

血清 1 型鸭甲型肝炎病毒实时定量 PCR 检测方法的建立与初步应用

孙庆歌¹, 李晶梅¹, 朱 薇¹, 肖爱芳¹, 赖 志², 薛 霜¹,
高俊锋², 马慧慧¹, 祝春花¹, 谢红玲^{1*}

(1. 武汉中博生物股份有限公司, 武汉 430070; 2. 上海创宏生物科技有限公司, 上海 201619)

[收稿日期] 2014-09-25 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2014) 12-0017-05 [中图分类号] S858.32

[摘 要] 为建立一种可检测血清 1 型鸭甲型肝炎病毒(DHAV-1)的实时定量 PCR 方法, 根据 GenBank 中 DHAV-1 5' 非编码区的保守区, 设计合成 1 对引物和 1 条 TaqMan 探针, 以构建的重组质粒作为标准品, 绘制标准曲线, 并对所建立方法进行了特异性、敏感性和可重复性试验以及临床病料检测初步应用。结果, 该方法与血清 3 型鸭甲型肝炎病毒、鸭瘟病毒、新城疫病毒、禽流感病毒、呼肠孤病毒、传染性支气管炎病毒等无交叉反应性; 最低可以检测到 10 copies/ μ L; 组内和组间变异系数均小于 3%; 临床病料的检测结果与测序检测结果一致。结果表明, 所建立的实时定量检测方法具有特异、敏感、稳定等优点, 可用于 DHAV-1 的快速检测与定量分析。

[关键词] 血清 1 型鸭甲型肝炎病毒; 实时定量 PCR; TaqMan 探针

Establishment and Application of Real-time Quantitative PCR to Detect Duck Hepatitis A Virus Serotype 1

SUN Qing-ge¹, LI Jing-mei¹, ZHU Wei¹, XIAO Ai-fang¹, LAI Zhi², XUE Shuang¹,
GAO Jun-feng², MA Hui-hui¹, ZHU Chun-hua¹, XIE Hong-ling^{1*}

(1. Wuhan Chopper Biology Co., Ltd., Wuhan 430070, China; 2. Shanghai Chuanghong Biological Technology Co., Ltd., Shanghai 201619, China)

Abstract: In order to develop a real-time quantitative PCR to detect duck hepatitis A virus serotype 1 (DHAV-1), a pair of primers and one TaqMan probe were designed and synthesized, according to the 5' untranslated sequences of DHAV-1 published on GenBank. The recombinant plasmid was built as a standard control for the method, the specificity, sensitivity, and repeatability of the method were determined, and also preliminarily applied in the detection of clinical samples. The results showed that the detection assay was specific for DHAV-1, and there was no cross reaction between duck hepatitis A virus serotype 3 (DHAV-3) and the other viruses including duck plague virus, Newcastle disease virus, avian influenza virus, duck reovirus, avian infectious bronchitis virus, etc. The method also showed high sensitivity, as low as 10 copies virus could be detected for each reaction, and good reproducibility, there was a coefficient of variations less than 3% for both

作者简介: 孙庆歌, 硕士, 从事禽病分子诊断技术研究。

通讯作者: 谢红玲。E-mail: 13419546263@163.com

inter-assay and intra-assay. The detection results of clinical samples were consistent with the sequencing. These results indicated that the developed TaqMan fluorescence quantitative PCR assay had the advantages of good specificity, sensitivity and repeatability; it was useful for the rapid diagnosis and quantification analysis of DHAV-1.

