

4 种重要虫媒病的核酸液相芯片高通量检测方法的建立

詹爱军¹, 王新卫², 卢体康¹, 陈书琨¹, 孙洁¹,
陈兵¹, 曾少灵¹, 花群义^{1*}

(1. 深圳出入境检验检疫局动植物检验检疫技术中心, 深圳 518010;

2. 河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002)

摘要: 为建立可检测鹿流行性出血热病毒(EHDV)、阿卡斑病毒(AKV)、蓝舌病病毒(BTV)和水泡性口炎病毒(VSV)的液相芯片快速检测技术,用 DNASTar 软件对 GenBank 中 BTV 的 VP7 基因、EHDV 的 VP7 基因、AKV 的 N 基因和 VSV 的 NP 基因序列进行序列分析,设计针对这些基因的特异性探针并标记生物素,分别与不同编号的荧光编码微球偶联后再与这些病毒相应基因的 PCR 产物杂交反应,用液相芯片检测仪(Liquichip 200)检测荧光信号建立了以上 4 种虫媒病的快速液相芯片检测方法。检测结果显示,该方法具有较好的特异性,偶联特异性探针的微球只与相应的病毒基因的 PCR 产物反应,而不与其他虫媒病病毒反应;检测灵敏度达到 50~100 个 TCID₅₀。本研究建立了可以同时检测鹿流行性出血热病毒、阿卡斑病毒、蓝舌病病毒和水泡性口炎病毒的高速高通量液相芯片技术,为其他类似病毒的高速高通量检测提供了借鉴和经验。

关键词: 鹿流行性出血热病毒;阿卡斑病毒;蓝舌病病毒;水泡性口炎病毒;液相芯片检测技术

中图分类号: S854.43

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)02-0240-06

Development of Liquichip Technique to Detect Four Insect-borne Disease Virus Rapidly

ZHAN Ai-jun¹, WANG Xin-wei², LU Ti-kang¹, CHEN Shu-kun¹, SUN Jie¹,
CHEN Bing¹, ZENG Shao-ling¹, HUA Qun-yi^{1*}

(1. *Technical Center of Animal and Plant Quarantine Inspection, Shenzhen CIQ,*

Shenzhen 518010, China; 2. *College of Animal Husbandry and Veterinary,*

Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The aim is to develop liquichip technique to detect infection of epizootic haemorrhagic disease virus of deer (EHDV), akabane virus (AKV), bluetongue virus (BTV), and vesicular stomatitis virus (VSV). The VP7 gene of EHDV, N gene of AKV, VP7 gene of BTV and NP gene of VSV in the GenBank were analyzed by using the software DNASTar 5.0. Specific gene probes of all these four viruses labeled with biotin were prepared and coupled with fluorescence-coded microspheres. The probes were used for hybridization reaction to RT-PCR products of the four viruses, and then the liquichip detection technique for detection of all these four viruses was established by using liquichip 200 to detect fluorescence signals in the reaction system. The results showed that this assay method displayed better specificity to RT-PCR products of correspondent viruses and no response to that of other insect-borne disease viruses when being used for

收稿日期: 2009-09-22

基金项目: 科技部“863”计划项目(2006AA10Z445); 国家质检总局项目(2008IK011)资助

作者简介: 詹爱军(1970-), 男, 江苏扬州人, 博士后, 高级兽医师, 主要从事分子病毒学和免疫学研究, E-mail: zhanaijun@126.com, 现在深圳出入境检验检疫局动植中心工作

* 通讯作者: 花群义, E-mail: ciqhua@yahoo.com

detection. The sensitivity test indicated that the detecting limitation for the viruses could reach to 50-100 TCID₅₀. The rapidly high throughput liquichip detection technique to detect the four insect-borne disease viruses was established, which provided a foundation and exploration for further research to detect other viruses with the same technique in animal husbandry.

