

# 应用多重 GeXP-PCR 同时检测 6 种鸡免疫抑制病病毒的研究

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

(广西壮族自治区兽医研究所广西畜禽疫苗新技术重点实验室, 南宁 530001)

**摘要:** 拟建立一种基于 GeXP 多基因表达分析系统的多重 PCR 方法, 同时检测 6 种鸡免疫抑制病病毒——鸡马立克病毒、禽白血病毒(包括 A、B 和 J 亚群)、禽网状内皮组织增生症病毒、禽呼肠孤病毒、鸡传染性贫血病毒和传染性法氏囊炎病毒。多重 PCR 反应使用嵌合引物和通用引物组合的反应体系, 经过 GeXP 多基因表达分析系统进行毛细管电泳, 鉴别 PCR 产物片段; 通过调整嵌合引物浓度、 $Mg^{2+}$  浓度、*Taq* 酶浓度优化反应体系及调整退火温度和时间优化反应条件。应用建立的多重 GeXP-PCR, 分别单独和同时检测 6 种鸡免疫抑制病病毒的 8 个目的基因, 同时以其他常见禽类病毒和鸡组织器官核酸为对照, 验证其特异性; 检测 8 个目的基因不同浓度的克隆质粒, 验证其敏感性; 应用建立的多重 PCR 检测 300 份临床样品, 并同时用荧光定量 PCR 和测序验证其检测结果的准确性。结果表明建立的多重 GeXP-PCR 方法能够分别扩增出 6 种病毒, 8 个特异性目的片段, 不能扩增其他常见禽类病毒和鸡组织器官的基因; 在低至  $100 \text{ copies} \cdot 20 \mu\text{L}^{-1}$  的水平能同时特异性地检测出 6 种鸡免疫抑制病病毒核酸; 检测 300 份临床病死鸡样品, 190 份样品显示为阳性, PCR 和测序结果与多重 GeXP-PCR 结果相符。本研究建立的多重 GeXP-PCR 方法可特异、敏感、高通量地检测 6 种鸡免疫抑制性病毒, 可用于临床鉴别诊断和分子流行病学调查, 具有很高的临床应用价值。

**关键词:** GeXP 多基因表达分析系统; 多重 PCR; 高通量; 鸡免疫抑制病病毒

中图分类号: S858.315.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2016)06-1198-11

## Simultaneous Detecting Six Immunosuppressive Chicken Viruses by a GeXP Analyser-based Multiplex PCR Assay

ZENG Ting-ting, XIE Zhi-xun\*, XIE Li-ji, DENG Xian-wen, XIE Zhi-qin,  
LUO Si-si, HUANG Li, HUANG Jiao-ling

(Guangxi Key Laboratory of Animal Vaccines and Diagnostics,  
Guangxi Veterinary Research Institute, Nanning 530001, China)

**Abstract:** The objective of this research was to develop a novel, high-throughput Genome Lab Gene Expression Profiler Analyser-based multiplex PCR method (GeXP-multiplex PCR) for simultaneous detection of 6 immunosuppressive chicken viruses. Using chimeric primers, 6 immunosuppressive chicken viruses, including Marek's disease virus (MDV), three subgroups of avian leucosis virus (ALV-A/B/J), reticuloendotheliosis virus (REV), infectious bursal disease virus (IBDV), chicken infectious anaemia virus (CIAV) and avian reovirus (ARV) were amplified and identified by their respective amplicon sizes. The concentration of the chimeric primers,  $Mg^{2+}$  and *Taq*, and annealing temperature, and time were optimised according to the amplification efficiency

收稿日期: 2015-09-29

基金项目: 国家自然科学基金(31160512); 广西自然科学基金(2014GXNSFC A118006); 广西特聘专家专项基金(2011B020); 广西水产畜牧兽医局科技项目(桂渔牧科 201452003; 201528013)

作者简介: 曾婷婷(1986-), 广西合浦人, 硕士, 助理研究员, 主要从事禽病原分子生物学研究, E-mail: tingtingzeng1986@163.com

\* 通信作者: 谢芝勋, 研究员, 广西特聘专家, E-mail: xiezhi-xun@126.com

of the GeXP-multiplex PCR assay. The assay specificity for each immunosuppressive viral target was individually and simultaneously tested with a mixture of 8 sets of chimeric primers in a multiplex PCR assay. Plasmid DNA and transcribed ssRNA were diluted to a final concentration ranging from  $10^5$  copies  $\cdot$   $20 \mu\text{L}^{-1}$  to 1 copy  $\cdot$   $20 \mu\text{L}^{-1}$  and then subjected to the GeXP-multiplex PCR assay with 8 sets of chimeric primers, both individually and in pre-mixed solutions. A total of 300 clinic specimens of disease chicken were detected by using GeXP-multiplex PCR. The results were confirmed using independent real-time PCR and sequencing to determine true positives. The specificity and sensitivity of the optimised GeXP-multiplex PCR assay were evaluated, and the data demonstrated that this technique could selectively amplify these 6 viruses at a sensitivity of 100 copies  $\cdot$   $20 \mu\text{L}^{-1}$  when all 6 viruses were present. Of the 300 examined clinical specimens, 190 were positive for immunosuppressive viruses according to the GeXP-multiplex PCR assay. The GeXP-multiplex PCR assay is a high-throughput, sensitive and specific method for the detection of 6 immunosuppressive viruses that can be used for differential diagnosis and molecular epidemiologic surveys.

**Key words:** GeXP analyser; multiplex PCR; high-throughput; chicken immunosuppressive viruses

鸡免疫抑制病病毒主要包括鸡马立克病毒 (Marek's disease virus, MDV)<sup>[1]</sup>、禽白血病病毒 (avian leucosis virus, ALV, 以 A、B 和 J 亚群 ALV 为主)<sup>[2]</sup>、禽网状内皮组织增生症病毒 (reticuloendotheliosis virus, REV)<sup>[3]</sup>、禽呼肠孤病毒 (avian reovirus, ARV)<sup>[4]</sup>、鸡传染性贫血病毒 (chicken infectious anaemia virus, CIAV)<sup>[5]</sup> 和传染性法氏囊炎病毒 (infectious bursal disease virus, IBDV)<sup>[6-7]</sup>, 这些病毒都能破坏鸡的免疫功能造成免疫抑制。鸡群感染免疫抑制病病毒后, 对致病菌和其他病毒更加易感, 发生继发感染, 接种疫苗后达不到预期免疫效果<sup>[8-9]</sup>, 饲料报酬降低和生长缓慢。鸡感染这些病毒后的临床症状各有不同, 但有些不是马上表现出来。鸡感染 MDV、ALV 和 REV 后, 免疫抑制比肿瘤出现早得多<sup>[1,3]</sup>。小于 3 周龄的雏鸡感染 IBDV 有时不会出现典型症状, 但仍出现免疫抑制<sup>[9]</sup>。超过 3 周龄的雏鸡感染 CIAV 后, 能产生一定的免疫力, 不会引起贫血, 但仍然会发生免疫抑制<sup>[10]</sup>。临床上常见几种免疫抑制病毒混合感染, 使诊断更加困难<sup>[11-12]</sup>。

