



朱俊灵, 叶佐东, 邓洁汝, 等. 猪瘟病毒 RT-LAMP-LFD 检测方法的建立与应用[J]. 华南农业大学学报, 2016, 37(1): 1-7.

猪瘟病毒 RT-LAMP-LFD 检测方法的建立与应用

朱俊灵[†], 叶佐东[†], 邓洁汝, 勾红潮, 陈金顶
(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】建立一种新型的、能在基层场地进行实时便捷诊断的猪瘟病毒检测方法。【方法】环介导等温扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) - 横向流动试纸条技术(Lateral flow dipstick, LFD)相结合, 针对猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV) NS5B 基因设计一套特异性引物及生物素标记探针, 结合异硫氰酸荧光素标记的扩增产物, 建立 RT-LAMP-LFD 检测方法。【结果】所建立的方法能够特异地检测出 CSFV 的存在, 检测 PRRSV、JEV、PCV-2 等其他病毒均为阴性; 所建立的 CSFV-RT-LAMP 方法对 RNA 的最低检测限为 50 pg; 反应快速, 整个扩增反应可在 1 h 内完成; 操作简单, 不需要 PCR 仪等复杂的仪器, 结果可经肉眼观察。【结论】应用 RT-LAMP-LFD 检测 CSFV 特异性强、灵敏度高, 并且操作安全、简便、快捷, 可以满足基层检疫的需要。

关键词:猪瘟病毒; NS5B 基因; 环介导等温扩增技术; 横向流动试纸条技术; 病毒检测
中图分类号:S855.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2016)01-0001-07

Rapid detection of classical swine fever virus by loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick method

ZHU Junling[†], YE Zuodong[†], DENG Jieru, GOU Hongchao, CHEN Jinding
(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract:【Objective】The experiment was conducted to establish a rapid real time detection method of classical swine fever virus at local fields. 【Method】A rapid detection method(RT-LAMP-LFD) of classical swine fever virus(CSFV) was developed by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) combined with lateral flow dipstick (LFD) method. The LAMP method for amplification of the CSFV NS5B gene using fluorescein isothiocyanate-labeled primer was combined with a chromatographic LFD for rapid and simple visual detection of CSFV. 【Result】This method could specifically detect CSFV, but not other virus such as PRRSV, JEV and PCV-2. The minimum detection limit of the CSFV-RT-LAMP-LFD method was 50 pg. The detection could be finished within 1 h without using complex instruments such as PCR machine and the results were visible by eye. 【Conclusion】This RT-LAMP-LFD method is a highly specific and sensitive, safe, rapid and simple way for field detection of CSFV infection.

Key words:classical swine fever virus; NS5B gene; LAMP; LFD; virus detection

猪瘟(Classical swine fever, CSF)是由猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)引起的猪的一种高度接触性、急性传染病。该病的高发病率和高死亡率给养猪业造成巨大的经济损失, 严重危害畜牧业的发展^[1-2]。目前对 CSFV 的实验室诊断方法主要包括细胞培养分离病毒、实时 RT-PCR 等病原学方

收稿日期:2015-04-13 优先出版时间:2015-12-07
优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20151207.1115.002.html>
作者简介:朱俊灵(1989—), 男, 硕士研究生, E-mail: 919736608@qq.com; 叶佐东(1990—), 男, 硕士研究生, E-mail: zuodongye@126.com; [†] 对本文贡献相同; 通信作者:陈金顶(1968—), 男, 教授, 博士, E-mail: jdchen@scau.edu.cn
基金项目:国家自然科学基金(U1405216, 31172321 和 31472200); 广东省高等教育科技创新特殊项目(2012CXZD0013)

法,以及酶联免疫吸附试验(ELISA)、间接免疫荧光试验(IFA)和中和试验(NT)等血清学方法^[3-6]。病毒分离通常是确诊疫病的经典方法,但由于CSFV不同毒株的毒力差异很大,CSFV感染猪的临床症状和病理变化差别很大,一般很难根据临床表现和病理变化来确诊;实时荧光RT-PCR的方法快速、灵敏,但对于设施设备等试验条件的要求较高;而ELISA、IFA、NT等血清学方法在操作简便性、检测敏感性和特异性方面存在不足^[7-8]。因此,建立一种快速、简便、灵敏度较高的检测猪瘟病毒的方法十分有意义。

环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是在基因的6个区域设计4种特异引物,然后在恒温条件下特异扩增目的DNA的技术。与其他检测方法相比,该技术特异性强、灵敏度高、操作简便,无特殊设备要求,适用于基层及现场诊断使用^[9]。横向流动试纸条(Lateral flow dipstick, LFD)法是利用含有生物素(Biotin)标记的LAMP扩增产物能与异硫氰酸荧光素(Fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的探针特异性杂交,从而与胶体金标记的抗FITC的抗体结合形成三元复合物,结合在含生物素抗体的检测线上,而未杂交的FITC标记探针形成不含生物素的两元复合物,结合在含抗FITC的质控线上^[10]。近年来,LAMP-LFD检测方法已经成功用于许多动物病毒性病原的检测。其优势在于不仅快速、特异、操作简单,而且避免了琼脂糖凝胶电泳或荧光染料染色肉眼观察所引起的假阳性。

