

曾宇晨, 龚浪, 王京煜, 等. 基于 B646L、EP402R、MGF360/505 基因的非洲猪瘟病毒 ERA 检测方法的建立 [J]. 华南农业大学学报, 2021, 42(5): 33-40.
ZENG Yuchen, GONG Lang, WANG Jingyu, et al. Development of ERA detection method for African swine fever virus based on B646L, EP402R and MGF360/505 genes[J]. Journal of South China Agricultural University, 2021, 42(5): 33-40.

基于 B646L、EP402R、MGF360/505 基因的 非洲猪瘟病毒 ERA 检测方法的建立

曾宇晨¹, 龚浪², 王京煜¹, 潘昊鸣¹, 梁杏玲¹, 马俊¹, 张桂红², 王衡^{1,2,3}

(1 华南农业大学 兽医学院/广东省兽医临床重大疾病综合防控重点实验室, 广东 广州 510642; 2 国家非洲猪瘟区域实验室 (广州)/华南农业大学 非洲猪瘟防控技术研究中心, 广东 广州 510642; 3 华南农业大学 国家生猪种业工程技术研究中心, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】建立一种基于酶促重组酶扩增 (Enzymatic recombinase amplification, ERA) 技术的非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus, ASFV) DNA 快速检测方法。【方法】参考 ASFV B646L 基因、EP402R 基因和多基因家族成员 MGF360/505 基因保守序列, 设计特异性的 ERA 探针和引物, 经过反应条件的优化, 建立 42 ℃ 等温条件下检测 ASFV DNA 的 ERA 方法。【结果】ERA-ASFV-B646L、ERA-ASFV-EP402R 和 ERA-ASFV-MGF 3 个检测方法分别在 16、7 和 13 min 内即可得出检测结果; 特异性强, 对阳性样品拷贝数的检测下限均为 10² μL⁻¹; 与我国非洲猪瘟诊断技术标准中的方法对比, 结果符合率为 100%。【结论】本研究建立的 ERA 检测方法可以用于 ASFV 的快速检测, 为流行病学调查和现场检测提供了一种快速有效的检测方法。

关键词: 非洲猪瘟; 酶促重组酶扩增; 等温扩增; 快速检测
中图分类号: S852.651 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2021)05-0033-08

Development of ERA detection method for African swine fever virus based on B646L, EP402R and MGF360/505 genes

ZENG Yuchen¹, GONG Lang², WANG Jingyu¹, PAN Haoming¹, LIANG Xingling¹,
MA Jun¹, ZHANG Guihong², WANG Heng^{1,2,3}

(1 College of Veterinary medicine, South China Agricultural University/Key Laboratory of Comprehensive Prevention and Control for Severe Clinical Animal Diseases of Guangdong Province, Guangzhou 510642, China;
2 African Swine Fever Regional Laboratory of China (Guangzhou)/Prevention and Control Technology Research Center for African Swine Fever, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 3 National Engineering Research Center for Breeding Swine Industry, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】To establish a rapid detection method of African swine fever virus (ASFV) DNA based on enzymatic recombinase amplification (ERA) technology. 【Method】Specific ERA probes and primers were designed according to the conserved sequences of B646L and EP402R genes, and MGF360/505

收稿日期: 2021-01-15 网络首发时间: 2021-05-12 09:29:49
网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20210511.1546.002.html>
作者简介: 曾宇晨 (1995—), 男, 硕士研究生, E-mail: 2602166905@qq.com; 通信作者: 张桂红 (1968—), 女, 教授, 博士, E-mail: guihongzh@scau.edu.cn; 王衡 (1981—), 男, 副教授, 博士, E-mail: wangheng2009@scau.edu.cn
基金项目: 广东省重点领域研发计划 (2019B020211005, 2019B020211003); 国家自然科学基金 (31941004); 财政部和农业农村部国家现代农业技术产业体系基金 (CARS-35)

gene which was one of the ASFV multigene family members. Through optimizing reaction conditions, the ERA method for detecting ASFV DNA was finally established under the isothermal condition of 42 °C. 【Result】 The detection results of three methods of ERA-ASFV-B646L, ERA-ASFV-EP402R and ERA-ASFV-MGF could be obtained within 16, 7 and 13 min respectively. The copy number detection limitation of positive sample was all $10^2 \mu\text{L}^{-1}$. The coincidence rate was 100% compared with the common method in the technical standard of ASFV diagnosis in China. 【Conclusion】 The established ERA method can be used for rapid detection of ASFV, and provides an effective rapid detection method for epidemiological investigation and field detection.

