

杨 颖, 肖亦辰, 马 平, 等. 2 种鹅星状病毒一步法双重 RT-PCR 检测方法的建立与应用[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(6): 1612-1619.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2022.06.020

## 2 种鹅星状病毒一步法双重 RT-PCR 检测方法的建立与应用

杨 颖<sup>1,2,3,4</sup>, 肖亦辰<sup>1,2,3,4</sup>, 马 平<sup>1,2,3,4</sup>, 赵冬敏<sup>1,2,3</sup>, 章丽娇<sup>1,2,3</sup>, 李 银<sup>1,2,3</sup>, 刘青涛<sup>1,2,3</sup>, 杨 婧<sup>1,2,3</sup>, 刘宇卓<sup>1,2,3</sup>, 韩凯凯<sup>1,2,3</sup>, 黄欣梅<sup>1,2,3,4</sup>

(1.江苏省农业科学院兽医研究所, 江苏 南京 210014; 2.农业农村部兽用生物制品工程技术重点实验室, 江苏 南京 210014; 3.国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏 南京 210014; 4.南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 为建立能同时快速鉴别新型鹅星状病毒和鹅星状病毒变异株的检测方法, 根据新型鹅星状病毒的 *ORF2* 基因和鹅星状病毒变异株的 *ORF1a* 基因的保守区域序列, 设计并合成 2 对特异性引物。通过优化反应体系及反应条件, 建立了能同时检测 2 种鹅星状病毒的一步法双重 RT-PCR 检测方法。该方法可同时扩增出新型鹅星状病毒 658 bp 和鹅星状病毒变异株 381 bp 的特异性条带, 对坦布苏病毒、鹅细小病毒、鹅副黏病毒、H9N2 亚型禽流感病毒、大肠杆菌和沙门菌的扩增结果均为阴性, 具有良好的特异性。对新型鹅星状病毒和鹅星状病毒变异株重组质粒的最低检测量分别是 1  $\mu$ l  $1.71 \times 10^3$  拷贝和 1  $\mu$ l  $1.70 \times 10^3$  拷贝, 敏感性良好, 并且具有良好的重复性。应用该方法对临床采集的雏鹅泄殖腔拭子进行检测, 结果显示, 124 份样品中新型鹅星状病毒阳性率为 45.16%, 鹅星状病毒变异株阳性率为 28.23%, 2 种鹅星状病毒均为阳性的占 11.29%, 与单一 RT-PCR 方法检测结果符合率为 100.00%。本研究建立的一步法双重 RT-PCR 检测方法快速简便, 特异性强、灵敏度高, 可用于临床样品的鉴别诊断, 该方法的建立对 2 种鹅星状病毒病的流行病学调查和有效防控以及混合感染的致病性研究具有重要意义。

**关键词:** 新型鹅星状病毒; 鹅星状病毒变异株; 一步法双重 RT-PCR

**中图分类号:** S855.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2022)06-1612-08

## Establishment and application of a one-step duplex RT-PCR method for detection of two kinds of goose astroviruses

YANG Ying<sup>1,2,3,4</sup>, XIAO Yi-chen<sup>1,2,3,4</sup>, MA Ping<sup>1,2,3,4</sup>, ZHAO Dong-min<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Li-jiao<sup>1,2,3</sup>, LI Yin<sup>1,2,3</sup>, LIU Qing-tao<sup>1,2,3</sup>, YANG Jing<sup>1,2,3</sup>, LIU Yu-zhuo<sup>1,2,3</sup>, HAN Kai-kai<sup>1,2,3</sup>, HUANG Xin-mei<sup>1,2,3,4</sup>

(1. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Key Laboratory of Veterinary Biological Engineering and Technology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210014, China; 3. National Research Center of Engineering and Technology for Veterinary Biologicals, Nanjing 210014, China; 4. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** To establish a method for the simultaneous detection of the novel goose astrovirus (nGoAstV) and the variant of goose astrovirus (vGoAstV), two pairs of specific primers were designed and synthesized according to the conserved sequence of the nGoAstV *ORF2* gene and the vGoAstV *ORF1a* gene. By optimizing the reaction system and conditions,

收稿日期: 2022-02-10

作者简介: 杨 颖 (1996-), 女, 安徽宣城人, 硕士研究生, 主要从事家禽疫病防控研究。(E-mail) joyyoung1996@163.com

通讯作者: 黄欣梅, (E-mail) hxmrene@126.com

a one-step duplex RT-PCR method was established for simultaneous detection of two kinds of goose astroviruses. Two specific fragments of nGoAstV (658 bp) and vGoAstV (381 bp) were amplified simultaneously.

Moreover, the amplification results of Tembusu virus (TMUV), goose parvovirus (GPV), goose paramyxovirus (GPMV), H9N2 subtype avian influenza virus (AIV), *Escherichia coli* and *Salmonella* were negative, indicating that this method had good specificity. The minimum detection amount of recombinant plasmids of nGoAstV and vGoAstV was  $1.71 \times 10^3$  copies per microliter and  $1.70 \times 10^3$  copies per microliter respectively, indicating that the method had good sensitivity and repeatability. The 124 clinical cloacal swabs samples collected from gosling were detected by the established one-step duplex RT-PCR method. The positive rates of nGoAstV and vGoAstV were 45.16% and 28.23%, respectively, and the rate of two kinds of goose astrovirus co-infection was 11.29%. The coincidence rate between this method and the single RT-PCR method was 100.00%. The one-step duplex RT-PCR method established in this study is rapid, simple, sensitive and specific, which can be used for clinical differential diagnosis of nGoAstV and vGoAstV. It is of great significance for epidemiological investigation, effective prevention and control, and the pathogenicity study of co-infection of two kinds of goose astroviruses.

