

司振书,殷国政,路建彪,等. H9N2 亚型 AIV 双重 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 江苏农业科学,2019,47(7):35-37.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.07.009

# H9N2 亚型 AIV 双重 RT-PCR 检测方法的建立

司振书,殷国政,路建彪,李玉保

(聊城大学农学院,山东聊城 252000)

**摘要:**为 H9N2 亚型 AIV 进行快速、准确鉴定与诊断,根据 H9N2 亚型禽流感病毒的 HA、NA 基因各设计 1 对引物,建立了一种对 2 个表面基因同时进行扩增的双重 RT-PCR 检测方法。HA、NA 基因预期扩增的目的片段长度分别为 700、423 bp。通过对 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。采用该方法对 H1~H15 和 N1~N9 等亚型流感病毒及新城疫病毒等进行检测,结果只有 H9N2 亚型 AIV 出现 2 个特异性目的条带,与其他常见禽病原无交叉反应;用建立的双重 RT-PCR 和病毒分离 2 种方法同时对送检样品进行检测,结果 2 种方法的符合率达 99.77%,说明该检测方法特异性强、敏感性较高,在临床诊断和流行病学调查方面具有较好的应用前景。

**关键词:**禽流感病毒;H9N2 亚型;双重 RT-PCR;检测方法

**中图分类号:** S852.65<sup>+</sup>7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)07-0035-03

H9N2 亚型禽流感病毒为中低致病力毒株,分布广泛,司振书等对山东省鸡群进行了 H9 亚型 AIV 的感染情况进行了调查,疑似流感鸡病料 RT-PCR 阳性率为 8.41%<sup>[1]</sup>。该病毒能造成鸡群的免疫抑制,如果与其他病原协同感染则可引起禽类严重发病,如与金黄色葡萄球菌混合感染可引起肉鸡发病,死亡率达 6%<sup>[2]</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>[3-4]</sup>,1999 年来发生了多次 H9N2 亚型 AIV 感染人的事件<sup>[5]</sup>,给人类健康带来威胁。禽流感病毒有多种检测方法,包括血凝(HA)、血凝抑制(HI)试验,神经氨酸酶抑制(NI)试验,琼脂扩散试验(AGP),酶联免疫吸附试验(ELISA),病毒的中和试验(NT),免疫荧光抗体技术(IFA)和 real-time RT-PCR 等。司振书等建立了针对 H9 亚型 AIV 的 RT-PCR 检测方法<sup>[6]</sup>,包红梅

等建立了一步法 RT-PCR 检测方法,具有较好地特异性和敏感性<sup>[7]</sup>,但以上方法没有对 NA 基因进行扩增,不能确定 NA 亚型。司振书等对 H9N2 亚型禽流感病毒的 HA、NA 基因分别进行扩增,操作较麻烦且多耗试验材料<sup>[8]</sup>。传统的血清学方法则需要多种亚型的血清和抗原,费时费力。根据 H9N2 亚型禽流感病毒的 HA 基因和 NA 基因各设计 1 对引物,初步建立了一种针对 H9N2 亚型 AIV 的双重 RT-PCR 检测方法,该方法特异性强、敏感性较高。该试验于 2012 年在中国农业大学动物流感研究室完成。

## 1 材料与方法

### 1.1 毒株

H9N2 亚型 AIV 标准参考毒株、H1~H15 亚型 AIV、N1~N9 亚型 AIV、鸡新城疫病毒、传染性支气管炎病毒、传染性法氏囊炎病毒、传染性喉气管炎病毒、马立克氏病病毒及鸡痘病毒等毒株,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

针对 HA、NA 基因的保守区序列分别设计特异性引物,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至生工生物工程(上海)股份有限公司北京合成部合成。

收稿日期:2017-11-12

基金项目:聊城大学博士启动基金(编号:318051310);聊城大学实验技术研究基金(编号:LDSY2014046)。

作者简介:司振书(1971—),女,山东冠县人,博士,副教授,主要从事动物病毒学研究。E-mail:dckszs@163.com。

通信作者:李玉保,博士,教授,主要从事家禽疫病防控研究。E-mail:liyubao@lcu.edu.cn。

[7] 宋海斌,崔喜波,马鸿艳,等. 基于 SSR 标记的甜瓜品种(系) DNA 指纹图谱库的构建[J]. 中国农业科学,2012,45(13):2676-2689.

[8] 叶卫军,杨勇,周斌,等. 分子标记在绿豆遗传连锁图谱构建和基因定位研究中的应用[J]. 植物遗传资源学报,2017,18(6):1193-1203.

