

9 种鸭病毒病 GeXP 多重 PCR 检测方法的建立及其应用

张艳芳, 谢芝勋*, 谢丽基, 邓显文, 谢志勤, 罗思思, 黄莉, 黄娇玲, 曾婷婷, 王盛

(广西壮族自治区兽医研究所 广西兽医生物技术重点实验室, 南宁 530001)

摘要:旨在建立一种能够同时鉴别 H5、H7 和 H9 亚型禽流感病毒、基因 A 型鸭甲肝病毒、鸭坦布苏病毒、鸭瘟病毒、减蛋综合征病毒、新城疫病毒、鸭圆环病毒、番鸭呼肠孤病毒和番鸭细小病毒 9 种常见鸭病毒病的 GeXP 多重 PCR 检测方法。根据这些病原体在 GenBank 上公布的保守基因序列,设计合成了 12 对特异性 GeXP 引物。用单一病毒或混合病毒样品的 cDNA/DNA 模板优化反应条件,同时以其他常见鸭病病原体及鸭组织器官核酸为对照,验证所建立的 GeXP 方法的特异性和准确性。以 10^6 至 10^1 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 梯度稀释的克隆质粒或体外转录 RNA 来检测 GeXP 方法的敏感性。随机选取不同浓度的模板 (10^3 和 10^7 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) 进行干扰性试验,并与单一病原体为模板的 GeXP 多重 PCR 的检测结果比较。最后用该方法检测 150 份临床样品,与普通 PCR 方法的结果作比较,所有阳性结果样品均进行测序,进一步验证所建立的 GeXP 检测方法的可靠性。结果显示,单重或多重模板的 GeXP 检测均能特异性扩增出相应片段,不能扩增其他常见鸭病病原体,并且可在 10^3 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 水平上同时特异地检测出 9 种鸭病原体。GeXP 干扰性试验结果显示,当 3 种不同浓度的模板组合时,本试验所建立的方法依然可同时检测出所有病原体,与单重检测比较,未影响其检出。比较 GeXP 多重 PCR 方法和普通 PCR 方法对 150 份临床样品的检测结果,结果显示 GeXP 方法更为敏感与准确。笔者建立的同时鉴别 9 种鸭病毒病的 GeXP 多重 PCR 检测方法,具有高通量、特异性强和灵敏度高的特点,为混合感染的鸭病毒病临床样品提供了快速分子诊断新方法。

关键词: 鸭病毒病; GeXP 检测; 多重 PCR; 特异性嵌合引物

中图分类号: S858.325.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2016)12-2457-12

Development and Application of a GeXP-multiplex PCR Assay for Detection of Nine Duck Viruses

ZHANG Yan-fang, XIE Zhi-xun*, XIE Li-ji, DENG Xian-wen, XIE Zhi-qin, LUO Si-si,

HUANG Li, HUANG Jiao-ling, ZENG Ting-ting, WANG Sheng

(Guangxi Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Guangxi

Veterinary Research Institute, Nanning 530001, China)

Abstract: This experiment was developed to simultaneously detect these nine viral pathogens that cause infections in ducks including avian influenza virus (AIV) subtypes H5, H7, and H9; duck hepatitis A virus (DHAV-A); duck Tembusu virus (DTMUV); duck enteritis virus (DEV); egg drop syndrome virus (EDSV); Newcastle disease virus (NDV); duck circovirus (DuCV); muscovy duck reovirus (MDRV); and muscovy duck parvovirus (MDPV). Twelve pairs of specific primers were designed according to the conserved sequences of the genes from each pathogen available in the GenBank database. Single, mixed pathogen cDNA/DNA templates, other common duck pathogens and duck organs nucleic acids were used

收稿日期: 2016-06-27

基金项目: 广西科技攻关项目 (10100014-5; 14123001-8; AD16380009; AB16380054); 广西水产畜牧兽医局科技计划项目 (桂渔牧科 201452012); 国家“万人计划”领军人才专项 (2016-37-88); 广西重大专项资金 (桂科重 14121003-4-2)

作者简介: 张艳芳 (1987-), 女, 广西武鸣人, 助理研究员, 硕士生, 主要从事兽医生物技术方面的研究, E-mail: zhangyanfang409@126.com

* 通信作者: 谢芝勋, 二级研究员, 主要从事动物传染病防治技术的研究, E-mail: xiezhexun@126.com

to evaluate the specificity of the GeXP-multiplex assay. Serial dilution from 10^6 to 10^1 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ of *in vitro* transcript RNA of target genes and plasmids were used to test the sensitivity of GeXP multiplex PCR assay. Different amounts of the templates (10^3 and 10^7 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) were selected at random, mixed and tested in the GeXP multiplex PCR assay. The results were compared with those of the single template GeXP multiplex PCR assay. The GeXP assay was evaluated using 150 clinical specimens and compared with the single PCR. All positive specimens in the GeXP multiplex PCR and conventional PCR were identified via sequencing to verify the accuracy and reliability of the GeXP assay. These results showed that the corresponding specific fragments of genes were amplified by the single and multiplex GeXP PCR assay. Other pathogens did not result in amplification products. The detection limit of GeXP was 10^3 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ when all nine types of duck virus were present. The results of the interference assay showed that three specific amplification peaks can still be observed in the case of combination of three different concentration templates. The results of these experiments showed that mixed infections can be detected by GeXP multiplex PCR with minimal interference. Compared with the results of conventional PCR, the GeXP multiplex PCR method was more sensitive and accurate in the detection of 150 clinical samples. In conclusion, this GeXP-based multiplex PCR is a high-throughput, specific and sensitive test to detect nine duck viruses. This assay provides a new method in rapid molecular diagnosis for mix clinical duck virus samples.

Key words: duck virus disease; Genome Lab Gene Expression Profiler (GeXP); multiplex PCR; specific chimeric primer

我国是世界上最大的水禽生产国与消费国,水禽饲养量占世界总量的 75% 以上^[1]。鸭类产业是水禽产业的重要组成部分,根据联合国粮农组织 (FAO) 统计,我国肉鸭产量早在 2009 年就占到了全世界的 69.12%^[1],并且这个比例在逐年递增,养鸭业的市场前景十分广阔。随着近几年来养鸭业的快速发展,鸭病毒性传染病的发病率也在逐年升高,俨然成为限制养鸭业发展的重大因素,具体表现为:老病仍在流行,新病陆续出现;有些流行很久的疾病病原出现了新的血清型或变异株;某些过去认为鸭可感染但不发病的病原也转变为致死性感染因子^[2]。目前的研究表明,H5、H7 和 H9 亚型禽流感病毒 (avian influenza virus, AIV)、基因 A 型鸭甲肝病毒 (duck hepatitis A virus, DHAV-A)、鸭坦布苏病毒 (duck Tembusu virus, DTMUV)、鸭瘟病毒 (duck enteritis virus, DEV)、减蛋综合征病毒 (egg drop syndrome virus, EDSV)、新城疫病毒 (Newcastle disease virus, NDV)、鸭圆环病毒 (duck circovirus, DuCV)、番鸭呼肠孤病毒 (muscovy duck reovirus, MDRV) 和番鸭细小病毒 (muscovy duck parvovirus, MDPV) 是严重危害养鸭业的常见病毒病^[2],这些疾病在临床上常常以混合感染的形式存在,仅靠肉眼观察发病症状、剖检变化和发病特征等,难以作出快速鉴别诊断,因此建立真正意义上的

