

王永娟, 左伟勇, 朱善元, 等. 鸭呼肠孤病毒的 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(5): 1107-1110.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.05.024

## 鸭呼肠孤病毒的 RT-PCR 检测方法的建立

王永娟, 左伟勇, 朱善元, 王安平, 吴双, 洪伟鸣, 陆辉

(江苏农牧科技职业学院/江苏省兽用生物制药高技术研究重点实验室, 江苏 泰州 225300)

**摘要:** 为快速检测临床鸭呼肠孤病毒的感染情况, 根据鸭呼肠孤病毒  $\sigma C$  蛋白的基因序列设计 1 对特异性 PCR 引物, 并以呼肠孤病毒基因组为模板, 建立了鸭呼肠孤病毒的特异性 RT-PCR 检测方法。采集江苏省多地疑似呼肠孤病毒感染病料, 提取基因组 DNA 进行 RT-PCR 扩增, 产物经测序鉴定后判断建立的方法对临床样品的检出率。结果显示, 该方法可以特异性扩增鸭呼肠孤病毒  $\sigma C$  基因保守区 438 bp 的序列, 与其他鸭病毒无交叉反应, 最低可检测 1 fg 基因组 DNA, 对于临床样品检出率为 100%。该方法可以用于临床快速诊断鸭呼肠孤病毒感染。

**关键词:** 鸭; 呼肠孤病毒; RT-PCR; 检测

中图分类号: S858.322.65<sup>+</sup>9.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2016)05-1107-04

## Establishment of a RT-PCR method for duck reovirus detection

WANG Yong-juan, ZUO Wei-yong, ZHU Shan-yuan, WANG An-ping, WU Shuang, HONG Wei-ming, LU Hui

(*Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College/Jiangsu Provincial Key Laboratory of Veterinary Bio-pharmaceutical High Tech Research, Taizhou 225300, China*)

**Abstract:** To rapidly assess the clinical infection of duck reovirus, a pair of specific primers based on duck reovirus  $\sigma C$  protein gene sequence was designed. Using the duck reovirus genome as a template, a specific RT-PCR method was established and applied to the samples collected from ducks infected by suspected reovirus in Jiangsu province. The RT-PCR technique established can specifically amplify the 438-bp sequence of reovirus  $\sigma C$  conservative region, and detect the genomic DNA of duck reovirus as low as 1 fg with detection rate of 100%. The RT-PCR can be used for rapid clinical diagnosis of duck reovirus infection.

**Key words:** duck; reovirus; RT-PCR; detection

鸭呼肠孤病毒俗称花肝病, 是一种以脚软、发

病率高、病死率高、肝脾有大量坏死点为特征的新急性传染病。吴宝成等在 2001 年鉴定并确认其病原为番鸭呼肠孤病毒(MDRV)<sup>[1]</sup>。自 2007 年以来, 该病在中国广东、广西、福建、浙江和江西等地广泛流行, 给养鸭业造成了重大经济损失<sup>[2]</sup>。鸭呼肠孤病毒毒株基因组由 L1、L2、L3、M1、M2、M3、S1、S2、S3、S4 构成, 病毒蛋白质有 14 种<sup>[3]</sup>。其中  $\sigma C$  蛋白是鸭呼肠孤病毒的主要免疫原性蛋白, 可诱导机体产生免疫保护性抗体, 而且序列同源性高, 是研制鸭呼肠孤病毒诊断试剂首选蛋白<sup>[4]</sup>。

目前临床上检测鸭呼肠孤病毒的方法有病毒分

收稿日期: 2016-06-08

基金项目: 江苏省“六大人才”高峰第十二批培养对象资助项目(NY-023、10410015002); 江苏省农业科技支撑计划项目(BE2014380); 江苏农牧科技学院“凤凰人才工程”项目; 江苏农牧科技职业学院重点支持项目(NSFZD1405、NSFPT201510、NSFPT201512)

作者简介: 王永娟(1980-), 女, 江苏海门人, 博士, 副教授, 主要从事动物传染病防治研究, (E-mail) 43088591@qq.com

通讯作者: 陆辉, (E-mail) smluhui@163.com

离鉴定、乳胶凝集试验、琼脂扩散和免疫荧光抗体技术<sup>[5-6]</sup>。但前两者耗时长,琼脂扩散试验敏感性低,免疫荧光抗体价格昂贵,均难以在临床中大力推广应用。PCR检测技术具有灵敏度高、简便、快速、安全等特点,其扩增后的产物可以利用电泳进行分析,无放射性污染物,易推广;且不需要分离病毒,对标本的纯度要求低<sup>[7]</sup>。本试验以病毒 $\sigma$ C蛋白基因为目标,建立快速、敏感并且廉价的RT-PCR检测方法,为在临床中作为试剂盒研制和推广应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

