

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.11.03

运用实时荧光定量 PCR 法检测感染鸡种蛋中的 REV

黄小洁, 杨承槐, 刘 丹, 侯力丹, 李慧姣, 李俊平*, 陈晓春*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2017-04-26 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 11-0015-05 [中图分类号] S852.65

[摘 要] 为研究通过种蛋检测的方法监测 SPF 鸡群 REV 感染情况, 运用已建立的荧光定量 PCR 方法检测攻毒母鸡种蛋中 REV, 并与血清 REV 水平进行比较。人工感染 12 月龄母鸡, 从种蛋中提取蛋清, 接种正常鸡胚成纤维细胞后传代一次, 之后石蜡密封孵化至 9 日龄制成鸡胚成纤维细胞 (CEF), 运用荧光定量 PCR 方法检测蛋清, 并和血清的检测结果进行比较, 结果显示: 83 份蛋清, 3 份阳性样品分别收集自攻毒后的第 8、11、14 天; 46 份 CEF, 2 份阳性样品分别收集自攻毒后的第 11 天和第 14 天, 阳性的蛋清和 CEF 呈对应关系, 说明两种方法的检测结果一致。攻毒后的 6~15 d 是病毒血症持续期, 阳性鸡蛋均采集自这段时间, 表明通过种蛋 REV 检测能反映 SPF 鸡的急性感染状态。本研究为通过种蛋抗原检测从而监测 SPF 鸡 REV 感染奠定基础。

[关键词] 网状内皮组织增生症病毒; 荧光定量 PCR; 血清; 蛋清; 鸡胚成纤维细胞

Detection of REV in Serum and Eggs of Infected Chickens by Real-time Fluorescent Quantitative PCR

HUANG Xiao-jie, YANG Cheng-huai, LIU Dan, HOU Li-dan, LI Hui-jiao, LI Jun-ping*, CHEN Xiao-chun*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: LI Jun-ping, E-mail: lijunping@ivdc.org.cn; CHEN Xiao-chun, E-mail: chenxiaochun@ivdc.org.cn

Abstract: The aim of this study was to study the egg detection indicating the REV infection status in SPF chickens. The REV of eggs in infected hens was detected by real-time PCR method already established, and compared with the serum. 12 month-old hens inoculated with REV. The egg white was extracted from the eggs and was inoculated into chicken embryo fibroblast (CEF) and passaged once, then these eggs were sealed with paraffin wax and hatched, CEF was made from 9 days embryos. These egg white and CEF were detected by the real-time PCR then compared with the serum. The result showed that REV in three egg white samples could be detected from 83 samples, which collecting from the eighth and the eleventh and the fourteenth day after infection. Two CEF samples could be detected from 46 samples, which collecting from the eleventh and the fourteenth day after infection. The positive egg white and CEF was correspondence. The result indicated the two methods were

基金项目: 国家重点研发计划项目“禽病检测标准物质与计量技术方法研究”课题(2016YFD0500809)

作者简介: 黄小洁, 兽医硕士, 从事禽病毒类生物制品的检验和研究工作。

通讯作者: 李俊平, E-mail: lijunping@ivdc.org.cn; 陈晓春, E-mail: chenxiaochun@ivdc.org.cn

consistent. The viremia continued from 6 to 18 days after attack and the positive eggs were collected from this time. The result indicated that the egg detection could be used to monitor the acute infection status in SPF chicken. The research provided a foundation for monitoring REV infection in SPF chickens by egg antigen test.

