

# 鸡4种主要RNA病毒病多重感染复合PCR检测方法的建立

刘媛<sup>1</sup>,李学伍<sup>2</sup>,王丽<sup>2</sup>,谷雨<sup>3</sup>,王林建<sup>3</sup>

(1.河南科技大学 动物科技学院,河南 洛阳 471023; 2.河南省农业科学院 动物免疫学重点实验室,  
河南 郑州 450002; 3.河南农业大学 生物工程学院,河南 郑州 450002)

**摘要:**依据GenBank中注册的禽流感病毒(AIV)、鸡传染性支气管炎病毒(IBV)、新城疫病毒(NDV)和传染性法氏囊病毒(IBDV)基因组核苷酸序列,通过序列比对获得AIV、IBV、NDV、IBDV的相对保守序列。根据每种病毒的保守序列利用生物学软件分别设计3对特异性引物,4种病毒共设计12对引物,并对12对引物进行模拟筛选,获得匹配最佳的4对引物。对获得的最佳匹配引物进行单项PCR验证,优化复合PCR反应条件,确定最佳的退火温度、引物浓度和Taq DNA聚合酶使用量;经特异性、敏感性及简化PCR试验,最终建立了简易复合PCR检测方法。结果表明,建立的检测方法可同时扩增出4条大小与设计相符的特异性片段,即IBV(146 bp)、NDV(215 bp)、IBDV(345 bp)、AIV(435 bp);建立的复合PCR方法具有较强的敏感性和特异性,能检测出100 pg AIV、IBV、IBDV的cDNA和100 fg NDV的cDNA;将三温热循环改进为二温热循环,即将退火和延伸过程合为一步(62℃),大大缩短了反应时间。

**关键词:**禽流感病毒;鸡传染性支气管炎病毒;新城疫病毒;传染性法氏囊病毒;RNA病毒;复合PCR

**中图分类号:**S855.3   **文献标志码:**A   **文章编号:**1004-3268(2016)11-0105-05

## Establishment of Multiplex PCR Detection Method for Four Kinds of Avian Main RNA Viral Diseases

LIU Yuan<sup>1</sup>, LI Xuewu<sup>2</sup>, WANG Li<sup>2</sup>, GU Yu<sup>3</sup>, WANG Linjian<sup>3</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Henan Science and Technology University, Luoyang 471023, China;  
2. Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;  
3. College of Veterinary Medicine and Animal Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** Specific primers were designed upon gene conservative sequence in GenBank as well as the gene of avian influenza virus(AIV), avian infectious bronchitis virus(IBV), newcastle disease virus(NDV) and infectious bursal disease virus(IBDV) genomic nucleotide. Biological software were used to design 3 pairs of specific primers in the conserved sequence of each kind of virus, 12 pairs of primers were designed for 4 viruses, 12 pairs of primers was simulated screened, and 4 pairs of primers were appropriate. Optimal annealing temperature, concentration of primers and Taq DNA polymerase concentration were determined to optimized multiplex PCR reaction conditions. The specificity test, sensitivity test and simplified PCR test were used to establish the simple multiplex PCR detection method. The results showed that specific bands at lengths of IBV (146 bp), NDV (215 bp), IBDV (345 bp) and AIV (435 bp) respectively were amplified by the developed quadruple PCR, which were consistent with those expected. It indicated that high specificity and sensitivity of the developed method, which could detect 100 pg AIV, IBV, NDV IBDV cDNA and 100 fg NDV cDNA. According to the classical principle of PCR technology, the composite PCR

收稿日期:2016-05-20

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(201303033)

作者简介:刘媛(1991-),女,河南漯河人,在读硕士研究生,研究方向:分子病原学和免疫学。E-mail:862424624@qq.com

(three step thermal cycle step) was improved, which annealing and extension step were merged into one step, and the optimum temperature of annealing-extension was 62 °C, which could reduce the reaction time.

