

赵冬敏, 吴青, 赵翰飞, 等. H5、H7、H9 亚型禽流感病毒三重 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(9): 204-207.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.09.047

H5、H7、H9 亚型禽流感病毒三重 RT-PCR 检测方法的建立

赵冬敏, 吴青, 赵翰飞, 刘青涛, 杨婧, 黄欣梅, 刘宇卓, 韩凯凯, 毕可然, 李银

(江苏省农业科学院兽医研究所/农业部兽用生物制品工程技术重点实验室/国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏南京 210014)

摘要:根据 GenBank 中 H5、H7、H9 亚型禽流感病毒血凝素蛋白(HA)编码基因,使用 DNASTar 软件比较分析筛选出特异的保守片段,设计 3 对引物 H5-P1/H5-P2、H7-P3/P4 和 H9-P5/P6。在此基础上,建立了 H5、H7、H9 亚型禽流感的三重 RT-PCR 检测方法,本方法可同时检测出样品中的 H5、H7、H9 亚型禽流感病毒。敏感性试验结果表明,该方法检测 H5、H7、H9 亚型禽流感 RNA 的敏感性分别达 2.80、10.50、5.73 pg/μL,该方法检测其他相关病毒时均为阴性,具有很高的特异性,此外,该方法具有良好的重复性。利用所建立方法对 240 份禽流感临床样品进行检测,结果与血凝试验和血凝抑制试验结果的符合率为 100%。此诊断方法检出时间早,且特异、敏感、经济、快速,可普遍推广,在禽流感诊断和防治中具有重要意义和应用价值。

关键词:禽流感病毒;H5 亚型;H7 亚型;H9 亚型;三重 RT-PCR

中图分类号:S852.65⁺7 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)09-0204-03

禽流行性感(avian influenza virus, AIV)是由正黏病毒科 A 型流感病毒引起的禽类烈性传染病,其易感动物包括鸡、鸭、火鸡、鹌鹑等家禽及野鸟、水禽、海鸟等野禽,且对人类和低等哺乳动物也能引起严重的疾病,包括高致病性毒株引起的急性致死性疫病以及低致病性毒株引起的产蛋下降、轻度呼吸道疾病等多种疾病^[1]。禽流感病毒亚型较多,毒株变异较大,给本病的防治带来极大困难。国际兽医局(OIE)规定该病为 A 类传染病。我国也将此病列为一类动物疫病。

研究发现 H5、H7、H9 是禽流感病毒中具有较强致病性的 3 种亚型,其中 H5N1 禽流感病毒对禽类的致死率通常可以达到 100%^[2-3]。1997 年,香港首次报道发生 18 例人感染 H5N1 禽流感病毒,其中 6 人死亡,引起了全球卫生界的广泛关注^[4],证实了 AIV 可直接对人类造成威胁。2013 年 3 月,我国上海、安徽等地发现人感染 H7N9 型禽流感,共造成 136 人感染,其中 37 人死亡,是全球首次发现的新亚型流感病毒^[5]。自 1994 年首次报道鸡群分离到 H9N2 亚型禽流感病毒以来^[6],H9 亚型低致病性禽流感病毒广泛存在于我国^[7]。低致病性的 H9N2 亚型禽流感病毒虽然不引起感染禽类的大量死亡,但是可导致感染禽产蛋下降和免疫抑制,与其他病原共感染时常导致高死亡率,给我国养禽业造成了巨大的经济损失^[8-9]。1999 年 H9N2 亚型禽流感在内地和香港感染人事

件的发生,更突出体现了禽流感预防治疗的公共卫生意义^[10]。因此,快速、及时、准确地检测出禽流感对保障国民的生命财产安全具有重要意义。

RT-PCR 作为一种现代分子生物学基因诊断技术,具有高度敏感性和特异性,并可极大缩短禽流感病毒的检出时间,能在数小时内检出痕量病原,可克服传统的 AIV 诊断技术包括病毒分离鉴定试验周期长的缺点,为 AIV 早期快速诊断提供了敏感、快速、实用的方法。本试验针对我国养禽业的主要病毒亚型 H5、H7 和 H9,建立了 H5、H7、H9 的三重 RT-PCR,快速诊断禽流感,进行禽流感早期诊断,疫情预测,为禽流感的防治提供有效的早期诊断技术和监测手段,同时也为高致病性禽流感防治争取宝贵的快速反应时间。

