

司振书,贾国富. H9 亚型禽流感病毒的分子生物学鉴定[J]. 江苏农业科学,2016,44(6):64-66.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.015

# H9 亚型禽流感病毒的分子生物学鉴定

司振书<sup>1</sup>, 贾国富<sup>2</sup>

(1. 聊城大学农学院, 山东聊城 252000; 2. 山东省聊城市东昌府区畜牧局, 山东聊城 252000)

**摘要:** H9 亚型禽流感病毒(avian influenza virus, AIV)是危害我国养禽业的主要病毒之一,造成了严重的经济损失。根据 H9 亚型 AIV 的 HA 基因设计了 1 对引物,建立了 H9 亚型禽流感病毒的 RT-PCR 鉴定方法。H9 亚型 AIV 的 HA 基因预期扩增的目的片段长度为 425 bp。对 H9N2 亚型禽流感病毒不同稀释度的尿囊液进行检测,证实病毒尿囊液的最低检出量为  $1 \times 10^{4.25}$  EID<sub>50</sub>/100  $\mu$ L。建立的 RT-PCR 检测方法对 H9、H3、H4、H5 亚型 AIV 及新城疫病毒、鸡传染性支气管炎病毒等进行检测,结果仅有 H9N2 亚型 AIV 出现特异性目的条带,其他均未出现目的条带,与其他常见禽病病原无交叉反应;用建立的 RT-PCR 和病毒分离 2 种方法同时对 10 株 H9N2 亚型 AIV 和 8 个病鸡组织的鸡胚尿囊液样品进行检测,结果 2 种检测方法的符合率达 100%。说明该鉴定方法特异性强,敏感性较高。

**关键词:** 禽流感病毒; H9 亚型; 鉴定

**中图分类号:** S855.3    **文献标志码:** A    **文章编号:** 1002-1302(2016)06-0064-02

禽流感病毒(AIV)的核酸为单股负链 RNA,由 8 个独立的 RNA 节段组成<sup>[1]</sup>,变异频繁,亚型众多。H9 亚型禽流感病毒为低致病力毒株,特点是分布广泛,能造成鸡群的免疫抑制,如果与禽传染性支气管炎病毒、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等其他病原协同感染则可引起禽类严重发病。近十几年来,H9 亚型禽流感在我国呈上升趋势,严重危害了我国养禽业发展,影响畜产品的国际贸易,同时还给人类健康带来威胁。研究表明,H9N2 亚型 AIV 为 1997 年引起香港流感的 H5N1 亚型 AIV 提供了内部基因<sup>[2]</sup>,1999 年,发生了 H9N2 亚型 AIV 感染人事件<sup>[3]</sup>,2013 年我国发生了 H7N9 感染人事件,6 个内部基因全部来自于 H9N2 AIV<sup>[4-5]</sup>。所以,H9N2 亚型 AIV 公共卫生意义引起了全世界广泛关注。传统检测 H9 亚型 AIV 的方法主要是病毒分离培养与血凝抑制试验(HI),费时费力,需要多种亚型的血清和抗原,不能及时对病毒进行鉴定或作出诊断。根据 H9 亚型 AIV 的 HA 基因设计了 1 对引物,初步建立了 1 种针对 H9 亚型 AIV 的检测方法,既可对 H9 亚型 AIV 快速、准确地鉴定,又可用于 H9 亚型 AIV 的流行病学调查。

## 1 材料与与方法

### 1.1 毒株

H9N2 亚型 AIV、H3N8 亚型 AIV、H4N6 亚型 AIV、H5N1 亚型 AIV、传染性喉气管炎病毒(ILTV)、传染性支气管炎病毒(IBV)、传染性法氏囊炎病毒(IBDV)、鸡新城疫病毒(NDV)等毒株由中国农业大学动物流感研究室保存并提供。