**Key words:** AIV; IBV; NDV; IBDV; RNA virus; multiplex PCR

禽流感 (avian influenza, AI)、鸡传染性支气管炎 (infectious bronchitis, IB)、新城疫 (Newcastle disease, ND) 和传染性法氏囊病 (infectious bursal disease, IBD) 是鸡常见的重要 RNA 病毒。其中, 禽流感病毒 (AIV) 为正黏病毒科甲型流感病毒属, 鸡传染性支气管炎病毒 (IBV) 为冠状病毒科冠状病毒属的代表种, 新城疫病毒 (NDV) 属副黏病毒科腮腺炎病毒属, 传染性法氏囊病病毒 (IBDV) 属双 RNA 病毒科、禽双 RNA 病毒属, 这 4 种病毒均为 RNA 病毒<sup>[1-4]</sup>。AI、IB、ND 和 IBD 具有流行广泛、传染性强、发病率和死亡率高、治愈率低、危害大等特点; 且临幊上常发生混合感染或继发感染, 给养鸡业造成了巨大的经济损失, 严重影响养鸡业的发展。这些疫病的发病特征、临床症状和剖检变化相似不易区分, 传统的病原分离鉴定和血清学方法无法进行快速检测和鉴别诊断, 严重影响对这些疫病的有效防治。因此, 建立一种特异、敏感、快速的检测方法, 对于鸡主要病毒性传染病的诊断和防控十分迫切和必要。

近年来, 利用普通 PCR、实时荧光定量 PCR、核酸探针、环介导等温扩增、固相基因芯片、液相芯片等技术检测病毒已有很多报道, 其中 PCR 技术已被广泛应用于多种疫病的检测诊断<sup>[5]</sup>, 但都是对单一病毒进行检测, 无法对多种病原混合感染进行快速鉴别诊断。复合 PCR 技术不仅具有普通 PCR 特异性强、敏感性高、快捷简便的优点, 而且可在一个反应体系中同时扩增多份 DNA 或 RNA 样本的不同目的基因片段, 由此可以检测鉴别多种不同的病原体, 特别适用于快速诊断多种混合感染的临床样本<sup>[6-8]</sup>。建立快速、准确、一次性检测 4 种病毒的检测方法, 对预防和控制上述疫病具有重要意义, 鉴于此, 本研究建立针对上述 4 种 RNA 病毒的简易复合 PCR 检测方法, 以达到在同一反应体系中同时扩增出对应病原体特异核酸片段的目的, 为鸡主要 RNA 病毒病原的快速准确检测奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 毒株

IBV (LDT3-A 株)、NDV (LaSota 株)、IBDV (B87 株) 为哈尔滨兽医研究所维科生物有限公司生产的活疫苗, AIV 尿囊液 (H9N2 株) 由河南省动

物免疫学重点实验室提供。

### 1.2 主要试剂

UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 反转录试剂盒、DEPC 处理水、Premix Taq (Ex Taq Version 2.0 plus dye) 购自大连宝生物工程有限公司。

### 1.3 引物的设计与合成

从 GenBank 中下载 AIV、IBV、NDV、IBDV 基因组核苷酸序列, 即 AIV 的 HA 基因 (GI:6537263, 序列长度为 1 064 bp)、IBV 的 N 基因 (GI:806017795, 序列长度为 1 230 bp)、NDV 的 L 基因 (GI:41323390, 序列长度为 6 615 bp)、IBDV 的 B 基因 (GI:114864536, 序列长度为 2 827 bp), 通过序列比对获得 AIV、IBV、NDV、IBDV 4 种病毒基因的相对保守序列<sup>[9-10]</sup>; 按照复合 PCR 对引物序列和退火温度等因素的要求, 根据病毒的保守序列应用 Primer Premier 6.0 生物学软件设计 3 对特异性引物, 4 种病毒共设计 12 对引物, 利用生物学软件模拟筛选出匹配最佳的引物, 即能同时扩增上述 4 种病原特定核酸片段的特异性引物<sup>[11]</sup>, 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

