

鸡传染性支气管炎病毒 RT-PCR 快速检测方法的建立

刘金朋¹, 商艳红¹, 陈红英¹, 王淑娟¹, 王子馨¹, 王亚丹¹, 师丽刚²

(¹河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002; ²洛阳市动物疫病预防控制中心, 河南洛阳 471002)

摘要:根据鸡传染性支气管炎病毒 (IBV) *N* 基因序列 (FJ767920), 利用引物软件 Premier5.0, 设计并合成了 1 对特异引物, 通过 RT-PCR 扩增条件的优化, 建立了一种快速检测 IBV 的 RT-PCR 方法。应用该方法成功地从 IBV M41 和河南株 HN99 中扩增出 318 bp 的目的片段, 而传染性喉气管炎病毒、新城疫病毒及马立克病毒基因组均未扩增出相应的片段。将回收的 RT-PCR 产物克隆到 pGEM-T Easy 载体后测序, 进一步证实 RT-PCR 检测方法的特异性。对 IBV 的最低检出量为 0.6 pg 的 cDNA。经初步应用表明, 该方法的建立为 IBV 的早期诊断和临床检测奠定基础。

关键词:鸡传染性支气管炎病毒; RT-PCR; 检测

中图分类号: S855.3

文献标志码: A

论文编号: 2010-2929

Development of RT-PCR for Rapid Detection of Infectious Bronchitis Virus

Liu Jinpeng¹, Shang Yanhong¹, Chen Hongying¹, Wang Shujuan¹, Wang Zixin¹, Wang Yadan¹, Shi Ligang²

(¹College of Animal Husbandry and Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002;

²Luoyang Center for Animal Diseases Control and Prevention, Luoyang Henan 471002)

Abstract: A pair of primers was designed according to a conserved region of infectious bronchitis virus (IBV) *N* gene (FJ767920), reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for rapid detection of IBV was developed by optimizing amplification conditions such as concentrations of primers for RT-PCR. A 318 bp fragment was amplified from IBV M41 strain and Nephropathogenic IBV HN99 strain, respectively, but not from infectious laryngotracheitis virus, Newcastle disease virus and Mareks disease virus. This amplified fragment was cloned into pGEM-T Easy vector and sequenced. The result showed that this amplified fragment was specific for IBV cDNA. This method could detect the template cDNA of 0.6 pg for IBV. Clinical detection of IBV by RT-PCR showed that this improved RT-PCR approach could be a fast, simple and specific detection method for IBV.

Key words: infectious bronchitis virus; RT-PCR; detection

0 引言

鸡传染性支气管炎 (Infectious bronchitis, IB) 是由鸡传染性支气管炎病毒 (IBV) 引起鸡的一种急性、高度接触性、呼吸道传染病^[1]。迄今为止, IBV 感染已有呼吸型、肾型、腺胃型、肠型等多种致病型^[2], 其中还有一些变异的中间体, IBV 主要侵害鸡的呼吸系统、泌尿生殖系统和消化系统。雏鸡感染后由于呼吸道或肾脏

病变而引起死亡, 死亡率一般为 20%~30%, 有时高达 40%~90%。产蛋鸡感染则使产蛋量下降, 蛋品质降低, 还可导致感染的肉鸡生产能力下降, 使鸡的增重和饲料报酬降低, 死淘率增加。自 1930 年在美国北达科他州发现该病以来^[3], 现已遍及世界各地。中国在 20 世纪 50 年代发现该病, 李康然等^[4]于 1990 年在广西分离了一株肾型 IBV, 1992 年以后中国 IB 的流行呈上升

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划专项 (2006BAD06A08)。

第一作者简介: 刘金朋, 男, 1983 年出生, 河南开封人, 硕士研究生, 主要从事分子免疫学和分子病毒学研究。通信地址: 450002 河南省郑州市文化路 95 号河南农业大学牧医工程学院, Tel: 0371-63558180, E-mail: taisuiyi613@126.com。

通讯作者: 陈红英, 女, 1965 年出生, 四川仁寿人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 长期从事动物微生物学及免疫学教学和科研工作, 在主要畜禽疫病病原学、分子生物技术及免疫学、疫病防治所用疫苗等方面具有独特研究。通信地址: 450002 河南省郑州市文化路 95 号河南农业大学牧医工程学院, Tel: 0371-63558180, E-mail: chhy927@126.com。