故对以上所述病毒感染进行鉴别诊断和检测尤为重要。常规的检测方法是病毒分离, 需要花费较长的周期。普通 PCR、荧光 PCR 和 LAMP 等分子生物学方法检测病毒比较快速, 但一个反应体系只能检测 2~4 种病毒。

GeXP 多基因表达分析系统是一种新的、高通量的基因检测平台<sup>[13]</sup>。通过毛细管电泳鉴定经过荧光

基因标记的多重 PCR 产物。PCR 体系使用嵌合引物和通用引物组合, 嵌合引物由特异性引物的 5' 端添加通用引物组成。上游嵌合引物由特异性引物和连接在其 5' 端的通用引物组成, 通用引物的 5' 端标记荧光基团, 下游嵌合引物亦由特异性引物和连接在其 5' 端的通用引物组成, 但不标记荧光基团。设计引物时, 使每对引物扩增的 PCR 产物之间至少相差 7~10 bp, 然后通过毛细管电泳辨认扩增片段大小。这项技术目前已经应用于诊断多种疾病, 如同时检测 11 种人乳头瘤病毒<sup>[14]</sup>, 9 种血清型的手足口病<sup>[15]</sup>, 癌基因<sup>[16]</sup>, 7 种肠炎病毒<sup>[17]</sup> 和人的 H1N1 病毒<sup>[18]</sup>。这项技术第一次应用于兽医领域是 2014 年本实验室用于检测 9 种鸡呼吸道病原<sup>[19]</sup>。

本研究旨在建立一种同时检测 MDV、ALV-A/B/J、REV、CIAV、IBDV 和 ARV 的多重 GeXP-PCR 方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物福利声明

本研究经过广西壮族自治区兽医研究所的动物福利委员会批准, 所使用的鸡胚和 SPF 鸡均符合动物福利标准, 动物宰杀和样品采集过程按照章程将动物的痛苦降至最低。

### 1.2 病毒毒株和临床样品采集

本研究中所使用病毒毒株为本实验室保存, 如表 1 所示。MDV、ALV-A/B/J 和 REV 使用 SPF 鸡胚制作的鸡胚成纤维细胞 (CEF) 增殖, IBDV 和

ARV 使用 9 日龄 SPF 鸡胚增殖, CIAV 使用 1 日龄 SPF 雏鸡增殖, 雏鸡腹膜注射含病毒的组织上清液, 2 周后收集雏鸡骨髓。临床样品采自送检病死

鸡, 共 300 羽病死鸡, 包括鸡胸腺、法氏囊、脾、肝、骨髓和血液, 将这些组织混合匀浆保存。病死鸡的日龄介于 50~135 d, 包括种鸡、蛋鸡和肉鸡。

表 1 毒株来源

Table 1 Sources of pathogens

病原 Pathogen	来源 Source
参考毒株 Reference viruses	
马立克病毒 Marek's disease virus KC453972, KC453973, GX130112, GX140301, 050118, 070123, 090201, 100428	GVRI
禽白血病病毒 A 亚群 Avian leucosis virus subgroup A isolate RSV-1	CVCC
禽白血病病毒 A 亚群 Avian leucosis virus subgroup A isolate GX110521, GX110522, ALVA01, ALVA02, ALVA03	GVRI
禽白血病病毒 B 亚群 Avian leucosis virus subgroup B isolate RSV-2	CVCC
禽白血病病毒 B 亚群 Avian leucosis virus subgroup B isolate GX111230, GX130401, ALVB15, ALVB23, ALVB28	GVRI
禽白血病病毒 J 亚群 Avian leucosis virus subgroup J isolate KC453974, KC453975, GX090201, GX090521, GX110110, GX120081, GX130018, GX140010	GVRI
禽网状内皮组织增生症病毒 Reticuloendotheliosis virus AV235	CVCC
禽网状内皮组织增生症病毒 Reticuloendotheliosis virus KC453976, KC453977, GX120825, GX131118	GVRI
禽呼肠孤病毒 Avian reovirus S1133, 1733, 526, C78, GuangxiR1, GuangxiR2, GX110058	GVRI
传染性法氏囊炎病毒 Infectious bursal disease virus CA, AV162, AV144	CVCC
传染性法氏囊炎病毒 Infectious bursal disease virus AV6	CIVDC
传染性法氏囊炎病毒 Infectious bursal disease virus 070124, 080113, 090053, 100008, 110110, 130223	GVRI
鸡传染性贫血病毒 Chicken infectious anaemia virus CAU0728, CAU0729, CAU0730, CAU0731, CAU0732	CVCC
鸡传染性贫血病毒 Chicken infectious anaemia virus GXC060821	GVRI
其他病毒 Other viruses	
禽流感病毒 Inactivated H5N1 avian influenza virus Re-1	HVRI
禽流感病毒 Avian influenza virus H9N6/Duck/HK/147/77	HKU
禽流感病毒 Avian influenza virus H7N2/chicken PA/3979/97	PU
新城疫病毒 Newcastle disease virus F48E9	GVRI
新城疫病毒 Newcastle disease virus GX6/02	GVRI
鸡传染性支气管炎病毒 Infectious bronchitis virus Massachusetts 41	GVRI
鸡传染性喉气管炎病毒 Infectious laryngotracheitis virus AV1231	CIVDC
鸡滑液囊支原体 <i>Mycoplasma synoviae</i> CAU0748	CVCC

HVRI. 哈尔滨兽医研究所; HKU. 香港大学; GVRI. 广西兽医研究所; CIVDC. 中国兽医药品监察所; PU. 宾夕法尼亚大学; CVCC. 中国兽医微生物保藏中心

HVRI. Harbin Veterinary Research Institute, China; HKU. University of Hong Kong, China; GVRI. Guangxi Veterinary Research Institute, China; CIVDC. China Institute of Veterinary Drugs Control, China; PU. University of Pennsylvania, USA; CVCC. China Veterinary Culture Collection Centre, China

