

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.04.02

牛布鲁氏菌病、结核、炭疽、口蹄疫、病毒性腹泻 黏膜病、副流感、传染性鼻气管炎可视化基因芯片 检测方法的建立

魏春霞^{1,2}, 孙 淼², 赵 炜², 陈延飞², 刘怀东², 张 敏¹,
李 岭², 陈 建², 才学鹏^{2*}, 曾巧英^{1*}, 薛青红^{2*}

(1. 甘肃农业大学, 兰州 730070; 2. 中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2019-03-12 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 04-0006-10 [中图分类号] S852.6

[摘要] 针对现有牛病病原检测方法指标单一, 操作复杂的现状, 拟建立一种可高效检测牛布鲁氏菌病、结核、炭疽、口蹄疫、病毒性腹泻黏膜病、副流感、传染性鼻气管炎的基因芯片技术。根据已公布的各病原核酸序列, 设计引物和探针。利用多重 PCR 方法扩增目的片段, 扩增产物与探针特异性杂交, 芯片反应显色后肉眼观察进行检测结果判定。优化反应条件、建立检测方法, 同时对检测方法的灵敏度、可重复性、特异性、保存期等进行评价。结果显示, 该基因芯片检测方法单一病原灵敏度检测可达 1.0×10^{-6} ng/ μ L, 混合病原灵敏度检测可达 1.4×10^{-5} ng/ μ L; 各病原间无交叉反应, 检测健康牛血清、组织, 牛流行性热病毒也均无响应; 针对同一阳性质控品, 芯片重复率达 100%。保存期试验表明, 芯片在 2~8 °C 至少可保存 6 个月。检测 30 份临床样本, 结果与标准方法结果一致。实验建立的方法具有高通量、高灵敏度、高特异性等特点, 可在 3 h 内完成同时对七种牛重要疫病的检测, 在牛群疫病诊断、净化及流行病学调查等方面有良好的应用前景。

[关键词] 牛布鲁氏菌病; 结核; 炭疽; 口蹄疫; 病毒性腹泻黏膜病; 副流感; 传染性鼻气管炎; 多重 PCR; 基因芯片

Establishment of Visible Gene Chip Detection Method for Brucella, Anthrax, Bovine Tuberculosis, Foot-and-Mouth Disease, Bovine Viral Diarrhoea, Bovine Parainfluenza, Bovine Infectious Rhinotracheitis

WEI Chun-xia^{1,2}, SUN Miao², ZHAO Wei², CHEN Yan-fei², LIU Huai-dong², ZHANG Min¹,
LI Ling², CHEN Jian², CAI Xue-peng^{2*}, ZENG Qiao-ying^{1*}, XUE Qing-hong^{2*}

(1. Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

基金项目: 国家重点研发计划课题“牛羊重大动物疫病的诊断与检测新技术研究”(2016YFD0500901)

作者简介: 魏春霞, 硕士研究生, 从事预防兽医学研究; 孙 淼, 博士研究生, 从事兽用病毒类生物制品检验与研究, 为共同第一作者。

通讯作者: 薛青红, E-mail: 732574709@qq.com; 曾巧英, E-mail: 820610738@qq.com; 才学鹏, E-mail: caixp@vip.163.com

Corresponding authors: XUE Qing-hong, E-mail: 732574709@qq.com; ZENG Qiao-ying, E-mail: 820610738@qq.com; CAI Xue-peng, E-mail: caixp@vip.163.com

Abstract: In view of the fact that the bovine pathogen detecting method has a single detection index and a complicated operation, this study is intended to establish a visible gene chip detection method for simultaneous detection of Brucella, Anthrax, Bovine tuberculosis, Foot-and-Mouth disease, Bovine viral diarrhoea, Bovine parainfluenza, Bovine infectious rhinotracheitis. Primers and probes were designed based on the published nucleic acid sequences of each pathogen. The multiplex PCR method was used to amplify the target fragment, and the amplified product was specifically hybridized with the probe. After the color reaction on chip, the result was determined by visual observation. The detection method was further optimized before establishment, and the sensitivity, repeatability, specificity, and shelf life were assessed. The chip detection method was of high sensitivity, good repeatability and specificity. When detecting the single pathogen, the sensitivity can reach 1.0×10^{-6} ng/ μ L. The seven mixed pathogens can reach 1.4×10^{-5} ng/ μ L. There is no cross-reaction among the seven pathogens, the healthy bovine samples, and bovine epizootic fever samples. For the same samples, the same batch and different batches of chips have consistent results. The chip shelf life test shows that the chip can be stored for 6 months at 2~8 °C. The 30 clinical samples test results were consistent with the results of the standard detection methods. The method established in this study is a high-throughput method with high specificity and high sensitivity, which can simultaneously detect the seven important diseases in 3 hours, and can be potentially applied in diagnosis and epidemiological investigation of bovine diseases.