1 材料与方法

1.1 试验材料

H9 亚型禽流感病毒由笔者所在实验室分离鉴定及序列测定。H5 亚型禽流感病毒 RNA 及阳性血清、H7 亚型禽流感病毒 RNA 及阳性血清均由美国密西西比州立大学万秀峰教授惠赠。鸭坦布苏病毒(duck tembusu virus, DTMUV),鸡传染性喉气管炎病毒(avian infectious laryngotracheitis virus, ILTV),鸡传染性支气管炎病毒(avian infectious bronchitis virus, IBV),减蛋综合征病毒(egg drop syndrome virus, EDS-76)、H9 亚型禽流感病毒阳性血清均由本实验室保存。

1.2 试剂

液体病毒 RNA/DNA 抽提试剂盒,购自 Axygen 生物科技有限公司;5 × AMV 反转录缓冲液、High Pure dNTPs (10 mmol/L)、Rnase Inhibitor (40 U/μL)、反转录酶 AMV、dNTPs (2.5 mmol/L)、Mg²⁺ (25 mmol/L)、Ex Taq 反应缓冲液 (10 ×)、Ex Taq 酶,均购自 TaKaRa 公司;反转录随机引物,由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

收稿日期:2018-01-19

基金项目:国家重点研发计划(编号:2017YFD0500800);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(15)1058]。

作者简介:赵冬敏(1982—),女,山东兖州人,博士,副研究员,主要从事家禽重大疫病流行病学和致病分子机制的研究。Tel: (025) 84390047;E-mail: zhaodongmin126@126.com。

通信作者:李银,博士,研究员,主要从事家禽疫病流行病学和防治研究。Tel: (025) 84391687;E-mail: muziyin08@163.com。

1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 已发表的 H5、H7 和 H9 亚型禽流感病毒基因序列,分析 HA 基因保守区,应用 DNASTAR 软件设计 3 对特异性引物(表 1),由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

表 1 引物序列			
亚型	引物名称	序列 (5'→3')	片段长度 (bp)
H5	P1	CCAATCCAGCCAATGACC	427
	P2	CTTCGACTTTGCCCCGTTT	
H7	P3	AATGCACARGGAGGAGAACT	501
	P4	TGAYGCCCCGAAGCTAAACCA	
H9	P5	CGGCTACCAATCAACAACTCC	673
	P6	ATCTTACTCGCAGTGTCTGACC	

1.4 样品的准备

按照试剂盒说明书提取 H9 亚型禽流感病毒、DTMUV、IBV 的总 RNA。反转录体系:5 × AMV 反转录缓冲液 4.0 μL,反转录随机引物(9 mer) 1.0 μL,dNTP(10 mmol/L) 2.0 μL,Ribonuclease Inhibitor 0.5 μL,AMV 反转录酶 1.0 μL,模板 RNA 11.5 μL。按如下条件将病毒 RNA 反转录成 cDNA:42 ℃ 反应 1 h,95 ℃ 反应 5 min。将 H5、H7 亚型禽流感病毒 RNA 按上述反应体系和条件反转录成 cDNA。参照试剂盒说明书,提取 EDS-76、ILTV 的 DNA,保存于 -20 ℃,备用。

1.5 单引物单模板验证

分别以 H5、H7、H9 亚型禽流感病毒 cDNA 为模板,进行单引物单模板 PCR 反应,反应体系如下:总体积为 25.00 μL,其中双蒸水 15.25 μL,10 × PCR Buffer 2.50 μL,25 mmol/L MgCl₂ 2.00 μL,dNTP(2.5 mmol/L) 2.00 μL,上、下游引物(50 μmol/L) 各 0.50 μL,模板 cDNA 2.00 μL,Ex Taq(5 U/μL) 0.25 μL。PCR 反应程序:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 50 s,56 ℃ 退火 50 s,72 ℃ 延伸 1 min,30 个循环;然后 72 ℃ 延伸 10 min。循环反应结束后,将扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 H5、H7、H9 亚型禽流感病毒三重 RT-PCR 检测方法的建立

经过对引物比例、引物浓度、Mg²⁺ 浓度、反应时间、反应温度等因素的反复优化,确定了 H5、H7、H9 亚型禽流感病毒多重 PCR 基本的反应体系为:双蒸水 13.25 μL,10 × PCR Buffer 2.50 μL,25 mmol/L MgCl₂ 2.00 μL,dNTP(2.5 mmol/L) 2.00 μL,H5-P1(50 μmol/L) 0.50 μL,H5-P2(50 μmol/L) 0.50 μL,H7-P3(50 μmol/L) 0.50 μL,H7-P4(50 μmol/L) 0.50 μL,H9-P5(50 μmol/L) 0.50 μL,H9-P6(50 μmol/L) 0.50 μL,混合病原 cDNA 2.00 μL,Ex Taq(5 U/μL) 0.25 μL。按照“1.5”节中所述 PCR 程序进行反应,循环结束后将扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.7 敏感性试验