### 1.3 试剂与仪器

RNA/DNA 共提试剂盒(E. Z. N. A.® Total DNA/RNA Isolation Kit)购自 OMEGA(Norcross, GA, USA);反转录试剂盒 TransScript II Reverse Transcriptase [M-MLV, RNase-] (High Temperature RT)购自全式金生物(北京,中国);多重 PCR 试剂盒 Genome Lab GeXP Starter Kit 购自贝克曼(Beckman Coulter, Brea, USA);样品缓冲液, DNA Marker, 上样板, 液体石蜡均购自贝克曼(Beckman Coulter, Brea, USA);pGEM-T 载体购自 Promega (Madison, USA), 普通 PCR 酶, 胶回收试剂盒, 感受态细胞购自全式金生物(北京,中国);限制性内切酶 *Spe* I 购自宝生物(大连,中国);DNA 体外转录试剂盒 RiboMAX Large Scale RNA Production Systems SP6/T7 Kit 购自 Promega (Madison, USA);PCR 仪购自 Thermo (Milford, USA);超微量分光光度计 NanoDrop 2000 购自 Thermo Fisher Scientific (Milford, USA);GeXP 多基因表达分析系统 GenomeLab GeXP Genetic Analysis System 购自贝克曼(Beckman Coulter, Brea, USA)。

### 1.4 RNA/DNA 抽提和 RNA 反转录

使用 RNA/DNA 共提试剂盒抽提 MDV 毒株细胞培养物;REV 和 ALV-A/B/J 毒株细胞培养物(含有 REV 和 ALV-A/B/J 的前病毒 DNA, proviral DNA)<sup>[20]</sup>, CIAV 人工感染 SPF 鸡的骨髓, IBDV 和 ARV 的鸡胚增殖的尿囊液的总 RNA/DNA。用无核酸酶超纯水溶解抽提好的 DNA/RNA, 于 -80 °C 条件保存备用。按照说明书将 IBDV 和 ARV 的 RNA 反转录为 cDNA 备用(反转录过程对抽提产物中的 DNA 无影响)。

### 1.5 引物设计和引物合成

将本实验室保存毒株的序列与 GenBank 公布的毒株序列经过 MEGA5.0 软件比对后, 在它们的保守区域用 Primer premier 5.0 软件设计特异性引物。通用引物为贝克曼公司专利产品, 不与任何现有物种的基因互补配对, 序列由贝克曼公司提供。特异性上游引物及其 5' 端加上通用引物序列, 并在通用引物的 5' 端标记荧光基团 Cy5 组成上游嵌合引物, 下游嵌合引物由下游特异性引物及其 5' 端加上通用引物序列组成, 但不标记荧光基团。所有的嵌合引物由上海英骏生物公司合成和纯化。引物序列见表 2。

### 1.6 建立多重 PCR 体系和反应程序

应用贝克曼 Genome Lab GeXP Starter Kit 建立

多重 PCR 体系:总反应体积为 20  $\mu$ L, 其中 5 $\times$  buffer 4  $\mu$ L, buffer 内含通用引物, 工作浓度为 0.25  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>;MgCl<sub>2</sub> (25  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 2  $\mu$ L;嵌合引物混合物 1  $\mu$ L; Thermo-Start DNA polymerase 0.35  $\mu$ L; cDNA/DNA 模板 1  $\mu$ L;无核酸酶超纯水补足体积。

多重 PCR 反应程序包括 3 步:95 °C 5 min 预变性后, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 10 个循环;94 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C 30 s, 10 个循环;94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 30 s, 10 个循环;72 °C 延伸 5 min, 结束反应。

### 1.7 毛细管电泳和结果分析

取 1  $\mu$ L PCR 产物和 38.75  $\mu$ L 样品缓冲液, 0.25  $\mu$ L DNA Marker 混合均匀, 加入上样板中, 滴加石蜡封闭液体表面。将上样板置于 GeXP 多基因表达分析系统仪器卡槽中, 进行高分辨率的毛细管电泳。不同大小片段的 PCR 产物在电泳过程中分离, 通过 PCR 产物携带的荧光基团辨认其片段大小和信号强度。电泳完成后, 使用仪器自带软件 eXpress Profiler software 分析结果, 横坐标表示片段大小, 纵坐标表示信号强度, 即 PCR 产物的含量。

### 1.8 基于 GeXP 的多重 PCR 方法的特异性和敏感性试验

根据电泳分析结果, 调整嵌合引物浓度、Mg<sup>2+</sup> 浓度、Taq 酶浓度优化反应体系及调整退火温度和时间优化反应条件。使用建立的多重 GeXP-PCR 方法, 分别以各毒株核酸、其他常见鸡病毒毒株(包括 H5/H7/H9 三个血清型的禽流感病毒、新城疫病毒、传染性支气管炎病毒和传染性喉气管炎病毒的核酸, 以及健康 SPF 鸡的胸腺、脾和法氏囊的核酸为模板), 检测该方法的特异性。

构建多重 GeXP-PCR 的各目的片段的重组质粒, 以此为模板测试建立的多重 GeXP-PCR 方法的敏感性。用特异性引物扩增各毒株的目的片段, 与 pGEM-T 载体连接后转化感受态细胞增殖, 并抽提质粒。构建好的质粒经过纯化和测序验证其序列的准确性。IBDV 和 ARV 的质粒经过 *Spe* I 酶切线性化之后体外转录为 ssRNA。所有 DNA 质粒和 ssRNA 均用紫外分光光度计测定浓度。以构建好的 DNA 质粒和 ssRNA 为模板, 按照建立的多重 GeXP-PCR 的流程, 单一模板的终浓度分别调整为 10<sup>5</sup> copies  $\cdot$  20  $\mu$ L<sup>-1</sup> 至 1 copy  $\cdot$  20  $\mu$ L<sup>-1</sup>, 测定多重 GeXP-PCR 对单一模板的敏感性;将单一模板等浓度混合为多重模板, 将每种模板的终浓度均调整为

表 2 引物序列信息

Table 2 Primer sequences

病毒 Virus	引物序列(5'-3') Primer sequence	扩增片段 /bp Amplicon size	目的 基因 Target region	引物浓度 /( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) Primer concentration
MDV	F: <u>AGGTGACACTATAGAATA</u> AAGGGAGCAGACGTACTATGTAGACAA R: GTACGACTCACTATAGGGATGGTAAGCAGTCCAAGGGTCA	227	<i>meq</i>	0.16
ALV-A	F: <u>AGGTGACACTATAGAATA</u> CAAGGGTTCTTGGTATCT R: GTACGACTCACTATAGGGATGTGCCTATCCGCTGTCA	155	<i>gp85</i>	0.2
ALV-B	F: <u>AGGTGACACTATAGAATA</u> TCAATCACGATTCTCCCACC R: GTACGACTCACTATAGGGATGTGACGCTTCGTTTACGTCTT	285	<i>gp85</i>	0.2
ALV-J	F: AGGTGACACTATAGAATACTGATGCAACAACCAGGAAA R: <u>GTACGACTCACTATAGGGAGCAGTGACATTAGTGACATACCC</u>	204	<i>gp85</i>	0.2
REV	F: AGGTGACACTATAGAATAGACCAGGCGAGCAAAAATC R: <u>GTACGACTCACTATAGGGAGGTGTAATAGGTAGGTATGGAGGA</u>	182	<i>gp90</i>	0.2
IBDV	F: <u>AGGTGACACTATAGAATA</u> AGGGTCAGGGCTAATTGTCTT R: GTACGACTCACTATAGGGATCTGTCAGTTCACCTCAGGCTTC	294	<i>VP2</i>	0.2
CIAV	F: <u>AGGTGACACTATAGAATA</u> AAAAGGCGAACAACCGATGA R: <u>GTACGACTCACTATAGGGATGCCCTGGAGGAAAAGACC</u>	269	<i>VP1</i>	0.2
ARV	F: <u>AGGTGACACTATAGAATA</u> AGGACCCCTACTTCTGTTCTCA R: <u>GTACGACTCACTATAGGGAATTTCCCGTGGACGACAT</u>	215	<i>S1</i>	0.16

