

刘青涛, 李 银, 赵冬敏, 等. 一步法 SYBR Green 实时定量 RT-PCR 检测坦布苏病毒方法的建立[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(4): 829-833.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.04.019

一步法 SYBR Green 实时定量 RT-PCR 检测坦布苏病毒方法的建立

刘青涛, 李 银, 赵冬敏, 刘宇卓, 黄欣梅, 杨 婧, 韩凯凯, 安凤娇

(江苏省农业科学院兽医研究所/农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室/国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏南京 210014)

摘要: 为建立快速检测坦布苏病毒(Tembusu virus, TMUV)的一步法 SYBR Green 实时定量 RT-PCR 方法, 本研究根据 TMUV NS2A 基因的保守序列, 设计并合成了 1 对特异性引物, 以体外转录的 NS2A 基因作为标准品, 采用一步法实时定量 RT-PCR 方法检测 TMUV。结果显示该方法标准曲线的决定系数为 0.997, 具有良好的线性关系; 灵敏度为 $1 \mu\text{l}$ 10 拷贝, 是常规 RT-PCR 方法的 100 倍; 并且与其他病毒无交叉反应, 批内和批间变异系数分别为 0.11% ~ 0.30% 和 0.88% ~ 1.31%, 具有良好的特异性和稳定性。该方法对于 TMUV 人工感染鸭泄殖腔棉拭子的检测阳性率为 100%, 而常规 RT-PCR 检测的阳性率只有 71%。因此, 本研究所建立的一步法实时定量 RT-PCR 方法灵敏度高、重复性、特异性好, 可以用于 TMUV 的临床检测。

关键词: 坦布苏病毒; 实时定量 RT-PCR; NS2A 基因

中图分类号: S855.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)04-0829-05

Development of a one-step SYBR Green-based real-time RT-PCR assay for detection of Tembusu virus

LIU Qing-tao, LI Yin, ZHAO Dong-min, LIU Yu-zhuo, HUANG Xin-mei, YANG Jing, HAN Kai-kai, AN Feng-jiao

(Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Animal Disease Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture/National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China)

Abstract: A one-step SYBR Green-based real-time RT-PCR assay was established for detection of the Tembusu virus (TMUV) that recently has caused infectious disease in ducks in China, by using NS2A gene-specific primers and *in vitro* transcribed viral RNA. The results showed that the *Ct* value was strongly correlated ($R^2=0.997$) with the logarithm of the transcribed viral RNA concentration, suggestive of a good linear relationship. The RT-PCR assay established was specific to TMUV, with no cross-reaction with other viruses. The inter- and intra-assay coefficients of variation ranged from 0.11% to 0.30% and 0.88% to 1.31%, respectively, indicative of good repeatability. The assay was 100 time more sensitive than the conventional RT-PCR, with a RNA detection-limit of 10 copies. All the cloacal swabs from TMUV infected ducks were detected

TMUV positive by this real-time RT-PCR assay while the figure was only 71% by conventional RT-PCR. Therefore, the one-step SYBR Green-based real-time RT-PCR assay developed here provides a rapid means and effective way identify TMUV infection in ducks.

Key words: Tembusu virus; real-time RT-PCR; NS2A gene

收稿日期: 2014-12-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(31172345); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(14)2091]

作者简介: 刘青涛(1981-), 男, 山东滨州人, 博士, 助理研究员, 主要从事分子病毒学与免疫学研究。(Tel)025-84390047; (E-mail)taoqingliu2013@163.com

