

陈俊红,何宇,祁宇晨,等.肉鸽圆环病毒、腺病毒及疱疹病毒 I 型混合感染的多重 PCR 检测[J].江苏农业科学,2021,49(22):167-171.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.22.030

肉鸽圆环病毒、腺病毒及疱疹病毒 I 型混合感染的多重 PCR 检测

陈俊红¹,何宇^{1,2},祁宇晨¹,刘裕鹏¹,邢光东³,王莹²,徐善金⁴,方光远¹,戴鼎震¹

(1. 金陵科技学院动物科学与食品工程学院,江苏南京 211169; 2. 扬州大学兽医学院,江苏扬州 225009;

3. 江苏省农业科学院畜牧研究所,江苏南京 211169; 4. 南京东晨鸽业有限公司,江苏南京 211169)

摘要:运用多重 PCR 同时检测肉鸽病原(圆环病毒、腺病毒及疱疹病毒 I 型)的方法,分别设计与合成 3 种病毒基因扩增引物,并提取疑似病鸽的肝脏样品 DNA,进行单一 PCR 扩增及基因序列测定,结果分别获得了大小为 239、418、618 bp 的 DNA 产物。通过摸索多重 PCR 反应条件,应用多重 PCR 同时检测 3 种病毒基因片段,同时获得了鸽疱疹病毒 I 型、鸽圆环病毒及鸽源腺病毒的基因片段。再对疑似混合感染这 3 种病毒的肝脏样品进行检测,发现 50% (6/12) 样品存在 3 种病毒的混合感染、25% (3/12) 样品存在鸽圆环病毒和鸽源腺病毒的混合感染、8.3% (1/12) 样品存在鸽源腺病毒和 I 型鸽疱疹病毒的混合感染、8.3% (1/12) 样品存在鸽圆环病毒和 I 型鸽疱疹病毒的混合感染、8.3% (1/12) 样品未发生任何感染。结果表明,多重 PCR 可快速检测鸽疱疹病毒 I 型、鸽圆环病毒及鸽源腺病毒的混合感染,表明运用三重 PCR 检测 3 种病毒混合感染有很好的应用价值。

关键词:鸽圆环病毒;鸽源腺病毒;鸽疱疹病毒 I 型;多重 PCR;基因测序

中图分类号:S858.39 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)22-0167-04

鸽圆环病毒(PiCV)、鸽源腺病毒(PiAdV)及鸽疱疹病毒 I 型(PiHV-1)是近年来在鸽子体内发现的病毒性病原体。PiCV 是一种单股 DNA 病毒,体型很小、球形、无囊膜,常经口传染 1 岁以下鸽子^[1-2]。该病毒也可经蛋垂直传播,并可造成鸽的免疫抑制^[3]。目前,尚无任何合适疫苗控制鸽圆环病毒感染。PiAdV 引起鸽呕吐及水样下痢,传播迅速,任何年龄的鸽皆可感染。短时间鸽舍内所有鸽均可感染,如继发大肠杆菌等病原感染,则死亡率很高^[4-6]。PiHV-1 感染成年鸽感染后多呈潜伏感染^[7],但可向环境排毒。及时注射疫苗也仍不足以阻止感染鸽带毒。因此,及时检测并隔离阳性鸽群非常重要。PiAdV、PiHV-1 及 PiCV 通常以混合感染的形式出现,这大大增加了死亡率,给鸽业带来严重危害。由此可见,这 3 种病原的快速准确检测

非常重要。PCR 是一种快速而实用的检测方法,准确、灵敏、方便。目前,国内外多见于运用单一 PCR 进行检测^[8-10],也有针对 2 种病原的 PCR^[11-12],但缺点是检测成本高、工作量大。如能运用三重 PCR 同时检测这 3 种病原目的基因,就可快速甄别混合感染鸽,及时淘汰病鸽,净化种群。运用多重 PCR 对 PiAdV、PiHV-1 及 PiCV 混合感染的检测并不多见,本研究拟分别设计与合成 3 种病毒基因扩增引物,构建多重 PCR 反应体系,同时检测 3 种病毒,为快速检疫病原提供新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