本研究针对CSFV NS5B基因的保守区域序列设计LAMP引物。建立了猪瘟病毒RT-LAMP方法,然后结合LFD技术,建立了一种猪瘟病毒RT-LAMP-LFD检测方法,该方法简单、快速、灵敏度高,为基层养殖场和兽医站提供了CSFV初步筛选检测的理想方法。

1 材料与方法

1.1 病毒

猪瘟病毒GXW-07株、石门株,日本乙型脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)SA14-14-2株,猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)GD08-2株,胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP)均由华南农业大学兽医学院微生物学与免疫学教研室保藏;猪圆环病毒2型(Porcine circovirus-2, PCV-2)LG株油乳剂灭活疫苗购自上海海利生物科技有限公司;伪狂犬病毒(Pseudorabies virus, PRV)Bartha-K61株灭活疫苗购自哈尔滨维科生物科技有限公司。

1.2 主要试剂

dNTP、AMV反转录酶、DNA提取试剂盒、RNA

提取试剂盒、RRI、Ex-Taq DNA聚合酶和琼脂糖为TaKaRa公司产品;Bst DNA聚合酶为New England公司产品;硫酸镁、甜菜碱(Betaine)、氯化锰、钙黄绿素(Calcein)为美国Sigma公司产品;RT-LAMP引物由华南农业大学微生物教研室设计,由上海生工生物工程有限公司合成;核酸试纸条密闭反应装置(LFD)为中国杭州优思达公司产品。

1.3 主要仪器

高压灭菌锅为日本Sanyo MLS-320产品。纯水仪为瑞士ELAG电子有限公司产品。台式冷冻高速离心机为美国Thermo公司产品。小型高速离心机为德国Eppendorf公司产品。LX-100手掌型离心机为江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司产品。凝胶图像分析系统为MOLECULAR IMAGING公司产品。ABI 9700PCR扩增仪为美国ABI公司产品。DK-8D型电热恒温水槽为上海森信实验仪器有限公司产品。BIO-RAD电泳仪为Powerpac Basic公司产品。

1.4 病毒核酸提取

根据MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver. 5.0说明书进行DNA/RNA抽提。

1.5 引物和荧光探针的设计合成

运用Primer Premier5.0软件,针对CSFV NS5B基因的保守序列设计1对PCR引物P1和P2(表1)。根据LAMP引物设计原则,应用在线引物设计软件Primer Explorer 4.0针对CSFV NS5B基因的保守区域序列(GenBank No. EU915211.1),进行LAMP引物设计。引物包括1对外引物(F3和B3)、1对内引物(FIP和BIP)、1条环引物(LB)以及1条探针(Probe)(表1),所有引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成并标记(图1)。

1.6 环介导等温扩增技术扩增条件的优化

1.6.1 CSFV RT-LAMP-LFD检测方法的建立 以猪瘟病毒GXW-07株基因组RNA为模板,25 μL 反应体系包含:10 $\times$ Thermopol Buffer 2.5 μL 、dNTP (2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)4.0 μL 、甜菜碱(10 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)2.5 μL 、FIP (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + BIP (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)4.0 μL 、LF (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + LB (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)2.0 μL 、F3 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + B3 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)0.5 μL 、Probe (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)2.0 μL 、硫酸镁(100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)0.5 μL 、Bst DNA polymerase (8 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)1.0 μL 、AMV反转录酶(5 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)0.5 μL 、模板RNA 5 μL 、加DEPC水至25 μL 。阴性对照不加模板。每个反应至少重复3次,用20 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。

表 1 CSFV RT-LAMP-LFD 引物序列

Tab.1 Primer sequences of CSFV RT-LAMP-LFD

引物名称	引物序列 (5'→3')
P1	CCTGAGGACCAAACACATGTTG
P2	TGGTGGAAGTTGCTTGTGTCTG
F3	GGAAAGGGCAAAGAGGCA
B3	CGAGAGCCCTTTCTGTGATC
Probe	CCACGGGAGTACCCTACAAGAG-Biotin
LB	FITC-GACAGGGTGGCAAAAATTTCATG
FIP(F1c + F2)	CCTCGCAGAAGGCGTAAACCATGTGGACAACCTGACACAAGC
BIP(B1c + B2)	ACGGGAGTACCCTACAAGAGCTAACCATCATCCCCGCACA