Key words: REV; real-time PCR; serum; egg white; CEF

禽网状内皮组织增生症(Reticuloendotheliosis, RE)是指由反转录病毒科网状内皮组织增生症病毒(Reticuloendotheliosis virus, REV)引起的禽类以急性网状细胞肿瘤、生长抑制综合症、淋巴组织和其他组织的慢性肿瘤形成为特征的一群病理综合症。REV与禽白血病病毒(Avian leukemia virus, ALV)、马立克氏病病毒(Marek's disease virus, MDV)并称为鸡群的三大肿瘤性病毒,严重危害我国的家禽养殖业。

REV属正反转录病毒科, γ 反转录病毒属,为单股、正链、线性RNA。REVS基因组RNA是由两个30~40s的RNA亚单位的60~70复合体组成^[1],分离株存在3个明显的亚型,网状内皮组织增殖病病毒T株(SNV)鸭传染性贫血病毒(DI-AV)、鸡合胞体病毒(CSV)^[2],不同毒株具有相同的抗原性。REV的传统检测方法包括免疫荧光、病毒分离培养、血清学等方法。然而,这些方法在敏感性、特异性、时效性等方面存在各自的不足。国标中,检测SPF鸡REV感染的方法主要是采用血清学的方法,然而血清的采集不仅费时费力,疫苗企业要获得可靠的血清作为检测样品也很困难。因此,亟待建立一种更为快速、方便、可靠的检测方法来准确诊断SPF鸡的REV感染情况。

近年来,实时荧光定量PCR(Fluorescent quantitative PCR)技术以其快速、灵敏、特异性强等优点在基因表达水平的分析、病原体的定性和定量检测等方面得到广泛应用^[3-5]。本研究运用已建立的REV实时荧光定量PCR方法^[2],对人工感染REV母鸡的血清及种蛋进行检测,探讨种蛋检测方法的可行性,为通过种蛋抗原检测从而监测SPF鸡REV感染奠定基础。

1 材料

1.1 病毒 REV MD-2株,病毒含量为 $10^{4.34}$

TCID₅₀,由中国兽医药品监察所分离保存。

1.2 SPF种鸡和种蛋 5只12月龄的成年SPF母鸡,2只SPF公鸡购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司;100枚SPF种蛋,购自5家SPF鸡胚生产企业;30枚普通鸡蛋购自北京某鸡场。

1.3 主要试剂 OMEGA总RNA提取试剂盒购自OMEGA公司;SYBR[®] Premix Ex Taq[™]试剂盒、PrimeScript TMRT reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒购自大连宝生物(Takara)工程有限公司;蛋白酶K溶液购自天根生化科技有限公司;无水乙醇、苯酚、氯仿、异戊醇购自国药集团。

2 方法

2.1 样品采集

2.1.1 动物试验 实验组:4只母鸡和1只公鸡放于一个隔离器内饲养,每只母鸡肌肉注射 10^5 TCID₅₀的REV MD-2株强毒,分别标记为1-4号鸡;对照组:1只公鸡和1只母鸡放于另一隔离器,注射与实验组相同剂量的生理盐水,标记为5号鸡。两组鸡同饲养两个月,每天收集种蛋,三天采一次全血分离血清,做好标记,保存于-20℃冰箱。

2.1.2 制作鸡胚成纤维细胞(CEF) 按照《中国兽药典》(二〇一〇版三部)^[6]方法制作。

2.2 样品采集及处理

2.2.1 感染种蛋蛋清的提取及CEF的制作 用1 mL注射器吸取0.5 mL蛋清,随后立即用石蜡密封,将种蛋放入孵化箱孵化;受精蛋孵化至9日龄按1.2.2的方法制成鸡胚成纤维细胞(CEF);蛋清样品用PBS进行10倍稀释,取1 mL接种CEF,放于5% CO₂、37℃培养箱培养1 h,弃去蛋清,用PBS洗涤2~3次,补充细胞维持液,放入培养箱培养5 d后传代一次冷藏备用。

2.2.2 血清中病毒DNA提取 按OMEGA总RNA提取试剂盒说明从血清中提取病毒RNA;按照

PrimeScript TMRT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒说明将 RNA 反转录成 cDNA, 保存于 -80 ℃ 冰箱。