Key words: epizootic haemorrhagic disease virus of deer; akabane virus; bluetongue virus; vesicular stomatitis virus; liquichip detection technique

蓝舌病、水泡性口炎、鹿流行性出血热病和赤羽病是重要的动物虫媒病,分别是世界动物卫生组织(OIE)规定的法定报告动物疫病和我国农业部规定的一、二类动物传染病^[1]。近年来,随着全球气候的变化、生态环境的改变和国际动物贸易的逐年增加,这几种动物疫病在全球范围内有扩大流行的趋势,严重威胁着畜牧业发展,对人类健康也有不良影响^[2-6]。研制 4 种重要动物虫媒病的快速诊断试剂盒,为我国重要动物虫媒病的检疫提供技术支持,具有重要现实意义。但目前可同时检测这 4 种疾病的高通量检测方法还未见报道。

液相芯片检测技术是一种全新的快速高通量检测技术,集多种生化技术于一体,具有独特的优点^[7-10]。该方法避免了 RT-PCR、酶联免疫吸附试验(ELISA)等常规方法不能满足出入境高通量检疫的缺点^[11-12]。鉴于此,笔者依据实际需要,采用 PCR 或 RT-PCR 检测方法 with 液相芯片检测技术结合,建立了 4 种虫媒病的液相芯片快速检测方法,为快速、高通量检测这 4 种虫媒病提供了必要的技术储备,为快速、准确、高通量检测动物疫病探索一种可能的方法。

1 材料与方法

1.1 质粒、试剂与仪器

带有蓝舌病病毒(BTV)的 VP7 基因的质粒 PMT-BTV-VP7、水泡性口炎病毒(VSV)的 NP 基因质粒 PMT-VSV-NP、鹿流行性出血热病毒(EHDV)的 VP7 基因质粒 PMT-EHDV-VP7、阿卡斑病毒(AKV)的 N 基因质粒 PMT-AKV-N 和西尼罗河病毒(WNV)的 E 基因质粒 PMT-WNV-E 由作者实验室构建^[13-14],带有质粒的菌株由本室保存。蓝舌病病毒、水泡性口炎病毒、鹿流行性出血热病毒和阿卡斑病毒由本实验室保存。所有样品为进口冻品。

试验试剂:TaKaRa Mini BEST Plasmid Purification Kit (2.0)、TaKaRa PCR Amplification Kit 和 TaKaRa DNA Fragment purification kit (2.0) 购自 TaKaRa 公司, Qiagen Viral RNA Mini Kit、Qiagen

OneStep RT-PCR Kit 与 EZ1 Virus mini Kit 2.0 购自 Qiagen 公司; EDC (N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride) 购自 Pierce 公司; Streptavidin R-Phycoerythrin Lumi Grade 购自 Roche Applied Science 公司; 0.5 mol · L⁻¹ MES [2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid hydrate Solution] 购自 Fluka 公司; 所用各种表面含有羧基的荧光编码微球来自 Luminex 和 Qiagen 公司。

主要仪器设备:梯度核酸扩增仪(T-Gradient 796) (Biometra), 液相芯片检测工作站(Liquichip 200) (Qiagen), 凝胶成像分析仪(GAS7001X) (UVItech)。

1.2 引物与探针的设计与合成

选取不同国家地区的 GenBank 上 BTV 的 VP7 基因、VSV 的 NP 基因、EHDV 的 VP7 基因和 AKV 的 N 基因序列,进行在线分析后再利用 DNASTar (V. 5.06) 分析,找出基因中最保守的 20 个左右寡核苷酸作为液相芯片检测探针,探针 T_m 值在 75~80 °C,在其 5' 端标记-NH₂。分别在探针的上下游设计特异性的扩增引物。同时根据探针的序列设计其反向互补序列作为建立反应体系的阳性对照。探针及反向互补序列、引物的序列如下: 1. AKV-EI-N 231 bp (84-314 bp), T_m = 78 °C, P1: 5'-TAAGTATGGGCAGCAGCTCAAC-3', P2: 5'-TCAGCAATCCAGCGAGCTAA-3'; Probe: 5'-CAGTGGTTAATAACCATTTTCCCCA-3'; RC-Probe: 5'-TGGG-GAAAATGGTTATTAACCACTG-3'。 2. BTV-B5-VP7, 211 bp (208-418 bp), T_m = 80 °C, P1: 5'-TCT-GCTGCTGGGATAAATGTTG-3'; P2: 5'-ACCTCCCTGGTTGGAAGGTT-3'; Probe: 5'-AAGCGGCGAATGAAATAGCTCGAGT-3'; RC-Probe: 5'-ACTCGAGCTATTTTCATTCGCCGCTT-3'。 3. EHDV VP7, 206 bp (387-592 bp), T_m = 79 °C, P1: 5'-GGCAGCGC-CAGAAGTTACC-3'; P2: 5'-CCGCTGCATTCGAAAAAGTC-3'; Probe: 5'-ATCGTATCCTCGACTTTAGCTCAGG-3'; RC-Probe: 5'-CCTGAGCTAAAGTCGAGGATACGAT-3'。 4. VSV-VN5-NP: 219 bp (918-1136 bp), T_m = 77 °C, P1: 5'-

