

DOI:10.13350/j.cjpb.220501

• 论著 •

一种快速灵敏的非洲猪瘟病毒荧光定量 PCR 检测方法的建立*

何久香¹, 丁晓艳¹, 周晓杨¹, 周仔欣¹, 全纹莹², 赵镜², 林治华², 李晋涛^{1**}

(1. 陆军军医大学基础医学院军事生物安全教研室, 重庆 400038; 2. 重庆理工大学药学与生物工程学院)

【摘要】 **目的** 建立一种经济快速、准确灵敏的非洲猪瘟病毒(ASFV)荧光定量 PCR 检测方法。 **方法** 对 30 个 ASFV 毒株来源的 P72 基因进行多重序列比对, 根据其保守区域设计两对特异性引物, PCR 扩增 P72 基因。以含 ASFV P72 基因保守区域的目的片段的重组标准质粒 PUC57-P72 为模板, 建立荧光染料 TB Green qPCR 方法, 绘制标准曲线并筛选最佳引物对。通过优化反应体系和条件, 提高最佳引物对的检测灵敏性, 并进行重复性检测。选用常见猪病毒如猪流感病毒 H1N1、猪圆环病毒 2 型(PCV2)、猪细小病毒(PPV)、猪伪狂犬病病毒(PRV)的核酸与 ASFV 标准质粒为模板进行特异性试验; 通过检测已知 ASFV 阳性和阴性参考样品评估方法的符合率。 **结果** 优选的基于 P72 基因的特异性引物对及反应体系, 能扩增 $1.0 \sim 1.0 \times 10^6$ copies/ μ L 的 ASFV P72 标准质粒, 建立的标准曲线 R^2 可达 0.9954; 该方法最低可检测到 1 copyies/ μ L 的目的基因, 优于 TaqMan 探针法扩增灵敏度; 该方法的扩增反应采用两步法, 耗时 <1 h; 方法的批内变异系数 <1%, 批间变异系数 <2%; 该方法针对 ASFV 扩增的特异性强, 检测其它 4 种常见猪病毒均未发生交叉阳性反应; 用该方法检测 4 份随机抽取的 ASFV 灭活参考样品均阳性, 4 份 SPF 级的巴马香猪组织样品均阴性, 符合率为 100%。 **结论** 建立的 TB Green qPCR 方法经济、快速、灵敏、特异, 可作为非洲猪瘟的分子诊断方法。

【关键词】 非洲猪瘟病毒; TB Green; qPCR; 分子诊断

【中图分类号】 R37

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)05-0497-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 May;17(5):497-501,508.]

A rapid and sensitive fluorescence quantitative PCR method for detection of African swine fever virus

HE Jiu-xiang¹, DING Xiao-yan¹, ZHOU Xiao-yang¹, ZHOU Yu-xin¹, QUAN Wen-xuan², ZHAO Jing², LIN Zhi-hua², LI Jin-tao¹ (1. Department of Military Biosafety, College of Basic Medicine, Army Medical University, Chongqing 400038, China; 2. School of Pharmacy and Bioengineering, Chongqing University of Technology) **

【Abstract】 **Objective** To establish an economical, rapid, accurate and sensitive TB Green fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qPCR) quantitative PCR method for detection of the detection of African swine fever virus (ASFV), the TB Green fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qPCR) technique was developed. **Methods** The conserved regions of P72 gene from thirty ASFV strains were analyzed with MegAlign software and In this study, two pairs of specific primers were designed from the conserved regions of P72 gene from thirty ASFV strains by multiple sequence alignment. The target fragment containing the conserved region of ASFV P72 gene was inserted into PUC57 vector to construct the recombinant standard plasmid PUC57-P72. Using PUC57-P72 as a template, the fluorescent dye TB Green qPCR method was used to establish the standard curve and screen out the best primer pairs. By optimizing the reaction system and conditions, the sensitivity of the best primer pairs was further improved and the repeatability was carried out. The nucleic acids of common swine viruses such as swine influenza virus H1N1, porcine circovirus type 2 (PCV2), porcine parvovirus (PPV), porcine pseudorabies virus (PRV) and ASFV standard plasmids were used as templates for specificity test. ASFV positive reference sample DNA was used to evaluate the detection compliance rate. Two pairs of specific primers were designed from this region conserved regions of for qPCR P72 gene from thirty ASFV strains by multiple sequence alignment and P72 gene was amplified. PPlasmid containing PUC57-P72 containing the target fragment of ASFV P72 gene conserved region was construct and used as standard template to establish TB Green qPCR method. Then, In addition, the optimal primer pairs which showed lower limit of detection and better linear relationship were screened out by according to the TB Green qPCR using standard template standard curve and detection limit. By opti-

