

王永娟,董亚青,郭方超,等. 鸭源 H9N2 亚型禽流感病毒 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 江苏农业科学,2018,46(1):105-106,115.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.01.028

# 鸭源 H9N2 亚型禽流感病毒 RT-PCR 检测方法的建立

王永娟,董亚青,郭方超,左伟勇,孟 婷

(江苏农牧科技职业学院/江苏省兽用生物制药高技术研究重点实验室,江苏泰州 225300)

**摘要:**为建立鸭 H9N2 亚型禽流感病毒的监测及临床诊断方法,根据鸭源 H9N2 亚型禽流感病毒 HA 蛋白的基因序列设计 1 对特异性 PCR 引物,并以鸭源 H9N2 亚型禽流感病毒基因组为模板,建立鸭源 H9N2 亚型禽流感病毒的特异性 RT-PCR 检测方法,并用该方法对江苏省多地采集的疑似病料进行检测,扩增产物经测序鉴定后判断建立的方法对临床样品的检出率。结果显示,该方法可以特异性扩增鸭源 H9N2 亚型禽流感病毒 HA 蛋白基因保守区的 837 bp 的序列,与对照的病毒无交叉反应,敏感性较好,最低可检测 1fg 基因组,临床样品的检测率为 100%,表明本试验建立的鸭源 H9N2 亚型禽流感病毒 RT-PCR 特异性强、敏感性高,可用于临床快速诊断鸭源 H9N2 亚型禽流感病毒感染。

**关键词:**鸭;H9N2 亚型禽流感病毒;RT-PCR;检测

**中图分类号:**S858.325.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)01-0105-02

禽流感(avian influenza,AI)是由 A 型禽流感病毒中的禽流感病毒(avian influenza virus,AIV)引起的一种传染病,其病原属于正黏病毒科、流感病毒属<sup>[1]</sup>。按其致病性可分为高致病性禽流感病毒、低致病性禽流感病毒、无致病性禽流感病毒 3 大类<sup>[2]</sup>。H9N2 亚型为低致病性禽流感病毒,首次由 Hommee 等于 1966 年从火鸡体内分离得到<sup>[3]</sup>,之后在 1994 年,陈伯伦等首次在病死鸡中分离得到该病毒<sup>[4]</sup>。我国于 1998 年起进行 H9N2 防治,但带毒野禽的迁徙和活禽的市场交易加大了防控难度,病毒出现跨种传播及重排现象,不仅在禽类中广泛流行,而且在 1999 年从感冒儿童体内分离到 H9N2,后来又有 5 例该病毒感染人的报道<sup>[5]</sup>。

H9N2 在鸭群中很少引起发病,在临床上多不出现症状,但鸭群可长期带毒或排毒,对 AIV 的发生及传播起到了非常重要的作用。最新研究证明,H9N2 亚型 AIV 在家禽中短期传播后,可突变成致病性高的病毒<sup>[6]</sup>。因此,建立快速、便捷的诊断方法对该病的预防和控制极其重要。H9N2 亚型禽流感病毒传统的检测方法主要是通过鸡胚接种分离病毒,结合血凝抑制试验检测。该方法敏感性高,但耗时费力,不能满足养殖场快速诊断的要求。本试验以已知的红血球凝集素(hemagglutinin,简称 HA)蛋白基因为目标,建立了快速、敏感并且廉价的 RT-PCR 检测方法,有望研发后在临床中作为试剂盒推广应用。

收稿日期:2016-08-01

基金项目:江苏省高校自然科学研究面上项目(编号:16KJB230004);江苏省“六大人才”高峰第十二批培养对象资助项目(编号:NY-023);江苏省高校优秀科技创新团队(编号:2050305-44);泰州市农业支撑项目(编号:TN201703);安徽省科技攻关项目(编号:1201c0602006);江苏农牧科技职业学院重点支持项目(编号:NSFZD1405、NSFPT201510、NSFPT201512)。

作者简介:王永娟(1980—),女,江苏海门人,博士,副教授,主要从事动物传染病防治研究。E-mail:43088591@qq.com。

通信作者:左伟勇,博士,教授,主要从事动物疫病防控研究。E-mail:979490023@qq.com。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