### 1.2 引物的设计、合成与筛选

根据 H9 亚型禽流感病毒的 HA 基因的序列,通过 DNA-man 软件进行比对,找出 HA 基因的保守区,针对 HA 基因的

保守区序列设计特异性引物,并在 Genbank 上进行 Blast 检测比对分析,用 Oligo 4.0 软件分析上下游引物是否匹配,将分析合格的引物送上海生工生物技术有限责任公司北京合成部合成。合成了针对 HA 基因的 5 对引物,用中国农业大学流感研究室分离保存的 H9N2 亚型 AIV 进行筛选,根据扩增效率确定引物对。确定上游引物 H9-F:5'-TGTGGCAACT-GAAGAAAT-3';下游引物 H9-R:5'-ACCAACCTCCCTC-TATGA-3';退火温度为 53  $^{\circ}$ C。目的片段长度为 425 bp。

### 1.3 主要试剂

TRIzol Reagent 由 invitrogen 公司生产;反转录试剂盒 K1622, Fermentas;氯仿、异丙醇、乙醇等均为市售;GoldenView 由北京索莱宝公司生产。

### 1.4 H9N2 亚型 AIV 病毒含量的测定

取感染 H9N2 亚型禽流感病毒 A/CK/SD/ZB/2007 的尿囊液,作 10 倍倍比稀释,每个稀释度接种 3 枚鸡胚(0.1 mL/枚)。35  $^{\circ}$ C 孵育 48 h,将鸡胚于 4  $^{\circ}$ C 过夜,收获尿囊液,测定其血凝效价,按 Reed-Muench 法计算半数感染量。

### 1.5 病毒 RNA 的提取与 cDNA 的合成

取感染 H9N2 亚型 AIV 毒株 A/CK/SD/ZB/2007 的鸡胚尿囊液 Trizol 法提取病毒的总 RNA,将干燥的 RNA 用 11  $\mu$ L DEPC 水溶解,立即做 RT-PCR 的扩增或 -80  $^{\circ}$ C 保存备用。

将 Unit 12(10  $\mu$ mol/L)1  $\mu$ L 加到含 RNA 的 11  $\mu$ L DEPC 水中,瞬时离心,70  $^{\circ}$ C 水浴 5 min 后,置冰上 5 min。依次加入  $5 \times$  AMV buffer 5  $\mu$ L, dNTPs (10 mmol/L) 2  $\mu$ L, RNasin (40 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, MLV (5 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L,混匀,瞬时离心,37  $^{\circ}$ C 水浴 1 h,70  $^{\circ}$ C 5 min,4  $^{\circ}$ C 保存。

### 1.6 反应体系和反应条件的优化

对 RT-PCR 反应体系和变性、退火、延伸温度和时间、循环次数等条件进行优化,最后确定采用总体积为 25  $\mu$ L 的反应体系:2  $\times$  PCR MIX buffer 12.5  $\mu$ L;浓度为 20 pmol/ $\mu$ L HA 上游引物 H9-F 1  $\mu$ L;HA 下游引物 H9-R 1  $\mu$ L;cDNA 2  $\mu$ L;ddH<sub>2</sub>O 补足至 25  $\mu$ L。最后确定 RT-PCR 最佳循环条

收稿日期:2015-05-15

基金项目:聊城大学博士启动基金(编号:318051310);山东省农业良种工程重点课题(编号:25114426)。

作者简介:司振书(1971—),女,山东冠县人,博士,副教授,研究方向为预防兽医。E-mail:dckszs@163.com。

件为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,53 ℃ 退火 35 s,72 ℃ 延伸 35 s,34 个循环;然后 72 ℃ 延伸 10 min。

### 1.7 产物分析与测序

用最佳反应体系及条件对毒株 A/CK/SD/ZB/2007 进行 PCR 扩增,将产物进行回收纯化,送北京华大基因科技股份有限公司测序。

### 1.8 特异性试验

用建立的 RT-PCR 方法分别对 H9N2 亚型、H3N8 亚型、H4N6 亚型、H5N1 亚型 AIV 及 ILTV、IBV、IBDV、NDV 的鸡胚尿囊液进行 PCR 扩增,分析该检测方法的特异性。

