Duck hemorrhagic ovaritis, DHO)<sup>[2]</sup>为同一种病原,与坦布舒病毒的同源性极高。到目前为止,此病给我国养鸭业造成了严重的经济损失。实时荧光定量 RT-PCR 具有特异性强、定量准确、重复性好、高通量易操作等优点,已成为一种越来越重要的检测手段。本试验根据鸭黄病毒的 E 蛋白基因序列设计引物和探针,建立了用于检测鸭黄病毒的实时荧光定量 RT-PCR 方法并对此方法进行了初步应用。

## 1 材料与方法

**1.1 毒株、质粒标准品和鸡胚** 鸭黄病毒(DECV-BZ 株(简称 BZ))为本研究室保存的毒株,TCID<sub>50</sub>为 10<sup>5.9</sup>/0.1 mL。鸭病毒性肝炎病毒(DHV)、新城疫病毒(NDV)、腺病毒(EDSV)、鸭瘟病毒(DPV)、猪乙脑病毒(JEV)、质粒标准品(T-NS1)由山东省农科院家禽研究所禽病检测中心保存,禽流感病毒(AIV)由华南农业大学馈赠。鸡胚为山东省农科院家禽研究所的 SPF 鸡胚。

**1.2 主要试剂** 总 RNA 提取试剂 Trizol<sup>®</sup> Reagent 为 Invitrogen 公司产品。One Step PrimeScript<sup>™</sup> RT-PCR Kit,为东洋坊(上海)生物科技有限公司。

**1.3 引物和探针的设计** 根据已发表的鸭黄病毒 E 蛋白基因的序列(GenBank 登录号:JF312912),设计并合成 1 对特异性引物及探针。探针的 5'端标记荧光发光基团 FAM(6-carboxy-fluorescein),3'端标记荧光淬灭基团 TAMRA(6-carboxy-tetramethyl-rhodamine),由生工生物工程(上海)有限公司合成。上游引物 P1:5'-ACACCAAGGAGACTTGCCAAA-3';下游引物 P2:5'-CAAGATCGCGTTCAACTCATGT-3';TaqMan 探针:5'(FAM)-CATACGATCAGT-CAGCAGGCTCGAGCA-(TAMRA)3'。

**1.4 循环参数及反应体系的优化** 采用 Invitrogen 公司的 Trizol 核酸提取试剂,按照说明书提取病毒 RNA。用实时荧光定量 RT-PCR 仪(ABI7300 美国 ABI 公司)进行扩增,扩增体系为 20  $\mu$ L:10  $\mu$ L 2 $\times$  RT-PCR mix(包含 Taq DNA polymerase, M-MLV 逆转录酶, dNTPs 和 MgCl<sub>2</sub> 等 RT-PCR 反应成分),上下游引物 5~20 pmol,探针 5~20 pmol 和鸭黄病毒核酸模板 5  $\mu$ L,补充 DEPC 水至 20  $\mu$ L。反应条件为:90 $^{\circ}$ C 30 s,61 $^{\circ}$ C 20 min,95 $^{\circ}$ C 60 s;95 $^{\circ}$ C 20 s,退火温度 52~62 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,45 个

循环,于 60 $^{\circ}$ C 延伸结束后收集荧光,对退火温度及上下游引物、探针的终浓度进行优化。

**1.5 标准曲线的制作** 阳性质控标准品(T-NS<sub>1</sub>)用微量紫外分光光度计(Nanodrop2000)定量,以 10 $\times$  倍比稀释,取浓度范围在 5.88 $\times$ 10<sup>1</sup>~5.88 $\times$ 10<sup>10</sup> 拷贝/ $\mu$ L 阳性质控标准品进行检测,根据 Ct 值经对数拟合作图形成标准曲线。

**1.6 特异性试验** 为了评价荧光定量 RT-PCR 方法用于检测鸭黄病毒的特异性,以 DFV(DECV-BZ 分离株)、DHV、AIV、NDV、EDSV、DPV、JEV、SPF 鸡胚尿囊液、健康鸭胚尿囊液、SPF 鸡胚成纤维细胞、健康鸭胚成纤维细胞所提取的核酸为模板进行荧光定量 RT-PCR 检测,并对其扩增产物进行鉴定。

**1.7 敏感性试验** 取 100  $\mu$ L 鸭黄病毒液(10<sup>5.9</sup> TCID<sub>50</sub>/0.1 mL),10 倍梯度连续稀释,采用 Invitrogen 公司的 Trizol 提取各个梯度的病毒核酸,从中取 5  $\mu$ L,按上述方法进行检测,测定模板最低检出量,判定该方法的敏感度。