Key words: Brucella; Anthrax; *Mycobacterium tuberculosis*; Foot-and-Mouth disease; Bovine viral diarrhoea; Bovine parainfluenza; Bovine infectious rhinotracheitis; gene chip; multiplex PCR

伴随我国居民生活水平的提高及膳食结构的变化,牛肉、牛奶等产品市场需求旺盛,进而促进了养牛业的发展。牛布鲁氏菌病、结核、炭疽、口蹄疫、病毒性腹泻黏膜病、副流感、传染性鼻气管炎这几种牛病常发病,威胁着这一产业的发展。因此,为了满足民众日常需求,减少养殖场和养殖户的经济损失,建立一种快速高效检测这几种牛病原的方法用以这些疾病的预防和防控十分必要。

牛布鲁氏菌(*Brucella*, Bru)、结核杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)、炭疽杆菌(*Anthrax*)、口蹄疫病毒(Foot-and-Mouth disease virus, FMDV)、牛病毒性腹泻病毒(Bovine viral diarrhoea virus, BVDV)、牛副流感病毒 3 型(Bovine parainfluenza virus, BPIV3)、牛传染性支气管炎病毒(Bovine infectious rhinotracheitis virus, IBRV)均易感牛,在不同程度上均可造成牛消瘦、母牛流产,甚

至导致死亡。目前,常用的布病检测方法有琥红平板实验、凝集试验及补体结合试验;炭疽的检测方法主要依赖微生物学及血清学方法,包括 Ascoli 氏反应和 PCR;结核的检测常用过敏反应等来鉴定;FMDV、BVDV、BPIV3、IBRV 的检测主要以病原分离、血清学试验和分子生物学检测方法为主。上述检测方法均存在检测指标单一、操作复杂、费时费力等问题^[1],给牛群疫病诊断带来一定困难。本文针对牛群主要发生疫病病原诊断方法存在的问题拟研究建立一种可以快速高效同时检测七种牛疫病病原的基因芯片检测技术,用于牛群疫病诊断及流行病学调查。

1 材料与方法

1.1 材料 本实验所用检测病原牛布鲁氏菌疫苗、结核分支杆菌疫苗、炭疽芽孢杆菌弱毒苗、牛病毒性腹泻病毒、牛副流感病毒、牛传染性支气管炎

病毒、牛流行性热病毒由中国兽医药品监察所 (IVDC) 保存并提供, 口蹄疫病毒疫苗由金宇保灵生物有限公司提供。所用临床样本采集

自某养殖场, 由中国兽医药品监察所保存。实验用病原信息见表 1。

表 1 病原信息

Tab 1 Pathogens information

病原	菌/毒株代码	病原信息	来源
Brucella	Brucella-A19	疫苗毒株	IVDC
	Brucella-S2		
	Brucella-M5		
	Brucella-M590		
Anthrax	CVCC40-205	弱毒株	IVDC
FMDV	OJMS	灭活抗原	Jinyu baoling biological medicine co., LTD
	AsiaI/JSL/ZK/06		
	Re-A/WH/09		
	O/MYA98/BY/2010		
IBRV	IBRV-LN01	灭活病毒	IVDC
BVDV	BVDV-C24V	灭活病毒	IVDC
BPIV3	/	灭活病毒	IVDC
MTB	CVCC-68002	疫苗毒株	IVDC
Bovine epizotic fever virus	/	灭活病毒	IVDC

1.1.1 主要试剂 核酸提取试剂盒 AXYGEN Axyprep 体液病毒 DNA/RNA 小量试剂盒, 逆转录试剂盒 Prime-Script One Step RT-PCR Kit Ver2 (TaKaRa), PMD 18-T Vector Cloning Kit (TaKaRa), TOP 10 感受态细胞, MakerII (康为世纪), 2×Taq MasterMix、普通质粒小量提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒 (北京天根生化科技有限公司), SA-HRP (Jackson), Pierce™ 1-Step Ultra TMB Biotting Solution (Thermo)。

1.2 方法的建立

1.2.1 引物探针的设计 以布鲁氏菌的外膜蛋白 (OMP25) 保守序列为靶基因设计引物; 以炭疽芽孢杆菌的 POX1 质粒和 16SrDNA 基因片段为模板设计引物探针; 参照文献^[2] 设计牛结核分枝杆菌引物及探针; 副流感病毒 N 蛋白常作为分子诊断的靶基

