

用M基因鉴别NDV中强毒株与弱毒株RT-nPCR方法的建立

朱小甫, 吴旭锦

(咸阳职业技术学院畜牧兽医研究所, 动物疫病分子生物学诊断实验室, 陕西 咸阳 712000)

摘要: 建立一种鉴别NDV中强毒株与弱毒株RT-nPCR检测方法, 能快速区分疫苗弱毒和流行中强毒株。根据GenBank上公开的NDV基因序列, 针对M基因差异位点设计了3对引物, 通过优化反应体系与条件, 建立了能够区分NDV中强毒株与弱毒株RT-nPCR检测方法。灵敏度试验结果表明, 该方法检测cDNA含量极限为 6.15×10^{-4} pg/L。特异性试验显示, NDV中强毒株扩增出543bp、375bp两个条带, 弱毒株仅出现375bp一个条带, 其他常见禽病毒为阴性。临床样品检测发现鸡群NDV弱毒带毒率高, 中强毒株带毒率较低。成功建立了一种基于M基因的快速鉴别诊断NDV中强毒株与弱毒株的RT-nPCR方法。

关键词: 新城疫病毒; 中强毒株; 弱毒株; M基因; 鉴别诊断

中图分类号: S852.65+1

文献标识码: A

文章编号: 94047-(2017)02-028-04

新城疫(Newcastle disease, ND)是一种禽类急性传染病, 感染率高, 死亡率高, 对多种家禽和野禽均有致病性, 广泛分布在世界各地^[1]。新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)属于副黏病毒科、禽腮腺炎病毒属病毒, 其核酸为单股负链不分节段的RNA^[2]。由于新城疫对养禽业造成巨大的经济损失, 我国农业部将其定为一类动物疫病。

准确诊断是防控新城疫的前提, 对扑灭疫情、减少经济损失有重要意义。国标《新城疫诊断技术》(GB/T16550-2008)中诊断方法有临床诊断、病毒分离鉴定、血凝-血凝抑制试验和反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)^[3]。其中RT-PCR技术具有灵敏度高、特异性好、快速准确的优点, 国内学者设计了多种RT-PCR检测方法, 并进行了临床应用^[4]。NDV虽只有一个血清型, 但毒力差异很大, 常规RT-PCR方法无法区分弱毒株和中强毒株。明文龙等^[5]基于F基因建立了鉴别新城疫强、弱毒一步RT-PCR方法, 使用强毒引物可从NDV强毒株中特异性扩增出349bp的目的片段, 使用弱毒引物可从NDV弱毒株中特异性扩增出255bp目的片段, 但该方法需要进行鸡胚接种增殖病毒后才能检测。刘禄等^[6]、曹殿军等^[7]均针对NDV F基因建立了强弱毒株RT-PCR鉴别诊断方法。为提高RT-

PCR方法灵敏度, 并能区分NDV弱毒株和中强毒株, 本课题组根据NDV M基因设计了鉴别弱毒株和中强毒株的套式多重聚合酶链式反应方法(RT-nPCR), 临床应用取得了良好效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒 NDV强毒标准株F48E9, 动物疫病分子生物学诊断实验室保存; NDV强毒野毒SXWN株^[8], 本课题组分离鉴定保存; NDV中强毒Mukteswar株(I系)、NDV弱毒LaSota株(IV系)、传染性支气管炎病毒(IBV)、传染性法氏囊病病毒(IBDV)、鸡痘病毒(POX)、传染性喉气管炎病毒(ILTV)和禽脑脊髓炎病毒(AEV)均为商品疫苗毒株; 禽流感H9亚型病毒DJ15株^[9](H9 AIV)为动物疫病分子生物学诊断实验室分离保存。

1.1.2 病料和棉拭子 本课题组采集或鸡场送检组织病料, 包括发病鸡肺脏、脾脏、气管, 研磨处理, 12000 r/min离心10 min, 收集上清液; 采集的喉头、泄殖腔棉拭子, 加适量灭菌生理盐水, 充分挤压后12000 r/min离心10 min, 收集上清液; 先后采集到95份样品, 处理后的上清液-70℃保存备用。

1.1.3 试剂 RNAiso Reagent、DNAiso核酸提取试

收稿日期: 2017-04-18

基金项目: 咸阳职业技术学院重大科研项目(2016KYA01)