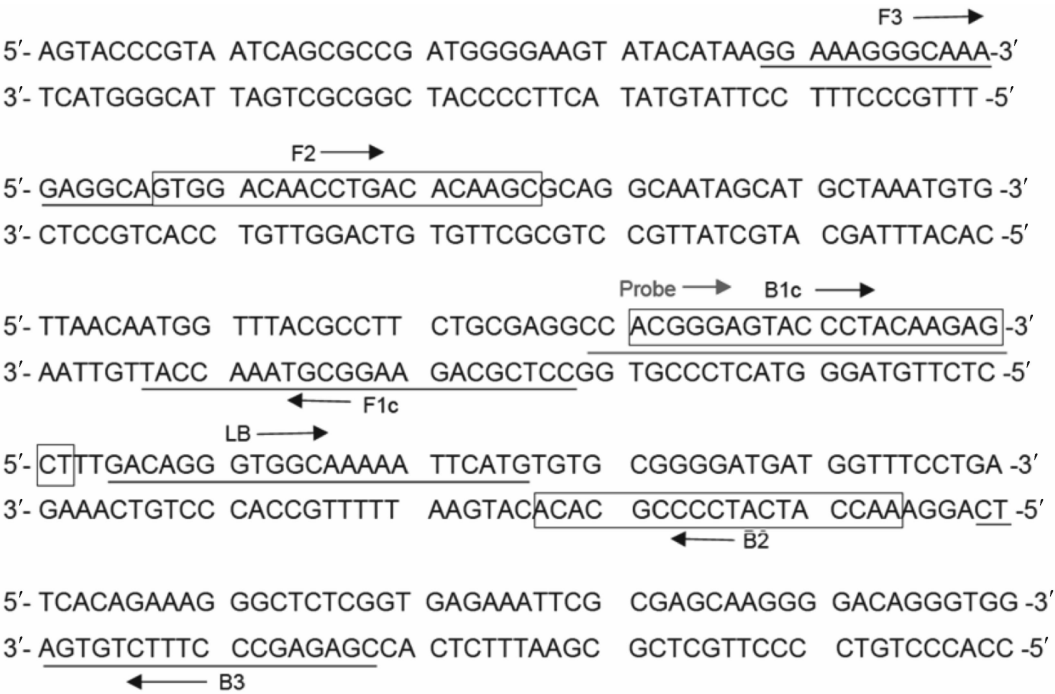


图 1 CSFV RT-LAMP-LFD 引物设计示意图

Fig.1 Diagrams of CSFV RT-LAMP-LFD primers

1.6.2 CSFV RT-LAMP 反应条件优化 分别在 59、60、61、62、63、64、65、66 ℃ 8 个温度梯度进行 RT-LAMP 反应,根据扩增效果确定最佳反应条件。分别设计 10、20、30、40、50、60、70 min 7 个时间梯度,在已优化得到的最佳反应温度下进行 RT-LAMP 反应,根据扩增效果确定最佳反应条件。

1.6.3 CSFV RT-LAMP 反应体系优化 分别按 2、4、6、8、10 mmol · L⁻¹ 5 个 Mg²⁺ 浓度梯度进行 RT-LAMP 反应,其余成分不变,根据扩增效果得出 CSFV RT-LAMP 反应的最佳 Mg²⁺ 浓度。分别按 0、0.5、1.0、1.5、2.0 mol · L⁻¹ 5 个甜菜碱浓度梯度进行 RT-LAMP 反应,以优化的条件和成分,根据扩增效果得出 CSFV RT-LAMP 反应的最佳甜菜碱浓度。分别按 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mmol · L⁻¹ 6 个 dNTP 浓度梯度进行 RT-LAMP 反应,以优化的条件和成分,根据扩增效果得出 CSFV RT-LAMP 反应的最佳 dNTP 浓度。分别按 4、8、12、16、20 U 5 个 *Bst* DNA

聚合酶浓度梯度进行 RT-LAMP 反应,以优化的条件和成分,根据扩增效果得出 CSFV RT-LAMP 反应的最佳 *Bst* DNA 聚合酶浓度。分别按 1.0、1.5、2.0、2.5、5.0 U 5 个 AMV 反转录酶浓度梯度进行 RT-LAMP 反应,以优化的条件和成分,根据扩增效果得出 CSFV RT-LAMP 反应的最佳 AMV 反转录酶浓度。以外引物的用量为参照,设计外引物与环引物的比例分别为 1:0、1:1、1:2、1:4、1:6、1:8 共 6 个梯度,以优化的条件和成分,根据扩增效果得出 CSFV RT-LAMP 反应的最佳环引物浓度。

1.7 CSFV RT-LAMP-LFD 方法的特异性分析

PRRSV GD08-2 株、JEV SA14-14-2 株基因组 RNA、PCV-2、PRV、APP 的基因组 DNA 为模板作为特异性对照,按优化的条件,检测该方法的特异性,同时以 CSFV GXW-07 株、CSFV 石门株为阳性对照,每个反应至少重复 3 次。其中 5 μL 反应产物用于 20 g · L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳进行检测,剩余 20 μL 产