**Key words:** novel goose astrovirus; variant of goose astrovirus; one-step duplex RT-PCR

星状病毒(Astrovirus)是一种无囊膜,单股正链的RNA病毒,其基因组全长6.2~7.8 kb,包含ORF1a、ORF1b和ORF2 3个开放阅读框以及5'UTR、3'UTR和PolyA尾<sup>[1]</sup>。星状病毒科包括哺乳动物星状病毒属和禽星状病毒属2个属。哺乳动物星状病毒属可导致人、猪、牛、羊、猫和犬等多种哺乳动物患胃肠炎、脑膜炎和腹泻疾病<sup>[2-4]</sup>。禽星状病毒属可引起鸭致死性肝炎<sup>[5]</sup>,鸡的发育不良综合征<sup>[6]</sup>、白鸡综合征<sup>[7]</sup>、火鸡的家禽肠炎死亡综合征<sup>[8]</sup>等。

Bidin等<sup>[9]</sup>从克罗地亚地区鹅群中分离到禽星状病毒属中的禽肾炎病毒(Avian nephritis virus, ANV),并证实该星状病毒在鹅场中普遍存在,可导致鹅胚胎发育障碍及孵化阶段死亡。Zhang等<sup>[10]</sup>从湖南省具有肠炎症状的雏鹅体内鉴定出1株鹅源星状病毒(Goose astrovirus, GoAstV)FLX株。基因序列分析结果表明,与禽星状病毒属其他成员相比,鹅星状病毒FLX株的基因组核苷酸同源性为51%~59%,3个开放阅读框的氨基酸同源性低于66%,是禽星状病毒属中新出现的一种鹅源星状病毒。2017年至2019年,有研究者从国内鹅群中分离到鹅源星状病毒SCCD株和AHDY株,遗传序列分析结果表明,SCCD株和AHDY株与FLX株编码衣壳蛋白的ORF2基因编码的蛋白质的氨基酸同源性为81%,遗传距离为0.189。国际病毒分类学委员会星状病毒研究小组规定,不同星状病毒毒株的ORF2基因编码氨基酸同源性若大于75%,可划分为同一星状病毒种,如果遗传距离大于0.05,ORF2基因核苷酸同源性小于93%,可定义为变异株,因此有学者将SCCD株和AHDY株定义为鹅星状病毒FLX株的变异株<sup>[11]</sup>。

2016年以来,中国主要养鹅地区陆续暴发一种以雏鹅肾炎和内脏、关节痛风为主要特征的急性传染病,死亡率为20.0%~50.0%,给中国养鹅产业造成的经济损失达 $1.2 \times 10^9 \sim 1.5 \times 10^9$ 元<sup>[12]</sup>。多位研究者从具有痛风症状的雏鹅体内分离到一种新的星状病毒,包括GD、AHQJ18、SDPY、JSHA、CXZ18和SD01等毒株<sup>[13-18]</sup>。基因序列分析结果表明,这些从具有痛风症状的雏鹅体内分离到的鹅星状病毒与禽星状病毒属其他代表性毒株的基因组核苷酸同源性为46.5%~62.0%,与ORF2基因编码的蛋白质的氨基酸序列的同源性仅为27.3%~57.0%,遗传距离较远。与引起肠炎的鹅星状病毒FLX株相比,引起痛风症状的鹅星状病毒ORF2基因编码的蛋白质的氨基酸相似性为40.4%~42.5%,低于同种星状病毒的划分标准(75.0%),是一种新的鹅星状病毒种,因此许多学者将引起雏鹅痛风的鹅星状病毒定义为新型鹅星状病毒。也有学者将这2种鹅星状病毒分别定义为鹅星状病毒1(GoAstV1)和鹅星状病毒2(GoAstV2)<sup>[19]</sup>,或者是鹅星状病毒G-I群和鹅星状病毒G-II群<sup>[20]</sup>。目前对这2种鹅星状病毒还未有统一的命名方式,本文暂时将引起鹅肠炎的毒株称为鹅星状病毒变异株,将引起雏鹅痛风的毒株称为新型鹅星状病毒。

张玉杰等<sup>[11]</sup>对临床采集的典型雏鹅痛风样品进行检测,发现约有94.03%的样品为鹅星状病毒变异株和新型鹅星状病毒混合感染,动物试验结果表明2种鹅星状病毒混合感染引起的痛风症状及死亡率要高于单独感染组。本实验室在前期流行病学调查中也发现,发生雏鹅痛风的鹅群中,可从部分泄殖腔拭子中同时检测出2种鹅星状病毒<sup>[21]</sup>。这些结果表明,临床上存在鹅星状病毒变异株和新型鹅星