作者简介: 朱小甫(1977—), 男, 陕西眉县人, 执业兽医师, 主要从事动物疫病分子病原学和免疫学研究。

剂、M-MLV反转录酶、RNA酶抑制剂、rTaq酶、dNTP、DL2000 Marker均为宝生物工程(大连)有限公司产品。其他试剂均为国产分析纯。

1.1.4 引物设计与合成 根NDV基因序列AY508514 (F48E9)、JF950509 (Mukteswar) 和 JF950510 (LaSota), 针对M基因差异位点设计了3对引物, NDV-M-1F: ATGGACTCATCTTGGACGC, NDV-M-1R: GTAGACGTCACCTCRTGCAG, NDV-M-2F: TGAATACAGTCAAGAACGCC, NDV-M-2R: GGCGGAGTACATGACTGTT, NDV-M-3F: TATACTTTCATTCRGCCT, NDV-M-3R: GAYAGCTTAARYTCTGCGCA。NDV-M-1F/NDV-M-1R为通用外扩引物对, NDV-M-2F/NDV-M-2R为通用内扩引物对, 预期扩增片段375bp, 所有NDV毒株均可检测, NDV-M-3F/NDV-M-3R为中强毒株特异性引物对, 预期扩增片段543bp, 只有NDV中强毒力毒株才能特异性扩增。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 NDV RNA的提取和cDNA的合成 取F48E9标准强毒尿囊液200 μ L, 加入RNAiso Reagent 800 μ L, 混匀后静置10 min充分裂解, 加入氯仿200 μ L, 剧烈振荡10 s乳化后静置10 min, 4 $^{\circ}$ C、10 000 g离心10 min; 将上清液600 μ L移入另一离心管中, 加入冰冷的异丙醇750 μ L混匀, 置-20 $^{\circ}$ C静置沉淀10 min; 4 $^{\circ}$ C、10 000 g离心10 min, 弃去上清液, 加入1 mL 75%酒精洗涤1次, 弃去酒精, 倒置离心管自然干燥总RNA。反转录反应液成分为, DEPC水10.5 μ L, 引物NDV-M-1F 1.0 μ L, dNTP 4.0 μ L, 5 \times AMV Buffer 4.0 μ L, M-MLV 0.25 μ L, RNA酶抑制剂 0.25 μ L, 总体积20.0 μ L。核酸干燥后用反转录反应液反复吹打溶解核酸, 置37 $^{\circ}$ C水浴中反应60 min, 用微量紫外分光光度计测定cDNA浓度。

1.2.2 NDV RT-nPCR检测方法的建立 取已知浓度的cDNA溶液做为模板, 摸索扩增条件。第1次扩增反应体系中, cDNA 2.0 μ L, 10 \times PCR Buffer 2.5 μ L, dNTP 2.0 μ L, NDV-M-1F/NDV-M-1R各0.5 μ L, 调整rTaq DNA聚合酶用量(0.25~1.0 μ L), 用超纯水补足总体积25.0 μ L。条件为95 $^{\circ}$ C预变性5 min; 进入循环后94 $^{\circ}$ C 50 s变性, 梯度PCR退火温度由50 $^{\circ}$ C至60 $^{\circ}$ C按1 $^{\circ}$ C递增设定退火50 s, 72 $^{\circ}$ C延

伸50 s, 共进行35个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸10 min。第2次扩增反应体中, 取2.0 μ L第1次扩增产物作为模板, 体系为10 \times PCR Buffer 2.5 μ L, dNTP 2.0 μ L, NDV-M-2F/NDV-M-2R、NDV-M-3F/NDV-M-3R各0.5 μ L, 改变rTaq DNA聚合酶用量(0.25~1.0 μ L), 用超纯水补足总体积25.0 μ L。条件设定为95 $^{\circ}$ C预变性5 min; 进入循环后94 $^{\circ}$ C 40 s变性, 退火温度由55 $^{\circ}$ C至65 $^{\circ}$ C按1 $^{\circ}$ C递增设定退火45s, 72 $^{\circ}$ C延伸45s, 共35个循环; 最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。寻找最优反应体系和反应条件。