F. 上游引物; R. 下游引物; 带下划线的为通用引物, 嵌合引物由通用引物和特异性引物一起合成组成

F. Forward primer; R. Reverse primer; Universal tag sequences are underlined. Chimeric primers were synthesised using universal tags and specific primers

$10^5$  copies  $\cdot$  20  $\mu\text{L}^{-1}$  至 1 copy  $\cdot$  20  $\mu\text{L}^{-1}$ , 测定多重 GeXP-PCR 对多重模板的敏感性。

### 1.9 模拟混合感染和干扰试验

为了测试建立的多重 GeXP-PCR 方法应用于临床时的准确性和敏感性, 将经过病毒分离和测序鉴定确诊为免疫抑制病毒感染的病鸡组织器官样品: 胸腺、法氏囊、骨髓、肝和血液随机组合并以任意比例混合, 抽提总 DNA/RNA, 按照建立的多重 GeXP-PCR 方法流程进行检测。

为了测试不同模板之间的浓度差异较大时, 不同浓度的模板对建立的多重 GeXP-PCR 方法引物扩增效率的影响和是否仍能敏感的检测到低浓度的模板, 使用不同浓度的阳性毒株核酸(最高模板浓度至少是最低模板浓度的  $10^4$  倍)随机组合为模板进行多重 GeXP-PCR, 并以单一模板为对照进行多重 GeXP-PCR。如随机挑选了 ALV-J、MDV 和 CIAV 作为组合。先以探针法荧光定量 PCR 测定模板浓度, 调整模板终浓度依次为  $10^7$ 、 $10^2$  和  $10^3$  copies  $\cdot$  20  $\mu\text{L}^{-1}$  进行多重 GeXP-PCR, 同时分别以相同浓度的 ALV-J 和

MDV 为单一模板进行多重 GeXP-PCR。

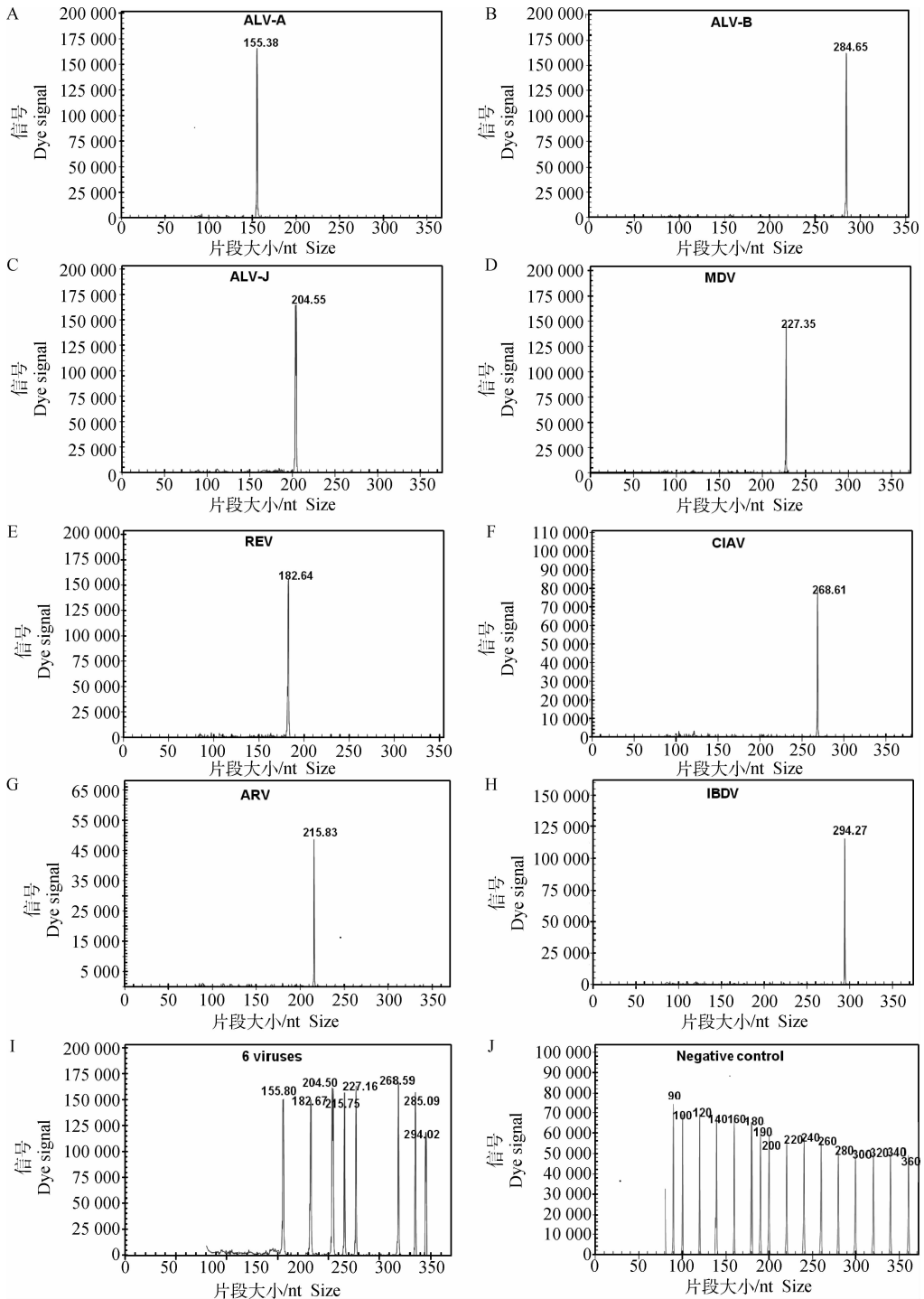
### 1.10 应用建立的多重 PCR 方法检测临床样品

采集病死鸡的胸腺、法氏囊、骨髓、脾、肝和血液, 混合匀浆后抽提总 DNA/RNA, 按照建立的多重 GeXP-PCR 方法进行检测。同时以本研究设计的特异性引物进行 SYBR Green I 定量 PCR, 并将 PCR 产物克隆测序, 验证阳性结果。

