

鸡大肝大脾病毒 RT-PCR 检测方法的建立及其检测 *

马玉玲, 杨德吉 **, 陆承平

(南京农业大学 农业部动物疫病与免疫重点实验室, 江苏南京 210095)

Establishment of a RT-PCR Assay for the BLSV Gene

and the Molecular Detection of BLS

MA Yu-ling, YANG De-ji **, LU Cheng-ping

(key laboratory of Animal Disease Diagnostic and Immunology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Based on the reported Big liver and spleen disease virus (BLSV) gene sequence, a pair of primers was designed and a 375bp product was amplified from the total RNA extracted from homogenates of BLSV-infected livers. Twenty liver samples were randomly collected from two commercial broiler breeder flocks in Nanjing. One of ten liver samples was positive reaction in RT-PCR in one flock but not in another. The RT-PCR detection for cDNA from BLSV was specific with the sensitivity of $4.16 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Phylogentic tree analysis suggested that the 338bp sequence of the isolated strain (BLSV-NJ2002) shared 97.3% and 83.6% nt hemologue identities with that of Australia strain and avian HEV respectively.

Key words: Big liver and spleen disease virus (BLSV); Retrotranscription polymerase chain reaction; Detection

关键词: 鸡大肝大脾病毒 (BLSV); 逆转录多聚酶链式反应 (RT-PCR); 检测

中图分类号: S 831.7 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125 (2005) 02-0197-03

鸡大肝大脾病 (Big liver and spleen disease, BLS) 是发生于商品代肉用产蛋母鸡的一种传染性疾病, 1980 年最先在澳大利亚发现, 1988 年 Handlinger^[1] 等对该病进行了描述。感染鸡直到性成熟后才出现临床症状, 仅表现为精神沉郁、产蛋下降或达不到产蛋高峰。死亡率为 1%。剖检患鸡或死亡鸡见肝脏、脾脏肿大, 呈现腹膜炎和肠炎。BLS 以其对产蛋和鸡肉品质的影响在澳大利亚造成了重大的经济损失。血清学调查表明在英国、美国和新西兰也有一些鸡群感染过 BLS。单松华等^[2-4] 通过血清学调查证实我国部分地区已存在 BLS。

本实验根据已报道的 BLSV 基因序列^[5] 自行设计和合成了一对可扩增长度为 375bp 目的片段的引物, 建立了检测 BLSV 基因的 RT-PCR 方法, 并对南京两个鸡场发病鸡群进行 BLSV 的检测。

1 材料和方法

1.1 病料采集

2002 年 12 月采集自南京六合和迈皋桥种鸡场的 AA 商品代种母鸡。患鸡表现精神沉郁、产蛋下降, 死亡率为 1%, 发病后用抗生素治疗无效。在发病鸡群中随机抽取 10 只, 无菌取肝、脾组织, 加 PBS (pH 7.4) 研磨成 20% 的匀浆。20 周龄 SPF 鸡肝、脾组织样品作为阴性对照。

1.2 引物设计

根据澳大利亚 Payne CJ 等^[5] 报道的 BLSV 基因, 用 Primer5 软件设计一对引物, 其序列为:

上游引物 (P1): 5'-GCTTGATT TACAACCCACC-3'

下游引物 (P2): 5'-GGCA TCA GTAACCCCAA T-3'

1.3 RNA 的提取

收稿日期: 2004-07-22, 修回日期: 2004-11-16

* 基金项目: 江苏省自然科学基金资助 (BK2001065); 国家自然科学基金资助 (39940018)