状病毒混合感染的情况,这 2 种鹅星状病毒在雏鹅痛风中发挥的作用及致病机制还有待进一步深入研究。目前还未有同时鉴别区分 2 种鹅星状病毒感染的诊断方法。传统的病原分离鉴定存在耗时长,对人员设备要求高等缺点。因此,建立一种可同时快速检测 2 种鹅星状病毒的方法具有重要的临床意义。本研究拟根据新型鹅星状病毒的 *ORF2* 基因和鹅星状病毒变异株的 *ORF1a* 基因序列分别设计特异性引物,对反应体系和条件进行优化,建立快速、灵敏、准确的一步法双重 RT-PCR 检测方法,以期对 2 种鹅星状病毒的临床鉴别诊断,流行病学调查以及有效防控雏鹅痛风提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒与细胞

新型鹅星状病毒(nGoAstV) AHQJ18 株、鹅星状病毒变异株(vGoAstV) 33-3 株、坦布苏病毒

表 1 本试验所用引物序列及产物长度

Table 1 Sequences of primers and lengths of RT-PCR products

病毒	引物名称	引物序列(5'→3')	扩增片段长度(bp)
新型鹅星状病毒(nGoAstV)	nGoAstV-F	ACACTCGACCGGAAGCATAAATA	658
	nGoAstV-R	AGACGCGCCTGTGTGCTCCTTC	
鹅星状病毒变异株(vGoAstV)	vGoAstV-F	ATATGAAGCCCTTGAGCAGACTAG	381
	vGoAstV-R	AAAAAGGACCAGCCAATAAAAGTG	

### 1.4 新型鹅星状病毒和鹅星状病毒变异株单一 RT-PCR 扩增

分别取 200  $\mu$ l 新型鹅星状病毒阳性 LMH 细胞培养物和鹅星状病毒变异株阳性鹅胚尿囊液,用 RNA 提取试剂盒提取病毒核酸,利用新型鹅星状病毒和鹅星状病毒变异株的特异性引物,分别进行单一的一步法 RT-PCR 扩增。扩增反应体系为:2 $\times$ 一步法反应缓冲液 12.50  $\mu$ l,酶混合物 1.25  $\mu$ l,上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1.00  $\mu$ l, RNA 模板 2.00  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 补足至 25.00  $\mu$ l,混匀。新型鹅星状病毒的反应程序为:50  $^{\circ}$ C 反转录 30 min;94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94  $^{\circ}$ C 30 s,54  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 45 s,共 30 个循环;72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min。鹅星状病毒变异株的反应程序为:50  $^{\circ}$ C 反转录 30 min;94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94  $^{\circ}$ C 30 s,56  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 30 s,共 30 个循环;72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min。反应结束后,扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶

(TMUV)、鹅细小病毒(GPV)、鹅副黏病毒(GPMV)、H9N2 亚型禽流感病毒(AIV)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、沙门菌(*Salmonella*)和鸡肝癌细胞系(LMH)等由江苏省农业科学院兽医研究所保存。

### 1.2 试剂

pMD19-T 载体、DH5 $\alpha$  感受态细胞、限制性内切酶 *Eco* R I 和 *Hind* III 购自宝生物工程(大连)有限公司;DNA/RNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒、小量提取质粒试剂盒等购自爱思进生物技术(杭州)有限公司;一步法 RT-PCR 试剂盒、DNA Marker 等购自南京诺唯赞生物科技有限公司。

### 1.3 引物设计与合成

参考 GenBank 收录的新型鹅星状病毒 *ORF2* 基因和鹅星状病毒变异株 *ORF1a* 基因序列,应用 Primer Premier 5.0 软件分别设计了 1 对特异性引物,引物信息见表 1。引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

电泳检测。

### 1.5 重组质粒标准品的制备

用胶回收试剂盒分别回收上述 RT-PCR 扩增条带,克隆至 pMD19-T 载体,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,筛选阳性克隆,提取质粒后用限制性内切酶 *Eco* R I 和 *Hind* III 进行双酶切鉴定。阳性质粒送南京金斯瑞生物科技有限公司进行序列测定。提取序列正确的重组质粒,测定质量浓度并计算质粒拷贝数,作为质粒标准品。

### 1.6 一步法双重 RT-PCR 检测方法的建立及反应条件优化

将新型鹅星状病毒和鹅星状病毒变异株阳性培养物等量混合后提取 RNA 作为模板,建立一步法双重 RT-PCR 检测方法。固定反应体系中其他组分不变,单一改变引物用量来确定最适的引物浓度。引物 nGoAstV-F、nGoAstV-R 和 vGoAstV-F、vGoAstV-R



的浓度均为 10  $\mu\text{mol/L}$ , 加入量设 0.1  $\mu\text{l}$ 、0.3  $\mu\text{l}$ 、0.5  $\mu\text{l}$ 、0.7  $\mu\text{l}$ 、0.9  $\mu\text{l}$  5 个梯度。反应程序为: 50  $^{\circ}\text{C}$  反转录 30 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 共 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min。反应结束后, 取扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