因, 针对 N 基因设计引物及探针^[3]; IBRV 有四类糖蛋白, 针对 gB 蛋白基因的保守区域设计引物探针^[4]; BVDV E2 基因是病毒的主要保护性抗原编码基因, 在 E2 基因的 5'端是不同毒株的主要变异区域, 故选择 BVDV 5'-非翻译区 (5'-Untranslated region, 5'-UTR) 设计引物和探针^[5]; 比较 FMDV 全基因组进行多序列比较, 发现 FMDV 7 个血清型的保守基因是 3D 基因, 进而根据该保守序列设计引物及探针。以上引物设计及性能评价用 oligo7 软件。引物探针具体信息见表 2 和表 3。

1.2.2 芯片的制备 探针用磷酸缓冲液稀释至终浓度为 6 μmol/L, 设置点样仪参数为 100 drop, 按照点样顺序将各探针点样于纳米膜上。点样后将膜基片置于湿度为 40%~60%, 温度为 22~25 °C 条件下过夜晾干, 2~8 °C 存放。芯片点样模式见图 1。

表 2 引物信息

Tab 2 Primers information

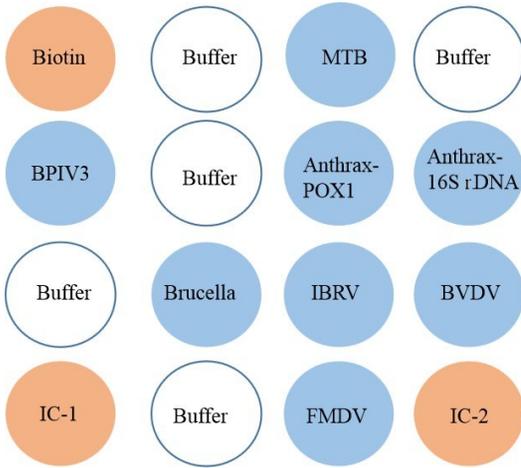
引物名称	引物序列(5'→3')	产物大小/bp	靶基因序列
Brucella	F CGTCGTCCAAGCCGTTGT-Biotin	137	GTCAAGCAGGGCTTTGAAGGCTCGTGCCTGTC- CCGCGTTGGCTACGACCTGAACCCGTTATGC- CGTACCTCACGGCTGGTATTGCCGTTCCGAG- ATCAAGCTTAACAACGGCTTGGACGACGAAA- GCAAGTCCG
	R GTCAAGCAGGGCTTTGAAGG		
Anthrax (16SrDNA)	F AAAACTACCGATGCCGCTA	143	ACCCGCAACAATACTCACAGCAATACCAACC- ATACATGCAGCATCATCCGACCAAATGATCC- CTCCTCAAATGTATGAATCAAACGAAACGGC- GGCGTGCAGCAACTACAGCAGCATCAAGTAG- CGGCATCGGTAGTTTT
	R ACCCGCAACAATACTCAC-Biotin		
Anthrax(POX1)	F ACCGTATATCCTTCTACCTCT-Biotin	110	TTTATCAAAGTAAAGAATAGCGATGAATATAC- ATTTGCTACTTCCGCTGATAGTTACCTAACAAAT- CTGGGTAGATACCAAGAAGTATTAATAAAA- GCTTCTAATTCTA
	R TCTAGTGATAACTTACAACCTGCC		
FMDV	F GCGAGTCTGCCACGGA	90	TACAAACCTGTGATAACTTCGAATCGCCTCGA- GGCTATCCTCTCCTTTGAGCCCGCTGGGACCA- TACAGGAGAAGTTGATCTCCGTGGCA
	R ACTGGGTCTACAAACCTGTGA-Biotin		
IBRV	F CGGTGCCGTAACMGCC	103	TTGGCGGGACTACGTGTACTACGAGAACTAC- GCGTACGTGGCGGGCTCCCGCTCCGGAGCT- GGAGGTATCAGCACCTTGTGGACCTAAACC- TCACGGG
	R TCGAGTGGARGTAAGAAAAGG-Biotin		
BVDV	F TGGGATACATAGTAAGAAAAATCAGG	148	AGTCTCAGTGGTTCCAGCCTTGGAAATAAAG- GTCTCGAGATGCCACGTGGACGAGCGGATGCC- CAAAGCACATCTTAACCTGAGCGGGTCCGCC- CAGGTAAGCAGTTTTAAACCGACTGTTACGA- ATACAGCCTGATAGGGTCT
	R CGAAATGAAAATTTTATATGGAAT-Biotin		
BPIV3	F CGCCAAGTACAAGAAGCTGATGA-Biotin	117	ATTCGACGAAAATTAGACATTCCTCAAGACAA- GAGAGTTGTGTCTGTCGGAATGTCCTAAACA- ATGCAGATACTGCATCAAAGATAGATTCTTA- GCAGGTCTAATGATAGGAGT
	R TACACGGAGTTGGCCGTGATCTTGTA		
MTB	F CATCTTGCTTCGGCGTGTCC-Biotin	97	GTAACCGTCTGAATCAACGTCATGATCGTGCT- ACCGATGCGCCAAAGTTGGCTTGTATTGCACAA- GGTGTGCAGACGGAGAGGATCAGATTTGTGAGA
	R CTCTGAAATTCGCCTCTGTAGTGC		