物用于 LFD 检测。

1.8 CSFV RT-LAMP-LFD 方法的灵敏度分析

抽提 CSFV GXW-07 株的 RNA 模板并制备出 CSFV 标准品($10\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)作为初始模板,将初始模板进行 10 倍梯度稀释($10^{-1}\sim 10^{-7}$),按优化的条件进行反应。反应产物分别用 LFD、钙黄绿素-可视化 RT-LAMP、 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶电泳进行检测。每个试验至少重复 3 次。

1.9 CSFV RT-PCR 方法

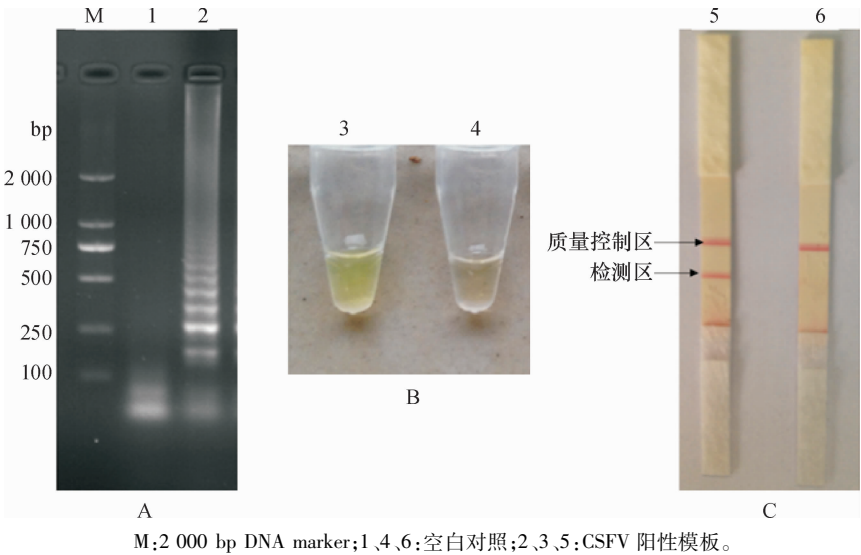
参照试剂盒说明书进行 RNA 抽提,逆转录的反应体系 $20\text{ }\mu\text{L}$: $5\times\text{AMV Buffer}$ $4\text{ }\mu\text{L}$ 、 dNTP ($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) $2\text{ }\mu\text{L}$ 、 RNase inhibitor (40 U) $0.5\text{ }\mu\text{L}$ 、 Random primer (50 pmol) $1\text{ }\mu\text{L}$ 、 AMV (5 U) $1\text{ }\mu\text{L}$ 、 RNA $10\text{ }\mu\text{L}$,补 DEPC 水至 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h 。获得的 cDNA 作模板,P1、P2 作为上、下游引物进行 PCR。PCR 反应体系 $25\text{ }\mu\text{L}$: $10\times\text{PCR Buffer}$ $2.5\text{ }\mu\text{L}$ 、 dNTPs (2.5 mmol) $2\text{ }\mu\text{L}$ 、P1 ($10\text{ }\mu\text{mol}$) 和 P2 ($10\text{ }\mu\text{mol}$) 各 $0.5\text{ }\mu\text{L}$ 、 Ex-Taq (5 U) $0.25\text{ }\mu\text{L}$ 、模板 $2\text{ }\mu\text{L}$,

加双蒸水至 $25\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min ; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s , $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s , 30 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min 。

2 结果

2.1 CSFV RT-LAMP-LFD 检测方法的建立

以猪瘟病毒 GXW-07 株 RNA 为模板进行 RT-LAMP 反应,反应后的产物分别用 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 凝胶电泳、钙黄绿素法以及 LFD 进行检测,验证检测方法的可行性。琼脂糖凝胶电泳结果显示 CSFV 阳性模板有梯状条带而空白对照无条带(图 2A);钙黄绿素法的结果显示 CSFV 阳性模板结果出现荧光绿色而空白对照为橘黄色(图 2B);RT-LAMP-LFD 结果显示,CSFV 阳性模板出现 2 条红色条带,分别位于检测区(T)内和质量控制区(C)内,而空白对照组仅在质量控制区(C)出现 1 条红色条带(图 2C)。结果表明,该 CSFV RT-LAMP-LFD 检测方法可行。



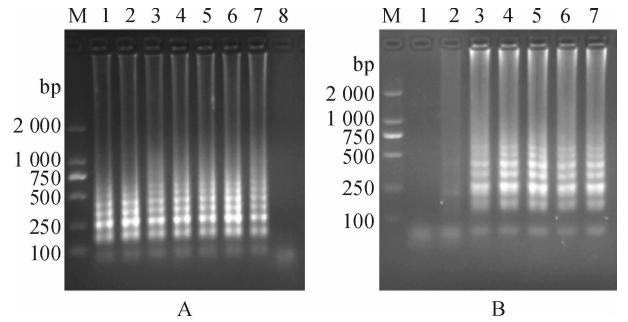
A: RT-LAMP 凝胶电泳检测方法;B: 钙黄绿素-可视化 RT-LAMP 检测方法;C: RT-LAMP-LFD 检测方法。

