

# 1 型鸭肝炎病毒 R 株全基因组分析与检测技术的研究

罗玉均<sup>1,2</sup>, 张桂红<sup>1</sup>, 陈建红<sup>2</sup>, 廖明<sup>1</sup>, 徐小芹<sup>1</sup>, 任涛<sup>1</sup>, 张济培<sup>2</sup>, 罗开健<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>华南农业大学兽医学院, 广州 510642; <sup>2</sup>佛山科学技术学院生命科学学院, 广东南海 528231)

**摘要:** 【目的】测定 1 型鸭肝炎病毒 (DHV1) 毒株 R 全基因组, 建立鸭肝炎病毒 1 型巢式 PCR 与实时荧光定量 RT-PCR。【方法】设计特异性引物测定 DHV1 毒株 R 全基因组, 以 3D 为靶基因序列的引物 P1 和 P2, P3 和 P4 进行巢式 PCR, 引物 F 和 R 进行实时荧光定量 RT-PCR。【结果】序列分析发现该毒株与其它 GenBank 上发表的 DHV1 毒株基因组核苷酸序列同源率为 94.2%~99.2%, 编码聚合蛋白氨基酸序列同源率为 98%~98.8%, 表明 DHV1-R 株与其它 DHV1 毒株之间病毒基因组一级结构有较高的同源性。基因组结构 5' UTR-VP0-VP3-VP1-2A1-2A2-2B-2C-3A-3B-3C-3D-3' UTR 在遗传进化关系上与副肠孤病毒属 (Parechovirus) 亲缘关系较近。参照鸭肝炎病毒 1 型基因序列设计特异性引物, 分别进行巢式 PCR 和 SYBR Green I 实时荧光定量 RT-PCR 方法检测鸭肝炎病毒 1 型, 结果表明巢式 PCR 敏感性为 6 pg·ml<sup>-1</sup>。实时荧光定量 RT-PCR 确定特异性产物的 T<sub>m</sub> 值, 同时做普通 RT-PCR。试验结果表明, 特异性产物的 T<sub>m</sub> 值为 85.6℃, 最低能检测到含 0.015 fg·μl<sup>-1</sup> 阳性质粒标准品。【结论】建立的巢式 PCR 与 SYBR Green I 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法显示了较好的特异性、敏感性, 为鸭肝炎病毒 1 型的临床检测和流行情况调查提供了新的技术手段。

**关键词:** 1 型鸭肝炎病毒; 全基因组; 巢式 PCR; 荧光定量 RT-PCR

## Genomic Analysis and Establishment of Diagnostic Technology for Duck Hepatitis Virus Type 1

LUO Yu-jun<sup>1,2</sup>, ZHANG Gui-hong<sup>1</sup>, CHEN Jian-hong<sup>2</sup>, LIAO Ming<sup>1</sup>, XU Xiao-qin<sup>1</sup>, REN Tao<sup>1</sup>,  
ZHANG Ji-pei<sup>2</sup>, LUO Kai-jian<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangdong 510642; <sup>2</sup>College of Life and Science, Foshan University, Nanhai 528231, Guangdong)

**Abstract:** 【Objective】To determine the genomic sequence of a duck hepatitis virus type 1 (DHV-1) strain and establish nested PCR and real-time PCR. 【Method】Real-time quantitative polymerase chain reaction (RTQ-PCR) assay based on SYBR Green I technology and nested PCR were developed to target 3D gene of DHV-1. 【Result】Comparative sequence analysis showed that the genome has a typical picornavirus genetic organization, and strain DHV1-R genetic organization is 5' UTR-VP0-VP3-VP1-2A1-2A2-2B-2C-3A-3B-3C-3D-3' UTR, DHV1-R has a close relationship with Parechovirus, DHV1-R has 94.2%-99.2% nucleotide sequence identity and has 98%-98.8% amino acid identity with other DHV-1 strains. Based on the DHV-1 sequences in GenBank, three pairs of specific primers were designed to amplify DHV-1 using nested PCR and real-time PCR. The results showed that sensitivity of nested PCR is 6pg·ml<sup>-1</sup>, and real-time PCR T<sub>m</sub> value is 85.6℃, and the detected limit of positive plasmid is 0.015 fg·μl<sup>-1</sup>. 【Conclusion】All results showed that the nested PCR and real-time PCR have high sensitivity and specificity to detect DHV-1. These methods are rapid, sensitive, and reliable, and can be readily adopted for detection of DHV-1 from other clinical samples.

**Key words:** Duck hepatitis virus type 1; Complete genome; Nested PCR; Real-time RT-PCR

收稿日期: 2007-07-10; 接受日期: 2007-10-08

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (5006678)

作者简介: 罗玉均 (1980-), 男, 广东韶关人, 硕士, 研究方向为预防兽医学。Tel: 020-85280242; E-mail: yujunluo@126.com。通讯作者张桂红 (1968-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 教授, 研究方向为动物分子病毒学。E-mail: guihongzh@scau.edu.cn