### 1.4 病毒核酸的提取

将 IBV、NDV、IBDV 冻干疫苗用 DEPC 处理水制成悬液, 根据 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒说明书对 AIV、IBV、NDV、IBDV 总 RNA 进行提取; 随即对总 RNA 进行反转录, cDNA 于 -20 °C 或 -70 °C 保存备用<sup>[12]</sup>; 测定 4 种 cDNA 的浓度及 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值, 并稀释 cDNA 至工作浓度。

### 1.5 单项 PCR 扩增

分别将提取的 IBV、NDV、IBDV、AIV 的 cDNA 与对应的匹配最佳的引物混合, 建立 50 μL 常规 PCR 反应体系: Premix Taq (Ex Taq Version 2.0 plus dye) 25 μL, 病毒特异性上、下游引物 (20 μmol/L) 各 1 μL, cDNA 1 μL, 高压双蒸水补足至 50 μL。PCR 反应程序为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 在不同退火温度下退火 30 s, 72 °C 延伸 40 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 结束反应。用 2% 琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 产物。

### 1.6 复合 PCR 反应条件优化

在单项 PCR 扩增反应体系和反应程序的基础上, 将 RNA 病毒 AIV、NDV、IBV 和 IBDV 的 cDNA

(各 1  $\mu$ L) 以及各种反应试剂混合在一起进行复合 PCR 反应条件的优化, 以确定最佳的 PCR 反应条件。条件的优化主要包括退火温度的优化、引物浓度的选择、*Taq* DNA 聚合酶使用量的优化<sup>[13]</sup>。经复合 PCR 扩增筛选出最佳的反应条件。

### 1.7 复合 PCR 敏感性试验

将提取的 AIV、NDV、IBV 和 IBDV 的 cDNA 进行核酸定量, 测定各病原核酸的浓度, 用 DEPC 水 10 倍梯度倍比稀释, 模板稀释倍数依次为  $10^1$ 、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 。取各稀释度的 cDNA 为模板, 采用最佳复合 PCR 反应优化条件进行扩增, 通过最低检出量来确定其敏感性。

### 1.8 复合 PCR 特异性试验

将 AIV、IBV、NDV、IBDV、传染性喉气管炎病毒 (ILT-V)、禽痘病毒 (FPV)、马立克氏病毒 (MDV) 7 种

病毒的 cDNA 依次加入和同时一起加入到优化好条件的复合 PCR 反应体系中进行扩增, 通过琼脂糖凝胶电泳分析, 检测其是否具有特异性<sup>[14]</sup>。

### 1.9 复合 PCR 简化试验

在经典 PCR 技术原理的基础上, 依据酶学原理对常规 PCR 三温循环进行改进。将上述 4 种病毒的退火及延伸的温度设置在同一温度, 确保在酶活性不是最高的条件下, 与模板退火结合的引物也可以短时间内充分延伸形成产物片段, 减少升降温过程, 从而缩短反应时间, 提高反应速度<sup>[15-16]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 引物筛选结果

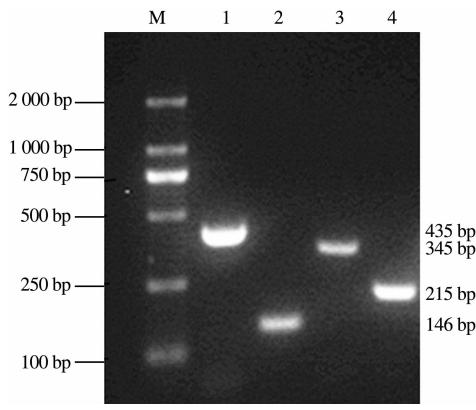
利用生物学软件对 12 对引物进行模拟筛选, 获得并合成匹配最佳的 4 对引物, 引物序列见表 1。