Key words: duck hepatitis A virus serotype 1; real-time quantitative PCR; TaqMan probe

鸭病毒性肝炎(Duck Viral Hepatitis)主要是由鸭甲型肝炎病毒(duck hepatitis A virus, DHAV)和鸭星状病毒引起的一种急性、烈性传染病^[1]。鸭病毒性肝炎流行范围较广,全球范围内均有发病报道,在我国和韩国等周边国家和地区的发病主要是由鸭甲型肝炎病毒感染引起的,鸭星状病毒感染地域性较为明显,仅在英国和美国有发病报道。鸭甲型肝炎病毒,按基因型可以分为基因A型鸭甲型肝炎病毒(DHAV-A)、基因B型鸭甲型肝炎病毒(DHAV-B)和基因C型鸭甲型肝炎病毒(DHAV-C),由于3个基因型之间并无血清交叉反应^[2],因此可以对应的称之为血清1型鸭甲型肝炎病毒(DHAV-1)、血清2型鸭甲型肝炎病毒(DHAV-2),血清3型鸭甲型肝炎病毒(DHAV-3),鸭甲型肝炎病毒这种特殊的基因型与血清型关系,为通过检测病毒核酸对血清型进行鉴定提供了便利。

DHAV-1是引起我国鸭病毒性肝炎流行的主要血清型,给我国鸭养殖业造成巨大的经济损失。鉴于鸭病毒性肝炎发病急、病程短、死亡率高的特点,建立一种快速、特异地实时定量PCR检测方法,不仅对于临床上鸭病毒性肝炎的快速诊断与疫情控制具有一定的指导意义,也为DHAV-1的研究提供技术手段。目前关于DHAV-1的实时定量PCR检测方法,国内外相关文献上已有报道,包括SYBR Green染料法和TaqMan探针法等,但在引物设计区域,一般都采用3D区或者VP1区的保守序列,而这两区域编码蛋白都具有免疫原性,一般会用于基因重组活疫苗研究中,导致疫苗株病毒与田间野毒无法区分^[3-4]。本研究采用5'非编码区设计引物,一方面实现了重组疫苗株毒与田间野毒鉴别,另一方面也为实时定量PCR检测DHAV-1提供一种补充方法。

1 材料与方法

1.1 材料 DHAV-1(ATCC株)、DHAV-3(B54株)、禽呼肠孤病毒(ARV)由中国农业大学传染病

实验室惠赠;鸭瘟疫苗病毒(DPV AV1222株)、新城疫疫苗毒(NDV HB1株)、禽流感疫苗毒(AIV-H9)、传染性支气管炎疫苗毒(IBV H120株)由武汉中博生物股份有限公司保存;大肠杆菌Trans DH5a感受态细胞,购自北京全式金生物公司。5份疑似鸭病毒性肝炎雏鸭肝脏病料(WHC、THL、GSH、YMC、HX),为湖北孝感地区养殖户送样。

1.2 主要试剂与仪器 RNA提抽试剂盒,胶回收纯化试剂盒, M-MLV反转录酶(RNase H⁻), Oligo(dT)引物, pMD18-T载体试剂盒, Taq DNA聚合酶, RNase Inhibitor, Premix Ex TaqTM(Probe qPCR)等均购自大连宝生物工程有限公司。荧光定量PCR仪(ABI, USA), 紫外分光光度计(Thermo Scientific, USA)。

1.3 引物与探针设计 根据GenBank所发表的DHAV-1 5' UTR序列,利用Primer Express 3.0设计特异性引物与探针。DHAV-1F: 5'-AGAG-GAAGGCTAGTCTATG-3', DHAV-1R: 5'-GTGT-GCCTACTCTAGACC-3'; TaqMan探针DHAV-1PB: 5'-FAM-AACCTTGGTAGTC-BHQ-3'; 另根据参考文献合成一对可检测不同血清型DHAV通用引物, For: 5'-GGAGGTGCTGCTGAAA-3', Rev: 5'-CCTCAGGAAGTCTCTGGA-3', 扩增产物250 bp^[5]。两对引物由大连宝生物工程有限公司合成, TaqMan探针由上海英骏生物技术有限公司。