**1.8 人工感染鸭样品检测** 选取 3 日龄体质量相近的健康鸭 5 只,将鸭黄病毒(DECV-BZ 株(简称 BZ))1 000 倍稀释,每只鸭脑内注射 0.05  $\mu$ L 稀释好的病毒液。攻毒后 86 h,采集脑内接种雏鸭的心、肝、脾、肺、肾、脑、气管、胰腺、十二指肠、盲肠、法氏囊,研磨处理后冷冻保存,冻融 3 次后 10 000  $\times$  g 离心 10 min,分别取其上清液 300  $\mu$ L,一部分提取病毒总 RNA,用本试验建立的荧光 RT-PCR 方法分别对各样品进行检测,观察扩增曲线。取另一部分接种 9 日龄 SPF 鸡胚,收集 24 h 后死亡的鸡胚尿囊液,分离病毒,用常规 RT-PCR 方法进行检测(上游引物 P3:5'-GAGATGTACTGGGTGAGCGG-3',下游引物 P4:5'-GGTCTCACACTTCCCTTG-CAG-3')。

## 2 结果

**2.1 循环参数及反应体系的优化** 经过多次试验验证,得到最佳循环参数。在已确定的最佳循环参数条件下,对反应体系从引物浓度、探针浓度进行最优化探讨,最终确定反应体系为 20  $\mu$ L,上游引物为 20 pmol,下游引物为 20 pmol,探针为 10 pmol。荧光 RT-PCR 扩增程序:90 $^{\circ}$ C 30 s,61 $^{\circ}$ C 20 min,95 $^{\circ}$ C 60 s;95 $^{\circ}$ C 20 s,55 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,45 个循环。

**2.2 标准曲线** 以起始模板拷贝数的对数为 X 轴,Ct 值为 Y 轴作回归曲线,建立了检测鸭黄病毒的标准曲线(图 1),在较低的模板拷贝数时(5.88 $\times$

$10^2$ )仍然具有很好的线性关系,线性关系式为: $Y = -3.39 X + 43.18 (r = 0.973)$ 。以  $C_t$  值 33 作为临界值,能够检测出的基因拷贝数为  $5.88 \times 10^2$  个。同时阳性质控标准品在标准曲线上的数据点与曲线拟合良好。无模板对照(Notemplate control, NTC)没有荧光扩增曲线为阴性结果。

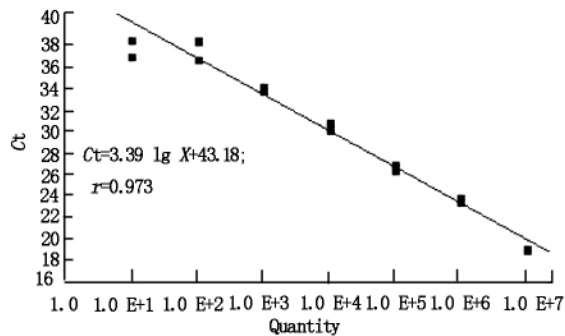


图1 RT-PCR 检测 DFV DNA 的标准曲线

**2.3 特异性试验** 以 DECV-BZ 分离株的核酸为模板进行荧光 RT-PCR 检测,扩增曲线为阳性,以 DHV、AIV、NDV、EDSV、DPV、JEV、SPF 鸡胚尿囊液、健康鸭胚尿囊液、SPF 鸡成纤维细胞、健康鸭成纤维细胞的核酸为模板进行荧光 RT-PCR 检测,扩增曲线为阴性( $C_t$  值均大于 33)(图 2),扩增产物的鉴定结果见图 3。