高通量快速检测多种鸭病毒病的方法迫在眉睫。

用于鉴别诊断这些鸭病的传统方法主要包括病原分离鉴定和血清学试验等^[3-6]。但这些方法操作繁琐、费时,并且常受临床病料新鲜度、污染程度或病程等因素的限制,鸭病又常以多重混合感染并存,因此鉴别诊断就更为困难。随着分子生物学的发展,PCR 等技术已被广泛应用于各种鸭传染病的检测^[7-10],并建立了多重 PCR 检测技术^[11-13],同时检测几种病原,但当几对引物组合在一起同时竞争扩增时,引物之间会相互干扰,引物对越多,形成非特异性扩增的概率就越大,检测结果就越不敏感。需要通过琼脂糖电泳后才可观察到 PCR 产物扩增的结果,并且间隔在 50~100 bp 以内的片段大小难以区分。同时检测的目的基因数量一般很有限 (多在 2~6 个基因)^[14],因此多重 PCR 也难以达到高通量的检测。多重 real-time PCR 是通过探针标记不同发光波长的荧光基团实现多种病原体检测,如果标记太多的荧光基团,同样也会相互干扰,使得多重荧光 PCR 还达不到高通量快速检测和分析的目的。

GeXP 多重 PCR 技术是将荧光标记通用引物和特异性嵌合引物相结合而引发多个基因的同时扩增。GenomeLab GeXP 遗传分析系统可在同一个体系里对多达 30 个目的基因进行有效分析^[15]。目前,已成功建立了同时检测 11 种亚型人乳头瘤病

毒,9 种常见手足口病的人肠道病毒,8 种脑炎相关虫媒病毒,7 种人腹泻病毒等基于 GeXP 多重基因表达系统的 GeXP 高通量检测方法^[16-20]。本实验室研究人员已成功建立了同时检测 9 种鸡呼吸道病病原体 GeXP 检测方法与 8 种猪呼吸道和繁殖障碍病病原体 GeXP 检测方法^[21-22],而目前未见有同时检测 9 种鸭病毒病的 GeXP 方法的报道。本研究基于

GeXP 多重基因表达遗传分析系统,建立一种能同时鉴别 9 种鸭常见病毒病的分子诊断检测方法,为鸭病的监测和防控提供技术支持。

1 材料与方

1.1 毒株来源及处理

本研究所有毒株来源见表 1。按照 RNA/DNA

表 1 毒株来源

Table 1 The source of the strains

毒株名称 Name	数量 Number	来源 Source
^a 禽流感病毒 AIV H5N3 Duck/HK 313/78 的 cDNA	1	香港大学 HKU
^a 禽流感病毒 Inactivated H5N1 AIV Re-1	1	哈尔滨兽医研究所 HVRI
禽流感病毒 H5N2 AIV chicken/QT35/87 的 cDNA	1	美国宾夕法尼亚州州立大学 PU
禽流感病毒 H5N5 AIV chicken/QT35/98 的 cDNA	1	美国宾夕法尼亚州州立大学 PU
禽流感病毒 H5N9 AIV chicken/QT35/98 的 cDNA	1	美国宾夕法尼亚州州立大学 PU
禽流感病毒 H7N2 AIV chicken PA/3979/97 的 cDNA	1	美国宾夕法尼亚州州立大学 PU
^a 禽流感病毒 H7N2 AIV Duck/HK/47/76	1	香港大学 HKU
^a 禽流感病毒 H9N6 AIV Duck/HK/147/77	1	香港大学 HKU
禽流感病毒 H9 AIV (Guangxi isolate)	9	广西兽医研究所 GVRI
禽流感病毒 H1N3 AIV Duck/HK/717/79-d1	1	香港大学 HKU
禽流感病毒 H1N1 AIV Human/NJ/8/76	1	香港大学 HKU
禽流感病毒 H2N3 AIV Duck/HK/77/76	1	香港大学 HKU
禽流感病毒 H3N6 AIV Duck/HK/526/79/2B	1	香港大学 HKU
禽流感病毒 H4N5 AIV Duck/HK/668/79	1	香港大学 HKU
禽流感病毒 H6N8 AIV Duck/HK/531/79	1	香港大学 HKU
禽流感病毒 H8N4 AIV Turkey/ont/6118/68	1	香港大学 HKU
禽流感病毒 H10N3 AIV Duck/HK/876/80	1	香港大学 HKU
禽流感病毒 H11N3 AIV Duck/HK/661/79	1	香港大学 HKU
禽流感病毒 H12N5 AIV Duck/HK/862/80	1	香港大学 HKU
禽流感病毒 H13N5 AIV Gull/MD/704/77	1	香港大学 HKU
禽流感病毒 H14N5 AIV Mallard/Astakhan/263/82	1	美国康涅狄格州大学 CU
禽流感病毒 H15N9 AIV shearwater/Western Australia/2576/79	1	美国康涅狄格州大学 CU
禽流感病毒 H16N3 AIV shorebird/Delaware/168/06	1	美国康涅狄格州大学 CU
^b 基因 A 型鸭甲肝病毒 DHAV-A(AV2111)	1	中国兽医药品监察所 CIVDC
基因 A 型鸭甲肝病毒 DHAV-A (GX2012/01,GX2012/02,GX2012/03,GX2013/03)	4	广西兽医研究所 GVRI
^c 鸭瘟病毒 DEV(AV1221)	1	中国兽医药品监察所 CIVDC
鸭瘟病毒 DEV(D2013/01,D2013/02,D2013/03,D2013/04)	4	广西兽医研究所 GVRI
^d 鸭坦布苏病毒 DTMUV(GX201301,GX201302, GX201303, GX201304,GX2013H,GX2013G,GX2013E)	7	广西兽医研究所 GVRI
^e 新城疫病毒 NDV(GX1/00,GX6/02,GX16,GX17,F48E9)	5	广西兽医研究所 GVRI
^f 减蛋综合征病毒 EDSV(GEV,ED01,ED02,ED03,ED04)	5	广西兽医研究所 GVRI
^g 番鸭呼肠孤病毒 MDRV(NM1,NM2,NM3,NM4)	4	广西兽医研究所 GVRI
^h 番鸭细小病毒 MDPV(GX-5,GX-6,GX-7,GX-8)	4	广西兽医研究所 GVRI
ⁱ 鸭圆环病毒 DuCV (GX1006,GX1008,GX1009,GX1010,GX1011,GX1012)	6	广西兽医研究所 GVRI
鸭疫里默菌	1	广西兽医研究所 GVRI
鸭源大肠杆菌	1	广西兽医研究所 GVRI
鸭源沙门菌	1	广西兽医研究所 GVRI
禽多杀性巴氏杆菌	1	广西兽医研究所 GVRI
基因 C 型鸭甲肝病毒	1	广西兽医研究所 GVRI
鸭星状病毒(AV2111)	1	中国兽医微生物菌种保藏管理中心 CVCC

a. 参考文献 [21]; b. GenBank 登录号 EF442073.1; c. GenBank 登录号 EU315247; d. GenBank 登录号 KJ700462.1; e. GenBank 登录号 JX193083.1; f. 参考文献 [12]; g. 参考文献 [12]; h. GenBank 登录号 KM093740.1; i. GenBank 登录号 JX241046.1

a. Reference [21]; b. GenBank No. EF442073.1; c. GenBank No. EU315247; d. GenBank No. KJ700462.1; e. GenBank No. JX193083.1; f. 参考文献 [12]; g. 参考文献 [12]; h. GenBank No. KM093740.1; i. GenBank No. JX241046.1

共提试剂盒及细菌总 DNA 抽提试剂盒说明书, 抽提表 1 中所有病原体和健康鸭组织器官的核酸, DNA 模板保存于 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。如果是 RNA 或 ss-RNA, 需按反转录试剂盒说明书将 RNA 反转录成 cDNA, 将 cDNA 保存于 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