选择上述筛选的最佳引物用量, 单一改变退火温度, 设置 52.0  $^{\circ}\text{C}$ 、53.0  $^{\circ}\text{C}$ 、54.0  $^{\circ}\text{C}$ 、55.2  $^{\circ}\text{C}$ 、56.4  $^{\circ}\text{C}$ 、57.6  $^{\circ}\text{C}$ 、58.8  $^{\circ}\text{C}$  和 60.0  $^{\circ}\text{C}$  8 个梯度退火温度, 进行一步法双重 RT-PCR 扩增, 确定最佳退火温度。

### 1.7 一步法双重 RT-PCR 检测方法的特异性试验

用上述优化好的反应体系和条件, 分别检测新型鹅星状病毒和鹅星状病毒变异株单一和混合样品, 以及坦布苏病毒、鹅细小病毒、鹅副黏病毒、H9N2 亚型禽流感病毒、大肠杆菌和沙门菌单一样品, 同时设置生理盐水为阴性对照, 用建立的一步法双重 RT-PCR 方法进行扩增检测, 检验该方法的特异性。

### 1.8 一步法双重 RT-PCR 检测方法的敏感性试验

将构建好的新型鹅星状病毒和鹅星状病毒变异株质粒标准品等体积混合, 用 ddH<sub>2</sub>O 进行 10 倍梯度稀释, 取  $1 \times 10^{-2} \sim 1 \times 10^{-10}$  9 个稀释度各 2  $\mu\text{l}$  混合质粒作为模板进行一步法双重 RT-PCR 扩增, 以检验该方法的敏感性。

### 1.9 一步法双重 RT-PCR 检测方法的重复性试验

用建立的一步法双重 RT-PCR 检测方法对 3 份新型鹅星状病毒和鹅星状病毒变异株均为阳性的样品进行 3 次重复检测, 以检验该方法的重复性和稳定性。

### 1.10 临床样品的检测

对 2020 年江苏地区 124 份 21 日龄内扬州白鹅泄殖腔拭子样本分别用本研究建立的单一和双重 RT-PCR 方法检测其中的新型鹅星状病毒和鹅星状病毒变异株, 以评价该一步法双重 RT-PCR 检测方法的临床实用性。

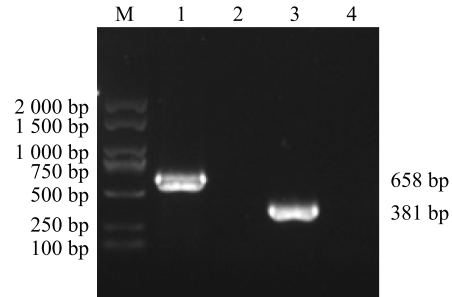
## 2 结果与分析

### 2.1 单一 RT-PCR 扩增及重组质粒标准品的构建

以提取的新型鹅星状病毒和鹅星状病毒变异株 RNA 为模板, 利用引物 nGoAstV-F/R 和 vGoAstV-F/R 分别进行单一的一步法 RT-PCR 扩增。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶核酸电泳检测, 结果如图 1 所示, 新型鹅星状病毒目的基因片段大小为 658 bp, 鹅

星状病毒变异株目的基因片段大小为 381 bp, 与预期片段大小相符。

将 2 个目的基因片段分别回收纯化后连接至 pMD19-T 载体, 转化 DH5 $\alpha$  *E. coli*, 提取质粒后进行双酶切鉴定。琼脂糖凝胶核酸电泳检测结果显示, 酶切片段与预期大小相符(图 2)。测序后经 NCBI BLAST 比较分析发现, 2 个目的基因片段与新型鹅星状病毒(GenBank 登录号: MF772821.1)和鹅星状病毒变异株(GenBank 登录号: MH410610.1)的同源性分别为 98.2% 和 97.6%, 表明阳性重组质粒标准品构建成功。用超微量分光光度计测定 pMD19T-nGoAstV 和 pMD19T-vGoAstV 的质量浓度, 其质量浓度分别为 62.83 ng/ $\mu\text{l}$  和 57.40 ng/ $\mu\text{l}$ , 计算其拷贝数分别为 1  $\mu\text{l}$   $1.71 \times 10^{10}$  拷贝和 1  $\mu\text{l}$   $1.70 \times 10^{10}$  拷贝。



M: DL2 000 DNA marker; 1: 新型鹅星状病毒; 2: 阴性对照; 3: 鹅星状病毒变异株; 4: 阴性对照。

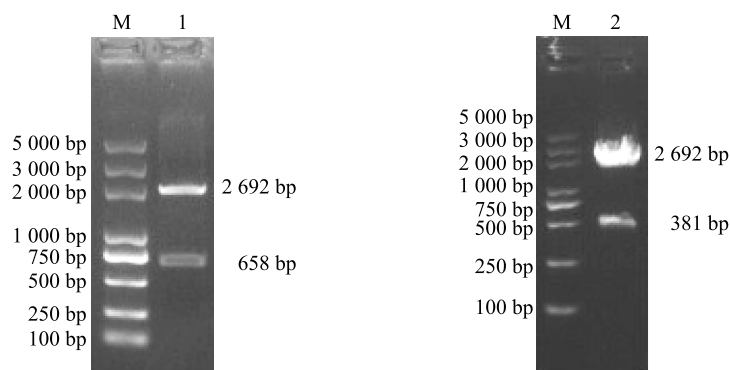
图 1 新型鹅星状病毒和鹅星状病毒变异株单一 RT-PCR 扩增

Fig.1 The single RT-PCR amplification of novel goose astrovirus and variant of goose astrovirus