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 81570497)。

** **【通讯作者】** 李晋涛, E-mail: ljqtms@tmmu.edu.cn

【作者简介】 何久香(1988-), 女, 重庆万州人, 在读硕士研究生。研究方向: 病毒感染与宿主免疫。E-mail: 734575586@qq.com

mizing the reaction system and conditions, the sensitivity of the best primer pairs was improved by optimizing the reaction system and conditions. Furthermore, and the repeatability of the method was carried out. The nucleic acids of common swine viruses such as swine influenza virus H1N1, porcine circovirus type 2 (PCV2), porcine parvovirus (PPV), porcine pseudorabies virus (PRV) and ASFV standard plasmids were selected as templates select to verify the specificity of the methodspecificity test. The coincidence rate was assessed by testing known ASFV positive and negative reference samples. **Results** The optimized primer pairs and reaction system based on P72 gene could effectively amplify ASFV P72 standard plasmid of $1.0-1.0 \times 10^6$ copies/ μL , the standard curve R^2 could reach 0.9954, and the minimum amplification sensitivity was 1 copies/ μL , which was similar to that of SYBR Green I and better than that of TaqMan probe. The amplification reaction of the detection method was completed by two steps, and the detection time was shortened within 1 h. Repeatability test showed that the coefficient of variation within a batch was less than 1%, and the coefficient of variation between batches was less than 2%. This method has strong specificity for ASFV amplification and does not cross-react with other four common pig pathogens. The method was used to detect four randomly selected reference samples of ASFV inactivation, and the detection rate was 100%. The optimized primer pairs and reaction system based on P72 gene could amplify ASFV P72 standard template plasmid ranging from 1.0×10^0 to 1.0×10^6 copies/ μL , and the standard curve s wereas linear with R^2 the standard curve R^2 reached to=0.9954. The TB Green qPCR method showed awas shown to be highlyer sensitivity than TaqMan probe method . with a detection limit of 1 copy/ μL , which was better than TaqMan probe method. In addition, the detection time of this methodof this two-step amplification method was less than one hour as it was a two-step amplification, and the intra-assay coefficient of variation (0.33, 0.31 and 0.26) and inter-assay coefficient of variation (0.99, 1.22 and 1.76) were less than 2%. This method wasis highly specific amplification of ASFV, and had no cross-reactionsspecific with other important porcine virus selected, without any cross-reactions with other important porcine viruses selected, Only the positive sample was detected with a Ct value of 20.84. The results of eight reference samples were randomly selected for validating the method. The results showed that reference samples were consistent with the results of clinical diagnosis, with four positive ASFV inactivated samples (with a Ct value of 14.46, 16.04, 16.97 and 21.7) were positive and four SPF panamax porcine tissue negative ASFV samples (with a Ct value more than 35.42) were accurate detection (the positive samples with Ct values less than 21.7 and the negative samples with Ct values more than 35.42) negative, indicating the coincidence rate was 1 which were consistent with the results of clinical diagnosis, indicating the coincidence rate was 100%. **Conclusion** The TB Green qPCR method established in this study is economical, rapid, sensitive and specific, and is a more economical and effective method for molecular diagnosis of ASF. These results demonstrated that Tthe TB Green qPCR method established in this study wasis economical, rapid, sensitive and specific, which cancould be used applied for molecular diagnosis of ASF.

【Key words】 African swine fever virus; TB Green; qPCR real-time PCR; molecular diagnostic

非洲猪瘟(African swine fever, ASF)是非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)引起的急性、高度接触性传染病^[1]。ASFV主要在宿主髓系细胞中复制,特别是抗原呈递细胞(APCs),如单核/巨噬细胞和树突状细胞,引起组织的严重坏死、出血,最终导致死亡^[2-6]。ASF发病急,传染速度快,发病率和病死率均可达100%,属于我国一类动物疫病。ASF最早于1921年在非洲肯尼亚国家暴发,1957年传入欧洲,1971年传入美洲,1982年起成为地中海撒丁岛地方流行性疾病,2007年该疾病传入了东欧部分国家^[6],2018年传入中国^[7],席卷欧、美、亚、非四大洲,估计造成全球20亿美元的经济损失。虽然从首次发现ASFV至今已有100年历史,全球多个国家致力于ASFV疫苗的研究,但目前尚无安全有效的疫苗上市。现阶段对非洲猪瘟的控制主要依靠传统的措施:动物一旦确诊感染,立刻采取全扑杀以防范ASFV的进一步扩散和蔓延。因此,快速准确的诊断识别ASF是该

