

应用 PCR 方法检测鸡传染性贫血病毒

杨 兵, 徐福洲, 王金洛, 陈小玲, 孟彦妮

(北京市农林科学院畜牧兽医研究所, 北京 100089)

摘要:根据鸡传染性贫血病毒(CIAV)基因组序列,设计一对引物扩增基因组上 nt358~nt1042 之间 684 bp DNA 片段。在 CIAV 感染 MDCC-MSB1 细胞系中提取核酸为模板可扩增出相应 DNA 片段,且以感染细胞核酸为模板反应敏感性可达 1 fg,而以其他病原核酸为模板扩增结果均为阴性。应用该 PCR 方法对实验感染鸡肝脏、脾脏、胸腺、肾脏、法氏囊、骨髓、白细胞、泄殖腔棉拭子等不同样品进行检测,均可扩增出相应 DNA 片段。证明我们建立的 PCR 方法敏感性特异性强,可用于临床感染不同组织 CIAV 的检测。

关键词:鸡;传染性贫血病;病毒;聚合酶链式反应

中图分类号:S858.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2003)03-0090-03

Detecting Chicken Infectious Anemia Virus with Polymerase Chain Reaction

YANG Bing, XU Fu-zhou, WANG Jin-luo, CHEN Xiao-ling, MENG Yan-ni

(Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Beijing

Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100089, China)

Abstract:A polymerase chain reaction (PCR) was constructed to detect chicken infectious anemia virus (CIAV). The assay used a pair of primers to amplify a 684 bp fragment of CIAV genome which located in the position 358 to 1 042. The amplified fragment was observed to detect infected cell culture and the sensitivity of the assay can be up to 1 fg. The result of amplification with NDV, MDV, IBDV, IBV, EDSV and E. Coli were negative. It showed that the assay was specific and highly sensitive. The positive fragments were also achieved in infected chicken tissues such as liver, spleen, thymus, bursa, kidney, white blood cell and rectal sub.

Key words:Chicken; Chicken infectious anemia; Virus; PCR

鸡传染性贫血病毒(Chicken infectious anemia virus, CIAV)为日本学者 Yuasa 等于 1979 年首次分离获得,该病毒在世界范围内广泛分布,以雏鸡再生障碍性贫血和免疫抑制为主要特征,严重影响雏鸡生长发育和免疫反应。因该病毒常见病原如 NDV、MDV、IBDV 等混合感染,临床诊断中较难鉴别,因而对养鸡业危害更大。本研究期望建立 CIAV PCR 方法用于检测感染鸡不同组织样品,以便临床上更加准确快速检测 CIAV,对防治该病将具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 病毒

CIAV 病毒 Cux-1 标准株,SR43 分离株分别于 MDCC-MSB1 细胞上增殖后备用。

1.2 SPF 试验鸡

1 日龄 SPF 雏鸡饲养于隔离器内,顶部皮下接种 CIAV 病毒 Cux-1 标准株,至 16 日龄出现典型症状时剖杀,分别取胸腺、骨髓、脾脏、肝脏、法氏囊、肾脏、血凝白细胞和粪便供检测用。

收稿日期:2002-12-27

基金项目:北京市科委合同项目(954414900)

作者简介:杨 兵(1969-),女,湖北武汉人,助理研究员,主要从事兽医分子生物学方面研究。

1.3 PCR 反应试剂

1.3.1 引物 根据发表的 CIAV 基因组序列设计一对引物,上下游引物分别位于基因组 358 bp 和 1 042 bp 处,引物序列分别为:

F 5'-ATACTCGAGGCGGTCCGGGTGGATGC-3'

R 5'-GGTGGCGCCGCTCACACTATACGT-3'

由上海生工生物工程公司合成,扩增片段大小为 684 bp。

1.3.2 Taq DNA 聚合酶 利用产 Taq 酶的大肠杆菌菌株,由本室自行培养和提纯 Taq 酶,酶活性与国产商品化 Taq 酶相当。

1.3.3 PCR 反应缓冲液 配方为:100 mmol/L Tris-Cl(pH 9.0),500 mmol/L KCl,15 mol/L Mg-Cl₂,1% TritonX-100。

1.3.4 dNTP 其中包括 dATP,dCTP,dGTP,其浓度为 10 mmol/L,为国产商品化试剂。

1.4 模板 DNA 提取

感染鸡不同组织分别取少量分别研磨后用适量 PBS 稀释,反复冻融 3 次,5 000 r/min 离心 5 min,取上清液加入蛋白酶 K(100 μg/mL),SDS(1%),56 ℃ 消化 2 h,等体积的苯酚,苯酚:氯仿:异戊醇(质量比 25:24:1)溶液及氯仿分别抽提 1 次,两倍体积预冷的无水乙醇沉淀后溶于少量 TE(pH8.0)中。CIAV 感染细胞经反复 3 次冻融后按同样方法提取细胞毒 DNA。