Key words: African swine fever; enzymatic recombinase amplification; isothermal amplification; rapid detection

非洲猪瘟 (African swine fever) 是由非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus, ASFV) 引起的急性、烈性、高度接触性的传染病。该病毒是一种有囊膜的双链 DNA 病毒, ASFV 基因组大小约为 170~190 kb, 编码 151~167 个基因^[1]。ASFV 中, B646L 基因编码的 P72 蛋白是 ASFV 的主要衣壳结构蛋白, 也是 ASFV 检测中最常用的靶基因^[2]; EP402R 基因编码的 CD2v 蛋白和多基因家族成员 MGF360/505 基因均能够影响宿主的干扰素产生, 且 2 个基因的缺失是研制非洲猪瘟疫苗的主要方向之一^[3-4]。

目前尚无有效的疫苗和药物用于控制非洲猪瘟, 只能通过早期检测淘汰来控制疫情的发展。已经建立的检测方法主要包括红细胞吸附试验、PCR、实时荧光定量 PCR、环介导等温扩增 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 及酶促重组酶扩增 (Enzymatic recombinase amplification, ERA) 等^[5]。ERA 是一种检测核酸的新技术, 通过在模板内添加 3 种蛋白 (DNA 重组酶、单链结合蛋白和具有聚合链置换功能的 DNA 聚合酶), 并加入特异性引物和探针, 在一定时间内 (15~20 min) 完成等温扩增^[6]。本研究采用 ASFV 编码 P72 蛋白的 B 6 4 6 L、编码 C D 2 v 蛋白的 E P 4 0 2 R 和 MGF360/505 基因作为目的基因模板, 通过条件优化, 建立用于快速检测 ASFV 的 ERA 等温扩增方法。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

基础型核酸扩增试剂盒 (ERA 法) 购自苏州先达基因科技有限公司; Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; GenStar 2×Taq PCR StarMix 和 Loading Dye 购自广州康润生物公司; pMD18-T Vector Cloning 试剂盒购自 Takara 公司; RaPure Viral RNA/DNA 试剂盒购自广州美基生物科技有

限公司。

1.2 病毒株与临床样品

猪繁殖和呼吸综合征病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)、猪瘟病毒 (Classical swine fever virus, CSFV) 和伪狂犬病毒 (Pseudorabies virus, PRV) 的阳性 DNA 或 cDNA 样品均由华南农业大学兽医学院传染病教研室保存。15 份 ASFV 阳性核酸样品由华南农业大学国家非洲猪瘟区域实验室 (广州) 提供。

1.3 引物和探针设计

根据 GenBank 公布的 ASFV GZ201801 (GenBank: MT496893.1) 病毒基因序列, 选取 B646L 基因 (编码 p72 蛋白) 序列、EP402R 基因 (编码 CD2v 蛋白) 序列和多基因家族成员 MGF360/505 基因序列的相关片段。根据 TwistDX 公司给出的指导建议 (<https://www.twistdx.co.uk/en/support/rpa-assay-design-2>) 设计 ERA 引物和探针 (表 1), 通过 BLAST 比对确定引物和探针的特异性, 送生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成标记。

1.4 DNA 标准模板的制备

以 ASFV(GZ201801 株) 细胞培养悬液为样本, 按照 RaPure Viral RNA/DNA 提取试剂盒说明书, 对病毒悬液进行 DNA 提取。利用构建目的片段的引物 (B646L-18t-F/R、EP402R-18t-F/R 和 MGF-18t-F/R), 使用 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 试剂盒, 经过 PCR 后, 获得 B646L、EP402R 和 MGF360/505 目的基因片段 (表 1)。PCR 反应体系: 2× Phanta Max Buffer 25 μL , dNTP Mix($10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 2 μL , Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 1 μL , 上、下游引物 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 2 μL , DNA 样本 2 μL , ddH₂O 补足 50 μL 。反应程序: 95 °C 3 min; 95 °C 15 s、61 °C (B646L)/43 °C (EP402R)/57 °C (MGF360/505) 15 s、72 °C 1 min (B646L)/1 min (EP402R)/1.5 min (MGF360/505), 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。上述病毒核酸提取及