### 2.2 一步法双重 RT-PCR 检测方法的建立及反应条件优化

将新型鹅星状病毒和鹅星状病毒变异株阳性培养物等量混合后提取 RNA 作为模板, 用引物 nGoAstV-F/R 和 vGoAstV-F/R 进行一步法双重 RT-PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳检测结果显示, 可同时扩增出 658 bp 和 381 bp 2 个条带, 与单一 RT-PCR 扩增条带大小相同, 阴性对照未扩增出任何条带(图 3)。

固定其他条件不变, 对加入的引物 nGoAstV-F/R 和 vGoAstV-F/R 设置 0.1  $\mu\text{l}$ 、0.3  $\mu\text{l}$ 、0.5  $\mu\text{l}$ 、0.7  $\mu\text{l}$  和 0.9  $\mu\text{l}$  5 个梯度, 进行一步法双重 RT-PCR 扩增。结果显示, 当 2 对上、下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各加入 0.5  $\mu\text{l}$  时即可获得较高的扩增效率, 因此确定引物最适用量为 0.5  $\mu\text{l}$ (图 4)。

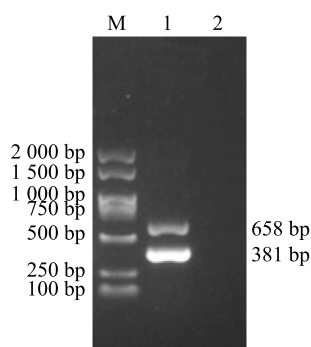


M:DL5 000 DNA marker;1:新型鹅星状病毒质粒标准品 pMD19T-nGoAstV 酶切鉴定; 2:鹅星状病毒变异株质粒标准品 pMD19T-vGoAstV 酶切鉴定。

图2 重组质粒标准品的酶切鉴定

Fig.2 Identification of standard recombinant plasmids digested by *Eco* R I 和 *Hind* III

固定其他反应条件不变,2 对引物用量均为 0.5  $\mu$ l,在 RT-PCR 扩增时设置 52.0  $^{\circ}$ C、53.0  $^{\circ}$ C、54.0  $^{\circ}$ C、55.2  $^{\circ}$ C、56.4  $^{\circ}$ C、57.6  $^{\circ}$ C、58.8  $^{\circ}$ C 和 60.0  $^{\circ}$ C 8 个退火温度梯度,结果显示,退火温度为 57.6  $^{\circ}$ C 及以下时,目的条带均较亮,最终确定 57.6  $^{\circ}$ C 为最佳退火温度(图 5)。



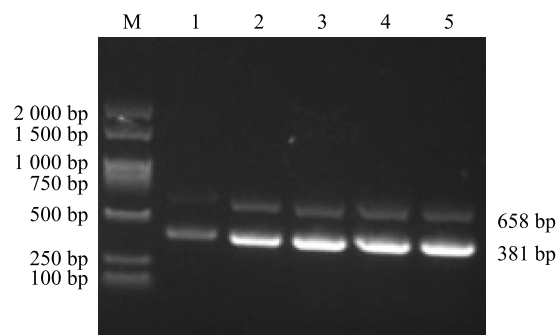
M:DL2 000 DNA marker;1:新型鹅星状病毒和鹅星状病毒变异株一步法双重 RT-PCR 扩增产物;2:阴性对照。

图3 新型鹅星状病毒和鹅星状病毒变异株一步法双重 RT-PCR 扩增

Fig.3 The one-step duplex RT-PCR amplification of novel goose astrovirus and variant of goose astrovirus

### 2.3 一步法双重 RT-PCR 检测方法的特异性试验

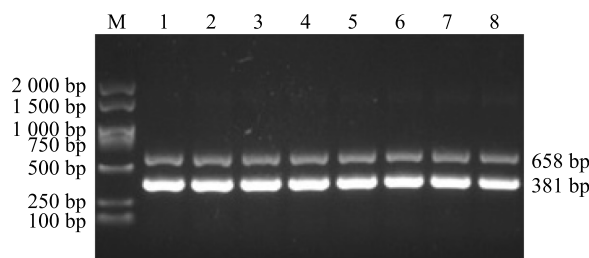
应用优化的一步法双重 RT-PCR 检测方法分别对新型鹅星状病毒和鹅星状病毒变异株单一和混合阳性样品以及坦布苏病毒、鹅细小病毒、鹅副黏病毒、H9N2 亚型禽流感病毒、大肠杆菌和沙门菌进行检测,结果(图 6)显示,2 种鹅星状病毒的单一样品和混合样品均能扩增出与预期一致的特异性条带,



M:DL2 000 DNA marker;1~5:引物用量依次为 0.1  $\mu$ l、0.3  $\mu$ l、0.5  $\mu$ l、0.7  $\mu$ l、0.9  $\mu$ l。