1.2 试剂和仪器

GeXP 启动试剂盒、分离胶和分离缓冲液、DNA size standard Kit-400 Base Pairs 购自贝克曼公司(美国), JumpStart Taq DNA Polymerase 购自 SIGMA 公司(美国), 体外反转录和纯化试剂盒购自 Promega 公司(美国); DNA/RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、EX Taq Mix 和 pMD 18-T vector、限制性内切酶 *SpeI* 均购自大连 TaKaRa 公司(日本); 细菌总 DNA 抽提试剂盒购自北京全式金公司(中国)。PCR 仪购自 BIO-RAD 公司(美国); NanDrop ND-1000 微量核酸检测仪购自赛默飞公司(美国); GenomeLab GeXP 遗传分析系统均购自贝克曼公司(美国)。

1.3 试验方法

1.3.1 引物设计 在 NCBI 的基因库下载 A 型 AIV 的 *M* 基因(全部 16 个亚型 AIV 均含 *M* 基因)以及 AIV 的 H5、H7 和 H9 亚型的 *HA* 基因、DHAV-A 5' UTR 区域基因、DTMUV *E* 基因、DPV *UL6* 基因、NDV *L* 基因、EDSV *penton* 基因、MDRV *S1* 基因、MDPV *VP1* 基因和 DuCV *REP* 基因, 通过 DNASTAR 软件比对分析序列同源性, 用 Primer premier 5.0 软件根据引物设计原则选择特异且保守的区域进行引物设计。GeXP 通用引物序列分别连接在每对的正、反向引物 5' 端(表 1 下划线部分), 由北京华大基因合成 12 对特异性嵌合引物。病毒名称及各引物信息见表 2。

1.3.2 GeXP 多重 PCR 的反应体系和程序 反应体系如下: GenomeLab™ GeXP Start Kit 5×PCR Buffer 4 μL , 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 4 μL , 0.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物 2 μL 、JumpStart Taq DNA Polymerase 1.4 μL ,

表 2 GeXP 引物信息

Table 2 Primer information of the GeXP

病毒 Virus	上游引物序列(5'-3') Forward primer sequence (5'-3')	下游引物序列(5'-3') Reverse primer sequence (5'-3')	片段大小/bp Amplicon size	靶基因 Target region
AIV-M	<u>AGGTGACACTATAGAATA-</u> CAGAAACGGATGGGAGTGC	<u>GTACGACTCACTATAGGGATA-</u> TCAAGTGCAAGATCCCAATGAT	122	<i>M</i>
AIV-H5	<u>AGGTGACACTATAGAATACTTCAG-</u> GCATCAAAATGCACA	<u>GTACGACTCACTATAGGGATAG-</u> TTTGTTTCATTTCTGAGTCGGTC	285	<i>HA</i>
AIV-H7	<u>AGGTGACACTATAGAATAAAT-</u> GGGGCHTTCATAGCTCC	<u>GTACGACTCACTATAGGGAT-</u> GATAGCARTCRCCTCACAA	144	<i>HA</i>
AIV-H9	<u>AGGTGACACTATAGAATAACAA-</u> CAAGTGTGACAACAGAAGA	<u>GTACGACTCACTATAGGGATC-</u> TTCCGTGGCTCTCTCC	237	<i>HA</i>
DHAV-A	<u>AGGTGACACTATAGAATATCT-</u> TCGTTGTGAAACGGATTACC	<u>GTACGACTCACTATAGGGATGC-</u> CTGGACAGATDTGTGCCTACT	133	5UTR
DTMUV	<u>AGGTGACACTATAGAATAATGGA-</u> CAGGGTCATCAGCGG	<u>GTACGACTCACTATAGGGA-</u> GAATRGCTCCYGCCAATGCT	176	<i>E</i>
EDSV	<u>AGGTGACACTATAGAATAAATCG</u> GCAACTCAAGACATC	<u>GTACGACTCACTATAGGGACCC-</u> ATTCATAAACAGGATTC	208	<i>penton</i>
DEV	<u>AGGTGACACTATAGAATAGGGAG-</u> GAGCAAACAAAGA	<u>GTACGACTCACTATAGGGAA-</u> TCGCAAATTCATCACATA	150	<i>UL6</i>
NDV	<u>AGGTGACACTATAGAATAGTRGCA-</u> GCAAGRACAAGG	<u>GTACGACTCACTATAGGGA-</u> CATATCYGCATACATCAA	196	<i>L</i>
DuCV	<u>AGGTGACACTATAGAATATGKC-</u> CAAAGAGTCGACATA	<u>GTACGACTCACTATAGGGACAA-</u> AYGCATAACGGCTCTTTCC	300	<i>REP</i>
MDRV	<u>AGGTGACACTATAGAATACAGTT-</u> GAGCCGAYGGTAATT	<u>GTACGACTCACTATAGGGA</u> ACTC- GGTTGGTGTAGTVGCVTAGAA	219	<i>S1</i>
MDPV	<u>AGGTGACACTATAGAATACTT-</u> TCAGGCTACATCTTCAA	<u>GTACGACTCACTATAGGGA-</u> AATTCTCTTTTACCCATCC	253	<i>VP1</i>

模板 cDNA 或 DNA 0.5 pg~0.5 μg,加灭菌水至 20 μL。PCR 反应程序:95 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 30 s,10 个循环;95 °C 30 s,63 °C 30 s,72 °C 30 s,10 个循环;95 °C 30 s,50 °C 30 s,72 °C 30 s,20 个循环;4 °C 终止。使用 GeXP 系统对各 PCR 产物同时进行毛细管电泳检测,操作步骤如下:以甲酰胺为上样缓冲液,DNA size standard Kit-400 Base Pairs 与上样缓冲液按体积比 1:100 彻底混匀,在样品板上每孔加入 19 μL 混匀好的液体,对 PCR 产物进行 10~100 倍稀释,取稀释后的产物 1 μL 加至样品板,混匀,最后在每孔滴入一滴石蜡油进行封闭。在缓冲液板上每孔加入 2/3 的缓冲液,进行毛细管电泳。利用 GeXP 系统分析检测结果。用各病毒引物和对应模板,以健康鸭组织器官核酸作为阴性对照,按上述反应体系与程序,进行单一引物与对应模板的反应,对引物进行验证。

1.3.3 GeXP 多重 PCR 的特异性试验 等量混匀 12 对特异嵌合引物,使各对引物工作浓度均为 0.2 μmol·L⁻¹。在 12 对引物同时存在的多重反应体系中,参照“试验方法 1.3.2”,分别以表 1 中不同阳性毒株的核酸、其他常见鸭病病原体核酸(包括 13 种亚型禽流感病毒、鸭疫里默菌、鸭源大肠杆菌、鸭源沙门菌、禽多杀性巴氏杆菌、基因 C 型鸭甲肝病毒、鸭星状病毒)和健康鸭组织器官核酸为模板,验证所建立的 GeXP 多重 PCR 方法的特异性。

1.3.4 GeXP 多重 PCR 的准确性试验 随机选取样品抽提其总 cDNA 或 DNA 以任意比例进行组合并混匀,分为两组,第 1 组:AIV-H5、AIV-H7 和 AIV-H9 三种不同亚型禽流感病毒的 cDNA 混合作为模板;第 2 组:DEV、DTMUV、NDV、EDSV 和 AIV-H5 的 cDNA 五种病毒的 cDNA 或 DNA 混合作为模板;第 3 组:将 9 种鸭病毒病的 cDNA/DNA 全部以任意比例混合作为模板,验证 GeXP 多重 PCR 对模拟临床混合感染检测的准确性。