病流行病学管理的关键。

ASFV是双链DNA病毒,包含外膜、衣壳、双层内膜、核心壳层和基因组5层结构^[8],其基因组为170~193 kb的线性双链DNA,含有150~167个开放阅读框,编码150~200种蛋白^[9]。其中,B646L(P72)基因高度保守,编码的P72蛋白为ASFV的主要衣壳蛋白,参与病毒与宿主细胞的结合过程,因此P72基因常用作做ASFV检测中的靶基因^[10]。OIE(Office International Des Epizooties)ASFV诊断标准中建立了基于P72基因的qPCR方法,但其利用的是兼并引物,特异性较差^[11]。基于P72基因,用传统的TaqMan探针法荧光定量PCR检测ASFV,其检出最低模板浓度为10 copies/ μL ^[12-13],灵敏度差,因此还需对该方法进行改良。本研究通过对30个非洲猪瘟病毒毒株来源的P72基因进行多重序列比对,依据其保守区域设计两对特异性引物,优化反应体系和条件,并进行重复性、灵敏性和特异性试验,建立了基于ASFV P72基

因的荧光染料 TB Green qPCR 方法。

材料与与方法

1 材料

1.1 病毒与质粒 猪流感病毒 H1N1 亚型灭活疫苗 (TJ 株), 猪伪狂犬病病毒灭活疫苗, 猪圆环病毒 2 型灭活疫苗和猪细小病毒灭活疫苗购自武汉科前生物股份有限公司; 连接有 ASFV P72 基因保守区域的质粒 PUC57-P72 的合成与测序由擎科生物技术有限公司完成(目的片段长度为 506 bp, 载体总长度 3 135 bp)。

1.2 主要试剂与仪器 Mini BEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver. 5.0, PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 和 Real Time PCR 荧光染料试剂 TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 均购自 TaKaRa (日本) 公司; 质粒 DNA 提取试剂盒购自天根生物有限公司。实时荧光定量 PCR 仪 (LightCycler 96) 购于瑞士国 Roche 公司。

2 方法

2.1 病毒核酸的提取及 cDNA 的获取 采用 Mini BEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver. 5.0 分别提取猪流感病毒 H1N1、猪圆环病毒 2 型 (PCV2)、猪细小病毒 (PPV)、猪伪狂犬病病毒 (PRV) 的核酸, 按说明书操作。主要提取过程: 分别取 200 μL 灭活疫苗, 加入 200 μL buffer VGB、20 μL Proteinase K 和 1 μL Carrier RNA, 于 56 °C 水浴温浴 10 min。然后向裂解液中加入 200 μL 无水乙醇, 充分混匀。将溶液转移至 Spin Column 中, Spin Column 提前安置于 Collection Tube 上, 13 000 g 离心 2 min, 弃滤液。加入 500 μL buffer RWA 至 Spin Column 中, 13 000 g 离心 1 min, 弃滤液。加入 700 μL buffer RWB 至 Spin Column 中, 13 000 g 离心 1 min, 弃滤液洗涤 2 次。将 Spin Column 安置于 Collection Tube 上, 13 000 g 离心 2 min, 去除残留的液体。将 Spin Column 放置于 1.5 mL RNase free EP 管, 在 Spin Column 中央加入 30 μL RNase free dH₂O, 室温静置 5 min, 13 000 g 离心 2 min 洗脱 DNA/RNA, -20 °C 保存。提取的 RNA 用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Erase 进行逆转录, 按照说明书操作获取 cDNA。

2.2 引物的设计与合成 参考文献[14]设计特异引物序列 P1, 并在 NCBI 上选择来源于 30 条非洲猪瘟毒株的 P72 基因全长序列, 通过 MegAlign 软件筛选基因的保守区域, 并使用 NCBI 网站的 Primer designing tool 各自设计两对特异性引物 P2 和 P3, 引物序列见表 1, 由华大基因有限公司合成。

表 1 基于 P72 基因特异性扩增的 ASFV 引物
Table 1 ASFV primer sequence based on P72 gene specific amplification