测定 H5、H7、H9 亚型禽流感病毒 RNA 浓度。在此基础上,分别进行 10 倍梯度稀释,然后反转录成 cDNA,进行三重 RT-PCR 方法检测,确定该方法的敏感性。

1.8 重复性试验

用建立的三重 RT-PCR 检测方法,对 3 份禽流感病毒阳性样品重复检测 3 次,以验证本方法的重复性和稳定性。

1.9 特异性试验

取 DTMUV、ILTV、IBV 和 EDS-76,分别提取 RNA 或 DNA,采用三重 RT-PCR 进行扩增,确定本方法检测的特异性。

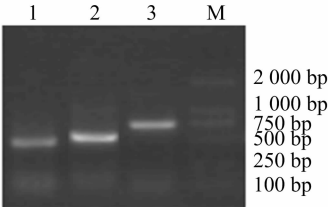
1.10 三重 RT-PCR 方法对临床样品的检测

采集江苏地区活禽市场中鸡、鸭、鹅的泄殖腔拭子和喉拭子 240 份,置于添加四抗的无菌 PBS 缓冲液中,冻融 3 次后,尿囊腔接种 9~11 日龄 SPF 鸡胚,弃去 24 h 内死亡鸡胚,于接种后 120 h 收集鸡胚尿囊液,分别进行三重 RT-PCR 检测、血凝试验和血凝抑制试验。

2 结果与分析

2.1 单引物单模板验证

将 H5、H7 和 H9 亚型禽流感病毒 RNA 反转录成 cDNA 后,采用单引物单模板进行 PCR,结果显示,H5、H7、H9 亚型禽流感病毒特异性检测引物的目的基因大小分别为 427、501、673 bp,与试验设计相符(图 1)。

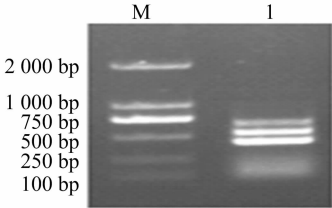


M—DNA Marker DL 2000; 1—H5 型禽流感病毒; 2—H7 型禽流感病毒; 3—H9 型禽流感病毒

图1 H5、H7、H9 亚型禽流感病毒的单一 RT-PCR 检测结果

2.2 H5、H7、H9 亚型禽流感病毒三重 RT-PCR 方法的建立

以 H5、H7 和 H9 亚型禽流感病毒混合 cDNA 为模板,同时采用 3 对引物进行 RT-PCR 扩增,经过对引物比例、引物浓度、Mg²⁺ 浓度、反应时间、反应温度等因素的反复优化,电泳结果显示,H5、H7 和 H9 亚型混合模板扩增出预期大小的特异性条带(图 2)。



M—DNA Marker DL 2000; 1—三重 RT-PCR 检测结果

图2 H5、H7、H9 亚型禽流感病毒三重 RT-PCR 检测结果

2.3 敏感性试验

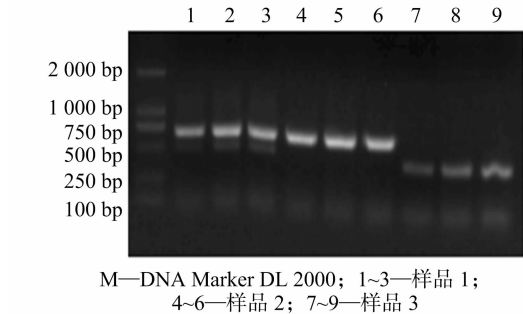
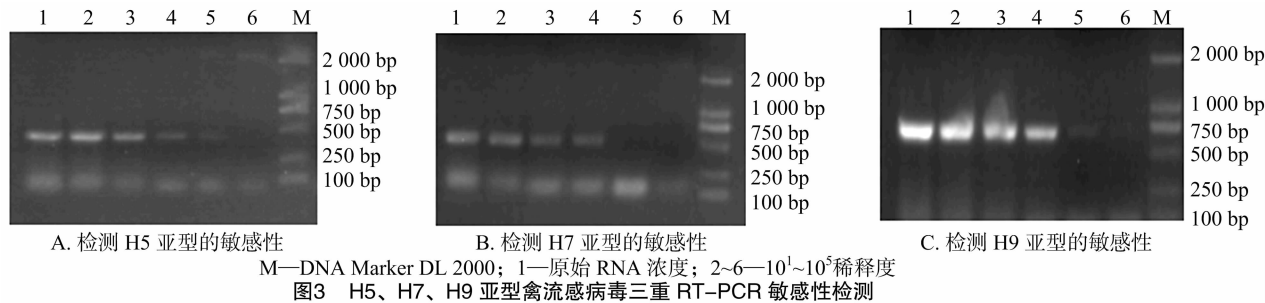
禽流感病毒核酸初始质量浓度的测定结果为:H5 亚型模板的质量浓度为 28.0 ng/μL,H7 亚型模板的质量浓度为 105.3 ng/μL,H9 亚型模板的质量浓度为 57.3 ng/μL。将其进行 10¹~10⁵ 稀释后进行三重 RT-PCR 扩增。检测结果表明,该方法能检测出稀释度为 10⁴ 的 H5、H7 和 H9 亚型 AIV(图 3)。