## 0 引言

【研究意义】鸭肝炎病毒 1 型(duck hepatitis virus 1, DHV1) 是引起的雏鸭的一种急性高度致死性传染病, 主要侵害 4 周以内的雏鸭, 特别是 1 周以下的雏鸭最易感染, 死亡率较高, 是危害养鸭业最为严重的传染病之一<sup>[1]</sup>。1 型鸭肝炎病毒含 RNA 分类上属于小核糖核酸病毒科<sup>[2]</sup>。Sandhu 等<sup>[3]</sup>发现种 1 型鸭肝炎病毒变异株, 称为 1a 型鸭肝炎。用鸡胚作交叉中和试验证实, 1 型和 1a 型之间有部分交叉反应, 但结果有些反复。他们还证实当用其中任一毒株攻击用另一毒株免疫过的雏鸭时, 可产生部分交叉保护。Woolcock<sup>[4-6]</sup>也报道了这两型病毒在鸭胚肾细胞上进行的空斑减少试验的不同。因此研究和阐明 DHV1 中国株基因结构特征, 与世界各地分离到的不同 DHV1 地理区域毒株进行比较, 分析其基因结构之间可能存在着的差异, 对与中国 DHV1 诊断试剂与疫苗的开发具有重要价值。【前人研究进展】目前鸭肝炎病毒 1 型在世界多数养鸭国家均有发生和流行, 在中国许多养鸭的省市均有本病的流行。当前对鸭肝炎病毒 1 型的病原鉴定方法主要是中和试验<sup>[7]</sup>、血清保护试验, 以及其它的血清学诊断方法如 ELISA<sup>[8]</sup>、Dot-ELISA、胶体金免疫电镜技术<sup>[9]</sup>、琼脂扩散试验<sup>[10]</sup>以及间接血凝试验<sup>[11]</sup>等, 随着鸭肝炎病毒 1 型全基因组的测定, PCR 技术也开始用于鸭肝炎病毒 1 型的诊断<sup>[8,12,13]</sup>。【本研究切入点】但目前国内外尚未见报道巢式 PCR 与荧光定量 PCR 检测鸭肝炎病毒 1 型的报道。【拟解决的关键问题】为此, 笔者对该毒株全基因组进行了分子克隆, 并且对其核苷酸和氨基酸序列进行了分析, 建立了一种用于鸭肝炎病毒 1 型的巢式 PCR 与荧光定量 PCR 检测方法结果报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒

鸭肝炎病毒 1 型 FS 株、鸭肝炎病毒 1 型 R 株分别为 2001、2007 年于广东佛山、广州等地病死白鸭肝组织中所分离毒株, 鸭肝炎病毒 1 型 FS 株为强毒株, 鸭肝炎病毒 1 型 R 株为中等毒力毒株, 新城疫病毒 (NDV)、禽流感病毒 (H5 和 H9)、鸭瘟病毒 (DPV)、鹅副粘病毒 (GPMV) 为本实验室保存。

### 1.2 主要试剂

RT-PCR 试剂盒、PMD18-T 载体、凝胶回收试剂盒, 购自 TaKaRa 公司; LB 培养基、Trizol 抽提试剂,

购自 Invitrogen 公司; 氨苄青霉素为 Promaga 公司产品。Marker DL 2000 均购自 TaKaRa 公司; SYBR Green I 预混剂购自 TOYOBO 公司; 其它试剂均为国产分析纯。

### 1.3 引物的设计与合成

根据 GenBank 中登录的鸭肝炎病毒 1 型基因序列, 用 Primer Premier 5.0 软件设计全基因组扩增引物、巢式 PCR 引物和巢氏 PCR 引物。

巢式 PCR 引物序列为:

P1: 5'-AGATATGGCAGTAGAGG-3'

P2: 5'-TTGCTGTTTGAATCTTCTGTCCC-3'

P3: 5'-ATgTACCACTgTggTCATT-3'

P4: 5'-TCTTCAGaAATTCATCTC-3'

外引物 P1/P2 扩增片段长度为 400 bp, 内引物 P3/P4 扩增片段长度为 250 bp。

荧光定量 PCR 引物序列为:

F: 5'-CTGTCAGTGCCAGAGTGCC-3'

R: 5'-CCAATAATTTTGCAGTCCG-3', 预计扩增片段大小为 175 bp, 由上海生工生物工程有限公司合成。

### 1.4 全基因组 PCR 扩增和序列测定

首先用 Trizol 提取病毒 DNA, 具体操作见 Trizol 说明书, 然后用全基因组扩增引物 (表 1) 对病毒基因组进行扩增 PCR 反应条件为 94℃ 4 min; 94℃ 50 s, 60℃ 1 min, 72℃ 3 min, 共 30 个循环, 之后 72℃ 延伸 10 min, 将扩增产物用胶纯化试剂盒 (Omega 公司产品) 纯化, 具体步骤参照试剂盒说明书。取适量经纯化回收的 PCR 产物, 按 pMD18-T 载体说明加入连接体系, 于 16℃ 连接过夜, 取 10 μl 连接产物转化 DH5α 大肠杆菌。挑取在含氨苄青霉素的 LB 培养基上长出的白色菌落, 少量培养, 用碱裂解法抽提质粒 DNA 进行 PCR 鉴定。阳性克隆菌由上海生物技术有限公司进行测序。而 R 株 5' 与 3' 端序列采用 RACE 方法进行, 具体步骤参照试剂盒说明书。

### 1.5 序列分析和基因进化树的建立

为了研究 R 株同其它 DHV1 毒株之间的基因进化关系, 笔者以全基因组序列为根据建立了进化树, 所选 DHV1 毒株基本上涵盖了所有已发表的有完整基因序列的 DHV1 毒株序列, 应用 DNASTAR 5.07 基因分析软件包, 应用 MegAlign 软件的 Cluster W 算法, 进行核苷酸序列与氨基酸序列同源性比较。