试验时间:2019 年 3 月 5 日至 2020 年 5 月 20 日;地点:金陵学院兽医微生物实验室。

1.1.1 病料 来自镇江句容、南京六合区及浦口鸽场的疑似病鸽;PiCV、PiHV-1 及 PiAdV 的对照阳性样品均为笔者所在单位鉴定保存。

1.1.2 试剂 DNA 提取试剂盒及胶回收试剂盒(广州基迪奥生物科技有限公司)、DNA marker(康为世纪 CW0636),分析纯。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 模板基因分别是:PiAdV 的六邻

收稿日期:2021-05-08

基金项目:江苏省“六大人才高峰”D 类项目;金陵科技学院“创客虚拟班”立项项目(编号:2017008)。

作者简介:陈俊红(1990—),女,安徽宿州人,博士,讲师,主要从事预防兽医、比较医学及中兽医学研究。E-mail:chenjunhong@jit.edu.cn。

通信作者:戴鼎震(1964—),男,江苏兴化人,博士,教授,主要从事预防兽医、中兽药及中西兽医结合研究。E-mail:dzdai@163.com。

体蛋白(Hexon)基因来自 GenBank 中 MF576429.1; PiHV - 1 的多聚酶 polymerase 基因序列来自 KJ995972.1); PiCV Rep 蛋白和衣壳蛋白(cap)基因序列来自 JX901125.1。利用 Primer 5.0 软件设计从保守区筛选 3 对特异性引物,预计扩增的目的基因大小见表 1。引物合成来自南京思普金公司。

表 1 3 种病毒基因片段扩增引物设计序列

序号	引物名称	引物序列(5'→3')	检测病毒及 基因产物大小
1	PiCV - F	GGTTTGCCGTAGCCAGAT	PiCV 418 bp
2	PiCV - R	CACAGGAGGAGTAGCCGTATT	
3	PiAdV - F	TCCTGACCTGACTACCGCC	PiAdV 616 bp
4	PiAdV - R	AGACCCTACTTTAGCAACTTTCC	
5	PIHV - 1 - F	GAGGACTACTCCGTGTCGG	PIHV - 1 型 239 bp
6	PIHV - 1 - R	ACGCCTTTCATCATTTTGGC	

1.2.2 DNA 的提取 根据试剂盒提取要求进行 DNA 提取。取疑似病鸽口腔、鼻窦、肝脏膜样品 10 ~ 20 mg,研磨,加缓冲液混合混匀,55 ℃ 水浴,使组织充分酶解。再加消化液,混匀,于 70 ℃ 水浴维持 10 min。然后过柱纯化,得到 DNA,保存于 -20 ℃ 备用。

1.2.3 单一 PCR 检测 采用设计的引物分别用提取的 3 种病毒模板进行单一 PCR 检测,PCR 扩增反应。由表 2 可知,预混液为 2 × Es Taq MasterMix。每对引物浓度均为 10 mmol/L。反应条件:98 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 10 s,56 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 5 min,16 ℃ 维持 5 min。扩增产物经凝胶电泳,观察产物大小。

1.2.4 多重 PCR 检测 利用上述引物针对 PiCV、PiAdV 及 PiHV - 1 模板建立三重 PCR 扩增体系。由表 3 可知,反应条件:98 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 15 s,56 ℃ 10 s,72 ℃ 1.5 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 5 min,16 ℃ 维持 5 min。扩增完成后,2% 琼脂糖凝胶电泳,观察结果。

1.2.5 PCR 产物基因序列测定 按试剂盒程序将产物进行回收、送检、测序。

1.2.6 临床样品多重 PCR 检测 采集镇江、六合及浦口等地鸽场采集场疑似病料,共 18 份,提纯 DNA 模板,进行三重 PCR 扩增,统计结果。

2 结果与分析

2.1 单一 PCR 产物的电泳结果与分析

从 3 种病毒标准 DNA 模板扩增出来的基因片

表 2 单一 PCR 扩增反应体系

检测对象	成分	体积 (μL)
PiCV	2 × 预混液	10.0
	PiCV 模板	1.0
	PiCV - F	0.4
	PiCV - R	0.4
	dd H ₂ O	8.2
	合计	20.0
PiAdV	2 × 预混液	10.0
	PiAdV 模板	1.0
	PiAdV - F	0.6
	PiAdVR	0.6
	dd H ₂ O	7.8
	合计	20.0
PiHV - 1	2 × 预混液	10.0
	PiHV - 1 模板	1.0
	PiHV - 1 - F	1.0
	PiHV - 1 - R	1.0
	dd H ₂ O	7.0
	合计	20.0