表 3 探针信息

Tab 3 Probes information

探针名称	序列(5'→3')	探针长度/bp
Brucella-P1	CTGAACCCGGTTATGCCGTACCTCAC	26
16SrDNA-P1	ATCCCCGAGCAAATGATCCCT	20
POX1-P1	CCGTGACAATGCATGAATCCCT	22
FMDV-P1	TCCTTTGCACGCCGTGGGAC	20
IBRV-P1	TGGAGCCCGTAAACATATTGAACTC	25
BVDV-P1	ATGAGCCATCCATTTTCCAACCTCT	24
BPIV3-P1	TGCATCGAGTTCTAGATCTCGCGGT	25
MTB-P1	CATCAGCCTGGCCGCACGAGTTA	23

1.2.3 单一病原核酸的提取、扩增 参照核酸提取试剂盒说明书提取各病原的核酸,优化退火温度等 PCR 反应条件。将 BPIV3、BVDV、FMDV 核酸(遗传物质为 RNA),Brucella、IBRV、MTB、Anthrax 核酸(遗传物质为 DNA)分别按常规体系扩增。反应条件分别为 50 ℃ 30 min,94 ℃ 4 min,94 ℃ 45 s,56 ℃ 1 min,72 ℃ 30 s,35 个循环,72 ℃ 10 min;94 ℃ 5 min,94 ℃ 45 s,56 ℃ 1 min,72 ℃ 30 s,35 个循环,72 ℃ 10 min。



Biotin、IC-1、IC-2 为阳性质控点, Buffer 为阴性质控点

图 1 芯片点样模式

Fig 1 The chip spotting model

1.2.4 混合样品核酸的扩增 应用多重 PCR 方法对混合样品核酸进行扩增, 通过对其退火温度、引物用量等反应条件优化后, 将样品核酸按表 4 体系进行扩增。扩增条件为 50 °C 30 min, 94 °C 4 min, 94 °C 45 s, 56 °C 1 min, 72 °C 30 s, 35 个循环, 72 °C 10 min。

表 4 混合样品核酸扩增体系

Tab 4 Mixed sample nucleic acid amplification system

序号	试剂/引物名称	A 管/ μL	B 管/ μL
1	2×1 Step Buffer	12.5	12.5
2	Brucella F/R	0.7	/
3	MTB F/R	0.4	/
4	Anthrax-POX1 F/R	/	1.0
5	Anthrax-16SrDNA F/R	/	1.0
6	FMDV F/R	/	0.6
7	BVDV F/R	0.6	/
8	BPIV3 F/R	0.5	/
9	IBRV F/R	0.4	/
10	F1/R1/R2	1.0	1.0
11	样品核酸	2.0	2.0
12	质控点阳性质粒	1.0	1.0
13	Primescript 1 step Enzyme mix	0.5	0.5
14	DD H ₂ O	0.8	0.8
	合计	25.0	25.0

1.2.5 基因芯片的杂交、洗涤与可视化检测 取 20 μL PCR 产物, 加入到 100 μL 的杂交液中, 沸水浴 5 min 后加入到已 47 °C 预热芯片中, 200 r/min 反应 20 min。弃去反应液后用 47 °C 预热的洗涤液, 200 μL /孔淋洗三遍, 47 °C 孔板孵育器洗 10 min。杂交液 1 : 2000 稀释 SA-HRP, 100 μL /孔, 200 r/min, 室温反应 10 min。洗涤液室温淋洗 2 次, 每孔加入 60 μL TMB 避光显色。拍照记录实验结果。

1.2.6 结果判定 阴性质控点不显色, 阳性质控点的颜色为明显强于阴性质控点的蓝紫色, 两个阳性质控点至少有一个显色为有效实验结果。如被测样品所在探针点不显色, 即为阴性; 如果被测样品所在探针点为蓝紫色, 则为阳性。

