

赵 碧,熊朝丽,徐茂文,等. 鸭肠炎病毒核衣壳蛋白质互作蛋白质基因荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(2) :389-393.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.02.026

鸭肠炎病毒核衣壳蛋白质互作蛋白质基因荧光定量 PCR 检测方法的建立

赵 碧¹, 熊朝丽¹, 徐茂文¹, 周碧君^{1,2}, 程振涛^{1,2}, 文 明^{1,2}

(1. 贵州大学动物科学学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州省动物疫病与兽医公共卫生重点实验室, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 为进一步阐明鸭肠炎病毒(DEV)的致病机理,本试验建立检测鸭肠炎病毒核衣壳蛋白质(NP)的互作蛋白质(PKCI)基因荧光定量 PCR 方法。针对 PKCI 基因设计特异性引物,经 PCR 扩增目的基因构建重组质粒 pMD18-T-PKCI,将其作为阳性标准品构建荧光定量 PCR 标准曲线,并对建立的荧光定量 PCR 方法进行重复性、特异性和敏感性试验。结果显示:标准曲线的线性关系为 $Y = -3.31x + 42.00$, 相关系数为 -1.00 , 扩增效率为 100%, 熔解曲线仅出现单特异峰,对 H5 亚型、H7 亚型和 H9 亚型禽流感病毒及新城疫病毒、鸭肝炎病毒均未检测到荧光信号。表明本试验建立的方法具有良好的稳定性、特异性和灵敏性。

关键词: 鸭肠炎病毒; 核衣壳蛋白质; 蛋白质激酶 C 抑制蛋白质; 荧光定量 PCR

中图分类号: S858.32 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2015)02-0389-05

Establishment of a real-time fluorescent quantitative PCR method for detecting the interacting protein (PKCI) gene of nucleocapsid protein of duck enteritis virus

ZHAO Bi¹, XIONG Chao-li¹, XU Mao-wen¹, ZHOU Bi-jun^{1,2}, CHENG Zhen-tao^{1,2}, WEN Ming^{1,2}

(1. College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Key Laboratory of Animal Disease and Veterinary Public Health of Guizhou Province, Guiyang 550025, China)

Abstract: To identify the pathogenesis of duck enteritis virus(DEV), a real-time fluorescent quantitative PCR assay for detecting the interacting protein (PKCI) gene of nucleocapsid protein(NP) of duck enteritis virus was developed. With designed specific primer, the PKCI gene was amplified by PCR. The recombinant plasmid of pMD18-T-PKCI was used as positive standard to construct a standard curve by real-time fluorescent quantitative PCR, $Y = -3.31x + 42.00$, with the correlation coefficient of -1.00 and the amplification efficiency of 100%. Melting curve appeared a single specific peak. The fluorescence signal were not detected in H5, H7, H9 subtype avian influenza viruses, newcastle disease virus, and duck hepatitis virus. The real-time fluorescent quantitative PCR method established in this study exhibited good stability, specificity and sensitivity.

Key words: duck enteritis virus; nucleocapsid protein; protein kinase C inhibitor(PKCI); real-time fluorescent quantitative PCR

收稿日期:2014-08-12

基金项目:国家自然科学基金项目(31260607);贵州省重点实验室培育项目[黔科合计 Z 字(2011)4008 号]

作者简介:赵 碧(1991-),男,云南曲靖人,硕士研究生,主要从事兽医微生物学与免疫学研究。(Tel)0851-8298078;(E-mail)710215448@qq.com

通讯作者:文 明,(E-mail)as.mwen@gzu.edu.cn

鸭肠炎病毒(Duck enteritis virus, DEV)可引起鸭、鹅等雁行目禽类发生急性、败血性、高度接触性

传染病,即鸭病毒性肠炎(Duck viral enteritis, DVE),是危害水禽养殖业的重要病原之一^[1-2]。目前该病毒的研究取得了诸多进展,但主要集中在病毒基因组和蛋白质组上,且致病机理尚未完全清楚。病毒的致病过程实质上就是病毒与宿主间的相互作用过程,但有关宿主细胞对DEV感染的应答特别是病毒蛋白质受体的研究较少。