图4 一步法双重 RT-PCR 引物用量的优化

Fig.4 Optimization of primer dosage for the one-step duplex RT-PCR

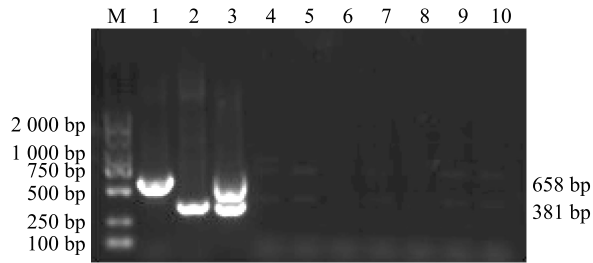


M:DL2 000 DNA marker;1~8:退火温度依次为 52.0  $^{\circ}$ C、53.0  $^{\circ}$ C、54.0  $^{\circ}$ C、55.2  $^{\circ}$ C、56.4  $^{\circ}$ C、57.6  $^{\circ}$ C、58.8  $^{\circ}$ C 和 60.0  $^{\circ}$ C。

图5 一步法双重 RT-PCR 退火温度的优化

Fig.5 Optimization of annealing temperature for the one-step duplex RT-PCR

而其他病原菌均未扩增出特异性条带,说明该方法具有较高的特异性。



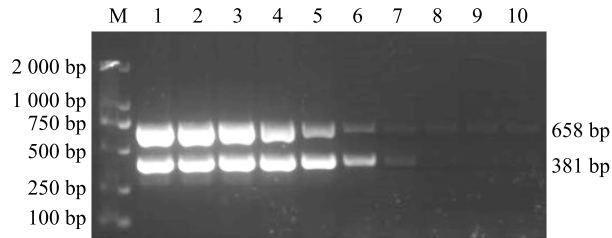
M: DL2 000 DNA marker; 1: 新型鹅星状病毒; 2: 鹅星状病毒变异株; 3: 新型鹅星状病毒和鹅星状病毒变异株; 4: 坦布苏病毒; 5: 鹅细小病毒; 6: 鹅副黏病毒; 7: H9N2 亚型禽流感病毒; 8: 大肠杆菌; 9: 沙门菌; 10: 阴性对照。

图 6 一步法双重 RT-PCR 检测方法的特异性试验

Fig.6 Specificity test of the one-step duplex RT-PCR detection method

#### 2.4 一步法双重 RT-PCR 检测方法的敏感性试验

将新型鹅星状病毒和鹅星状病毒变异株质粒标准品等体积混合后进行 10 倍梯度稀释, 取  $1 \times 10^{-2} \sim 1 \times 10^{-10}$  9 个稀释度各 2  $\mu$ l 混合质粒为模板, 用建立的一步法双重 RT-PCR 检测方法进行扩增, 结果(图 7)显示, 当混合质粒标准品稀释至  $1 \times 10^{-7}$  时仍能同时检测出 2 种鹅星状病毒的特异性条带, 即对新型鹅星状病毒和鹅星状病毒变异株的最低检出量分别为 1  $\mu$ l  $1.71 \times 10^3$  拷贝和 1  $\mu$ l  $1.70 \times 10^3$  拷贝, 表明该方法具有良好的敏感性。



M: DL2 000 DNA marker; 1~9: 新型鹅星状病毒和鹅星状病毒变异株混合质粒标准品稀释度分别为  $10^{-2} \sim 10^{-10}$ ; 10: 阴性对照。

图 7 一步法双重 RT-PCR 检测方法的敏感性试验

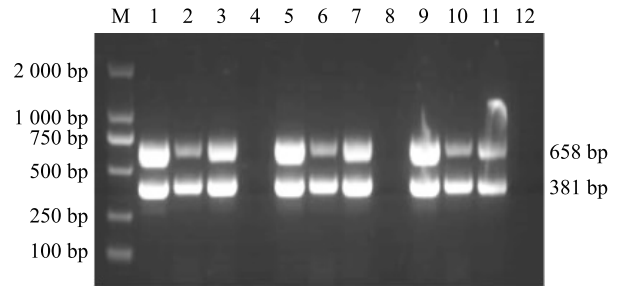
Fig.7 Sensitivity test of the one-step duplex RT-PCR detection method

#### 2.5 一步法双重 RT-PCR 检测方法的重复性试验

用建立的一步法双重 RT-PCR 检测方法对 3 份新型鹅星状病毒和鹅星状病毒变异株均为阳性的样品进行 3 次重复检测, 均能同时扩增出 2 种鹅星状病毒的特异性条带(图 8), 表明该方法具有良好的重复性。

#### 2.6 临床样品的检测

用本研究建立的单一和一步法双重 RT-PCR 方



M: DL2 000 DNA marker; 1~3、5~7、9~11: 3 份新型鹅星状病毒和鹅星状病毒变异株均为阳性样品的 3 次重复性检测; 4、8、12: 阴性对照。

图 8 一步法双重 RT-PCR 检测方法的重复性试验

Fig.8 Repeatability test of the one-step duplex RT-PCR detection method

法分别对 2020 年江苏地区 124 份 21 日龄内扬州白鹅泄殖腔拭子样本中的 2 种鹅星状病毒进行检测。在 124 份雏鹅泄殖腔拭子样本中, 新型鹅星状病毒阳性样本 56 份, 阳性率为 45.16%; 鹅星状病毒变异株阳性样本 35 份, 阳性率为 28.23%; 2 种鹅星状病毒均为阳性的样本 14 份, 阳性率为 11.29%。检测结果与单一 RT-PCR 方法结果一致, 符合率为 100.00%。表明本研究建立的一步法双重 RT-PCR 检测方法可以对临床样品中的 2 种鹅星状病毒进行鉴别诊断。