1.3.5 GeXP 多重 PCR 的敏感性试验

1.3.5.1 阳性质粒标准品的制备:以 AIV 的 M 基因、各亚型(H5、H7、H9)AIV 的 HA 基因、DHAV-A 5' UTR 区域的基因、DPV 的 UL6 基因、DTMUV 的 E 基因、NDV 的 L 基因、EDSV 的 penton 基因、MDRV 的 S1 基因、MDPV 的 VP1 基因和 DuCV 的 REP 基因的全长 cDNA 或 DNA 片段引物分别进行 PCR 扩增,扩增得到的 PCR 阳性产物连接到 pMD 18-T 载体,抽提阳性克隆质粒。然后使用 Spe I

酶对 AIV-H5、AIV-H7、AIV-H9、DHAV-A、DTMUV、NDV 和 MDRV 的质粒进行酶切线性化之后体外转录为 ssRNA 并纯化,利用 NanDrop ND-1000 微量核酸检测仪测核酸浓度,根据分子量及浓度计算各阳性克隆质粒和体外反转录 ssRNA 的拷贝数^[22]。

1.3.5.2 GeXP 多重 PCR 单一模板的敏感性试验:将 12 种阳性标准品分别梯度稀释为 10⁶ 至 10¹ 拷贝·μL⁻¹,参照“1.1”和“1.3.2”的反应程序,验证所建立的方法对单一模板检测的敏感性。同一试验平行 3 次,一周内重复三次非同日平行试验。

1.3.5.3 GeXP 同时检测 12 种模板的敏感性试验:将 12 种阳性标准品等量混合,浓度依次为 10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²、10¹ 拷贝·μL⁻¹,参照“1.1”和“1.3.2”进行 GeXP 多重 PCR 的敏感性分析。同一试验平行 3 次,一周内重复三次非同日平行试验。

1.3.6 GeXP 多重 PCR 的干扰性试验 随机选取 10³ 拷贝·μL⁻¹ 的克隆质粒 DuCV,10⁷ 拷贝·μL⁻¹ 的 AIV-M 和 10⁷ 拷贝·μL⁻¹ 的 AIV-H9 体外转录 ssRNA 作为组合,参照“1.1”和“1.3.2”进行 GeXP 干扰性试验,同一试验平行 3 次,一周内重复三次非同日平行试验,并比较与单一病原体为模板的 GeXP 多重 PCR 的结果。

1.4 临床样品检测

采集于 2012 年 7 月至 2013 年 11 月的 150 份来源于广西若干规模化养鸭场、活禽市场及送检临床样品,由广西兽医研究所保存并提供,包括 100 份无明显临床病症的鸭棉拭子和 50 份病死鸭肝、肺、脾和肾等混合组织病理样品,样品是日龄介于 10~130 d 之间的雏鸭、种鸭、蛋鸭和肉鸭。用本研究建立的 GeXP 多重 PCR 方法检测 150 份临床样品,并参考已建立的检测 9 种鸭病毒病的普通单重 RT-PCR 方法^[11-12,23-26,29],包括引物及反应条件等,比较这两种方法的检测结果。同时对 150 份临床样品进行分离鉴定。所有 GeXP 多重 PCR 和普通 RT-PCR 方法检测的阳性结果均送至北京华大基因公司进行测序。

2 结果

2.1 引物验证

GeXP 多重 PCR 的单引物单模板扩增结果显示的片段大小与试验设计相符,无杂峰,12 对引物扩增 9 种鸭病原体的靶基因片段大小分别为 AIV-M:121~123 bp;AIV-H5:285~287 bp;AIV-H7:143~145 bp;AIV-H9:236~238 bp;DHAV-A:

132~135 bp;DTMUV:175~177 bp;EDSV:207~209 bp;DEV:150~152 bp;NDV:195~197 bp;DuCV:299~301 bp;MDRV:218~220 bp;MDPV:252~254 bp.

2.2 GeXP 多重 PCR 方法的建立和特异性试验

12 对引物同时存在 GeXP 多重 PCR 扩增体系

时,应用所建立的 GeXP 方法对表 1 中所有阳性毒株进行单一模板特异性试验,均能扩增出对应的特异峰,无其他杂峰。如图 1A~K 所示,H5、H7 和 H9 亚型 AIV 均有一个特异信号峰和 AIV 的 M 基因通用信号峰,共两个峰。H5 亚型 AIV 两个峰包括 122.13 和 285.45 bp,H7 亚型 AIV 包括 122.01

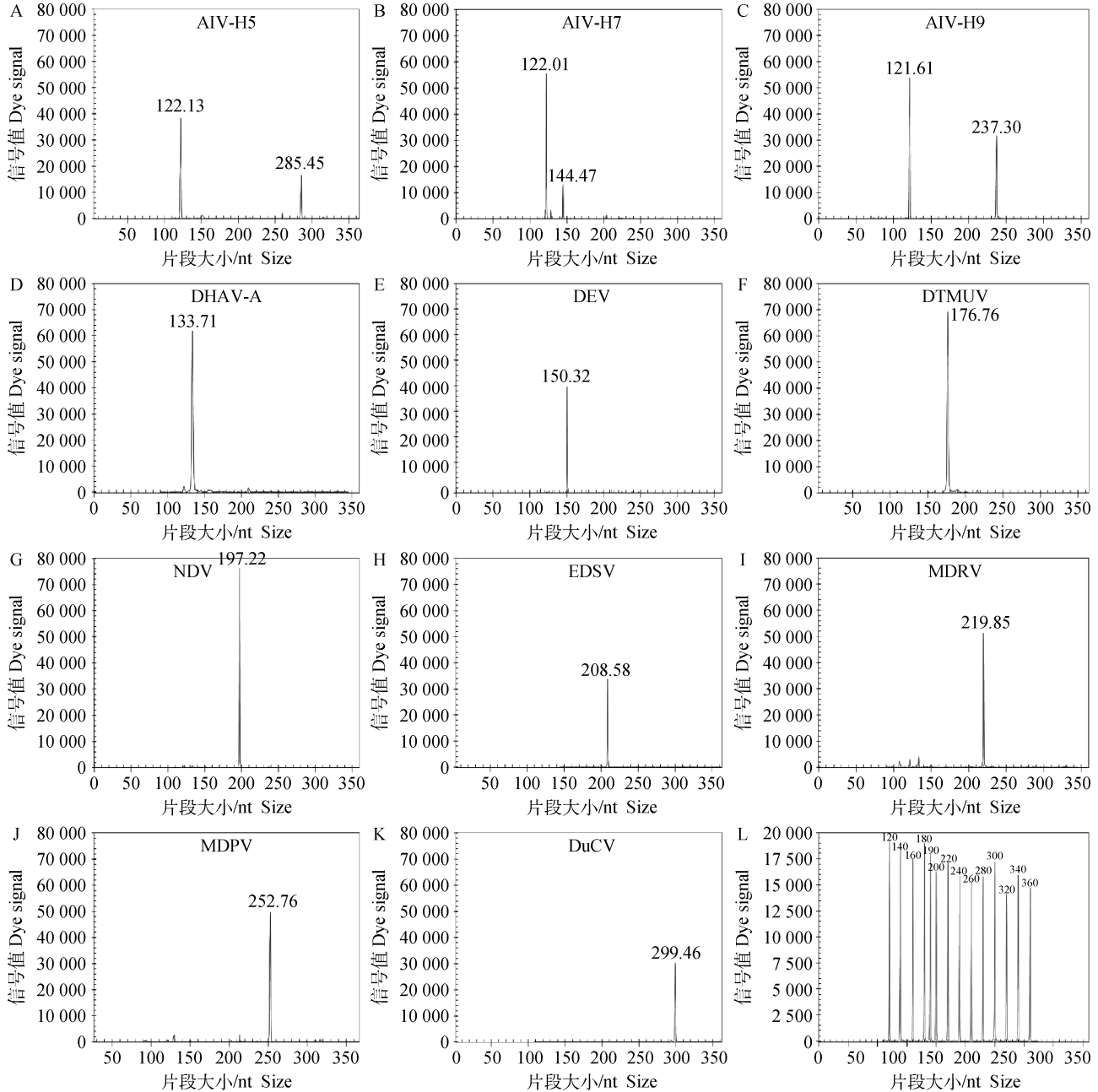


图 A~K 分别为 AIV-H5、AIV-H7、AIV-H9、DHAV-A、DEV、DTMUV、NDV、EDSV、MDRV、MDPV 和 DuCV 的 GeXP 特异性扩增结果。图 L 为阴性对照,各峰表示的是 Marker