GCTAAGATCAACTCGGGCAAA-3', P2: 5'-CCAAGCCAGTCCACGACATT-3'; Probe: 5'-ATGCTAGACAGCCTGACGACATCGA-3'; RC-Probe: 5'-TCGATGTCGTCAGGCTGTCTAGCAT-3'。

引物、探针送 Sigma 公司合成,所有下游引物的 5'端标记生物素,Probe 的 5'-C6 标记氨基,探针反向互补序列 RC-Probe 的 5'端标记生物素。引物用水溶解成 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 贮存母液备用。

1.3 PCR 扩增体系的建立

用 TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver. 2.0 抽提带有以上 4 种病毒基因的质粒,按照 TaKaRa PCR Amplification Kit Handbook 推荐的方法建立这 4 种基因的通用 PCR 检测方法。PCR 的反应体系如下 ($50 \mu\text{L}$): RNase-free water $34 \mu\text{L}$; $10 \times$ TaKaRa PCR buffer $5 \mu\text{L}$; dNTPs mix ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ each) $4 \mu\text{L}$; TaKaRa Taq ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $2 \mu\text{L}$; P1 ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $1 \mu\text{L}$; template (Plasmid DNA) $2 \mu\text{L}$; P2 ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $2 \mu\text{L}$ 。加完各成分混匀后进行 PCR 反应,程序如下: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 热启动 3 min ; $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s , $52 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 $1 \text{ min } 30 \text{ s}$, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 1 min , 15 个循环; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 10 min 。同样用 Qiagen Viral RNA Mini Kit 抽提 4 种虫媒病灭活病毒的 RNA,按照 Qiagen OneStep RT-PCR Kit Handbook 推荐的方法建立 $50 \mu\text{L}$ 体系的 RT-PCR 检测方法, RT-PCR 的反应体系如下: RNase-free water $27.5 \mu\text{L}$; $5 \times$ Qiagen one step RT-PCR buffer $10 \mu\text{L}$; dNTPs mix ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ each) $4 \mu\text{L}$; P1 ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $1 \mu\text{L}$; RNase inhibitor ($40 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $0.5 \mu\text{L}$ ($10 \text{ U} \cdot \text{反应}^{-1}$); Qiagen one step RT-PCR enzyme mix (HotStarTaq DNA Polymerase) $2 \mu\text{L}$; template (viral RNA) $3 \mu\text{L}$, P2 (20) $2 \mu\text{L}$ 。加完各成分混匀后进行 RT-PCR 反应。反应程序: $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 逆转录 35 min , $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 逆转录酶的灭活及热启动 15 min , $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s , $52 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 $1 \text{ min } 30 \text{ s}$, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 1 min , 15 个循环; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 后延伸 10 min 。反应结束后,取 $5 \mu\text{L}$ PCR 或 RT-PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳检测。

1.4 核酸液相芯片 (PLex) 检测体系的建立

1.4.1 EDC 一步法偶联寡核苷酸探针与 Luminex 羧基化的荧光编码微球 按照 Luminex 推荐的荧光编码微球序号,与上述 4 种虫媒病毒的各个基因保守序列的特异性寡核苷酸探针一一对应进行偶联,荧光编码微球与探针的偶联参照 Luminex 推荐操作步骤进行^[15-16]。偶联后与其 RC-Probe 进行杂交反应,并设空白对照,以确定偶联是否有效。根据