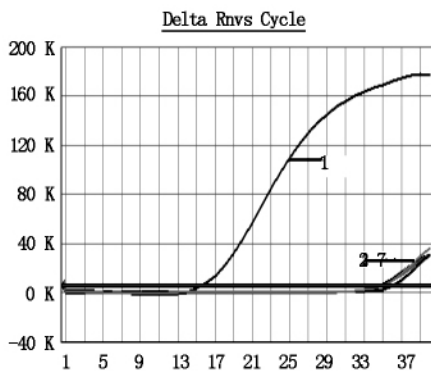


图2 荧光定量 RT-PCR 特异性 1. DFV; 2~7. DHV、AIV、NDV、DPV、JEV 及阴性对照

**2.4 敏感性试验结果** 用此方法对梯度稀释的鸭黄病毒所提取的病毒核酸进行检测,最低限为  $1.9 \text{ TCID}_{50}/0.1 \text{ mL}$ ,即  $20 \text{ pg}$  病毒核酸(图 4)。

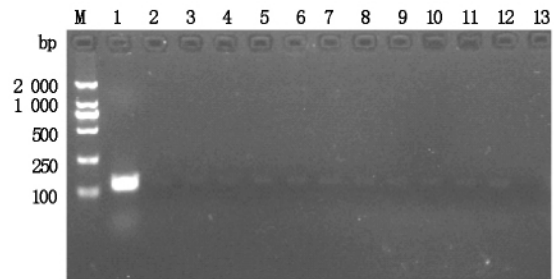


图3 特异性试验扩增产物电泳图 M. Marker; 1~13. 分别为 DFV、DHV、AIV ( $H_5$ )、AIV ( $H_9$ )、NDV、EDSV、DPV、JEV、SPF 鸡胚尿囊液、健康鸭胚尿囊液、CEF、DEF、DEPC 水

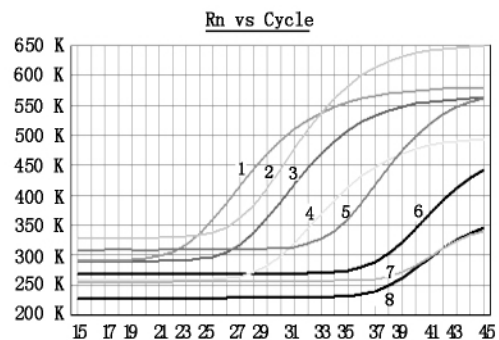


图4 DFV 荧光定量 RT-PCR 敏感性 1~8. DFV 的核酸量分别为  $1.9 \times 10^4$ 、 $1.9 \times 10^3$ 、 $1.9 \times 10^2$ 、 $1.9 \times 10^1$ 、 $1.9$ 、 $1.9 \times 10^{-1}$ 、 $1.9 \times 10^{-2}$ 、 $1.9 \times 10^{-3} \text{ TCID}_{50}/0.1 \text{ mL}$

**2.5 人工感染样品检测** 以  $C_t$  值 33 为判定限值,从脑内接种雏鸭的心、肝、脾、肺、肾、脑、气管、胰腺、十二指肠、法氏囊分离的病毒,结果阳性率为 100%,与病毒分离阳性符合率达 100%。对盲肠样品的检测阳性率为 40%,而病毒分离检测率为 92.5%(表 1)。

表1 人工感染样品检测结果

| 项目           | 心     | 肝     | 脾     | 肺     | 肾     | 脑     | 气管    | 胰腺    | 十二指肠  | 盲肠    | 法氏囊   |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $C_{t1}$     | 18.15 | 16.69 | 18.30 | 18.01 | 17.45 | 17.24 | 17.15 | 18.91 | 18.84 | 32.08 | 19.54 |
| $C_{t2}$     | 17.49 | 16.43 | 18.11 | 17.72 | 17.20 | 17.16 | 17.05 | 18.02 | 19.01 | 32.75 | 19.65 |
| $C_{t3}$     | 17.30 | 16.27 | 17.82 | 17.57 | 17.17 | 17.10 | 16.91 | 18.36 | 19.16 | 33.22 | 20.21 |
| $C_{t4}$     | 17.66 | 16.45 | 18.07 | 17.81 | 17.26 | 17.15 | 17.08 | 18.42 | 19.06 | 32.86 | 19.70 |
| $C_{t5}$     | 17.64 | 16.44 | 18.05 | 17.78 | 17.24 | 17.16 | 18.98 | 18.50 | 19.11 | 33.15 | 19.78 |
| Mean $C_t$   | 17.65 | 16.46 | 18.07 | 17.78 | 17.27 | 17.16 | 17.37 | 18.44 | 19.03 | 32.61 | 19.78 |
| StdDev $C_t$ | 0.282 | 0.134 | 0.153 | 0.143 | 0.098 | 0.045 | 0.793 | 0.286 | 0.111 | 0.454 | 0.230 |

注: $C_{t1} \sim C_{t5}$  分别为 5 只脑内接种雏鸭样本的  $C_t$  值

### 3 讨论

建立快速、特异、敏感的鸭黄病毒诊断方法,是鸭黄病毒临床诊断、防疫与检疫的迫切要求。由于传统的 PCR 技术具有不能准确定量,且操作过程中易污染而使得假阳性率高等缺点,使其应用受到限制<sup>[3]</sup>,实时荧光定量 RT-PCR 技术拥有特异性强、灵敏度高、重复性好、定量准确、速度快、全封闭反应等优点,现已成为了分子生物学研究中的重要工具<sup>[4]</sup>。目前,多种 PCR 技术已广泛应用于黄病毒属特异性诊断<sup>[5-9]</sup>。