2.4 重复性试验

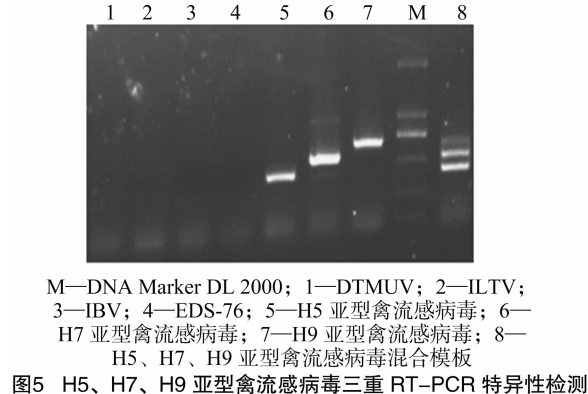
用建立的三重 RT-PCR 检测方法,对 3 份禽流感样品重复检测 3 次,结果均出现相同的检测结果,表明所建立的方法具有良好的稳定性和重复性(图 4)。

2.5 特异性试验

采用所建立的三重 RT-PCR 方法对几种禽主要疫病病



毒进行检测,结果对坦布苏病毒、鸡传染性喉气管炎病毒、鸡传染性支气管炎病毒、减蛋综合征病毒进行 RT-PCR 均未出现特异扩增条带,说明该检测方法特异性好(图 5)。



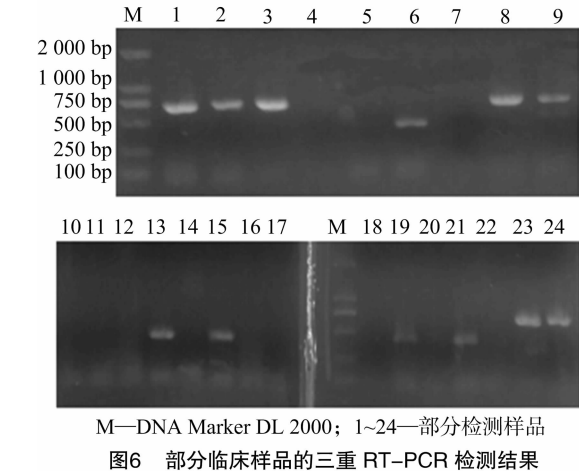
2.6 三重 RT-PCR 方法对临床样品的检测

采集江苏地区活禽市场中鸡、鸭、鹅的泄殖腔拭子和喉拭子 240 份,接种 9~11 日龄 SPF 鸡胚后收集鸡胚尿囊液,利用禽流感三重 RT-PCR 方法进行检测,结果检测到 H5 亚型禽流感病毒 5 份、H9 亚型禽流感病毒 6 份,H9 和 H7 亚型混合感染 1 份。所检测结果与血凝试验和血凝抑制试验的结果完全符合,证明该方法可用于临床检测(图 6)。

3 结论与讨论

禽流感病毒可引起禽类全身性或呼吸器官性传染病。至今 A 型禽流感病毒的血凝素已发现 16 种,神经氨酸酶 10 种,其血清型较多,易变异^[11]。病毒主要通过病禽的排泄物、分泌物和尸体等污染饮水和饲料,经消化道或伤口传染^[12]。早期快速诊断和血清学监测是预防、控制禽流感的前提条件。由于感染禽种类、年龄、性别、所处环境以及感染并发症的不同,表现的临床症状差异极大,因此,该病主要依靠实验室诊断。