### 1.9 敏感性试验

对已确定病毒含量的毒株 A/CK/SD/ZB/2007 的尿囊液进行  $10^0$ 、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  等不同稀释度稀释。对不同稀释度尿囊液进行 PCR 扩增,分析该检测方法的敏感性。

### 1.10 RT-PCR 检测方法的应用

取经 HI 常规方法鉴定的 H9 亚型 AIV 感染鸡的组织样品 8 份,称量,研磨,加含双抗的 PBS 制成 10%~20% 质量分数的悬液。4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min,取上清接种 10 日龄 SPF 鸡胚,收集 24~72 h 死亡及未死亡的鸡胚尿囊液。对实验室保存的 10 株 H9N2 亚型 AIV 及以上 8 个样品分别用该方法进行 PCR 扩增。

## 2 结果与分析

### 2.1 病毒含量的测定结果

经测定 H9N2 亚型禽流感病毒 A/CK/SD/ZB/2007 的尿囊液,病毒含量为  $1 \times 10^{7.25}$  EID<sub>50</sub>/100 μL。

### 2.2 扩增结果

H9N2 亚型 AIV A/CK/SD/ZB/2007 的扩增结果见图 1。获得了 425 bp 的目的条带,与预期产物大小相符。

### 2.3 测序结果

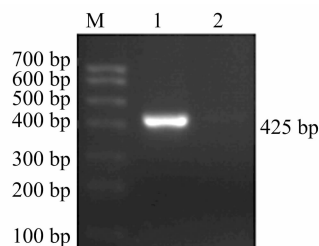
将 HA 基因扩增片段测序结果在 NCBI 流感数据库中进行 Blast 比对,HA 基因序列与 A/Chicken/Shandong/A1/2009 (H9N2)、A/Chicken/Zhejiang/611/2011 (H9N2) 等毒株的第 4 个片段 HA 基因的同源性为 99%。

### 2.4 特异性试验结果

H9N2 亚型 AIV 扩增出 425 bp 的目的条带。而 NDV、H3N8 亚型 AIV、H4N6 亚型 AIV、H5N1 亚型 AIV、ILTV、IBV、IBDV 的尿囊液样品均无条带出现(图 2)。结果表明,该方法对 H9 亚型 AIV 进行检测具有很强的特异性,可特异性地检出 H9 亚型 AIV。

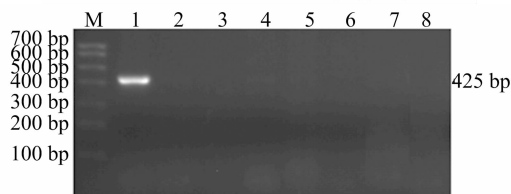
### 2.5 敏感性试验结果

对病毒含量为  $1 \times 10^{7.25}$  EID<sub>50</sub>/100 μL 的病毒 A/CK/SD/



M—Trans DNA marker I; 1—H9N2亚型AIV; 2—空白对照

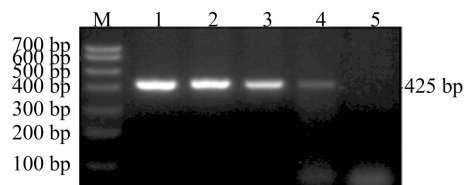
图1 H9亚型AIV RT-PCR扩增结果



M—Trans DNA marker I; 1—H9N2亚型AIV; 2—NDV; 3—H3N8亚型AIV; 4—H4N6亚型AIV; 5—H5N1亚型AIV; 6—ILTV; 7—IBV; 8—IBDV

图2 对其他病原的 RT-PCR 检测

ZB/2007 的尿囊液进行 10 倍倍比稀释,分别提取 RNA,用该方法检测,扩增结果见图 3。在  $10^{-3}$  稀释时仍然可以扩增出明显的目的条带,说明该方法对病毒尿囊液的最低检出量为  $1 \times 10^{4.25}$  EID<sub>50</sub>/100 μL,灵敏度较高,敏感性较强。



M—Trans DNA marker I; 1~5—分别为  $10^0$ 、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  稀释度的 H9N2 亚型 AIV 的尿囊液