鸭低致病性禽流感病毒,由扬州大学兽医学院馈赠;鸭坦布苏病毒、鸭瘟病毒、I 型鸭肝炎病毒、番鸭细小病毒,均由中国农业科学院上海兽医研究所馈赠;鸭呼肠孤病毒毒株,由福建省农业科学院惠赠。9~11 日龄无特定病原体(SPF)鸡胚,购自扬州朝天歌农牧科技有限公司;dNTPs、RNA 酶抑制剂、病毒提取试剂盒、PCR 酶、DNA marker,均购自 TaKaRa 公司;MLLV 反转录试剂盒,购自 BBI 公司;病毒基因组提取试剂盒,购自 TaKaRa Bio 公司;磷酸盐缓冲液(PBS)、注射器、移液管、指形管和石蜡,均为市售。

### 1.2 病毒扩增

按 1:10、1:100、1:1 000 体积比例 PBS 稀释 H9N2 禽流感病毒原液,从尿囊腔无菌接种至 9~11 日龄 SPF 鸡胚,每枚鸡胚接种 0.1 mL。37℃ 孵化 72 h 后全部死亡,4℃ 放置 12 h 后,收取尿囊液,放至于 -80℃ 保存。

### 1.3 病毒 RNA 提取

取上述收集的尿囊液 100 μL,按照病毒基因组提取试剂盒说明书进行 RNA 提取,提取时未加入 Carrier RNA。最后将 RNA 溶解于 40 μL RNase free dH<sub>2</sub>O 中,分光光度仪测定病毒基因组的纯度与浓度。

### 1.4 RT-PCR 方法的建立

根据已发表的 HA 蛋白基因序列(登录号:AY790315.1)设计 1 对引物。上游引物 F:5'-CAAACCTCCACAGAACTG-3',下游引物 R:5'-CTGACATTGTGGAATGGC-3'。设置 25 μL 反应体系进行反转录,包含反转录酶 1 μL、dNTPs 2 μL、Random Primer 2 μL、5×RT buffer 5 μL、抑制剂 0.5 μL 和 RNA 模板 14.5 μL,反应程序:25℃ 10 min,42℃ 60 min,70℃ 10 min。

PCR 采用 50 μL 反应体系,包含 cDNA 产物 5 μL、上游引物 1 μL、下游引物 1 μL、2×Taq mix 酶 25 μL、水 18 μL。反应程序:94℃ 预变性 4 min;94℃ 变性 30 s,52℃ 退火 45 s,

72 ℃ 延伸 1 min, 进行 25 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。反应结束后取 5  $\mu$ L 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 并用凝胶成像系统拍照分析。同时设无 RNA 的空白对照组。

### 1.5 特异性测定

按病毒基因组提取试剂盒说明书, 分别提取 H9N2 病毒、鸭瘟病毒、I 型鸭肝炎病毒、鸭呼肠孤病毒、番鸭细小病毒和鸭坦布苏病毒基因组, 用 H9N2 的上、下游引物分别进行 RT-PCR 扩增, 取扩增产物 5  $\mu$ L 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。

### 1.6 敏感性测定

取 1  $\mu$ L 提取的 RNA 作 10 倍梯度稀释, 按照上述反转录及 PCR 程序进行扩增, 后取扩增产物 5  $\mu$ L 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 并用凝胶成像系统拍照分析。

### 1.7 临床样品检测

应用建立的 RT-PCR 方法, 对江苏泰州、南通和徐州等地的 5 份疑似 AIV 病毒感染的鸭肝脏组织进行检测, 检测时设不加 RNA 的空白对照组与 H9N2 AIV 阳性对照组, 扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析, 并将特异性扩增条带切胶

回收后, 送至上海英骏生物技术有限公司测序鉴定。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因组的提取

按照病毒基因组提取试剂盒说明书进行 RNA 提取后, 用分光光度仪测定病毒基因组浓度为 11.9 ng/ $\mu$ L。

### 2.2 检测方法的建立

病毒基因组经 42 ℃ 1 h 反转录后, 94 ℃ 预变性 4 min; 94 ℃ 变性 30 s, 52 ℃ 退火 45 s, 72 ℃ 延伸 1 min (25 个循环); 72 ℃ 延伸 10 min, 在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳结果中可见清晰条带 (图 1), 该条带与预期 837 bp 目的片段相符。