引物 Primer	引物名称 Name	碱基序列 (5'-3') Sequence	所在位点 Site
P1	P72F-W	GATTGGCACAAAGTTCGGAC	1456-1474
	P72R-W	GGTTGGTATTCTCCCGTG	1763-1781
P2	P72F-O	ACCTACTGGAACATCTCCGA	1413-1433
	P72R-O	ACTTGTGCCAATCTCGGTGT	1449-1468
P3	P72F-O2	GTTAACGCCATTATGCAG	1480-1497
	P72R-O2	ACATGCGTCTGGAAGAGC	1540-1557

2.3 TB Green qPCR 荧光定量 PCR 反应体系和反应条件优化 标准品的拷贝数根据下述计算公式确定: 拷贝数 (copies/(L)) = (ng/(L)) × 10⁻⁹ × 6.02 × 10²³ / (bp × 660)。将构建的 PUC57-P72 质粒标准品按 10 倍倍比稀释, 最终浓度分别在 1 × 10¹⁰ ~ 1 × 10¹ copies/μL, 反应体系为 10 μL。在反应体系中分别加入引物对 P1、P2 和 P3, 使其终浓度为 0.3 μmol/L。反应条件: 1) 95 °C 预变性 30 s; 2) 95 °C 变性 5 s, 60 °C 30 s, 共 40 个循环; 3) 熔解曲线反应, 逐渐升温至 95 °C。根据检测的扩增曲线的灵敏度和熔解曲线的特异性筛选最佳扩增引物对。然后对筛选的引物对进行反应体系及条件的优化, 反应体系设为 10 μL 或 20 μL, 反应体系中加入 P3 引物对, 使其终浓度分别为 0.2、0.4、0.6 μmol/L。

2.4 标准曲线的建立及灵敏性检测 将 1 × 10⁶ copies/μL 质粒标准品按 10 倍倍比稀释, 终浓度分别在 1 × 10⁶ ~ 1 × 10⁰ copies/μL, 每个浓度梯度做 3 个重复, 以 ddH₂O 为对照, 以稀释后的质粒为模板按照 2.3 优化的条件进行 TB Green qPCR 检测。以得到的 Ct 值为纵坐标, P72 基因拷贝数的对数为横坐标绘制标准曲线并观察其线性关系。根据检测的扩增曲线获得最低检出拷贝数。

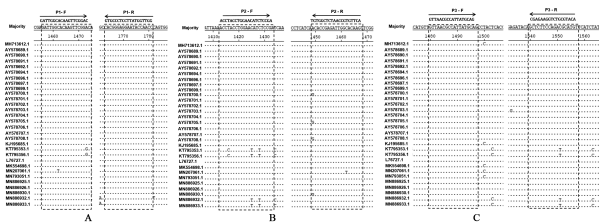
2.5 特异性和重复性检测 分别以猪伪狂犬病病毒灭活疫苗、猪圆环病毒 2 型灭活疫苗、猪细小病毒灭活疫苗的 DNA 和猪流感病毒 H1N1 亚型灭活疫苗 (TJ 株) 的 cDNA 为模板, 以 1.0 × 10⁵ copies/μL 的标准质粒为阳性对照, 以 ddH₂O 为阴性对照, 按照 2.3 优化的反应条件进行方法的特异性检测。分别选取 1.0 × 10¹、1.0 × 10³、1.0 × 10⁵ copies/μL 为模板, 进行 3 次批内和批间重复性试验, 以批内和批间 Ct 值的变异系数评估方法的重复性。

2.6 临床样品检测 以军事医学科学院军事兽医研究所扈荣良研究员提供的 4 份随机抽取的感染 ASFV 的大白猪 DNA 为阳性参考样品, 随机抽取的 4 份巴拿马香猪 DNA 为对样品, 按照 2.3 优化后的反应体系进行检测。

结果

1 TB Green qPCR 引物的设计

参考文献[14]设计合成的能特异扩增非洲猪瘟病毒 P72 片段的引物 P1(图 1A)对比 OIE 推荐的 PCR 引物对更为保守,灵敏度和检测范围更广。根据 NCBI 收录的非洲猪瘟病毒 P72 基因登录号,对 30 个来源于不同毒株的 P72 基因扩增后进行多重序列比对,在 P72 基因保守区域利用 NCBI Primer designing tool 设计另外两对基于 P72 保守区域引物 P2 和 P3(图 1B 和图 1C),结果显示同 P1 类似,设计的两对引物在不同毒株中高度保守。



注:“A”为文献报道的引物对 P1 的位置;“B”和“C”为 P2 和 P3 引物对的位置;“.”表示相同的碱基。引物位置用虚线框指示。

图 1 30 条 ASFV P72 基因完整编码序列的比对及引物目标序列的位置

Notes:“A”Locations of the target sequences of the P1 primer that reported before;“B”and“C” Locations of the target sequences of the P2 and P3 primer;Dots (.) indicate identical bases. The primer-binding sequences are framed with a dotted line.