1.2.3 NDV RT-nPCR检测方法灵敏性试验 将cDNA溶液做10倍梯度稀释至108倍, 分别以各稀释后cDNA溶液作为模板进行PCR扩增。按照建立的方法进行反应, 测试方法检测cDNA浓度的极限值。

1.2.4 NDV RT-nPCR检测方法特异性试验 提取F48E9、SXWN、Mukteswar、LaSota、IBV、IBDV、AEV和DJ15病毒RNA, 用建立的方法进行检测; 按照DNAiso试剂说明提取POX、ILTV等DNA病毒的DNA作为模板, 用建立的方法进行检测, PCR产物琼脂糖凝胶电泳照相。

1.2.5 临床样品NDV的检测 用以上建立的检测方法对收集的95份组织病料和棉拭子进行检测, 验证方法的实用性。

1.2.6 用优化国标法检测对比分析 利用参考文献[2]中本课题组优化国标RT-PCR方法对95份临床样品进行F基因检测, 选择部分疑似中强毒株样品和弱毒株样品进行F基因测序分析验证。

2 结果与分析

2.1 NDV RT-nPCR检测方法的建立

通过改变rTaq酶用量, 改变反应条件中的退火温度, 优化反应体系和反应条件, 最终确定最优体系和条件为: 第1次扩增cDNA 2.0 μ L, 超纯水17.0 μ L, 10 \times PCR Buffer 2.5 μ L, dNTP 2.0 μ L, NDV-M-1F/NDV-M-1R各0.5 μ L, rTaq DNA聚合酶0.5 μ L, 总体积25.0 μ L。条件为: 95 $^{\circ}$ C预变性5 min, 94 $^{\circ}$ C 50 s, 52 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 共进行35个循环, 最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。第2次扩增反应体系和条件为: 第1次扩增PCR产物 2.0 μ L, 超纯水16.0 μ L, 10 \times PCR Buffer 2.5 μ L, dNTP 2.0 μ L, NDV-M-2F/NDV-M-2R、NDV-M-3F/NDV-M-3R各0.5 μ L, rTaq DNA聚

合酶0.5 μL, 总体积25.0 μL。条件为: 95 °C 预变性5 min, 94 °C 40s, 62 °C 45s, 72 °C 45 s, 共进行35个循环, 最后72 °C 延伸10 min。

2.2 NDV RT-nPCR检测方法的灵敏性

测定反转录第一链cDNA含量为615ng/μ L, 10倍梯度稀释后进行扩增, 建立的方法能够扩增出可见目的条带的最大稀释度为106 (图1), 即检测的cDNA含量极限为6.15 × 10⁻⁴ ng/μ L。

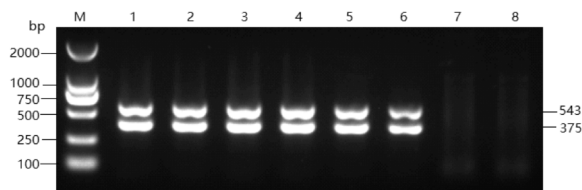


图1 NDV RT-nPCR检测方法灵敏度试验结果
M. DL2000 DNA Marker; 1~8.依次为615 × 10⁻¹~615 × 10⁻⁸ ng/μ L cDNA PCR结果
Fig.1 The result of sensitivity test of reverse transcription – complex nested PCR for NDV
M. DL2000 DNA Marker; 1–8. 615 × 10⁻¹~615 × 10⁻⁸ ng/μ L of NDV cDNA respectively

2.3 NDV RT-nPCR检测方法的特异性

用所建立的方法对F48E9、SXWN、Mukteswar、LaSota、IBV、IBDV、AEV、DJ15 (H9)、POX和ILTV等进行检测, 结果显示, F48E9、SXWN与Mukteswar出现543bp、375bp两个条带, LaSota出现375bp一个条带, IBV、IBDV、AEV、DJ15 (H9)、POX和ILTV均未出现条带 (图2)。结果证实建立的方法能直观区分中强毒株 (F48E9、SXWN、Mukteswar) 和弱毒株 (LaSota), 其他常见禽病毒均为阴性, 表明建立的方法特异性高。