作者简介: 马玉玲 (1977-), 女, 新疆省籍, 硕士, 研究方向为兽医微生物与免疫学。

** 通讯作者: 杨德吉 (1963-), 男, 江苏省籍, 副教授。Tel: 025-84395505; E-mail: djyang@njau.edu.cn

采用 RNA 一步分离法,使用 Trizol 试剂(GIBCO/BRL 公司产品)提取总 RNA。

1.4 cDNA 第一链的合成

引物由上海生物工程技术服务有限公司合成,用 ddH₂O 稀释,-20℃ 冻存备用。

根据 RT-PCR Kit(GIBCO BRL)说明,用下游引物(P2)合成 cDNA 第一链。在 20.0μL 反应体系加入总 RNA,5.2μL;下游引物(P2),0.5μL。将上述成分轻弹混匀,并与离心机上慢速离心 5s,而后 70℃,5min,冰浴后加入下列成分:M-MLV RT 5× Buffer,4.0μL;2.5mmol/L dNTP Mix,8.0μL;25mmol/L MgCl₂,0.8μL;Rnase hibitor,0.5μL。将上述成分混匀,并于离心机上慢速离心 5s,42℃,2min。然后加入 M-MLV 逆转录酶 1.0μL,42℃,60min。用做 PCR 扩增模板,备用。

1.5 PCR 反应

在 PCR 反应管中加入下列成分,做 50.0μL 反应体系。10×PCR Buffer,5.0μL;2.5mmol/L dNTPs,1.0μL;25mmol/L MgCl₂,2.0μL;Taq 酶(5U/μL),1.0μL;cDNA,5.0μL;上游引物(20pmol),2.0μL;下游引物(20pmol),2.0μL;5%DMSO,5.0μL;ddH₂O,27.0μL。将上述成分混匀,并在上面加 50.0μL 矿物油,于离心机上慢速离心 5sec。PCR 反应循环条件:95℃,5.0min,预变性;95℃,30sec;37℃,1.0min;60℃,1.0min,共 5 个循环,接着再进行 95℃,30sec;55℃,1.0min;72℃,1.0min,共 30 个循环。72℃,10.0min,退火延伸。反应结束后于 4℃ 保存。

1.6 RT-PCR 产物的鉴定、回收与纯化

将 RT-PCR 产物在 0.9% 的琼脂糖上进行电泳,电泳后在紫外透射仪上进行鉴定。回收目的片段,并使用 QIA quick Gel Extraction 试剂盒(Takara 公司产品)进行目的片段的纯化、回收。

1.7 灵敏度试验

将含量为 4.16μg/μL 的 cDNA 用 TE 缓冲液进行 10⁻¹至 10⁻⁶稀释后再进行 PCR 扩增、鉴定。

1.8 RT-PCR 产物的 TA 克隆

将扩增的 BLSV 的基因与 pMD18-T 载体连接,用 CaCl₂ 法转化大肠杆菌 DH5 感受态细菌,并在含有 Amp、IPTG 和 X-Gal 的 LB 平板上挑选含 BLSV 基因的阳性菌落。

1.9 阳性 TA 克隆菌株的序列测定

挑选经过鉴定为阳性克隆的菌株,对所克隆的 BLSV 基因分别进行序列分析。样品送交大连宝生生物工程公司进行测定。

1.10 BLSV 基因序列的同源性比较

使用 DNASTAR 软件对分离株 BLSV-NJ2002 大小为 338bp 的部分基因序列与澳大利亚所报道的 BLSV 序列、GenBank 中禽戊型肝炎病毒(Avian hepatitis E virus,AHEV)序列进行同源性比较,并且对它们的进化树进行了绘制和分析。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增

用上、下游引物对南京两鸡场采集的病料及 SPF 鸡肝、脾组织进行 RT-PCR 扩增,其中六合鸡场有 1 例在 375bp 出现特异性片段,将该病毒分离株定名为 BLSV-NJ2002;迈皋桥鸡场的 10 例均未出现特异性片段。SPF 鸡未出现特异性片段。

2.2 PCR 检测的灵敏性

将 BLSV cDNA 稀释后进行 RT-PCR 反应,结果发现 10⁻¹~10⁻³倍稀释后可见 375bp 的特异性片段;而 10⁻⁴~10⁻⁶倍稀释后则无特异性片段(图 1)。

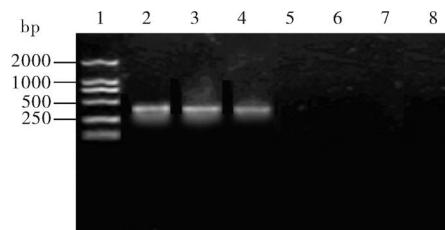


图 1 不同浓度的模板扩增结果

Fig. 1 The PCR amplification with different concentration model

1, DNA Marker; 2-7, The PCR amplification with different concentration model: 4.16×10⁻¹μg/μL, 4.16×10⁻²μg/μL, 4.16×10⁻³μg/μL, 4.16×10⁻⁴μg/μL, 4.16×10⁻⁵μg/μL, 4.16×10⁻⁶μg/μL; 8, Negative control.