### 1.6 GenBank 登录号

DHV1-R 株全基因组序列已经被 GenBank 收入,

表 1 DHV1-R 毒株全基因组扩增引物

Table 1 Amplified primers for DHV1-R genome

序号 No.	上游引物 Forward primer 5'-3'	下游引物 Reverse primer 5'-3'	片段长度 Length (bp)
1	GTTGTCACCTGGCCTCTGTAC	AGTTAGGGTGACTGCCCTGGA	1354
2	AAGTTTCAGGGCAGCA	TTGGCAAATGAGACAA	1741
3	CTTCTGCGAAATGTTCTAATG	GTAATCTTTTTTCAGTTCTTAGCATA	1611
4	AAAAACTGACCCCTCTTCAGGG	CACAAGTGACATAATGGTCCAGG	1119
5	GATTCTTGGTATAGGAAGTGGGA	AATAACAAGTGAAACAGTGTGG	1168
6	GGCAATGTGTTTCAGCCTCCCT	GTTTCGCGACACCCAAGGTAAT	1138

登录号为 EF585200。

### 1.7 鸭肝炎病毒 1 型巢式 PCR 扩增

第一次 PCR 扩增以 25  $\mu\text{l}$  反应体系进行, 包括 Premix EX-Taq 12.5  $\mu\text{l}$ , 20  $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  上、下游引物 F、R 各 0.5  $\mu\text{l}$ , 模板 cDNA 2  $\mu\text{l}$ , 加 ddH<sub>2</sub>O 补足至 25  $\mu\text{l}$ 。反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$  3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$  50 s, 55 $^{\circ}\text{C}$  50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  50 s, 30 次循环, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 4 min。取 4  $\mu\text{l}$  PCR 产物, 进行琼脂糖凝胶电泳。反应结束后, 取 1  $\mu\text{l}$  PCR 产物, 做 10~10<sup>7</sup> 倍梯度稀释, 作为第二轮扩增的模板。第二轮扩增方法除使用不同的特异引物和 1  $\mu\text{l}$  不同稀释度的第一次 PCR 产物为模板外, 反应体系与第一轮一致。PCR 扩增参数为: 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min 后进入以下循环, 94 $^{\circ}\text{C}$  变性 40 s, 49 $^{\circ}\text{C}$  退火 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 40 s, 进行 30 个循环, 最后于 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 4 min。取 PCR 产物各 4  $\mu\text{l}$ , 在 15  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  琼脂糖凝胶 (0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  EB) 上进行电泳, 用凝胶成像系统进行拍照。

**1.7.1 巢式 PCR 扩增的特异性试验** 用鸭肝炎病毒 1 型、新城疫病毒 (NDV)、禽流感病毒 (H5 和 H9)、鸭瘟病毒 (DPV)、NDV、鹅副粘病毒 (GPMV) cDNA 或 DNA 抽提物进行 RT-PCR 扩增, 每次扩增反应同时设双蒸水作阴性对照, 扩增反应结束后用凝胶电泳检测。

**1.7.2 巢式 PCR 扩增的敏感性测定** 利用紫外分光光度法测定模板 cDNA 的浓度。将所提取的 cDNA 依次做 10 倍梯度稀释然后每个稀释度取 2  $\mu\text{l}$  为模板, 用引物 P1 与 P2 进行 PCR 扩增, 反应结束后进行凝胶电泳检测。以第一次 RT-PCR 产物为模板, 以 P3 和 P4 为引物进行第二次扩增, 反应结束后进行凝胶电泳检测。

**1.7.3 临床样品的巢式 PCR 检测** 扩增方法和扩增条件同 1.7。

### 1.8 实时荧光定量 RT-PCR 快速检测

通过对引物和探针浓度、退火温度等条件的优化, 最终确定反应体系为: SYBR Green I 预混剂 12.5  $\mu\text{l}$ , 上游引物 F (20  $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) 0.5  $\mu\text{l}$ , 下游引物 R (20  $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) 0.5  $\mu\text{l}$ , 标准品 cDNA 2  $\mu\text{l}$ , SYBR Green I 0.3  $\mu\text{l}$ , 加 ddH<sub>2</sub>O 补足至 25  $\mu\text{l}$ ; 反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$  2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$  15 s, 59 $^{\circ}\text{C}$  20s, 72 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 80 $^{\circ}\text{C}$  35 s; 然后 95 $^{\circ}\text{C}$  15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$  20 s, 95 $^{\circ}\text{C}$  15 s 做熔解曲线。80 $^{\circ}\text{C}$  时收集荧光信号, 进行 40 个循环。

**1.8.1 鸭肝炎病毒 1 型分离株的检测** 分别以制备的阳性标准品和分离株提取的 cDNA 为模板进行实时荧光定量 RT-PCR 扩增, 观察比较所形成的扩增曲线和熔解曲线, 反应条件和反应体系同 1.8。

**1.8.2 实时荧光定量 PCR 检测的敏感性试验** 将质粒标准品做 1:10、1:10<sup>2</sup>、1:10<sup>3</sup>、1:10<sup>4</sup>、1:10<sup>5</sup>、1:10<sup>6</sup>、1:10<sup>7</sup>、1:10<sup>8</sup> 稀释后同时进行实时荧光定量 RT-PCR 和普通 RT-PCR, 比较两种检测方法的灵敏度。

### 1.8.3 标准曲线的制作

**1.8.3.1 实时荧光定量 RT-PCR 扩增** 将标准品质粒 DNA 依次做 1:10、1:10<sup>2</sup>、1:10<sup>3</sup>、1:10<sup>4</sup>、1:10<sup>5</sup>、1:10<sup>6</sup>、1:10<sup>7</sup>、1:10<sup>8</sup> 稀释后进行实时荧光定量 PCR, 制作标准曲线。反应条件同上。