贵州省动物疫病与兽医公共卫生重点实验室前期研究中通过DEV基因文库的构建,发现并鉴定了其核衣壳蛋白质(Nucleocapsid protein, NP)基因^[3-4],进行了生物信息学分析^[5-6]和原核表达研究^[7];通过酵母双杂交系统筛选并鉴定了核衣壳蛋白在鸭宿主细胞上的受体为蛋白激酶C抑制蛋白质(Protein kinase C inhibitor, PKCI)^[8]。PKCI是宿主细胞内蛋白激酶C(Protein kinase C, PKC)的抑制蛋白质,PKC是一类由多基因编码,分子量约为80 000的多肽类物质,属于丝氨酸/苏氨酸蛋白质激酶家族,参与细胞内多种功能的信号转导过程,包括增殖、分化和凋亡等。近年来,有学者在研究禽流感病毒^[9-10]、新城疫病毒^[11]和博纳病病毒^[12]等时,发现宿主细胞的蛋白激酶(包括PKC)与病毒的增殖存在一定的关系,即宿主细胞的蛋白质激酶通过调节病毒蛋白质的磷酸化,造成病毒蛋白质分布的差异,进而影响病毒的复制转录过程。实时荧光定量PCR(Real-time fluorescent quantitative PCR, FQ-PCR)技术是目前分析基因转录水平表达差异的重要方法,具有实时性、特异性强、准确性和灵敏度高等优点,广泛应用于生命科学研究和应用的各个领域^[13]。

PKCI既是宿主细胞内PKC的抑制蛋白质,也是DEV在宿主细胞内的受体,本试验建立针对鸭肠炎病者核衣壳蛋白质(DEV-NP)互作蛋白质(PKCI)基因的FQ-PCR检测方法,为进一步明确PKCI在DEV增殖中发挥何种作用及DEV致病机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 毒株和质粒 pMD18-T,购自上海生工生物工程有限公司;E. coli DH5 α ,由贵州省动物疫病与兽医公共卫生重点实验室提供;鸭肠炎病毒GZ株(DEV-GZ),由贵州省动物疫病与兽医公共卫生重点实验室分离鉴定提供;参考毒株:H5亚型、H7亚

型、H9亚型禽流感病毒及新城疫病毒、鸭肝炎病毒,由贵州省动物疫病与兽医公共卫生重点实验室分离鉴定提供。

1.1.2 主要试剂 胰酶,购自HyClone公司;LB培养液,购自Clontech公司;胎牛血清,购自浙江天杭生物科技有限公司;Orient Express Oligo(dT) cDNA Synthesis Kits,购自Novagen公司;DMEM/HIGH-GLUCOSE,购自赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司;TIANprep Mini Plasmid Kit质粒提取试剂盒,购自天根生化科技(北京)有限公司;SYBR Premix Ex Taq试剂(200次)、TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver. 4.0试剂盒等,购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.1.3 主要仪器 PCR自动扩增仪(TC-412),英国制造;倒置生物显微镜(XSZ. D2型),扬州生产;CO₂培养箱(2123TC型),美国SHELDON生产;Sigma高速冷冻离心机(1-15K),德国制造;电泳凝胶图像分析系统(SYGENE),Gene公司生产;数显恒温水浴锅(HH-4)购自江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司;实时荧光定量PCR仪(FQD-48Line-Gene3000)购自杭州博日有限公司。

1.2 方法

1.2.1 宿主细胞PKCI基因的扩增 根据GenBank中登录的PKCI基因序列(登录号AB033884.1),通过引物设计软件Primer Premier 5.0设计引物,F:5'-GCAAGAAGTGTGCTGCTAACC-3', R: 5'-AACT-GACGACCACCCAGAATA-3',预扩增长度为121 bp,送上海生工生物工程有限公司合成。用TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver. 4.0试剂盒提取总RNA,用Orient Express Oligo(dT) cDNA Synthesis Kits试剂盒反转录为cDNA,经PCR扩增,PCR产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.2 标准曲线建立 胶回收PKCI基因PCR产物后克隆于pMD18-T载体中,构建重组质粒pMD18-T-PKCI,以该重组质粒为阳性标准品,紫外分光光度计测定阳性标准品的OD₂₆₀值,根据阳性标准品的分子量与质量浓度,计算其拷贝浓度,调整浓度后10倍稀释至1 μ l 1.0 \times 10²~1.0 \times 10⁹拷贝数为模板,取1 μ l 1.0 \times 10²~1.0 \times 10⁹拷贝数重组质粒进行荧光定量PCR扩增,以重组质粒拷贝数的对数为X轴,循环数(Ct)为Y轴,建立标准曲线。

1.2.3 重复性验证 将pMD18-T-PKCI重组质粒

在同一浓度和反应条件下进行 3 次 FQ-PCR 重复检测,验证该方法的重复性。

1.2.4 特异性验证 分别以 pMD18-T-*PKCI* 重组质粒和 H5 亚型、H7 亚型、H9 亚型禽流感病毒及新城疫病毒、鸭肝炎病毒核酸为模板进行 FQ-PCR 检测,验证该方法的特异性。