通讯作者: 李 银, (Tel)025-84391687; (Email)muziyin08@163.com

坦布苏病毒 (Tembusu Virus, TMUV) 为单股正链 RNA 病毒, 属于黄病毒科 (Flaviviridae), 黄病毒属 (*Flavivirus*), 恩塔亚病毒群 (Ntaya virus group), 该病毒于 1955 年首次分离于马来西亚吉隆坡地区的库蚊, 随后又在马来西亚其他地区和泰国的库蚊中分离到^[1-3]。2000 年, 在马来西亚霹雳州实兆远地区的患病肉鸡中分离到 TMUV, 这是首次发现 TMUV 对家禽的致病性^[4]。2010 年春季, 在中国东部省份主要养鸭地区的鸭群中暴发了由 TMUV 引起的疫情, 主要表现为种鸭、蛋鸭采食量和产蛋率迅速下降, 肉鸭拉稀, 出现神经症状和死亡, 此次疫情一直持续到 2010 年冬季^[5-7]。2011 年 10 月, 在江苏、山东、河南等地再次出现鸭坦布苏病毒病的流行, 一直持续到 2012 年 3 月。2012 年 9 月, 江苏、山东等地再次发生鸭坦布苏病毒病^[8]。目前坦布苏病毒病作为鸭的一种常见病, 给中国养鸭业造成了巨大经济损失。据不完全统计, 鸭坦布苏病毒病仅 2010 年造成的经济损失就达数十亿元。此外, TMUV 还可以引起鸡和鹅的感染和发病^[9-10], 并且在人的血清中也检测到 TMUV 的核酸和抗体^[11], 不排除 TMUV 有人畜共患的风险。

实时定量 PCR 是近年来发展起来的一种新型诊断技术, 在各种疾病特别是传染性疾病的快速诊断中发挥了重要作用。常规 PCR 通过 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳判定结果, 而实时定量 PCR 是通过添加的荧光染料或荧光标记探针在 PCR 过程中实时收集检测信号, 根据机器收集的荧光信号强度进行结果的判定, 减少了试验污染和环境污染。因此, 与常规 PCR 相比, 实时定量 PCR 的敏感性更高, 检测速度更快, 并且更环保。国内学者根据 TMUV 基因的不同区域建立了多种用于 TMUV 检测的实时定量 RT-PCR, 于春梅等建立了基于 TMUV NS5、E 基因的 SYBR Green I 实时定量 RT-PCR 方法^[12], 万春和等根据 TMUV 的 NS5 基因设计引物建立了 SYBR Green I 实时定量 RT-PCR 方法^[13], 彭珊和靳宇田等分别根据 TMUV 的 E 基因和 PrM 基因设计引物和探针建立了 TaqMan 实时定量 RT-PCR 方法^[14-15], 以上方法均具有很好的特异性和敏感性, 为鸭坦布苏病毒病的临床病原学诊断提供了检测手段。但是, 以上实时定量 RT-PCR 均采用两步法, 即在提取样品的 RNA 后首先进行反转录, 然后再以转录产物为模板进行实时定量 PCR 方法测定, 操作比

较繁琐, 增加了试验过程中的操作误差和样品被污染的几率。而本研究针对 TMUV 基因的保守区域设计了 1 对特异性引物, 利用体外转录的 TMUV 病毒的 NS2A 基因作为标准品制作标准曲线, 建立了 TMUV 的一步法 SYBR Green 实时定量 RT-PCR 检测方法。与两步法相比, 本方法操作简单, 检测快速, 减少了试验过程中的操作误差和样品被污染的几率, 为 TMUV 的快速诊断和流行病学研究提供有效的技术手段。

1 材料与方法

1.1 试验材料

坦布苏病毒 (TMUV)、新城疫病毒 (NDV)、H9N2 禽流感病毒 (H9N2 AIV)、鸭肝炎病毒 (DHV)、鸭瘟病毒 (DPV)、小鹅瘟病毒 (GPV)、减蛋综合征病毒 (EDSV)、猪瘟病毒 (CSFV) 均由江苏省农业科学院兽医研究所分离并保存。1 日龄樱桃谷鸭购自南京市六合区, 养至 21 日龄用于攻毒。

1.2 仪器和试剂

RNA/DNA 和质粒提取试剂盒购自康宁公司, T7 体外转录试剂盒购自百奥迈科生物技术有限公司, 反转录试剂盒、One Step RT-PCR Kit 购自宝生物工程 (大连) 有限公司, ABI 7500 Real-Time PCR System 购自美国 Applied Biosystems 公司。