**1.8.3.2 标准品拷贝数的计算** 采用 NanoDrop ND-1000 型分光光度计测定纯化的鸭肝炎病毒 1 型质粒 DNA 浓度 (为 1500  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ), 将标准品质粒 DNA 以 10 倍倍比稀释后进行浓度测定, 确认稀释后标准品的浓度基本符合倍比关系, 证明标准品稀释的准确性, 进而得到 1  $\mu\text{l}$  标准品的拷贝数为:  $[1500 \times 10^{-6} / (2692 + 175) \times 330 \times 2] \times 6.02 \times 10^{23} = 1.9 \times 10^{11} \text{copy}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 DHV1-R 株病毒全基因组序列分析

DHV1-R 株病毒经 RT-PCR 扩增后, 共产生 8 个片段, 长度从 401 bp 到 1 741 bp。测序结果表明 DHV1-R 株 cDNA 全长为 7 703 bp, 3'端有多聚腺嘌呤核苷酸[poly (A)]尾巴。腺嘌呤 (A) 含量为 28.88%, 胞嘧啶 (C) 含量最低, 为 20.51%, 鸟嘌呤 (G) 为 22.63%, 尿嘧啶 (U) 为 27.98%, G+C 含量为 43.14%。基因组 5'UTR 由 623 bp, 这比 DHV1-DRL-62 毒株、

DHV1-C80 毒株稍短一些, 而基因组 3'UTR 与 DHV1-C80 毒株一致。DHV1-R 株全基因组核苷酸序列与已发表的 DHV1 毒株的同源性为 94.2%~99.2%, 氨基酸序列同源性为 98%~98.8%。表明该毒株与世界其它各地的 DHV1 毒株之间病毒基因组一级结构有较高的同源性 (图 1, 表 2)。

2.2 进化树分析

同一性百分率 Percent identity

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
序列差异百分率 Divergence	1	■	97.0	97.1	95.7	95.1	95.1	95.7	94.2	96.5	98.6	99.2	95.7	95.8	1	DHV strain R
	2	3.1	■	97.1	95.5	94.9	95.3	95.4	93.8	96.4	96.1	96.6	95.5	95.5	2	DQ219396 (韩国 Korea)
	3	2.9	3.0	■	95.7	95.2	95.3	95.6	94.0	99.1	96.4	97.0	95.7	95.7	3	DQ226541 (韩国 Korea)
	4	4.3	4.4	4.1	■	95.3	94.8	96.5	95.1	95.4	95.4	95.8	100.0	96.5	4	DQ249299 (中国台湾 Taiwan)
	5	4.6	4.8	4.4	4.6	■	94.5	95.2	94.1	95.4	95.3	95.4	95.6	95.3	5	DQ249300 (中国台湾 Taiwan)
	6	4.7	4.4	4.3	5.2	5.8	■	94.3	93.3	95.5	95.2	95.3	95.0	94.4	6	DQ249301 (中国台湾 Taiwan)
	7	4.4	4.8	4.5	3.7	5.0	6.0	■	97.9	95.0	95.3	95.7	96.3	99.5	7	DQ886445 (中国China)
	8	4.5	4.9	4.6	3.7	5.1	5.9	0.5	■	95.4	95.7	95.6	96.4	99.5	8	EF093502 (中国China)
	9	3.1	3.2	0.3	4.4	4.7	4.4	4.7	4.8	■	96.8	96.8	95.6	95.5	9	EF151312 (中国China)
	10	0.9	3.4	3.0	4.3	4.7	4.7	4.4	4.5	3.2	■	99.3	95.7	95.8	10	EF151313 (中国China)
	11	0.8	3.4	3.0	4.3	4.8	4.8	4.4	4.6	3.3	0.7	■	95.5	95.6	11	EF382778 (中国China)
	12	4.3	4.4	4.1	0.0	4.6	5.2	3.7	3.7	4.4	4.3	4.3	■	96.5	12	NC_008250 (中国台湾 Taiwan)
	13	4.3	4.7	4.4	3.6	4.9	5.9	0.5	0.5	4.7	4.4	4.4	3.6	■	13	DQ864514 (中国China)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13			

图 1 DHV1-R 株与其它各地 DHV1 毒株全基因组核苷酸序列同源性比较

Fig. 1 Homology comparison of nucleotide sequences of DHV1

表 2 DHV1-R 株与其它 DHV1 毒株的基因组特征比较

Table 2 Comparison of the genomic features of DHV-1 strains, DRL-62, C80

基因 Gene	编码氨基酸大小 Amino acids size			N 端潜在裂解位点 Predicted N-terminal cleavage sites			DHV1-R 株与其它毒株的核苷酸序列同源性 Homology of nucleotide sequences (%)	
	R	DRL-62	C80	R	DRL-62	C80	DRL-62	C80
5'UTR	623	626	625	-	-	-	-	-
Polyprotein	2249	2249	2249	-	-	-	-	-
L	30	-	30	-	-	-	-	96.7
VP0	226	256	226	L/G	Q/G	L/G	96.2	95.9
VP3	237	237	237	Q/G	Q/G	Q/G	95.5	95.2
VP1	238	238	238	Q/G	Q/G	Q/G	96.6	95.0
2A1	20	20	20	E/S	E/S	E/S	95.0	95.0
2A2	285	285	285	NPG/P	NPG/P	NPG/P	97.3	95.6
2B	119	119	119	Q/s	Q/s	Q/s	100	97.5
2C	333	333	333	Q/s	Q/s	Q/s	98.0	95.8
3A	93	93	93	Q/s	Q/s	Q/s	96.8	95.3
3B	28	34	28	Q/s	Q/s	Q/s	98.8	95.2
3C	187	181	187	E/T	Q/S	E/T	93.2	96.1
3D	453	453	453	Q/G	Q/G	Q/G	96.3	95.7
3'UTR	314	315	314	-	-	-	-	-