## 2 结果

### 2.1 特异性试验

经过体系优化, 最终嵌合引物的比例和浓度见表 2。应用建立的多重 GeXP-PCR 方法, 以表 1 中所列毒株为模板进行单一模板特异性试验, 经过 GeXP 电泳, 均得到特异性单峰, 图 1A~H 所示为单一模板电泳图, 片段大小与引物设计预期相符; 进行多模板特异性试验, 经过 GeXP 电泳, 同时得到 8 个特异性单峰; 以表 1 中其他禽病原体 and SPF 健康鸡组织核酸为模板, 无扩增片段。单重模板、多重模板均无非特异扩增峰, 见图 1。



多重 GeXP-PCR 的单一模板特异性试验: A. ALV-A, 155.38 bp; B. ALV-B, 284.65 bp; C. ALV-J, 204.55 bp; D. MDV, 227.35 bp; E. REV, 182.64 bp; F. CIAV, 268.61 bp; G. ARV, 215.83 bp; H. IBDV, 294.27 bp; 多重 GeXP-PCR 的多重模板特异性试验: I. 6 种病毒, 8 个特异性片段依次为 ALV-A, 155.80 bp; REV, 182.67 bp; ALV-J, 204.50 bp; ARV, 215.75 bp; MDV, 227.16 bp; CIAV, 268.59 bp; ALV-B, 285.09 bp; IBDV, 294.02 bp; J. 阴性对照以其他禽病原体 and SPF 鸡组织核酸为模板, 单峰为 marker

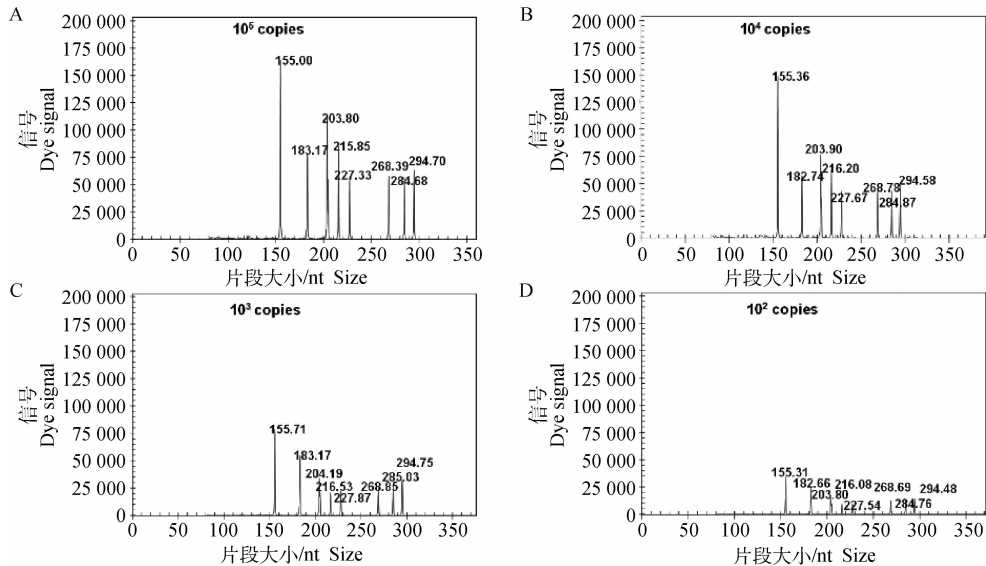
The GeXP-multiplex PCR assay was performed using a single template and mixed primers for the following: A. ALV-A, 155.38 bp; B. ALV-B, 284.65 bp; C. ALV-J, 204.55 bp; D. MDV, 227.35 bp; E. REV, 182.64 bp; F. CIAV, 268.61 bp; G. ARV, 215.83 bp; H. IBDV, 294.27 bp; I. The GeXP-multiplex PCR assay was performed using mixed templates and mixed primers for the following: 8 single products: ALV-A, 155.80 bp; REV, 182.67 bp; ALV-J, 204.50 bp; ARV, 215.75 bp; MDV, 227.16 bp; CIAV, 268.59 bp; ALV-B, 285.09 bp; IBDV, 294.02 bp; J. Negative control was performed using nucleic acid of others avian viruses and SPF chicken, signal was marker

图 1 多重 GeXP-PCR 特异性试验经 GeXP 电泳结果

Fig. 1 Specificity of GeXP-multiplex PCR assay

## 2.2 敏感性试验

应用建立的多重 GeXP-PCR 方法进行敏感性试验,使用构建的 DNA 质粒或 ssRNA 为单一模板时,ALV-A、ALV-J、REV、CIAV 和 ARV 的最低检测值为  $10 \text{ copies} \cdot 20 \mu\text{L}^{-1}$ ; MDV、ALV-B 和 IBDV 为  $10^2 \text{ copies} \cdot 20 \mu\text{L}^{-1}$ 。6 种病毒 8 个目的基



使用构建的 DNA 质粒和 ssRNA 为模板进行多重 GeXP-PCR 方法,每个反应每种模板分别为 A.  $10^5 \text{ copies} \cdot 20 \mu\text{L}^{-1}$ ; B.  $10^4 \text{ copies} \cdot 20 \mu\text{L}^{-1}$ ; C.  $10^3 \text{ copies} \cdot 20 \mu\text{L}^{-1}$ ; D.  $10^2 \text{ copies} \cdot 20 \mu\text{L}^{-1}$

The GeXP-multiplex PCR assay was performed using equal amounts of specific DNA-containing plasmid template and *in vitro* transcribed ssRNA corresponding to 6 immunosuppressive viruses, 8 templates at concentrations: A.  $10^5 \text{ copies} \cdot 20 \mu\text{L}^{-1}$ , B.  $10^4 \text{ copies} \cdot 20 \mu\text{L}^{-1}$ , C.  $10^3 \text{ copies} \cdot 20 \mu\text{L}^{-1}$ , D.  $10^2 \text{ copies} \cdot 20 \mu\text{L}^{-1}$