鸭呼肠孤病毒(MDRV)毒株由福建省农业科学院惠赠,5~7日龄SPF鸡胚购自扬州朝天歌农牧科技有限公司,dNTPs、RNA酶抑制剂、病毒提取试剂盒、PCR酶、DNA marker均购自TaKaRa公司,MMLV反转录试剂盒购自BBI公司,病毒基因组提取试剂盒购自TaKaRa公司,盐酸盐缓冲液(PBS)、注射器、移液管、指形管和石蜡均为市售。鸭低致病性禽流感病毒由扬州大学兽医学院馈赠,鸭瘟病毒、I型鸭肝炎病毒、鸭坦布苏病毒、番鸭细小病毒均由中国农业科学院上海兽医研究所馈赠。

### 1.2 病毒扩增

将鸭呼肠孤病毒原液用PBS按照1:10、1:100、1:1 000比例稀释,卵黄囊无菌接种5~7日龄SPF鸡胚,每个胚体接种0.1 ml。无菌收取接毒24~192 h期间死亡和未死亡的胚体,观察病变情况。剪碎研磨后加适量PBS缓冲液制成匀浆,反复冻融3次后,5 000 r/min离心10 min,吸取上清液,-80℃保存。

### 1.3 MDRV病毒RNA提取

取收集的病毒液100.0  $\mu$ l,按照病毒提取试剂盒说明书提取RNA,提取时未加入Carrier RNA。最后将RNA溶解于40.0  $\mu$ l RNase free dH<sub>2</sub>O中,用分光光度仪测定病毒基因组的纯度与浓度。

### 1.4 RT-PCR方法的建立

根据已发表的S4编码的 $\sigma$ C蛋白基因序列(登录号:AJ310525.1)设计1对引物:上游引物F为5'-GCACTCTGGATCCAGTAC-3',下游引物R为5'-CAATGGAGAAGCGAACCG-3'。设置25.0  $\mu$ l反应体系进行反转录,包括反转录酶1.0  $\mu$ l、dNTPs 2.0

$\mu$ l、Random primer 2.0  $\mu$ l、5 $\times$ RT 5.0  $\mu$ l、抑制剂0.5  $\mu$ l和RNA模板14.5  $\mu$ l。反应程序为:25℃ 10 min,42℃ 60 min,70℃ 10 min。

PCR采用50.0  $\mu$ l反应体系,包括cDNA产物5.0  $\mu$ l、上游引物1.0  $\mu$ l、下游引物1.0  $\mu$ l、2 $\times$ Taq; mix酶25.0  $\mu$ l、水18.0  $\mu$ l。反应程序为:94℃预变性4 min;94℃变性30 s,52℃退火45 s,72℃延伸1 min,25个循环,最后72℃延伸10 min。反应结束后取5.0  $\mu$ l产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳,并用凝胶成像系统拍照分析。同时设无RNA的空白对照。

### 1.5 特异性测定

参照病毒基因组提取试剂盒说明书,分别提取鸭瘟病毒、I型鸭肝炎病毒、鸭坦布苏病毒、番鸭细小病毒和鸭低致病性禽流感病毒基因组。按方法1.4,分别以MDRV上、下游引物进行扩增,扩增产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳。

### 1.6 敏感性测定

取提取的MDRV RNA 1.0  $\mu$ l进行10倍梯度稀释,按照方法1.4反转录及PCR程序进行扩增,取扩增产物5.0  $\mu$ l进行1.5%琼脂糖凝胶电泳,并用凝胶成像系统拍照分析。

### 1.7 临床样品检测

分别取1 g左右来自江苏省盐城、射阳和徐州等地的7份疑似MDRV感染的番鸭肝脏组织,按照病毒提取试剂盒说明书提取组织总RNA,再按方法1.4进行RT-PCR扩增,设不加RNA的空白对照和MDRV阳性对照。扩增产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳,并将特异性扩增条带切胶回收后,由上海英俊公司测序鉴定。

