

肖亦辰,杨颖,马平,等. 新型鹅星状病毒一步法 RT-PCR 检测方法的建立与应用[J]. 江苏农业科学,2022,50(2):142-146.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.02.024

新型鹅星状病毒一步法 RT-PCR 检测方法的建立与应用

肖亦辰^{1,2}, 杨颖^{1,2}, 马平^{1,2}, 赵冬敏¹, 章丽娇¹, 刘青涛¹, 杨婧¹, 李银¹, 刘宇卓¹, 韩凯凯¹, 黄欣梅^{1,2}

(1. 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;

2. 南京农业大学动物医学院, 江苏南京 210095)

摘要:新型鹅星状病毒(goose astrovirus, GoAstV)感染引起的鹅痛风病,是近年严重危害我国养鹅业的传染病之一,给我国养鹅产业造成严重经济损失,快速准确诊断有助于更好地防控该病。为了建立一种鉴定新型 GoAstV 的一步法 RT-PCR 方法,根据新型 GoAstV *ORF2* 基因序列设计特异性引物,构建质粒标准品,并对引物用量和退火温度等反应体系和条件进行了优化。结果表明,该方法能特异性扩增新型 GoAstV 512 bp 基因片段,其他鹅常见病毒性病原扩增结果均为阴性,具有较高的特异性。敏感性试验结果提示,最小检测限量达 4.54×10^2 拷贝/ μL 。此外,该方法重复性良好,应用所建立的方法对新型 GoAstV 临床样品进行检测,102 份鹅泄殖腔拭子的阳性率为 46.08%,24 份痛风症状患病鹅内脏样本阳性率为 91.70%。本研究建立的新型 GoAstV 一步法 RT-PCR 检测方法具有良好的特异性、敏感性和重复性,且操作简便、经济、快速,可用于新型 GoAstV 的临床鉴别诊断和流行病学调查。

关键词:新型鹅星状病毒;一步法 RT-PCR;鉴别诊断;鹅痛风病;敏感性试验;临床样品检测

中图分类号:S855.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)02-0142-05

2016 年以来,我国东部主要养鹅地区暴发一种以内脏痛风为主要特征的急性传染病,给养鹅产业造成巨大经济损失^[1-2]。该病主要影响 21 日龄以内雏鹅,患病雏鹅表现为精神沉郁、食欲减退、腹泻、四肢瘫痪,剖检可见心脏、肝脏、肾脏等内脏器官表面、胸腹膜及关节腔内存在大量白色尿酸盐沉积,死亡率为 20%~50%。通过病原分离和动物回归试验,确定该病是由一种新型鹅星状病毒(goose astrovirus, GoAstV)感染引起。基因序列分析结果表明,近年引起鹅痛风的鹅星状病毒毒株(GD、AHQJ18、SDPY、JSHA 和 SD01)与以往从鸡、火鸡、

鸭和鹅等家禽体内分离的禽星状病毒的基因组同源率为 49.5%~67.7%,编码衣壳蛋白的 *ORF2* 基因核苷酸序列同源性仅为 41.0%~59.0%,遗传距离较远,形成独立的进化分支^[3-7]。

目前,尚无有效疫苗和药物预防或治疗新型 GoAstV 引起的鹅痛风病症。因此,早发现和准确诊断是预防该病流行和传播的重要手段。另外,含高蛋白的饲料引起的蛋白质代谢障碍、药物中毒引起的肾脏损伤也会导致血液中尿酸水平升高,引起鹅的痛风,需要注意与新型 GoAstV 感染引起的痛风鉴别诊断。经典的病毒分离及血清学诊断方法虽准确可靠,但存在费时、费力及对实验室条件和生物安全性要求高等缺点,无法满足临床诊断的需要。目前,已有文献报道检测新型 GoAstV 的荧光定量 RT-PCR(qRT-PCR)方法^[8-9]。尽管 RT-PCR 方法的灵敏度不如 qRT-PCR,但 RT-PCR 方法扩增的片段较长,经测序后可用于基因型的确定和遗

