

曹军平, 王晓泉, 程 汉, 等. 基于 NP 基因的新城疫病毒 Class I 实时荧光定量 RT-PCR 方法的建立及验证[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(6): 1389-1394.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2015.06.030

基于 NP 基因的新城疫病毒 Class I 实时荧光定量 RT-PCR 方法的建立及验证

曹军平^{1,2}, 王晓泉¹, 程 汉², 刘晓文¹, 刘秀梵¹

(1. 扬州大学兽医学院, 江苏 扬州 225009; 2. 江苏农牧科技职业学院, 江苏 泰州 225300)

摘要: 新城疫病毒是影响养禽业健康发展的主要病原之一。新城疫病毒只有 1 个血清型, 但根据亲源关系可以划分为 Class I 和 Class II 两大类。为快速定量检测 Class I 新城疫病毒, 根据其 NP 基因的保守序列, 设计合成 1 对引物和 TaqMan 探针, 以 Class I 新城疫病毒 JS-18-05 株 NP 基因阳性重组质粒为标准品模板, 建立荧光定量 PCR 标准曲线, 首次建立了一种敏感、特异、重复性好的快速检测新城疫病毒 Class I 核酸载量的 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 方法。该方法在 $10^2 \sim 10^8$ 拷贝范围内具有良好的线性关系, 可检测到初始模板中 $1 \mu\text{l}$ 10 拷贝的病毒核酸, 与传统的病毒分离方法具有相近的敏感性, 且这两种方法对 33 株 Class I、Class II 新城疫病毒分离株尿囊液样品检测结果符合率为 100%。

关键词: 新城疫病毒 Class I; 核衣壳蛋白基因; 荧光定量 RT-PCR

中图分类号: S858.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)06-1389-06

Development and validation of a real-time fluorescent quantitative RT-PCR based on NP gene of Newcastle disease virus (NDV) Class I

CAO Jun-ping^{1,2}, WANG Xiao-quan¹, CHENG Han², LIU Xiao-wen¹, LIU Xiu-fan¹

(1. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China)

Abstract: Newcastle disease (ND) is one of the most serious poultry diseases. Phylogenetic analysis has revealed Newcastle disease virus (NDV) strains include two distinct classes (Class I and Class II) within a single serotype. To develop a quick method to detect NDV Class I, a pair of primers and a TaqMan probe were designed and synthesized according to NP gene conservative sequence of Newcastle disease virus Class I. The positive recombinant plasmid cloned with NP gene of JS-18-05 strain isolated from duck was used as a positive quantitative template to establish a standard curve. Then a real-time fluorescent quantitative RT-PCR assay was established. The method had a good linear relationship within the concentration of 10^2 to 10^8 copies of NDV, with which $1 \mu\text{l}$ 10 copy of the virus nucleic acid could be detected in the initial template. Compared with traditional methods, the assay established in this study show the same results in detecting 33 NDV isolates.

The method had a good linear relationship within the concentration of 10^2 to 10^8 copies of NDV, with which $1 \mu\text{l}$ 10 copy of the virus nucleic acid could be detected in the initial template. Compared with traditional methods, the assay established in this study show the same results in detecting 33 NDV isolates.

Key words: Newcastle disease virus class I; NP gene; fluorescent quantitative RT-PCR

收稿日期: 2015-03-25

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (30630048); 国家科技支撑计划项目 (2006BAD06A03)

作者简介: 曹军平 (1970-), 男, 湖北阳新人, 博士, 教授, 主要从事分子病毒学及生物技术研究。(E-mail) cccc62@163.com

通讯作者: 刘秀梵, (E-mail) xfliu@yzu.edu.cn

新城疫(Newcastle disease, ND)是唯一分布于五大洲的 OIE A 类传染病。中国 ND 疫情十分严重,是养鸡业发展最直接的威胁^[1],已给家禽生产造成严重损失^[2]。