目前,禽流感的诊断技术主要有病毒分离鉴定、免疫荧



光、RT-PCR、血凝抑制、琼脂扩散、ELISA 等,其中病毒分离鉴定和 RT-PCR 具有很高的敏感性和特异性^[13]。但由于病毒分离鉴定操作繁琐、耗时较长,因此,RT-PCR 技术仍然是当前诊断禽流感的主要方法。多重 PCR 是在以单基因 PCR 基础上进行的发展和完善,是在同一 PCR 体系中加入多对特异性引物,一次同时扩增多个靶基因,实现了多基因型的鉴别和多种病原体的同时检出,使混合感染的诊断和基因分型变得更加简捷,减少了漏诊率,提高了检验效率。张文慧等建立了同时检测 H5 和 H7 亚型禽流感病毒的多重 RT-PCR 方法^[14];陈思怀等针对 NP(型诊断)、HA(亚型诊断)基因设计 2 对引物,从而对 H5、H6、H9 亚型 AIV 做快速检测^[15]。马鸣潇等针对 H5 和 H9 这 2 个亚型,各设计 1 套特异性的引物,建立了 RT-PCR 一步法,用于 H5 和 H9 亚型的鉴别^[16]。

本研究针对我国养禽业的主要病毒亚型 H5、H7 和 H9,设计 3 对特异性检测引物,通过条件优化,建立了同时检测 H5、H7、H9 亚型禽流感的三重 RT-PCR 方法。该方法可同时检测 H5、H7 和 H9 亚型禽流感病毒,检测灵敏度分别达 2.80、10.50、5.73 pg/ μ L,方法特异性好、重复性高,可用于快速诊断禽流感,进行禽流感早期预测。本方法的建立可为禽流感防治提供有效的早期诊断技术和监测手段,同时也为高致病性禽流感防治争取了宝贵的快速反应时间。

参考文献:

[1] 刘燕,钱爱东. 禽流感病毒 H5、H9 亚型的多重 RT-PCR 鉴别诊断[J]. 中国预防兽医学报,2005,27(1):74-76.
[2] Guan Y, Vijaykrishna D, Bahl J, et al. The emergence of pandemic influenza viruses[J]. Protein & Cell,2010,1(1):9-13.
[3] Subbarao K, Katz J. Avian influenza viruses infecting humans[J].

何青芬, 苏 越, 王 坤, 等. 不同复合色素对蛋鸡生产性能及蛋品质的影响[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(9): 207–210.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.09.048

不同复合色素对蛋鸡生产性能及蛋品质的影响

何青芬¹, 苏 越¹, 王 坤¹, 陈 瑞¹, 陶正国², 王 亨³, 周岩民¹, 温 超¹

(1. 南京农业大学动物科技学院, 江苏南京 210095; 2. 广州立达尔生物科技股份有限公司, 广东广州 510663;
3. 浙江医药股份有限公司新昌制药厂, 浙江绍兴 312500)

摘要:为在研究不同复合色素对蛋鸡生产性能和蛋品质的影响, 将 270 羽 54 周龄海兰褐蛋鸡随机分为 3 组, 每组 6 个重复, 对照组饲喂小麦型基础日粮, 试验 I、II 组分别饲喂基础日粮中添加 5 g/t 斑蝥黄 + 10 g/t 阿朴酯、5 g/t 斑蝥黄 + 10 g/t 叶黄素的试验日粮。结果表明, 添加色素不影响蛋鸡生产性能和鸡蛋蛋白高度、哈夫单位。与对照组相比, 2 个色素组均显著提高鲜蛋、煎蛋和煮蛋的蛋黄罗氏比色扇值、红度和黄度值 ($P < 0.05$), 显著降低鲜蛋和煮蛋亮度值 ($P < 0.05$), 且试验 I 组和 II 组间无显著差异。提示斑蝥黄分别与阿朴酯、叶黄素复配均可提高鲜蛋、煎蛋和煮蛋的蛋黄颜色, 2 种组合的着色效果相当。

关键词:色素; 斑蝥黄; 阿朴酯; 叶黄素; 蛋鸡; 蛋黄颜色

中图分类号: S831.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)09-0207-04

随着生活水平的提高, 人们在追求食品营养价值的同时, 开始注重其感官品质。对于鸡蛋而言, 蛋黄颜色是消费者选购鸡蛋时的第一感官指标^[1-2]。调查发现, 消费者普遍喜欢的蛋黄颜色是罗氏比色扇 (RCF) 值高于 8 的橙红色或金黄色^[3]。较深的鸡蛋颜色会刺激人们的食欲, 促进消化吸收,