Figure A-K show the results of the amplification of AIV-H5, AIV-H7, AIV-H9, DHAV-A, DEV, DTMUV, NDV, EDSV, MDRV, MDPV and DuCV, respectively. Figure L show the negative control, the peaks indicate the DNA size standard

图 1 GeXP 多重 PCR 的特异性检测

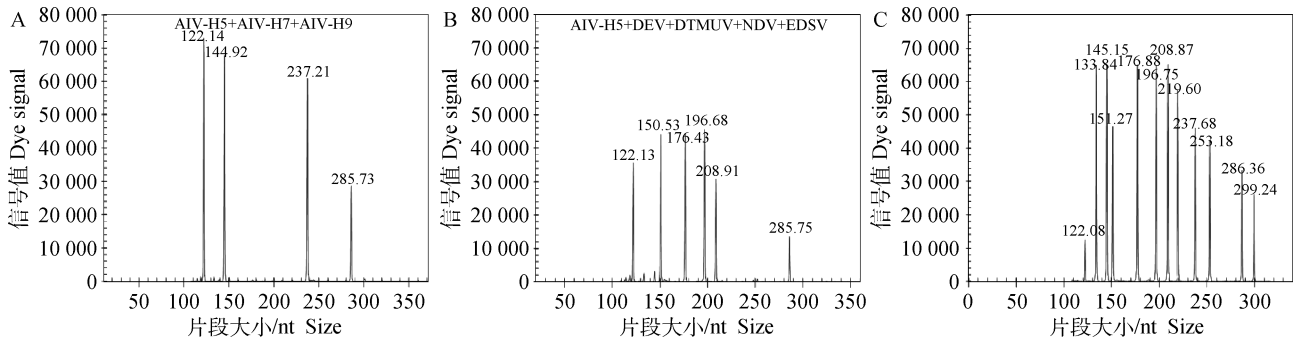
Fig. 1 Specificity analyses of the GeXP-PCR assay

和 144.47 bp, H9 亚型 AIV 包括 122.61 和 237.30 bp。DHAV-A、DEV、DTMUV、EDSV、NDV、DuCV、MDRV 和 MDPV 分别展现出 133.71、150.32、176.76、197.22、208.58、219.85、252.76 和 299.46 bp 特异信号峰。以表 1 中其他常见鸭病病原体核酸(包括 13 种亚型禽流感病毒、鸭疫里默菌、鸭源大肠杆菌、鸭源沙门菌、禽多杀性巴氏杆菌、基因 C 型鸭甲肝病毒、鸭星状病毒)和健康鸭组织器官核酸为阴性对照的模板,只有 DNA 分子量标准的信号峰,无其他杂峰(图 1L)。

2.3 GeXP 多重 PCR 准确性验证

GeXP 多重 PCR 准确性验证试验结果显示(图 2A、图 2B),第一组可检出四个目的峰,其中 122.14 bp

为 *M* 基因通用信号峰,285.73、144.92 和 237.21 bp 分别为 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 的特异性信号峰。第二组可检出 6 个目的峰,其中 H5 亚型 AIV 有 285.75 和 122.13 bp 两个峰。150.53、176.43、196.68 和 208.91 bp 分别为 DEV、DTMUV、NDV 和 EDSV 的信号峰。结果表明样品中同时含有 H5 亚型 AIV、DEV、DTMUV、NDV 和 EDSV。9 种病毒混合模板可检出 12 个目的信号峰(图 2C)。其中 122.08 bp 为 *M* 基因通用信号峰重叠,286.36、145.15 和 237.68 bp 分别为 H5、H7 和 H9 亚型 AIV 特异性的信号峰。133.84、151.27、176.88、196.75、208.87、219.60、253.18 和 299.24 bp 分别为 DHAV-A、DEV、DTMUV、NDV、EDSV、MDRV、MDPV 和 DuCV 的信号峰。



A. AIV-H5、AIV-H7 和 AIV-H9 模板混合样品; B. AIV-H5、DEV、DTUMV、NDV 和 EDSV 模板混合样品; C. 9 种鸭病毒模板混合样品

A. The mixed templates for AIV-H5, AIV-H7 and AIV-H9; B. The mixed templates for AIV-H5, DEV, DTUMV, NDV and EDSV; C. The mixed templates for nine duck viruses

图 2 GeXP 多重 PCR 检测混合模板

Fig. 2 GeXP-multiplex PCR detect the mixed templates

2.4 GeXP 多重 PCR 检测单一病原模板的敏感性

以不同拷贝数的 12 种单一质粒或体外转录 RNA 为模板,在 12 对引物同时存在的 GeXP 多重扩增体系中进行反应,结果显示,对 AIV-M、AIV-H5、DHAV-A、DTMUV、EDSV、NDV 和 MDRV 的敏感性均为 10 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$,对 AIV-H7、AIV-H9、DEV、DuCV 和 MDPV 检测的敏感性均为 100 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

2.5 GeXP 多重 PCR 同时检测 9 种病原模板的敏感性

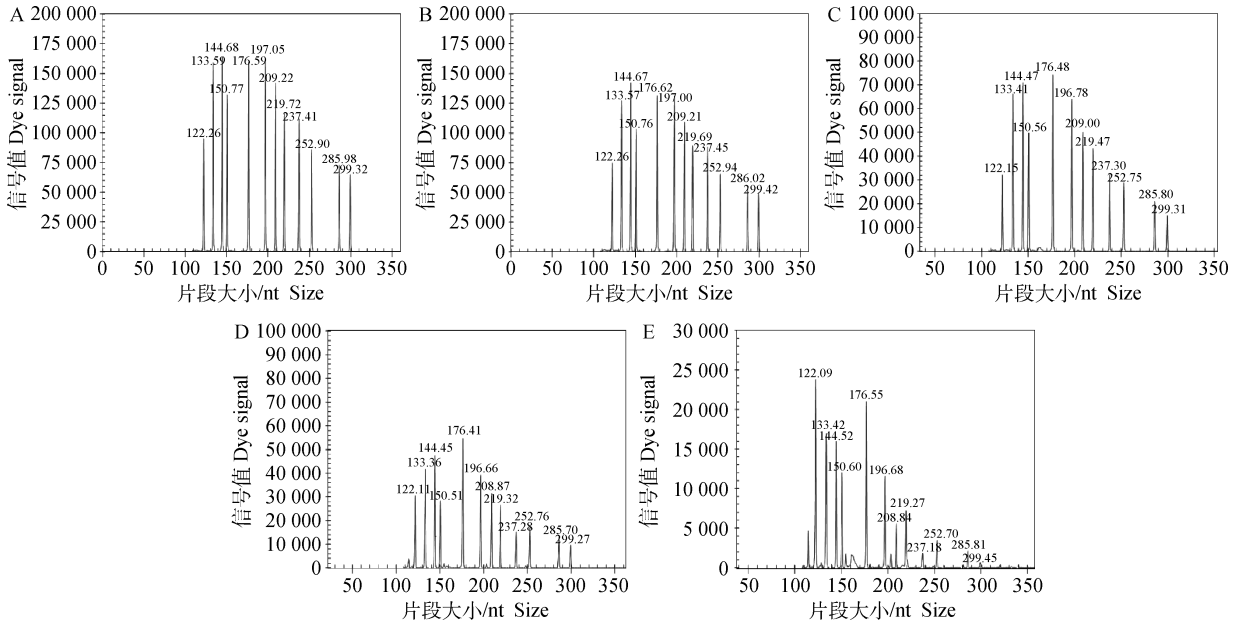
本研究所建立的 GeXP 多重 PCR 可在 10^3 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 水平同时特异地检测出 9 种鸭病病原体(图 3),在 10^2 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 水平上可同时检出 8 种鸭病毒病,李瑾等^[27]认为信号值大于 2 000 为显著, DuCV 峰值低于 2 000,判定为阴性。