1.3 引物设计与合成

根据本实验室分离的病毒株以及 GenBank 登录的 TMUV 全基因核苷酸序列, 采用 DNASTar 软件进行同源性分析, 选出高度保守并且特异的核苷酸区域, 用 Primer Ex-press 2.0 软件设计 1 对检测引物, 其序列为 D1: 5'-GCAGCCCAGGAGATTTTGAG-3' 和 D2: 5'-CTAACGCAACGCCAAGCA-3', 扩增片段大小为 280 bp。另外, 设计 1 对克隆引物将 NS2A 基因连接到 pcDNA3.1(+) 载体中, 其序列为 C1: 5'-GGTCGGATCCTTTCAAGGGG-3' 和 C2: 5'-CTG-GTCTAGATCTCCGTGTCACCTGG-3'。

1.4 病毒核酸的提取

按照试剂盒说明进行病毒核酸的提取, 以提取的核酸为模板直接进行一步法 SYBR Green 实时定量 RT-PCR 检测。

1.5 标准品的制备

将提取的 TMUV 核酸按照试剂盒说明进行反转录, 以转录产物为模板用引物 C1 和 C2 PCR 扩增

TMUV 的 NS2A 基因,然后将扩增基因片断用 *Bam*H I 和 *Xba* I 进行双酶切,连接到 pcDNA3.1(+) 载体中,经测序正确后用于体外转录,并命名为 pcDNA-NS2A。

将质粒 pcDNA-NS2A 经 *Xba* I 单酶切进行线性化,然后按照试剂盒的说明进行体外转录,将体外转录产物用 RNA 提取试剂盒纯化后,进行浓度测定、拷贝数计算、稀释、分装, -70 ℃ 保存备用。

1.6 敏感性试验和标准曲线的建立

将体外转录制备的标准品进行 10 倍系列稀释 ($1 \mu\text{l } 1 \times 10^0 \sim 1 \times 10^7$ 拷贝) 作为模板进行实时定量 RT-PCR 扩增,以检测出的最低拷贝数作为该方法的灵敏度,并与常规 RT-PCR 检测方法进行比较,同时根据测定结果绘制标准曲线。实时定量 RT-PCR 的扩增体系为: $2 \times \text{Buffer } 10 \mu\text{l}$, 酶 $0.8 \mu\text{l}$, 引物 D1 ($10 \mu\text{mol/L}$) $0.8 \mu\text{l}$, 引物 D2 ($10 \mu\text{mol/L}$) $0.8 \mu\text{l}$, ROX Reference Dye II $0.4 \mu\text{l}$, RNA $1 \mu\text{l}$, H_2O $6.2 \mu\text{l}$ 。扩增程序为: $42^\circ\text{C } 5 \text{ min}$, $95^\circ\text{C } 10 \text{ s}$; $95^\circ\text{C } 15 \text{ s}$, $60^\circ\text{C } 34 \text{ s}$, 40 个循环,以 3 ~ 15 个循环数的荧光值作为基底值。

1.7 特异性试验

用建立的一步法 SYBR Green 实时定量 RT-PCR 方法分别对 NDV、H9N2 AIV、DHV、DPV、GPV、EDSV、CSFV 进行检测,以 TMUV 为阳性对照,以灭菌超纯水为阴性对照,评价所建立方法的特异性。

1.8 重复性试验

用建立的一步法 SYBR Green 实时定量 RT-PCR 方法对不同拷贝数的标准品进行 3 次定量测定,对结果进行统计分析,计算批内及批间的变异系数,验证所建立方法的重复性。

1.9 对 TMUV 攻毒样品的检测

取 TMUV 0.2 ml [病毒含量为 $0.1 \text{ ml } 1 \times 10^{5.7}$ (鸡胚半致死量)] 肌肉注射 3 只 21 日龄樱桃谷鸭,每只 10^6 [鸡胚半致死量 (ELD_{50})], 攻毒后 1 d、3 d、5 d、7 d、10 d、15 d、21 d 每天采集攻毒鸭的泄殖腔拭子,反复冻融 3 次后提取 RNA,分别用一步法 SYBR Green 实时定量 RT-PCR 方法和常规 PCR 方法进行检测,同时设不攻毒的鸭为对照,比较 2 种方法的检出率。