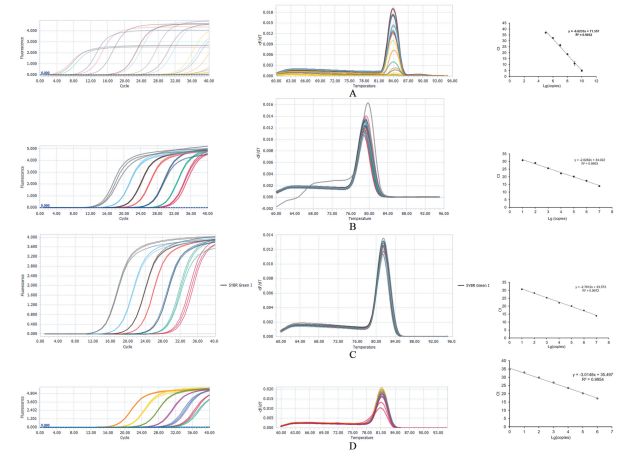
Fig. 1 Alignment of 30 ASFV P72 gene complete coding sequences and the locations of the primer target sequences

2 TB Green qPCR 检测最佳引物对筛选及反应体系优化

将 PUC57-P72 质粒标准品按 10 倍倍比稀释(最终浓度为 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^1$ copies/ μL)后进行 TB Green qPCR,绘制标准曲线和熔解曲线。结果显示, P1 引物对无引物二聚体,但引物扩增效率较低,标准曲线相关系数为 0.9932;荧光染料 TB Green qPCR 检测下限 10^4 copies/ μL ,灵敏度不佳(图 2A)。P2 引物对无引物二聚体,标准曲线相关系数为 0.9953,检测下限 10 copies/ μL ,灵敏度较高,但熔解曲线有偏峰,特异性差(图 2B)。P3 引物对无引物二聚体,标准曲线相关系数为 0.9972,检测下限 10 copies/ μL ,灵敏度较高,熔解曲线峰形较好,特异性强(图 2C)。因此确定 P3 引物对为检测 ASFV 最佳引物对。

为进一步分析 P3 引物对的检测灵敏性,对 P3 引物对的使用浓度及反应体系进行优化。检测结果显示,基于 P72 的 TB Green qPCR 的最优反应体系为: $10 \mu\text{L}$ $2 \times$ TB Green Premix Ex Taq II(Tli RNaseH Plus), $0.8 \mu\text{L}$ P3 引物对($10 \mu\text{mol/L}$), $2 \mu\text{L}$ 标准质粒模板,无核酸酶的 ddH₂O 补齐至 $20 \mu\text{L}$ 。反应条件: 1) 95°C 预变性 30 s; 2) 95°C 变性 5 s, 60°C 30 s, 共 40

个循环; 3) 熔解曲线反应, 逐渐升温至 95°C 。以检测的 Ct 值为纵坐标, 标准质粒拷贝数的对数为横坐标绘制标准曲线, 建立的线性回归方程 $y = -3.0148x + 35.497$, 相关系数 $R^2 = 0.9954$, 线性关系良好。利用 P3 引物对优化的反应体系扩增最低可检测模板浓度为 1 copies/ μL (图 2D), 灵敏性良好。以 ddH₂O 为阴性对照检测的 Ct 值为 35.42 ± 0.64 , 当检测 Ct 值大于 35.42 可判定为阴性。



A P1 引物反应体系 B P2 引物反应体系 C P3 引物反应体系 D 优化的 P3 引物反应体系。

图 2 TB Green 荧光定量 PCR 检测方法的扩增曲线、熔解曲线和标准曲线

A P1 primers B P2 primer C P3 primer D Optimization of P3 primer reaction system

Fig. 2 Amplification curve, melting curve and standard curve detected by TB Green qPCR method