2.6 GeXP 多重 PCR 干扰性试验验证

随机选取的三种不同浓度的质粒或体外转录 ssRNA 为模板组合进行 GeXP 多重 PCR 试验, AIV-M 和 AIV-H9 为 10^7 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$, DuCV 为 10^3 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$,两者浓度差异为 10^4 倍,结果显示,当不同浓度的模板组合时,最高模板浓度与最低模板浓度差异较大,本试验所建立的方法依然可同时检测到 AIV-M、AIV-H9 和 DuCV。相比同一浓度的 DuCV、AIV-M 和 AIV-H9 的单模板 GeXP 多重 PCR,峰值无太大差异(图 4)。

2.7 GeXP 多重 PCR 方法验证临床样品

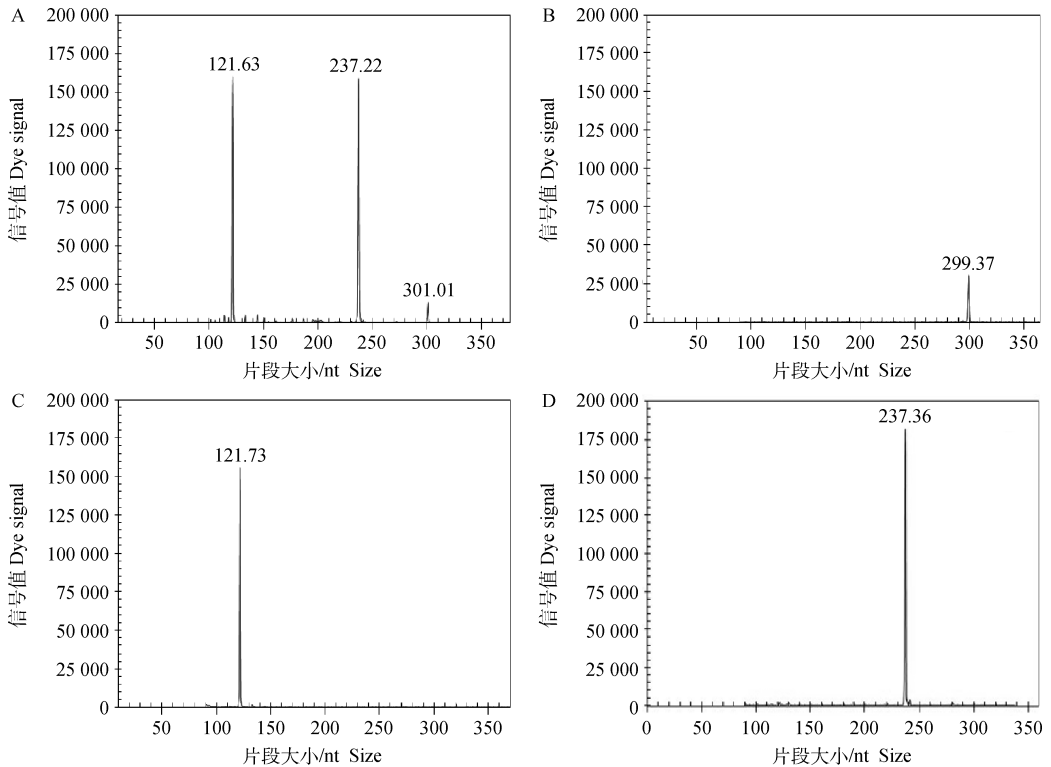
150 份检测样品中,GeXP 多重 PCR 检测与普通 RT-PCR 阳性与阴性检测结果以及每种病原体检出率(见表 3)。GeXP 检测 89 株阳性,其中检测出 14 份二重和三重混合感染(见表 4)。普通 RT-



A. 10^6 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$; B. 10^5 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$; C. 10^4 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$; D. 10^3 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$; E. 10^2 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$; 目的峰顺序依次为 AIV-M, DHAV-A, AIV-H7, DEV, DTMUV, NDV, EDSV, MDRV, AIV-H9, MDPV, AIV-H5 和 DuCV
 A. 10^6 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$; B. 10^5 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$; C. 10^4 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$; D. 10^3 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$; E. 10^2 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$.
 The viral targets from left to right are as follow: AIV-M, DHAV-A, AIV-H7, DEV, DTMUV, NDV, EDSV, MDRV, AIV-H9, MDPV, AIV-H5, and DuCV

图 3 GeXP 多重 PCR 的敏感性检测

Fig. 3 Sensitivity of the GeXP-PCR assay



A. AIV-M 10^7 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$, AIV-H9 10^7 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 和 DuCV 10^3 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$; B. DuCV 10^3 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$; C. AIV-M 10^7 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$; D. AIV-H9 10^7 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$
 A. AIV-M 10^7 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$, AIV-H9 10^7 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ and DuCV 10^3 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$; B. DuCV 10^3 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$; C. AIV-M 10^7 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$; D. AIV-H9 10^7 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$

图 4 GeXP 多重 PCR 干扰性试验结果

Fig. 4 GeXP-multiplex PCR interference assay

表 3 比较 GeXP 多重 PCR 与普通 PCR 临床样品检测结果

Table 3 Analysis of clinical samples using the GeXP assay and conventional PCR methods

临床样品 Clinical samples	GeXP 检测结果 GeXP assay results			PCR 检测结果 Conventional methods PCR results		
	阳性数量 Positive	阴性数量 Negative	检出率/% Detection rate	阳性数量 Positive	阴性数量 Negative	检出率/% Detection rate
H9 subtypes of AIV	20	130	13.33	18	132	12.00
DHAV-A	5	145	3.33	5	145	3.33
DEV	1	149	0.67	1	149	0.67
DTMUV	5	145	3.33	5	145	3.33
NDV	10	140	6.67	9	141	6.00
EDSV	3	147	2.00	3	147	2.00
MDRV	1	149	0.67	1	149	0.67
MDPV	4	146	2.67	4	146	2.67
DuCV	40	110	26.67	35	115	23.33
Total	89	61	59.33	81	69	54.00

表 4 150 份临床样品混合感染情况

Table 4 The detection results of 150 clinical samples by the GeXP assay

混合感染类型 Co-infection type	混合感染样品数 No. of co-infections	混合感染率/% Co-infection rate
H9+ DHAV-A+DuCV	2	1.33
H9+NDV+DuCV	4	2.67
H9+MDPV	1	0.67
DTMUV+EDSV	2	1.33
DTMUV+ DuCV	1	0.67
NDV+ DuCV	2	1.33
DHAV-A+MDRV	1	0.67
DHAV-A+DuCV	1	0.67