本试验利用鸭黄病毒 E 蛋白基因序列,设计引物和探针,通过对退火温度、引物和探针浓度等反应条件和反应体系的优化,成功建立了一种灵敏度高、特异性强、重复性好的鸭黄病毒一步法荧光定量 RT-PCR 检测方法。本试验采用的是宝生物工程(大连)有限公司的 One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit 试剂盒。与常规的两步法相比,本方法操作方便,荧光定量 RT-PCR 反应时直接以 RNA 为模板,在一个反应管内先后进行反转录和荧光定量 PCR 反应,避免了样本间的交叉污染或反复开管时带入污染源,减少了污染的可能;也显著简化了操作步骤,很大程度上缩短了检测时间,从 RNA 提取到结果分析只要 3 h(两步法一般为 4 h)。

本方法只能从含有鸭黄病毒的样本中检测出特异性扩增荧光信号,而不与参考病毒(鸭病毒性肝炎病毒、H5 及 H9 亚型禽流感病毒、新城疫病毒、腺病毒、鸭瘟病毒、猪乙脑病毒)等病原核酸发生交叉反应,充分证明了其检测鸭黄病毒的高度特异性。通过敏感性试验得知用此方法对所提取的鸭黄病毒进行检测,最低可检测出 1.9 TCID<sub>50</sub>/0.1 mL(20 pg)病毒核酸。

鸭黄病毒广泛分布于病鸭体内各组织、器官,用本试验建立的实时荧光定量 RT-PCR 检测人工感染鸭心、肝、脾、肺、肾、脑、气管、胰腺、十二指肠、法氏囊,检测结果均为阳性,与病毒分离阳性符合率达 100%,结果表明,鸭黄病毒的嗜性广泛,能在雏鸭的多个脏器组织增殖。然而,盲肠扁桃体检出率仅为 40%,具体原因还有待进一步分析。同时,试验仅检测了攻毒后 86 h 各组织的病毒分布,病毒在不同时间动态分布情况将在下一步的工作中进行深入研究。

黄病毒通过节肢动物(如蚊、蜚、白蛉等)传播,人、家禽等被其叮咬后受感染,近年发现,黄病毒分

布越来越广泛,这可能与全球变暖有一定关系<sup>[10-11]</sup>。在我国,主要的黄病毒为流行性乙型脑炎病毒、森林脑炎病毒和登革热病毒<sup>[12]</sup>。此次我国种(蛋)鸭发生蛋骤降疫病,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<sup>[2]</sup>。鸭黄病毒实时荧光定量 RT-PCR 方法的建立,为病毒组织定位等深入研究提供了一种手段。此方法不仅能用于养殖场中鸭黄病毒病的快速检测,为鸭场减少损失,而且还可以为进出口检验检疫提供可靠的检测方法,对我国鸭黄病毒病的防控有着重要意义。

### 参考文献:

- [1] 李玉峰,马秀丽,于可响,等. 一种从鸭新分离的黄病毒研究初报[J]. 畜牧兽医学报,2011,42(6):885-891.
- [2] 万春和,施少华,程龙飞,等. 鸭出血性卵巢炎病毒 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 福建农业学报,2011,26(1):10-12.
- [3] Chung H W. Reverse transcriptase PCR (RT-PCR) and quantitative-competitive PCR (QC-PCR) [J]. Exp Mol Med,2001,33(Suppl1):85-97.
- [4] Arya M, Shergill I S, Williamson M, et al. Basic principles of real-time quantitative PCR [J]. Expert Rev Mol Diagn,2005,5(2):209.
- [5] Lanciotti R S. Molecular amplification assays for the detection of flaviviruses [J]. Adv Virus Res,2003,61:67-99.
- [6] 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.
- [7] Jackson G, McNichols R, Fox G, et al. Toward universal flavivirus identification by mass cataloging [J]. J Mol Diagn,2008,10(2):135-141.
- [8] Trepo C, Vierling J, Zeytin F, et al. The first flaviviridae symposium [J]. Intervirology,1997,40(4):279-288.
- [9] 唐 熠,刁有祥,高绪慧,等. 鸭黄病毒逆转录半套式 PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医学报,2012,32(4):517-519.
- [10] Gaunt M W, Sall A A, de Lamallerie X, et al. Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography [J]. J Gen Virol,2001,82(8):1867-1876.
- [11] Gould E A, Moss S R, Turner S L. Evolution and dispersal of encephalitic flaviviruses [J]. Arch Virol Suppl,2004,(18):65-84.
- [12] 滕巧洪,颜丕熙,张 旭. 一种新的黄病毒导致蛋鸭产蛋下降及死亡[J]. 中国动物传染病学报,2010,18(6):1-4.