## 2 结果

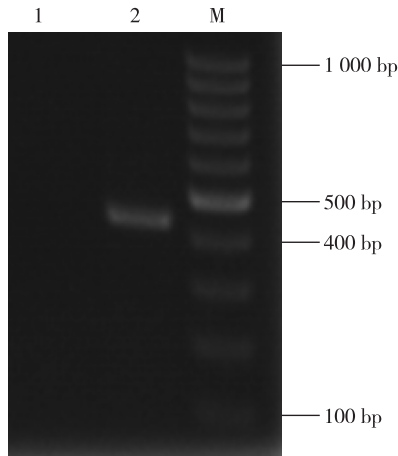
### 2.1 呼肠孤病毒致病性

鸡胚在接种呼肠孤病毒后,少数1:10稀释度接种的鸡胚于5~8 d内死亡,1:100、1:1 000和多数1:10稀释度接种的鸡胚未见死亡。取出胚体后发现,与相同日龄未接种病毒的鸡胚相比,胚体体积变小,胚体脑部有明显出血,肝脏与脾脏有明显出血斑,肝脏成黄绿色,鸡胚心包积液,腹腔呈胶冻样。

### 2.2 鸭呼肠孤病毒检测方法的建立

提取鸭呼肠孤病毒基因组RNA,用分光光度计

测得浓度为  $11.2 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 。病毒基因组经  $42^\circ\text{C}$   $1 \text{ h}$  反转录、 $94^\circ\text{C}$  预变性  $4 \text{ min}$ ; $94^\circ\text{C}$  变性  $30 \text{ s}$ , $52^\circ\text{C}$  退火  $45 \text{ s}$ , $72^\circ\text{C}$  延伸  $1 \text{ min}$  (25 个循环)以及  $72^\circ\text{C}$  延伸  $10 \text{ min}$  后,在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳中可见清晰条带(图 1),与预期 438 bp 目的片段相符。



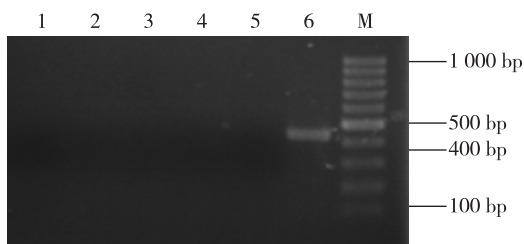
1:空白对照;2:MDRV 基因组;M:100 bp DNA ladder marker。

图 1 鸭呼肠孤病毒的 RT-PCR 法检测

Fig.1 Detection of duck reovirus by RT-PCR

### 2.3 鸭呼肠孤病毒 RT-PCR 检测法的特异性

在同等反应条件下,以 MDRV 上、下游引物对鸭瘟病毒、I 型鸭肝炎病毒、鸭坦布苏病毒、番鸭细小病毒和鸭低致病性禽流感病毒基因组进行 RT-PCR 扩增。扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,结果(图 2)显示均未扩增出目的条带。



1:鸭瘟病毒;2:I 型鸭肝炎病毒;3:鸭坦布苏病毒;4:番鸭细小病毒;5:鸭低致病性禽流感病毒;6:鸭呼肠孤病毒;M:100 bp DNA ladder marker。

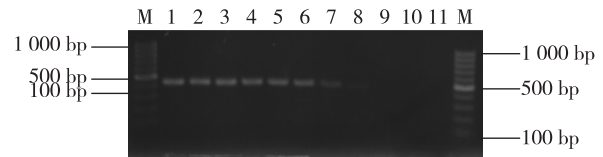
图 2 鸭呼肠孤病毒 RT-PCR 检测法的特异性测定

Fig.2 Specificity of the RT-PCR for detection of duck reovirus

### 2.4 鸭呼肠孤病毒 RT-PCR 检测法的敏感性

在相同反应条件下,改变基因组 RNA 的剂量,以  $11.2 \text{ ng}/\mu\text{l}$  RNA  $1.0 \mu\text{l}$  为起始剂量,10 倍梯度稀释,进行 RT-PCR 扩增。结果(图 3)表明,在稀

度  $1 \times 10^7$  之后无特异性条带扩增,对应 RNA 约为  $1 \text{ fg}$ 。



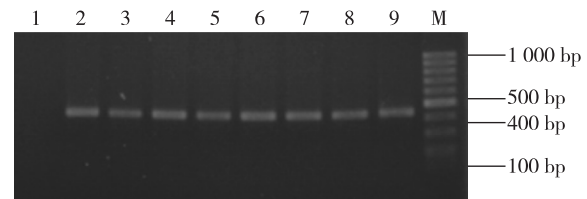
M:100 bp DNA ladder marker;1~11: $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^{10}$  稀释的 MDRV。