2 结果

2.1 敏感性试验及标准曲线的建立

标准品 ($1 \mu\text{l } 1 \times 10^0 \sim 1 \times 10^7$ 拷贝) 的检测结果

显示,建立的一步法 SYBR Green 实时定量 RT-PCR 的检测底限为 $1 \mu\text{l } 10$ 拷贝 (图 1), 而常规 RT-PCR 的检测底限为 $1 \mu\text{l } 1 \times 10^3$ 拷贝 (图 2)。根据标准品拷贝数与 C_t 值进行标准曲线 (图 3) 绘制,标准曲线的决定系数为 0.997, 扩增效率 (Eff) 为 99.441%, 说明所建立的标准曲线具有良好的线性关系和扩增效率。此外,由熔解曲线 (图 4) 可见,各扩增样品均为单一峰,无非特异性产物。以上结果说明,所建立的方法可以对大于等于 $1 \mu\text{l } 10$ 拷贝的样品进行精确定量。

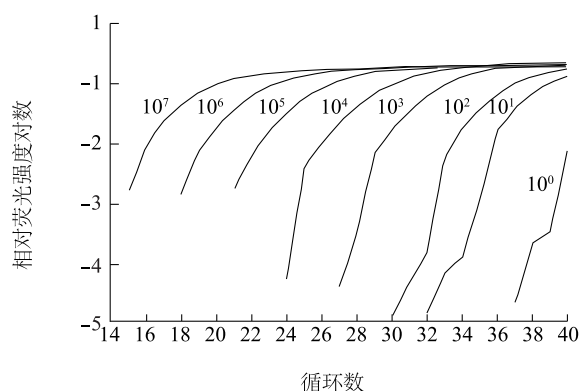
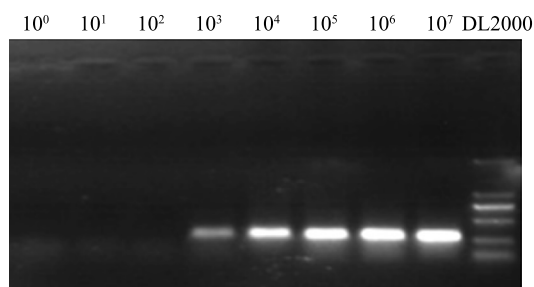


图 1 扩增曲线

Fig.1 Amplification plot



DL2000: Marker; 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 为模板稀释浓度。

图 2 常规 PCR 敏感性试验

Fig.2 Sensitivity of the conventional RT-PCR

2.2 特异性试验结果

一步法 SYBR Green 实时定量 RT-PCR 方法对 NDV、H9N2 AIV、DHV、DPV、GPV、EDSV、CSFV 和灭菌超纯水的检测结果均为阴性,而对 TMUV 的检测结果为阳性 (图 5), 这说明所建立的方法具有良好的特异性。