Luminex 公司推荐的判定标准,当每种荧光编码微球个数不少于 20 个且背景空白荧光强度不高于 300,表明试验成立,进行结果判定。

1.4.2 单一病毒基因液相芯片检测体系的建立

为验证已经偶联探针的荧光编码微球与相应基因的 PCR 产物之间能否正确杂交,取 PCR 的扩增产物,按照 Luminex 推荐的液相芯片步骤,将已经偶联虫媒病基因探针的相应荧光编码微球与扩增产物进行杂交,建立一种病毒基因偶联探针的荧光编码微球检测体系。设置仪器每次只检测相应编码的荧光编码微球,将上样加热陶瓷底板预先加热至 $52 \text{ }^\circ\text{C}$ 后取样品上机进行检测。结果判定标准同 1.4.1。

1.4.3 检测 4 种病毒的 PLex 检测体系建立

分别取 $100 \mu\text{L}$ 4 种偶联不同病毒基因探针的荧光编码微球,充分混合后制备荧光编码微球混合液,再次用 $1.5 \times$ TMAC 杂交液将每种荧光编码微球进一步稀释成 200 个荧光编码微球 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$,其他杂交反应同 1.4.2,分别与 1 或 2 种混合的 PCR 的扩增产物反应。进行液相芯片检测时,设置仪器为同时检测 4 种荧光编码微球。结果判定标准同 1.4.1,建立检测 4 种病毒基因偶联探针的荧光编码微球检测体系。

液相芯片定性比值结果 (Luminex qualitative ratio result, LQRR) 等于样品的校正后的荧光强度中位值 (Median fluorescence intensity, MFI) 与空白对照 MFI 的平均值 (MFIB) 的比值,即 $\text{LQRR} = \text{MFIS} / \text{MFIB}$ 。如果 $\text{LQRR} \geq 3$,判定为阳性样本;如果 $2 \leq \text{LQRR} < 3$,则判定为可疑;如果 $\text{LQRR} < 2$,则判定为阴性。

1.5 PLex 快速检测方法的灵敏性试验

为确定 PLex 快速检测方法检测灵敏度,将抽提的 EHDV 的 VP7 基因的质粒 DNA 定量后,对此模板进行 10 倍梯度稀释,连续稀释至 10^{-8} ;对 EHDV 和 BTV 的灭活溶液进行 10 倍梯度稀释,连续稀释至 10^{-5} 约 $5 \sim 10 \text{ TCID}_{50}$,抽提 RNA,进行 RT-PCR 扩增。然后按所建立 PLex 方法,确定 PLex 方法的灵敏度。

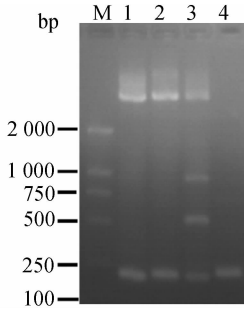
1.6 PLex 快速检测方法特异性试验

分别取带有 BTV 的 VP7 基因、VSV 的 NP 基因、EHDV 的 VP7 基因、AKV 的 N 基因和 WNV 的 E 基因的质粒作为模板,按照 1.3 的方法进行这些基因的 PCR 扩增,将扩增产物与偶联基因探针的相应荧光编码微球以及混合微球进行杂交,同时扩增实验室具有的类似疾病猪瘟、口蹄疫等病毒的基因片段用上述方法检测,确定所建方法的特异性。

2 结果

2.1 PCR 检测方法的建立与优化

PCR 在反应体系中其他条件相同的条件下,确定的最佳引物终浓度分别为 $0.01 \sim 0.05 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MgCl}_2$ 的浓度为反应体系中的镁离子浓度。以此条件建立了 4 种虫媒病毒的 PCR 和 RT-PCR 检测方法。



M, DL2000 DNA 相对分子质量标准; 1~4. 分别为 EHDV VP7 基因、VSV NP 基因、BTV VP7 基因和 AKV N 基因的 PCR 扩增片段

M, DL2000 DNA Marker; 1-4. Amplified fragments of VP7 gene of EHDV, NP gene of VSV, VP7 gene of BTV, and N gene of AKV, respectively

