

应用二温式多重 PCR技术鉴别鸡传染性支气管炎病毒和鸡传染性喉气管炎病毒*

Detection of Infectious Bronchitis Virus and Infectious Laryngotracheitis Virus by Two-temperature PCR

谢志勤 谢芝勋 庞耀珊 刘加波 邓显文 廖敏

Xie Zhiqin Xie Zhixun Pang Yaoshang Liu Jiabo Deng Xianwen Liao Min

(广西兽医研究所 南宁市友爱北路 51号 530001)

(Guangxi Veterinary Research Institute, 51 North You'ailu, Nanning, Guangxi, 530001, China)

摘要 为了简化聚合酶链反应 (PCR) 程序和加快检测速度, 将二温式 PCR与多重 PCR结合起来, 建立一种同时检测鸡传染性支气管炎病毒 (IBV) 和鸡传染性喉气管炎病毒 (ILTV) 的二温式多重 PCR技术。试验根据 IBV 和 ILTV 的基因文库, 设计 2对分别与 IBV 和 ILTV 某段基因序列互补的引物, 用这 2对引物对同一样品中的 IBV、ILTV 核酸模板进行二温式多重 PCR扩增, 结果均同时得到 2条特异性大小与实验设计相符的 1720bp (IBV) 和 647bp (ILTV) 的扩增带, 而对其他 6种禽病病原的扩增结果均为阴性; 敏感性测定结果表明, 该二温式多重 PCR技术能检出 10pg 的 IBV RNA 模板和 10pg 的 ILTV DNA 模板。

关键词 鸡传染性支气管炎病毒 鸡传染性喉气管炎病毒 二温式多重聚合酶链式反应 检测

中图分类号 S 858.314.44

Abstract A two-temperature polymerase chain reaction was optimized to simultaneously detect two pathogens of IBV and ILTV for saving time of detection. Two sets of specific primers were designed according to the sequences of IBV and ILTV at the Gene Bank. All samples which contain IBV cDNA and ILTV DNA could be amplified by the two-temperature PCR using these two sets primers, yielding two specific bands of IBV 1720bp and ILTV 647bp. But no specific band amplified could be found from other six avian pathogenic viruses and bacteria. As little as 10pg of IBV RNA and 10pg of ILTV DNA were detected using gel electrophoresis in this two-temperature PCR.

Key words infectious bronchitis virus, infectious laryngotracheitis virus, two-temperature polymerase chain reaction, detection

鸡传染性支气管炎病毒 (IBV) 和鸡传染性喉气管炎病毒 (ILTV) 引起鸡传染性支气管炎和传染性喉气管炎。感染病毒的鸡会直接死亡, 而存活的鸡生长缓慢, 淘汰率增高, 蛋鸡产蛋下降, 并干扰其它疫苗的免疫能力, 使鸡继发感染其它疾病, 造成严重的经济损失^[1-3]。这两种疾病临床上都出现呼吸道症状, 而且在流行病学、病理变化等方面的特征也十分相似; 临床上还易与其它呼吸道病如鸡新城疫 (ND)、禽流感 (AI)、支原体病 (MG) 等相混淆。目前, 对 IBV、ILTV 的鉴别诊断主要依靠传统的病原分离鉴定及血清学方法等, 但这些方法操作繁杂, 敏感性较低,

确诊时间长。特别是对于有 IBV、ILTV 等多种病毒混合感染而引起的疾病, 应用这些传统方法进行诊断更为困难。现代集约化养禽业需要快速、准确、能同时检测多种病毒的检测技术。

聚合酶链反应 (PCR) 检测技术, 近几年已被广泛应用于禽病的研究及病原体检测^[4-7]。文献 [8] 报道了应用聚合酶链反应扩增鸡传染性喉气管炎病毒 TK 基因的方法, 文献 [9] 报道了用二重 PCR 检测鸡毒霉形体 (MG)、滑液霉形体 (MS) 的技术。二温式 PCR 是 PCR 的一种特殊形式, 操作比常规 PCR (三温 PCR) 更简便。为了简化 PCR 程序和提高检测速度, 本试验将二温式 PCR 与多重 PCR 结合起来, 建立二温式多重 PCR 检测 IBV、ILTV 的方法。