表 1 IBV、NDV、IBDV、AIV 复合 PCR 扩增匹配引物

引物名称	引物序列 (5'-3')	位置	产物长度/bp	引物 ID
IBV21	TGGCTCACCGTCGTTCTGCAA	665—810	146	KM658232
IBV22	TGCCGTAACACGCCCATCCTTA			
NDV21	AAGAAGAACATGCAGGTGTGCCCCG	1 216—1 430	215	AY505072
NDV22	TTGGGGTGTGCGATTGCCTTGT			
AIV31	GCATAAATCACCCACCCACCGATA	554—988	435	AF186267
AIV32	CAGGCACATTCTCAGACCAACT			
IBDV51	GTTGAGGTTGGTAGGTGGTTGGA	1 986—2 330	345	DQ906922.1
IBDV52	GCTGTGGCTAGAAGGACGAGAC			

### 2.2 单项 PCR 扩增结果

由图 1 可见, 各病毒均扩增出与试验设计相符的特异性条带, 分别是: IBV 146 bp、NDV 215 bp、IBDV 345 bp、AIV 435 bp。可见, 设计引物在单项 PCR 扩增试验中均可获得特异扩增片段, 实现了单独检出其对应病毒的目的, 且效果良好。



M: DNA Marker; 1—4: 分别为 AIV、IBV、IBDV、NDV

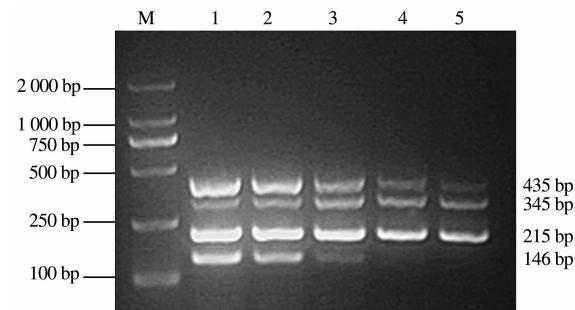
图 1 IBV、NDV、IBDV、AIV 单项 PCR 扩增结果

### 2.3 复合 PCR 反应条件的优化结果

在单项 PCR 扩增反应体系和反应程序的基础上, 通过对复合 PCR 反应条件中退火温度、引物浓度和 *Taq* DNA 聚合酶浓度的优化, 确定复合 PCR 的

最佳反应条件。

2.3.1 退火温度 在单项 PCR 基础上, 利用 4 对引物在同一反应体系中同时扩增 4 种病毒的混合模板, 建立复合 PCR 方法。根据设计引物的 Tm 值, 确定复合 PCR 体系的退火温度范围, 设置温度梯度进行体系退火温度的优化, 试验温度分别为 55、56、58、60、62 °C。结果显示, 退火温度在 55、56 °C 时均呈现良好扩增结果(图 2)。为确保 PCR 反应的特异性, 选择 56 °C 为最佳退火温度。

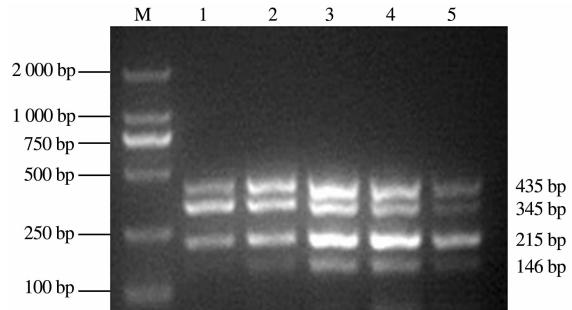


M: DNA Marker; 1—5: 退火温度分别为 55、56、58、60、62 °C

图 2 IBV、NDV、IBDV、AIV 复合 PCR 退火温度优化结果

2.3.2 引物浓度 选择不同的引物浓度进行复合 PCR 扩增, 同时提高 IBDV 的引物浓度; 则复合 PCR 反应体系为: Premix *Taq* (Ex *Taq* Version 2.0 plus