### 2.3 特异性测定

在同等反应条件下, 以 H9N2 上、下游引物对 H9N2、鸭瘟病毒、I 型鸭肝炎病毒、鸭坦布苏病毒、番鸭细小病毒和鸭呼肠孤病毒基因组进行 RT-PCR 扩增, 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析, 由图 2 可见, 仅 H9N2 扩增出预期大小片段, 而其他对照病原均未扩增出任何目的条带。

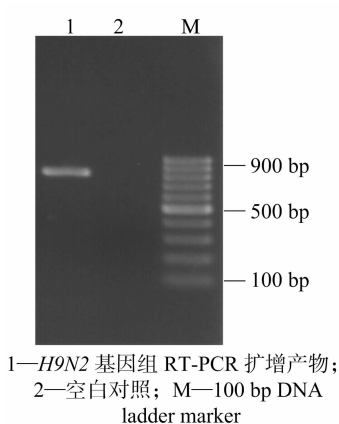


图1 RT-PCR 方法的建立

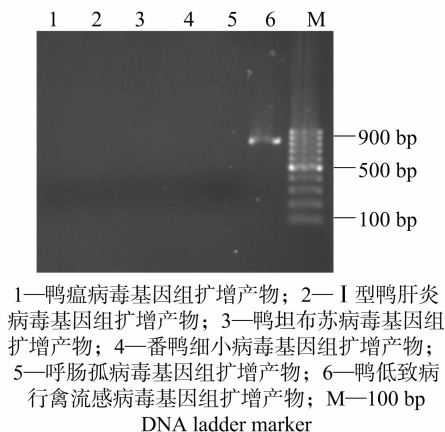


图2 建立方法的特异性测定结果

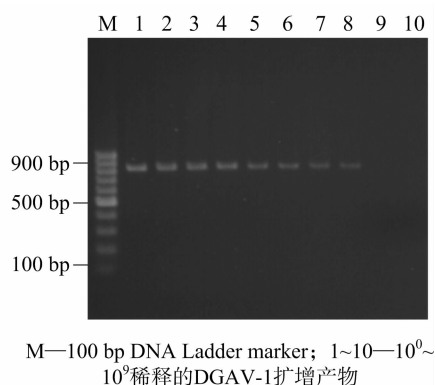


图3 建立方法的敏感性测定结果

### 2.4 敏感性测定

在同等反应条件下, 以 1  $\mu$ L RNA 为起始剂量, 经 10 倍梯度稀释后作为模板, 进行扩增, 在稀释了 10<sup>7</sup> 之后无特异性条带, 对应 RNA 约为 1 fg, 结果见图 3。

### 2.5 临床样品的测定

用建立的方法检测临床采集的 5 份疑似病料, 均在预期的 837 bp 处有特异性扩增, 而空白对照组无扩增条带, 检出率为 100%, 检测结果见图 4。5 个扩增产物的测序结果与 HA 蛋白基因序列 (登录号: AY790315.1) 同源性为 100%。

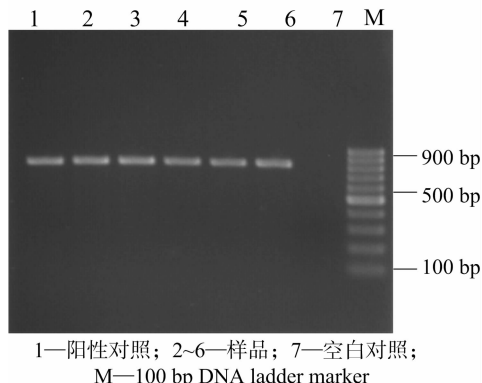


图4 建立方法的临床样品检测结果

## 3 讨论

禽流感一年四季均可发生, 但以春季流行为主, 可感染人、猪、马、海洋哺乳动物、禽类等, 其中迁栖水禽, 尤其是鸭, 产生的病毒比其他禽类要多。水禽感染后一般不表现出临床症状, 但可长期带毒和排毒, 研究表明, 水禽粪便中的病毒滴度相当高, 病毒通过粪便将病毒排到水中, 形成一个传播链: 粪便—水—口<sup>[5]</sup>。水禽不仅通过间接方式传播病毒, 而且可作为 AIV 变异和重组的混合器, 各种亚型的禽流感病毒均可从鸭体内分离到<sup>[5-6]</sup>。