1.2.7 引物的特异性试验 将各病原样品扩增后, 2% 琼脂糖凝胶电泳。将胶回收产物送往华大基因公司测序。

1.2.8 探针的特异性试验 将七种病原、健康牛血清、牛流行性热病毒, 分别按照 1.2.4 扩增后进行芯片检测。

1.2.9 芯片的灵敏度试验 各病原 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳之后, 将胶回收产物连接 pMD 18-T Vector, 连接产物转化至 TOP 10 感受态细胞中, 涂板, 选取大小适中的单个菌落培养, 菌液 PCR 后, 将 PCR 阳性的菌液送往测序公司测序。使用 DNA Star 和 NCBI Blast 分析测序结果, 同时将测序成功的阳性菌液扩增培养后提取质粒。将各阳性质粒定量后 10 倍倍比稀释, 扩增后分别与芯片反应, 进行单一阳性质粒灵敏度检测同时对其进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。再将七种病原质粒等浓度体积混合, 10 倍倍比稀释, 扩增后与芯片杂交, 进行七种阳性质粒混合灵敏度测定。

1.2.10 芯片的保存期试验 将浓度为 1.4×10^{-4} ng/ μL 的七种病原阳性混合质粒按照步骤 1.2.4 扩增, 与在 2~8 °C 保存 30 d、60 d、120 d、180 d 的芯片分别进行反应。

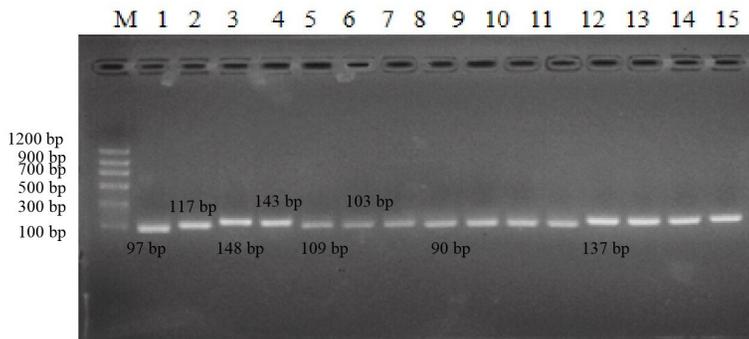
1.2.11 芯片的重复性检测 将同一质控样品的扩增产物用不同批次及同一批次内不同芯片进行检测。

1.2.12 芯片检测临床样品与国标方法检测的比对
 将 23 份牛血清、4 份牛肺组织、3 份牛肠组织临床样品提取核酸后,按照 1.2.4 方法进行扩增,扩增产物与芯片反应后记录检测结果,芯片反应操作同 1.2.5。同时将各临床样本参照《奶牛布鲁氏菌病 PCR 诊断技术 NY/T 1467-2007》、《动物炭疽诊断技术 NY/T 561-2015》、《结核病原菌实时荧光 PCR 检测方法 GB/T 27639-2011》、《口蹄疫检测技

术规范 SN/T 1181-2010》、《牛病毒性腹泻/粘膜病 检疫规范 SN/T 1129-2007》、《牛传染性鼻气管炎 检疫技术规范 SN/T 1164.1-2011》及中和试验进行检测。

2 结果与分析

2.1 引物的特异性评价 各病原扩增产物大小与前期设计一致(图 2),测序结果与设计目的片段相同。



M: DNA 分子质量标准;1: 结核杆菌; 2: 牛副流感病毒 3 型; 3: 牛病毒性腹泻病毒; 4: 炭疽-16SrDNA;
 5: 炭疽-POX1; 6,7: 牛传染性鼻气管炎病毒; 8-11: 口蹄疫病毒; 12-15: 布鲁氏菌

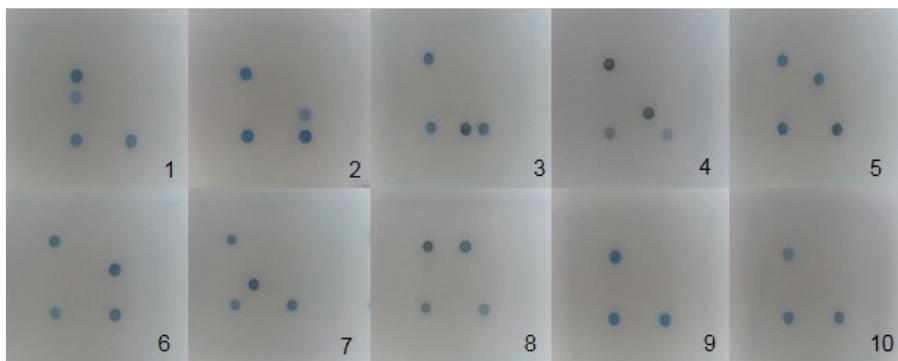
M: MakerII; 1: MTB; 2: BPIV3; 3: BVDV; 4: Anthrax-16SrDNA; 5: Anthrax-POX1; 6,7: IBRV; 8-11: FMDV; 12-15: Brucella