新城疫病毒(NDV)是新城疫的病原,属禽副粘病毒 1 型(AMPV-1),有囊膜,基因组为单股负链 RNA,大小约 15 kb,编码 6 种蛋白质,包括 RNA 聚合酶(L)、血凝素-神经氨酸酶蛋白质(HN)、融合蛋白质(F)、基质蛋白质(M)、磷蛋白质(P)和核蛋白质(N)。新城疫病毒分离株根据对鸡致病严重程度可分为 3 个主要致病型(毒力型)^[2]:Lentogenic 株是低致病力型,可造成鸡轻微呼吸道或肠道感染;Mesogenic 株是中等致病力型,主要引起呼吸系统疾病;Velogenic 株是高致病力型,造成高死亡率,基于病理表现被进一步分为嗜神经或嗜内脏型。高毒力型 NDV 属于必须报告的 OIE A 类传染病,它的发生可导致检疫和贸易禁运。

NDV 只有 1 个血清型,但根据亲缘关系可以划分为两大类:Class I、Class II,绝大多数常见的都是 Class II,可分成 I~X 10 个基因型。Class I 于 2006 年被证实存在,当前可被细分为 9 个基因型(1~9)。Class I 所有自然分离株均为无毒株或弱毒株,但有经人工传代返强的报道,由于其分布广泛,数量庞大,对养禽业有巨大的潜在威胁^[3]。为了更好地了解 Class I 新城疫毒株的生物学特性,为研究 Class I 提供参考,建立一种快速特异的检测方法很有必要。

目前,用鸡胚进行病毒分离,然后用新城疫特异性抗体做血凝抑制试验代表病毒检测的参考标准^[4]。虽然病毒分离是一个敏感和特异性的方法,但由于 NDV 毒力差异大,低毒和无毒株普遍存在,加之弱毒疫苗的普遍使用,对分离毒株血凝抑制试验结果必须结合毒力鉴定才能确诊,一般需要数天才能完成^[1]。更快速毒力分型方法基于逆转录聚合酶链(RT-PCR)反应后进行琼脂糖凝胶电泳,RT-PCR 产物测序,限制性内切酶分析扩增产物以及使用荧光探针^[2]。实时荧光逆转录聚合酶链反应(RRT-PCR)技术,灵敏度高,特异性好,避免了传统 RT-PCR 检测后处理步骤,节省了试验时间和材料^[2,4,6]。本研究拟建立针对禽新城疫病毒 Class I 核衣壳蛋白(NP)基因的 RRT-

PCR 检测方法,为快速定量检测 Class I 新城疫病毒及进一步明确该病毒对禽的致病作用和致病机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 病毒

鸡新城疫病毒(NDV)由扬州大学农业部畜禽传染病重点开放实验室(BSL-3)分离鉴定和保存(表 1)。所有 NDVs 分别以磷酸盐缓冲液(PH 7.2)10⁻⁵倍稀释接种于 9~10 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔,接种后 24 h 内死亡鸡胚舍弃,及时收集 24~120 h 死亡鸡胚尿囊液,-70℃保存备用。禽流感病毒(AIV)、鸡传染性支气管炎病毒(IBV)、鸡传染性法氏囊炎病毒(IBDV)、鸡传染性喉气管炎病毒(ILTV)、鸡痘病毒(FPV)等常见禽病病毒均由扬州大学兽医学院保存。