\* 5'UTR 和 3'UTR 大小与编码基因氨基酸个数 \* No. of nucleotides for 5'UTR and 3'UTR and amino acids for proteins

基于全基因组序列建立的进化树，结果表明 DHV1-R 株与中国分离毒株 EF151313、EF382778 亲缘关系较近，处于同一较小的分支。而与中国分离株 C80 (DQ864514)，韩国分离株 DRL-62 (DQ219396)、DQ249301 以及中国台湾 DHV1 毒株的亲缘关系都较远 (图 2)。与其它小 RNA 病毒属的病毒 (HPeV、LV、EMCV、FMDV) 进行全序列比较，进化树分析发现，DHV1 与 Parachovirus 遗传进化关系较近。

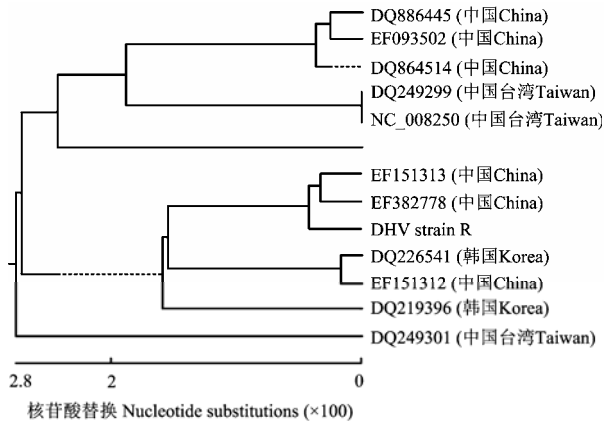


图 2 基于全基因组序列建立的进化树

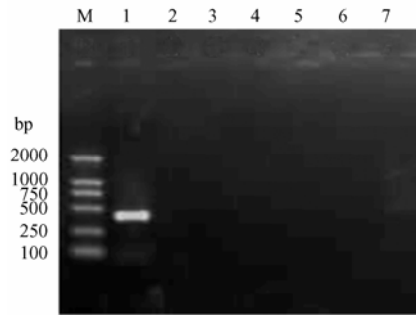
Fig. 2 Phylogenetic tree of DHV1

### 2.3 巢式 PCR 特异性

以参考鸭肝炎病毒 1 型 FS 株为模板，以 P1 和 P2 为引物，对反应体系和扩增条件优化后进行 PCR 扩增。扩增产物经凝胶电泳显示 1 条约 400 bp 的目的片段，由此说明所用的引物设计合理，反应体系及条件都适宜。将引物 P1 和 P2 的 PCR 产物做 100 倍稀释，作为第二次扩增的模板，内部引物用 F 和 R，可扩增出 1 条约 250 bp 的目的片段，说明该反应体系及条件也合适，从而证明该方法是可行的 (图 3)。

### 2.4 巢式 PCR 敏感性测定

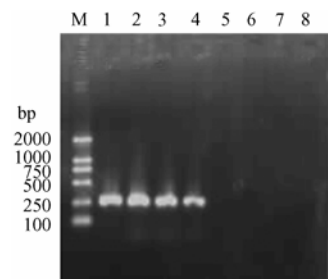
利用紫外分光光度法测定模板 cDNA 的浓度为  $600 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ 。将所提取的 cDNA 依次做 10 倍梯度稀释然后每个稀释度取  $2 \mu\text{l}$  为模板，用引物 P1 与 P2 进行 PCR 扩增，反应结束后进行凝胶电泳检测。以第一次 RT-PCR 产物为模板，以 P3 和 P4 为引物进行第二次扩增，反应结束后进行凝胶电泳检测，结果见图 4，结果表明，第一次 PCR 的敏感性为  $0.06 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ，第二次 PCR 的敏感性为  $6 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。通过第二次巢式 PCR 扩增后敏感性提高了 1 000 倍。



M: DL2000; 1: DHV1; 2: AIV-H5; 3: AIV-H9; 4: NDV; 5: DPV; 6: GPMV; 7: 阴性对照

图 3 巢式 PCR 特异性测定

Fig. 3 Specificity of nested PCR



M: DL2000; 1:  $6000 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; 2:  $600 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; 3:  $60 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; 4:  $6 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; 5:  $0.6 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; 6:  $0.06 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; 7:  $0.006 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; 8: 阴性对照

图 4 巢式 PCR 扩增的敏感性测定

Fig. 4 Sensitivity of nested PCR

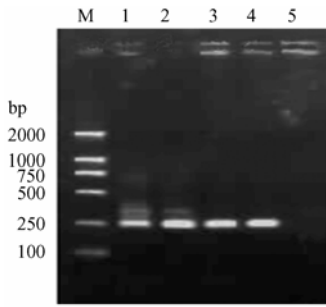
### 2.5 临床样品的巢式 PCR 检测

用巢式 PCR 对 10 份鸭肝炎病毒 I 型病料，用引物 P1 和 P2 扩增时，得到 5 份阳性 PCR 产物，阳性检出率为 5/10，而病毒分离阳性率为 9/10；将第一次 PCR 产物进行第二次扩增，得到 8 份阳性 PCR 产物 (部分病料第二次扩增的 PCR 产物电泳结果图 5)，阳性检出率为 8/10，表明巢式 PCR 敏感性较高。