[9] 周丽霞,吴翼,肖勇. 基于 SSR 分子标记的油棕遗传多样性分析[J]. 南方农业学报,2017,48(2):216-221.

[10] 黄海燕,杜红岩,乌云塔娜,等. 基于杜仲转录组序列的 SSR 分子标记的开发[J]. 林业科学,2013,49(5):176-181.

[11] 李炎林,杨星星,张家银,等. 南方红豆杉转录组 SSR 挖掘及分

子标记的研究[J]. 园艺学报,2014,41(4):735-745.

[12] 张振,张含国,莫迟,等. 红松转录组 SSR 分析及 EST-SSR 标记开发[J]. 林业科学,2015,51(8):114-120.

[13] 宗宇,王月,朱友银,等. 基于中国樱桃转录组的 SSR 分子标记开发与鉴定[J]. 园艺学报,2016,43(8):1566-1576.

[14] Gao L F, Tang J F, Li H W, et al. Analysis of microsatellites in major crops assessed by computational and experimental approaches[J]. Molecular Breeding, 2003, 12(3):245-261.

[15] 戚维聪,程计华,黄邦全,等. 基于海甘蓝 RNA-Seq 序列开发 EST-SSR 分子标记[J]. 江苏农业学报,2014,30(5):997-1002.

分别合成了针对 HA、NA 基因的 5 对引物,用 H9N2 亚型 AIV 进行筛选,根据扩增效率确定的引物对见表 1。HA、NA 基因扩增的目的片段长度分别为 700、423 bp。

表 1 H9、N2 基因扩增引物核苷酸序列

引物名称	类型	引物序列 (5'→3')	长度 (bp)	靶序列长度 (bp)
H9-F	正向	CATAATGGGATGCTGTGTGC	20	700
H9-R	反向	CACCTTTTTCGGTCTGACATTG	21	
N2-F	正向	ATGGAACCTTGTGCCGTAG	18	423
N2-R	反向	CATAACCTGAGCGTGAAT	18	

1.3 主要试剂

TRIzol Reagent, 由 Invitrogen 公司生产;反转录试剂盒 K1622, Fermentas;三氯甲烷、异丙醇、乙醇等均为市售;T<sub>4</sub> 连接酶, 由 Promega 公司生产;GoldenView、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒, 由北京索莱宝公司生产;Trans5K DNA Marker、DL2000DNA Marker、DH5α 感受态细胞, 由北京全式金生物技术有限公司生产;PMD-18T 载体, 由 TaKaRa 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/鸡/山东/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 ℃ 孵育 48 h, 将鸡胚于 4 ℃ 过夜, 收获尿囊液, 测定其血凝效价, 按 Reed-Muench 法公式计算半数感染量。

1.5 病毒 RNA 的提取

Trizol 法提取毒株 A/Chicken/Shandong/ZB/2007 和 A/Chicken/Shandong/6/96 的 RNA, 立即作 RT-PCR 的扩增或 -80 ℃ 保存备用。

1.6 cDNA 的合成

按试剂盒说明书进行。

1.7 双重 RT-PCR 反应体系和反应条件的优化

对双重 RT-PCR 的反应体系和变性、退火、延伸温度和时间、循环次数等反应条件进行优化。最后确定采用总体积为 25 μL 的反应体系: 2 × PCR mix buffer 12.5 μL; 浓度为 20 pmol/μL HA 上游引物 H9-F 1.0 μL; HA 下游引物 H9-R 1.0 μL; 浓度为 20 pmol/μL NA 上游引物 N2-F 1.5 μL; NA 下游引物 N2-R 1.5 μL; ddH<sub>2</sub>O 补足至 25.0 μL。最后确定双重 RT-PCR 最佳循环条件为: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 48 ℃ 退火 35 s, 72 ℃ 延伸 45 s, 34 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。

1.8 双重 RT-PCR 特异性试验

用建立的双重 RT-PCR 方法分别对 H1~H15 亚型 AIV、N1~N9 亚型 AIV 进行检测, 以检测其他亚型病毒是否存在假阳性, 即是否与其他亚型 AIV 具有交叉反应; 用该方法对鸡新城疫病毒、鸡传染性支气管炎病毒、传染性法氏囊炎病毒、传染性喉气管炎病毒、马立克氏病病毒及鸡痘病毒等毒株进行检测, 分析该双重 RT-PCR 检测方法的特异性。