2001-01-10 收稿

* 广西留学基金 (9817131)、广西十百千人才专项资金 (99202) 和国家留学回国人员基金。

1 材料与amp;方法

1.1 试验用毒菌株

IBV: Mass41株、Florida株、JMK株、Ark株、Conn.株由美国康州大学 Khan博士惠赠; ILTV: 北京株 (购自中国兽药监察所); ILTV的台湾疫苗株、以色列疫苗株、广西分离株、对照菌 (毒) 株: 禽呼肠孤病毒 (S1133)、禽巴氏杆菌 (C48-1)、禽大肠杆菌 (O₂)、鸡毒霉形体 (MG)、鸡新城疫病毒 (NDV)、禽沙门氏菌 (C79-13), 均由本室保存。

1.2 试剂盒和 PCR反应仪

RNA抽提试剂盒、PE9600PCR仪购自美国 Promega公司; RT-PCR试剂盒购自美国 Perkin Elmer Cetus公司。

1.3 供试毒株的增殖和收集

参考文献 [10] 的方法, 将 IBV、ILTV 种毒作适当稀释后, IBV 稀释液接种 10日龄 SPF鸡胚, 经繁殖后收获鸡胚尿囊液, ILTV 稀释液接种 10日龄 SPF鸡胚绒毛膜, 120 h后收获有痘斑病变的鸡胚尿囊液和尿囊膜, 尿囊膜经研磨后与尿囊液混合, 反复冻融 3次。收获的病毒液在 4℃条件下经 8 000 r/min离心 30 min, 弃沉淀, 上清液再经 50 000 r/min离心 2 h, 收集沉淀的病毒颗粒, 然后将病毒颗粒悬浮于适当的无 RNA酶的 DEPC水中, 存于 -70℃, 供抽提 RNA或 DNA用。

1.4 供试毒株核酸的抽提

IBV 及对照毒株 RNA的抽提, 参照谢芝勋^[11]的方法进行。ILTV 及对照菌 (毒) 株 DNA的抽提参照文献 [12] 的方法进行。按 Sambrood方法^[13]测定核酸浓度和纯度, 并置于 -70℃保存备用。

1.5 引物设计与合成

根据已发表 IBV、ILTV 的基因文库, 应用电脑软件, 参照文献 [8, 14] 设计针对 IBV、ILTV 基因序列的 2对引物, 其中 IBV 扩增幅为 1720 bp, ILTV 为 647 bp, 引物核酸序列为:

IBV XZ3 5'-CAT AAC TAA CAT AAG GGC AA-3'
XZ4 5'-TGA AAA CTG AAC AAA AGA CA-3'

ILTV XZ7 5'-ACG ATG ACT CCG ACT TTC-3'
XZ8 5'-CGT TGG AGG TAG GTG GTA-3'

引物由中科院上海生物工程研究中心合成, 经薄层色谱法纯化, 为冻干品, 用时用适量灭菌超纯水溶解, 按 Sambrook^[13]方法测其浓度, 并分装成每管 20 μl, 保存于 -20℃。

1.6 反转录

采用 25 μl 反转录体系合成 cDNA, 其中含 10

mM MgCl₂ 4 μl, 10× RNA PCR buffer 2 μl, 10 mM dNTP 2 μl, RNase Inhibitor 1 μl, Random Hexamers 1 μl, MuL_v 反转录酶 1 μl (50U), IBV 核酸模板 5 μl (100 ng), 最后用 DEPC H₂O 补足体积至 25 μl, 置于 PE 9600 仪中, 按下列程序进行反转录: 25℃ 10 min, 42℃ 60 min, 94℃ 6 min, 4℃ 5 min, 进行一个循环, cDNA 合成完毕。

1.7 PCR反应介质

cDNA 结束后, 分别加入下列试剂进行 PCR 反应, 总反应体积为 100 μl, 其中 10 mM MgCl₂ 6 μl, 10× PCR buffer 8 μl, Taq 聚合酶 0.5 μl (2.5 U), 一定浓度的 IBV 和 ILTV 上、下游引物各 5 μl, ILTV 核酸模板 5 μl (100 ng), 用超纯水补足至 100 μl, 置 PE9600 PCR 仪上, 按预先设定的程序进行多重 PCR 扩增反应。