图 2 PCR 产物示意图

Fig 2 Schematic diagram of PCR product

2.2 探针的特异性评价 阴性质控点无响应,阳性质控点响应,各病原探针点特异性响应。健康牛血

清、牛流行性热病毒除阳性质控点响应外,其他探针均无响应(图 3),表明所设计探针特异性良好。



1: 牛副流感病毒 3 型; 2: 牛病毒性腹泻病毒; 3: 口蹄疫病毒; 4: 传染性鼻气管炎病毒; 5: 炭疽-POX1;
 6: 炭疽-16SrDNA; 7: 布鲁氏菌; 8: 结核杆菌; 9: 健康牛血清; 10: 牛流行性热病毒
 1: BPIV3; 2: BVDV; 3: FMDV; 4: IBRV; 5: Anthrax-POX1; 6: Anthrax-16SrDNA; 7: Brucella; 8: MTB;
 9: Healthy bovine serum; 10: Bovine epizotic fever virus

图 3 探针特异性响应实验结果

Fig 3 Probe specificity test results

2.3 芯片的灵敏度评价

2.3.1 单一阳性质粒灵敏度 单一阳性质粒芯片检测灵敏度可达 1.0×10^{-6} ng/ μ L,比普通 PCR 高出 10~100 倍(表 5)。

2.3.2 混合阳性质粒灵敏度 当混合阳性质粒稀释至浓度为 1.4×10^{-5} ng/ μ L 时,各病原探针点与阳性质控点均显色,阴性质控点无显色。浓度为 1.4×10^{-6} ng/ μ L 时,阳性质控点正常显色,阴性质

控点无显色,病原探针点只有 MTB、Anthrax 有响应(图 4)。故七种病原混合阳性质粒芯片检测灵敏度可达 1.4×10^{-5} ng/ μ L。

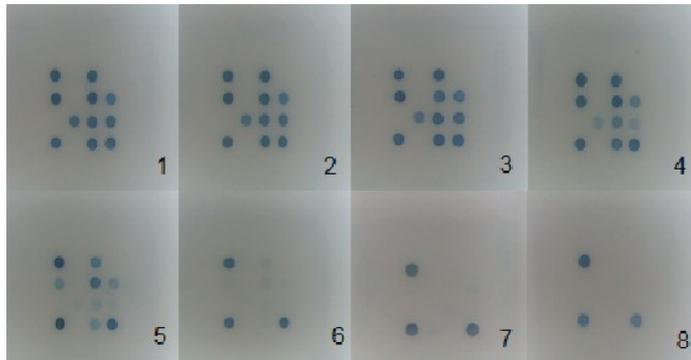
2.4 芯片的保存期评价 同一扩增产物与 2~8 $^{\circ}$ C 保存了 30 d、60 d、120 d、180 d 的芯片反应后,阳性质控点及七种病原对应探针点均有显色(图 5),表明在 2~8 $^{\circ}$ C,芯片至少可保存 180 d。

表 5 单一病原质粒检测灵敏度

Tab 5 Sensitivity of the single pathogen plasmid

ng/ μ L

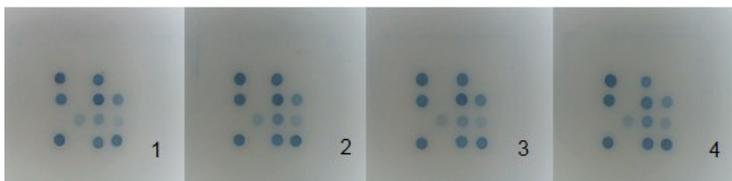
Method	Brucella	Anthrax	FMDV	BPIV3	BVDV	IBRV	MTB
PCR	10^{-6}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-5}
Micorarray	10^{-7}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-6}



1: 1.4×10^{-1} ng/ μ L; 2: 1.4×10^{-2} ng/ μ L; 3: 1.4×10^{-3} ng/ μ L; 4: 1.4×10^{-4} ng/ μ L; 5: 1.4×10^{-5} ng/ μ L; 6: 1.4×10^{-6} ng/ μ L; 7: 1.4×10^{-7} ng/ μ L; 8: Blank control