图2 CSFV RT-LAMP-LFD 检测方法的建立

Fig.2 The establishment of CSFV RT-LAMP-LFD detection method

2.2 CSFV RT-LAMP 扩增条件的确立

在反应条件优化试验中,在 $59\sim 66\text{ }^{\circ}\text{C}$ 8 个不同温度间进行 RT-LAMP 反应,结果(图 3A)显示泳道 2 扩增条带最亮,因此选择 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 为 CSFV RT-LAMP 反应的最佳反应温度;反应时间优化结果(图 3B)显示,从 30 min 时开始即可以通过琼脂糖凝胶电泳检测到 RT-LAMP 扩增产物,反应 50 min 后产物量趋于饱和,因此选定 50 min 为 CSFV RT-LAMP 反应的最佳反应时间。反应体系优化结果如图 4,CSFV RT-LAMP 最佳反应体系为: $3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的镁离子(图 4A), $1.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甜菜碱(图 4B), $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

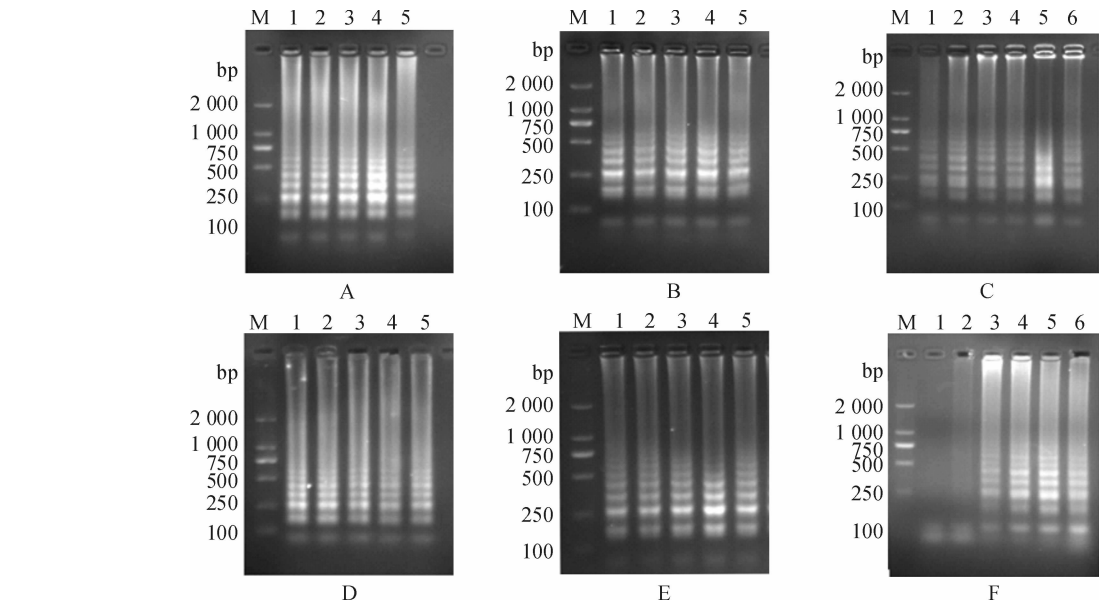


M: 2000 bp DNA marker;A: 反应温度优化试验,1~8 分别为: $59\sim 66\text{ }^{\circ}\text{C}$;B: 反应时间优化试验,1~7 分别为: $10\sim 70\text{ min}$ 。

图3 CSFV RT-LAMP 反应条件优化

Fig.3 Optimization of reaction conditions of CSFV RT-LAMP

的 dNTP(图 4C),8 U 的 *Bst* DNA 聚合酶(图 4D)和 2.5 U 的 AMV 的逆转录酶(图 4E),外引物与环引物用量比为 1:4(图 4F)。



M;2 000 bp DNA marker;A:硫酸镁浓度优化试验,1~5 分别为:0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mmol · L⁻¹ 硫酸镁;B:甜菜碱浓度优化试验,1~5 分别为:0、0.5、1.0、1.5、2.0 mol · L⁻¹ 甜菜碱;C:dNTP 浓度优化试验,1~6 分别为:0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mmol · L⁻¹ dNTP;D:*Bst* DNA 聚合酶浓度优化试验,1~5 分别为:4、8、12、16、20 U *Bst* DNA 聚合酶;E:AMV 逆转录酶浓度优化试验,1~5 分别为:1.0、1.5、2.0、2.5、5.0 U AMV 逆转录酶;F:外引物与环引物的用量比例优化试验,1~6 示外引物与环引物用量比分别为:1:0、1:1、1:2、1:4、1:6、1:8。