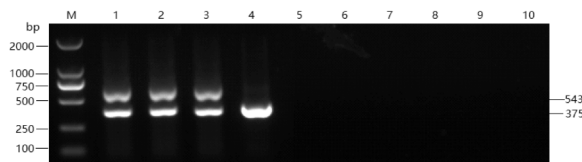


图2 NDV RT-nPCR检测方法特异性试验结果
M. DL2000 DNA Marker; 1~10.分别为F48E9、SXWN、Mukteswar、LaSota、IBV、IBDV、AEV、DJ15 (H9)、POX和ILTV毒株扩增结果
Fig.2 The result of specialization test of reverse transcription – complex nested PCR for NDV M. DL2000 DNA Marker; 1--10.the result of F48E9,SXWN,Mukteswar,LaSota,IBV,IBDV,AEV,DJ15 and ILTV respectively

2.4 病料中NDV检测结果

对临床采集的95份组织病料和棉拭子进行检测, 结果有67份样品为NDV阳性, 阳性率70.5%。其中中强毒株阳性样品4份, 阳性率4.2%, 弱毒株阳性63份, 阳性率66.3%。部分病料检测见图3。

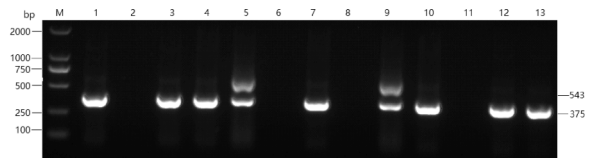


图3 部分疑似NDV病料检测结果
M.DL2000 DNA Marker; 1~13.部分病料检测, 5和9为中强毒株阳性, 1、3、4、7、10、12和13为弱毒株阳性
Fig.3 The result of detection from some dubitable effected NDV sample M.DL2000 DNA Marker; 1–13.the detection

2.5 优化国标法检测结果与F基因序列分析

用优化国标法对临床采集的95份样品进行检测对照, 结果有71份样品为NDV阳性, 阳性率为74.7%。选取鉴别诊断RT-nPCR方法检测的4份中强毒株 (编号为SX1、SX2、SX3和SX4) 以及4份弱毒株 (编号为SX5、SX6、SX6和SX8) F基因片段进行测序, 序列比对分析发现4份中强毒株与参考强毒株DQ439868在同一个进化分支上, 而4份弱毒株和Lasota株在一个进化分支上 (图4)。结果证实建立的RT-nPCR方法诊断结果准确。

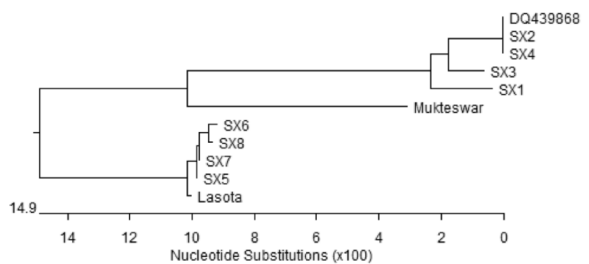


图4 F基因进化树
Fig.4 Phylogenetic tree of F gene

3 讨论

新城疫是鸡群重大病毒性传染病, 对养鸡业造成很大的经济损失。准确诊断对及早控制新城疫有重要意义。但由于鸡群普遍免疫弱毒疫苗, 临床采集的样本中普遍存在疫苗毒株, 对病原诊断造成极大干扰, 因而开发能够鉴别诊断NDV中强毒株和弱毒株的检测方法十分必要。常规的病毒分离和毒力测定耗时太长, 无法做到临床快速诊断。RT-PCR技术是当前普遍应用的一种快速诊

断技术,但常规技术无法区分NDV毒力强弱,因而有学者建立了不同的鉴别诊断方法。目前报道建立的鉴别诊断方法均是针对NDV F基因设计,由于F基因变异较大,不是分子检测最佳目的基因。NDV M蛋白为基质蛋白,M基因保守性高,是分子诊断理想的靶基因。