PCR 检测 81 株, GeXP 多重 PCR 检出阳性率为 59.33%, 普通 RT-PCR 检出阳性率为 54.00%, 混合感染检出率为 9.33%。分离鉴定结果与 GeXP 检测方法的结果一致(尚无体外增殖方法的鸭圆环病毒除外)。所有检测阳性结果均送至北京华大基因公司测序, 测序结果均为阳性。结果说明所建立的 GeXP 方法与普通 PCR 方法相比更为敏感与准确。

3 讨论

多重普通 PCR 和多重荧光 PCR 可同时检测多种病原体, 既省时又省力, 这两种近几年兴起的分子检测技术是在多种疾病混合感染中应用比较多的鉴别诊断方法^[28-29]。但在实际应用中, 多重 PCR 检测

技术也存在缺陷, 即反应体系中多对引物组合会互相干扰, 很难实现同时对 4 种以上病原体的高通量扩增。H5、H7 和 H9 亚型 AIV、DHAV-A、DTMUV、EDSV、DEV、NDV、DuCV、MDRV 和 MDPV 是严重危害鸭的 9 种主要传染性疾病。这些病毒病在临床上常以混合感染形式存在, 临床症状较为相似^[2], 需借助实验室操作做进一步诊断。传统的病毒分离鉴定及血清学方法等耗时耗力, 还达不到快速鉴别诊断的要求。因此, 建立一种既特异又灵敏的 GeXP 高通量检测方法, 对于鸭常见病毒病的防控是非常迫切和必要的。目前本实验室已成功建立有同时检测 9 种鸡呼吸道病病原体 GeXP 检测方法^[21-22]。

本研究依据多重 PCR 引物设计原则, 设计了 H5、H7 和 H9 亚型 AIV、DHAV-A、DEV、DTMUV、NDV、EDSV、MDRV、MDPV、DuCV 和 AIV (通用引物) 的特异性引物共 12 对。GeXP 多重基因表达分析系统是基于多重 PCR 技术, 将嵌合特异性引物和荧光标记通用引物相结合, 通过筛选, 首先确保了 12 对引物之间互不干扰和每对引物扩增的特异性。通用引物在 PCR 循环中起到主导作用, 引发特异性产物的扩增, 即使反应体系存在多对引物, 每个模板的扩增效率也能趋于一致。PCR 产物经毛细管电泳后, 可根据片段大小和荧光峰值判断检测结果。由于检测的病原体基因序列可能存在个别碱基的差异以及 GeXP 系统自身的误差, 目的片段

显示的峰值可能与预计大小有 1~3 个碱基的差异,在筛选引物组合的时候,每对引物扩增目的片段大小差异应大于 7 个碱基,避免可能造成不同目的信号峰交叉或重叠。毛细管电泳的灵敏度很高,实验室应实行严格分区操作,避免各环节交叉污染而导致出现假阳性结果。

作为一种快速、敏感、准确、高通量的新型分子生物学诊断方法,GeXP 方法目前已实现了人的 7 种人腹泻病毒、11 种亚型人乳头瘤病毒、手足口病的 9 种常见的肠道病毒的同时检测以及动物的 9 种鸡呼吸道病病原体、6 种鸡免疫抑制病病原体、8 种猪呼吸道和繁殖障碍病病原体的鉴别诊断等^[16-22,30]。本研究通过对单一或混合模板检测试验,验证了 GeXP 多重 PCR 的特异性及准确性,成功建立了同时检测 9 种鸭病毒病的 GeXP 多重 PCR 检测方法,该方法灵敏度较高,1 000 拷贝· μL^{-1} 能同时检出 9 种鸭病病原体。并用 150 份临床样品对该法进一步验证,结果与普通 PCR 比较,GeXP 方法检测出 89 株阳性,普通 PCR 检出 81 株,GeXP 多重 PCR 检出阳性率为 59.33% (其中混合感染检出率为 9.33%),普通 RT-PCR 检出阳性率为 54.00%,测序结果表明该 GeXP 多重 PCR 检测更为敏感与准确。该方法应用于临床诊断时,一方面,应注意近期是否注射活疫苗,结合临床症状加以判断;另一方面,流行病学调查发现病毒处于不断变异的状态,故一套 GeXP 检测方法不能永久地满足临床样品检测的需求,需要不断更新病毒序列的信息,设计更多 GeXP 引物来应对病毒不断变异的检测要求。

4 结 论

本研究利用 GeXP 多重基因表达遗传分析系统,建立一种能同时鉴别多种鸭常见病毒病的检测方法,关键是设计特异性引物,将多重引物组合,利用通用引物,把多重引物的扩增转化为 1 对通用引物的扩增,从而达到高通量检测的目的。本研究建立的 GeXP 多重检测方法可同时鉴别诊断 9 种鸭病毒病,是一种特异性强、敏感性高、高通量的新型分子检测方法,适用于鸭常见病毒感染或混合感染的鉴别监测,对及时有效防制鸭常见病毒病有重要意义。

参考文献 (References):

[1] 麦尔旦·吐尔孙,闫建伟,王雅鹏. 中国肉鸭产业的

区域优势分析——基于全国 21 个水禽主产省(市、区)的研究[J]. 农业现代化研究, 2013(4):477-481. MAI E D·T E S, YAN J W, WANG Y P. Analysis on regional advantages of china's meat duck industry-based on researches in 21 main waterfowl-producing provinces (cities and districts)[J]. *Research of Agricultural Modernization*, 2013(4): 477-481. (in Chinese)

[2] 张大丙. 当前鸭病流行现状及防控对策[J]. 中国家禽, 2012, 34(7):38-40.

ZHANG D B. The current epidemic status of duck disease and its prevention and control strategies[J]. *China Poultry*, 2012, 34:38-40. (in Chinese)

[3] 曾婷婷,谢芝勋,谢丽基,等. 4 株广西鸭源坦布苏病毒分离及初步鉴定[J]. 中国动物检疫, 2013, 30(6):31-35.

ZENG T T, XIE Z Z, XIE L J, et al. Isolation and identification of duck tembusu virus from Guangxi [J]. *China Animal Health Inspection*, 2013,30(6): 31-35. (in Chinese)

[4] HOTTA K, TAKAKUWA H, YABUTA T, et al. Antibody survey on avian influenza viruses using egg yolks of ducks in Hanoi between 2010 and 2012[J]. *Vet Microbiol*, 2013, 166(1-2):179-183.

[5] SCHMITZ A, LE BRAS M O, GUILLEMOTO C, et al. Evaluation of a commercial ELISA for H5 low pathogenic avian influenza virus antibody detection in duck sera using Bayesian methods[J]. *J Virol Methods*, 2013, 193(1):197-204.

[6] WANG G, QU Y, WANG F, et al. The comprehensive diagnosis and prevention of duck plague in north-west Shandong province of China[J]. *Poult Sci*, 2013, 92(11):2892-2898.

[7] 谢芝勋,谢志勤,刘加波,等. 用聚合酶链反应检测鸭瘟病毒的研究[J]. 中国兽药杂志, 2000, 34(4): 10-12.

XIE Z X, XIE Z Q, LIU J B, et al. Detection of duck plague virus using the polymerase chain reaction[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2000, 34(4): 10-12. (in Chinese)

[8] WOŹNIAKOWSKI G, SAMOREK-SALAMONOW-ICZ E, KOZDRUŃ W. Quantitative analysis of waterfowl parvoviruses in geese and Muscovy ducks by real-time polymerase chain reaction; correlation between age, clinical symptoms and DNA copy number of waterfowl parvoviruses[J]. *BMC Vet Res*, 2012, 8:29.