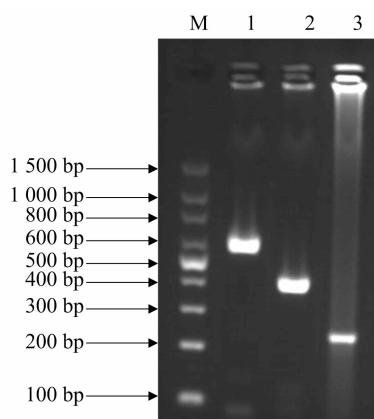
表 3 三重 PCR 反应体系

成分	体积 (μL)
2 × 预混液	10.0
dd H ₂ O	3.0
PiCV - F	0.4
PiCV - R	0.4
PiAdV - F	0.6
PiAdVR	0.6
PiHV - 1 - F	1.0
PiHV - 1 - R	1.0
PiAdV 模板	1.0
PiHV - 1 模板	1.0
PiCV 模板	1.0
共计	20.0

段,经琼脂糖凝胶电泳。由图 1 可知,PCR 产物扩增结果分别为大小在 600 ~ 800、400 ~ 500、200 ~ 300 bp 的单一清晰条带。表明针对标准阳性模板的引物设计是准确的,与预期欲获得的 616、418、239 bp 基因片段大小相符。

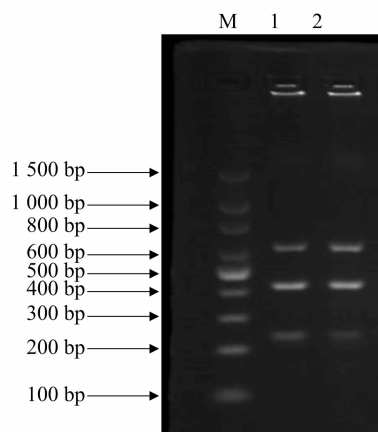
2.2 多重 PCR 产物的电泳结果与分析

由图 2 可知,通过多重 PCR 获得了 PiAdV、PiCV 及 PiHV - 1 的特异性基因片段,经 2% 琼脂糖



M—DNA Marker(1 500 bp); 1—PiAdV 的 PCR 产物;
2—PiCV 的 PCR 产物; 3—PiHV-1 的 PCR 产物
图1 PiAdV、PiCV 及 PiHV-1 的单一 PCR 扩增

凝胶电泳,与标准 DNA 对照相比发现,3 条条带分别位于 600 ~ 800、400 ~ 500、200 ~ 300 bp 间,大小均分别与单一 PCR 所扩增片段大小相对应,表明 3 对特异性引物混合在一起进行扩增,未出现相互互补现象,它们均扩增出了清晰的 DNA 条带,符合预期扩增 616、418、239 bp 基因片段大小。



M—DNA Marker(1 500 bp); 1—阳性对照的 PCR 产物;
2—混合感染样品的 PCR 产物
图2 PiAdV、PiCV 及 PiHV-1 的多重 PCR 扩增

2.3 DNA 序列测定结果与分析

对 3 对引物扩增到的 DNA 产物进行了核酸序列测定,分别为 PiAdV, 616 bp; PiCV, 418 bp; PiHV-1, 239 bp。结果证实各自扩增的 DNA 片段大小的正确性。经过 DNA 序列比对及编码蛋白的阅读框架分析,发现所扩增的目的基因片段核酸序列分别与各自的标准模板基因序列相同,且阅读框架与所编码的 Hexon 蛋白、DNA polymerase 及 PiCV 的 Rep 与 cap 蛋白相同,证明所扩增的目的基因正确。

2.4 临床样品多重 PCR 结果与分析

由表 4 可知,经三重 PCR 检测,在总共 18 份检测样品中,PiAdV、PiHV-1 及 PiAdV 检测呈阳性的分别是 5、12、8 份,结果与单一 PCR 相比完全相符合。

