

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.02.03

H4、N2 和所有亚型禽流感 三重 RT-PCR 检测方法的建立

罗思思, 谢芝勋*, 李孟, 黄娇玲, 李丹, 谢丽基, 张民秀,
曾婷婷, 王盛, 张艳芳, 范晴, 谢志勤, 邓显文

(广西壮族自治区兽医研究所, 广西兽医生物技术重点实验室, 南宁 530001)

[收稿日期] 2019-10-25 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 02-0016-06 [中图分类号] S852.65

[摘要] 为建立一种同时检测 H4、N2 和所有亚型禽流感的方法, 分别针对 H4 亚型禽流感病毒 (AIV) HA 基因、N2 亚型 AIV NA 基因和所有亚型 AIV M 基因保守序列, 设计筛选出 3 对特异性引物, 优化引物之间的浓度, 对三重反应体系进行特异性和敏感性验证, 建立了 H4、N2 和所有亚型 AIV 三重 RT-PCR 检测方法, 并用该法对临床样品进行检测。建立的方法能特异性扩增 H4、N2 和所有亚型 AIV, 与其他禽病病原体不发生交叉反应; 对 H4、N2 和所有亚型 AIV 至少能检测到 6 pg/μL。在 185 份临床样品的检测中, 检出 4 份 H4、10 份 N2 和 19 份 AIV 阳性。所建立的三重 RT-PCR 方法特异性强、灵敏度高, 为快速检测 H4、N2 和所有亚型 AIV 提供了有效的方法。

[关键词] 禽流感; H4 亚型; N2 亚型; 三重 RT-PCR

Development of a Triplex RT-PCR Assay for Detection of H4, N2 and all Subtypes Avian Influenza

LUO Si-si, XIE Zhi-xun*, LI Meng, HUANG Jiao-ling, LI Dan, XIE Li-ji, ZHANG Min-xiu,
ZENG Ting-ting, WANG Sheng, ZHANG Yan-fang, FAN Qing, XIE Zhi-qin, DENG Xian-wen

(Guangxi Veterinary Research Institute, Guangxi Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Nanning 530001, China)

Corresponding author: XIE Zhi-xun, E-mail: xiezixun@126.com

Abstract: To develop a simultaneous detection method for H4, N2 and all subtypes avian influenza, the conserved sequences of HA gene of H4 subtype avian influenza virus (AIV), NA gene of N2 subtype AIV, and the M gene of all subtypes AIV were targeted, respectively, and three pairs of specific primers were designed and screened out. The concentration between primers was optimized. The specificity and sensitivity of the triplex assay

基金项目: 广西科技项目 (桂科 AA17204057, AD17195083, AD16380009); “广西八桂学者”专项 (2019.79); 国家“万人计划”领军人才专项 (W02060083)

作者简介: 罗思思, 副研究员, 从事畜禽病原学和防控技术的研究。

通讯作者: 谢芝勋。E-mail: xiezixun@126.com

were validated. A triplex RT-PCR assay for detection of H4, N2 and all subtypes AIV was developed. Clinical samples were detected with the developed method. The method amplified specifically H4, N2 and all subtypes AIV, and had no cross reaction with common avian pathogens, and at least can detect 6 pg/ μ L for H4, N2 and all subtypes AIV. Among 185 clinical samples, positive samples included H4 (4), N2 (10) and AIV (19). This developed triplex RT-PCR assay was specific and sensitive, and could be used for the detection of H4, N2 and all subtype AIV.