1.2 主要试剂和仪器

TaqMan Universal PCR Master Mix Kit 为美国 ABI 公司产品;7300 型实时定量 PCR 扩增仪为美国 ABI 公司生产。

1.3 引物及探针的设计与合成

根据 GenBank 上 5 株 Class I NDV NP 基因序列,结合扬州大学农业部畜禽传染病重点开放实验室分离鉴定测序的 8 株 Class I NDV NP 基因序列,GenBank 登录号见表 1,选取保守区(靠近 5'端)设计引物。采用 LASERGENE 软件包(DNASTAR Inc., Madison, WI, USA)和 Primer Premier 5.0 软件设计和分析引物,合成 NDV 的 1 对特异引物及相应的探针,并在 NCBI 上进行了 BLAST 比对验证。扩增片段位于 NDV Class I 国际标准分离株 DE-R49-99 NP 基因的 800~1 086 bp,长度为 287 bp,探针位于 NP 基因 970~990 bp。上游引物:5'-CCTCAACT-TATTACAACCTC-3' (800~819 bp);下游引物:5'-TACAGATGCCATACCCATTGC-3' (1 066~1 086 bp);TaqMan 探针:5'-CGGATGAAAGGGGAGAAT-GCC-3' (970~990 bp)。5'端标记的荧光报告基团是 JOE, 3'端标记的荧光猝灭基团为 TAMRA,探针命名为:CNPIP。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,探针由大连宝生物工程有限公司合成。

1.4 标准品模板的制备

1.4.1 NP 基因阳性质粒构建 NP 基因保守区

764 bp(JS-18-05 株^[7]) 阳性重组质粒由曹军平构建鉴定并保存,载体为 PCR2.1 (Invitrogen, USA)。常规法提取质粒纯化后送上海生工生物工程技术有限公司进行序列测定,以确定没有变异。

1.4.2 标准品模板的稀释 用紫外分光光度计分别测定阳性重组质粒在 260 nm 和 280 nm 处的吸光度,并根据公式计算重组质粒的 DNA 浓度与纯度。将重组质粒进行 10 倍梯度稀释,以 1 μ l 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 拷贝作为标准品模板,用于荧光定量 PCR 反应条件的优化、标准曲线的建立。

$1 \text{ ml 分子拷贝数 (个)} = \text{DNA 质量浓度} / \text{DNA 分子量}$

$\text{DNA 分子量} = \text{DNA 碱基数} \times 324.5$

$\text{DNA 质量浓度} = 260 \text{ nm 吸光度} \times 50 \times \text{稀释倍数} \times 6.02 \times 10^{23}$

1.5 荧光定量 PCR 反应标准曲线的建立

用引物扩增 NP 基因阳性质粒,分别以 10 倍拷贝系列稀释的重组质粒为标准品模板,加入探针,采用实时荧光定量 PCR 试剂盒 (ABI 公司) 进行反应,反应总体积为 25 μ l。在实时荧光定量 PCR 仪中检测荧光信号,分别对引物和探针浓度、循环参数、样本用量等进行优化。利用随机软件进行分析,建立标准曲线。

特异性试验:以 AIV、EDS₇₆、IBDV、IBV、ILTV、FPV 等常见其他禽病病毒及 NDV Class II 核酸 (表 1) 和健康鸡组织 RNA、水为模板,进行荧光定量 PCR。

灵敏度试验:将阳性重组质粒进行 10 倍梯度稀释,以 1 μ l 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 拷贝作为标准品模板,用于荧光定量 PCR 反应条件的优化、标准曲线的建立并计算灵敏度。

重复性试验:批内重复性试验,即分别取等量的 3 份不同滴度 (1 μ l 10^2 拷贝、 10^4 拷贝、 10^6 拷贝) 的重组质粒进行荧光定量 PCR 检测,每份样品做 5 个重复;批间重复性试验:取以上 3 份样品,在同一反应条件下进行 5 次独立的荧光定量 PCR 检测。