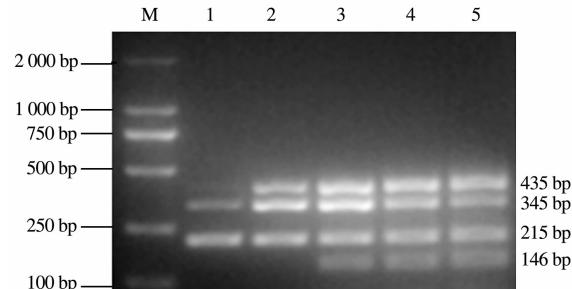
dye)25 μL,cDNA 各 1 μL, 上、下游引物各 1 μL, 灭菌双蒸水补足至 50 μL; AIV、IBV、NDV 上下游引物浓度分别均设为 25、50、100、150、200 μmol/L, IBDV 上下游引物浓度分别为 50、75、125、175、225 μmol/L。结果显示,AIV、IBV、NDV 引物浓度在 100 μmol/L, IBDV 引物浓度在 125 μmol/L 时的条带最亮(图 3)。因此,选用 AIV、IBV、NDV 引物浓度 100 μmol/L, IBDV 引物浓度 125 μmol/L 为最佳引物浓度。



M: DNA Marker; 1—5: IBV、NDV、AIV 引物浓度  
分别为 25、50、100、150、200 μmol/L, 同时 IBDV 引物  
浓度分别为 50、75、125、175、225 μmol/L

图 3 IBV、NDV、IBDV、AIV 复合 PCR 引物浓度优化结果

**2.3.3 Taq DNA 聚合酶使用量** 以优化完成的退火温度、引物浓度为基础,在建立的复合 PCR 50 μL 反应体系中,将 Premix Taq (0.05 U/μL) 使用量分别设定为 15、20、25、30、35 μL 进行 PCR 扩增。结果显示,Premix Taq 使用量为 25 μL 时效果最佳(图 4)。

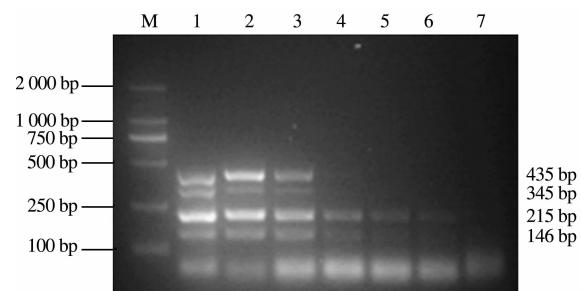


M: DNA Marker; 1—5: Premix Taq (0.05 U/μL)  
用量分别为 15、20、25、30、35 μL

图 4 IBV、NDV、IBDV、AIV 复合 PCR  
Taq DNA 聚合酶使用量优化结果

## 2.4 复合 PCR 的敏感性检测

将 10 倍递进稀释后的 AIV、IBV、NDV、IBDV 的 cDNA 作为模板,模板质量浓度分别为 10 ng/μL、1 ng/μL、100 pg/μL、10 pg/μL、1 pg/μL、100 fg/μL、10 pg/μL。采用最佳的退火温度、引物浓度和 Premix Taq 使用量等复合 PCR 反应条件,进行复合 PCR 扩增以检测其敏感性。敏感性试验结果显示:该复合 PCR 至少能同时扩增到 100 pg AIV、IBV、IBDV 和 100 fg NDV 的 cDNA(图 5)。



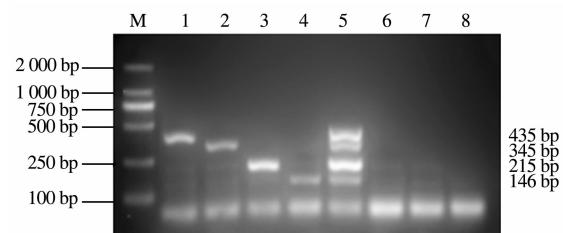
M: DNA Marker; 1—7: 模板质量浓度分别为: 10 ng,

1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg

图 5 IBV、NDV、IBDV、AIV 复合 PCR 敏感性试验结果

## 2.5 复合 PCR 的特异性检测

以 AIV、IBV、NDV、IBDV、ILTV、FPV、MDV 的核酸为模板,应用建立的复合 PCR 方法进行扩增,检测该复合 PCR 的特异性。结果显示,单独扩增 IBV、NDV、IBDV 和 AIV 的核酸全部出现与预期相符的目的片段,而单独扩增 ILTV、FPV、MDV 的核酸均没有扩增出任何条带,与此同时混合 7 种病毒核酸的复合 PCR 体系只扩增出与设计相符的 AIV、IBV、NDV、IBDV 核酸的特异性扩增条带(图 6)。