1.5 PCR 反应条件及程序

PCR 反应管中加入 10 倍 PCR 反应缓冲液 5 μL,dNTP 2 μL(0.4 mmol/L),上下游引物分别为 2 μL(10 nmol/L),Taq 酶 1 μL,模板 DNA 1 μL,加双蒸水补足至 50 μL,混匀后上覆 2 滴液体石蜡油,置 PCR 仪上反应。具体程序为:经 94 ℃、5 min 变性后,进行 94 ℃、1 min→55 ℃、1 min→72 ℃、2 min 共 30 个循环,最后经 72 ℃、5 min 延伸后结束。

1.6 特异性

分别以含扩增片段的重组质粒、Cux-1 株细胞毒、SR43 株细胞毒、MDCC-MSB1 细胞,及其他病原 NDV、MDV、IBDV、IBV、EDSV 和大肠杆菌核酸为模板进行 PCR 反应,检测扩增片段的特异性。

1.7 敏感性

将 Cux-1 标准株感染细胞抽提的核酸用 TE 缓冲液进行 10 倍系列稀释,不同稀释度核酸样品分别作为模板进行 PCR 反应,以能扩增出特异性条带的最高稀释度判定敏感性。

1.8 实验感染鸡不同组织的检测

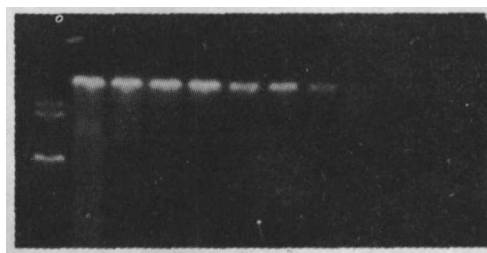
取 CIAV 实验感染鸡不同组织样品,如肝脏、脾脏、胸腺、法氏囊、骨髓、肾脏、白细胞和泄殖腔棉拭子等,分别提取模板 DNA,进行 PCR 检测。

2 结果与分析

2.1 PCR 反应的敏感性

CIAV Cux-1 标准株感染细胞毒后抽提核酸,将初浓度稀释为 1 ng/μL,经 10 倍系列稀释至 0.01 fg/μL。结果见图 1。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



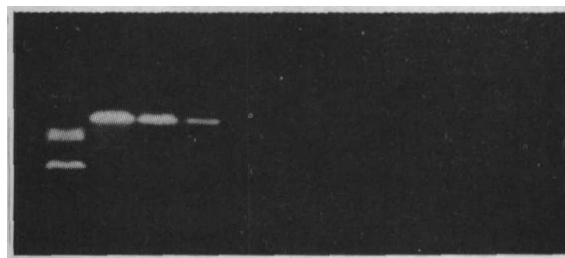
1.DNA Marker(PBR322/BstN I);2.1 ng/μL;3.100 pg/μL;
4.10 pg/μL;5.1 pg/μL;6.100 fg/μL;7.10 fg/μL;
8.1 fg/μL;9.0.1 fg/μL;10.0.01 fg/μL

图 1 PCR 反应敏感性

2.2 PCR 反应的特异性

PCR 结果显示,含扩增片段的重组质粒,Cux-1 标准株及 SR43 分离株感染细胞毒核酸均能扩增出明显的特异性条带,而 MDCC-MSB1 细胞核酸及其他禽常见病原 NDV,MDV,IBDV,IBV,EDSV 和 E.coli 核酸扩增结果均为阴性。说明该 PCR 方法特异性较强,结果见图 2。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



