

鸡胚致死孤儿病毒和鸡减蛋综合症病毒多重 PCR 检测方法的建立及初步应用

王淑菁,付 瑞,李晓波,王 吉,卫 礼,巩 薇,岳秉飞,贺争鸣

(中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所,国家实验动物质量检测中心,北京 100050)

【摘要】 目的 建立鸡胚致死孤儿病毒(CELO)和鸡减蛋综合症病毒(EDS)的多重 PCR 检测方法并进行初步应用。方法 参照 GenBank 提供的基因序列,设计了 2 对特异性引物分别扩增 CELO 长纤突蛋白和 EDS 六邻体蛋白的基因序列,建立检测 CELO 和 EDS 的多重 PCR 方法,考察该方法的特异性和敏感性,并使用该方法检测流感疫苗主种子批病毒是否存在外源性禽腺病毒的污染。结果 该多重 PCR 方法成功扩增得到了两条特异性目的条带,并经测序验证。该方法特异性好,灵敏度显示核酸最低检测量可达 10^{-4} $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。使用该方法检测 12 批次流感疫苗主种子批病毒,外源性禽腺病毒的检测结果均为阴性。结论 成功建立鸡胚致死孤儿病毒和鸡减蛋综合症病毒的多重 PCR 检测方法,灵敏度高,特异性好。在流感疫苗主种子批病毒的外源性禽腺病毒的检测中具有很高的使用价值和应用前景。

【关键词】 鸡胚致死孤儿病毒;鸡减蛋综合症病毒;禽腺病毒;多重 PCR

【中图分类号】 S852.65 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 01-0066-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.001.012

Detection of chicken embryo lethal orphan virus and egg drop syndrome virus by multiplex polymerase chain reaction

WANG Shu-jing, FU Rui, LI Xiao-bo, WANG Ji, WEI Li, GONG Wei, YUE Bing-fei, HE Zheng-ming
(National Institute for Food and Drug Control, Institute for Laboratory Animal Resources,
National Center for Monitoring of Laboratory Animal Health, Beijing 100050, China)

【Abstract】 Objective To establish multiplex PCR assay for detection of chicken embryo lethal orphan virus (CELO) and egg drop syndrome virus (EDS). **Methods** According to GenBank gene sequence, two pairs of specific primers designed were amplified CELO long fiber protein and EDS hexon protein gene sequence. The specificity and sensitivity of multiplex PCR were tested. We also use the multiplex PCR to detect exogenous CELO and EDS in influenza virus. **Results** Two target bands have been successfully amplified and verified by sequencing. The specificity of the method is better, and the sensitivity is 10^{-4} $\mu\text{g}/\text{mL}$. The results of detecting exogenous CELO and EDS in 12 influenza virus were negative. **Conclusion** The multiplex PCR assay for detection of CELO and EDS was established successfully, which have good specificity and high sensitivity, and have high value and application prospect for detecting exogenous CELO and EDS in influenza virus.

【Key words】 Chicken embryo lethal orphan virus (CELO); Egg drop syndrome virus (EDS); Avian adenovirus;

[基金项目] 实验动物质量检测关键技术研究(2013BAK11B01);中检院中青年发展研究基金课题(2013NC2)。

[作者简介] 王淑菁(1985-),女,助理研究员,研究方向:实验动物病毒学。Email: wsj2008gogo@163.com。

[通讯作者] 贺争鸣(1957-),男,研究员,研究方向:微生物学和免疫学。Email: zhengminghe57@163.com。

Multiplex PCR

鸡胚致死孤儿病毒(CELO)属于禽腺病毒 I 型,为无包膜双股 DNA 病毒。主要引起鸡的包涵体肝炎、再生障碍性贫血、呼吸道感染、出血性肠炎和产蛋量减少,常与禽类呼吸道病原微生物混合感染,导致死亡率增加。减蛋综合症病毒(EDSV)属于禽腺病毒 III 型,为无包膜双股 DNA 病毒,感染后主要在输卵管内大量繁殖,形成嗜碱性包涵体,引起产蛋量下降、蛋壳异常和蛋体畸形^[1]。

在流感疫苗检定中,规定主种子批病毒需进行外源禽腺病毒 I 型和 III 型的检测。传统检测方法为使用血凝方法、琼脂扩散方法等血清学方法对鸡胚致死孤儿病毒(CELO)和减蛋综合症病毒(EDSV)进行检测,存在特异性、敏感性及仪器试剂方面的不足,需建立快速、特异性强的 PCR 检测方法^[2-4]。