M: DNA Marker; 1—4: 分别为 AIV、IBDV、NDV、IBV;

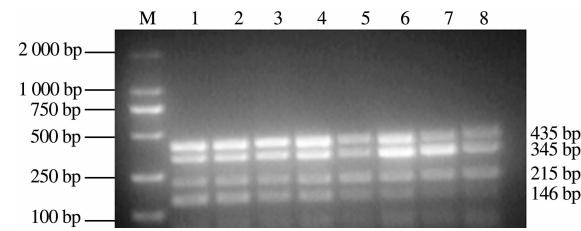
5: IBV + NDV + AIV + IBDV + MDV + FPV + ILTV;

6—8: 分别为 MDV、FPV、ILTV

图 6 IBV、NDV、IBDV、AIV 复合 PCR 特异性试验结果

## 2.6 复合 PCR 的简化结果

对建立的复合 PCR 进行简化改进,即将退火—延伸合并为一个温度,探索退火—延伸的最佳温度,试验温度分别设为 56、58、60、62、64、66、68、70 °C。扩增程序为:95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 退火—延伸 (56、58、60、62、64、66、68、70 °C) 40 s, 30 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 结束反应。结果显示,退火—延伸温度在 62 °C 时最佳(图 7)。



M: DNA Marker; 1—8: 退火—延伸温度分别为

56、58、60、62、64、66、68、70 °C

图 7 简化复合 PCR 退火—延伸温度结果

### 3 结论与讨论

一种高效复合 PCR 检测方法的建立,涉及多种因素,如特异性引物、退火温度、引物浓度和 *Taq* DNA 聚合酶使用量等。最关键的因素是引物设计,与常规 PCR 引物设计相比,其对引物的要求更高<sup>[17]</sup>,引物不仅要具有特异性、敏感性、无二聚体,而且要确保引物对之间有相近的退火温度;同时兼顾复合 PCR 扩增片段的大小,确保各病毒模板的扩增片段在电泳图谱上能够更直观方便地区分。引物浓度和 *Taq* DNA 聚合酶使用量同样有至关重要的作用,对复合 PCR 体系进行优化,可使建立的复合 PCR 体系对所检测的病毒更具敏感性。特异性和敏感性是复合 PCR 方法成功建立的标志,由于复合 PCR 反应体系中多对引物会竞争结合扩增,存在引物之间产生干扰的可能性,引物对越多,干扰的可能性就越大,引物设计严谨才可避免或降低这种干扰。本研究从设计的 12 对引物中筛选出匹配最佳的 4 对特异性引物,其 Tm 值范围相近,目的片段大小存在明显差异(146、215、345、435 bp),为复合 PCR 扩增条件的优化奠定了基础;建立的复合 PCR 方法特异性强、敏感性高,AIV、IBV、IBDV 检出限为 100 pg, NDV 为 100 fg。