图 4 混合样品灵敏度检测结果

Fig 4 Mixed sample sensitivity experiment results



1: 30 days; 2: 60 days; 3: 120 days; 4: 180 days

图 5 不同保存期实验结果

Fig 5 The results of different storage experiment

2.5 芯片的重复性评价 用同一批样品的扩增产物与同一批次及不同批次的芯片进行反应。实验

结果表明,针对同一样品,同一批次及不同批次的芯片的检测结果均相同。芯片的可重复性为 100%。

2.6 临床样本的检测 30 份牛样品经芯片检测, 其中 Brucella 检出 1 份, BPIV3 检出 7 份, BVDV 检出 10 份, IBRV 检出 11 份, Anthrax、MTB、FMDV 未检出。经标准方法检测 Brucella 检出 1 份, BPIV3

检出 7 份, BVDV 检出 12 份, IBRV 检出 10 份, Anthrax、MTB、FMDV 未检出。其中单一病原感染占 63.3%, 两种病原混合感染比例为 36.7%。两种检测方法符合率为 98.6%。具体数据见表 6。

表 6 临床样品检测结果

Tab 6 Results of clinical samples

序号	芯片检测结果					国标 PCR 检测结果				
	Brucella	BPIV3	BVDV	IBRV	Anthrax、 MTB、FMDV	Brucella	BPIV3	BVDV	IBRV	Anthrax、 MTB、FMDV
1	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
6	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
7	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
8	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
12	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
13	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
14	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
15	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
16	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
17	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
18	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
19	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
20	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
21	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-
25	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: 阳性; -: 阴性

3 讨论与结论

基因芯片技术近些年来被广泛应用于医学领域,并在基因功能表达、致病机理、临床诊断、药物开发等研究方面取得突出成效^[6]。目前针对这七种牛群常发病病原,国内检测方法一般为病毒分离试验、血清中和试验等方法。此类传统方法都需要耗费较多的人力和时间,每次只能检测一种病原。本实验所研制的基因芯片检测方法具有操作简单、快速、便捷、高通量等特点。

基因芯片检测技术一般包括芯片的制备,样品的制备,样品与芯片的生物反应以及反应信号的检测与分析等^[7]。本研究建立的基因芯片方法以“0+X”纳米膜为支撑,与通常醛基化玻片为支撑的芯片检测方法相比可大大缩短杂交、洗涤、显色等芯片反应各步骤的时间,本检测方法仅需 3 h,而采用醛基化玻片的芯片则需要至少 5 h^[8-10]。在样品制备方面,根据各病原的特异性保守区域设计探针引物。据文献可知探针大小及靶 DNA 的长度等因素会影响杂交信号^[11],本实验各探针长度均在 25 bp 左右,各靶基因的目标片段均在 80~150 bp,保证了响应信号的稳定清晰。生物素与链霉亲和素有良好的亲和性^[12],用 5'端标记生物素的引物来扩增目的片段,探针与带有生物素的扩增产物结合后再与 HRP 标记的链霉亲和素反应,最后在底物显色液的作用下,探针点可显现出肉眼可见的蓝紫色响应点。方便肉眼观察,且不需要复杂仪器来记录实验结果。同时该方法在点样时设置了三个阳性质控点及 1 个阴性质控点,用以监测操作过程的各步骤是否有效,保证检测结果可靠性。

利用多重 PCR 扩增特异性片段,引物浓度及引物间相互作用会影响扩增效率^[13]。将七种病原的八对引物排列组合后进行双重 PCR,发现本实验中设计的炭疽的两对引物和口蹄疫的引物对其他五种病原的扩增效率影响较大,但对它们自身扩增没有影响,故将这两种病原分开进行扩增,同时对各引物的最佳浓度进行优化,建立完整的扩增体系。芯片反应温度对芯片检测结果有一定影响,优化芯片反应温度可得 47 ℃ 为最佳芯片反应温度。

对阳性质控质粒的浓度进行优化,使其在检测样品不同浓度下可一直响应,同时不影响样品扩增的灵敏度。最终确定其浓度为 1.0×10^{-3} ng/ μ L 时为最佳用量。

在确定的最优条件下,该基因芯片单一病原检测灵敏度可达 1.0×10^{-6} ng/ μ L,比普通 PCR 检测方法灵敏 10~100 倍,对七种混合病原的检测灵敏度达到 1.4×10^{-5} ng/ μ L。杨帆^[14]建立了一种 BPIV3、IBRV、BVDV 和 *Mycoplasma bovis* 多重 PCR 检测方法,对 BPIV3 和 BVDV 最低检测量分别为 100 pg 和 1 ng,对 IBRV 和 *Mycoplasma bovis* 的最低检测量分别为 10 pg 和 100 pg。