图 2 多重 PCR 敏感性试验 GeXP 电泳结果

Fig. 2 Sensitivity of GeXP-multiplex PCR assay

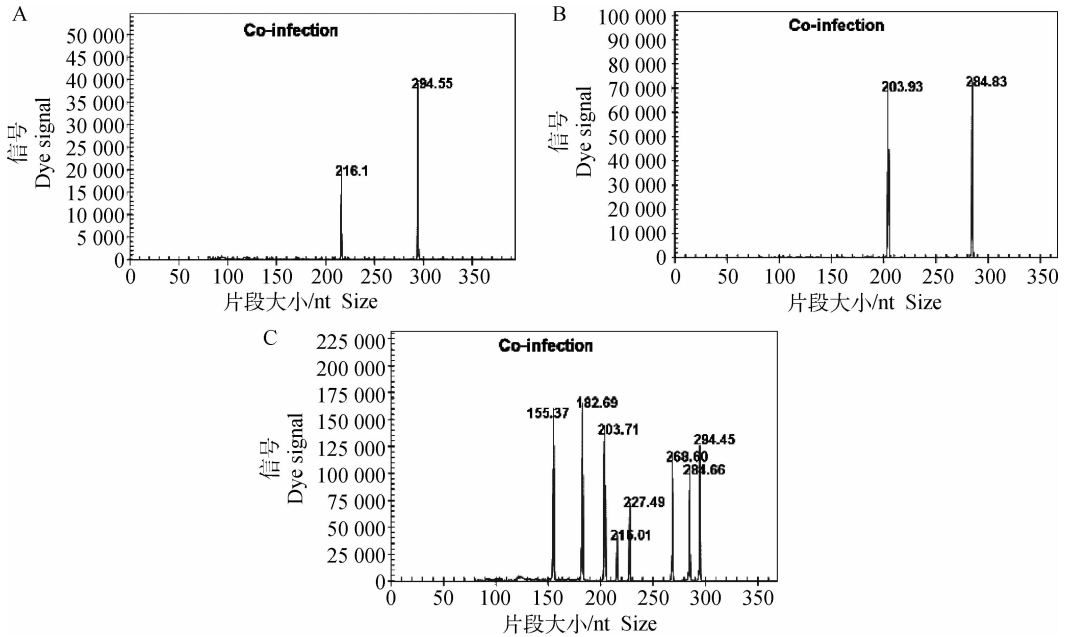
## 2.3 模拟混合感染和干扰试验

将确诊为免疫抑制病毒阳性的病料随机混合,应用建立的多重 GeXP-PCR 方法进行检测,得到与预期相符合特异性单峰,图 3 所示为随机混合 ARV 和 IBDV, ALV-J 和 ALV-B 以及 6 种病毒病料混合的电泳结果。将构建的 DNA 质粒和 ssRNA 按照 ALV-J  $10^7 \text{ copies} \cdot 20 \mu\text{L}^{-1}$ , MDV  $10^2 \text{ copies} \cdot 20 \mu\text{L}^{-1}$  和 CIAV  $10^3 \text{ copies} \cdot 20 \mu\text{L}^{-1}$  为反应体系终浓度的比例混合,应用建立的多重 GeXP-PCR 方法进行检测,同时分别以同一浓度的单一模板为对照,结果显示,当不同模板的浓度悬殊时,仍能准确敏感地检测出低浓度的模板,并且多重模板和单一模板的产物浓度相差不大,如图 4 所示。

## 2.4 临床样品检测

300 份临床样品检测结果见表 3。同时使用本研

究中设计的特异性引物进行单重 SYBR Green I 定量 PCR 检测临床样品,将 PCR 产物克隆测序,并与建立的多重 GeXP-PCR 对比检测结果。结果显示,应用建立的多重 GeXP-PCR 结果与定量 PCR 结果相符,并且测序结果显示阳性结果均为对应的病毒。300 份临床样品中,190 份样品检测结果为阳性,其中单重感染 119 份,ALV-A 6 份,ALV-B 2 份,ALV-J 21 份,MDV 26 份,REV 15 份,IBDV 17 份,CIAV 9 份和 ARV 23 份;混合感染 71 份:MDV+ALV-A 4 份,MDV+ALV-J 25 份,ALV-B+ALV-J 1 份,MDV+ALV-J+REV 6 份,MDV+CIAV 5 份,MDV+REV 6 份,ALV-J+REV 3 份,IBDV+ALV-J 5 份,MDV+CIAV+ALV-J 4 份,REV+ARV 3 份,ALV-J+ARV 6 份,ALV-J+IBDV 3 份。

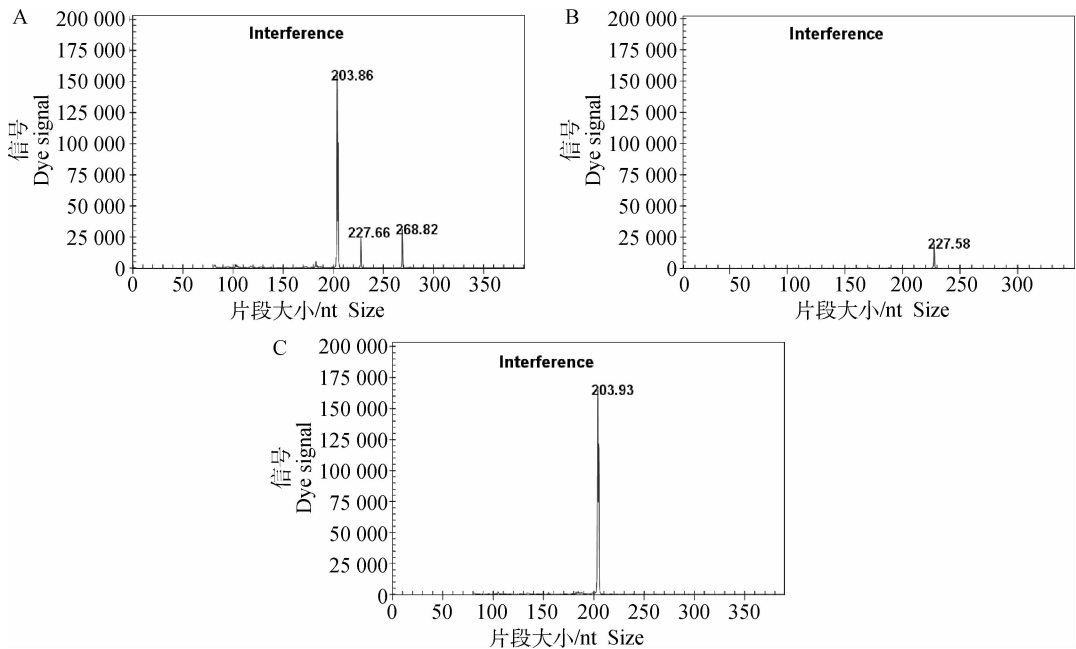


将 ARV 和 IBDV, ALV-J 和 ALV-B, 以及 6 种免疫抑制病病毒的病料为模板, 模拟混合感染情况: A. ARV 和 IBDV; B. ALV-J 和 ALV-B; C. 6 种免疫抑制病病毒

The GeXP-multiplex PCR assay was performed using artificially mixed templates and mixed primers for ARV and IBDV, ALV-J and ALV-B, or 6 immunosuppressive viruses; A. ARV and IBDV; B. ALV-J and ALV-B; C. 6 immunosuppressive viruses