1.8 二温式多重 PCR不同引物浓度和扩增条件的优化

以抽提的 IBV Mass41株、ILTV 北京株的核酸为模板, 测其浓度后, 稀释成含相同模板浓度, 然后对二温式多重 PCR 的各引物浓度及 PCR 反应的各项参数 (温度、时间、循环次数) 进行优化, 以筛选出二温式多重 PCR 反应体系中最佳的反应模式。

1.9 二温式多重 PCR的特异性试验

把含有 IBV 和对照病原的 RNA 样品, 先进行 cDNA 合成, 然后将含有 ILTV 及对照病原的 DNA 样品分别加入到 IBV、ILTV 的二温式多重 PCR 反应体系中进行扩增, 以检测其特异性。

1.10 二温式多重 PCR的敏感性试验

将抽提的 IBV Mass41 株的 RNA 和抽提的 ILTV 北京株的 DNA 作为模板测其含量后, 将其核酸作 10 倍递进稀释。采用最佳引物浓度和最佳二温式多重 PCR 反应条件, 分别对上述 RNA 模板进行 cDNA 合成后加入 DNA 模板进行二温式 PCR 扩增以检测其敏感性。

1.11 二温式多重 PCR产物的分析

取 10 μl 二温式多重 PCR 产物和 2 μl 加样缓冲液混合, 在 1% 琼脂糖凝胶上, 以 80V 电压进行电泳, 用溴化乙锭染色后, 置紫外光透射仪上观察拍照, 以标准分子量作参考, 分析记录结果。

2 结果

2.1 不同引物浓度的二温式多重 PCR条件的优化

通过对 IBV 和 ILTV 二种引物浓度的测定及二温式多重 PCR 扩增的温度、时间和循环次数等的优化, 最后确定二温式多重 PCR 中最佳引物的浓度分

别为 IBV 1 200 ng, ILTV 600 ng; 二温式多重 PCR 的最佳反应模式为 94℃ 5 min, 然后进入 94℃ 1 min, 60℃ 3 min, 共进行 35 个循环, 最后经 60℃ 延伸 10 min 后于 4℃ 结束反应

2.2 二温式多重 PCR 的特异性扩增结果

将 IBV 和 ILTV 核酸和其他对照菌 (毒) 株的核酸分别进行二温式多重 PCR 扩增, 结果全部含有 IBV、ILTV 的核酸样品均能扩增出与试验设计大小相符的 1720bp、647bp 二条明亮条带, 而对照菌 (毒) 株的核酸却扩增不出任何条带, 结果见图 1



图 1 IBV、ILTV 二温式 PCR 特异性扩增电泳图

Fig. 1 Specific banks of IBV, ILTV amplified by two-temperature PCR

1. λ DNA/EcoRI + HindIII; 2. IBV Mass 41; 3. ILTV 北京株; 4. Florida (IBV) + ILTV 台湾株; 5. MK (IBV) + ILTV 以色列株; 6. Ark (IBV) + ILTV 广西分离株; 7. Conn. (IBV) + ILTV 北京株; 8. ARV (S1133); 9. MGS6; 10. C48-1; 11. E. coli O2; 12. ND Lasota; 13. C79-13.

2.3 二温式多重 PCR 敏感性扩增结果

在引物浓度分别为 IBV 1 200 ng, ILTV 600 ng 时, 该二温式多重 PCR 反应最低能同时检测到 10 pg 的 IBV 和 ILTV 核酸模板, 结果见图 2



图 2 IBV、ILTV 二温式 PCR 敏感性扩增电泳图

Fig. 2 Sensitive banks of IBV, ILTV amplified by two-temperature PCR

1. λ DNA/EcoRI + HindIII; 2. 100 ng IBV, 100 ng ILTV; 3. 10 ng IBV, 10 ng ILTV; 4. 1 ng IBV, 1 ng ILTV; 5. 100 pg IBV, 100 pg ILTV; 6. 10 pg IBV, 10 pg ILTV; 7. 1 pg IBV, 1 pg ILTV; 8. 100 fg IBV, 100 fg ILTV; 9. 10 fg IBV, 10 fg ILTV; 10. 1 fg IBV, 1 fg ILTV; 11. 0.1 fg IBV, 0.1 fg ILTV; 12. 0.01 fg IBV, 0.01 fg ILTV.