2.3 序列测定

采用末端终止法利用正负链进行双向 DNA 序列测定,338bp 序列分析表明分离株 BLSV-NJ2002 与澳大利亚报道的 BLSV 同源性为 97.3%,与 GenBank 中禽 HEV 序列的同源性为 83.6%。该序列已被 GenBank 收录,登录号为 AY818322。

2.4 BLSV 核苷酸序列进化树的绘制

使用 DNASTAR 软件,将分离株 BLSV-NJ2002 大小为 338bp 的基因片段与澳大利亚报道的及 GenBank 中禽 HEV 和 HEV 的核苷酸序列比较,绘制 BLSV 核苷酸序列进化树(图 2)。

3 讨论

BLS 以其对产蛋和鸡肉品质的影响在澳大利

亚造成经济损失,并由该国的研究人员首先报道。血清学调查表明,在英国、美国和新西兰也有一些鸡群感染此病毒^[1]。单松华等^[2,3]通过血清学调查证实我国部分地区已存在 BLS。但是 BLS 的血清学检出率灵敏度较低,虽然可以通过静脉接种鸡胚来提高灵敏度^[6],但所要求的技术难度较大,所以通过基因的检测更具有实用价值。本实验采用的方法,可以直接从肝脏组织中进行检测,能显著缩短检测时间,有利于疾病发生时的快速检测和流行病学调查,适合实验室大量诊断。

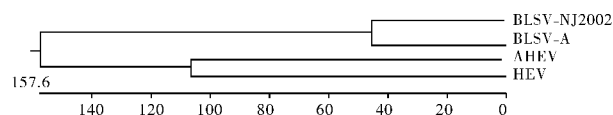


图2 BLSV 在大小为 338bp 基因区域核苷酸序列的进化树

Fig. 2 The phylogenetic tree of the 338bp sequence of BLSV

对南京地区两个鸡场发病鸡群进行 BLSV 的检测调查,在某鸡场检出 BLS 阳性病例,从而在分子水平上首次证实南京 BLS 阳性鸡群的存在,有利于今后采取相应的预防控制措施。

本研究所用的引物是根据澳大利亚 Payne CJ^[5]等发表的 BLSV 部分片段所设计。该片段尚未进行基因结构和功能的分析,只是发现它与禽

HEV 解旋酶的部分序列有一定的同源性,其保守性尚不清楚。

序列分析表明,本实验分离的 BLSV-NJ2002 株在大小为 338bp 的基因区域与国际认同的澳大利亚报道的毒株同源性为 97.3%,与 GenBank 中禽 HEV 序列的同源性为 83.6%。由此可以进一步确定所分离的毒株为 BLSV,至于其与澳大利亚毒株差异的意义何在,尚待进一步研究。

参考文献

- [1] Handliger J H, Willcams W. An Egg Drop Associated with Splenomegaly in Broiler Breeds [J]. Avian Disease, 1998, 32: 773-778.
- [2] 单松华,张卫忠,谢爱织. 鸡大肝大脾的流行病学地调查[J]. 中国畜禽传染病,1995,6:51-52.
- [3] 谭 勋,杨德吉,侯世忠,等. 鸡大肝大脾病的流行病学初步调查[J]. 中国兽医科技,1996,26:16-17.
- [4] 杨德吉,单松华. 部分鸡场鸡大肝大脾病血清学调查[J]. 中国兽医科技,1997,27:13-14.
- [5] Payne C J, Ellis T M, Plant S L, *et al.* Sequence data suggests big liver and spleen disease virus (BLSV) is genetically related to hepatitis E virus [J]. Veterinary Microbiology, 1999, 68: 119-125.
- [6] Payne C J, Plant S L, Ellis T M, *et al.* The detection of the big liver and spleen agent in infected tissues via intravenous chick embryo inoculation [J]. Avian Pathology, 1993, 22: 245-256.