收稿日期:2021-05-06

基金项目:横向课题“雏鹅痛风病因确定和防控方法初探”。

作者简介:肖亦辰(1998—),女,陕西西安人,硕士研究生,主要从事家禽疫病防控研究。E-mail:1457747114@qq.com。

通信作者:黄欣梅,博士,副研究员,主要从事家禽疫病防控研究。

E-mail:hxmrene@126.com。

Glo1 function in the aorta of diabetic rats and in HUVECs[J].

Oxidative Medicine and Cellular Longevity,2019(4):1-14.

[16] Yang X H, Fu J J, Wan H F, et al. Protective roles and mechanisms of taurine on myocardial hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis[J]. Acta Cardiol Sin, 2019, 35(4):415-424.

[17] Bian Y Q, Wang H, Sun S. Taurine alleviates endoplasmic reticulum stress in the chondrocytes from patients with osteoarthritis[J].

Redox Rep, 2018, 23(1):118-124.

[18] 李侗宇, 闫素梅, 史彬林, 等. 壳聚糖对泌乳中期奶牛花生四烯酸免疫调节途径的影响[J]. 动物营养学报, 2019, 31(9): 4218-4225.

[19] 李树森, 杨晓燕, 李莹, 等. 体外棕榈酸诱导自噬调节奶牛淋巴细胞炎症通路[J]. 中国农业大学学报, 2021, 26(1):43-50.

传进化分析,可广泛用于新型 GoAstV 的检测和流行病学调查。一步法 RT-PCR 检测方法将反转录和 PCR 扩增反应合并在一个反应管中一步完成,减少中间环节引入污染源的风险,不但节省时间,还可提高检测准确率。本研究根据新型 GoAstV *ORF2* 基因序列设计特异性引物,优化反应条件,建立了准确、灵敏、快速的新型 GoAstV 一步法 RT-PCR 检测方法,对新型 GoAstV 感染的快速诊断及有效防控具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 病毒与细胞

新型鹅星状病毒 AHQJ18 株、坦布苏病毒 JS804 株(TMUV)、鹅细小病毒(GPV)、H9N2 亚型禽流感病毒(H9 AIV)、鹅副黏病毒(GPMV)和鸡肝癌细胞系(LMH)等由江苏省农业科学院兽医研究所保存。

1.2 试剂

限制性内切酶 *BamH* I 和 *Xho* I,购自宝生物工程(大连)有限公司;pEASY-T1 载体,购自北京全式金生物技术有限公司;DNA/RNA 提取试剂盒、小量提取质粒试剂盒、胶回收试剂盒等,购自爱思进生物技术(杭州)有限公司;一步法 RT-PCR 试剂盒、DNA Marker、DH5 α 感受态细胞等,购自南京诺唯赞生物科技有限公司。

1.3 引物设计与合成

参考 GenBank 已发表的新型 GoAstV *ORF2* 基因序列,应用 Primer Premier 5.0 软件设计了 1 对检测引物,扩增片段长度为 512 bp,上游引物为 PF: 5'-TCCACCGAACACGCCACTA-3',下游引物为 PR:5'-AGCCGATTCCTGAGTTCCGTT-3',引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

1.4 质粒标准品的构建

取 200 μ L 新型 GoAstV 在 LMH 细胞上的培养物,采用 RNA 提取试剂盒提取病毒基因组 RNA,使用特异性引物 PF 和 PR 进行 RT-PCR 扩增新型 GoAstV *ORF2* 基因部分片段,回收纯化 PCR 产物,克隆至 pEASY-T1 载体,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,筛选阳性克隆,提取质粒,用限制性内切酶 *BamH* I 和 *Xho* I 进行双酶切鉴定,阳性质粒送南京金斯瑞生物科技有限公司测序鉴定。序列正确的阳性重组质粒即为质粒标准品,检测质粒浓度并计算质粒拷贝数。