### 2.6 分离株的实时荧光定量 RT-PCR 检测

试验结果显示，分离株和阳性对照都产生了“S”形的扩增曲线 (图 6)。从溶解曲线上可以看出，2 个毒株都具有相同的  $T_m$  值  $85.6^\circ\text{C}$ ，表明引物特异性较好。

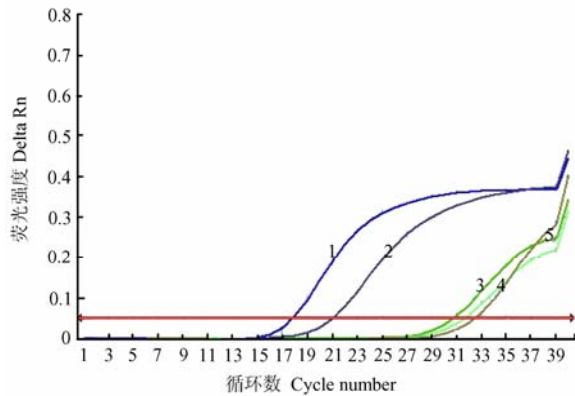
### 2.7 实时荧光定量 RT-PCR 的敏感性



M: DL2000; 1: DHVI 阳性标准; 2~4: 临床病料; 5: 阴性对照  
 M: DL2000; 1: DHVI positive sample; 2-4: Clinical samples; 5: Negative control

图 5 部分病料 PCR 产物的电泳结果

Fig. 5 Amplified product of nested PCR for tissue samples



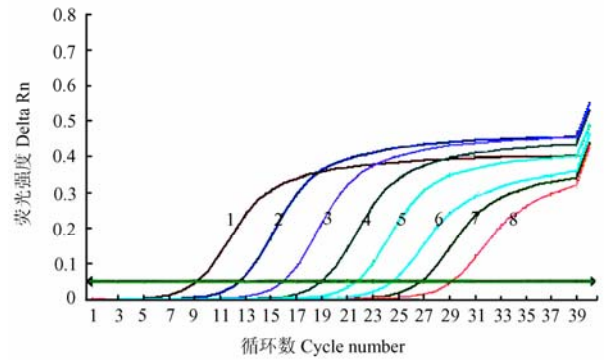
1, 2: 阳性标准对照; 3~5: 分离株  
 1, 2: Positive control; 3-5: Isolate strain

图 6 阳性标准株和分离株的扩增曲线

Fig. 6 Amplified curve of DHV1 for real-time PCR

质粒标准品做 1 : 10、1 : 10<sup>2</sup>、1 : 10<sup>3</sup>、1 : 10<sup>4</sup>、1 : 10<sup>5</sup>、1 : 10<sup>6</sup>、1 : 10<sup>7</sup>、1 : 10<sup>8</sup> 稀释后同时进行实时荧光定量 RT-PCR 板, 按优化的反应条件进行实时荧光定量 PCR, 最后使用分析软件自动生成动力学曲线 (图 7)。从扩增曲线图可以看出, 阳性质粒做 10<sup>7</sup> 稀释可作为检测的极限, 及最低的检测量为 0.015 fg·μl<sup>-1</sup>。其特异性产物的 T<sub>m</sub> 值为 85.6℃。而普通 RT-PCR 的电泳结果表明阳性质粒 1 : 10<sup>6</sup> 稀释后未能扩增出特异性条带 (图 8)。

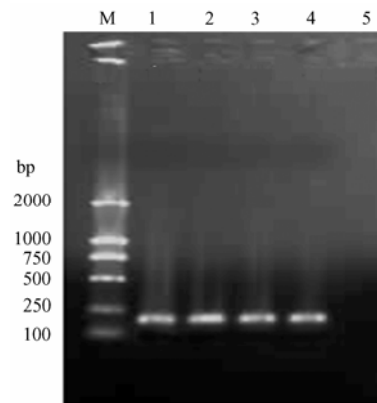
本试验用 1 : 10~1 : 10<sup>8</sup> 的标准样品进行实时荧光定量 RT-PCR 扩增, 最后用进行数据分析, 以起始模板拷贝数的对数为 X 轴, 以 Ct 值为 Y 轴, 建立标准曲线。由图 9 可见, 模板 Ct 值与该模板起始拷贝数



1~8: 分别为阳性质标准品 1 : 10~1 : 10<sup>8</sup> 稀释  
 1-8: 1 : 10-1 : 10<sup>8</sup> serially dilution of positive standard samples

图 7 倍比稀释的阳性对照的扩增曲线

Fig. 7 Amplified curve of serially dilution of positive plasmids



M: DNA 分子质量标准; 1~5: 1 : 10<sup>2</sup>~1 : 10<sup>6</sup> 标准品  
 M: DNA marker DL2000; 1-5: 1 : 10<sup>2</sup>-1 : 10<sup>6</sup> serially dilution of positive samples

图 8 普通 RT-PCR 的扩增结果

Fig. 8 Amplified product of conventional RT-PCR

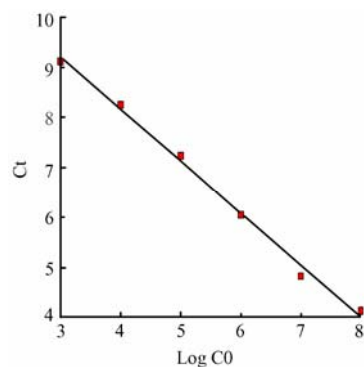


图 9 实时荧光定量 RT-PCR 检测的标准曲线

Fig. 9 Standard curve of real-time PCR

的对数存在线性关系, 起始拷贝数越大, Ct 值就越小。较低的 Ct 值敏感性较高。斜率为  $-1.039$ , 截距为  $12.32$ , 相关系数为  $0.995$ , 从而得到标准曲线:  $y = -1.039x + 12.32$ 。进行检测样品时, 待测样品的 Ct 值可以从仪器中读取, 把待测样品的 Ct 值代入标准曲线就可以得出样品的起始拷贝数。