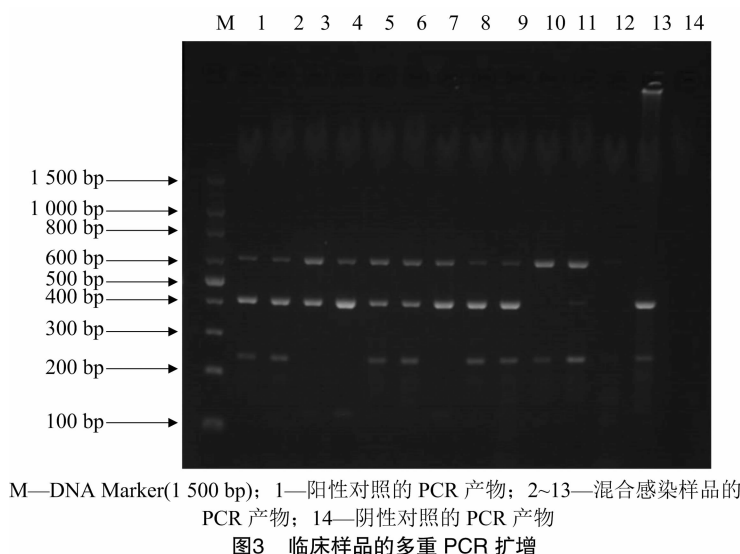
表 4 临床样品 PCR 检测结果

病毒	多重 PCR		单一 PCR		符合率 (%)
	阳性数 (份)	阳性率 (%)	阳性数 (份)	阳性率 (%)	
PiAdV	5	27.78	5	27.78	100
PiHV-1	12	66.67	12	66.67	100
PiCV	8	44.44	8	44.44	100

由图 3 可知,泳道 2、5、6、8、9、11 均从样品中扩增到 3 种病毒基因片段,表明存在这 3 种病毒混合感染,感染率达 50% (6/12);泳道 3、4、7 见有 2 个扩增条带,大小分别对应于 PiAdV 及 PiCV 目的片段大小,反映出样品存在这 2 种病毒混合感染,感染率 25% (3/12);泳道 10 也有 2 个条带,大小分别对应 PiAdV 及 PiHV-1 目的基因片段,说明发生了这 2 种病原双重感染,感染率为 8.3% (1/12);泳道 13 存在 2 个条带,分别对应 PiHV-1、PiCV 目的片段,说明存在这 2 种病原感染,占样品数 8.3% (1/12)。泳道 12 无条带,判定样品无感染。结果表明,三重 PCR 能一次性检出单一感染、双重感染及三重感染。

3 讨论与小结

PiAdV、PiCV 及 PiHV-1 混合感染不仅仅是单纯的 3 种传染病,且均参与导致了更严重的幼鸽疾病综合征 (YPDS)^[3-4,13],往往引起很高死亡率。因此,同时快速检测病鸽这 3 种病毒的感染对于预防控制鸽病具有重要意义。目前,能够用来检测这 3 种病毒的方法有病毒分离与鉴定、单一 PCR 检测和病理组织学检测^[14]。但分离鉴定法费时、费力、诊断周期长。病毒可存在于病鸽的口腔、鼻窦、肝脏、食管等部位,病毒分离费时、费力,且分离较为困难,分离率不高,这对于快速诊断、隔离病鸽是不利的。相对来说,PiHV-1 分离容易一些,而 PiAdV 及 PiCV 的分离培养较为困难。如赵盼盼在野鸽体内分离到了野鸽 PiHV,并进行了分析^[15]。Hess 等通过肝细胞培养出了 PiAdV^[5]。尚未见 PiCV 分离的报道,这就限制了对开展进一步研究。由于这 3 种病毒均可产生包涵体,因此,可以通过病理切片观察包涵体。腺病毒感染鸽的肝细胞、小肠绒毛的



上皮细胞中可检查到核内包涵体^[5]。Gough 等报道了在鸽的法氏囊内发现了圆环病毒样粒子^[1],但这些检测方法均需逐个检测,不适合大量同时检测。

相比之下,运用 PCR 检测就较为快速、准确,加之 3 种病毒均为 DNA 类病毒,PCR 扩增不需要进行反转录,因而更为方便。如 Zhang 等^[7]、余旭平等^[9]及薛媚等^[10]通过 PCR 分别检测到了 PiHV - 1 及 PiCV 的基因。蒋文明等运用双重 PCR 同时检测到了 PiAdV 及 PiHV - 1 的基因,总体上体现出 PCR 快速、准确的特点,但仍不能一次性同时检测 3 种病原^[11]。