1.5 一步法 RT-PCR 反应体系及条件的优化

1.5.1 引物浓度优化

以新型 GoAstV 基因组

RNA 为模板,在 0.2 mL PCR 管中加入以下反应组分:2 \times one step mix 12.5 μ L,Enzyme mix 1.25 μ L,上、下游引物(10 μ mol/L)设置 5 个梯度,各分别加入 0.1 μ L、0.5 μ L、1.0 μ L、1.5 μ L 和 2.0 μ L,模板 RNA 2.0 μ L,无 RNase 双蒸水加至总体积为 25 μ L,混匀,瞬时离心后置于 PCR 仪中。反应程序为:50 $^{\circ}$ C 反转录 30 min;94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 40 s,共 30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。反应完成后,取 10 μ L 产物进行琼脂糖凝胶核酸电泳检测。

1.5.2 退火温度优化

筛选出最佳引物使用量后,固定反应体系及其他反应条件,对退火温度进行优化。设置 50、52、54、56、58、60 $^{\circ}$ C 6 个梯度退火温度,进行 RT-PCR 扩增。反应完成后,取 10 μ L 产物进行琼脂糖凝胶核酸电泳检测。

1.6 特异性试验

取新型 GoAstV 细胞培养物、TMUV、GPV、H9 AIV 和 GPMV,分别提取 RNA 或 DNA,同时设置空白 LMH 细胞和生理盐水为阴性对照,用建立的新型 GoAstV 一步法 RT-PCR 方法进行扩增,以评价该方法的特异性。

1.7 敏感性试验

将测算好质粒拷贝数的质粒标准品进行 10 倍比稀释,取 $4.54 \times 10^8 \sim 4.54 \times 10^0$ 拷贝/ μ L 9 个浓度梯度作为模板,采用建立的新型 GoAstV 一步法 RT-PCR 方法进行扩增,以评价该检测方法的敏感性。

1.8 重复性试验

采用建立的一步法 RT-PCR 方法对 4 份新型 GoAstV 阳性样品及正常 LMH 细胞进行 3 次重复检测,以评估该方法的重复性和稳定性。

1.9 临床样品的检测

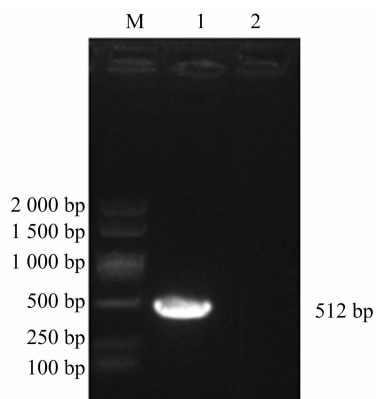
对 2020 年 6—9 月间江苏常州金坛、沭阳地区 102 份 16 日龄左右扬州白鹅泄殖腔拭子样本,24 份出现痛风症状患病鹅内脏样本,采用本研究建立的检测方法检测新型 GoAstV 核酸,以评估该方法的临床实用性。

2 结果与分析

2.1 质粒标准品的构建

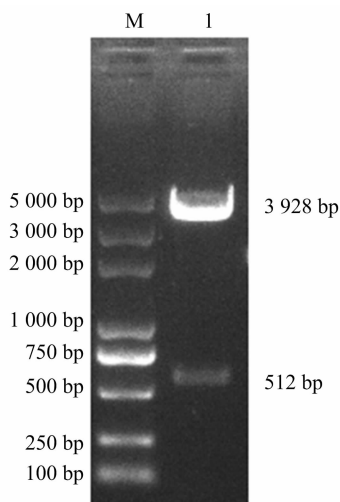
分别提取新型 GoAstV 细胞培养物和正常 LMH 细胞 RNA,以本研究设计的引物进行一步法 RT-PCR 扩增,进行琼脂糖凝胶核酸电泳检测。由图 1