图 3 鸭呼肠孤病毒 RT-PCR 检测法的敏感性测定

Fig.3 Sensitivity of the RT-PCR for detection of duck reovirus

### 2.5 临床样品的测定

用建立的方法检测临床采集的 7 份疑似病料,检测结果(图 4)显示,均在预期 438 bp 处有特异性扩增,而空白对照组无扩增,检出率为 100%。7 个扩增产物的测序结果与  $\sigma\text{C}$  蛋白基因序列(登录号:AJ310525.1)同源性为 100%。



1:空白对照;2~8:样品;9:阳性对照;M:100 bp DNA ladder marker。

图 4 鸭呼肠孤病毒 RT-PCR 检测法检测临床样品结果

Fig.4 Detection of MDRV clinical samples by RT-PCR

## 3 讨论

鸭呼肠孤病毒病以番鸭、半番鸭和麻鸭为发病群体。一般情况下,鸡胚接种该病毒后 3~6 d 内死亡,胚体全身出血,肝脏有出血斑和坏死灶,该病是以肝脏出现明显病变和出血混杂的一种新疫病<sup>[8]</sup>。但是本试验中在卵黄囊接种 5~7 d 龄鸡胚后,鸡胚死亡率仅为 0.2%,这可能是病毒传代引起的毒力致弱现象。因为从胚体解剖情况看,可见与预期一致的病变,如胚体体积变小、胚体脑部出血、胚体肝脏变为黄绿色且出血、胚体心脏有出血斑、个别胚体心包积液和腹腔内有透明果冻样胶状物等。同时,我们能够以这些胚体的基因组为模板建立 RT-PCR 检测方法,也足以证实了该病毒样本的有效性。

对于该病的诊断,传统的病毒分离方法和琼脂扩散方法较为复杂,费事、费力且敏感性较低。2004 年胡奇林等建立了番鸭呼肠孤病毒的 RT-PCR 检测

方法,该方法虽能检测番鸭呼肠孤病毒,但不能鉴别诊断其他病毒,而且最低检测限为  $1\text{ pg}^{[8]}$ 。陈海鹏等于 2014 年创建了基于  $\sigma\text{C}$  蛋白抗体的间接 ELISA 检测方法<sup>[9]</sup>,但是该方法检测过程较为复杂,有漏诊现象。本试验中我们选取了能够产生具有良好免疫原性  $\sigma\text{C}$  蛋白的一段保守区基因为靶序列,设计了 1 对引物。这对引物避免了与鸭瘟病毒、I 型鸭肝炎病毒、鸭坦布苏病毒、番鸭细小病毒和鸭低致病性禽流感病毒基因组相关基因的序列同源性,能够特异性扩增 438 bp 的条带。所建立的 MDRV RT-PCR 检测方法与胡齐林等<sup>[8]</sup>的方法相比,敏感性提高了  $1\times 10^3$ ,检出率也进一步提升,而且廉价、快捷、准确,对采样要求较低,更适于在临床推广应用。

#### 参考文献:

- [1] 吴宝成,陈家祥,姚金水,等. 番鸭呼肠孤病毒的分离与鉴定[J]. 福建农业大学学报, 2001, 30(2): 227-230.
- [2] 陆新浩,陈秋英,刘 鸿,等. 宁波地区鸭呼肠孤病毒的流行病学及防控措施[J]. 浙江畜牧兽医, 2015, 23(5): 34-35.
- [3] WANG D, XU F, MA G, et al. Complete genomic sequence of a new Muscovy duck-origin reovirus from China[J]. Journal of Virology, 2012, 86(22): 12444-12445.
- [4] 耿宏伟,郭东春,刘 明,等. 番鸭呼肠孤病毒 S 基因组的克隆与序列分析[J]. 中国兽医科学, 2007, 37(4): 305-311.
- [5] 陈少莺,陈仕龙,林锋强,等. 新型鸭呼肠孤病毒的分离与鉴定[J]. 病毒学报, 2012, 29(3): 224-230.
- [6] 郑景生,吕 蓓. PCR 技术及实用方法[J]. 分子植物育种, 2003, 3(1): 381-394.
- [7] 胡 成,朱善元,左伟勇,等. 鸭 I 型肝炎病毒一步法 RT-LAMP 可视化快速检测方法的建立[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(3): 613-618.
- [8] 胡齐林,林锋强,陈少莺,等. 应用 RT-PCR 技术检测番鸭呼肠孤病毒[J]. 中国兽医学报, 2004, 24(3): 231-232.
- [9] 陈海鹏.  $\sigma\text{C}$  蛋白抗体间接 ELISA 检测方法的建立和应用[D]. 泰安:山东农业大学, 2014.

(责任编辑:张震林)