3 特异性检测

以 1×10^5 copies/ μL 标准质粒为阳性对照, 以猪流感病毒 H1N1、猪圆环病毒 2 型(PCV2)、猪细小病毒(PPV)、猪伪狂犬病病毒(PRV)核酸为模板, 按照优化的 TB Green qPCR 反应条件进行检测, 阳性对照有特异性扩增(Ct 值为 20.84 ± 0.12), 其它病毒均阴性(Ct 值均 > 35.42), 方法的特异性良好。

4 重复性检测

为验证检测 ASFV 的 TB Green qPCR 试验的重复性, 以浓度 1.0×10^1 、 1.0×10^3 、 1.0×10^5 copies/ μL 的标准质粒为模板进行 3 次重复测定, 同一模板设置 3 个复孔, 观察试验的批内和批间重复性。结果显示, 批内 Ct 值的变异系数(CV)均 $< 1\%$, 批间 Ct 值的变异系数(CV)均 $< 2\%$ (表 2), 建立的 TB Green 荧光定量 qPCR 方法具有良好的重复性。

5 临床样品的检测

将随机抽取的 4 份 SPF 级的巴拿马香猪组织以及 4 份确诊 ASFV 感染的大白猪组织提取的 DNA, 用优化的荧光染料 TB Green qPCR 方法检测, 结果见表 3。SPF 级的巴拿马香猪组织样品均为阴性, 确诊

ASFV 感染的大白猪组织样品均阳性,检测的符合率为 100%。

表 2 TB Green 荧光定量 PCR 方法的重复性
Table 2 Repeatability of TB Green fluorescent quantitative PCR assay

标准质粒浓度 (copies/ μ L) Standard plasmid concentration (copies/ μ L)	批内重复 Intra-assay		批间重复 Inter-assay	
	Ct 值($\bar{x} \pm s$) Ct value	变异系数 CV(%)	Ct 值($\bar{x} \pm s$) Ct value	变异系数 CV(%)
1.0×10^1	32.81 \pm 0.11	0.33	32.33 \pm 0.32	0.99
1.0×10^3	26.45 \pm 0.08	0.31	27.01 \pm 0.33	1.22
1.0×10^5	19.21 \pm 0.05	0.26	20.40 \pm 0.36	1.76

表 3 TB Green 荧光定量 PCR 检测临床样品结果
Table 3 Result of clinical sample test

样本 Sample	Ct 平均值($\bar{x} \pm s$) Ct mean
参考样品 1	14.46
参考样品 2	16.04
参考样品 3	16.97
参考样品 4	21.70
对照样品 1	—
对照样品 2	—
对照样品 3	—
对照样品 4	—

注:“—”表示检测结果为阴性。

讨论

ASFV 是非洲猪瘟流行的致病病原体,是一种具有高度传染性 DNA 病毒,对该病毒感染的早期检测尤为重要。OIE 推荐检测 ASFV 的方法主要有 PCR、荧光定量 PCR、ELISA 等。用免疫学方法检测抗体可以了解 ASFV 感染、发生、发展的进程,但抗体只有在病毒感染至一定时期后才会出现,因此 ELISA 等抗体检测方法存在一定的滞后性和局限性。PCR、实时荧光定量 PCR 等分子生物学技术在猪感染 ASFV 的早期即可检测到病毒核酸,在 ASFV 的早期检测中占主导地位。该方法具有灵敏度高、特异性强、反应快速等优点,在世界各地广泛用于 ASFV 检测^[15]。在荧光定量 PCR 检测方法中,主要有 SYBR Green I 染料法和 TaqMan 探针法两种。相比较而言,SYBR Green 染料法因不用合成带荧光基团的探针,因此更为经济实惠,其特异性主要依赖于优选的引物对。TaqMan 探针法需合成特异性探针,成本更高,但特异性较 SYBR Green 染料法好。ASFV 的 B646L 基因编码主要衣壳蛋白 P72,是病毒粒子主要的结构成分,占病毒粒子总质量的 31%~33%^[16]。P72 具有较高的热稳定性,是 ASFV 感染猪血液中检测到的主要抗原^[17]。不同株 ASFV 间的 P72 基因较保守,因此目前市场上检测 ASFV 通常基于 P72 基因。