H9N2 亚型禽流感病毒是 A 型流感病毒的一个亚型, 其系谱复杂, 流行范围广, 是我国禽流感的主要亚型, 其致病性较低, 但可在水禽体内发生重组, 改变其抗原和宿主的特异性, 对养殖业和人类均可带来潜在的危害。Liu 等于 2014 年提出 H9N2 为新型人流感提供了温床的概念<sup>[7]</sup>。因此, 建立一种快速有效的诊断方法对禽流感病毒传播的控制显得尤为重要。对于该病的诊断, 传统的方法主要针对病毒抗体的检测, 有琼脂扩散试验、血凝抑制试验、酶联免疫吸附试验等, 传统的检测方法虽然重复性好, 敏感性强, 但耗时费力。目前, 国外已建立以 HA 蛋白为基础的 H5、H7 亚型特异性 RT-

(下转第 115 页)

直是豆粕氨基酸质量不高的主要原因,也是限制豆粕使用量的因素之一。豌豆蛋白粉在蛋氨酸含量方面的优势,使得豌豆蛋白粉部分替代豆粕以达到饲料氨基酸平衡成为可能。试验中 2 种蛋白原料间同一氨基酸和同一原料间不同氨基酸的消化利用差异并不一致,可能是氨基酸消化吸收的具体机制不同<sup>[24]</sup>,但具体原因还有待进一步研究。

#### 4 结论

高邮鸭对豆粕和豌豆蛋白粉中各种氨基酸的消化率存在着较大差异,豆粕的营养价值要高于豌豆蛋白粉。但豌豆蛋白粉的蛋白含量较高,可消化蛋氨酸含量丰富,具有一定的饲用价值,可作为蛋白质饲料原料应用于鸭养殖中。

#### 参考文献:

- [1] 杨宇,刘晓华,龚萍,等. 强饲法测定北京鸭对不同蛋白原料的表观消化率和真消化率[C]//中国畜牧业协会禽业分会第五届中国水禽行业发展大会会刊. 中国畜牧协会,2013:145-149.
- [2] 师伟伟,华欲飞. 豌豆粉丝厂废水中蛋白质的提取和性质研究[J]. 食品工业科技,2014,35(1):120-124.
- [3] Adedokun S A, Parsons C M, Lilburn M S, et al. Comparison of ileal endogenous amino acid flows in broiler chicks and Turkey poults[J]. Poultry Science, 2007, 86(10):1682-1689.
- [4] Kim E J, Utterback P L, Parsons C M. Development of a precision-fed ileal amino acid digestibility assay using 3-week-old broiler chicks[J]. Poultry Science, 2011, 90(2):396-401.
- [5] 陈亮,张宏福,高理想,等. 仿生法评定饲料干物质消化率的影响因素[J]. 中国农业科学,2013,46(15):3199-3205.
- [6] Sibbald I R. A bioassay for available amino acids and true metabolizable energy in feedingstuffs[J]. Poultry Science, 1979, 58(3):668-673.
- [7] 赵峰,赵江涛,张宏福. 排空强饲法测定鸭饲料氨基酸真消化率的研究[J]. 动物营养学报,2008,20(5):592-598.
- [8] 雷廷,冯于明,杜恩存,等. 4 种植物性蛋白质饲料原料在不同日龄肉仔鸡的标准回肠氨基酸消化率的比较[J]. 动物营养学报,2013,25(12):2854-2864.
- [9] 郭广涛,王康宁,李霞. 差量法和酶解酪蛋白法测定鸭饲料氨基酸真消化率及内源排泄量的比较研究[J]. 动物营养学报,

2008,20(1):23-28.