1.2.5 敏感性验证 以拷贝浓度为 $1 \mu\text{l}$ $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^9$ 拷贝数的 pMD18-T-*PKCI* 重组质粒为模板进行 FQ-PCR 检测,同时设立阴性对照,验证该方法的敏感性。

2 结果

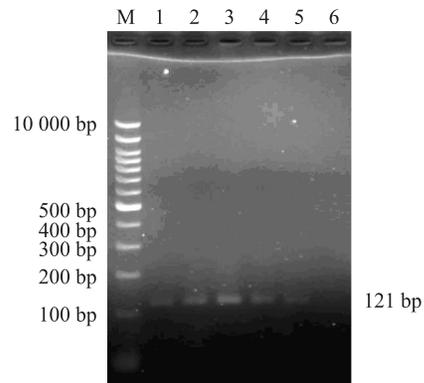
2.1 *PKCI* 基因扩增的结果

PKCI 基因经 PCR 扩增,产物经琼脂糖凝胶电泳检测,出现条带与预期扩增片段大小相符(图 1)。

2.2 标准曲线的建立

以 $1 \mu\text{l}$ $1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^9$ 拷贝数的对数为 X 轴,循环数(*Ct*)为 Y 轴,建立标准曲线,结果(图 2)显示:标准品各稀释度扩增曲线平行,*Ct*值相差均

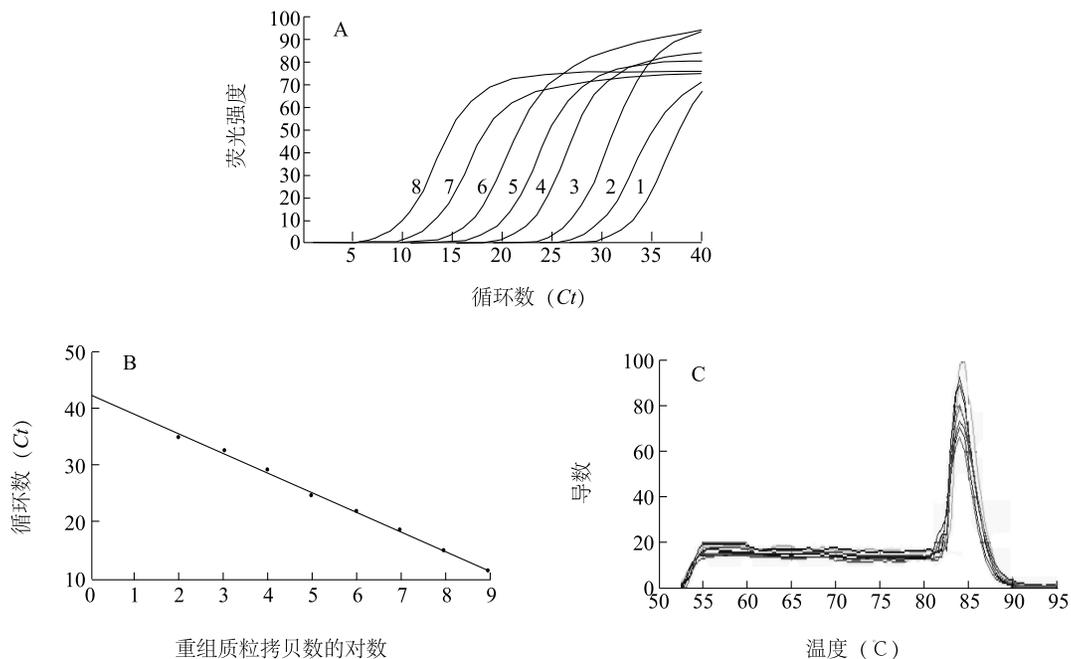
匀,反映不同稀释度的标准品 *Ct* 值与拷贝数呈现良好的线性关系,相关系数(*r*)为 -1.00 ,扩增效率达 100%,起始拷贝数的对数与 *Ct* 值线性关系为 $Y = -3.31x + 42.00$ 。熔解曲线显示,各浓度阳性标准品均在 84.5°C 出现特异性熔解峰,由于引物二聚体影响,在 82.0°C 有较小波峰,但不影响结果准确性。



M:1 000 bp plus ladder;1~5:*PKCI* 基因 PCR 产物;6:阴性对照。

图 1 *PKCI* 基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PCR products of *PKCI* gene