1.6 验证试验

用表 1 毒株接种 SPF 鸡胚,收集尿囊液进行血凝试验 (Hemagglutination test, HA) 和 NDV 血凝

抑制试验 (Hemagglutination inhibition test, HI),同时用样品做 RRT-PCR 试验,计算 2 种方法的符合率。

2 结果

2.1 荧光定量 PCR 反应条件的优化

通过多个批次的重复试验,证明在 25 μ l 体系中,探针浓度为 0.5 μ mol/L、引物浓度为 0.5 μ mol/L、模板量 3 μ l,退火温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 时,本底反应最小、 C_t 值最小、扩增效率最高。将 25 μ l 体系小心放入 RRT-PCR 仪中,记录样本摆放顺序,在 96 孔板内填写被检样品、阳性对照、阴性对照、定量标准品孔,设置反应程序。95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min,然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 43 个循环。荧光信号的收集及数据的采集定在 60 $^{\circ}\text{C}$ 。将以 10 倍拷贝系列稀释的重组 NP 基因阳性质粒为标准品模板,加入体系中。检测结束,根据噪音情况设定和调整基线及阈值,并利用随机软件进行分析,建立标准曲线。根据荧光曲线和循环数 (C_t) 判断结果。

2.2 标准曲线的建立

按上述优化的反应条件,取 1 μ l 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 拷贝浓度的重组质粒作为标准品模板,分别加入 RRT-PCR 反应体系中进行扩增,系统自动分析软件显示 C_t 值与标准品浓度的对数之间存在良好的线性关系 (图 1、图 2)。

2.3 特异性试验

以 AIV、EDS₇₆、IBDV、IBV、ILTV、FPV 等常见其他禽病病毒及 NDV Class II 核酸 (表 1) 和健康鸡组织 RNA、水为模板,进行荧光定量 PCR,没有发现有效扩增。NDV Class I 光信号明显。

2.4 灵敏度试验

从图 1 可见,当 1 μ l 标准质粒浓度 ≥ 1.0 拷贝数时仍可出现典型扩增曲线。从图 2 可见,在较广的范围内 (1 μ l $1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^8$ 拷贝数), C_t 值与质粒拷贝数的对数之间呈现很好的线性关系,决定系数 $R^2 = 0.99$ 。将其检测限的 C_t 值通过标准曲线换算成初始模板拷贝数约为 1 μ l 1 拷贝,相当于 1 个 NDV 颗粒。

2.5 重复性试验

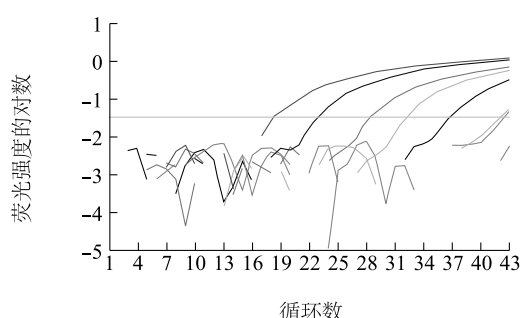
批内重复性试验:分别取等量的 3 份不同滴度 (1 μ l 10^2 拷贝、 10^4 拷贝、 10^6 拷贝) 的重组质粒进行荧光定量 PCR 检测,每份样品做 5 个重复;批间重