1.9 双重 RT-PCR 敏感性试验

对已确定病毒含量的毒株 A/Chicken/Shandong/ZB/2007 的尿囊液进行 10<sup>0</sup>、10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup> 等不同稀释度稀释, 对不同稀释度尿囊液进行检测以确定其敏感性。

1.10 双重 RT-PCR 的应用

对送检的 226 份具呼吸道症状的病鸡病料和 201 份棉拭子样品用双重 RT-PCR 和病毒分离 2 种方法检测, 以检测 2 种方法的符合率。

2 结果与分析

2.1 病毒含量的测定结果

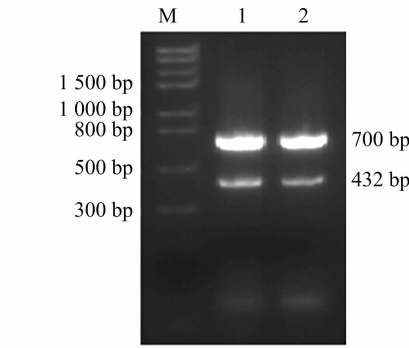
经测定 H9N2 亚型禽流感病毒 A/Chicken/Shandong/ZB/2007 的尿囊液, 病毒含量为 1 × 10<sup>7.25</sup> EID<sub>50</sub>/100 μL。

2.2 H9、N2 双重 RT-PCR 扩增结果

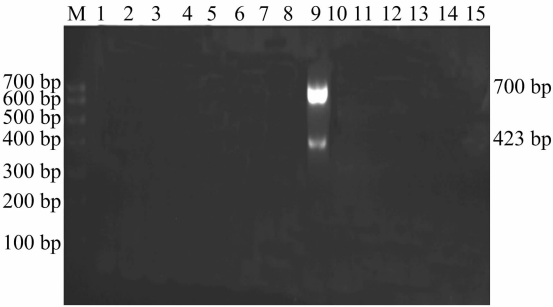
H9N2 亚型 AIV A/Chicken/Shandong/ZB/2007 和 A/Chicken/Shandong/6/96 的双重 RT-PCR 扩增结果见图 1, 均获得 700、423 bp 的目的片段。

2.3 特异性试验结果

对 H1~H15 亚型 AIV (其中 H9 AIV 为 H9N2 亚型) 进行双重 RT-PCR 检测, H9N2 亚型 AIV 扩增出 700、423 bp 的 2 个目的条带, 其他亚型病毒均没有扩增出目的条带 (图 2)。对 N1~N9 等其他亚型 (其中 N2 AIV 为 H9N2 亚型) AIV 进行检测, H9N2 亚型 AIV 扩增出 700、423 bp 的目的条带, 其他亚型病毒均未出现条带 (图 3)。对 NDV、IBV 等其他病毒进行检测 (图 4)。H9N2 亚型 AIV 扩增出 700、423 bp 的 2 个目的条带, 而 NDV、IBV 等均无条带产生。结果表明, 所建立的双重 RT-PCR 检测方法具有很强的特异性, 可以特异性地检出 H9N2 亚型禽流感病毒。



M—Trans5K DNA marker; 1、2—H9N2 亚型 AIV A/Chicken/Shandong/ZB/2007、A/Chicken/Shandong/6/96  
图1 H9N2 亚型 AIV 双重 RT-PCR 扩增结果



M—Trans DNA marker I; 1—H1 亚型 AIV; 2—H2 亚型 AIV; 3—H3 亚型 AIV; 4—H4 亚型 AIV; 5—H5 亚型 AIV; 6—H6 亚型 AIV; 7—H7 亚型 AIV; 8—H8 亚型 AIV; 9—H9 亚型 AIV (H9N2); 10—H10 亚型 AIV; 11—H11 亚型 AIV; 12—H12 亚型 AIV; 13—H13 亚型 AIV; 14—H14 亚型 AIV; 15—H15 亚型 AIV  
图2 H1~H15 亚型 AIV 的双重 RT-PCR 检测结果