### 3 讨论

本研究报道了一株 DHV1 的全基因组序列, 经 DNASTAR 分析发现, DHV1-R 株包含一个大开放阅读框, 编码聚合蛋白由 2 249 个氨基酸组成。DHV1 基因组具有典型的小 RNA 病毒基因组特点。DHV1-R 株与其它 GenBank 发表的 DHV1 毒株基因组核苷酸同源率为  $94.2\% \sim 99.2\%$ , 编码聚合蛋白氨基酸序列同源率为  $98\% \sim 98.8\%$ , 表明 DHV1-R 株与其它毒株之间病毒基因组一级结构有较高的同源性。在遗传进化关系上与副肠孤病毒属 (Parechovirus) 亲缘关系较近。通过分析表明 DHV1-R 株基因组结构为 5'-UTR-VP0-VP3-VP1-2A1-2A2-2B-2C-3A-3B-3C-3'-UTR, 这与 Ding<sup>[14]</sup>、Kim<sup>[15,16]</sup>、Tseng<sup>[17-19]</sup>报道的基本一致。但 Tseng 报道的 2A 蛋白中还额外多预测了一种 2A3。目前报道的 DHV1 基因组变异程度不大, DHV1a 型鸭肝炎基因组是否会与 DHV1 存在较大的差异, 还需要进一步研究。对于 FMDV VP1 蛋白大部分暴露在病毒的表面, 是决定病毒抗原性的主要成分。能诱导动物产生中和抗体, 也是抗原性的高变区<sup>[20-23]</sup>。一般认为, 衣壳蛋白 VP1 上的 RGD 序列是细胞表面受体的配体, 是小 RNA 病毒科病毒侵染细胞所必需的<sup>[24]</sup>。因此分析该基因对 DHV1 遗传变异的研究具有指导意义, 而且对 DHV1 流行病学的研究以及新型疫苗的研制也很重要。

本研究建立的巢式 PCR 方法应用于检测鸭肝炎病毒 1 型在国内外尚属首次。为了增加 PCR 反应的敏感性, 针对鸭肝炎病毒 I 型 3D 保守区设计了两对引物, 第一对引物扩增 400 bp 大小的片段, 结果可检出  $0.06 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  cDNA; 再设计第二对巢式引物, 以初次扩增产物为模板, 扩增 250 bp 的特异片段, 结果检出  $6 \text{ pg} \cdot \text{ml}^{-1}$  cDNA, 反应的敏感性提高了 1 000 倍。

本研究建立的运用 SYBR Green I 的实时荧光定量 RT-PCR 方法应用于检测鸭肝炎病毒 I 型在国内外尚属首次。用标准品分别做实时荧光定量 RT-PCR 和常规 RT-PCR, 结果显示实时荧光定量 RT-PCR 方法可以检测到  $0.015 \text{ g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  的样本, 比普通 RT-PCR 敏感

性要高 1 000 倍, 说明本研究建立的实时荧光定量 RT-PCR 检测确实有着很高的敏感性。常规 PCR 技术能够快速、特异地检测目的基因, 但是存在不能定量、需要接触 EB 等有害物质、易污染、出现假阳性等缺点。实时荧光定量 PCR 所使用的实时定量 PCR 仪是特异性靶基因检测与定量的一体化平台, 它将 PCR 热循环、荧光检测和应用分析软件结合在一起, 可动态地观察 PCR 每一循环各反应管中 PCR 产物逐渐增加, 具有省时、可重复、灵敏度高和线性范围宽等优点。而 SYBR Green I 荧光染料在核酸的实时检测方面有很多优点, 由于它与所有的双链 DNA 相结合, 因此通用性好, 且价格相对较低, 所以本研究建立的检测鸭肝炎病毒 1 型的实时荧光定量 PCR 比较实用。

因此, 本研究建立的巢式 PCR 方法与实时荧光定量 RT-PCR 方法用于检测鸭肝炎病毒 1 型具有准确性高、敏感性强、特异性好的特点, 可以用于鸭肝炎病毒 1 型快速诊断与基础研究。

### 4 结论

本研究结果表明 DHV-1 具有典型的小 RNA 病毒基因组结构特征。目前 GeneBank 数据库中公布的 DHV-1 序列在核苷酸与蛋白质水平上均分别具有较高的同源性。DHV-1 在小 RNA 病毒科多聚蛋白氨基酸序列进化树上形成一个独立的进化分枝, 显示可能是小 RNA 病毒科的一个新属病毒。预测 DHV-1 全长多聚蛋白总共被切割成 12 个成熟产物, 形成其结构蛋白与非结构蛋白, 这与小 RNA 病毒多聚蛋白加工特点相符。所建立的巢式 PCR 与 SYBR Green I 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法显示了较好的特异性、敏感性, 为鸭肝炎病毒 1 型的临床检测和流行情况调查提供了新的技术手段。

### References

- [1] Saif Y M, Barnes H J, Glisson J R, Fadly A M, McDougald L R, Swayne D E. *Diseases of Poultry* (11th ed). Iowa State University Press, 2003: 343-354.
- [2] Tauraso N M, Coghill G E, Klutch M J. Properties of the attenuated vaccine strain of duck hepatitis virus. *Avian Disease*, 1969, 13: 321-329.
- [3] Sandhu T S, Calnek B W, Zeman L. Pathologic and serologic characterization of a variant of duck hepatitis type I virus. *Avian Disease*, 1992, 36: 932-936.
- [4] Woolcock P R, Fabricant J. Duck virus hepatitis. *Disease of Poultry*