2.2.3 蛋清细胞培养物、CEF 细胞 DNA 提取 取 437.5 μL 病毒液于 1.5 mL Eppendorf 管中, 分别加入 12.5 μL proteinase K (20 mg/mL), 50 μL 10% SDS 充分混匀后 56 ℃ 水浴 60 min; 加入 500 μL 酚/氯仿/异戊醇 (25 : 24 : 1), 上下颠倒混匀, 室温静置 5 min, 4 ℃, 12000 r/min 离心 15 min, 取上层水相; 加入 900 mL 冰冷的无水乙醇和 45 mL 3 mol/L NaAC (pH5.2), -20 ℃ 沉淀过夜; 加入 450 μL 氯仿-异戊醇 (24 : 1), 上下颠倒混匀, 室温放置 5 min, 4 ℃, 12000 r/min 离心 10 min, 取上层水相; 4 ℃, 12000 r/min 离心 20 min 沉淀核酸; 弃上清, 加入 450 μL 70% 乙醇, 混匀后 4 ℃, 12000 r/min 离心 20 min, 弃上清; 将 Eppendorf 管倒扣于吸水纸上, 室温下使乙醇自然挥发; 加入 30 μL 的双蒸水溶解核酸, -20 ℃ 保存备用。

2.3 样品 DNA (cDNA) 的荧光定量 PCR 检测 按照已建立的荧光定量 PCR 方法^[1], 对提取的样品 DNA (cDNA) 样品进行荧光定量检测, 25 μL 反应体系为: SYBR Premix Ex TaqTM 12.5 μL; PCR Forward Primer (10 μmol/L) 0.5 μL; PCR Reverse Primer (10 μmol/L) 0.5 μL; DNA Template 2 μL; ddH₂O 9.5 μL。反应条件为: 95 ℃ 30 s; 95 ℃ 5 s; 55 ℃ 30 s; 72 ℃ 30 s, 40 个循环。

2.4 数据分析 每个样品重复测定 3 次, 每次取样品 DNA (cDNA) 模板 2 μL, 通过标准曲线换算出病毒基因组拷贝数平均对数值 (log₁₀ copies/μL), 再换算成 1 μL 样品中所含的 DNA (cDNA) 拷贝数平均对数值 (log₁₀ copies/μL), 3 次测定结果的平均值为最终测定结果。以 Ct 值小于 35 作为阳性样品判定标准。

2.5 临床样品检测 对 100 枚 SPF 种蛋和 50 枚普通鸡蛋进行 REV 检测。

3 结 果

3.1 REV 在母鸡血清中的动态分布 采集母鸡全

血分离血清, 攻毒后的 3 d、6 d、9 d、12 d、15 d 从 4 只攻毒母鸡血清中均检测到病毒 cDNA, 将 4 只母鸡的检测结果取平均值, 3 d 时平均拷贝数约为 10² 拷贝, 6 d 时约为 10⁴ 拷贝, 9 d 拷贝数达到峰值为 10⁵ 拷贝, 12 d 时降至 10⁴ 拷贝, 15 d 为 10² 拷贝。18 d 以后检测不到病毒 (图 1)。对照母鸡在各个阶段血清中 REV 的检测结果均为阴性。