1.4 RNA提取与cDNA合成 参照RNA提抽试剂盒说明书,提取DHAV-1(ATCC株)RNA,以提取的DHAV-1RNA为模板,进行反转录,制备cDNA模板。反转录反应体系与反应条件为:模板RNA 5.0 μL、Oligo(dT) Primer (50 μmol/L) 1 μL、5×M-MLV buffer 2.0 μL、dNTPs (10 mmol/L each) 0.5 μL、RNase Inhibitor (40 U/μL) 0.25 μL、M-MLV (200 U/μL) 0.5 μL,加RNase free dH₂O补充至10 μL,混合均匀后,42℃保温1 h。

1.5 标准品的制备 以DHAV-1F/DHAV-1R引

物对 1.4 制备的 cDNA 模板,进行 PCR 扩增,扩增体系与反应条件为:10×PCR buffer 6.0 μL、dNTPs (2.5 mmol/L each) 5.0 μL、上下游引物各 1.0 μL、Taq DNA 聚合酶 0.5 μL、cDNA 5.0 μL, RNase free dH₂O 补充至 50 μL;反应条件为:95 ℃,5min 预变性,进入循环,95 ℃变性 30 s;55 ℃退火 30 s;72 ℃延伸 30 s,共 30 个循环;72 ℃总延伸 10 min。扩增产物经胶回收试剂盒纯化后克隆到 pMD-18T 载体上。将重组质粒进行 PCR 和测序鉴定,鉴定均正确的重组质粒,使用分光光度计进行浓度测定,根据公式计算出每微升所含的拷贝数,作为定量标准品^[6]。

1.6 荧光定量 PCR 检测方法反应条件的建立与优化以 1.4 制备的 cDNA 为模板,参考 Premix Ex Taq™ (Probe qPCR) 试剂盒说明书,对 PCR 反应条件和体系进行优化,包括引物与探针浓度的调整、退火温度、阳性检测 CT 值的确定,并对检测方法进行特异性、敏感性、重复性等方面的研究^[7]。

1.6.1 标准曲线建立 以 1.5 制备的标准品质粒 (1.0×10⁸ copies/μL) 为模板,用 RNase free dH₂O 进行 10 倍梯度稀释,对其中的 5 个梯度浓度溶液的标准品 (1.0×10⁷~1.0×10³ copies/μL) 进行检测,以标准品拷贝数作为横坐标,不同标准品浓度的检测 CT 值作为纵坐标,绘制标准曲线。

1.6.2 敏感性测定 将标准品进行 10 倍梯度稀释,对 1.0×10³~1.0×10⁰ copies/μL 浓度的标准品稀释液进行检测,以检验该方法的敏感性。

1.6.3 特异性试验 提取 DHAV-1 (ATCC 株)、DHAV-3 (B54 株)、DPV、NDV、AIV (H9)、ARV、IBV 核酸 RNA,反转录成 cDNA 模板 (DPV 除外) 后,应用优化好的实时定量 PCR 反应体系和条件对上述样品进行检测,检测该方法的特异性。

1.6.4 重复性试验^[8] 分别取 3 份不同浓度 (1.0×10⁷、1.0×10⁵、1.0×10³ copies/μL) 的标准品进行实时定量 PCR 组内和组间重复性检测,每份样品作 3 个重复,计算变异系数 (CV)。

1.7 临床样本的检测

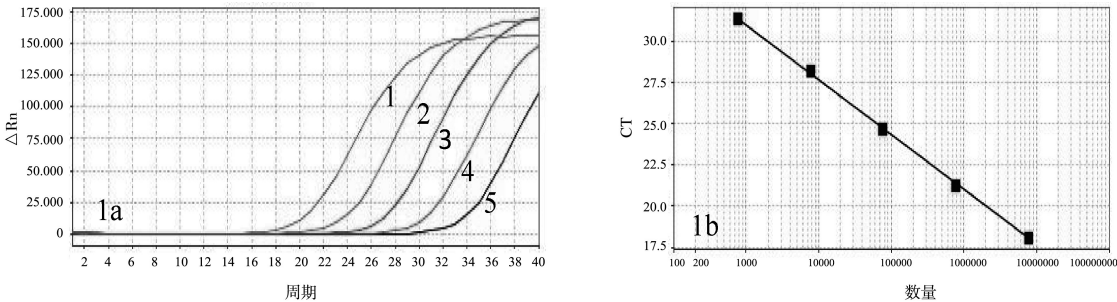
1.7.1 临床样本的测序检测 按 1.4 方法提取 5 份鸭肝病料组织总 RNA,制备 cDNA。以此 cDNA 为模板,使用 DHAV 通用检测引物 For/Rev 进行扩增,按 1.5 方法将扩增产物克隆到 pMD-18T 载体上,将重组质粒进行测序,并对序列进行分析,以确定其血清型。