可知,新型 GoAstV 细胞培养物在 512 bp 处可见单一的扩增条带,与预期片段大小相符,而正常 LMH 细胞无扩增条带。回收 PCR 产物,连接至克隆载体 pEASY-T1,转化大肠杆菌 DH5 α ,提取质粒后进行双酶切鉴定。由图 2 可知,琼脂糖凝胶核酸电泳检测显示酶切片段为 500 bp 左右,与预期大小相符。测序结果显示,所连片段与新型 GoAstV AHQJ18 株序列同源性为 100%,表明新型 GoAstV 质粒标准品构建成功。采用核酸蛋白浓度检测仪测定重组阳性质粒浓度为 221 ng/ μ L,计算得出其拷贝数为 4.54×10^{10} 拷贝/ μ L。



M—DL 2000 plus DNA Marker; 1—新型 GoAstV RT-PCR 扩增产物; 2—LMH 细胞

图1 新型 GoAstV 目的基因的扩增



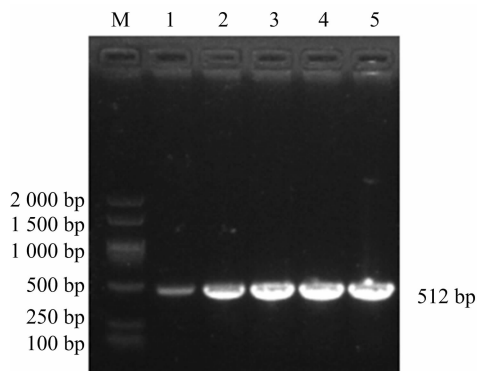
M—DL5000 DNA Marker; 1—新型GoAstV 重组质粒酶切鉴定

图2 质粒标准品的酶切鉴定

2.2 一步法 RT-PCR 反应条件优化

2.2.1 引物浓度优化 固定其他反应条件不变,对上、下游引物(浓度 10 μ mol/L)设置 5 个体积梯度,分别为 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 μ L,进行一步法 RT-PCR 扩增。由图 3 可知,当上、下游引物

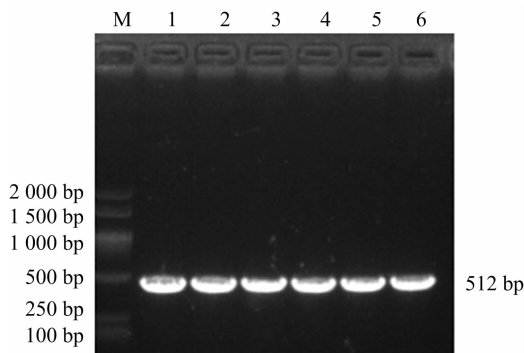
(10 μ mol/L)各加入体积为 1.0 μ L 及以上时,即可获得较高的扩增效率,条带无显著差异,因此确定引物最佳体积为 1.0 μ L。



M—DL 2000 plus DNA Marker; 1~5—上、下游引物体积分别为 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 μ L

图3 引物浓度优化

2.2.2 退火温度优化 固定一步法 RT-PCR 反应体系,加入上、下游引物各为 1.0 μ L,在 RT-PCR 扩增时设置 6 个退火温度,分别是 50、52、54、56、58、60 $^{\circ}$ C,由图 4 可知,退火温度为 54 $^{\circ}$ C 及以下时,目的条带亮度均较强,差异不显著,最终确定 54 $^{\circ}$ C 为最佳退火温度。