- [9] 谢丽基, 谢芝勋, 庞耀珊, 等. 鸭 I 型肝炎病毒荧光定量 RT-PCR 方法的建立及初步应用[J]. 中国家禽, 2012, 34(10):23-26.
XIE L J, XIE Z X, PANG Y S, et al. Development and application of Real-time RT-PCR assay for detection of duck hepatitis virus type I [J]. *China Poultry*, 2012, 34(10):23-26. (in Chinese)
- [10] XIE L, XIE Z, ZHAO G, et al. A loop-mediated isothermal amplification assay for the visual detection of duck circovirus[J]. *Virol J*, 2014, 11:76.
- [11] 谢芝勋, 谢丽基, 刘加波, 等. 禽流感和新城疫病毒二重荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 生物技术通讯, 2008, 19(3):410-413.
XIE Z X, XIE L J, LIU J B, et al. Development of a multiplex real-time RT-PCR assay of avian influenza virus and Newcastle disease virus[J]. *Letters in Biotechnology*, 2008, 19 (3):410-413. (in Chinese)
- [12] 张艳芳, 谢芝勋, 谢丽基, 等. 鸭坦布苏病毒和鸭瘟病毒二重 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 南方农业学报, 2014, 45(2):314-317.
ZHANG Y F, XIE Z X, XIE L J, et al. Development of a duplex RT-PCR assay for detection of duck tembusu virus and duck plague virus [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2014, 45 (2): 314-317. (in Chinese)
- [13] 张艳芳, 谢芝勋, 谢丽基, 等. 鸭坦布苏病毒和鸭瘟病毒二重荧光定量 RT-PCR 方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41 (3):77-82.
ZHANG Y F, XIE Z X, XIE L J, et al. Development of duplex real-time RT-PCR assay for detection of duck Tembusu virus and duck plague virus[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2014, 41 (3): 77-82. (in Chinese)
- [14] ZENG Z, LIU Z, WANG W, et al. Establishment and application of a multiplex PCR for rapid and simultaneous detection of six viruses in swine[J]. *J Virol Methods*, 2014, 208:102-106.
- [15] 卢 昌, 吴国华, 颜新敏, 等. GeXP 多重基因表达分析系统及其应用[J]. 中国兽医科学, 2013, 43 (2):216-220.
LU C, WU G H, YAN X M, et al. GeXP based on multiplex system and its application[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2013, 43(2): 216-220. (in Chinese)
- [16] HU X, XU B, YANG Y, et al. A high throughput multiplex PCR assay for simultaneous detection of seven aminoglycoside-resistance genes in Enterobacteriaceae[J]. *BMC Microbiol*, 2013, 13:58.
- [17] 何 玢, 王环宇, 张 晨, 等. 8 种脑炎相关虫媒病毒 GeXP 检测方法的建立[J]. 病毒学报, 2012, 28 (1):57-62.
HE B, WANG H Y, ZHANG C, et al. Development of a GeXP based multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of eight arboviruses related to encephalitis[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2012, 28(1):57-62. (in Chinese)
- [18] QIN M, WANG D Y, HUANG F, et al. Detection of pandemic influenza A H1N1 virus by multiplex reverse transcription-PCR with a GeXP analyzer[J]. *J Virol Methods*, 2010, 168 (1-2):255-258.
- [19] YANG M, LUO L, NIE K, et al. Genotyping of 11 human papillomaviruses by multiplex PCR with a GeXP analyzer[J]. *J Med Virol*, 2012, 84(6):957-963.
- [20] HU X, ZHANG Y, ZHOU X, et al. Simultaneously typing nine serotypes of enteroviruses associated with hand, foot, and mouth disease by a GeXP analyzer-based multiplex reverse transcription-PCR assay[J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50 (2):288-293.
- [21] XIE Z, LUO S, XIE L, et al. Simultaneous typing of nine avian respiratory pathogens using a novel GeXP analyzer-based multiplex PCR assay [J]. *J Virol Methods*, 2014, 207:188-195.
- [22] 张民秀, 谢芝勋, 邓显文, 等. 8 种猪呼吸道和繁殖障碍病病原体 GeXP 检测方法的建立[J]. 中国农业科学, 2015, 48(24):4996-5006.
ZHANG M X, XIE Z X, DENG X W, et al. Establishment of a GeXP analyser-based multiplex PCR assay for detection of eight reproductive and respiratory swine pathogens [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2015, 48(24):4996-5006. (in Chinese)
- [23] 曾婷婷, 谢芝勋, 谢丽基, 等. 应用二重实时荧光定量 RT-PCR 鉴别坦布苏病毒与产蛋下降综合征病毒 [J]. 中国家禽, 2015, 37(1): 17-21.
ZENG T T, XIE Z X, XIE L J, et al. Development of duplex Real-time fluorescence RT-PCR assay for differential detection of Tembusu virus and egg drop syndrome virus [J]. *China Poultry*, 2015, 37(1): 17-21. (in Chinese)
- [24] 张艳芳, 谢芝勋, 谢丽基, 等. 鸭坦布苏病毒与鸭圆环病毒二重 RT-PCR 方法的建立[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2014 (12): 44-47.
ZHANG Y F, XIE Z X, XIE L J, et al. Establishment of a duplex RT-PCR assay for detection of duck Tembusu virus and duck circovirus[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2014

- (12): 44-47. (in Chinese)
- [25] 胡奇林, 林锋强, 陈少莺, 等. 应用 RT-PCR 技术检测番鸭呼肠孤病毒[J]. 中国兽医学报, 2004, 24(3): 231-232.
HU Q L, LIN F Q, CHENG S Y, et al. Detection of muscovy duck reovirus by RT-PCR [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2004, 24(3): 231-232. (in Chinese)
- [26] 谢丽基, 谢芝勋, 邓显文, 等. 鸭 I 型肝炎病毒和番鸭细小病毒二重荧光定 RT-PCR 方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2013, 33(8): 1184-1189.
XIE L J, XIE Z X, DENG X W, et al. Development of duplex real-time RT-PCR assay for detection of duck hepatitis virus type I and muscovy duck parvovirus [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2013, 33(8): 1184-1189. (in Chinese)
- [27] 李 瑾, 毛乃颖, 秦 萌, 等. GeXP 多重 PCR 技术同时检测 12 种常见呼吸道病毒[J]. 病毒学报, 2011, 27(6): 526-532.
LI J, MAO N Y, QIN M, et al. A GeXP based multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of twelve human respiratory viruses [J]. *Chinese Journal of Virology*. 2011, 27(6): 526-532. (in Chinese)
- [28] 罗思思, 谢芝勋, 谢丽基, 等. 同时鉴别 6 种鸡病毒性呼吸道病 GeXP 检测方法的建立[J]. 病毒学报, 2013(3): 250-257.
LUO S S, XIE Z X, XIE L J, et al. Development of a GeXP assay for simultaneous differentiation of six chicken respiratory viruses [J]. *Chinese Journal of Virology*, 2013(3): 250-257. (in Chinese)
- [29] XIE Z, PANG Y S, LIU J, et al. A multiplex RT-PCR for type A influenza virus and differentiation of avian H5, H7 and H9 hemagglutinin subtypes [J]. *Mol Cell Probes*, 2006, 20(3-4): 245-249.
- [30] 曾婷婷, 谢芝勋, 谢丽基, 等. 应用多重 GeXP-PCR 同时检测 6 种鸡免疫抑制病病毒的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(6): 1198-1208.
ZENG T T, XIE Z X, XIE L J, et al. Simultaneous detecting six immunosuppressive chicken virus by a GeXP analyser-based multiplex PCR assay [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2016, 47(6): 1198-1208. (in Chinese)

(编辑 白永平)