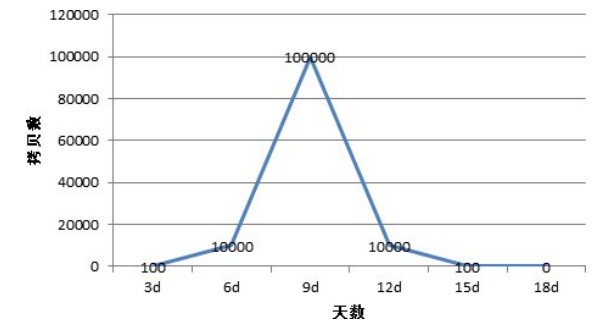


图 1 REV 在感染鸡体内的增殖规律

Fig 1 The proliferation of REV in infected chickens

3.2 蛋清细胞培养物、CEF 检测结果 两个月时间共收集感染种蛋样品 83 份, 提取蛋清 83 份, 接种 CEF 并传代一次, 有 3 份检测结果为 REV 阳性, 分别为感染后的第 8、11、14 天收集 (表 1)。83 份鸡蛋样品中, 有 46 份受精, 孵化制成 CEF 样品 46 份, 有 2 个样品检测结果为阳性, 分别为感染后第 11 天和第 14 天收集。同一份种蛋的阳性 CEF 和阳性蛋清一一对应, 均在感染后的 11 和 14 天收集。对照组的蛋清、CEF 均为阴性。

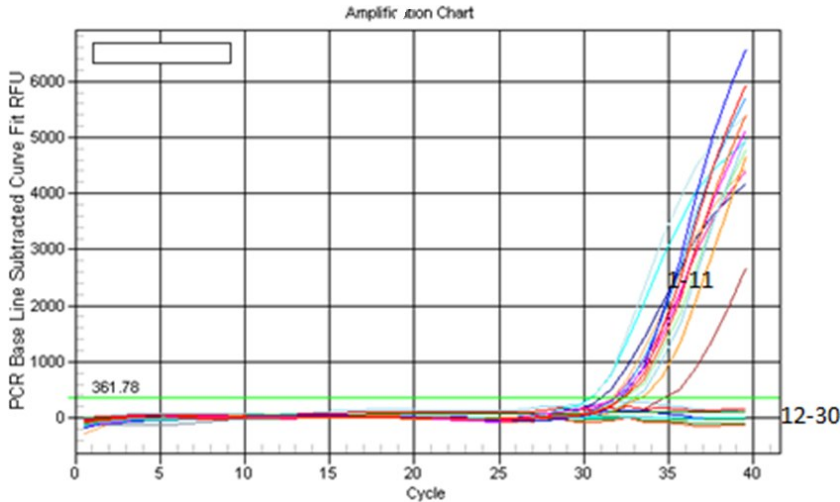
表 1 蛋清细胞培养物、CEF 检测结果

Tab 1 The detection result of the egg White cell culture and the CEF

样品 sample	数量 number	阳性样品 positive sample	
		采集时间 (感染天数) collection time (infection days)	数量 number
蛋清	83	8、11、14	3
CEF	46	11、14	2

3.3 临床样品检测结果 100 枚 SPF 种蛋的蛋清细胞培养物 100 份,制成 CEF 细胞 82 份,经荧光定量 PCR 检测均为 REV 阴性;30 枚普通鸡蛋的蛋清培养

物有 30 份,均为非受精蛋,蛋清的细胞培养物经检测有 11 份为 REV 阳性(图 2),阳性率为 36.7%。



1-11 阳性鸡蛋;12-30 阴性鸡蛋

1-11 positive eggs;12-30 negative eggs

图 2 普通鸡蛋蛋清细胞培养物荧光定量 PCR 检测结果

Fig 2 Detection result of fluorescent quantitative PCR for egg white cell culture

4 讨 论

本实验人工感染 12 月龄 SPF 母鸡,攻毒后第 3 天即可从血清中检测出病毒,这个结果比起雏鸡感染后出现病毒血症^[7-8]的时间要早约 10 d,这可能与接种的病毒毒株、接种方式不同,以及鸡的日龄大免疫机能完善等因素有关。第 9 天血清 REV 达到峰值,之后缓慢下降,第 18 天左右病毒血症消失,攻毒后 3~18 d 是病毒血症的持续时间。在蛋清的细胞培养物和 CEF 细胞中,检测出了 REV,阳性鸡蛋的蛋清和 CEF 呈一一对应关系,说明这两种方法的检测结果一致,运用这两种方法检测种蛋均可行。并且检测出的阳性样品的采集时间同血清病毒血症持续的时间相一致,表明了耐受性感染的母鸡确实能把病毒垂直传播给后代。但是鸡蛋中 REV 检出率比较低,可能是垂直传播的几率低导致^[9-11],也可能是病毒从母鸡传播到鸡蛋后,病毒含量非常低,方法的敏感性不够而导致检测不到病毒。