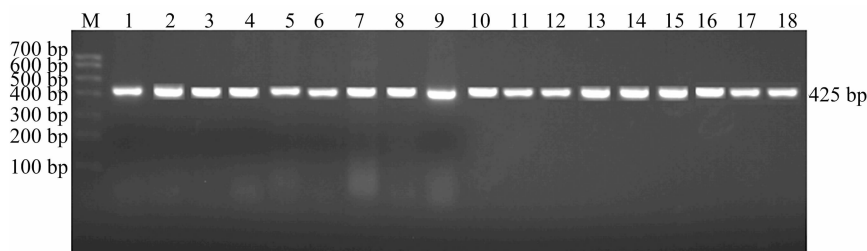
图3 不同稀释度病毒尿囊液的 RT-PCR 检测

### 2.6 RT-PCR 检测方法的应用

对 10 株 H9N2 亚型 AIV 和 8 个病鸡组织的鸡胚尿囊液样品用该方法进行检测,结果(图 4)表明,各毒株与样品均扩增出了 425 bp 的条带,大小与预期相符,表明所建立的 RT-PCR 检测方法的鉴定结果与 HI 等常规方法相比符合率为 100%。

## 3 讨论

H9N2 亚型 AIV 在我国鸡群中分布广泛,并能引起人类感染,给养禽业和公共卫生造成重大影响,能对其快速准确地进行鉴定非常重要。本研究根据 H9N2 亚型禽流感病毒的



M—Trans DNA marker I; 1~10 均为 H9N2 亚型 AIV; 11~18 为病鸡组织的鸡胚尿囊液样品

图4 H9亚型AIV RT-PCR检测方法的应用

艾子凌,高 鹏,杜黎黎,等. 利用 CAPS 初步定位甜瓜 MR-1 白粉病抗性基因[J]. 江苏农业科学,2016,44(6):66-70.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.016

# 利用 CAPS 初步定位甜瓜 MR-1 白粉病抗性基因

艾子凌,高 鹏,杜黎黎,栾非时

(东北农业大学园艺学院/农业部东北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室,黑龙江哈尔滨 150030)

**摘要:**从国际生理小种鉴别寄主中选取甜瓜抗病自交系 MR-1 为母本,感病自交系 Topmark 为父本,构建 F<sub>2</sub> 代群体。对 354 株 F<sub>2</sub> 代群体进行田间甜瓜白粉病抗病性调查并分析其遗传规律,发现甜瓜白粉病的抗性基因为单显性基因;根据两亲本基因组重测序数据,自行开发设计 CAPS 分子标记,将具有多态性的标记应用于 F<sub>2</sub> 代基因分型以构建遗传连锁图谱。图谱内含 142 个 CAPS 标记,分布于 12 个连锁群上。图谱总长度 2 065.47 cM,平均距离 14.55 cM;标记最多的为第四连锁群,分布 22 个标记,标记间平均距离为 11.61 cM;最长的为第五连锁群,总长 277.98 cM;最短的为第三连锁群,总长 65.6 cM。得到 1 个甜瓜白粉病抗性相关基因位点,该位点在第七连锁群上,位于 CAPS 标记 7-4E 和 7-1H 之间。

**关键词:**甜瓜;白粉病;生理小种;CAPS;遗传图谱

**中图分类号:** S436.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)06-0066-05

甜瓜白粉病别称白毛病、粉霉病,常在坐果期发生,是一种世界性病害,严重威胁葫芦科作物生长<sup>[1]</sup>。病菌侵染到叶片表面,起初叶片上只是有水滴大小的白色圆形粉状霉点,在高温潮湿的环境里迅速布满叶片,蔓延至叶柄、茎蔓,浓厚的白粉菌不仅降低感病植株的光合效能,还能增加植株的蒸腾效能,长时间呼吸作用强于光合作用导致植株萎黄干枯,提早衰亡,严重影响甜瓜产量和品质<sup>[2]</sup>。甜瓜白粉病致病菌有 3 个属,6 个种,瓜单囊壳白粉菌分化出生理小种 0、1、2(2U. S、