多重 PCR 是一种可在同一体系中同时检测多种病原体的分子生物学方法,灵敏度高,特异性强,能够对疾病做到快速、准确的诊断,适合大量样品(特别是混合感染样品)中病原体的快速检测^[5-6]。本研究拟建立一种能够同时检测鸡胚致死孤儿病毒和鸡减蛋综合症病毒的多重 PCR 方法,以期对流感疫苗主种子批病毒进行快速、准确的检测。

1 材料和方法

1.1 病毒

鸡胚致死孤儿病毒(CELO VR-432 株)、小鼠腺病毒(MAdV)均购买于美国模式菌种收集中心,鸡减蛋综合症病毒(EDS AV127 株)购于中国兽药监察所。猴腺病毒-1 和猴腺病毒-20 均为本科室保存。

1.2 引物的设计

根据 GenBank 提供的基因序列,选择 CELO 和 EDS 保守特异的区域设计引物。针对 CELO 独有蛋白即长纤突蛋白基因序列设计一对引物(CELO-172F: 5' TGCTGACTACCTCGCTCTAC3'; CELO-172R: 5' ATACTGATGTTGCTTGCTC3'),扩增条带为 172 bp。针对 EDS 六邻体蛋白基因序列设计一对引物(EDS-516F: ACCCGCTTCGTTACACCAT; EDS-516R: CCCTCGGAGAAATCCCTAC),扩增条带为 516 bp。

1.3 病毒 DNA 的提取

使用 Qiagen 基因组 DNA 提取试剂盒(QIAamp

DNA Mini Kit, 型号 51304) 提取病毒 DNA, 详细操作见产品说明书。

1.4 单个 PCR 反应

PCR 反应体系为 25 μ L, 包括: 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, dNTP 2 μ L, ddH₂O 17.35 μ L, 引物各 1 μ L, DNA 1 μ L, HS Taq 酶 0.15 μ L。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 52 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物进行琼脂糖电泳测定。PCR 产物送 Takara 公司进行序列测定。

1.5 多重 PCR 反应及优化

PCR 反应体系为 25 μ L, 包括: 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, dNTP 2 μ L, ddH₂O 16.35 μ L, 引物各 0.75 μ L, CELO DNA 1 μ L, EDS DNA 1 μ L, HS Taq 酶 0.15 μ L。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 退火温度 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

对多重 PCR 的退火温度进行优化, 选择 50 $^{\circ}$ C、52 $^{\circ}$ C、54 $^{\circ}$ C、56 $^{\circ}$ C、58 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C 进行 PCR 反应。

1.6 特异性试验

提取小鼠腺病毒、鸡胚致死孤儿病毒、鸡减蛋综合症病毒、猴腺病毒-1, 猴腺病毒-20 的 DNA, 考察该多重 PCR 方法的特异性。

1.7 灵敏度试验

取 CELO DNA 与 EDS DNA 各 10 μ L 混匀, 倍比稀释混合模板浓度从 1 \sim 10⁻⁹ μ g/mL, 考察该多重 PCR 方法的灵敏度。

1.8 检测方法的应用

应用建立的多重 PCR 方法对流感疫苗主种子批病毒进行检测。

2 结果

2.1 单个 PCR 检测体系的建立

CELO 经特异性引物扩增得到 172 bp 目的片段(图 1); EDS 经特异性引物扩增得到 516 bp 目的片段(图 2)。将扩增得到的目的片段经测序后, 与 NCBI 网站上的序列一致率均为 100%。

2.2 多重 PCR 检测体系的建立及优化

多重 PCR 扩增 CELO、EDS 混合模板, 得到 172 bp 和 516 bp 两条目的条带。将两条带分布切胶回收, 转入 T-easy 载体后测序, 证实 172 bp 目的片段与 CELO 基因序列一致率为 100%, 516 bp 目的片段与 EDS 基因序列一致率为 100%。选择 50 $^{\circ}$ C ~