A:荧光扩增曲线,1~8 分别表示 $1 \mu\text{l}$ $1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^9$ 拷贝数标准阳性品浓度;B:标准曲线;C:熔解曲线。

图 2 *PKCI* 标准曲线的建立

Fig.2 The standard curve of *PKCI*

2.3 FQ-PCR 重复性验证

将 pMD18-T-PKCI 重组质粒在同一浓度和条件下进行 3 次 FQ-PCR 重复检测,结果(图 3)显示:3 次重复检测的荧光强度曲线基本吻合,表明本试验建立的 FQ-PCR 方法具有良好的重复性。

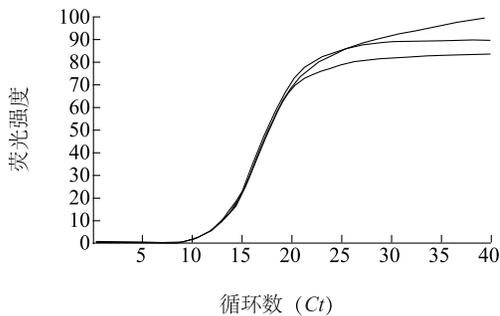


图 3 PKCI FQ-PCR 方法重复性验证

Fig. 3 Repeatability of FQ-PCR for PKCI

2.4 FQ-PCR 特异性验证

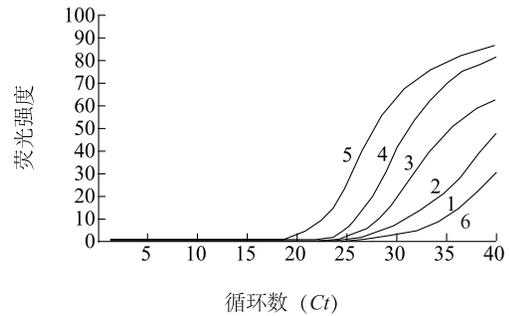
分别检测 pMD18-T-PKCI 重组质粒和提取的不同参考毒株核酸,结果显示:除阳性质粒出现扩增曲线外,其余参考毒株(H5 亚型、H7 亚型和 H9 亚型禽流感病毒及新城疫病毒、鸭肝炎病毒考毒株)均未出现扩增曲线,表明本试验建立的 FQ-PCR 方法具有良好特异性。

2.5 FQ-PCR 敏感性验证

取不同拷贝浓度阳性标准品进行 FQ-PCR 检测,结果(图 4)显示:1 μl $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^5$ 拷贝数阳性标准品均出现特异性荧光扩增,阴性对照无荧光扩增,表明本试验建立的 FQ-PCR 方法具有一定的灵敏度,灵敏度为 1 μl 1.0×10^1 拷贝数。

3 讨论

贵州省动物疫病与兽医公共卫生重点实验室前期通过酵母双杂交系统筛选并鉴定了鸭肠炎病毒核衣壳蛋白质(NP)在鸭宿主细胞上的受体为蛋白质激酶 C 抑制蛋白质(PKCI),并且推测 DEV 的致病机理可能是,DEV 感染鸭后,DEV-NP 与宿主细胞内 PKCI 结合,导致 PKCI 对 PKC 的抑制或阻断作用减弱,从而使 PKC 促进组织细胞代谢、增殖和分化的作用增强,利于 DEV 在宿主细胞上增殖而使宿主细胞发生病变^[8]。本试验建立针对 DEV-NP 互作蛋白质(PKCI)基因的 FQ-PCR 检测方法,以期为后续研



1~5:1 μl $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^5$ 拷贝数阳性标准品浓度;6:阴性对照。

图 4 PKCI FQ-PCR 方法敏感性验证

Fig. 4 Sensitivity of FQ-PCR for PKCI

究奠定基础。

荧光定量 PCR 技术是将 DNA 荧光结合染料或特异性荧光探针加入到 PCR 反应体系中,利用产生的荧光信号强弱来实时监测整个 PCR 过程^[14],该技术用于病原体的检测具有其他方法无可比拟的优势:灵敏度高、特异性好、准确性高、操作简单、自动化程度高、防污染、高通量等^[15]。国内外很多学者应用 FQ-PCR 技术建立了畜禽、水产等动物病毒快速检测方法并取得很好的应用效果^[16-18]。本试验建立检测 DEV-NP 互作蛋白质(PKCI)基因的 FQ-PCR 方法时选择 SYBR Green I 荧光染料加入定量反应体系,SYBR Green I 荧光染料可特异地与双链 DNA 结合,同时荧光信号的强弱与 PCR 产物的多少呈正相关,荧光染料方法较简便,也无需设计探针,从而降低检测成本。但是由于 SYBR Green I 荧光染料可以与双链 DNA 结合,所以可能会与非特异的 DNA 片段结合产生假阳性信号。因此,在优化反应条件时需用熔解曲线分析软件检测是否存在引物二聚体干扰。本试验优化反应条件后,熔解曲线只有单一波峰,说明引物和反应条件良好,无非特异性产物扩增。