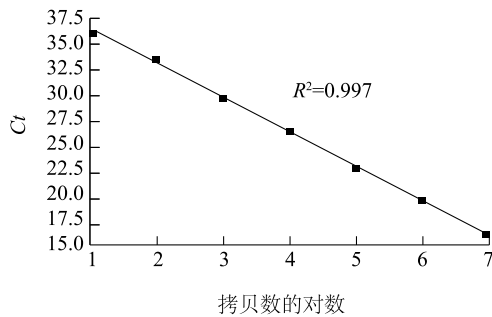


图3 标准曲线

Fig.3 Standard curve

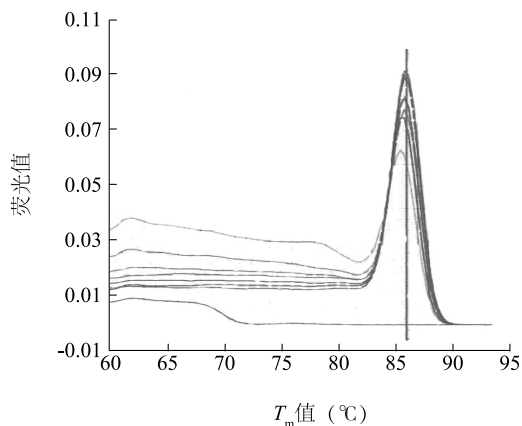
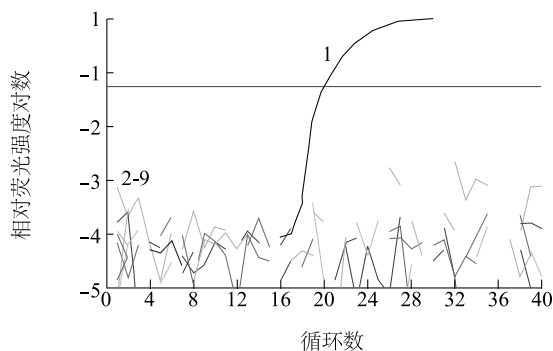


图4 溶解曲线

Fig.4 Melt curve



1: TMUV; 2: NDV; 3: H9N2 AIV; 4: DHV; 5: DPV; 6: GPV; 7: EDSV; 8: CSFV; 9: 阴性对照。

图5 特异性试验

Fig.5 Specificity test

2.3 重复性试验结果

由表 1 可知,各样品的批内变异系数为 0.11% ~ 0.30%,批间变异系数为 0.88% ~

1.31%,说明所建立的方法重复性良好。

表 1 重复性试验结果

Table 1 Reproducibility test

样品号	批内		批间	
	Ct 平均值±标准差	变异系数 (%)	Ct 平均值±标准差	变异系数 (%)
1	35.97±0.04	0.11	36.37±0.32	0.88
2	29.98±0.07	0.23	30.39±0.31	1.02
3	16.56±0.05	0.30	16.76±0.22	1.31

2.4 对 TMUV 攻毒样品的检测

由 TMUV 攻毒鸭泄殖腔拭子的检测结果(表 2)显示,常规 RT-PCR 在攻毒后 1 d,只从 1 只鸭的拭子中检测到 TMUV,21 d 时已检测不出 TMUV;而一步法 SYBR Green 实时定量 RT-PCR 在攻毒后 1 d 到 21 d 在所有攻毒鸭的泄殖腔拭子中均检测到了 TMUV,其阳性检出率为 100%,而常规 RT-PCR 的阳性检出率为 71%。以上结果进一步说明本研究建立的 TMUV 检测方法的敏感性远远高于常规 RT-PCR 检测方法。此外,2 种方法对对照鸭的检测结果均为阴性。

3 讨论

由于集约化养殖模式的发展,鸭的养殖密度越来越大,发病情况也越来越复杂,往往是几种病原(包括新出现的病原)共同感染或者继发感染发病,给疾病的诊断和处置造成了困难。2010 年以来,鸭坦布苏病毒病在中国已经发生了 3 次较大规模的流行,目前该病在中国已成为鸭的一种常见病^[5-8]。鸭坦布苏病毒病作为一种新发疫病,因临床症状不特异而难以诊断,因此迫切需要建立一种快速、准确的病原检测方法来对该病进行实验室诊断。

本研究以 TMUV 基因的保守区为靶点设计 1 对特异引物,建立了一步法 SYBR Green 实时定量 RT-PCR 检测方法,并且对该方法的扩增曲线、标准曲线、溶解曲线、敏感性、特异性和重复性进行了分析和验证。结果表明,所建立的实时定量 RT-PCR 方法标准曲线的线性关系良好;对 TMUV 的最低检测量达到 1 μl 10 拷贝,灵敏度是常规 RT-PCR 检测方法的 100 倍;溶解曲线呈单一峰,并且只能检测出 TMUV,与其他病原无交叉反应,具有良好的特异性;批内和批间变异系数较小,具有良好的重复性。

利用建立的荧光定量 RT-PCR 方法和常规 RT-PCR 方法对不攻毒对照鸭和 TMUV 感染鸭的泄殖腔棉拭子进行了检测,结果表明 2 种方法对于对照鸭的检测结果均为阴性;而对于攻毒鸭一步法 SYBR Green 实时定量 RT-PCR 法检测出 TMUV 的阳性率