表 1 NDV 标准参考分离株及其他禽病病毒株

Table 1 NDV standard reference isolates and other avian viruses isolates

分离株	宿主	毒力	GenBank 登录号	基因型	特异性	
					RRT-PCR	病毒分离
ZJ1	鹅	V	AF431744	VII	-	+
GM	鸡	V	DQ486859	VII	-	+
I4	鹅	V	--	VII	-	+
GX/2/05/Ch	鸡	V	EU044790	VII	-	+
JS/7/05/Ch	鸡	V	FJ430159	III	-	+
JS/8/05/Ch	鸡	V	EU044801	VII	-	+
JS-2-05	鹅	V	DQ469831	VII	-	+
JS-3-05	鸡	V	DQ469832	VII	-	+
JS/10/05/Ch	鸡	V	EU044803	VII	-	+
JS/6/05/Go	鹅	V	EU044799	VII	-	+
JS/9/05/Go	鹅	V	FJ430160	III	-	+
JS-13-07	鸡	V	--	II	-	+
JS-14-07	鸡	V	--	VIIa	-	+
HN-1-07	鸡	V	--	VIII	-	+
QH1	鸡	V	AY260111	VIII	-	+
QH4	鸡	V	AY260112	VIII	-	+
E-2	鸽子	V	--	VIb	-	+
JS-7-07	鸽子	V	--	VI	-	+
Northern	鸡	V	--	V	-	+
F48E8	鸡	V	AY636144	IX	-	+
Mukteswar	鸡	M	AF224505	I	-	+
LaSota	鸡	L	AY845400	II	-	+
V4	鸡	L	AF542823	I	-	+
JS-8-06	鸭	L	EF211814	II	-	+
F7	鸭	L	--	I	-	+
B-Z110	鸭	L	--	Class I	+	+
F74	鸭	L	--	Class I	+	+
JS-16-05	鸭	L	FJ597584	Class I	+	+
JS-10-06	鸭	L	--	Class I	+	+
JS-13-06	鸭	L	--	Class I	+	+
Z81	鸭	L	--	Class I	+	+
JS-1-07	鹅	L	FJ597582	Class I	+	+
JS-18-05	鸭	L	FJ597589	Class I	+	+
AIV	鸡	--	--	--	-	-
IBDV	鸡	--	--	--	-	-
IBV	鸡	--	--	--	-	-
EDS ₇₆	鸡	--	--	--	-	-
ILTV	鸡	--	--	--	-	-
FPV	鸡	--	--	--	-	-

L:弱毒;M:中等毒力;V:强毒;--:未发表。 -和+分别代表阴性、阳性。



从左至右依次为稀释度 $10^2 \sim 10^8$ NP 基因克隆阳性质粒的扩增曲线。

图1 荧光定量 RT-PCR 扩增动力学曲线

Fig.1 Dynamic curve of real-time fluorescent quantitative RT-PCR

1.39%(表2),表明误差都非常小,重复性好。

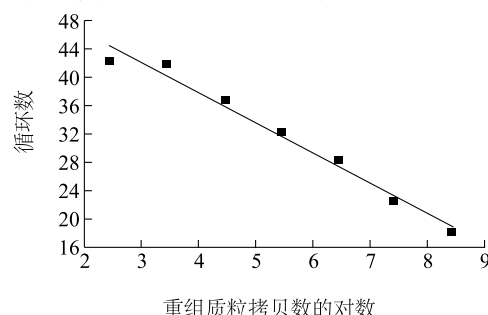


图2 RRT-PCR 标准曲线

Fig.2 Standard curve of real-time RT-PCR

复性试验:取以上3份样品,在同一反应条件下进行5次独立的荧光定量PCR检测。结果显示,批内变异系数为0.43%~0.99%,批间变异系数为0.95%~

2.6 验证结果

RRT-PCR与病毒分离结果见表1,结果显示,2种方法检测33株NDV,阴性和阳性结果完全符合,符合率为100%。

表2 用荧光定量 RT-PCR 检测 3 份不同病毒含量标准品的批内和批间重复检测结果

Table 2 Intra-and inter-assay reproducibility of fluorescent quantitative RT-PCR for 3 standard samples

重组质粒滴度	批内重复阈值 (Ct 值)					平均	变异系数 (%)	批间重复阈值 (Ct 值)					平均	变异系数 (%)
	1	2	3	4	5			1	2	3	4	5		
1 μ l 10^2 拷贝	36.85	36.72	36.80	36.68	36.92	36.79 \pm 0.15	0.43	36.78	36.50	36.23	35.95	36.56	36.40 \pm 0.33	0.95
1 μ l 10^4 拷贝	28.23	27.98	28.01	28.46	28.36	28.21 \pm 0.20	0.75	28.01	28.23	28.39	28.76	27.92	28.26 \pm 0.35	1.21
1 μ l 10^6 拷贝	18.62	18.15	18.51	18.39	18.65	18.46 \pm 0.19	0.99	18.33	18.83	18.62	18.39	18.97	18.63 \pm 0.28	1.39