荧光定量 PCR 理想的扩增效率为 90% ~ 110%,越接近 100% 扩增效率越理想,本试验建立的荧光定量 PCR 标准曲线的扩增效率为 100%,说明结果较理想,无假阳性;相关系数反映标准曲线的直线性,理想值应大于 0.990,越接近 1 直线性越好,定量越准确,本试验建立的荧光定量 PCR 标准曲线的相关系数为 -1,表明线性较好,定量准确;本试验建立的标准曲线的斜率值为 -3.31,靠近理想

值-3.32。以上结果说明本试验建立的标准曲线达到荧光定量 PCR 标准,可用于后期鸭肠炎病毒核衣壳蛋白质及其互作蛋白质基因转录动态研究。

参考文献:

- [1] 殷 震,刘景华. 动物病毒学 [M]. 2 版. 北京:科学出版社出版,1997.
- [2] BEACH J R. The virus of laryngotracheitis of fowls[J]. Science, 1930,72(1877):633-634.
- [3] 文 明. DEV 基因文库构建、核衣壳蛋白基因的发现及克隆与表达[D]. 雅安:四川农业大学,2005.
- [4] 程安春,汪铭书,文 明,等. 鸭病毒性肠炎病毒基因文库的构建及其核衣壳蛋白基因的发现、克隆与鉴定[J]. 高技术通讯, 2006,16(9):948-953.
- [5] 代淑燕,程振涛,汪德生,等. DEV 核衣壳蛋白二级结构与 B 细胞表位预测[J]. 山地农业生物学报,2008,27(4):335-339.
- [6] 高 颖,代淑燕,张 荷,等. 鸭肠炎病毒核衣壳蛋白密码子偏爱性分析[J]. 山地农业生物学报,2011,30(2):136-140.
- [7] 代淑燕,寨鸿瑞,文 明,等. 鸭肠炎病毒核衣壳蛋白基因的克隆与原核表达[J]. 生物技术,2008,18(4):12-15.
- [8] 张 荷,毛君婷,杨 颖,等. 鸭肠炎病毒核衣壳蛋白受体的筛选与鉴定[J]. 病毒学报,2012,28(1):63-66.
- [9] HE Y, XU K, KEINER B, et al. Influenza A virus replication induces cell cycle arrest G0/G1 phase [J]. Journal of Virology, 2010,84(24):12832-12840.
- [10] DAI X X, ZHANG L S, HONG T. Host cellular signaling induced by influenza virus [J]. Science China (Life Science), 2011, 54(1):68-74.
- [11] 詹 媛,陈鸿军,仇旭升,等. 宿主细胞磷酸激酶在新城疫病毒感染中的作用[J]. 中国动物传染病学报,2011,19(2):1-7.
- [12] SONJA S, PHILIPPE M, CHRISTINE M A P, et al. Protein kinase C dependent phosphorylation of borna disease virus P protein is required for efficient viral spread [J]. Archives of Virology, 2010, 155:789-793.
- [13] KHEIFETS V, MOCHLY-ROSEN D. Insight into intra-and intermolecular interactions of PKC; design of specific modulators of kinase function [J]. Pharmacol Res, 2007, 55(6):467-476.
- [14] 韩俊英,曾瑞萍. 荧光定量 PCR 技术及其应用 [J]. 国外医学, 2000(3):117-120.
- [15] 韦信贤,黎小正,童桂香,等. 实时荧光定量 PCR 技术及其在水生动物病毒病定量检测中的应用 [J]. 水产科学, 2010(29):681-686.
- [16] 黄 萍,肖家勇,欧阳振宇,等. 非洲猪瘟病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. 中国动物检疫, 2010(27):27-30.
- [17] DHAR A, MICHELIE M R, KLIMPEL K. Detection and quantification of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus and white spot virus in shrimp using real-time quantitative PCR and SYBR green chemistry [J]. J Clin Microbiol, 2001, 39:2835-2845.
- [18] 杨 利,曹三杰,文心田,等. 实时荧光定量 PCR 检测胸膜肺炎放线杆菌方法的建立及应用 [J]. 农业生物技术学报, 2010(18):1024-1030.

(责任编辑:袁 伟)