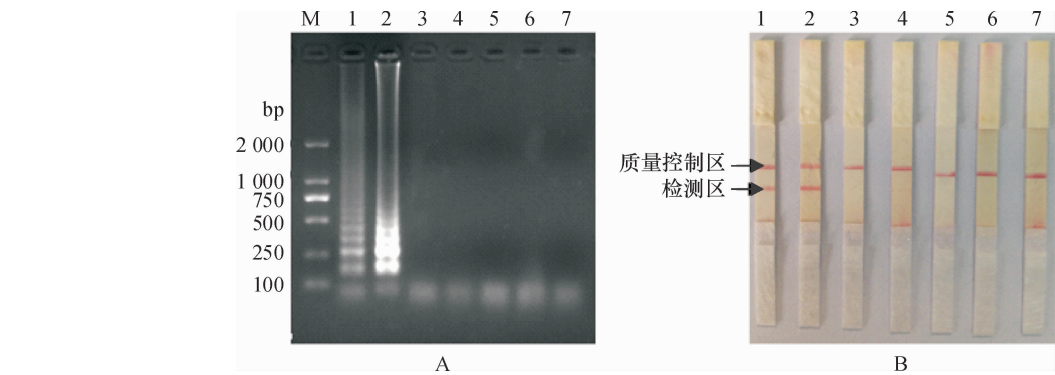
图 4 CSFV RT-LAMP 反应体系优化

Fig. 4 Optimization of reaction components of CSFV RT-LAMP

2.3 CSFV RT-LAMP-LFD 检测方法特异性分析

为了确认 CSFV RT-LAMP-LFD 检测方法的特异性,用优化的条件,分别以 PRRSV、JEV、PCV-2、PRV、APP、CSFV GXW-07 株和 CSFV 石门株的核酸模板进行 RT-LAMP 方法检测,并用琼脂糖凝胶电泳

法作为方法对照。结果表明,CSFV GXW-07 株和石门株为阳性,其余病原均为阴性(图 5),该结果表明所建立的 CSFV RT-LAMP-LFD 检测方法具有良好的特异性。



M;2 000 bp DNA marker; 1~7 分别为:CSFV GXW-07 株、CSFV 石门株、APP、PCV-2、PRV、JEV、PRRSV;A:RT-LAMP 琼脂糖凝胶电泳检测;B:RT-LAMP-LFD 方法检测。

图 5 CSFV RT-LAMP-LFD 检测方法特异性分析

Fig. 5 The specificity of CSFV RT-LAMP-LFD detection method

2.4 CSFV RT-LAMP-LFD 检测方法的灵敏度分析

对 CSFV GXW-07 株基因组 RNA 进行 10 倍梯度稀释试验表明,钙黄绿素-可视化 RT-LAMP 方法

(图 6A)、RT-LAMP 琼脂糖凝胶电泳检测方法(图 6B)以及 RT-LAMP-LFD 检测方法(图 6C)的敏感性一致,最低检测模板浓度均为 50 pg,但比 RT-PCR 检测(500 pg)方法(图 6D)的灵敏度高 10 倍。