图 3 多重 PCR 模拟混合感染的 GeXP 电泳结果

Fig. 3 Artificially mixed templates for the GeXP-multiplex PCR assay



A. ALV-J  $10^7$  copies  $\cdot 20 \mu\text{L}^{-1}$ , MDV  $10^2$  copies  $\cdot 20 \mu\text{L}^{-1}$  和 CIAV  $10^3$  copies  $\cdot 20 \mu\text{L}^{-1}$  的反应体系终浓度的比例混合为模板进行多重 GeXP-PCR 检测; B. 以 MDV  $10^2$  copies  $\cdot 20 \mu\text{L}^{-1}$  的浓度为模板进行多重 GeXP-PCR 检测; C. 以 ALV-J  $10^7$  copies  $\cdot 20 \mu\text{L}^{-1}$  的浓度为模板进行多重 GeXP-PCR 检测

A. The GeXP-multiplex PCR assay was performed using templates for ALV-J  $10^7$  copies  $\cdot 20 \mu\text{L}^{-1}$ , MDV  $10^2$  copies  $\cdot 20 \mu\text{L}^{-1}$  and CIAV  $10^3$  copies  $\cdot 20 \mu\text{L}^{-1}$ ; B. MDV  $10^2$  copies  $\cdot 20 \mu\text{L}^{-1}$ ; C. ALV-J  $10^7$  copies  $\cdot 20 \mu\text{L}^{-1}$

图 4 干扰试验多重 PCR 反应经 GeXP 电泳结果

Fig. 4 GeXP-multiplex PCR interference assays



表 3 临床样品检测结果

Table 3 Detection results for clinical specimens

	单重感染 Single infection										
	MDV	ALV-A	ALV-B	ALV-J	REV	IBDV	CIAV	ARV	MDV+ ALV-A	MDV+ ALV-J	ALV-B+ ALV-J
数量 Number	2.6	6	2	21	15	17	9	23	4	25	1
比例/% Rate	8.7	2.0	0.7	7.0	5.0	5.7	3.0	7.7	1.3	8.3	0.4
定量 PCR 结果											
Real-time PCR results	26	6	2	21	15	17	9	23	4	25	1
测序结果											
Sequencing results	26	6	2	21	15	17	9	23	4	25	1
	混合感染 Co-infection										
	MDV+ALV- J+REV	MDV+ CIAV	MDV+ REV	ALV-J+ REV	IBDV+ ALV-J	MDV+CIAV +ALV-J	REV+ ARV	ALV-J+ ARV	ALV-J+ IBDV		
数量 Number	6	5	6	3	5	4	3	6	3		
比例/% Rate	2.0	1.6	2.0	1.5	1.6	1.3	1.0	2.0	1.0		
定量 PCR 结果											
Real-time PCR results	6	5	6	3	5	4	3	6	3		
测序结果											
Sequencing results	6	5	6	3	5	4	3	6	3		

### 3 讨论

MDV、ALV (以 ALV-A/B/J 为主)、REV、IBDV、CIAV 和 ARV 是引起鸡免疫抑制的主要几种病原,并且常常发生混合感染,给诊断带来极大的难度<sup>[11-12,21]</sup>。传统的分子生物学检测方法存在比较耗时和每个反应检测项目少的限制,常规的 PCR 或定量 PCR 往往每个反应只能检测 2~4 种病原。

基于 GeXP 多基因表达分析系统的多重 PCR 方法,以其优越的特异性,敏感性和高通量为同时鉴别诊断以上几种病原提供了解决方案<sup>[22-23]</sup>。首先,利用嵌合引物和通用引物组合的 3 步法的 PCR 扩增程序为多重 PCR 提高了特异性和大大降低引物间互相干扰扩增效率的影响。第一步 10 个循环的 PCR 扩增是由嵌合引物中的特异性引物部分引发,特异性引物结合在目的基因上引发原始扩增,同时通用引物经过特别设计不会与常见的生物序列结合,故不会出现通用引物引发的非特异性扩增;第二

步 10 个循环是由嵌合引物引发,嵌合引物结合在之前 10 个循环的 PCR 产物的两端,继续进行指数型扩增,由于这一步的退火温度比第一步高 13 °C,特异性引物部分不会再结合到原始模板上,保证了嵌合引物整体结合在前 10 个循环的 PCR 产物上;第三步 10 个循环主要是通用引物介导的所有 PCR 产物的同步扩增,通用引物结合在含有通用引物序列的 PCR 产物上,最大化降低由于不同特异性引物混合对扩增效率的影响,使所有的 PCR 产物都得到几乎相同的扩增效率,避免在检测临床样品时,某种病毒载量较低时导致假阴性。

其次,建立的多重 GeXP-PCR 方法具优良的敏感性。多重 PCR 扩增后,PCR 产物经过毛细管电泳辨认产物片段大小,结果与预期片段大小相差 1 bp 内可判断为阳性结果,如 ALV-A 的预期 PCR 产物片段大小为 155 bp,若得到的 PCR 产物含有 154~156 bp 的片段,即可认为 ALV-A 检测结果为阳性。GeXP 毛细管电泳后,经过软件分析,PCR 产

物以单峰形式呈现,单峰峰值 2 000 荧光单位( absorbance units, A. U. ) 以上为阳性扩增。本研究的敏感性试验中,多重模板的最低检测水平为每种模板  $100 \text{ copies} \cdot 20 \mu\text{L}^{-1}$  反应体系,最小的峰值为 9 000 A. U., 远远高于阳性阈值,说明建立的多重 GeXP-PCR 方法具有优良的敏感性。

再次,建立的多重 GeXP-PCR 方法具高通量的优点<sup>[16]</sup>。GeXP 能辨认 110~400 bp 范围内的 PCR 片段,只要两个目的片段之间相差 7~10 bp 即可分辨,故每个反应可检测 20 个以上目的基因;应用嵌合引物和通用引物的多重 PCR,一个反应也可以同时检测 8 个以上目的基因<sup>[14,23-25]</sup>,比传统的多重 PCR 或多重定量 PCR 每个反应检测目的基因数目多一倍以上<sup>[26-27]</sup>。检测一份样品,只需抽提一次,PCR 加样一次,电泳一次,即可得到 8 种以上目的基因的检测结果。一个电泳上样板为 96 孔板,操作一次 GeXP 即可检测 96 份样品。这在进行大规模检测或流行病学调查时,尤其凸显其高通量的优势。

应用建立的多重 GeXP-PCR 方法检测 300 份临床样品,同时用本研究设计的特异性引物进行单重定量 PCR 检测,PCR 产物测序验证阳性结果的准确性为 100%。同时经过不断的流行病学调查,我们也发现病毒不断处于变异的状态,故一套多重 GeXP-PCR 体系将不能长期满足临床检测的需求,需要不断更新病毒序列信息,设计更多的引物来达到应对病毒不断变异的要求。