图 1 4 种虫媒病相应基因 PCR 扩增后电泳检测结果

Fig. 1 Gel electrophoresis of PCR for four insect-borne viruses

2.3 PLEX 检测体系的建立

相应的荧光编码微球与各个毒株的探针偶联后与相应的 RC-Probe 杂交后检测偶联的效率,各个

表 1 微球偶联直接 PLEX 检测 MFI 值

Table 1 MFI value of PLEX for the direct reaction with RC-Probe

荧光编码微球 Carboxy beads	35	36	37	38	42	43	44	45
Probe	EHDV	EHDV	AKV	AKV	BTV	BTV	VSV	VSV
MFI+	3 861	3 902	4 244	4 437	4 398	4 756	3 724	3 865
MFI of control	130	254	233	256	92	49	79	141

4 种虫媒病毒的探针与相应荧光编码的荧光编码微球偶联后,与相应的 PCR 反应扩增产物直接杂交后显示,各种参与计数的荧光编码微球均 ≥ 20 个,表明用于计数的荧光编码微球数量有效,所产生的 MFI 值可信;各个荧光编码微球的空白对照 MFI

表 2 检测一种病毒的 PLEX MFI 值

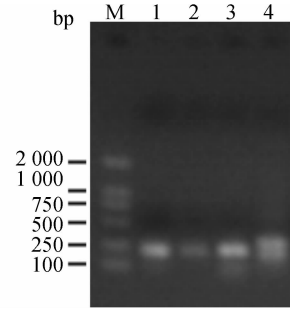
Table 2 MFI value of PLEX for detection one of four insect-borne viruses

液相芯片微球	35	36	37	38	42	43	44	45
Liquidchip carboxy beads								
MFI _B	13	16	44	72	62	66	162	146
MFI _S	926	1 020	1 226	1 154	1 877	1 831	2 237	2 148
Result	+	+	+	+	+	+	+	+

2.2 PCR 检测结果

分别带有 4 种虫媒病基因之一的质粒经 PCR 检测,均可特异性地扩增出所需要的目的条带,约 200 bp,与理论结果相符(图 1)。

同样各个病毒株抽提病毒核酸后,进行 RT-PCR 检测,均能特异性地扩增出与理论相符的目的条带(图 2)。



M, DL2000 DNA 相对分子质量标准; 1~4. BTV VP7 基因、VSV NP 基因、AKV N 基因和 EHDV VP7 基因的 PCR 扩增片段

M, DL2000 DNA Marker; 1-4. Amplified fragments of VP7 gene of BTV, NP gene of VSV, N gene of AKV, and VP7 gene of EHDV, respectively

图 2 4 种虫媒病相应基因 PCR 扩增后电泳检测结果

Fig. 2 Gel electrophoresis of PCR for four insect-borne viruses

偶联后荧光编码微球的 MFI 值都在 3 000 以上,而空白对照 MFI 值均 < 300 ,表明偶联成功(表 1)。

值均 < 300 ,表明结果有效,试验可进行结果判定;PCR 扩增产物的 MFI 值明显大于阴性和空白对照的值。探针与相应的 PCR 扩增的阳性产物之间均有特异性的杂交, LQRR 值都大于 10,表明均为阳性(表 2)。

同样将单毒株的 RT-PCR 扩增产物纯化后,直接或 2 种混合后与 4 种偶联不同探针的混合微球进行杂交,每个样品 2 个重复,混合微球的探针与各种

病毒 RT-PCR 扩增的阳性产物之间均有特异性的杂交,LQRR 值都大于 10,且非特异性反应很小(表 3)。

表 3 同时检测 4 种虫媒病 PLeX 的 MFI 值

Table 3 MFI value of PLeX for detection of four insect-borne viruses

样品 Sample	36- EHDV	37- AKV	42- BTV	44- VSV
EHDV	1 086	33	13	33
EHDV	1 033	21	13	33
AKV	21	1 020	9.5	10
AKV	31	997	6	11.5
VSV	17	37	11	1 108
VSV	44	21	12	1 123
BTV	32	20	1 020	14
BTV	44	49	1 077	40
EHDV+ BTV	1 140	56	1 026	18
EHDV+ BTV	1 080	27	1 065	32
AKV+ VSV	18	1 033	46	926
AKV+ VSV	18	1 090	21	987