收稿日期: 2010-10-13, **修回日期:** 2010-11-17。

趋势,尤其是肾型 IB 已蔓延到所有养鸡地区,给养鸡业造成了严重的经济损失。

由于 IBV 的基因组核酸在复制过程中易发生突变和高频重组,从而导致该病毒血清型众多^[5],变异株又不断出现,并且鸡新城疫病毒、禽流感病毒等也可引起类似症状,单凭临诊剖检往往不能作出准确的诊断,必须依靠实验室诊断^[6-7]。目前国内诊断 IB 的方法仍然是病毒的分离和血清学诊断反应等^[7],但是这些方法由于费时费力而不适于临床检测。与这些检测方法相比,反转录-聚合酶链反应(Reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)技术具有灵敏、特异、快速、易于操作的特点,在畜禽传染病的病原检测和鉴别诊断方面已得到了大量推广与应用^[8-11]。因此,研究利用 RT-PCR 技术,通过引物浓度、退火温度等条件的优化,建立了一种检测 IBV 的 RT-PCR 方法,具有快速、灵敏、特异、简便的特点,适用于 IBV 的早期诊断和临床检测。

1 材料和方法

1.1 毒株及 SPF 鸡胚

IBV M41 株、传染性喉气管炎病毒(ILTV)、新城疫病毒(NDV)、马立克氏病病毒(MDV)由河南省动物性食品安全重点实验室保存。IBV 河南株 HN99 由河南省动物性食品安全重点实验室从疑似 IBV 感染的 3 周龄病鸡中分离,初步鉴定为肾型 IBV。SPF 鸡胚购自济南斯帕法斯家禽有限公司。

1.2 主要试剂

2×PCR TaqMix 酶、DNA Marker DL2000、EcoR I、TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver 2.0 等购自宝生物工程(大连)有限公司;pGEM-T Easy 载体购自 Promega 公司;总 RNA 抽提试剂盒购自上海捷瑞生物工程技术有限公司;反转录试剂盒 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 购自美国 MBI 公司。

1.3 引物设计与合成

根据 IBV N 基因序列,利用 Premier5.0 软件,设计并合成 1 对特异性引物,扩增的片段长度为 318 bp。引物由上海生物工程有限公司合成。上游引物:5' -GTG TCA TCC CTC TGA ATC GT-3';下游引物:5' -GCC CTT CCT CAT TCA TCT TG-3'。

1.4 病毒增殖与 RNA 的抽提

将 IBV M41 株经尿囊腔接种于 10 日龄 SPF 鸡胚,37℃ 继续培养,弃去 24 h 内的死胚,培养至 48 h 时将所有的活胚置 4℃ 致死。无菌收集 24 h 后死胚和 48 h 活胚的尿囊液。取尿囊液 400 μL,按总 RNA 抽提试剂盒

使用说明书抽提病毒 RNA。

1.5 RT-PCR 扩增

在 20 μL 的反转录体系中,加入上述提取的病毒 RNA 11 μL,1 μL 通用引物(oligo(dt) primer),按照反转录试剂盒 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 使用说明书进行反转录,合成 cDNA。在 25 μL PCR 反应体系,加入 2×PCR TaqMix 酶 12.5 μL,上、下游引物各为 0.5 μL,cDNA 2 μL,用双蒸水补至 25 μL,瞬时离心混匀,进入 PCR 扩增:94℃ 预变性 5 min;94℃ 15 s,52℃ 30 s,72℃ 1 min,共 25 个循环;72℃ 延伸 10 min。扩增结束后,取 5 μL PCR 产物在 1.0% 琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/mL EB)上进行电泳检测。

1.6 RT-PCR 反应条件的优化

以 IBV cDNA 为模板,通过引物浓度、变性时间、退火温度、退火时间及循环次数的优化,建立一种快速检测 IBV 的 RT-PCR 方法。

1.6.1 引物浓度的优化 将引物倍比稀释为 50、25、12.5、6.25、3.125、1.56、0.78、0.39、0.195、0.098 μmol/L,每个浓度设置 3 个重复进行 RT-PCR 扩增,以确定最佳引物浓度。

1.6.2 退火温度的优化 选择 44℃、46℃、48℃、50℃、52℃、54℃、56℃、58℃、60℃ 进行 RT-PCR 扩增,以确定最佳退火温度。

1.6.3 变性和退火时间的优化 选择 15、30、45、60 s 进行 RT-PCR 扩增,以确定最佳变性和退火时间。

1.6.4 循环次数的优化 选择 20、25、30、32、35 次进行 RT-PCR 扩增,以确定最佳循环次数。

1.7 特异性试验

(1) 应用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver 2.0 对 RT-PCR 产物进行回收纯化。将回收的 RT-PCR 产物与 pGEM-T Easy 载体进行连接反应,转化到 *E coli* DH5α 感受态细胞,经蓝白斑筛选,挑取白色菌落,接种于含有 Amp⁺ 的 LB 肉汤培养基中,37℃ 振荡培养 12~16 h。提取重组质粒,经测序鉴定插入片段是否正确。