3 讨论

1985 年 Saiki 等^[15]建立了 PCR 技术, 由于其具有快速、简便、敏感、特异等特点, 在短短的十几年中, PCR 就已在生命科学的各个领域得到广泛应用, 并由单一的 PCR 发展成为多种形式的 PCR。多重 PCR 能够在同一个反应体系中检测到两种以上病原; 二温式多重 PCR 将退火和延伸两个温度合并为一个温度。所以在操作上更简单省时, 用二温式多重 PCR 检测 IBV、ILTV, 能更好地提高检测速度, 为防治这两种疾病赢得了时间。

引物的设计及分析是本试验获得成功的关键。根据各自的基因序列而设计出来的两对不同引物, 应进行同源性分析, 既要扩增各自的基因片段引物间又不会形成二聚体。同时在设计引物时还应考虑各扩增片段的大小要有一定的差别, 这样有利于在凝胶电泳时区分各自的扩增条带, 相差太大或者很接近都不利于电泳凝胶分析。本试验所设计的两对引物, 能成功地扩增出两条大小分别为 1 720bp (IBV)、647bp (ILTV) 的片段, 其片段大小很容易在电泳凝胶上区分出来, 说明本试验所设计的两对引物用于二温式多重 PCR 是成功的。

在进行二温式多重 PCR 时, 选择合适的退火-延伸温度十分重要, 由于退火-延伸是在同一温度下完成, 因此, 在选择温度时, 应选用适合两者都能扩增的温度范围。同时, 也应根据扩增片段的大小来选择扩增条件, 由于在多重 PCR 反应中总是有利于片段较小的片段优先扩增的原则^[9], 本试验所扩增的 IBV 片段为 1 720bp, ILTV 为 647bp, 两者相差较大, 所以在选择适合两者都能扩增的温度范围时, 应优先选择扩增 IBV 的退火-延伸温度。从试验结果可以看出, 只要退火-延伸温度选择得当, 是可以获得均一明亮的 2 条扩增带。

在进行二温式多重 PCR 时, 为了使各扩增片段都能得到均一的扩增, 调整引物浓度也十分关键, 因为引物浓度直接影响到扩增效果。从本试验可以看出, 当 IBV 的引物浓度为 1 200 ng, ILTV 的引物浓度为 100 ng, IBV 扩增片段很清楚, ILTV 扩增片段不出现 (如图 3 中的 4); 当把 ILTV 的引物浓度调整为 300 ng, IBV 的引物浓度仍为 1 200 ng 时, IBV 扩增片段很明亮, 而 ILTV 扩增片段不明亮 (如图 3 中的 5); 当把 ILTV 引物浓度调整为 1 000 ng 时, IBV 引物浓度为 1 200 ng 时, ILTV 扩增片段很明亮, 而 IBV 扩增片段不明亮 (如图 3 中的 7); 当 IBV、ILTV 二种引物浓度相同时 (都为 600 ng), ILTV 扩增片段

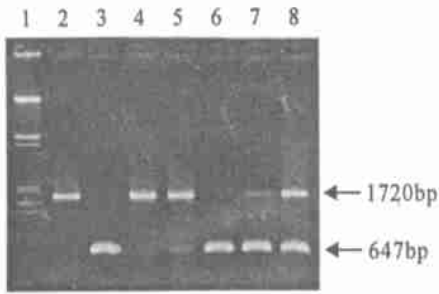


图 3 IBV、ILTV 不同引物浓度二温式 PCR 扩增电泳图

Fig. 3 Specific bands of IBV, ILTV amplified by two-temperature PCR at different concentration of primers

1. λ DNA/EcoRI + Hind III; 2. 1 200 ng IBV; 3. 600 ng ILTV; 4. 1 200 ng IBV+ 100 ng ILTV; 5. 1 200 ng IBV+ 300 ng ILTV; 6. 600 ng IBV+ 600 ng ILTV; 7. 1 200 ng IBV+ 1 000 ng ILTV; 8. 1 200 ng IBV+ 600 ng ILTV.