2.4 PLeX 快速检测方法灵敏性试验结果

将抽提的带有 EHDV VP7 基因的质粒定量后以 10 倍梯度稀释,进行 EHDV VP7 基因片段的 PCR 扩增、纯化后进行 PLeX 快速检测。结果表明(表 4):PLeX 快速检测方法检测 EHDV VP7 基因

的检测灵敏度为 10^{-5} ,LQRR 值约为 3.54,通过计算相当于 50 拷贝。检测病毒稀释液(后 4 行)灵敏度为 10^{-4} ,LQRR 值约为 3.72 和 3.27,通过计算相当于 50~100 TCID₅₀。

表 4 PLeX 检测的灵敏度

Table 4 The sensitivity test of PLeX

液相芯片微球 Liquichip carboxy beads	质粒/病毒稀释度及 LQRR 值 Plasmid/virus dilution and the corresponding LQRR value							
	LQRR value							
	LQRR ₁₀ ⁻¹	LQRR ₁₀ ⁻²	LQRR ₁₀ ⁻³	LQRR ₁₀ ⁻⁴	LQRR ₁₀ ⁻⁵	LQRR ₁₀ ⁻⁶	LQRR ₁₀ ⁻⁷	LQRR ₁₀ ⁻⁸
36	17.52	12.88	9.36	6.14	3.75	<2	<2	<2
36	17.67	12.24	9.06	5.78	3.32	<2	<2	<2
36	13.25	9.57	6.93	4.16	<2	<2	<2	<2
36	12.92	9.61	6.15	3.28	<2	<2	<2	<2
42	12.44	9.13	6.42	3.42	<2	<2	<2	<2
42	11.89	9.01	6.06	3.12	<2	<2	<2	<2

2.5 PLeX 快速检测方法特异性试验

对带有 BTV 的 VP7 基因、VSV 的 NP 基因、EHDV 的 VP7 基因和 AKV 的 N 基因检测结果,探针与相应的 RT-PCR 扩增的阳性产物之间均有特异性的杂交,LQRR 值都大于 10,表明均为阳性,而空白对照的值都很低,低于 300(表 2),说明建立的单毒株 GMPLex 检测方法特异性很好,方法成立;偶联不同探针的混合微球与各个毒株的 PCR 或 RT-PCR 扩增阳性产物之间均有特异性的杂交,LQRR 值均大于 10,明显表明均为阳性,且非特异性反应很小,几乎没有什么交叉反应(表 3)。对 WNV 的 E 基因的质粒和类似疾病猪瘟、口蹄疫等病毒的基因片段的检测结果也均为阴性,说明建立的 PLeX 检测方法特异性很好,方法成立。

3 讨论

液相芯片检测技术是一种全新的快速高通量检测技术。该技术中采用的荧光编码微球达 100 种,可对 100 种目标同时、准确地检测,PLeX 快速高通量检测方法的优点主要是能够快速高通量鉴定病毒的存在,通过高通量手段可降低成本和劳动力;检测样本量需求少,可通过液相荧光编码微球芯片的方法,在自然的液相反应条件下缩短检测时间^[17-19]。笔者的研究显示,在进行检测时,最佳探针与荧光编码微球偶联的比例需要进行梯度滴定,杂交之前对 PCR 或 RT-PCR 扩增产物进行纯化会明显提高检测效果;在 50 μ L MES 偶联体系中,EDC 的终浓度越高,偶联效果越好,1.0 mg \cdot mL⁻¹ 的浓度偶联效

果明显好于 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$;但荧光编码微球的加入量并非越多越好,过多反而影响与探针的偶联效率,导致杂交信号 MFI 值过低;只要探针的浓度相同,与不同量的探针杂交结果相同。探针的长度等也影响检测结果,笔者在研究中发现设计的针对 BTV 的 VP7 基因、VSV 的 NP 基因、EHDV 的 VP7 基因和 AKV 的 N 基因的探针特异性强,相互间没有交叉反应,也不与其他病毒基因反应。

4 结 论

作者将 PCR 方法与 Liquichip 检测方法结合,建立了 4 种虫媒病毒的 PLEX 快速高通量检测方法,搭建了虫媒病的全新快速高通量检测平台,为防止此类疾病进入我国以及监控其在我国的流行提供了重要的技术储备,也为其他同类病毒快速高通量检测提供了借鉴和经验。

参考文献:

[1] 梁国栋. 虫媒病毒与虫媒病毒病[J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20(9): 34-35.