本研究根据M基因的差异位点,设计了3对引物,建立了反转录套式复合PCR诊断方法,待检材料中含有NDV均可扩增出375bp片段,中强毒株另出现375bp、543bp两个片段,543bp片段只有NDV中强毒力毒株才能特异性扩增,仅有375bp片段而无543bp片段的为NDV弱毒阳性。套式扩增能大幅度提高检测灵敏度,本方法检测极限为cDNA含量 6.15×10^{-4} ng/ μ L。特异性试验发现,本方法能准确从NDV中强毒株F48E9、SXWN与Mukteswar扩增543bp、375bp两个条带,弱毒株LaSota仅出现375bp一个条带,常见禽病毒IBV、IBDV、AEV、DJ15(H9)、POX和ILTV均为阴性,证实方法特异性好。临床样品检测,95份组织病料和棉拭子中中强毒株阳性样品4份,阳性率4.2%,弱毒株阳性63份,阳性率66.3%。结果表明鸡群中NDV阳性率高,但主要是NDV弱毒疫苗株阳性,中强毒株感染率较低,这和刘华雷等^[10]的研究结果基本一致。同时应用优化国标法进行了对照对比检测试验,发现文献[2]方法检出率为74.7%,比建立的复合套式方法高出4.2%,提示复合PCR灵敏度确有所降低,但影响不大。测序分析表明,应用

建立的反转录套式复合PCR方法能准确区分NDV中强毒株和弱毒株,证实建立的方法临床应用效果良好,为ND疫情的快速普查提供了一种有力的技术手段。

参考文献

- [1] Saif Y M. 禽病学. 苏敬良, 高福, 索勋主译. 第十一版. 北京: 中国农业出版社. 2005.
- [2] 吴旭锦, 朱小甫. 新城疫国标RT-PCR诊断方法的优化与应用[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2015, 43(3): 27-31.
- [3] GB/T 16550-2008, 新城疫诊断技术[S]. 2008.
- [4] 杜景娇, 薛强, 邹明强, 等. 新城疫检测技术的研究新进展[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(2): 187-190.
- [5] 明文龙, 尹仁福, 谢光耀, 等. 鉴别新城疫强、弱毒一步RT-PCR方法的建立及应用[J]. 中国兽医学报, 2015, 35(7): 1056-1059.
- [6] 刘禄, 韦平. 禽新城疫快速鉴别诊断方法的建立[J]. 中国家禽, 2002, 24(4): 9-11.
- [7] 曹殿军, 刘培欣, 闫丽辉, 等. 鸡新城疫病毒强弱毒株RT-PCR鉴别诊断方法[J]. 中国预防兽医学报, 2000, 22(6): 415-417.
- [8] 朱小甫, 吴旭锦, 杨萍. 鸡新城疫病毒SXWN株的分离鉴定与基因分型[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016(01): 152-155.
- [9] 朱小甫, 杨萍, 吴旭锦. H9亚型禽流感病毒DJ15株的分离与鉴定[J]. 陕西农业科学, 2016, 62(05): 66-67.
- [10] 刘华雷, 郑东霞, 吕燕, 等. 宁夏地区鸡群新城疫流行率横断面调查[J]. 中国动物检疫, 2015, 32(10): 1-5.

[责任编辑、校对: 王军利]

Establishment of RT-nPCR Method for Identification of Velogenic & Lentogenic NDV Strains by Using Gene

ZHU Xiao-fu, WU Xu-jin

(Animal Epidemic Disease Diagnostic Laboratory of Molecular Biology; Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Xianyang Vocational & Technical College, Xianyang, Shaanxi 712000, China)

Abstract: To establish a RT-nPCR method for the identification of velogenic and lentogenic NDV strains, and to provide a technical means for rapid clinical differential diagnosis, according to the NDV gene sequence published in Gene Bank, three pairs of primers were designed for M gene difference sites of NDV. In which, reaction system and conditions is changed until PCR reaction was optimal. The results of sensitivity test showed that the limit of cDNA content was 6.15×10^{-4} pg / L. Specificity tests showed that 543bp and 375bp bands were found in the velogenic NDV strains, and only 375bp bands were found in the lentogenic strains. Other common avian viruses were negative. The clinical samples showed that the lentogenic NDV infection rate of the chickens was high and that of the velogenic strains was low. A rapid RT-nPCR method for the rapid differential diagnosis of velogenic and lentogenic NDV strains based on M gene was successfully established.

Key words: Newcastle disease virus, velogenic strains, lentogenic strains, M gene, Differential diagnosis