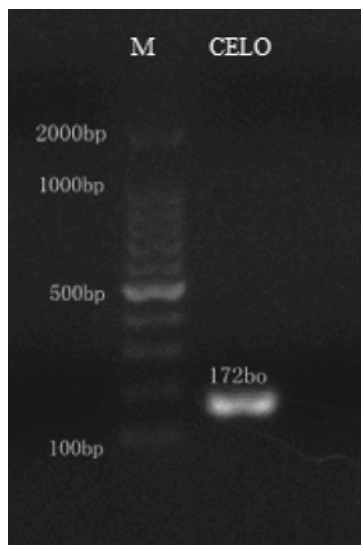


图 1 CELO 扩增目的条带

Fig. 1 The PCR result of CELO

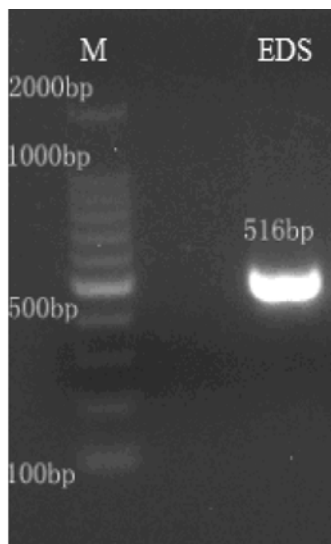


图 2 EDS 扩增目的条带

Fig. 2 The PCR result of EDS

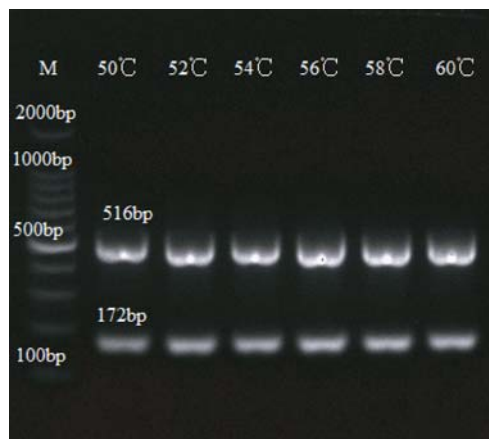
60℃ 的温度区间优化退火温度,结果显示在该温度区间均可扩增出两条特异的目的条带,没有非特异性扩增条带产生(图 3)。

2.3 多重 PCR 方法特异性测定

以小鼠腺病毒、鸡胚致死孤儿病毒、鸡减蛋综合症病毒、猴腺病毒-1,猴腺病毒-20 做对照,鸡胚致死孤儿病毒仅扩增得到其 172 bp 目的条带,鸡减蛋综合症病毒仅扩增得到其 516 bp 目的条带,小鼠腺病毒、猴腺病毒-1,猴腺病毒-20 均未扩增出条带(图 4)。

2.4 多重 PCR 方法灵敏性测定

取 CELO DNA 与 EDS DNA 各 10 μL 混匀后进



M:100 bp Marker

图 3 多重 PCR 扩增 CELO 和 EDS

Fig. 3 The multiplex PCR of CELO and EDS



注:M:100 bp Marker;1:阴性对照;2:鸡胚致死孤儿病毒;3:鸡减蛋综合症病毒;4:小鼠腺病毒;5:猴腺病毒-1;6:猴腺病毒-20;7:鸡胚致死孤儿病毒和鸡减蛋综合症病毒混合模板(阳性对照)。

图 4 多重 PCR 的特异性

Note:M:100 bp Marker;1:Negative control;2:CELO;3:EDS;4:MAAdv;5:SAAdv -1;6:SAAdv -20;7:CELO and EDS mixture (Positive control).

Fig. 4 The specificity test of multiplex PCR

行倍比稀释,模板浓度从 $1 \sim 10^{-9} \mu\text{g}/\text{mL}$,多重 PCR 反应结果显示其灵敏度至 $10^{-4} \mu\text{g}/\text{mL}$ (图 5)。

2.5 多重 PCR 检测流感疫苗主种子批病毒

提取送检的 12 批次流感疫苗主种子批病毒的 DNA,经多重 PCR 进行检测,结果均为阴性(图 6)。

3 讨论

随着分子生物学技术的发展,使用 PCR 技术快速检测病原微生物的应用越来越多。周斌等^[7]使用随机引物 PCR 扩增快速鉴定鸡胚致死孤儿病毒。



注: M: 100 bp Marker; 1: 1 µg/mL; 2: 10⁻¹ µg/mL; 3: 10⁻² µg/mL; 4: 10⁻³ µg/mL; 5: 10⁻⁴ µg/mL; 6: 10⁻⁵ µg/mL; 7: 10⁻⁶ µg/mL; 8: 10⁻⁷ µg/mL; 9: 10⁻⁸ µg/mL; 10: 10⁻⁹ µg/mL; 11: 阴性对照。

图 5 多重 PCR 的灵敏性

Note: M: 100 bp Marker; 1: 1 µg/mL; 2: 10⁻¹ µg/mL; 3: 10⁻² µg/mL; 4: 10⁻³ µg/mL; 5: 10⁻⁴ µg/mL; 6: 10⁻⁵ µg/mL; 7: 10⁻⁶ µg/mL; 8: 10⁻⁷ µg/mL; 9: 10⁻⁸ µg/mL; 10: 10⁻⁹ µg/mL; 11: Negative control.