[2] GLOSTER J, MELLOR P S, MANNING A J, et al. Assessing the risk of windborne spread of bluetongue in the 2006 outbreak of disease in northern Europe [J]. *Vet Rec*, 2007, 160: 54-56.

[3] HOFMANN M A, RENZULLO S, MADER M, et al. Genetic characterization of toggenburg orbivirus, a new bluetongue virus, from goats, Switzerland [J]. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14(12): 1855-1861.

[4] ARADAIB I, ALI N. Current status and future prospects of epizootic haemorrhagic disease of deer—a review [J]. *Veterinarski Arhiv*, 2004, 74(1): 63-83.

[5] PURSE B V, MELLOR P S, ROGERS D J, et al. Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3(2): 171-181.

[6] MC CLUSKEY B J, HURD H S, MUMFORD E L. Review of the 1997 outbreak of vesicular stomatitis in the western United States [J]. *J Am Vet Med Assoc*, 1999, 215(9): 1259-1262.

[7] WALSER M, PELLAUX R, MEYER A, et al. Novel method for high-throughput colony PCR screening in nanoliter-reactors [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(8): e57.

[8] CROFT H, MALINOWSKI T, KRIZBAI L, et al. Use of Luminex xMAP-derived Bio-Plex bead-based suspension array for specific detection of PPV and characterization of epitopes on the coat protein of the

virus [J]. *J Virol Methods*, 2008, 153(2): 203-213.

[9] LIU N, SU P, GAO Z, et al. Simultaneous detection for three kinds of veterinary drugs: chloramphenicol, clenbuterol and 17-beta-estradiol by high-throughput suspension array technology [J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 632(1): 128-134.

[10] ARMSTRONG B, STEWART M, MAZUMDER A. Suspension arrays for high throughput, multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping [J]. *Cytometry*, 2000, 40(2): 102-108.

[11] CUI SJ, FUNG YW, LAU LT, et al. Detection of newcastle disease virus using nucleic acid sequence-based amplification [J]. *Biologicals*, 2007, 35(1): 13-18.

[12] KONG L C, REN T, AO Y H, et al. Multiplex RT-PCR for virulence detection and differentiation between Newcastle disease virus and goose-origin APVM-1 [J]. *Avian Dis*, 2007, 51(3): 668-673.

[13] 花群义, 尚荣海, 徐自忠, 等. 蓝舌病病毒 vp7 基因的表达及其产物在 c-ELISA 中的应用 [J]. 中国病毒学, 2004, 19(3): 237-241.

[14] HUA Q, XU Z, DONG J, et al. Cloning and expression of the S7 RNA segment encoding nucleocapsid VP7 of epizootic hemorrhagic disease virus [DB/OL]. EMBL/GenBank/DDBJ databases, 2004.

[15] DUNBAR S A. Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection [J]. *Clin Chim Acta*, 2006, 363(1-2): 71-82.

[16] CHEN J, IANNONE M A, LI M S, et al. A microsphere-based assay for multiplexed single nucleotide polymorphism analysis using single base chain extension [J]. *Genome Res*, 2000, 10(4): 549-557.

[17] DUNBAR S A, VANDER ZEE C A, OLIVER K G, et al. Quantitative, multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the Luminex LabMAP system [J]. *J Microbiol Methods*, 2003, 53(2): 245-252.

[18] BORTOLIN S, BLACK M, MODI H, et al. Analytical validation of the tag-it high-throughput microsphere-based universal array genotyping platform; application to the multiplex detection of a panel of thrombophilia-associated single-nucleotide polymorphisms [J]. *Clin Chem*, 2004, 50(11): 2028-2036.

[19] DUNBAR S A, JACOBSON J W. Application of the luminex LabMAP in rapid screening for mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene: A pilot study [J]. *Clin Chem*, 2000, 46(9): 1498-1500.