基于 P72 基因用传统的 TaqMan 探针法荧光定量 PCR 检测 ASFV,最低能检测限为 10copies/ μ L,与

OIE 引物扩增灵敏度相当,远高于普通 PCR 方法^[11-13]。李艳等^[18]在常规 TaqMan 探针的基础上选择性地对探针中的一些碱基进行锁核酸修饰,建立了基于 P72 基因的锁核酸(locked nucleic acid, LNA)-TaqMan 探针荧光定量 PCR 方法,其最低检测限为 3.9 copies/ μ L。本研究建立的基于 ASFV P72 的 TB Green qPCR 方法检出的最低模板浓度为 1 copies/ μ L,方法的灵敏度优于 TaqMan 探针法,并且不需要合成特异性探针,在检测成本上更为经济实惠。贾云飞等^[10]基于 P72 基因建立的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 采用了传统的三步法,检测灵敏度达到 1 copyies/ μ L。本研究建立的 TB Green qPCR 检测方法的扩增反应由传统的三步法优化为两步法,检测时间 <1 h,提高了检测效率,灵敏度与 SYBR Green I 相当。

猪流感病毒 H1N1、猪圆环病毒 2 型(PCV2)、猪细小病毒(PPV)、猪伪狂犬病病毒(PRV)等是猪常见传染性病毒病原体,患猪常表现为混合感染,在 ASFV 检测中易受到干扰,给非洲猪瘟的诊断带来很大困难。本研究建立的检测 ASFV 感染的 TB Green qPCR 方法不与猪 H1N1、PCV2、PPV、PRV 等常见病毒病原发生交叉反应。同时,鉴于 ASFV 的流行目前趋于复杂化,自然突变株和基因缺失毒株的流行易产生漏检,本研究对 30 个来源于不同 ASFV 毒株的 P72 基因进行多重序列比对,针对高度保守区域设计引物,增加了 ASFV 检测的通用性。对随机抽取的临床参考样品进行检测,符合率达 100%,表明该方法可用于临床样品的检测。

本研究根据 ASFV 的 P72 基因组保守序列设计特异性引物,通过优化反应条件,建立检测 ASFV 的 TB Green 荧光定量 PCR/qPCR 方法。该方法灵敏、特异且重复性好,可用于非洲猪瘟病毒感染的筛查。

【参考文献】

- [1] 何健,石建州,刘阳坤,等.非洲猪瘟病毒研究进展[J].南阳师范学院学报,2022,21(1):55-62.
- [2] Malmquist WA, Hay D. Hemadsorption and cytopathic effect produced by African swine fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures[J]. Am J Vet Res, 1960(21):104-108.
- [3] Wardley RC, Wilkinson PJ. The association of African swine fever virus [J]. Arch Virol, 1977, 55 (4):327-34.
- [4] Dixon LK, Sun H, Roberts H. African swine fever [J]. Antiviral Res, 2019(165):34-41.
- [5] Tulman ER, Rock DL. Novel virulence and host range genes of African swine fever virus [J]. Curr Opin Microbiol, 2001, 4(4): 456-461.
- [6] Sanchez-Cordon PJ, Montoya M, Reis AL, et al. African swine fever: A re-emerging viral disease threatening the global pig industry [J]. Vet J, 2018(233):41-48.

(下转 508 页)

的药效、药理和药动相关实验,制备疗效较好的剂型和进入临床试验提供理论基础。

【参考文献】

[1] Wen H, Vuitton L, Tuxun T, et al. Echinococcosis: advances in the 21st century[J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 32(2): e00075-18.

[2] Han J, Bao G, Zhang D, et al. A newly discovered epidemic area of *Echinococcus multilocularis* in west gansu province in China[J]. PloS one, 2015, 10(7): e0132731.

[3] 曹文艳, 师晓莉, 曹明宇, 等. 新疆某三甲级医院包虫病流行病学的现状和特征分析[J]. 新疆医科大学学报, 2014, 37(9): 1204-1207.

[4] Deplazes P, Rinaldi L, Alvarez Rojas C, et al. Global distribution of alveolar and cystic echinococcosis[J]. Advan Parasitol, 2017(95): 315-493.

[5] Rufener R, Dick L, D'Ascoli L, et al. Repurposing of an old drug: *In vitro* and *in vivo* efficacies of buparvaquone against *Echinococcus multilocularis*[J]. Int J Parasitol Drug, 2018, 8(3): 440-50.

[6] Pensel P, Elissondo N, Gambino G, et al. Experimental cystic echinococcosis therapy: *In vitro* and *in vivo* combined 5-fluorouracil/albendazole treatment[J]. Vet Parasitol, 2017(245): 62-70.

[7] Ke Y, Bi X, Yang N, et al. Serum platelet-derived growth factor-BB levels as a potential biomarker in assessing the metabolic activity of lesions in alveolar echinococcosis patients[J]. Acta Trop, 2021(227): 106290.