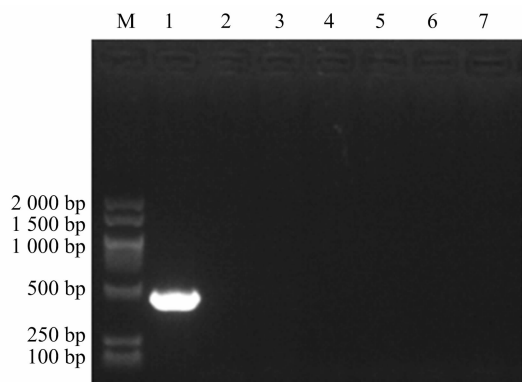


M—DL 2 000 plus DNA Marker; 1~6—退火温度分别为 50、52、54、56、58、60 $^{\circ}$ C

图4 退火温度优化

2.3 特异性试验

利用建立的新型 GoAstV 一步法 RT-PCR 方法对新型 GoAstV 细胞培养物、坦布苏病毒(TMUV)、鹅细小病毒(GPV)、H9N2 亚型禽流感病毒(H9 AIV)、鹅副黏病毒(GPMV),及空白 LMH 细胞和生理盐水进行检测。由图 5 可知,该方法仅对新型 GoAstV 可扩增出长度为 512 bp 的目的基因,而对 TMUV、GPV、H9 AIV、GPMV 以及空白 LMH 细胞和生理盐水的检测结果均为阴性,表明本研究建立的新型 GoAstV 一步法 RT-PCR 方法具有很好的特异性。

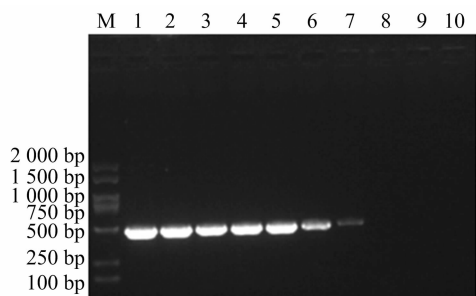


M—DL 2000 plus DNA Marker; 1—新型 GoAstV; 2—TMUV; 3—GPV; 4—H9 AIV; 5—GPMV; 6—LMH 细胞; 7—生理盐水

图5 一步法 RT-PCR 特异性试验

2.4 敏感性试验

将新型 GoAstV 质粒标准品从 4.54×10^8 拷贝/ μL 开始做 10 倍倍比稀释至 4.54×10^0 拷贝/ μL , 取每个稀释度样品分别作为模板进行一步法 RT-PCR 检测。由图 6 可知, 该方法对新型 GoAstV 质粒标准品的最小检出量为 4.54×10^2 拷贝/ μL , 表明本研究建立的新型 GoAstV 一步法 RT-PCR 方法具有



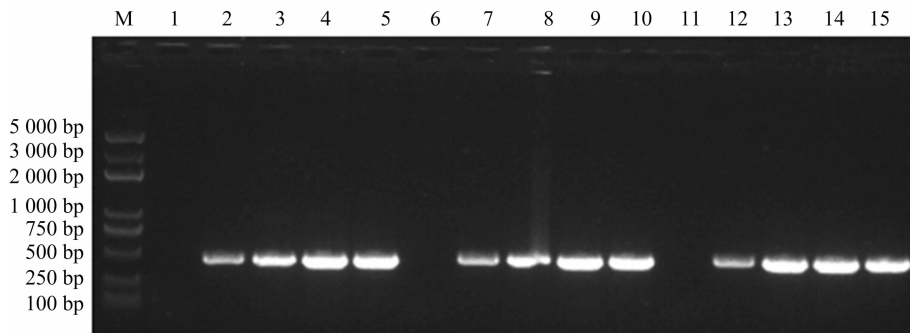
M—DL2000 plus DNA Marker; 1~9—质粒标准品浓度分别为 4.54×10^8 、 4.54×10^7 、 4.54×10^6 、 4.54×10^5 、 4.54×10^4 、 4.54×10^3 、 4.54×10^2 、 4.54×10^1 、 4.54×10^0 拷贝/ μL ; 10—ddH₂O