本研究首先使用单一 PCR 方法检测 PiAdV、PiHV - 1 及 PiCV,通过变性、退火、延伸 3 个基本反应步骤,进行循环,准确地获得了 PiAdV、PiHV - 1 及 PiCV 特异性片段,经电泳获得了大小不同的条带。结果表明,此法具有特异性强、灵敏度高、快捷等优点。在此基础上通过重构反应体系,将 3 种反应体系合而为一,并优化反应条件,同时成功扩增到了 DNA 产物,并通过基因序列测定确认是这 3 种病毒基因,从而证实多重 PCR 一次性检测混合感染不仅快速、灵敏,而且特异性强、成本低。从多重 PCR 扩增的产物看,DNA 条带清晰可变,大小适中,便于观察。经过临床样品的进一步扩大检测,还能够观察到检测鸽样品发生感染的实际状况(即有的鸽子 3 种病原同时感染,有的仅感染其中 2 种)。结果还提示,由于病毒分布全身多个组织器官,为增大扩增成功率,可在多个部位进行取样,但肝脏样品必须采集。总之,本试验三重 PCR 可同时检测 3 种病毒,敏感、准确、快速,且省时省力,适用于检测

种鸽病原混合感染。不过试验方法还值得进一步优化,如最低浓度试验、最优反应条件等。此外,还可开展更多病原的基因多重检测,或者重新设计合成引物进行 PCR 扩增,以便扩增到病毒不同的亚型基因,从而更精细地进行病原检测。

参考文献:

- [1] Gough R E, Drury S E. Circovirus - like particles in the bursae of young racing pigeons[J]. The Veterinary Record, 1996, 138(7): 167.
- [2] Santos H M, Chen C C, Tsai C Y, et al. Influence of pigeon interferon alpha (PiIFN - α) on pigeon Circovirus (PiCV) replication and cytokine expression in *Columba livia*[J]. Veterinary Microbiology, 2020, 242: 108591.
- [3] Raue R, Schmidt V, Freick M, et al. A disease complex associated with pigeon Circovirus infection, young pigeon disease syndrome[J]. Avian Pathology, 2005, 34(5): 418 - 425.
- [4] Vereecken M, de Herdt P, Ducatelle R. Adenovirus infections in pigeons; a review[J]. Avian Pathology, 1998, 27(4): 333 - 338.
- [5] Hess M, Prusas C, Monreal G. Growth analysis of adenoviruses isolated from pigeons in chicken cells and serological characterization of the isolates[J]. Avian Pathology, 1998, 27(2): 196 - 199.
- [6] Agnihotri K, Smith C, Oakey J, et al. Pigeon adenovirus and pigeon torque teno virus associated with acute multifocal hepatic necrosis in pigeons in Queensland, Australia[J]. Archives of Virology, 2021, 166(5): 1469 - 1475.
- [7] Zhang L J, Li Z H, Li S, et al. Characterization of the first columbid herpesvirus 1 isolate from a hybrid meat - type pigeon flock in China[J]. Archives of Virology, 2015, 160(2): 459 - 464.
- [8] 何宇, 邢华, 陈俊红, 等. 鸽腺病毒 PCR 检测及基因测序[J]. 畜牧兽医学(电子版), 2021(3): 10 - 12.
- [9] 余旭平, 竺春, 郑新添, 等. 鸽圆环病毒浙江株全基因组的克隆及序列分析[J]. 病毒学报, 2009, 25(5): 355 - 361.

朱伟峰,陈露,谭凯,等.猪丹毒丝菌 GAPDH 线性 B 细胞表位预测与鉴定[J].江苏农业科学,2021,49(22):171-174.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.22.031

猪丹毒丝菌 GAPDH 线性 B 细胞表位预测与鉴定

朱伟峰^{1,2,3},陈露^{1,2,3},谭凯^{1,2,3},王高杰^{1,2,3},蔡承志⁴

(1.江苏省农业科学院兽医研究所,江苏南京 210014; 2.农业农村部兽用生物制品工程技术重点实验室,江苏南京 210014;
3.国家兽用生物制品工程技术研究中心,江苏南京 210014; 4.华中农业大学动物医学院,湖北武汉 430070)