常规 PCR 的扩增,包括模板 DNA 的变性、模板 DNA 与引物的退火、引物的延伸。其中 *Taq* DNA 聚合酶活性最适温度为 70~75 ℃,在此温度下延伸速度为 150~300 bp/s,60~70 ℃ 时为 60~120 bp/s。若试验扩增的目的片段较短(100~500 bp),反应混合物在变性温度(94 ℃)和退火温度(50 ℃)之间过渡时,已达到了 *Taq* DNA 聚合酶的最适温度,可以在短时间内充分延伸形成所需产物片段<sup>[18]</sup>。因此,本试验根据常规 PCR 技术原理,对已完成的复合 PCR(三步法热循环步骤)进行改进,将退火和延伸合并为一步,缩短了 PCR 的反应时间,且试验探索的退火—延伸最佳温度为 62 ℃,比三温复合 PCR 的退火温度(56 ℃)高,所得产物的特异性高,各引物与模板的结合更为准确和稳定,扩增条带更清晰。不仅提高了对 AIV、IBV、NDV 和 IBDV 的诊断速度,为有效控制疫病争取了宝贵的时间,而且为鸡主要 RNA 病毒性疫病病原的快速准确检测奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] 李潭清. 鸡传染性法氏囊病的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(35):15481-15484.
- [2] 刘惠莉, 陆承平, 朱伟云. 鸡传染性支气管炎病毒的 RNA 干扰[J]. 中国病毒学, 2005, 20(3):272-276.
- [3] 谭伟, 徐倩, 谢芝勋. 禽流感病毒研究概述[J]. 基因组学与应用生物学, 2014, 33(1):194-199.
- [4] 程相朝, 张春杰, 李慧琴, 等. 新城疫病毒的分子生物学诊断技术[J]. 河南农业科学, 2004(9):76-79.
- [5] 樊振华, 王娟萍, 孟帆, 等. 猪细小病毒和猪圆环病毒 2 型多重 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 山西农业科学, 2012, 40(10):1102-1106.
- [6] 金宇良. PCR 技术的研究进展[J]. 现代农业科技, 2012(10):47-49.
- [7] 黄溢泓, 韦正吉, 李志源. 多重 PCR 技术在动物病原检测中的应用[J]. 广西农业科学, 2009, 40(4):423-427.
- [8] 庞耀珊, 谢芝勋. 二温式多重 PCR 同时检测鸡的 6 种呼吸道病原方法的建立[J]. 中国兽医科技, 2001, 31(5):4-7.
- [9] 邵西群, 邵群, 闫喜军. 大数量序列的 PCR 保守引物设计实践[J]. 生物信息学, 2007, 8(4):171-175.
- [10] 尤超, 赵大球, 梁乘榜. PCR 引物设计方法综述[J]. 现代农业科技, 2011(17):48-52.
- [11] 赵绪永, 宁豫昌, 赵丽, 等. 多重实时定量 PCR 快速检测 PRRSV、CSFV 和 PCV2 混合感染方法的建立[J]. 河南农业科学, 2013, 42(2):123-127.
- [12] 黄溢泓, 韦正吉, 李志源. 五种禽呼吸道病原多重 PCR 检测方法的建立和应用[J]. 中国兽医科学, 2010, 40(2):164-168.
- [13] Xu X G, Chen G D, Huang Y, et al. Development of multiplex PCR for simultaneous detection of six swine DNA and RNA viruses [J]. Journal of Virological Methods, 2012, 183(1):69-74.
- [14] Guang H F, Liu M D. Establishment of a multiplex RT-PCR assay to detect different lineages of swine H1 and H3 influenza A viruses [J]. Virus Genes, 2010, 41(2):236-240.
- [15] 路斌, 王一成, 吴润. 猪主要 RNA 病毒病多重二温式 RT-PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 华北农学报, 2010, 25(6):38-43.
- [16] Sun D B, Wu R, He X J, et al. Development of a multiplex PCR for diagnosis of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* from cows with endometritis [J]. Agricultural Sciences in China, 2011, 10 (10): 1624-1629.
- [17] Zhi XS, Xie L J. Simultaneous typing of nine avian respiratory pathogens using a novel GeXP analyzer-based multiplex PCR assay [J]. Journal of Virological Methods, 2014, 207(3):188-195.
- [18] V Balamurugan A S, Saravanan P. One-step multiplex RT-PCR assay for the detection of peste des petits ruminants virus in clinical samples [J]. Veterinary Research Communications, 2006, 30(6):655-666.