- [10] Darragh A J, Moughan P J, Smith W C. The effect of amino acids and peptide alimentation on the determination of endogenous amino acid flow at the terminal of the rat[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1990, 51(1):47-56.
- [11] 王国兴,王康宁,贾刚,等. 差量法测定鸭饲料氨基酸真消化率和内源氨基酸排泄量的研究[J]. 动物营养学报,2008,20(1):16-22.
- [12] Ammerman C B, Forbes R M, Garrigus U S. Ruminant utilization of inorganic phosphates[J]. Journal of Animal Science, 1957, 16(4):796-810.
- [13] 唐现文,段修军,董飏,等. 13 周龄黑羽番鸭饲料代谢能、粗蛋白、钙、有效磷表观消化率[J]. 江苏农业科学,2014,42(12):253-255.
- [14] Sibbald I R. A bioassay for true metabolizable energy in feeding stuffs[J]. Poultry Science, 1976, 55(1):303-308.
- [15] 杜懿婷,高庆,王玉峰,等. 套测法和直接强饲法测定肉雏鸭饲料中小麦氨基酸及能量营养价值的比较研究[J]. 动物营养学报,2012,24(1):104-110.
- [16] 杨玉娟,姚怡莎,秦玉昌,等. 豆粕与发酵豆粕中主要抗营养因子调查分析[J]. 中国农业科学,2016,49(3):573-580.
- [17] 中国饲料数据库. 中国饲料成分及营养价值表(2015 年第 26 版)[J]. 中国饲料,2015(21):23-33.
- [18] 李金喜. 粉浆蛋白粉饲喂肉食鸡效果试验[J]. 山东家禽,1999(4):11-12.
- [19] 杨元秀,周孝治. 氨基酸分析仪测定饲料及其原料中的含硫氨基酸[J]. 饲料广角,2009(2):40-42.
- [20] 王冉,周岩民,李如治. 五种蛋白质饲料的家禽氨基酸利用率测定研究[J]. 中国饲料,2002(24):17-19.
- [21] Huang K H, Li X, Ravindran V, et al. Comparison of apparent ileal amino acid digestibility of feed ingredients measured with broilers, layers, and roosters[J]. Poultry Science, 2006, 85(4):625-634.
- [22] 王超胜,贾刚,张克英,等. 评定蛋鸡豆粕代谢能和氨基酸可利用率的研究[J]. 动物营养学报,2015,27(3):820-828.
- [23] 赵峰,赵江涛,张宏福. 12 个豆粕样品鸭代谢能值及氨基酸消化率的比较研究[J]. 动物营养学报,2009,21(2):165-172.
- [24] 冯于明. 家禽营养[M]. 2 版. 北京:中国农业大学出版社,2004.

(上接第 106 页)

PCR 诊断技术<sup>[5]</sup>。笔者所在实验室以 H9N2 的 HA 蛋白为基础,比对鸭瘟病毒、鸭呼肠孤病毒、鸭坦布苏病毒、番鸭细小病毒和 I 型鸭肝炎病毒相关基因的序列,最终根据 AY790315.1 序列选取了苷酸序列同源性较高的长 837 bp 的保守序列作为靶序列,成功建立了一种特异性强、敏感性高、重复性好、操作简单的 H9N2 禽流感病毒 RT-PCR 检测方法,普遍适用于临床上 H9N2 感染样品(如内脏混合物、泄殖腔试纸、鼻试纸等)的快速检测,对预防和控制 H9N2 亚型禽流感病毒的流行具有积极的科学意义。

#### 参考文献:

- [1] 王金良,李旭勇,范俊,等. H9N2 亚型禽流感病毒的序列分析及对哺乳动物致病力研究[J]. 中国预防兽医学报,2013,35(8):

663-665.

- [2] 甘孟侯. 禽流感[M]. 2 版. 北京:中国农业出版社,2002.
- [3] Homme P J, Easterday B C. Avian influenza virus infections. I. Characteristics of influenza A-turkey-Wisconsin-1966 virus[J]. Avian Diseases, 1970, 14(1):66-74.
- [4] 陈伯伦,张泽纪,陈伟斌. 禽流感研究 I:鸡 A 型禽流感病毒的分离与血清学初步鉴定[J]. 中国兽医杂志,1994,20(10):3-5.
- [5] 李银. 禽流感病毒 H9N2 鸭分离株的生物学与分子生物学特性及其快速诊断的研究[D]. 南京:南京农业大学,2006.
- [6] 葛菲菲,刘健,杨德全,等. 上海市三株 H9N2 鸭禽流感病毒全基因遗传进化分析[J]. 中国动物传染病学报,2014,22(5):15-20.
- [7] Liu D, Shi W F, Gao F G. Poultry carrying H9N2 act as incubators for novel human avian influenza viruses[J]. Lancet, 2014, 383(9920):869.