SPF 鸡感染 REV 后血清抗体持续时间很长^[1],通过抗体检测只能反映鸡群的感染历史,不能判断鸡群是否处于急性感染期,判断感染期最可靠的方法还是进行病毒检测。本实验运用建立的荧光定量 PCR 方法对攻毒母鸡的血清、蛋清、CEF 细胞进行检测,结果表明三者出现的时间基本一致,通过对 SPF 种蛋进行病毒检测能如实反映鸡群的急性感染状态。但由于垂直传播率较低,实验步骤也比较繁琐,本方法是否适合大规模推广还有待进一步验证。对 SPF 鸡蛋和普通鸡蛋进行 REV 抗原检测,SPF 鸡蛋 REV 检出率为 0,普通鸡蛋的检出率 36.7%,检出率较高,说明我国商品鸡群存在较高的 REV 感染率。

参考文献:

[1] Saif Y M. 禽病学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2012.
Saif Y M. Diseases of poultry[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2012.

[2] 黄小洁,杨承槐,刘 丹,等. SYB Green I 实时荧光 PCR 法检

测禽活疫苗中禽网状内皮组织增生症病毒[J]. 中国兽药杂志, 2016, 50(7): 7-13.

Huang X J, Yang C H, Liu D, *et al.* Detection of avian reticuloendotheliosis virus of avian live vaccine by SYBR Green real-time PCR [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2016, 50(7): 7-13.

[3] 李井春. 禽网状内皮组织增殖症研究进展[J]. 现代畜牧兽医, 2011(6): 34-36.

Li J C. Research progress in avian reticuloendotheliosis [J]. Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2011(6): 34-36.

[4] Mackay I M, Arden K E, Nitsche A. Real-time PCR in virology [J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(6): 1292-1305.

[5] Heid C A, Stevens J, Livak K J, *et al.* Real time quantitative PCR[J]. Genome Res, 1996, 6(10): 986-994.

[6] 中华人民共和国兽药典[S]. 二〇一〇版三部. People's Republic of China Veterinary Pharmacopoeia[S]. Third Volume, 2010 Edition.

[7] 李文涛, 王俊东, 杨利峰, 等. 实时荧光定量 PCR 技术及其应用[J]. 生物技术通讯, 2006, 17(1): 112-114.

Li W T, Wang J D, Yang L F, *et al.* Real time quantitative PCR and its application[J]. Biotechnology Communication, 2006, 17(1): 112-114.

[8] 孟珊珊, 崔治中, 孙淑红, 等. REV 和 ALV-J 共感染鸡病毒血症及抗体反应的相互影响[J]. 中国兽医学报, 2006, 26(4): 363-366.

Meng S S, Cui Z Z, Sun S H, *et al.* Interaction of viremia and antibody in chickens coinfecting with REV and ALV-J [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2006, 26(4): 363-366.

[9] 李俊平. 禽网状内皮组织增生症病毒与 A 亚群白血病毒共感染的致病性分析[D]. 中国农业大学, 2015.

Li J P. Analysis on pathogenicity of co-infection of avian reticuloendotheliosis virus with leukosis virus subgroup A [D]. China Agricultural University, 2015.

[10] McDougall J S, Shilleto R F W, and Biggs P M. Experimental infection and vertical transmission of reticuloendotheliosis virus in the turkey[J]. Avian Pathology, 1980, 9: 445-454.

[11] Bagust T J, and Grimes T M. Experimental infection of chickens with an Australian strain of reticuloendotheliosis virus. 2. Serological responses and pathogenesis [J]. Avian Pathology, 1979, 8(4): 375-389.

(编辑: 李文平)