表 1 ERA 探针序列与构建目的片段的引物序列

Table 1 ERA probe sequence and primer sequence for constructing target fragment

引物/探针 Primer/probe	序列(5'→3') Sequence	产物长度/bp Product size
B646L-ERA-probe	CTGGAAGAGCTGTATCTCTATCCTGAAAGCT(FAM-dT)(THF) (BHQ1-dT)CTCTGCGTGGTGAGTGG-C3-spacer	
B646L-ERA-F1	CGATAAGATTGATACCATGAGCAGTTACGG	173
B646L-ERA-R1	GATTGGCACAAGTTCGGACATGTTGTTAAC	
B646L-ERA-F2	ACAAGTTCGGACATGTTGTTAACGCCATTA	135
B646L-ERA-R2	CGATAAGATTGATACCATGAGCAGTTACGG	
B646L-ERA-F3	CGATAAGATTGATACCATGAGCAGTTACGG	137
B646L-ERA-R3	GAGATTGGCACAAGTTCGGACATGTTGTTA	
EP402R ERA-probe	CATTACTTCCTAAGCCTTACAGTCGTTATCAG(FAM-dT)(THF) (BHQ1-dT)AATACACCTATTTAC-C3-spacer	
EP402R-ERA-F1	CCTGAATCTAATGAAGAAGAACAATGTCAGCATG	188
EP402R-ERA-R1	CACGGTTTAGGTAAGGGAAATGGGTTGAGT	
EP402R-ERA-F2	CGGTTTAGGTAAGGGAAATGGGTTGAGTGG	195
EP402R-ERA-R2	CACCACTTCCATACATGAACCATCTCCCAGAG	
EP402R-ERA-F3	CCACTTCCATACATGAACCATCTCCCAGAG	197
EP402R-ERA-R3	CACGGTTTAGGTAAGGGAAATGGGTTGAGT	
MGF-ERA-probe	CAGCGCGTAACAGTAATATATTGTTAATGGAT(FAM-dT)(THF) (BHQ1-dT)TATCCTTGGTAGAAGC-C3-spacer	
MGF-ERA-F1	TTGTACTGAAGTAAGCATAGCTTGGTTGAT	194
MGF-ERA-R1	GAATGGCGATTAAAATGTCTCCTGTATTAT	
MGF-ERA-F2	GAATGGCGATTAAAATGTCTCCTGTATTAT	192
MGF-ERA-R2	TATTGTACTGAAGTAAGCATAGCTTGGTTG	
MGF-ERA-F3	GTACTGAAGTAAGCATAGCTTGGTTGATGT	196
MGF-ERA-R3	GAATGGCGATTAAAATGTCTCCTGTATTAT	
B646L-18t-F	TTAGGTACTGTAACGCAGCACAGCTGAAC	1 941
B646L-18t-R	ATGGCATCAGGAGGAGCTTTTTGTCTTAT	
EP402R-18t-F	TAAAATGATAATACTTATTTTTTTAAT	1 087
EP402R-18t-R	TTAAATAATTCTATCTACGTGAATA	
MGF-18t-F	GTGTTGACAGATACCAGCCCGTAG	2 559
MGF-18t-R	GTAAAGGCCGTGAAGAGCGATAA	

扩增反应体系配置操作均在国家非洲猪瘟区域实验室(广州)所在的华南农业大学生物安全三级实验室完成。将纯化后的目的片段连接至 pMD18-T 载体后,送至广州天一辉远基因科技有限公司进行测序。测序正确后,换算为拷贝数。

1.5 ERA 方法的引物筛选

以构建的 DNA 标准质粒为模板,通过 PCR 获

得 ERA 引物的产物(B646L-ERA-F1/R1、B646L-ERA-F2/R2 和 B646L-ERA-F3/R3, EP402R-ERA-F1/R1、EP402R-ERA-F2/R2 和 EP402R-ERA-F3/R3, MGF-ERA-F1/R1、MGF-ERA-F2/R2 和 MGF-ERA-F3/R3),筛选出试验效果较优引物对。PCR 反应体系:2 × Taq PCR StarMix 10 μL, 上、下游引物(10 μmol·L⁻¹)各 0.40 μL, 模板 2 μL, ddH₂O 补足