1.7.2 临床样本的实时定量 PCR 检测 按 1.4 方法提取 5 份鸭肝病料组织总 RNA,制备 cDNA。以此 cDNA 为模板,应用优化好的 qPCR 反应体系和条件对上述样品进行检测。

2 结果

2.1 反应条件优化 优化后的 PCR 反应体系为: Premix Ex Taq 10 μL、上下游引物 (10μmol/L) 各 0.6 μL、TaqMan 探针 (10μmol/L) 0.5 μL、cDNA 模板 4 μL, DEPC dH₂O 补充到 20 μL 体系。反应程序为:95 ℃预变性 10 s;95 ℃变性 5 s,54 ℃退火 35 s (收集荧光信号),共 40 个循环。阳性检测 CT 值在 38.0 以下为阳性,大于 38.0 或无检测 CT 值均为阴性。

2.2 标准曲线的建立 结果显示,在 1.0×10⁷~1.0×10³ copies/μL 的模板稀释度范围内可得到良好的扩增曲线 (图 1),扩增效率为 98.5%。根据扩增曲线绘制的标准曲线 (图 2),标准曲线的方程为:Y=-3.26lgX+40.86 (Y 表示检测 CT 值,X 表示检测中模板拷贝数),相关系数 (R²) 为 0.999,提示误差较小,模板拷贝数与检测 CT 值具有良好的线性关系。



1-5:1.0×10⁷~1.0×10³ copies/μL 标准品

图 1 DHAV-1 荧光定量 PCR 检测方法的扩增曲线 (1a) 和标准曲线 (1b) 图

2.3 敏感性试验 对 $1.0\times10^3\sim1.0\times10^0$ copies/ μL 的标准品进行检测, 根据扩增曲线可知, 标准品浓度为 $1.0\times10^3\sim1.0\times10^1$ copies/ μL , 均呈现明显的扩增曲线, 检测 CT 值分别为: 32.48、34.99、36.87; 但 1.0×10^0 copies/ μL 和阴性对照均无扩增曲线, 也无检测 CT 值, 由此可判定该方法最低可检测 10 copies/ μL (图 2)。

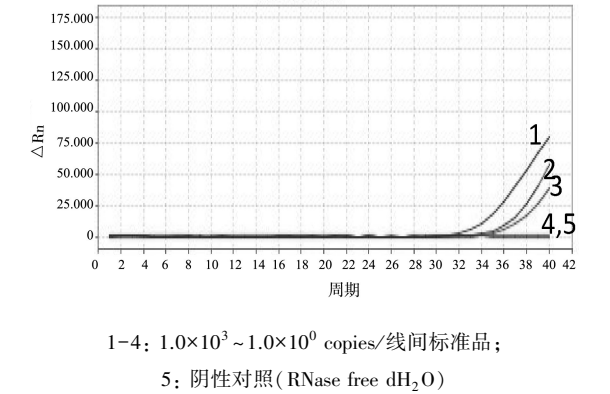


图 2 DHAV-1 荧光定量 PCR 检测方法敏感性试验结果图

2.4 特异性试验 用优化好的检测方法检测

DHAV-1、DHAV-3、DPV、NDV、AIV (H9)、ARV、IBV, 结果只有 DHAV-1 有扩增曲线, 其他病毒及阴性皆无扩增曲线 (图 4)。结果表明所建立的方法与其他病毒无交叉反应, 具有良好的特异性。