2France)、3、4、5<sup>[3]</sup>、6、7、N3 和 N4<sup>[4]</sup>;二孢白粉菌衍生出生理小种 0 和生理小种 1<sup>[5]</sup>。诸多病原菌仅仅依靠化学制剂已不能根除白粉病,且随着时间增长病原菌已产生耐药性,即使加大用药剂量也难以获得好的效果,这对甜瓜白粉病防治工作造成了极大的困难<sup>[6]</sup>。面对白粉病对甜瓜造成的重大危害,外界施药又困难重重,培育抗病新品种成为杜绝白粉病的不二方法。然而传统的育种方法极易受环境因素、基因表达、基因显隐性、目标基因与不利基因的连锁等影响,使得育种周期长,选择目标性状困难,很难培育出优良品种<sup>[7-8]</sup>。分子标记辅助育种可以有针对性的培育出所含目标性状的新品种,首先要明确致病菌类型研究抗病规律进而获得抗病基因<sup>[9]</sup>。本试验以甜瓜高抗白粉病品系 MR-1(P<sub>1</sub>)和甜瓜高感白粉病品系 Topmark(P<sub>2</sub>)为亲本配制杂交组合,探索抗源 MR-1 对瓜单囊壳白粉菌生理小种 1 的抗性遗传规律。以 F<sub>2</sub> 群体为作图群体,利用 CAPS 技术,定位抗性基因,为甜瓜抗白粉

收稿日期:2015-03-11

基金项目:国家自然科学基金(编号:31301791);农业部“948”项目(编号:2014-S15)。

作者简介:艾子凌(1988—),女,黑龙江齐齐哈尔人,硕士研究生,主要从事甜瓜分子育种。E-mail:linglingfighting@126.com。

通信作者:栾非时,教授,博士生导师,主要从事西甜瓜分子遗传育种。E-mail:luanfeishi@sina.com。

HA 基因和 NA 基因的保守区序列各设计 1 对引物,初步建立了针对 H9N2 亚型禽流感病毒的 RT-PCR 快速诊断方法,建立的 RT-PCR 检测方法对 H3、H4、H5、H9 等亚型流感病毒、新城疫病毒和鸡传染性支气管炎病毒等进行检测,只有 H9N2 亚型 AIV 出现特异性目的条带,其他亚型 AIV 与 NDV 等无任何条带,说明该方法对其他亚型 AIV 及 NDV 等无交叉反应,具有特异性;通过对 H9N2 亚型 AIV 不同稀释度进行检测,证实病毒尿囊液的最低检出量为  $1 \times 10^{4.25}$  EID<sub>50</sub>/100 μL,说明该检测方法特异性强,敏感性较高;对 10 株 H9N2 亚型 AIV 及 8 个病鸡组织的鸡胚尿囊液样品进行检测,其结果与经典的 HI 试验鉴定符合率为 100%。该方法可对 H9 亚型 AIV 进行快速鉴定,为试剂盒的研制打下了良好基础,在兽医临床诊断和流行病学调查方面具有较好的应用前景。

**参考文献:**

[1] Webster R G, Bean W J, German O T, et al. Evolution and ecology of

influenza A viruses [J]. Clinical Microbiology Reviews, 1992, 56 (1):152-157.

[2] Guan Y, Shortridge K F, Krauss S, et al. H9N2 influenza viruses possessing H5N1-like internal genomes continue to circulate in poultry in southeastern China [J]. Journal of Virology, 2000, 74 (20): 9372-9380.

[3] 郭元吉,谢健屏,吴昆昱,等. 流感病毒 A/广州/333/99 (H9N2) 毒株基因组特性的研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2002, 16(2):142-145.

[4] Shi J Z, Deng G H, Liu P H, et al. Isolation and characterization of H7N9 viruses from live poultry markets - Implication of the source of current H7N9 infection in humans [J]. Chinese Science Bulletin, 2013, 58(16):1857-1863.

[5] Gao R, Cao B, Hu Y, et al. Human infection with a novel avian - origin influenza A (H7N9) virus [J]. The New England Journal of Medicine, 2013, 368(20):1888-1897.