Key words: avian influenza; H4 subtype; N2 subtype; triplex RT-PCR

禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)属于正黏病毒科 A 型流感病毒属,是单股、分节段的 RNA 病毒,编码 8 个基因(PB1、PB2、PA、HA、NA、M、NP 和 NS)。根据血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)抗原性的不同,目前已发现 18 个 HA 亚型和 11 个 NA 亚型^[1]。部分 H5 和 H7 亚型为高致病性 AIV(Highly pathogenic AIV, HPAIV),可引起家禽大规模死亡,并可传染给人^[2]。大多数亚型 AIV 均为低致病性 AIV(Low pathogenic AIV, LPAIV)。

H4 亚型 AIV 属于 LPAIV,在流感调查项目中,发现 H4 亚型 AIV 常可分离到,已作为常分离出的主要亚型之一^[3-5]。N2 亚型 AIV 是最常见的 NA 亚型。快速检测 H4、N2 和所有亚型 AIV 的方法对于 AIV 的防控具有重要意义。目前,检测 AIV 的方法多为病毒分离鉴定,结果准确可靠,但存在操作步骤较多、耗时长的缺点,而在实际应用中更需要简单、快速的检测方法。多重 PCR 是在普通 PCR 基础上建立起来的,即在同一反应体系中加入多对引物从而实现多个目的基因同时扩增,具有快速、简便、成本低、可同时检测和鉴别多种病原体等特点,已被广泛应用于病原微生物的检测^[6-8]。本研究旨在利用多重 RT-PCR 技术,建立一种特异、敏感、简便和快速检测 H4、N2 和所有亚型 AIV 的三重 RT-PCR 方法。

1 材料与方法

1.1 毒株和主要试剂 不同亚型 AIV(H1N1、H1N2、H3N2、H3N6、H3N8、H4N2、H4N6、H5N2、H6N2、H6N6、H7N2、H9N2)、新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)和血清 4 型禽腺病毒(Fowl adenovirus serotype 4, FAdV4)由广西壮族自

治区兽药研究所分离保存;AIV 毒株的 RNA(H5N2、H7N2)由美国康涅狄格州立大学惠赠;传染性支气管炎病毒(Infectious bronchitis virus, IBV)、传染性喉气管炎病毒(Infectious laryngotracheitis virus, ILTV)、禽呼肠孤病毒(Avian reovirus, ARV)和鸡毒支原体(*Mycoplasma gallisepticum*, MG)购自中国兽医药品监察所。DNA/RNA 提取试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司;PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2 购自 TaKaRa 公司;SPF 鸡胚购自北京梅里亚公司。

1.2 引物设计 在 GenBank 基因库中下载 H4 亚型 AIV HA 基因、N2 亚型 AIV NA 基因和所有亚型 AIV M 基因序列,应用 DNASTAR 软件比对序列,找出保守区域。针对保守序列,在 Primer Premier 5.0 软件掌握序列片段的 T_m、错配和二聚体等信息,从而设计和筛选引物,初步筛出的引物经 NCBI-BLAST 模拟验证特异性,最终得出候选引物,发至广州 Invitrogen 公司合成。通过实际试验的验证,表 1 中的 3 对特异性引物可在同一反应体系混合使用,用于同时检测 H4、N2 和所有亚型 AIV。

1.3 病毒核酸提取与三重 RT-PCR 反应条件优化 参照 DNA/RNA 提取试剂盒说明书,抽提病毒 RNA 或 DNA。一步法 RT-PCR 反应体系 25 μ L:2 $\times$ 1 Step Buffer 12.5 μ L, PrimeScript 1 Step Enzyme Mix 1 μ L, H4、N2 和 AIV-M 三对引物终浓度在 0.1 ~ 1 μ mol/L 之间调整, RNA 2 μ L, 以无 RNA 酶的超纯水补足 25 μ L。反应程序如下:50 $^{\circ}$ C 30 min, 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 50 $^{\circ}$ C ~ 65 $^{\circ}$ C 之间调整 40 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

表 1 引物信息

Tab 1 The information of primers

引物	引物序列(5' - 3')	产物大小/bp	GenBank 登录号	位置
H4 - F	CACTGATGATCAAGTGGAAAGTGCTC	454	KJ881013.1	142 - 166
H4 - R	GATGTAAAGCCTCGCATAATCACCG			595 - 571
N2 - F	AAATGTTATCAGTTCGCACTTGGGC	282	KJ881015.1	401 - 425
N2 - R	GTTTGTGAGACCATGAACCAATACTG			682 - 658
AIV - M - F	GACTACCACCAACCCACTAATCAGG	167	KJ881014.1	523 - 547
AIV - M - R	GAGTCCCAATTGTCTCATCGCCTG			689 - 665