- (9th ed). Iowa State University Press, 1991: 597-608.
- [5] Zhao X L, Phillips R M, Li G D, Zhong A Q. Studies on the detection of antibody to duck hepatitis virus by enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Disease*, 1991, 35(4): 778-782.
- [6] Davis D, Woolcock P R. Passage of duck hepatitis virus in cell cultures derived from avian embryos of different species. *Research in Veterinary Science*, 1986, 41(1): 133-134.
- [7] Gabridge M G, Newman J P. Gel diffusion method for determining the titer of duck hepatitis virus. *Applied Microbiology*, 1971, 21(1): 147-148.
- [8] 马秀丽, 冯涛, 宋敏训, 李峰, 廖明, 辛朝安. 鸭病毒性肝炎病毒 RT-PCR 检测方法的建立与初步应用. *广东农业科学*, 2007, (7): 81-84.  
Ma X L, Feng T, Song M X, Li F, Liao M, Xin C A. Establishment of reverse transcriptional polymerase chain reaction for detection of duck hepatitis virus. *Journal of Guangdong Agricultural Science*, 2007, (7): 81-84. (in Chinese)
- [9] 程安春, 汪铭书, 廖得惠. 应用胶体金免疫电镜技术检测鸭肝炎病毒. *中国兽医杂志*, 1994, 20(6): 3-4.  
Cheng A C, Wang M S, Liao D H. Detection of duck hepatitis virus using colloidal gold immunoelectron microscopy. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 1994, 20(6): 3-4. (in Chinese)
- [10] Davis D. Duck hepatitis virus: adaptation of a plaque assay to determine 50 per cent end points with duck sera. *Research in Veterinary Science*, 1987, 42(2): 167-169.
- [11] Hwang J. Duck hepatitis virus-neutralization test in chicken embryos. *American Journal of Veterinary Research*, 1969, 30(5): 861-864.
- [12] Kim M C, Kwon Y K, Joh S J, Kwon J H, Kim J H, Kim S J. Development of one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction to detect duck hepatitis virus type 1. *Avian Disease*, 2007, 51(2): 540-545.
- [13] 程安春, 汪铭书, 信洪一, 陈海军, 杨苗, 郭宇飞, 朱德康, 贾仁勇, 袁桂萍, 陈孝跃. 1 型鸭病毒性肝炎病毒 RT-PCR 检测方法的建立. *中国兽医科学*, 2007, 37 (1): 38-42.  
Cheng A C, Wang M S, Xin H Y, Chen H J, Yang M, Guo Y F, Zhu D K, Jia R Y, Yuan G P, Chen X Y. Development of a RT-PCR assay to detect duck hepatitis virus type 1. *Veterinary Science in China*, 2007, 37(1): 38-42. (in Chinese)
- [14] Ding C Y, Zhang D B. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1. *Virology*, 2007, 361: 9-17.
- [15] Kim M C, Kwon Y K, Joh S J, Kim S J, Tolf C, Kim J H, Sung H W, Lindberg A M, Kwon J H. Recent Korean isolates of duck hepatitis virus reveal the presence of a new geno- and serotype when compared to duck hepatitis virus type 1 type strains. *Archive of Virology*, 2007, 152(11): 2059-2072.
- [16] Kim M C, Kwon Y K, Joh S J, Lindberg A M, Kwon J H, Kim J H, Kim S J. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 reveals a novel lineage close to the genus Parechovirus in the family Picornaviridae. *Journal of General Virology*, 2006, 87(11): 3307-3316.
- [17] Tseng C H, Tsai H J. Sequence analysis of a duck picornavirus isolate indicates that it together with porcine enterovirus type 8 and simian picornavirus type 2 should be assigned to a new picornavirus genus. *Virus Research*, 2007, 129: 104-114.
- [18] Tseng C H, Tsai H J. Molecular characterization of a new serotype of duck hepatitis virus. *Virus Research*, 2007, 126 (1-2): 19-31.
- [19] Tseng C H, Knowles N J, Tsai H J. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 indicates that it should be assigned to a new genus. *Virus Research*, 2007, 123(2): 190-203.
- [20] Taylor P L, Hanson L E. Indirect hemagglutination with duck hepatitis virus. *Avian Disease*, 1967, 11(4): 586-593.
- [21] Balamurugan V, Renji R, Saha S N. Protective immune response of the capsid precursor polypeptide ( P1) of foot and mouth disease virus type O produced in *Pichia pastoris*. *Virus Research*, 2003, 92(2): 141-149.
- [22] Mason P W, Grubman M J, Bant B. Molecular basis of pathogenesis of FMDV. *Virus Research*, 2003, 91(3): 9-32.
- [23] Carrillo C, Wigdorovitz A, Oliveros J C, Zamorano P I, Sadir A M, Gomez N, Salinas J, Escribano J M, Borca M V. Protective immune response to foot and mouth disease virus with VP1 expressed in transgenic plants. *Journal of Virology*, 1998, 72(2): 1688-1690.
- [24] Brown F, Benkirane N, Limal D, Halimi H, Newman J F, Van Regenmortel M H, Briand J P, Muller S. Delineation of a neutralizing subregion within the immunodomain epitope (GH Loop) of foot-and-mouth disease virus VP1 which does not contain the RGD motif. *Vaccine*, 1999, 18(1-2): 50-56.

(责任编辑 张云霞, 林鉴非)