在实际操作中,MDV 和 CIAV 是 DNA 病毒,ALV (以 ALV-A/B/J 为主)、REV、IBDV 和 ARV 是 RNA 病毒,故使用 RNA/DNA 共提试剂盒进行核酸提取,再进行反转录,使用的反转录试剂盒对核酸中的 DNA 成分无影响。同时 ALV 和 REV 属于逆转录病毒,抽提的 DNA 中也含有病毒基因组逆转录嵌入宿主基因组的前病毒 DNA,故进行多重 PCR 检测时,是同时以 ALV 和 REV 的基因组 RNA 和前病毒 DNA 为模板。

## 4 结 论

本研究建立的基于 GeXP 多基因表达分析系统的多重 PCR 方法,能够特异、敏感和高通量的鉴别检测 6 种鸡免疫抑制病病毒,可以成为临床鉴别诊断和流行病学调查时的有力工具。

## 参考文献 (References):

[1] CALNEK B. Pathogenesis of Marek's disease virus

infection[M]. Marek's Disease. Berlin: Springer, 2001:25-55.

[2] FADLY A M, WITTER R L, LEE L F. Effects of chemically or virus-induced immunodepression on response of chickens to avian leukosis virus[J]. *Avian Dis*, 1985, 29(1):12-25.

[3] ENRIETTO P J, WYKE J A. The pathogenesis of oncogenic avian retroviruses[J]. *Adv Cancer Res*, 1983, 39:269-314.

[4] ROESSLER D E. Studies on the pathogenicity and persistence of avian reovirus pathotypes in relation to age resistance and immunosuppression [M]. Delaware: University of Delaware, 1987.

[5] SMYTH J A, MOFFETT D A, CONNOR T J, et al. Chicken anaemia virus inoculated by the oral route causes lymphocyte depletion in the thymus in 3-week-old and 6-week-old chickens[J]. *Avian Pathol*, 2006, 35(3):254-259.

[6] SHARMA J M, KIM I J, RAUTENSCHLEIN S, et al. Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression[J]. *Dev Comp Immunol*, 2000, 24(2-3):223-235.

[7] 佟美姣, 高雪丽, 李博韬, 等. 传染性法氏囊病毒对 SPF 雏鸡免疫器官细胞凋亡及 *bcl-2* mRNA 表达的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(4):617-621.

TONG M J, GAO X L, LI B T, et al. The apoptosis and expression of *bcl-2* mRNA in the immune organs of SPF chicks infected with infectious bursal disease virus[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2013, 44(4):617-621. (in Chinese)

[8] CUI Z Z, SUN S, WANG J. Reduced serologic response to Newcastle disease virus in broiler chickens exposed to a Chinese field strain of subgroup J avian leukosis virus[J]. *Avian Dis*, 2006, 50(2):191-195.

[9] FARAGHER J T, ALLAN W H, WYETH P J. Immunosuppressive effect of infectious bursal agent on vaccination against Newcastle disease[J]. *Vet Rec*, 1974, 95(17):385-388.

[10] MCCONNELL C D, ADAIR B M, MCNULTY M S. Effects of chicken anemia virus on cell-mediated immune function in chickens exposed to the virus by a natural route[J]. *Avian Dis*, 1993, 37(2):366-374.

[11] 张洪海, 刘青, 邱波, 等. 地方柴鸡中 J 亚群禽白血病与马立克氏病的混合感染[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(8):1215-1221.

ZHANG H H, LIU Q, QIU B, et al. Mixed infection of ALV-J and MDV in a flock of Shandong free range

- chickens[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2009,40(8):1215-1221. (in Chinese)
- [12] 秦立廷,高玉龙,潘伟,等.我国部分地区蛋鸡群 ALV-J 及与 REV、MDV、CAV 混合感染检测[J]. 中国预防兽医学报,2010,32(2):90-93.  
QIN L T,GAO Y L,PAN W, et al. Investigation of co-infection of ALV-J with REV,MDV,CAV in layer chicken flocks in some regions of China[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2010,32(2):90-93. (in Chinese)
- [13] DREW J E,MAYER C D,FARQUHARSON A J, et al. Custom design of a GeXP multiplexed assay used to assess expression profiles of inflammatory gene targets in normal colon, polyp, and tumor tissue[J]. *J Mol Diagn*, 2011,13(2):233-242.
- [14] YANG M J,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.
- [15] 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.
- [16] RAI A J,KAMATH R M,GERALD W, et al. Analytical validation of the GeXP analyzer and design of a workflow for cancer-biomarker discovery using multiplexed gene-expression profiling[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009,393(5):1505-1511.
- [17] LIU Y,XU Z,ZHANG Q, et al. Simultaneous detection of seven enteric viruses associated with acute gastroenteritis by a multiplexed Luminex-based assay[J]. *J Clin Microbiol*, 2012,50(7):2384-2389.
- [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] 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.
- [20] TELESNITSKY A,GOFF S P. Reverse transcriptase and the generation of retroviral DNA[M]. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor (NY):Cold Spring Harbor Laboratory Press,1997.
- [21] 崔治中,孟姗姗,姜世金,等.我国白羽肉用型鸡群中 CAV、REV 和 REOV 感染状况的血清学调查[J]. 畜牧兽医学报,2006,37(2):152-157.  
CUI Z Z,MENG S S,JIANG S J, et al. Serological surveys of chicken anemia virus, avian reticuloendotheliosis virus and avian reovirus infections in white meat-type chickens in China[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2006,37(2):152-157. (in Chinese)
- [22] 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,2013,29(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*, 2013,29(3):250-257. (in Chinese)
- [23] ZHANG M X,XIE Z X,XIE L J, et al. Simultaneous detection of eight swine reproductive and respiratory pathogens using a novel GeXP analyser-based multiplex PCR assay[J]. *J Virol Methods*, 2015,224:9-15.
- [24] 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)
- [25] ZHANG Y F,XIE Z X,XIE L J, et al. GeXP analyzer-based multiplex reverse-transcription PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of eleven duck viruses[J]. *BMC Microbiol*, 2015,15:247.
- [26] XIE Z X,XIE L J,PANG Y S, et al. Development of a real-time multiplex PCR assay for detection of viral pathogens of penaeid shrimp[J]. *Arch Virol*, 2008,153(12):2245-2251.
- [27] 何玮玲,张驰,杨静,等.食品中 4 种肉类成分多重 PCR 的快速鉴别方法[J]. 中国农业科学,2012,45(9):1873-1880.  
HE W L,ZHANG C,YANG J, et al. A quick multiplex PCR method for the identification of four meat ingredients in food products[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012,45(9):1873-1880. (in Chinese)