1.4 三重 RT-PCR 特异性试验 用该法对 H4N2 亚型 AIV 不同分离株、H4Ny (y ≠ 2) 亚型 AIV (H4N6)、HxN2 (x ≠ 4) 亚型 AIV (H1N2、H3N2、H5N2、H6N2、H7N2、H9N2)、HxNy (x ≠ 4, y ≠ 2) 亚型 AIV (H1N1、H3N6、H3N8、H6N6)、NDV、IBV、ILTV、ARV、FAdV4、MG 的 RNA/DNA 进行三重 RT-PCR 检测,检验该法的特异性。

1.5 三重 RT-PCR 敏感性试验 测定 H4N2 亚型 AIV 的 RNA 浓度,将 RNA 倍比稀释为 6 ng/μL、600 pg/μL、60 pg/μL、6 pg/μL、600 fg/μL、60 fg/μL 和 6 fg/μL。用该法分别对各浓度 RNA 进行三重 RT-PCR 的检测,检验该法的敏感性。

1.6 三重 RT-PCR 临床样品检测 用该法对从广西南宁市活禽市场采集的 185 份咽喉和泄殖腔棉拭子样品进行检测。同时,将棉拭子溶液接种至 9~11 日龄 SPF 鸡胚,35℃ 孵育 24~120 h 进行病毒增殖与分离,收集尿囊液,用血凝试验(HA)对其进行鉴定,对有血凝性的样品进一步用血凝抑制试验(HI)鉴定出 H 亚型。对已确定 H 亚型的样品,提取病毒 RNA,参照文献^[9]的 HA 和 NA 基因全长

引物,扩增和克隆 HA 和 NA 基因并送广州 Invitrogen 公司测序。

2 结果与分析

2.1 反应条件优化结果 经过对引物之间浓度的优化,H4 - F 和 H4 - R 引物终浓度为 0.6 μmol/L, N2 - F 和 N2 - R 引物终浓度为 0.4 μmol/L, AIV - M - F 和 AIV - M - R 引物终浓度为 0.3 μmol/L。退火温度优化结果表明,最佳退火温度为 56℃。

2.2 特异性结果 图 1 显示,用该法对 H4N2 亚型 AIV 的检测出现 3 个目的条带,分别为 454 bp (H4 亚型 AIV)、282 bp (N2 亚型 AIV) 和 167 bp (所有亚型 AIV 通用检测);对 H4Ny (y ≠ 2) 亚型 AIV (H4N6) 检测出现 2 个目的条带,分别为 454 bp 和 167 bp;对 HxN2 (x ≠ 4) 亚型 AIV (H1N2、H3N2、H5N2、H6N2、H7N2 和 H9N2) 的检测出现 2 个目的条带,分别为 282 bp 和 167 bp;对 HxNy (x ≠ 4, y ≠ 2) 亚型 AIV (H3N6、H3N8、H6N6) 的检测只有 167 bp 目的条带;对常见禽病病原体 (NDV、IBV、ILTV、ARV、FAdV4 和 MG) 的检测无扩增条带;结果与实际相符。