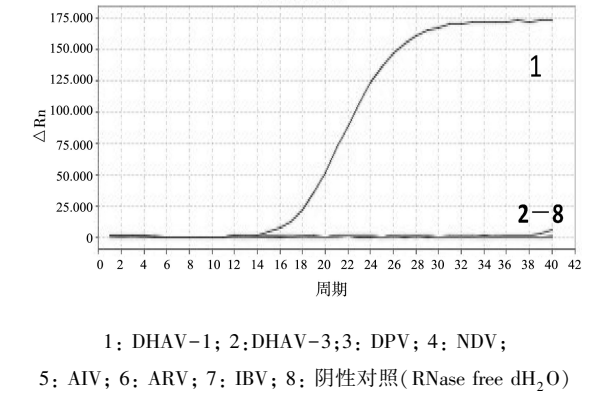


图 3 DHAV-1 荧光定量 PCR 检测方法特异性试验结果图

2.5 重复性试验 对 3 份不同浓度的标准品进行检测, 根据检测 CT 值, 计算组内和组间变异系数 (CV), 结果显示 CV 值均小于 3% (表 1), 表明该检测方法重复性好, 检测结果可靠。

表 1 不同拷贝数模板对应的检测 CT 值及变异系数测定结果

标准品浓度	组内重复				组间重复			
	CT 值 1	CT 值 2	CT 值 3	CV/%	CT 值 1	CT 值 2	CT 值 3	CV/%
1.0×10^7	18.17	18.42	17.90	1.43%	18.31	17.46	18.39	2.36%
1.0×10^5	25.30	24.54	24.73	1.59%	24.35	25.56	24.85	2.43%
1.0×10^3	31.65	32.85	32.03	1.86%	31.31	32.85	33.03	2.83%

2.6 临床样本的检测 5 份临床疑似鸭肝炎的临床病料, 用 DHAV 通用引物检测, 均为阳性, 将扩增产物构建测序质粒, 进行测序, 测序分析结果表明, 有 3 份为 DHAV-3 感染, 有 2 份为 DHAV-1 感染。用建立的实时定量 PCR 方法进行检测, 其检测结果与测序结果一致, 2 份 DHAV-1 感染的病料检测结果为阳性, 3 份 DHAV-3 感染的病料, 检测结果为阴性。结果表明, 所建立的实时定量 PCR 可用于临床病料的检测。

3 讨论与小结

DHAV-1 在 20 世纪 60 年代, 在我国就有发病报道, 一直到目前仍然在我国鸭养殖区广泛流行。关于 DHAV-1 的检测, 目前已报道的检测方法主

表 2 临床病料实时定量 PCR 法检测结果

样本名称	测序	CT 值	病毒含量/ (copies · μL^{-1})	判定
WHC	DHAV-1	21.80	7.0×10^5	+
THL	DHAV-3	-	-	-
GSH	DHAV-1	26.98	1.8×10^4	+
YMC	DHAV-3	-	-	-
HX	DHAV-3	-	-	-

要有病毒鸭胚分离、琼脂扩散试验、间接血凝试验、免疫胶体金电镜技术、间接 ELISA 和逆转录环介导等温扩增 (RT-LAMP)、RT-PCR 以及实时定量 RT-PCR 等, 另外还有用于鉴别检测 DHAV-1 与 DHAV-3 的双重 RT-PCR 及双重实时定量 RT-PCR 等^[5,9-10]。

实时定量 PCR 技术以其敏感、特异、快速的优势在 DHAV-1 的检测方面,也得到很好的应用,但在检测靶基因设计方面,一般以 3D 区或者 VP1 区的保守序列较为常见,尚未见针对于 5' 非编码区 TaqMan 探针检测方法的报道。近年来关于 DHAV-1 重组活疫苗研究中,一般考虑将 3D 蛋白或者 VP1 蛋白作为免疫原性蛋白,进行基因重组,因此,基因重组疫苗病毒可能会给田间野毒的检测造成干扰。本研究通过对 DHAV 多序列比对的基础上,在 5' 非编码区的保守区,设计引物及探针,一方面实现了重组疫苗株毒与田间野毒鉴别检测,另一方面也为实时定量 PCR 检测 DHAV-1 提供一种补充方法。