基因芯片检测技术的应用提高了感染性疾病分子诊断的质量,同时缩短了分析时间,是一种独立的可以筛选大量病理标本中多个基因的方法^[15-17]。用基因芯片方法与用国标方法同时检测 30 份临床样品,符合率为 98.6%。本研究所建立的方法可同时检测牛七种病原,七种病原间无交叉响应,与牛其他病原及健康牛血清组织也无响应,芯片重复率可达 100%,2~8 ℃ 保存期可达 180 d,完全可以满足实验室临床样品检测及流行病学监察。

参考文献:

- [1] 陈溥言. 兽医传染病学[M]. 中国农业出版社, 2006:146-147.
Chen B Y. Veterinary infectious disease[M]. China Agricultural Press, 2006:146-147.
- [2] Raviglonede, Sniderdej, Kochia. Globalepidemiology of tuberculosis morbidity and mortality of worldwide epidemic [J]. JAMA, 1995, 273(3): 220-226.
- [3] Hou P, Wang H, Zhao G, et al. Rapid detection of infectious bovine rhinotracheitis virus using recombinase polymerase amplification assays[J]. BMC Veterinary Research, 13(1): 386.
- [4] Fan Q, Xie Z, Xie Z, et al. Correction: Development of a GeXP-multiplex PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of six cattle viruses [J]. Plos One, 2017, 12(3): e0173829.
- [5] Chandler D, Bryant L, Griesemer S, et al. Integrated amplification microarrays for infectious disease diagnostics [J]. Microarrays, 2012, 1(3):107-124.
- [6] Ma H, Wu Y, Yang X, et al. Integrated poly(dimethylsiloxane)

- with an intrinsic nonfouling property approaching "Absolute" zero background in immunoassays [J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(15): 6338-6342.
- [7] 冯松凯. 检测动物皮毛中 6 种致病菌的基因芯片技术研究 [D]. 河南农业大学, 2013.
- Feng S K. Detection of the six pathogenic bacteria in animal furby DNA chip [D]. Henan Agricultural University, 2013.
- [8] Martínez, Miguel A, Soto-del Río, María de los Dolores, *et al.* DNA microarray for detection of gastrointestinal viruses [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2015, 53(1): 136-145.
- [9] Sultankulova K T, Kozhabergenov N S, Strochkov V M, *et al.* New oligonucleotide microarray for rapid diagnosis of avian viral diseases [J]. *Virology*, 2017, 14(1): 69.
- [10] Wang J, Jia H, Wen S, *et al.* Detection for CMV, LSV, LMoV infected lily with DNA microarray techniques [J]. *Virologica Sinica*, 2005, 20(4): 434-437.
- [11] Choi Y S, Yoon C W, Lee H D, *et al.* Efficient protein-ligand interaction by guaranteeing mesospacing between immobilized biotins [J]. *Chemical Communications*, 2004, 10(11): 1316-1317.
- [12] He Y P, Zhang Q, Fu M Z, *et al.* Development of multiplex PCR for simultaneous detection and differentiation of six DNA and RNA viruses from clinical samples of sheep and goats [J]. *Journal of Virological Methods*, 2017, 243: 44-49.
- [13] Li J, Chen S, Evans D H. Typing and subtyping influenza virus using DNA microarrays and multiplex reverse transcriptase PCR [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39(2): 696-704.
- [14] 杨帆, 徐娜, 雷宇. 牛副流感 3 型病毒、牛传染性鼻气管炎病毒、牛病毒性腹泻病毒和牛支原体多重 PCR 检测方法的建立 [J]. *中国预防兽医学报*, 2018, 40(5): 411-415.
- Yang F, Xu N, Lei Y. Establishment of a multiplex PCR for detection of bovine parainfluenza virus 3, infectious bovine rhinotracheitis virus, bovine viral diarrhea virus and *Mycoplasma bovis* [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2018, 40(5): 411-415.
- [15] Sultankulova K T, Chervyakova O V, Kozhabergenov N S, *et al.* Comparative evaluation of effectiveness of IAVchip DNA microarray in influenza diagnosis [J]. *The Scientific World Journal*, 2014, 2014: 1-11.
- [16] Liu L Y, Ye H Y, Chen T H, *et al.* Development of a microarray for simultaneous detection and differentiation of different tospoviruses that are serologically related to Tomato spotted wilt virus [J]. *Virology Journal*, 2017, 14(1): 1.
- [17] Wang L C, Pan C H, Severinghaus L L, *et al.* Simultaneous detection and differentiation of Newcastle disease and avian influenza viruses using oligonucleotide microarrays [J]. *Veterinary Microbiology*, 2008, 127(3/4): 217-226.

(编辑:李文平)