3 讨论

本研究的目的是制定一个快速、实时 RT-PCR 方法检测和区分临床样本中所有的新城疫病毒。众所周知,由于新城疫病毒基因组序列之间的高异质性^[6],设计可以扩增每个新城疫病毒分离株的 PCR 引物,已被证明存在一些困难^[7]。大多数努力集中于 F 基因^[7]。

将荧光定量 RT-PCR 应用于新城疫病毒的检测已有报道。Mark 等^[2]建立了 RRT-PCR 技术检测鸟类临床标本新城疫病毒。检测采用单管水解探针,引物和探针根据 M 基因保守区序列设计,可检测到大约1 000拷贝病毒基因组 RNA 和 10 EID_{50} 病毒。Beate 等^[8]建立了高通量的检测外来 NDV 的 RRT-PCR 方法。Mia 等^[9]建立了基于新城疫病毒 L 基因

基础上的 RRT-PCR 技术,对 Mark 等建立的新城疫病毒 M 基因 RRT-PCR 是一个有力的补充。Sheau 等^[10]报道 NP 基因相对比 F 基因更保守。刘晓文^[11]研究结果表明 Class I 分离株 NP 基因之间氨基酸序列的同源性为 93.0%~99.5%, Class I 毒株与 Class II 毒株 NP 蛋白质同源性为 88.2%~92.5%。本研究选取 Class I NP 基因保守区设计引物和探针,首次建立了一种新的基于 NP 基因的检测新城疫病毒 Class I 的 RRT-PCR 方法,对 Mark 等建立的新城疫病毒 M 基因 RRT-PCR 也是一个重要的补充。这两个方法结合可以快速检测所有 Class I 和 Class II 新城疫病毒并进行初步分群。随着 NDV 分子生物学研究的不断深入,NDV 基因序列及功能得到不断的揭示,ND 分子生物学检测技术将得到进一步的补充和完善。

参考文献:

- [1] 崔治中. 我国禽新城疫的流行现状[J]. 中国家禽, 2002, 24(4): 426.
- [2] MARK G W, DAVID L S, BRUCE S S, et al. Development of a real-time reverse-transcription PCR for detection of Newcastle disease virus RNA in clinical samples[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42: 329-338.
- [3] 金仕强, 孟春春, 仇旭升, 等. Class I 新城疫病毒概述[J]. 动物医学进展, 2012, 33(4): 102-106
- [4] Office of International Epizootes. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines [M]. 4th ed. Paris: Office of International Epizootes, 2000.
- [5] WATZINGER F, EBNER K, LION T. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR [J]. Molecular Aspects of Medicine, 2006, 27: 254-298.
- [6] LOMNICZI B, WEHMANN E, HERCZEG J, et al. Newcastle disease outbreaks in recent years in western Europe were caused by an old(virus isolation) and a novel genotype (VII) [J]. Arch Virol, 1998, 143:49-64.
- [7] ALDOUS E W, ALEXANDER D J. Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1) [J]. Avian Pathol, 2001, 30:117-128.
- [8] BEATE M C, SHARON K H, LIU-MEI S, et al. High-throughput real-time RT-PCR assay to detect the exotic Newcastle disease virus during the California 2002-2003 outbreak [J]. J Vet Diagn Invest, 2005, 17:124-132.
- [9] MIA K L, DANIEL J K, DAVID L S, et al. Characterization of Class I Newcastle disease virus isolates from Hong Kong live bird markets and detection using real-time reverse transcription PCR [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2007(45): 1310-1314.
- [10] TAN S W, IDERIS A, OMAR A R, et al. Detection and differentiation of velogenic and lentogenic Newcastle disease viruses using SYBR Green I real-time PCR with nucleocapsid gene-specific primers. Journal of Virological Methods, 2009, 160(1-2): 149-56.
- [11] 刘晓文. 家鸭中弱毒新城疫病毒的分子流行病学和以弱毒为骨架表达强毒 F 和/或 HN 基因对重组病毒毒力的影响[D]. 扬州: 扬州大学, 2009.

(责任编辑:袁 伟)