十分清楚, IBV 扩增片段不出现 (如图 3 中的 6); 只有当 IBV 引物浓度为 1 200 ng、ILTV 为 600 ng 时, 所扩增的片段都能同时扩增出来, 即获得均一的扩增条带 (如图 3 中的 8) 我们的实验结果表明, 扩增片段越长, 所需引物浓度越多, 扩增片段越短, 所需引物浓度相应就少。

本试验对 5 株不同血清型的 IBV 毒株, 4 株不同的 ILTV 毒株进行扩增检测, 结果均能扩增出 2 条明亮的 1 720 bp (IBV)、647 bp (ILTV) 条带, 而对对照的其它 6 株不同的禽病病原体的扩增结果都为阴性, 说明本试验所建立的二温式多重 PCR 是成功的, 具有良好的特异性。

本试验选用的最佳引物浓度及最佳反应条件来进行敏感性试验, 结果表明, 该二温式多重 PCR 最低能同时检测到 10 pg 的 IBV 和 ILTV 的核酸模板, 由此可以看出, 该二温式多重 PCR 仍不失为一种高灵敏度的检测方法, 可用于检测 IBV、ILTV 的临床样品。

IBV、ILTV 是危害养禽业发展的 2 种主要呼吸道传染病, 一直以来, 都是依靠常规的病原分离和血清学等方法来分离鉴定, 受到很多因素的影响, 如人为因素的影响等, 致使在判断时会出现假阳性或假阴性的结果, 导致出现错诊、误诊、漏诊的现象, 严重影响对这些疾病的有效防制。而该二温式多重 PCR 技术的建立, 可以大大地提高对这两种疾病的检测速度和准确性, 特别是对病毒早期感染的鸡群和隐性带毒的鸡群的检测, 有效地防止这些疾病的蔓延, 减少由这两种疾病造成的损失, 为进一步控制和消灭这 2 种呼吸道病具有十分重要的意义。

- Alexander D J. Diseases of poultry. Ames, Iowa Iowa State University Press, 1991, 461~ 481, 496~ 519.
- Jordan F T W. Poultry diseases. 3rd ed. Bailliere Tindall, London, 1990, 154~ 158.
- Curtis P E, Wallis A S. Infectious laryngotracheitis. Vet Rec, 1993, 112~ 486.
- Hansen W R, Brawn S E, Nashold S W, et al. Identification of duck plague virus by polymerase chain reaction. Avian Diseases, 1999, 43: 106~ 115.
- Jestin V, Jestin A. Detection of newcastle disease virus RNA in infected allantoic fluids by *in vitro* enzymatic amplification (PCR). Arch Virology, 1991, 118: 15~ 16.
- Kwon H M, Jackwood M W, Gelb Jr J. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. Avian Dis, 1993, 87: 37~ 202.
- 谢芝勋, Khan M I, Girshick T. 用 PCR 检测人工感染鸡体内鸡传染性贫血病毒的动态分布. 中国兽医科技, 1999, 29 (2): 5~ 7.
- 刘加波, 谢芝勋, 谢志勤等. 应用聚合酶链反应扩增鸡传染性喉气管炎病毒 TK 基因的研究. 中国兽医科技, 2000, 30 (4): 10~ 12.
- 谢芝勋, 庞耀珊, 邓显文等. 应用多重聚合酶链反应检测鸡毒霉形体和滑液霉形体的研究. 中国兽医科技, 1999, 29 (10): 9~ 11.
- 殷震, 刘景华. 动物病毒学. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1997.
- Xie Zhixun, Amin A F, Theodore G et al. Amplification of avian reovirus RNA using the reverse transcriptase~ polymerase chain reaction. Avian Diseases, 1997, 41: 654~ 660.
- Xie Zhixun, Fadel A A, Girshick T et al. Detection of avian adenovirus by polymerase chain reaction. Avian Diseases, 1999, 43: 98~ 105.
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 谢芝勋, 庞耀珊, 谢志勤等. 应用多重反转录~ 聚合酶链反应检测鸡新城疫病毒和传染性支气管炎病毒的研究. 中国预防兽医学报, 2000, 22 (2): 126~ 130.
- Saiki R K, Scharf S, Faloona F et al. Enzymatic amplification of beta-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, 1985, 230: 1350~ 1354.

(责任编辑: 邓大玉)