(2) 在优化的 RT-PCR 扩增条件下,以 IBV M41、IBV HN99、NDV、ILTV、MDV 的 cDNA 或 DNA 为模板进行 RT-PCR 扩增。

1.8 敏感性试验

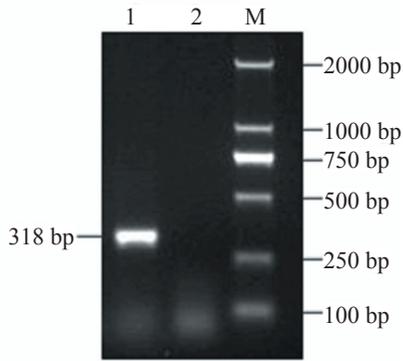
将 cDNA 用双蒸水稀释后,用 UNICOUV-2102 可见紫外分光光度计测定其在 260、280 nm 处的 OD 值,并根据公式计算出 cDNA 浓度与纯度。将 cDNA 用双蒸水进行 10 倍系列稀释后,每个稀释度的 cDNA,取 3 μL 作为模板,在优化的 RT-PCR 扩增条件下,分别进

行RT-PCR扩增。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 扩增

取RT-PCR产物于1%的琼脂糖凝胶电泳后,可见1条约300 bp的DNA带(图1),与预期结果相符。



M. DNA Marker DL2000; 1. IBV N基因的RT-PCR产物; 2.阴性对照

图1 IBV N基因RT-PCR扩增结果

2.2 RT-PCR 扩增条件的优化

将引物倍比稀释为10个浓度,结果显示浓度为

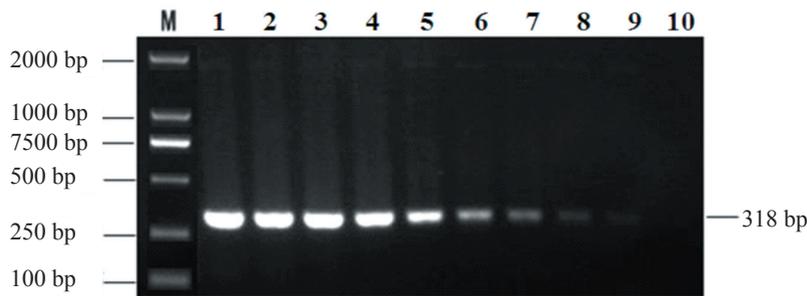
0.098 $\mu\text{mol/L}$ 以及大于0.098 $\mu\text{mol/L}$ 的引物均能扩增出目的片段,但3.125 $\mu\text{mol/L}$ 及其以上引物浓度扩增的条带都很亮,3.125 $\mu\text{mol/L}$ 以下引物浓度扩增的条带较暗,不利于观察,而3.125 $\mu\text{mol/L}$ 的引物浓度扩增的条带较亮,且无非特异性条带(图2)。因此,选择3.125 $\mu\text{mol/L}$ 作为RT-PCR检测IBV的最佳引物浓度。

通过4次重复试验,证明在25 μL 体系时,引物浓度为3.125 $\mu\text{mol/L}$,变性时间为15 s,52 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,25次循环时,扩增效率最高。

2.3 特异性试验

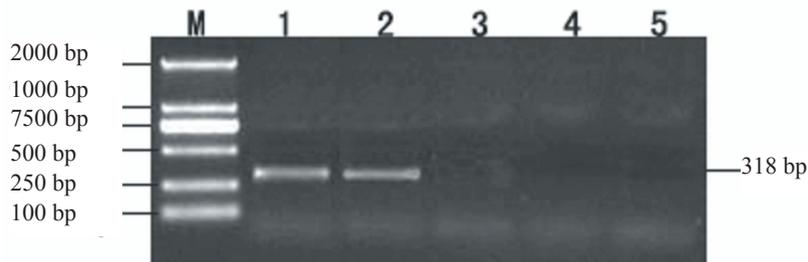
对IBV M41、IBV HN99、NDV、ILT V、MDV灭活抗原的cDNA或DNA进行RT-PCR扩增,结果只有IBV M41和IBV HN99扩增出1条318 bp的条带(图3),与预期结果吻合,证明RT-PCR检测方法的特异性。