### 3 讨论

2016 年以来, 中国主要养鹅地区陆续暴发一种以肾炎、痛风为主要特征的传染病, 对中国养鹅产业造成了严重的经济损失。该病主要影响 21 日龄以内的雏鹅, 患病雏鹅食欲减退、精神沉郁、腹泻, 死亡率高达 50%。剖检可见多个内脏器官表面及关节内有白色尿酸盐样渗出物, 胆囊肿大, 内有尿酸盐沉积, 肾脏肿胀, 输尿管内有白色尿酸盐样沉积物。国内多位学者从具有痛风症状的雏鹅体内分离到一种新的星状病毒<sup>[13-18]</sup>, 基因序列分析结果表明, 这些鹅星状病毒与禽星状病毒属其他代表性毒株的基因组核苷酸同源性较低, 遗传距离较远, 是一种新的鹅星状病毒种, 因此许多学者将引起雏鹅痛风的鹅星状病毒定义为新型鹅星状病毒。

Zhang 等<sup>[10]</sup>从具有肠炎症状的雏鹅体内鉴定出 1 株鹅源星状病毒 FLX 株。之后有学者从临床鹅群中分离到与新型鹅星状病毒不同的鹅源星状病毒。



遗传序列分析结果表明,这些鹅源星状病毒与鹅星状病毒 FLX 株为同一星状病毒种,但存在一定的遗传距离,可定义为变异株,本文暂时称为鹅星状病毒变异株。鹅星状病毒变异株与新型鹅星状病毒的 *ORF2* 基因编码的蛋白质的氨基酸同源性为 40.4%~42.5%,低于同种星状病毒的划分标准 75.0%,是 2 种不同的星状病毒种。有文献报道,在临床发生痛风症状的鹅群内存在 2 种鹅星状病毒混合感染的情况,动物试验结果表明,2 种鹅星状病毒混合感染引起的痛风症状及死亡率要高于单独感染组<sup>[11,21]</sup>。但这 2 种鹅星状病毒在雏鹅痛风中发挥的具体作用及致病机制还有待进一步深入研究。

目前国内对于 2 种鹅星状病毒的研究均处于初期阶段<sup>[22-23]</sup>,仅有单独检测新型鹅星状病毒和鹅星状病毒变异株的 RT-PCR 方法或实时荧光定量 RT-PCR 方法<sup>[24-25]</sup>,还没有同时鉴别区分 2 种鹅星状病毒感染的诊断方法。因此,本研究建立了一种一步法双重 RT-PCR 检测方法,可以同时、准确、快速、简便地检测这 2 种鹅星状病毒,具有重要的临床意义。

传统的病原分离鉴定存在耗时长,对人员设备要求高等缺点。RT-PCR 技术是一种比较成熟的核酸扩增检测技术,而且扩增出的特异性片段可以进行基因测序,进一步进行遗传进化分析。2 种鹅星状病毒均为 RNA 病毒,检测时需先将 RNA 反转录为 cDNA,再进行 PCR 扩增。本研究采用一步法 RT-PCR 方法,减少了操作步骤,降低了样本被污染的风险,提高了检测效率。

本研究根据新型鹅星状病毒的 *ORF2* 基因和鹅星状病毒变异株的 *ORF1a* 基因的保守区域分别设计了特异性引物,并对反应体系及反应条件进行优化,确定了最佳引物使用量和退火温度,首次建立了针对这 2 种鹅星状病毒的一步法双重 RT-PCR 检测方法。该方法可在同一反应体系中扩增出新型鹅星状病毒和鹅星状病毒变异株的 2 个特异性条带,对其他鹅常见病毒性和细菌性病原的检测结果均为阴性,具有较高的特异性。本研究建立的一步法双重 RT-PCR 检测方法对新型鹅星状病毒和鹅星状病毒变异株的最低检测量分别是  $1 \mu\text{l } 1.71 \times 10^3$  拷贝和  $1 \mu\text{l } 1.70 \times 10^3$  拷贝,具有良好的敏感性,同时具有较好的重复性。应用已建立的一步法双重 RT-PCR 检测方法对临床采集的雏鹅泄殖腔拭子样本进行检测,结果显示,124 份雏鹅泄殖腔拭子中新型鹅星状

病毒阳性率为 45.16%,鹅星状病毒变异株阳性率为 28.23%,2 种鹅星状病毒均为阳性的占 11.29%,证实临床上鹅群中确实存在 2 种鹅星状病毒混合感染的情况。检测结果与单一 RT-PCR 方法检测结果一致,符合率为 100.00%。

本研究建立的检测新型鹅星状病毒和鹅星状病毒变异株的一步法双重 RT-PCR 检测方法具有操作简便,灵敏度高,特异性强的特点,可以快速高效地检测出 2 种鹅星状病毒,为上述 2 种病毒病的流行病学调查和临床早期鉴别诊断提供技术支持,对 2 种鹅星状病毒病的病原监测和有效防控以及混合感染的致病性研究具有重要意义。