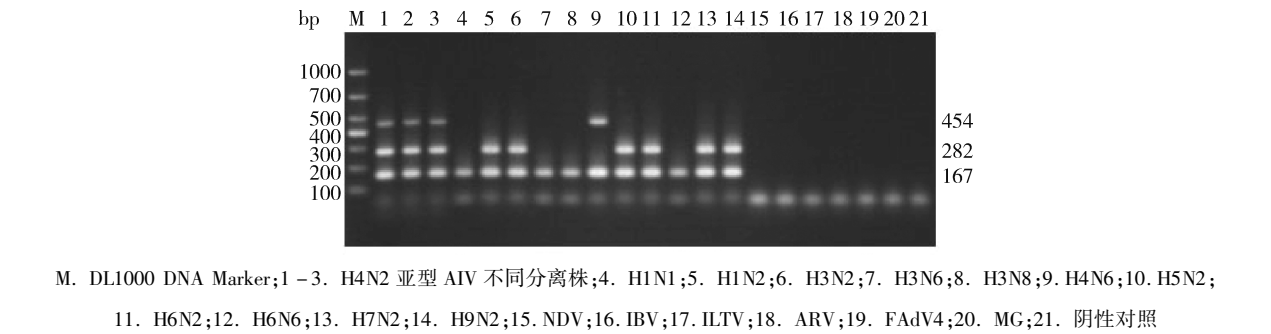


图 1 特异性试验结果

Fig 1 The results of specificity test

2.3 敏感性结果 用该法对 H4N2 亚型 AIV 不同浓度的 RNA 进行检测,结果见图 2。对 6 ng/ μ L ~ 6 pg/ μ L 浓度的 RNA,H4、N2、AIV – M 引物均能检测到;对 600 fg/ μ L 浓度的 RNA,H4、N2、AIV – M 引物均检测不到,无条带。因此,该法至少能检测到 6 pg/ μ L 的 RNA。

2.4 临床样品检测结果 用所建立的方法对 185 份临床样品进行检测,结果见表 2。有 3 份样品扩增出 3 条特异性条带,表明为 H4N2 亚型 AIV;有 1 份样品扩增出 454 bp 和 167 bp 的 2 条特异性条带,表明为 H4 亚型 AIV;有 7 份样品扩增出 282 bp 和 167 bp 的 2 条特异性条带,表明为 N2 亚型 AIV;有 8 份样品均出现 167 bp 的单一条带,表明为其他亚型 AIV (非 H4 和 N2 亚型) ;其他 166 份样品均

无任何条带,表明不是 AIV。上述样品通过病毒分离、血凝抑制试验和进一步测序鉴定,结果与上述相符。

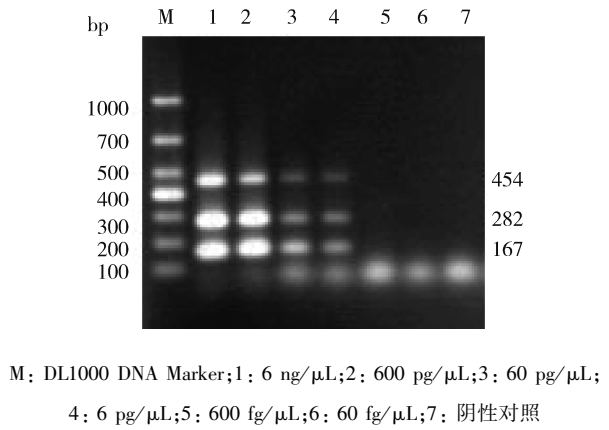


图 2 敏感性试验结果

Fig 2 The results of sensitivity test

表 2 临床样品检测结果

Tab 2 The detection results of clinical samples

样品	测序鉴定			三重 RT – PCR			
	HA 亚型	NA 亚型	鉴定结果	M 基因 167 bp	H4 亚型 454 bp	N2 亚型 282 bp	鉴定结果 (x $\neq$ 4,y $\neq$ 2)
1	H4	N2	H4N2	+	+	+	H4N2
2	H4	N2	H4N2	+	+	+	H4N2
3	H4	N2	H4N2	+	+	+	H4N2
4	H4	N6	H4N6	+	+	–	H4Ny
5	H3	N2	H3N2	+	–	+	HxN2
6	H3	N2	H3N2	+	–	+	HxN2
7	H9	N2	H9N2	+	–	+	HxN2
8	H9	N2	H9N2	+	–	+	HxN2
9	H9	N2	H9N2	+	–	+	HxN2
10	H9	N2	H9N2	+	–	+	HxN2
11	H9	N2	H9N2	+	–	+	HxN2
12	H1	N1	H1N1	+	–	–	HxNy
13	H3	N6	H3N6	+	–	–	HxNy
14	H3	N6	H3N6	+	–	–	HxNy
15	H3	N8	H3N8	+	–	–	HxNy
16	H6	N1	H6N1	+	–	–	HxNy
17	H6	N6	H6N6	+	–	–	HxNy
18	H6	N6	H6N6	+	–	–	HxNy
19	H6	N8	H6N8	+	–	–	HxNy