将RT-PCR产物回收纯化后,插入到pGEM-T Easy载体中进行测序,测序结果报告所测序列核苷酸长度为318 bp(序列略),与预期结果相一致。序列分



M. DNA Marker DL2000; 1~10.引物从50 $\mu\text{mol/L}$ 倍比稀释至0.098 $\mu\text{mol/L}$

图2 RT-PCR引物浓度的选择



M. DNA Marker DL2000; 1.传染性支气管炎病毒M41株; 2.传染性支气管炎病毒HN99株; 3.传染性喉气管炎病毒; 4.新城疫病毒; 5.马立克氏病病毒

图3 特异性试验

析显示所测序列与参考序列(FJ767920)核苷酸同源性的96%,进一步证明RT-PCR检测方法的特异性。

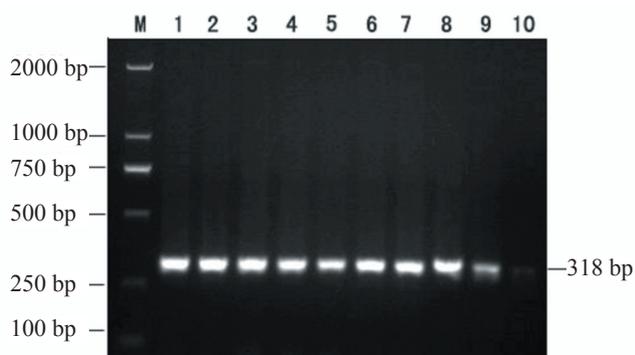
2.4 敏感性试验

IBV cDNA OD₂₆₀/OD₂₈₀为1.81,纯度合格,含量为202.5 $\mu\text{g/mL}$ 。将cDNA作10倍系列稀释后,每个稀释度的cDNA取3 μL ,分别进行RT-PCR扩增,结果以

10⁹稀释的cDNA为模板仍能扩增出318 bp目的片段,而10¹⁰稀释的cDNA不能扩增出条带。说明RT-PCR扩增可以检测到0.6 pg的IBV模板cDNA(图4)。

2.5 临床样品检测

对40份来自鸡场和动物医院采集的疑似IBV感染的病料,提取RNA。按照上述优化的RT-PCR扩增



M. DNA Marker DL2000; 1~10.将 IBV cDNA 10^1 到 10^{10} 稀释后作为模板的 RT-PCR 产物

图4 RT-PCR 敏感性试验结果

条件,进行 RT-PCR 扩增,同时设 IBV M41 株 RNA 作为阳性对照,蒸馏水作为阴性对照。电泳结果表明,来自鸡场的 14 份病料中有 3 份为阳性,来自动物医院的 26 份病料中有 8 份为阳性,其他均为阴性。

3 讨论

编码核衣壳蛋白(Nucleocapsid protein)的 *N* 基因,是 IBV 基因组中相对保守的一个基因^[12]。根据 *N* 基因结构的高度保守性,以 *N* 基因为 RT-PCR 的模板,能兼顾不同 IBV 血清型以及不同 IBV 毒株之间的保守区段,对 IBV 的检测具有很高的通用性,在 IB 的临床诊断与病原检测方面具有很重要的意义。因此,研究针对 IBV *N* 基因的保守区段设计了 1 对引物,对 IBV M41 株和肾型 IBV HN99 进行 RT-PCR 扩增,均能获得预期的 318 bp 条带,而对对照病毒株均无任何条带。

RT-PCR 扩增的特异性与引物有直接关系,如果引物设计合理,能扩增出目的片段,如果引物设计不合理,将会增加非特异性反应,甚至不能扩增出目的片段。试验针对 IBV *N* 基因的保守区段设计 1 对引物,对 IBV M41 株和肾型 IBV HN99 的 RNA 分别进行 RT-PCR 扩增,均得到了阳性结果,同时以 ILTV、ND、MD 灭活抗原的 DNA 或 cDNA 为模板进行 RT-PCR 扩增,结果均为阴性,这证明了所设计引物的可靠性,保证了 RT-PCR 检测 IBV 的特异性^[13]。将回收的 RT-PCR 产物克隆到 pGEM-T Easy 载体后,进行测序。测序结果显示,克隆的序列与发表的 IBV *N* 基因序列 (FJ767920) 核苷酸同源率为 96%,证明 RT-PCR 扩增产物的特异性。表明该研究建立的一种检测 IBV 的 RT-PCR 方法特异性强,可有效地检测临床病料中 IBV 的存在。

PCR 扩增中退火温度是影响 PCR 特异性的一个重要因素,研究选择 44℃、46℃、48℃、50℃、52℃、54℃、56℃、58℃、60℃ 9 个退火温度均能扩增出特异性目的