## 参考文献:

- [1] MATTHEW D K, STACEY S C. Avian astroviruses[J]. Avian Pathology, 2002, 31: 213-227.
- [2] GLASS R I, NOEL J, MITCHELL D, et al. The changing epidemiology of astrovirus-associated gastroenteritis: a review [J]. Archives of Virology, 1996(S12): 287-300.
- [3] LUO Z Y, STEPHANIE R, MARGAUX D, et al. Multiple novel and prevalent astroviruses in pigs [J]. Veterinary Microbiology, 2011, 149(3/4): 316-323.
- [4] DONATO C, VIJAYKRISHNA D. The broad host range and genetic diversity of mammalian and avian astroviruses [J]. Viruses, 2017, 9(5): 1-18.
- [5] LIU N, WANG F M, SHI J J, et al. Molecular characterization of a duck hepatitis virus 3-like astrovirus [J]. Veterinary Microbiology, 2014, 170(1/2): 39-47.
- [6] TAKASE K, UCHIMURA T, YAMAMOTO M, et al. Susceptibility of embryos and chicks, derived from immunized breeding hens, to avian nephritis virus [J]. Avian Pathology, 1994, 23(1): 117-125.
- [7] LONG K E, OUCKAMA R M, WEISZ A, et al. White chick syndrome associated with chicken astrovirus in Ontario, Canada [J]. Avian Diseases, 2018, 62(2): 247-258.
- [8] CATTOLI G, DE BATTISTI C, TOFFAN A, et al. Co-circulation of distinct genetic lineages of astroviruses in turkeys and guinea fowl [J]. Archives of Virology, 2007, 152(3): 595-602.
- [9] BIDIN M, LOJKIC I, TISLJAR M, et al. Astroviruses associated with stunting and pre-hatching mortality in duck and goose embryos [J]. Avian Pathology, 2012, 41(1): 91-97.
- [10] ZHANG Y X, WANG F M, LIU N, et al. Complete genome sequence of a novel avastrovirus in goose [J]. Archives of Virology, 2017, 162(7): 2135-2139.
- [11] 张玉杰, 孙 宁, 刘 东, 等. 鹅星状病毒的分离鉴定及全基因组序列分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2020, 51(11): 2765-2777.
- [12] WEI F, YANG J, WANG Y M, et al. Isolation and characteriza-

- tion of a duck-origin goose astrovirus in China[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2020, 9(1):1046-1054.
- [13] ZHANG X Y, REN D, LI T F, et al. An emerging novel goose astrovirus associated with gosling gout disease, China[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2018, 7(1):152-159.
- [14] 章丽娇, 黄欣梅, 刘 飞, 等. 新型鹅星状病毒 AHQJ18 株的分离鉴定[J]. *江苏农业学报*, 2019, 35(5):1262-1264.
- [15] YANG J, TIAN J J, TANG Y, et al. Isolation and genomic characterization of gosling gout caused by a novel goose astrovirus[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65(6):1689-1696.
- [16] 徐 蓉, 陆明青, 张海涛, 等. 一株雏鹅痛风型鹅星状病毒的分离鉴定及其生物学特性研究[J]. *南京农业大学学报*, 2019, 42(6):1124-1132.
- [17] YUAN X Y, MENG K, ZHANG Y X, et al. Genome analysis of newly emerging goose-origin nephrotic astrovirus in China reveals it belongs to a novel genetically distinct astrovirus[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2019, 67:1-6.
- [18] ZHANG Q S, CAO Y X, WANG J, et al. Isolation and characterization of an astrovirus causing fatal visceral gout in domestic goslings[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2018, 7(1):1-11.
- [19] LI J Y, HU W Q, LIU T N, et al. Isolation and evolutionary analyses of gout-associated goose astrovirus causing disease in experimentally infected chickens [J]. *Poultry Science*, 2021, 100(2):543-552.
- [20] ZHANG X Z, DENG T W, SONG Y Z, et al. Identification and genomic characterization of emerging goose astrovirus in central China, 2020[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2022, 69(3):1046-1055.
- [21] 马 平. 鹅源星状病毒变异株的分离鉴定及生物学特性研究[D]. 南京:南京农业大学, 2021.
- [22] 吕 炫, 张 森, 胡增金, 等. 鹅星状病毒衣壳纤突蛋白 VP27 多克隆抗体的制备和鉴定[J]. *江苏农业学报*, 2021, 37(2):412-417.
- [23] 白彩霞, 张 达, 赵 靓, 等. 鹅星状病毒 SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 方法的建立[J]. *江苏农业学报*, 2020, 36(3):634-638.
- [24] 肖亦辰, 杨 颖, 马 平, 等. 新型鹅星状病毒一步法 RT-PCR 检测方法的建立与应用[J]. *江苏农业科学*, 2022, 50(2):142-146.
- [25] WAN C H, CHEN C T, CHENG L F, et al. Specific detection of the novel goose astrovirus using a *TaqMan* real-time RT-PCR technology[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 137:1-4.

(责任编辑:陈海霞)