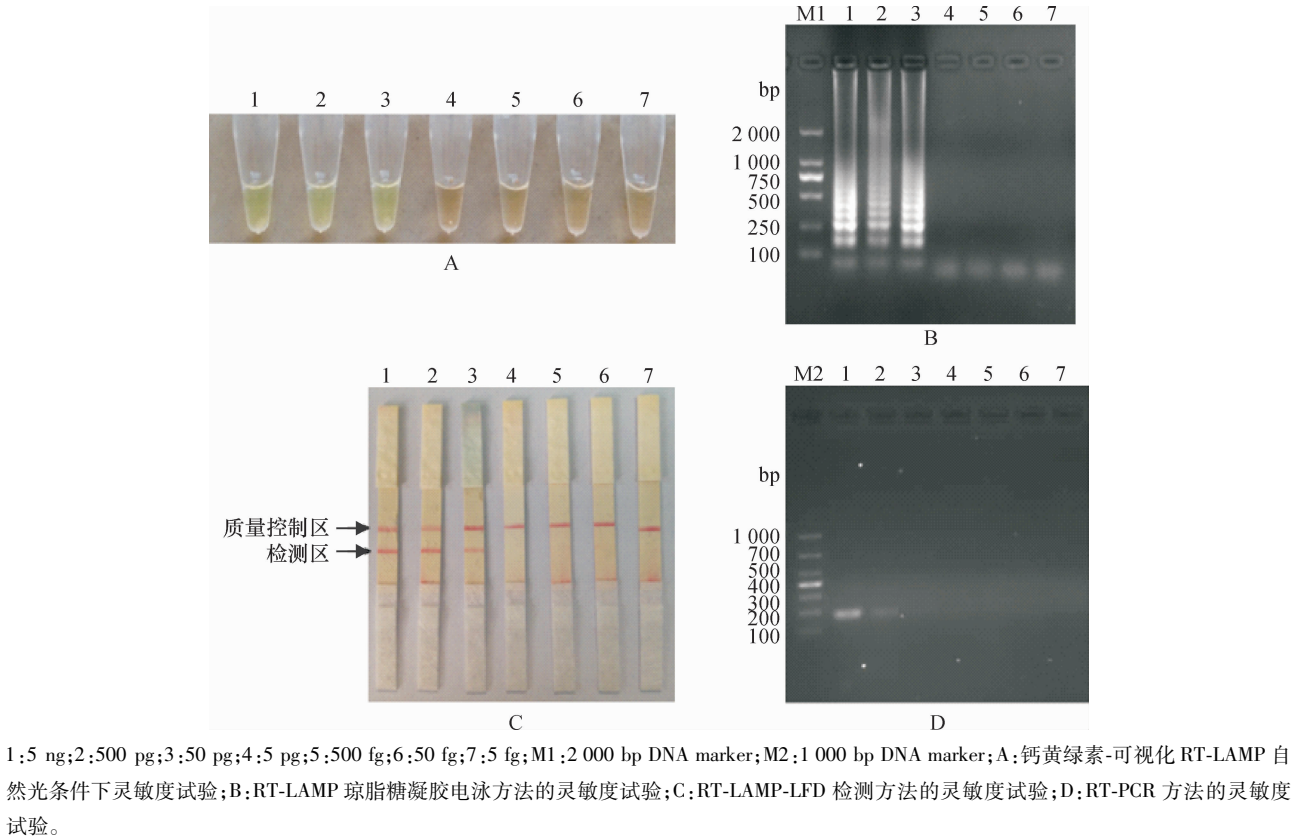


图 6 CSFV RT-LAMP-LFD 检测方法灵敏度分析

Fig. 6 The sensitivity of CSFV RT-LAMP-LFD detection method

2.5 CSFV RT-LAMP-LFD 检测方法的临床应用研究

将临床采集的 43 份疑似 CSFV 感染的病料进行 RT-PCR 和 RT-LAMP-LFD 方法检测。结果(表 2)显示,应用 RT-PCR 方法检测时,29 份呈阳性,阳性率为 67.4%;应用 RT-LAMP-LFD 方法检测时,31 份呈阳性,阳性率为 72.1%,二者的符合率为 93.5%。CSFV RT-LAMP-LFD 检测方法的临床检出率更高。

表 2 CSFV RT-LAMP-LFD 检测方法的临床应用				
Tab.2 Clinical application of CSFV RT-LAMP-LFD				
检测方法	阳性/份	阴性/份	阳性率/%	检测方法的符合率/%
RT-PCR	29	14	67.4	
RT-LAMP-LFD	31	12	72.1	93.5

3 讨论

猪瘟是猪重大烈性传染病之一,在中国主要采用猪瘟兔化弱毒疫苗(HCLV)接种的方法预防和控制 CSF 的流行,但是近年来,CSF 在我国重新抬头,出现非典型、持续感染、免疫抑制的流行特征,传统疫苗的作用越来越小^[11-12]。传统的诊断方法如 PCR、IFA 等虽然精确,但却受制于设备的需求以及

<http://xuebao.scau.edu.cn>

检测耗时较长的原因而不能在基层广泛应用。因此,建立一种新型、快速、简便的猪瘟检测方法对基层猪瘟预防和诊断具有重大意义。

本研究采用 RT-LAMP 和横向流动试纸条(LFD)技术相结合的方法,建立一种 CSFV RT-LAMP-LFD 检测方法,该法只需在水浴锅中恒温 60℃反应 50 min,然后通过标记的探针在密闭的横向流动试纸条杂交,5 min 后用肉眼就可观察到检测结果。整个过程可在 1 h 之内完成,且无需特殊设备要求。目前 CSFV 国标的检测方法是间接免疫荧光方法,该方法是基于检测 CSFV 表面抗原蛋白进行的。在实际应用中,间接免疫荧光方法存在耗时较长,操作复杂等弊端,比较难以具体开展。而本研究所建立的 CSFV RT-LAMP-LFD 检测方法是基于病毒核酸检测,因此我们选择与行业中常用的而又较易开展的核酸检测方法 RT-PCR 方法进行平行比较。旨在通过比较其对病毒核酸方面的检测时间、可操作性及临床应用效果,探索一种可在基层场地对临床病料进行实时便捷分析的检测方法。与传统 CSF 诊断方法相比,本试验建立的方法并不需要特殊设备要求,与 RT-PCR 相比,检测时间大大缩短,灵敏度高了 10 倍,跟钙黄绿素-可视化 RT-LAMP 方法相比,消除了因为肉眼观察颜色导致人为误差,而且试