Fig. 5 The sensibility test of multiplex PCR

Yo Okuda 等^[8]使用 PCR-RFLP 方法扩增禽腺病毒 I 型长纤突蛋白基因序列, 根据片段大小鉴定其是否为致病性腺病毒。马震原等^[9]使用 Taqman 探针方法检测鸡产蛋下降综合征病毒, 特异性强, 灵敏度可达 10 copies/µL。李文贵等^[10]使用套氏 PCR 检测产蛋下降综合征病毒, 灵敏度比常规 PCR 灵敏 100 倍, 可检测出 0.01fg 的 DNA 模板。目前国内尚未报道鸡胚致死孤儿病毒和鸡减蛋综合症病毒的多重 PCR 方法。

在多重 PCR 反应中, 设计特异性的引物是关键。本研究设计的引物是针对 2 种禽腺病毒各自保守的基因序列, 它们分别是鸡胚致死孤儿病毒的长纤突蛋白和鸡减蛋综合症病毒的六邻体蛋白基因组序列, 这些序列具有高度保守性, 因此能作为 PCR 扩增的目的基因^[11]。实验中扩增得到的目的产物经测序后比对, 与 NCBI 上序列一致率均为 100%。此外, 对退火温度进行优化, 在 50℃ ~ 60℃ 温度区间内考查退火温度, 结果表明, 在该温度范围内, 多重 PCR 均能得到很好的扩增, 没有非特异性的扩增。对新建立的多重 PCR 方法进行特异性



注: M: 100 bp Marker; 1 - 12 为送检流感疫苗主种子批病毒; 13: 鸡胚致死孤儿病毒; 14: 鸡减蛋综合症病毒; 15: 鸡胚致死孤儿病毒和鸡减蛋综合症病毒病毒的阳性对照; 16: 阴性对照。

图 6 多重 PCR 检测流感疫苗主种子批病毒

Note: M: 100 bp Marker; 1 - 12: Influenza virus; 13: CELO; 14: EDS; 15: CELO and EDS mixture (Positive control); 16: Negative control.

Fig. 6 The multiplex PCR result for detecting exogenous CELO and EDS in influenza virus

和灵敏度考察, 其特异性强, 灵敏度高, 最低核酸检测量可至 10⁻⁴ µg/mL。

《中华人民共和国药典》2010 年版三部中规定流感全病毒及裂解疫苗均需对毒种中外源性禽腺病毒进行检测。本研究建立的多重 PCR 方法能够对流感疫苗主种子批毒种中鸡胚致死孤儿病毒、鸡减蛋综合症病毒单独或混合污染进行快速、准确的

检测及鉴定, 结果表明, 该方法特异性强、灵敏度高, 具有很高的使用价值和应用前景。

参考文献:

[1] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 1997.
 [2] 国家药典委员会. 流感病毒裂解疫苗[S]. 中华人民共和国药典(2010 年版, 三部), 162 - 164.
 [3] 周斌, 刘华雷, 曹瑞兵. 污染疫苗的禽腺病毒分离和鉴定

- [J]. 南京农业大学学报, 2004, 27 (3): 78 - 80.
- [4] 智海东, 解生亮, 杨志, 等. 鸡胚致死孤儿病毒琼脂扩散抗原的研制及应用[J]. 中国兽药科学, 2009, 39(08): 718 - 722.
- [5] 冯育芳, 邢进, 岳秉飞, 等. 实验犬布氏杆菌的多重 PCR 检测与分型鉴定[J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(5): 57 - 61.
- [6] 张林, 胡北侠, 杨少华, 等. 禽四种病毒多重 PCR 诊断技术的建立和应用[J]. 家畜生态学报, 2011, 32(4): 71 - 74.
- [7] 周斌, 曹瑞兵, 芦银华, 等. 随机引物 PCR 扩增鸡胚致死孤儿病毒 DNA 的研究[J]. 中国病毒学, 2003, 18(2): 104 - 107.
- [8] Yo Okuda, Masaaki Ono, Isao Shibata, *et al.* Comparison of the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism pattern of the fiber gene and pathogenicity of serotype-1 fowl adenovirus isolates from gizzard erosions and from feces of clinically healthy chickens in Japan [J]. *Vet Diagn Invest*, 2006, 18: 162 - 167.
- [9] 马震原, 李刚, 李文超, 等. TaqMan 荧光定量 PCR 检测鸡产蛋下降综合征病毒方法的建立及应用[J]. 畜牧兽医学报, 2012, 43(5): 767 - 772.
- [10] 李文贵, 俞乃胜, 宋建领. 减蛋综合症病毒套氏 PCR 检测技术的研究[J]. 中国兽药科技, 2000, 30(12): 5 - 8.

[修回日期] 2014-09-09