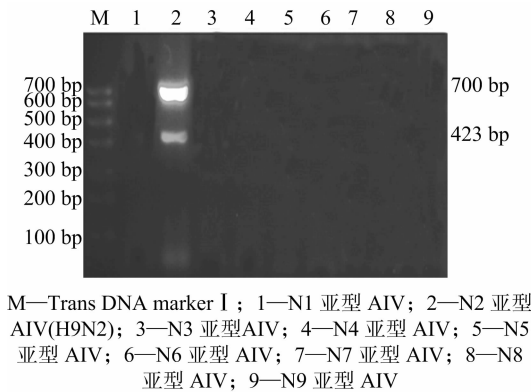


图3 N1~N9 亚型 AIV 的双重 RT-PCR 检测结果

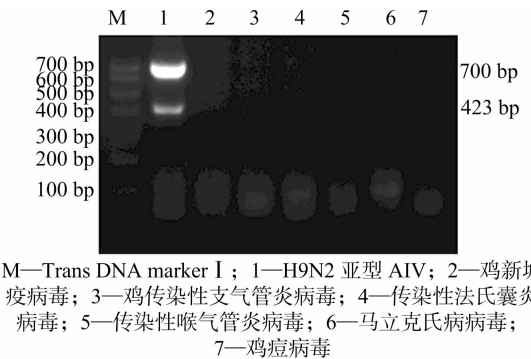


图4 对其他病原的双重 RT-PCR 检测结果

表1 H9N2 亚型 AIV 双重 RT-PCR 检测方法的临床应用

样品来源	样品类型	样品数量 (份)	RT-PCR 阳性数 (份)	阳性率 (%)	分离毒株数量 (份)	分离率 (%)
健康鸡	棉拭子	201	9	4.48	9	4.48
具呼吸道症状病鸡	肺、肾等	226	20	8.85	21	9.29
合计		427	29	6.79	30	7.03

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,因此对其快速准确地鉴定非常重要。RT-PCR 诊断技术可从基因水平检测 AIV,具有较高的特异性和敏感性。建立的双重 RT-PCR 检测方法对 H1~H15、N1~N9 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 2 个特异性目的条带,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;通过对不同稀释度的 H9N2 亚型 AIV 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,说明该检测方法敏感性较高;对送检的 226 份具呼吸道症状的病鸡病料和 201 份棉拭子样品进行检测,其结果与经典的病毒分离与血清学鉴定符合率达 99.77%。

该方法 H9、N2 基因扩增所产生的目的条带分别为 700、423 bp,相比而言,700 bp 的条带更亮,而长度为 423 bp 的条带较暗,尽管对各引物浓度、模板用量、退火温度等因素进行了多次试验,反复优化,扩增片段仍然一明一暗,短的片段虽相比暗些,但条带明显,不影响结果的判断。建立的双重 RT-PCR 方法可对 H9N2 亚型 AIV 进行快速鉴定,该方法的建立为进一步进行试剂盒的研制打下了良好的基础,在临床

2.4 敏感性试验结果

对不同稀释度的病毒液分别进行检测(图 5)。在  $10^{-3}$  稀释时,仍然可以扩增出 2 个明显的目的条带,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。

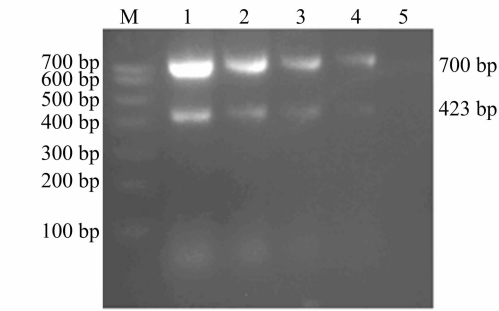


图5 不同稀释度尿囊液病毒的双重 RT-PCR 检测结果

2.5 双重 RT-PCR 的应用

用建立的双重 RT-PCR 和病毒分离与血清学鉴定 2 种方法,同时对送检的 226 份具呼吸道症状的病鸡病料和 201 份棉拭子样品进行检测,结果 2 种检测方法的符合率达 99.77%(表 1)。

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] 司振书,李玉保,刘文强,等. 山东省鸡群 H9 亚型流感病毒的分离及其感染情况调查[J]. 黑龙江畜牧兽医,2012(11):98-100.

[2] 邵丹,张海涛,司振书. 肉鸡 H9 亚型禽流感与金黄色葡萄球菌混合感染的诊治[J]. 黑龙江畜牧兽医,2016(12):125-126.

[3] 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.

[4] 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.

[5] 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.

[6] 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.

[7] 包红梅,王秀荣,陶启蒙,等. H9 亚型禽流感病毒 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医科学,2010,40(4):384-389.

[8] 司振书,朱明霞,王桂英. H9N2 亚型禽流感病毒 RT-PCR 鉴定方法的应用[J]. 黑龙江畜牧兽医,2016(05 上):19-21.