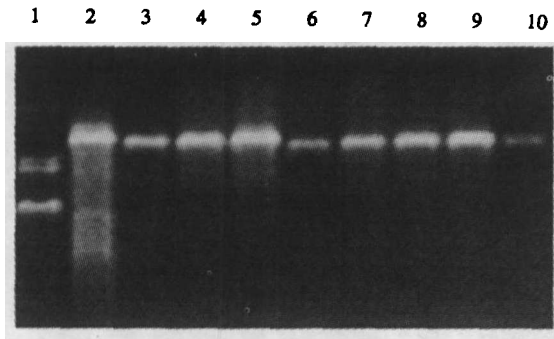
1.DNA Marker(PBR322/BstN I);2.pBluescript
ORF2;3.CIAV CUX-1;4.CIAV SR43;
5.MDCC-MSB1;6.NDV;7.MDV;8.IBDV;
9.IBV;10.EDSV;11.E.coli

图 2 PCR 反应特异性

2.3 实验感染鸡不同组织样品检测

PCR 检测结果显示,以肝脏、脾脏、胸腺、骨髓、

法氏囊、肾脏、白细胞和泄殖腔棉拭子等各组织样品为模板均能扩增出特异性条带,扩增条带的亮度强弱可反映不同组织含量的高低。结果见图3。



1. DNAMarker(PBR322/BstN I); 2. pBluescriptORF2;
3. 肝脏; 4. 脾脏; 5. 胸腺; 6. 骨髓; 7. 法氏囊;
8. 肾脏; 9. 白细胞; 10. 泄殖腔棉拭子(粪便)

图3 扩增条带亮度与不同组织含量

3 讨论

目前的诊断病毒的方法主要有病毒的分离培养、血清学方法和分子生物学方法。鉴于病毒分离培养费时费力,血清学方法常用于检测抗体,因而研究者更倾向于应用省时省力、准确性和敏感性均较高而且能直接检测抗原的分子生物学方法。核酸杂交和PCR方法在CIAV诊断中报道较多,与核酸杂交相比,PCR方法更加省时省力,而且敏感性提高10~100倍,因而在CIAV诊断中得到广泛的应用。本研究参考国内外文献,建立了特异性和敏感性均较高的CIAV PCR检测方法,我们希望以后在此方法基础上进一步优化,制备CIAV快速诊断试剂盒,这对CIAV的诊断将具有重要意义。

在此PCR方法中,我们选用CIAV核衣壳蛋白VP1基因作为扩增的目的片段,因该基因为CIAV主要结构蛋白基因,在CIAV不同毒株间序列相对保守,因而扩增该片段有助于检测CIAV不同毒株,

同时我们也可利用扩增的基因进行结构分析和蛋白表达,对CIAV防治也具有意义。

本试验中PCR反应的敏感性可达1 fg/ μ L,大约相当于100个CIAV基因组拷贝,这在所有可见报道的CIAV PCR方法中也是较高的,因而不但可用于检测CIAV感染MDCC-MSB1的细胞培养物,而且可用于检测感染鸡组织样品。在该PCR方法特异性试验中,我们选用鸡常见病原,既有DNA病毒,又有RNA病毒,还有细菌,反应结果均为阴性,证明该方法特异性较强,完全可用于野外混合感染组织样品的检测。

参考文献:

- [1] Calnek B W, Barnes H J, Beand C W, *et al.* Diseases of Poultry (Tenth Edition)[M]. Iowa: Iowa State University Press Ames, 1997. 736-756.
- [2] Noteborn U H M, Verschuuren C A J, Roozelaar D J V, *et al.* Detection of chicken anemia virus by - DNA hybridization and polymerase chain reaction[J]. Avian Pathol, 1992, 21: 107-118.
- [3] Kok Mun Tham, Wlodek L, Stanislawek. Polymerase chain Reaction Amplifications for Direct Detection of chicken Anemia virus DNA in Tissues and Sera[J]. Avian Disease, 1992, 36: 1000-1006.
- [4] Tham K M, Stanislawek W L. Detection of chicken anemia agent DNA sequences by the polymerase chain reaction [J]. Arch Virol, 1992, 127: 245-255.
- [5] Todd D, Mawhinney K A, McNulty M S. Detection and differentiation of chicken, Anemia virus Isolates by using the polymerase chain reaction [J]. Clinical MicroBio, 1992, 30(7): 1661-1666.
- [6] 刘岳龙, 崔治中, 段玉发. PCR和斑点杂交检测鸡传染性贫血病毒[J]. 中国兽医学报, 1996, 16(1): 38-41.