片段,但 56℃、58℃、60℃ 扩增出的特异性条带不如 52℃、54℃ 扩增出的特异性条带亮度高,而 48℃、50℃ 虽特异性条带较亮,但有非特异性条带,这是由于较低的退火温度更有利于引物和模板间的结合,增加了非特异性扩增,而较高的退火温度可大大减少引物和模板间的非特异性结合,从而提高 RT-PCR 反应的特异性。经过反复 RT-PCR 试验,研究选择 52℃ 作为退火温度。

在保证 RT-PCR 扩增的特异性和获得较多扩增产物的前提下,为了缩短 IBV 检测所需的时间,研究采取缩短变性、退火时间和减少循环次数。经过反复试验,确定 94℃ 变性 15 s, 52℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 25 次循环已足以检测出 IBV, 并且由于 RT-PCR 扩增后期的“平台效应”,使得 30 次循环后 RT-PCR 扩增效率大大地降低,扩增产物量难以大量增多,反而延长了检测所需的时间^[14]。试验建立的检测 IBV 的 RT-PCR 诊断方法与孙涛等^[15]报道的 RT-PCR 诊断方法相比较,明显缩短了检测所需的时间,并且提高了敏感性,真正体现了 RT-PCR 技术检测病原具有快速、灵敏、特异的特点。因此,研究所建立的一种快速检测 IBV 的 RT-PCR 方法,适用于 IBV 的流行病学调查、早期诊断、临床检测和疾病诊断,为 IB 的有效控制具有重要的现实意义。

参考文献

- [1] 陈溥言. 家畜传染病学[M]. 五版. 北京: 中国农业出版社, 2005: 373.
- [2] Yu L, Jiang Y, Low S, et al. Characterization of three infectious bronchitis virus isolates from China associated with proventriculus in vaccinated chickens [J]. Avian Dis, 2001, 45(2): 416-424.
- [3] Schalk A F, Hawn M C. An apparently new respiratory disease of baby chicks [J]. J Am Vet Med Assoc, 1931, 78: 413-422.
- [4] 李康然, 梁梅芳, 魏平, 等. 鸡传染性支气管炎病毒致肾病变毒株的分离和鉴定 [J]. 广西农学院学报, 1990, 9(1): 45-54.
- [5] 姜举娟, 刘永刚. IBV 结构蛋白的研究进展 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2008(8): 23-24.
- [6] 亓丽红, 李晓红, 王春玲, 等. 鸡传染性支气管炎病毒的分子生物学研究进展 [J]. 家禽科学, 2005(7): 45-48.
- [7] 聂磊, 张庆霞, 韩宗玺, 等. 中国 1995—2004 年鸡传染性支气管炎病毒地方分离株膜蛋白基因的遗传变异分析 [J]. 病毒学报, 2007, 23(4): 298-304.
- [8] 苏晓鸥, 赵德明. 鸡传染性法氏囊病病毒 RT-PCR 检测方法的建立 [J]. 动物医学进展, 2008, 29(9): 5-8.
- [9] 李玉峰, 王先炜, 陈闻, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 nsp2 基因缺失株 RT-PCR 检测方法的建立 [J]. 南京农业大学学报, 2009, 32(3): 169-171.
- [10] Hofmann M A, Thur B, Liu L, et al. Rescue of infectious classical swine fever and foot and mouth disease virus by RNA transfection and virus detection by RT-PCR after extended storage of samples in

- Trizol [J]. *J Virol Methods*,2000,87(1-2):29-39.
- [11] 崔尚金,陈化兰,唐秀英,等.禽流感RT-PCR 诊断方法的建立[J].*中国畜禽传染病*,1998,20(2):105-107.
- [12] Williams A K, Wang L, Sneed L W, et al. Comparative analyses of the nucleocapsid genes of several strains of infectious bronchitis virus and other coronaviruses [J]. *Virus Res*,1992,25(3):213-222.
- [13] 王非,蒋建一,华炯刚,等.鸡 ILV,IBV,NDV 和 AIV 多重 TR-PCR 检测方法的初步建立[J].*西北农林科技大学学报*,2007,35(4):37-40.
- [14] 李小康,赵丽,崔保安,等.多重 PCR 检测猪细小病毒和猪伪狂犬病毒的研究[J].*中国预防兽医学报*,2007,29(3):227-230.
- [15] 孙涛,王欣,陆苹.鸡传染性支气管炎病毒上海地方分离株的 RT-PCR 快速检测[J].*华中农业大学学报*,2001,20(4):368-371.