增强人们对食物的享受感。蛋鸡自身不能合成色素, 蛋黄的颜色主要是饲料原料尤其是玉米中的叶黄素等色素在体内沉积而产生的, 因此可通过在蛋鸡饲料中添加色素来使蛋黄颜色加深^[4-5]。目前, 饲料添加剂品种目录 (2013) 中, 允许在蛋鸡饲料中添加的色素包括叶黄素、 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯 (阿朴酯)、 β 、 β -胡萝卜素-4,4-二酮 (斑蝥黄) 等。对于蛋鸡日粮中单独添加斑蝥黄、阿朴酯和叶黄素对蛋黄颜色的影响已有报道^[6-11], 但不同色素复合添加的应用效果则鲜有报道。因此, 本试验旨在研究阿朴酯和叶黄素分别与斑蝥黄复配对蛋鸡生产性能、蛋品质, 尤其是蛋黄颜色的影响, 为其在蛋鸡上的合理应用提供理论依据。

收稿日期: 2017-12-28

基金项目: 广东省科技发展专项资金 (编号: 2016B090918056); 广东省广州市产学研协同创新重大专项 (编号: 201604020123); 江苏现代农业 (蛋鸡) 产业技术体系营养调控创新团队 (编号: SXGC [2017]288)。

作者简介: 何青芬 (1993—), 女, 河南三门峡人, 硕士研究生, 主要从事动物营养与饲料科学研究。E-mail: 2016105075@njau.edu.cn。

通信作者: 温 超, 博士, 讲师, 主要从事动物营养与饲料科学研究。E-mail: wenchao@njau.edu.cn。

Cellular and Molecular Life Sciences, 2000, 57(12): 1770–1784.

[4] Claas E C, de Jong J C, van Beek R, et al. Human influenza virus A/HongKong/156/97 (H5N1) infection[J]. Vaccine, 1998, 16(9/10): 977–978.

[5] Taubenberger J K, Morens D M. Influenza viruses: breaking all the rules[J]. mBio, 2013, 4(4): e00313–e00365.

[6] 陈伯伦, 张泽纪, 陈伟斌. 禽流感研究: I 鸡 A 型流感病毒分离与血清学初步鉴定[J]. 中国兽医杂志, 1994, 22(10): 3–5.

[7] 刘琳玉, 姜双应, 汪立杰, 等. 青海湖地区 5 株 H9N2 亚型禽流感病毒全基因组序列进化分析[J]. 病毒学报, 2014, 30(2): 109–118.

[8] 吴海燕, 李明义, 范根成, 等. 33 株 H9N2 亚型禽流感病毒分离株分子流行特点的研究[J]. 中国动物检疫, 2010, 27(6): 31–33.

[9] Parvin R, Heenemann K, Halami M Y, et al. Full-genome analysis of avian influenza virus H9N2 from Bangladesh reveals internal gene reassortments with two distinct highly pathogenic avian influenza viruses[J]. Archives of Virology, 2014, 159(7): 1651–1661.

[10] Peiris M, Yuen K Y, Leung C W, et al. Human infection with

influenza H9N2[J]. Lancet, 1999, 354(9182): 916–917.

[11] 傅生芳, 独军政, 常惠芸, 等. 禽流感病毒的分子生物学研究进展[J]. 动物医学进展, 2005, 26(5): 22–24.

[12] 邓振旭. 禽流感病毒检测技术的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(12): 2740–2741.

[13] 张应国, Song Jian Ling, Hu Yuan Yuan, et al. 禽流感病毒 RT-PCR 及多重 RT-PCR 检测技术的建立[J]. 中国兽医科技, 2005, 35(8): 600–604.

[14] Zhang W H, Guo H, Wang W L, et al. Designing Primers for H5 and H7 subtypes of avian influenza virus and multiplex RT-PCR amplification[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 39(1): 15–17.

[15] 陈思怀, 乔宪凤, 华文君, 等. 多重 RT-PCR 快速检测禽流感病毒的研究[J]. 湖北农业科学, 2006, 45(1): 20–23.

[16] 马鸣涛, 金宁一, 王振国, 等. 检测禽流感病毒 RT-PCR 一步法的建立及 H5、H9 亚型的鉴定[J]. 中国生物制品学杂志, 2005, 18(5): 63–65.