对于实时定量 RT-PCR 检测方法中使用的标准品,一般为采用体外转录合成的 cRNA,在对 RNA 病毒进行定量检测过程时,因为反转录和 PCR 扩增在同一体系中,所以对检测样本的定量比较准确^[11-12]。但是标准品 cRNA 的制备过程比较繁琐,且容易降解。考虑到目前商品化反转录酶,反转录效率较以前有了很大提高,可达到 90% 以上,另外质粒保存相对稳定,所以我们建立的方法中使用质粒作为标准品,对待样本中的反转录产物 cDNA 进行定量,来估算待检样本中病毒 RNA 的拷贝数,具有很好的实用性。

综上所述,本研究所建立的 DHAV-1 实时定量 PCR 检测方法,特异性好,与 DHAV-3 等无交叉反应,敏感度高,最低可检测到 10copies/ μ L,可实现对临床病料准确检测。但由于目前病料较少,还有待于进一步补充相关临床病料检测研究,以期为 DHAV-1 感染快速检测以及其流行病学调查等研究,提供了一种灵敏、准确的检测补充方法。

参考文献:

- [1] Fauquet C M, Mayo A, Maniloff J, *et al.* Virus Taxonomy[M]// Eighth Report of International Committee on Taxonomy of Viruses. Calif: Elsevier Academic Press, 2005: 757-778.
- [2] Wang L, Pan M, Fu Y, *et al.* Classification of duck hepatitis virus into three genotypes based on molecular evolutionary analysis[J]. Virus Genes, 2008, 37(1): 52-59.
- [3] Fu Y, Chen Z, Li C, Liu G. Protective immune responses in ducklings induced by a suicidal DNA vaccine of the VP1 gene of duck hepatitis virus type 1[J]. Veterinary microbiology, 2012, 160(3-4): 314-318.
- [4] 张 婧, 董嘉文, 郭霄峰. 携带 I 型鸭肝炎病毒 3D 基因的重组鸭瘟病毒的构建[J]. 广东畜牧兽医科技, 2011(01): 32-34+38.
- [5] Yang L, Li J, Bi Y, *et al.* Development and application of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of Duck hepatitis A virus type 1[J]. Virus Genes, 2012, 45(3): 585-589.
- [6] 孙庆歌, 杨银辉, 张维军, 等. 5 种人兽共患病病毒多重 RT-PCR 检测方法的初步建立[J]. 中国预防兽医学报, 2009(10): 785-789.
- [7] 孙庆歌, 薛 霜, 肖爱芳, 等. 血清 3 型鸭甲型肝炎病毒实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立与初步应用[J]. 中国兽药杂志, 2013(04): 1-5.
- [8] 岳 锋, 朱艳平, 银 梅, 等. 猪瘟病毒 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 中国畜牧兽医, 2014(06): 18-22.
- [9] Kim M C, Kwon Y K, Joh S J, *et al.* Differential diagnosis between type-specific duck hepatitis virus type 1 (DHV-1) and recent Korean DHV-1-like isolates using a multiplex polymerase chain reaction[J]. Avian Pathology, 2008, 37(2): 171-177.
- [10] Yang M, Cheng A, Wang M, *et al.* Development and application of a one-step real-time Taqman RT-PCR assay for detection of Duck hepatitis virus type 1[J]. Journal of Virological Methods, 2008, 153(1): 55-60.
- [11] Anchun C, Mingshu W, Hongyi X, *et al.* Development and application of a reverse transcriptase polymerase chain reaction to detect Chinese isolates of duck hepatitis virus type 1[J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 77(3): 332-336.
- [12] 陈玉环. I 型与新 I 型鸭肝炎病毒分离鉴定及实时荧光定量 RT-PCR 方法的建立[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013.

(编辑:李文平)