为 100%,比常规 RT-PCR 方法高出 29 个百分点。因此,与常规 RT-PCR 方法相比,我们建立的一步法 SYBR Green 实时定量 RT-PCR 方法检测速度更快、更敏感,更适合于临床样品的检测。

表 2 TMUV 攻毒鸭泄殖腔棉拭子测定结果

Table 2 Detection of TMUV in cloacal swabs from TMUV infected ducks

方法	攻毒后各天鸭泄殖腔棉拭子的 TMUV 检出率							样品总数	阳性数	阳性率 (%)
	1 d	3 d	5 d	7 d	10 d	15 d	21 d			
荧光定量 RT-PCR	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	21	21	100
常规 RT-PCR	1/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	0/3	21	15	71

本研究建立的一步法 SYBR Green 实时定量 RT-PCR 方法为坦布苏病毒病的实验室诊断提供了一种快速有效的方法,也为开展坦布苏病毒病的流行病学调查提供了技术手段。

参考文献:

- [1] PLATT G S, WAY H J, BOWEN E T, et al. Arbovirus infections in Sarawak, October 1968-February 1970 Tembusu and Sindbis virus isolations from mosquitoes [J]. Ann Trop Med Parasitol, 1975, 69(1): 65-71.
- [2] 张敬峰,李 银,赵冬敏,等. 鸭源坦布苏病毒株 NJX-4 的分离鉴定及部分生物学特性[J]. 江苏农业科学,2013,41(11): 228-229,297.
- [3] 韩凯凯,李 银,黄欣梅,等. 鹅新型坦布苏病毒囊膜蛋白的二级结构与 B 细胞表位预测[J]. 江苏农业科学,2014,42(6): 166-169.
- [4] KONO Y, TSUKAMOTO K, ABD HAMID M, et al. Encephalitis and retarded growth of chicks caused by Sitiawan virus, a new isolate belonging to the genus Flavivirus [J]. Am J Trop Med Hyg, 2000, 63:94-101.
- [5] 曹贞贞,张 存,黄 瑜,等. 鸭出血性卵巢炎的初步研究[J]. 中国兽医杂志, 2010(12): 3-6.
- [6] LIU P P, LU H, LI S, et al. Genomic and antigenic characterization of the newly emerging Chinese duck egg-drop syndrome flavivirus: genomic comparison with Tembusu and Sitiawan viruses [J]. J Gen Virol, 2012, 93:2158-2170.
- [7] 胡旭东,路 浩,刘培培,等. 我国发现的一种引起鸭产蛋下降综合征的新型黄病毒 [J]. 中国兽医杂志, 2011, 47(7): 43-47.
- [8] 刘志刚,孙青松,姚 蓉,等. 鸭坦布苏病毒研究进展 [J]. 中国动物传染病学报, 2013, 21(1):81-86.
- [9] 黄欣梅,李 银,赵冬敏,等. 新型鹅黄病毒 JS804 毒株的分离与鉴定[J]. 江苏农业学报, 2010, 27(2): 354-360.
- [10] LIU M, CHEN S, CHEN Y, et al. Adapted tembusu-like virus in chickens and geese in China [J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(8):2807-2809.
- [11] TANG Y, GAO X, DAO Y, et al. Tembusu virus in Human, China [J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2013, 60: 193-196.
- [12] 于春梅,刁有祥,唐 熠,等. 坦布苏病毒荧光定量 RT-PCR 方法的建立 [J]. 中国农业科学, 2012, 45(21): 4492-4500.
- [13] 万春和,朱海侠,施少华,等. 鸭坦布苏病毒 SYBR Green I 实时荧光定量检测方法的建立 [J]. 中国兽医学报, 2013, 33(7): 973-978.
- [14] 彭 珊,闫丽萍,李国新,等. 鸭坦布苏病毒 TaqMan 荧光定量 PCR 方法的优化 [J]. 中国预防兽医学报, 2013, 35(4): 294-298.
- [15] 靳宇田,黄显明,许秀梅,等. 鸭坦布苏病毒实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及应用 [J]. 中国动物传染病学报, 2013, 21(4): 46-50.

(责任编辑:陈海霞)