图6 一步法 RT-PCR 敏感性试验

较高的敏感性。

2.5 重复性试验

用建立的新型 GoAstV 一步法 RT-PCR 方法对 LMH 正常细胞和 4 份新型 GoAstV 阳性样品进行 3 次重复性检验。由图 7 可知, 3 次重复检测均出现相同的结果, 阳性样品均能扩增出相应条带, 而 LMH 正常细胞未出现扩增条带, 表明该方法具有良好的重复性和稳定性。



M—DL 5000 DNA Marker; 1、6、11—LMH 细胞; 2~5、7~10、12~15—4 份新型 GoAstV 阳性样品的 3 次重复检测

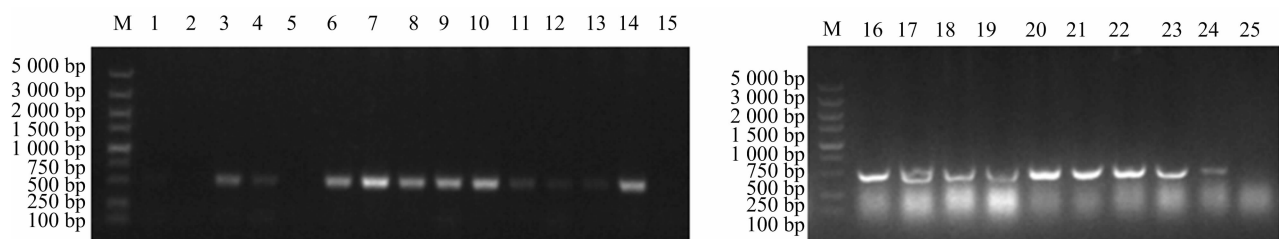
图7 一步法 RT-PCR 重复性试验

2.6 临床样品检测

采用建立的新型 GoAstV 一步法 RT-PCR 检测方法对 2020 年 6—9 月间江苏常州金坛、沭阳地区 102 份雏鹅泄殖腔拭子样本和 24 份出现痛风症状患病鹅内脏样本进行检测(图 8)。检测结果显示, 102 份雏鹅泄殖腔拭子样本中有 47 份为阳性, 阳性率为 46.08%; 24 份出现痛风症状患病鹅内脏样本中有 22 份为阳性, 阳性率为 91.70%。对新型 GoAstV 阳性样品的扩增条带进行序列测定, 证实目的条带均为新型 GoAstV *ORF2* 基因的特异性片段, 表明本研究建立的新型 GoAstV 一步法 RT-PCR 检测方法可有效地对临床样品中的新型 GoAstV 进行快速检测, 并具有良好的特异性和准确性。

3 讨论

2016 年以来, 由新型鹅星状病毒引起的以内脏痛风为主要特征的传染病在我国东部商品鹅养殖地区暴发, 并迅速传播至山东、江苏、安徽、河北、辽宁、福建及广东等省, 给我国养鹅产业造成了巨大的经济损失。该病主要发生于 21 日龄以内雏鹅, 患病雏鹅精神沉郁、采食量下降、腹泻、四肢瘫痪, 严重者死亡。剖检可见肝脏、心脏、肾脏、胸腹膜以及翅、腿关节内出现严重的白色尿酸盐沉积。作为一种新发传染病, 目前还没有商品化疫苗和药物可用以预防或治疗该病, 为最大程度减少养殖业损失, 早发现和准确诊断显得尤为重要。



A. 雏鹅泄殖腔拭子样本

B. 痛风症状患病鹅内脏样本

M—DL5000 DNA Marker; 1~13—部分雏鹅泄殖腔拭子样本; 17~24—部分痛风症状患病鹅内脏样本;