纸条是在密闭容器里完成,因此也没有其他因外加荧光染料导致的 RT-LAMP 产物的污染产生的误差,避免了假阳性产生。因此对于基础临床病料诊断具有良好的应用前景。

由于该方法是针对 CSFV *NS5B* 基因设计的引物,而 CSF 强弱毒株基因组 *NS5B* 序列上没有太大的区别,所以本研究所建立方法不能用于区分 CSFV 强弱毒株,对于该方法在强弱毒株的鉴别方面的不足,我们需对强弱毒株的基因组进行进一步分析,并探索可用于 RT-LAMP-LFD 检查方法的新引物。

RT-LAMP 引物的设计是整个检测方法的关键,好的引物能够保证检测结果的准确性。本试验首先对设计的针对 CSFV *NS5B* 基因的 RT-LAMP 引物进行筛选,结果表明,所设计的针对 CSFV *NS5B* 基因的特异性引物具有良好的特异性,并不与其他病原产生阳性反应。有研究表明,RT-LAMP 的反应条件和体系也直接影响了检测的特异性和敏感度,如内外引物的浓度、 Mg^{2+} 浓度以及酶浓度等^[9, 13]。因此本试验对建立的 CSFV RT-LAMP 检测方法进行体系和条件的优化。本试验设计的 1 对环引物大大加快了扩增反应的进行。有趣的是,过量的 dNTPs 和 *Bst* 酶会导致反应产物浓度降低。由此可见,体系成分和条件的优化对增加检测方法的灵敏度和特异性很有必要。另外在临床病料检测试验过程中,发现 CSFV RT-LAMP-LFD 检测方法比 RT-PCR 的临床检出率更高。

我们将 RT-LAMP 技术与 LFD 技术相结合应用于对 CSFV 的检测,该方法可用于检测 CSFV 感染的组织或血清等临床样品。本试验所建立的 CSFV RT-LAMP-LFD 检测方法旨在探索一种可在基层场地对正常与疑似 CSFV 感染猪进行实时便捷诊断的检测方法,其应用价值主要在于 CSFV 猪瘟病毒感染猪的初步诊断、进出口贸易中 CSF 的快速筛查以及无 CSF 疫苗免疫猪场的 CSF 净化。这对于开发 CSFV 感染的新型诊断工具,具有良好的应用前景。

参考文献:

[1] FLORES-GUTIERREZ G H, INFANTE F. Resolution of a classical swine fever outbreak in the United States-Mexico

border region [J]. Transbound Emerg Dis, 2008, 55 (9/10): 377-381.

[2] LOHSE L, NIELSEN J, UTTENTHAL A. Early pathogenesis of classical swine fever virus (CSFV) strains in Danish pigs[J]. Vet Microbiol, 2012, 159(3/4): 327-336.

[3] DIAS N L, FONSECA J A, OLIVEIRA A M, et al. Validation of a real time PCR for classical swine fever diagnosis[J/OL]. Vet Med Int, 2014-04-09[2015-04-13]. [http://dx. doi. org/10. 1155/2014/171235](http://dx.doi.org/10.1155/2014/171235).

[4] 刘坤,兰邹然,姜平. 猪瘟病毒分子生物学及检测技术研究进展[J]. 动物医学进展, 2012,33(10): 99-104.

[5] 温国元,李坤,邵华斌,等. 猪瘟病毒 E2 蛋白的原核表达及抗体间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 湖北农业科学, 2009,48(11): 2632-2635.

[6] 杨宗照,王剑峰,谢正,等. 猪瘟病毒强弱毒株通用性 RT-PCR 检测方法研究进展[J]. 中国动物检疫, 2012, 29(11): 71-76.

[7] 王向鹏,张兴娟,孙元,等. 六种检测猪瘟病毒方法的比较[J]. 微生物学报, 2010,50(8): 1087-1093.

[8] 张朝红,张彦明,张永国,等. 猪瘟病毒 4 种检测方法的比较[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007,35(5): 24-28.

[9] NOTOMIT O H M H. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): e63.

[10] GLYNOU K, IOANNOUP C, CHRISTOPOULOS T K, et al. Oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles as probes in a dry-reagent strip biosensor for DNA analysis by hybridization[J]. Anal Chem, 2003, 75(16): 4155-4160.

[11] JOHNS H L, BENSAUDE E, LA ROCCA S A, et al. Classical swine fever virus infection protects aortic endothelial cells from pIpC-mediated apoptosis[J]. J Gen Virol, 2010, 91: 1038-1046.

[12] SUN J, JIANG Y, SHI Z, et al. Proteomic alteration of PK-15 cells after infection by classical swine fever virus [J]. J Proteome Res, 2008, 7(12): 5263-5269.

[13] NAGAMINE K, HASE T, NOTOMI T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers[J]. Mol Cell Probes, 2002, 16(3): 223-229.

【责任编辑 柴 焰】