摘要:为预测并鉴定猪丹毒丝菌甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)分子线性 B 细胞表位,首先通过多序列比分析已经全基因组测序的 10 株菌株的 GAPDH 一级结构保守性;然后使用在线软件 Bepipred-2.0 预测猪丹毒丝菌 GAPDH 线性 B 细胞表位,接下来通过人工化学合方式合成 GAPDH 表位对应的多肽;最后使用间接 ELISA 法检测这些多肽与猪丹毒丝菌 GAPDH 高免血清之间的反应。研究发现已经完成全基因组测序的 10 株菌株的 GAPDH 一级结构高度保守。通过软件预测,找到了猪丹毒丝菌 GAPDH 的 3 个潜在的表位。ELISA 检测结果表明,₇₄VLSEDPKPNLPWKELGV₉₀和₁₇₈HAYTNDQNTLDGPHAKGDLRRGRAAAQSIIPNSTGA₂₁₃与 GAPDH 高免血清反应明显,是猪丹毒丝菌 GAPDH 的表位。成功预测并鉴定到 2 个猪丹毒丝菌的抗原表位,这些表位将为以后基于猪丹毒丝菌 GAPDH 表位的诊断、疫苗设计及致病机制研究提供技术基础。

关键词:猪丹毒丝菌;甘油醛-3-磷酸脱氢酶;保护性抗原;表位预测;表位鉴定

中图分类号:S858.28 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)22-0171-04

猪丹毒丝菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*,又称红斑丹毒丝菌、猪丹毒杆菌)是造成猪丹毒的病原^[1]。猪丹毒是世界范围内危害养猪业的主要细菌性疫病之一,在我国猪丹毒和猪肺疫、猪瘟曾并称为猪场三大疫病。近年来猪丹毒的危害虽然有所降低,但其临床分离或检出率依然位居前列,依然是猪场主要细菌性疫病^[2-3]。猪丹毒丝菌同样可以造成人类感染发病(类丹毒),是一种人兽共患病病原^[4]。

目前猪丹毒的免疫保护机制和致病机制依然不完全清楚^[4]。我们的前期工作针对猪丹毒丝菌

甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)分子的免疫保护作用 and 致病作用开展了研究。结果显示,猪丹毒丝菌的 GAPDH 分子既可以作为抗原发挥免疫保护作用,也可以作为毒力因子发挥黏附作用^[5-6]。

抗原表位是抗原引发免疫保护的物质基础^[7-8]。部分抗原表位既是抗体发挥作用的位点也是病原菌对宿主发挥作用的关键位点(即致病性表位)^[9]。因而通过鉴定猪丹毒丝菌 GAPDH 的 B 细胞表位有助于进一步理解 GAPDH 免疫保护效应的本质,并为进一步研究 GAPDH 的致病作用提供条件。伴随生物信息学的发展,不断有学者试图开发能够预测抗原表位的软件,近年来在线软件 Bepipred-2.0 对于线性 B 细胞表位已经有了比较好的预测效果^[10]。本研究的目的是预测猪丹毒丝菌 GAPDH 分子的线性 B 细胞表位,并进一步鉴定预测结果。

收稿日期:2021-04-01

基金项目:江苏省自然科学基金青年基金(编号:BK20190270);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(19)3016]。

作者简介:朱伟峰(1984—),男,河北石家庄人,博士,助理研究员,主要从事新型疫苗设计与动物疫病防控基础研究。E-mail: zhuweifeng8@126.com。

[10]薛媚,庄林林,戴鼎震,等. 鸽疱疹病毒 PCR 检测方法的建立及试剂盒的研制[J]. 现代农业科技,2013(12):229-230,232.

[11]蒋文明,侯广宇,李金平,等. 鸽疱疹病毒与腺病毒感染的 PCR 检测方法的建立[J]. 动物医学进展,2009,30(8):63-65.

[12]兰世捷,陈亮,苗艳,等. 一例鸽圆环病毒和鸽疱疹病毒混合感染的诊治[J]. 现代畜牧科技,2021(1):11-13,167.

[13]Ketterer P, Timmins B, Prior H, et al. Inclusion body hepatitis associated with an adenovirus in racing pigeons in Australia[J]. Australian Veterinary Journal, 1992, 69(4):90-91.

[14]冯冠裕,田丽平,鲁会军,等. 腺病毒诊断方法的研究进展[J]. 中国病原生物学杂志,2021,16(2):241-244,250.

[15]赵盼盼. 野鸽疱疹病毒的分离鉴定及 UI27 基因生物信息学分析[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2016.