14、16—新型 GoAstV 阳性对照; 15、25—阴性对照

图8 部分临床样本的一步法 RT-PCR 检测结果

RT-PCR 技术是一种比较成熟的核酸扩增技术,具有快速、简便、灵敏、特异性好和成本低等优点而被广泛应用于细菌、病毒及寄生虫等病原检测。且该方法可与基因测序相结合,用于进一步的遗传进化分析。新型 GoAstV 为 RNA 病毒,检测时需先将病毒基因组 RNA 反转录为 cDNA 再进行 PCR 扩增,在此过程中易增加污染风险,造成假阳性。本研究建立的新型 GoAstV 一步法 RT-PCR 方法减少了操作和加样步骤,降低了引入污染源的风险,不但节省时间,还可提高检测准确率。

本研究根据新型 GoAstV *ORF2* 基因序列设计 1 对特异性引物进行一步法 RT-PCR 扩增,获得的特异性片段克隆入 pEASY-T1 载体构建质粒标准品。为获得最佳检测效果,对反应体系及反应条件进行优化,确定浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 的上、下游引物加入量为 $1.0 \mu\text{L}$,最佳退火温度为 54°C 。该方法仅对新型 GoAstV 可扩增出特异性条带,对其他鹅常见病毒性病原及正常 LMH 细胞的扩增结果均为阴性,表明该方法具有很好的特异性。新型 GoAstV 一步法 RT-PCR 方法的最小检测限量为 4.54×10^2 拷贝/ μL ,具有较高的敏感性,该方法同时还具有良好的重复性。应用建立的新型 GoAstV 一步法 RT-PCR 方法对临床样本进行检测,结果显示,102 份鹅泄殖腔拭子的阳性率为 46.08%,24 份痛风症状患病鹅内脏样本阳性率为 91.70%。

因此,本研究建立的一步法 RT-PCR 方法可用于临床鹅泄殖腔拭子和脏器样本,及鹅胚和细胞培养物中新型 GoAstV 的检测,灵敏度高,特异性强,并

且快速准确、操作简便,可作为新型 GoAstV 临床鉴别诊断和流行病学调查的有力工具,为新型 GoAstV 感染的病原监测和有效防控提供技术支撑。

参考文献:

- [1] Zhang Y, Wang F, Liu N, et al. Complete genome sequence of a novel avastrovirus in goose [J]. Archives of Virology, 2017, 162 (7): 2135-2139.
- [2] Yang J, Tian J, Tang Y, et al. Isolation and genomic characterization of gosling gout caused by a novel goose astrovirus [J]. Transboundary and Emerging Diseases. 2018, 65: 1689-1696.
- [3] 章丽娇, 黄欣梅, 刘飞, 等. 新型鹅星状病毒 AHQJ18 株的分离鉴定 [J]. 江苏农业学报, 2019, 35 (5): 1262-1264.
- [4] 姜晓宁, 田家军, 杨晶, 等. 导致雏鹅痛风新型鹅星状病毒的分离鉴定 [J]. 中国兽医学报, 2018, 38 (5): 871-877, 894.
- [5] Zhang X, Ren D, Li T, et al. An emerging novel goose astrovirus associated with gosling gout disease, China [J]. Emerging Microbes and Infections, 2018, 7 (1): 152-159.
- [6] 徐蓉, 陆明青, 张海涛, 等. 一株雏鹅痛风型鹅星状病毒的分离鉴定及其生物学特性研究 [J]. 南京农业大学学报, 2019, 42 (6): 1124-1132.
- [7] Yuan X, Meng K, Zhang Y, et al. Genome analysis of newly emerging goose-origin nephrotic astrovirus in China reveals it belongs to a novel genetically distinct astrovirus [J]. Infection, Genetics and Evolution, 2019, 67: 1-6.
- [8] 邱思语, 徐蓉, 郭远奎, 等. 鹅肾型星状病毒 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法的建立 [J]. 中国兽医科学, 2020, 50 (3): 300-306.
- [9] Wan C, Chen C, Cheng L, et al. Specific detection of the novel goose astrovirus using a TaqMan real-time RT-PCR technology [J]. Microbial Pathogenesis, 2019, 137: 103766.