[8] Torgerson P. One world health: socioeconomic burden and parasitic disease control priorities[J]. Vet Parasitol, 2013(195): 223-232.

[9] Kui Y, Liu B, Wang X, et al. Epidemiological characteristics of

echinococcosis in non-endemic PLADs-China, 2017-2020[J]. China CDC, 2021, 3(51): 1084-1088.

[10] Lachenmayer A, Gebbers D, Gottstein B, et al. Elevated incidence of alveolar echinococcosis in immunocompromised patients[J]. Food Parasitol, 2019(16): e00060.

[11] Wang W, Li J, Yao J, et al. *In vitro* and *in vivo* efficacies of novel carbazole aminoalcohols in the treatment of cystic echinococcosis[J]. Antimicrobial Chemoth, 2017, 72(11): 3122-3130.

[12] Kern P, Menezes da Silva A, Akhan O, et al. The Echinococcoses: Diagnosis, Clinical Management and Burden of Disease[J]. Advanc Parasitol, 2017(96): 259-369.

[13] 吴向未, 彭心宇, 张示杰, 等. 肝脾棘球蚴周围纤维性囊壁形成机制的差异及临床意义[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2004, 12(1): 3-6.

[14] Kern P, Bardonnnet K, Renner E, et al. European echinococcosis registry: human alveolar echinococcosis, Europe, 1982-2000[J]. Emerg Infect Dis, 2003, 9(3): 343-349.

[15] 尚琳琳, 李玲慧, 李静, 等. 细粒棘球蚴感染对小鼠脾脏 NKT 细胞免疫功能的影响[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(8): 902-908.

[16] Sadreddini S, Baradaran B, Aghebati-Maleki A, et al. Immune checkpoint blockade opens a new way to cancer immunotherapy[J]. Cell Physiol, 2019, 234(6): 8541-8549.

[17] 齐新伟, 王晓然, 李斌, 等. 不同剂量多房棘球蚴感染小鼠调节性 B 细胞的动态变化及免疫作用研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(8): 917-923.

[18] Samji T, Khanna KM. Understanding memory CD8(+) T cells[J]. Immunol Lett, 2017(185): 32-39.

【收稿日期】 2022-01-05 【修回日期】 2022-03-16

(上接 501 页)

[7] Zhao D, Liu R, Zhang X, et al. Replication and virulence in pigs of the first African swine fever virus isolated in China[J]. Emerg Microbes Infect, 2019, 8(1): 438-447.

[8] Wang N, Zhao D, Wang J, et al. Architecture of African swine fever virus and implications for viral assembly[J]. Science, 2019, 366(6465): 640-644.

[9] Jia N, Ou Y, Pejsak Z, et al. Roles of African swine fever virus structural proteins in viral infection[J]. J Vet Res, 2017, 61(2): 135-143.

[10] 贾云飞, 赵福杰, 朱静静, 等. 非洲猪瘟病毒 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 河南农业大学学报, 2020, 54(1): 69-73.

[11] 任名, 牛婷婷, 于婉琪, 等. 非洲猪瘟病毒 TaqMan 探针法荧光定量 PCR 检测方法建立[J]. 中国动物传染病学报, 2020, 28(3): 42-8.

[12] 李洪利, 曹金山, 王君玮, 等. 非洲猪瘟病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(6): 37-40.

[13] Ren M, Mei H, Zhou M, et al. Development of a super-sensitive diagnostic method for African swine fever using CRISPR techniques[J]. Virol Sin, 2021, 36(2): 220-230.

[14] Luo Y, Atim S A, Shao L, et al. Development of an updated PCR assay for detection of African swine fever virus[J]. Arch Virol, 2017, 162(1): 191-199.

[15] Wang Y, Xu LZ, Lance N, et al. Development of a real-time PCR assay for detection of African swine fever virus with an endogenous internal control[J]. Transbound Emerg Dis, 2020, 67(6): 2446-2454.

[16] Liu Q, Ma B, Qian N, et al. Structure of the African swine fever virus major capsid protein p72[J]. Cell Res, 2019, 29(11): 3.

[17] Wang G, Xie M, Wu W, et al. Structures and functional diversities of ASFV proteins [J]. Viruses, 2021, 13(11): 2124.

[18] 李艳, 郭怡德, 勾红潮, 等. 非洲猪瘟病毒锁核酸探针荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2021, 41(4): 208-212.

【收稿日期】 2022-03-24 【修回日期】 2022-05-18