3 讨论与结论

H4 亚型 AIV 自 1956 年首次在捷克从鸭中分离出,之后广泛分布于亚洲、欧洲和北美洲^[10-12]。水禽和滨鸟是 H4 亚型 AIV 的主要宿主,并可感染海狮、马和猪等哺乳动物^[13-14]。在全球流感检测中,H4 亚型分离率较高,在野鸟中广泛流行^[15];在我国中部、东部和南部的活禽市场广泛传播,并发现该亚型与其他亚型进行复杂基因重组^[3-5]。有研究报道,H4N6 和 H9N2 共感染的家禽可导致高频的基因重组,重组病毒比野生型病毒毒力更强^[16]。虽然尚未有 H4 致死人和导致家禽大规模死亡的案例,但根据流行调查结果,警惕我们需要定期监测该亚型的流行态势和遗传进化情况。H4 亚型 AIV 在流感病毒进化中起的作用不容忽视^[17]。N2 亚型是主要的 NA 亚型,常与 H1、H3、H4、H6、H9 等搭配组合,H4N2 是常见的组合。因此,对于目前 AIV 的防控,建立一种 H4、N2 和所有亚型 AIV 的检测方法十分迫切。

本研究成功建立了 H4、N2 和所有亚型 AIV 的三重 RT-PCR 检测方法,关键在于 3 对特异性引物的设计。分别针对 H4、N2 亚型 AIV 的 HA 和 NA 基因保守序列,设计了 2 对型特异性引物,用于 H4、N2 亚型 AIV 的检测;M 基因在所有亚型 AIV 的进化中较为保守,针对 M 基因设计了 1 对型通用引物,用于所有亚型 AIV 的检测。由于 3 对引物混合在同一反应体系使用,因此在设计引物时需考虑各扩增片段至少相差 100 bp,各引物之间无非特异性反应和错配,避免竞争性的扩增。建立的三重 RT-PCR 方法首先检查是否存在 AIV 的感染,同时确定是否存在 H4、N2 亚型的感染;其次,如无 H4、N2 亚型 AIV 感染,可确定是否存在其他亚型 AIV 的感染,为进一步诊断提供参考依据。该法的局限性在于只能判定是否存在 H4N2、H4Ny 和 HxN2 亚型 AIV 的感染,并可辅助确定是否存在其他亚型 AIV 的感染,但无法确定是否存在混合感染的情况(H4N2 与 H4Ny、H4N2 与 HxN2、H4N2 与

HxNy、H4Ny 与 HxNy 等)。

本研究通过设计和筛选 3 对特异性引物,优化反应条件,建立同时检测 H4、N2 和所有亚型 AIV 的三重 RT-PCR 方法,具有特异性强、灵敏度高、成本低和省时省力等优点,为有效防控 AIV 提供技术支撑。

参考文献:

- [1] Chan J F, To K K, Tse H, *et al.* Interspecies transmission and emergence of novel viruses: lessons from bats and birds [J]. Trends Microbiol, 2013, 21: 544-555.
- [2] Luo S, Xie Z, Huang J, *et al.* Simultaneous differentiation of the N1 to N9 neuraminidase subtypes of avian influenza virus by a GeXP analyzer-based multiplex reverse transcription PCR assay [J]. Front Microbiol, 2019, 10:1271.
- [3] Luo S, Xie Z, Xie Z, *et al.* Surveillance of live poultry market for low pathogenic avian influenza viruses in Guangxi province, Southern China, from 2012 - 2015 [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 17577.
- [4] Deng G, Tan D, Shi J, *et al.* Complex reassortment of multiple subtypes of avian influenza viruses in domestic ducks at the Dongting lake region of China [J]. J Virol, 2013, 87(17): 9452-9462.
- [5] Shi Y, Cui H, Wang J, *et al.* Characterizations of H4 avian influenza viruses isolated from ducks in live poultry markets and farm in Shanghai [J]. Sci Rep, 2016, 6: 37843.
- [6] 罗思思, 谢芝勋, 谢志勤, 等. H10 亚型和 N8 亚型禽流感病毒三重 RT-PCR 检测方法的建立 [J]. 中国兽药杂志, 2019, 53(4): 1-5.
Luo S S, Xie Z X, Xie Z Q, *et al.* Development of a triplex RT-PCR assay for detection of H10 and N8 subtypes avian influenza virus [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2019, 53(4): 1-5.
- [7] 张艳芳, 谢芝勋, 谢丽基, 等. 鸭坦布苏病毒与鸭瘟病毒二重 RT-PCR 检测方法的建立 [J]. 南方农业学报, 2014, 45(2): 314-317.
Zhang Y F, Xie Z X, Xie L J, *et al.* Development of a duplex RT-PCR assay for detection of duck tembusu virus and duck plague virus [J]. Journal of Southern Agriculture, 2014, 45(2): 314-317.

- [8] 罗思思, 谢芝勋, 谢志勤, 等. H6N1 亚型禽流感病毒三重 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2015, 35 (10): 1626-1630.
Luo S S, Xie Z Z, Xie Z Q, *et al.* Development of a triplex RT-PCR assay for detection of H6N1 subtype avian influenza virus [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2015, 35 (10): 1626-1630.
- [9] Hoffmann E, Stech J, Guan Y, *et al.* Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses [J]. Arch Virol, 2001, 146: 2275-2289.
- [10] Song H, Qi J, Xiao H, *et al.* Avian-to-human receptor-binding adaptation by influenza A virus hemagglutinin H4 [J]. Cell Rep, 2017, 20(5): 1201-1214.
- [11] Reid S M, Brookes S M, Núñez A, *et al.* Detection of non-notifiable H4N6 avian influenza virus in poultry in Great Britain [J]. Vet Microbiol, 2018, 224: 107-115.
- [12] Amanat F, Meade P, Strohmeier S, *et al.* Cross-reactive antibodies binding to H4 hemagglutinin protect against a lethal H4N6 influenza virus challenge in the mouse model [J]. Emerg Microbes Infect, 2019, 8(1): 155-168.
- [13] Olsen B, Munster V J, Wallensten A, *et al.* Global patterns of influenza A virus in wild birds [J]. Science, 2006, 312(5772): 384-388.
- [14] Kang H M, Choi J G, Kim K I, *et al.* Genetic and antigenic characteristics of H4 subtype avian influenza viruses in Korea and their pathogenicity in quails, domestic ducks and mice [J]. J Gen Virol, 2013, 94(Pt 1): 30-39.
- [15] 王 帅, 梁立滨, 邓国华, 等. H4N2 亚型禽流感病毒反向遗传操作系统的构建 [J]. 中国预防兽医学报, 2014, 36(2): 90-93.
Wang S, Liang L B, Deng G H, *et al.* Establishment of reverse genetics system for H4N2 avian influenza virus [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2014, 36 (2): 90-93.
- [16] Li X, Liu B, Ma S, *et al.* High frequency of reassortment after co-infection of chickens with the H4N6 and H9N2 influenza A viruses and the biological characteristics of the reassortants [J]. Vet Microbiol, 2018, 222: 11-17.
- [17] 赵晴晴, 李群辉, 朱 杰, 等. 一株鸭源 H4N8 亚型禽流感病毒的全基因测序及遗传进化分析 [J]. 中国农业科学, 2015, 48(15): 3040-3049.
Zhao Q Q, Li Q H, Zhu J, *et al.* Genome sequencing and genetic analysis of H4N8 subtype avian influenza virus isolated from duck [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2015, 48(15): 3040-3049.

(编辑:李文平)