20 μL 。反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ (B646L)/62 $^{\circ}\text{C}$ (EP402R)/56 $^{\circ}\text{C}$ (MGF360/505) 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 5 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。使用常规 ERA 方法, 进行第 2 次引物筛选, 筛选出试验效果较优引物对。ERA 反应体系: 溶解剂 20 μL , 上、下游引物 ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 2.10 μL , 模板 2 μL , 激活剂 2 μL , ddH₂O 补足 50 μL 。反应程序: 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 每 15 s 收集 FAM 荧光信号。

1.6 ERA 方法反应体系因素水平设计与优化

参考 ERA 方法的使用说明^[7], 采用 L₉(3³) 的

正交方法设计方案 (表 2)。优化 ERA 体系中的温度、探针浓度、引物浓度、激活剂浓度。经试验得出结果, 使用 Minitab 软件分析得出各因素的最优水平。

1.7 ERA 方法的特异性试验

以 PRRSV、CSFV 和 PRV 的 DNA 或 cDNA 作为对照, ddH₂O 为空白对照, 使用优化后的 ERA 方法进行荧光检测, 通过观察有无扩增曲线, 检测方法的特异性。

表 2 L₉(3³) 试验方案
Table 2 L₉(3³) experimental program

序号 Order number	$\theta/^{\circ}\text{C}$	探针体积/ μL Probe volume	引物体积/ μL Primer volume	激活剂体积/ μL Activator volume
1	37	0.24	0.84	1
2	37	0.48	2.10	2
3	37	0.72	3.15	3
4	39	0.24	2.10	3
5	39	0.48	3.15	1
6	39	0.72	0.84	2
7	42	0.24	3.15	2
8	42	0.48	0.84	3
9	42	0.72	2.10	1

1.8 ERA 方法的灵敏性试验

将 pMD18T-ASFV-B646L、pMD18T-ASFV-EP402R 和 pMD18T-ASFV-MGF 按 10 倍梯度各稀释至拷贝数为 10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²、10¹ 和 10⁰ μL^{-1} 。以各浓度梯度的 pMD18T-ASFV-B646L、pMD18T-ASFV-EP402R 和 pMD18T-ASFV-MGF 为模板, 同时加入 ddH₂O 作为空白对照。使用优化后的 ERA 方法进行荧光检测, 重复 3 次, 检测方法的灵敏性。

1.9 ERA 方法的重复性试验

以拷贝数为 10⁵、10⁴ 和 10³ μL^{-1} 的 pMD18T-ASFV-B646L、pMD18T-ASFV-EP402R 和 pMD18T-ASFV-MGF 为模板, ddH₂O 作为空白对照。使用优化后的 ERA 方法进行荧光检测, 重复 3 次, 检测方法的重复性。

1.10 ERA 方法的临床样本验证检测

以 15 份 ASFV DNA 阳性样品和 50 份 DNA 阴性样品为模板, 使用优化后的 ERA 方法进行荧光检测, 并参照 GB/T 18648—2020 非洲猪瘟诊断技术标准^[8] 提供的 B646L 基因的扩增引物

和探针检测样品, 将 2 种方法的结果进行对比分析。

2 结果与分析

2.1 DNA 模板的制备

以 ASFV GZ201801 病毒基因组为模板, B646L-18t-F/R、EP402R-18t-F/R 和 MGF-18t-F/R 为引物, 分别扩增获得 1 941、1 087 和 2 559 bp 的特异性片段 (图 1A~1C)。将扩增片段纯化后, 克隆到 pMD18-T 载体上, 进行体外扩增检测得出结果 (图 1D~1F) 并测序正确后, 命名为 pMD18T-ASFV-B646L、pMD18T-ASFV-EP402R 和 pMD18T-ASFV-MGF。测得 pMD18T-ASFV-B646L、pMD18T-ASFV-EP402R 和 pMD18T-ASFV-MGF 的 DNA 拷贝数分别为 4.15 $\times 10^{10}$ 、4.67 $\times 10^{10}$ 和 4.13 $\times 10^{10}$ μL^{-1} 。

2.2 ERA 方法的引物筛选

将每对 ERA 引物, 分别进行普通 PCR, 发现每对引物的特异性都很好 (图 2)。再使用 ERA 体系, 对每对 ERA 引物进行荧光检测, 挑选出最优的

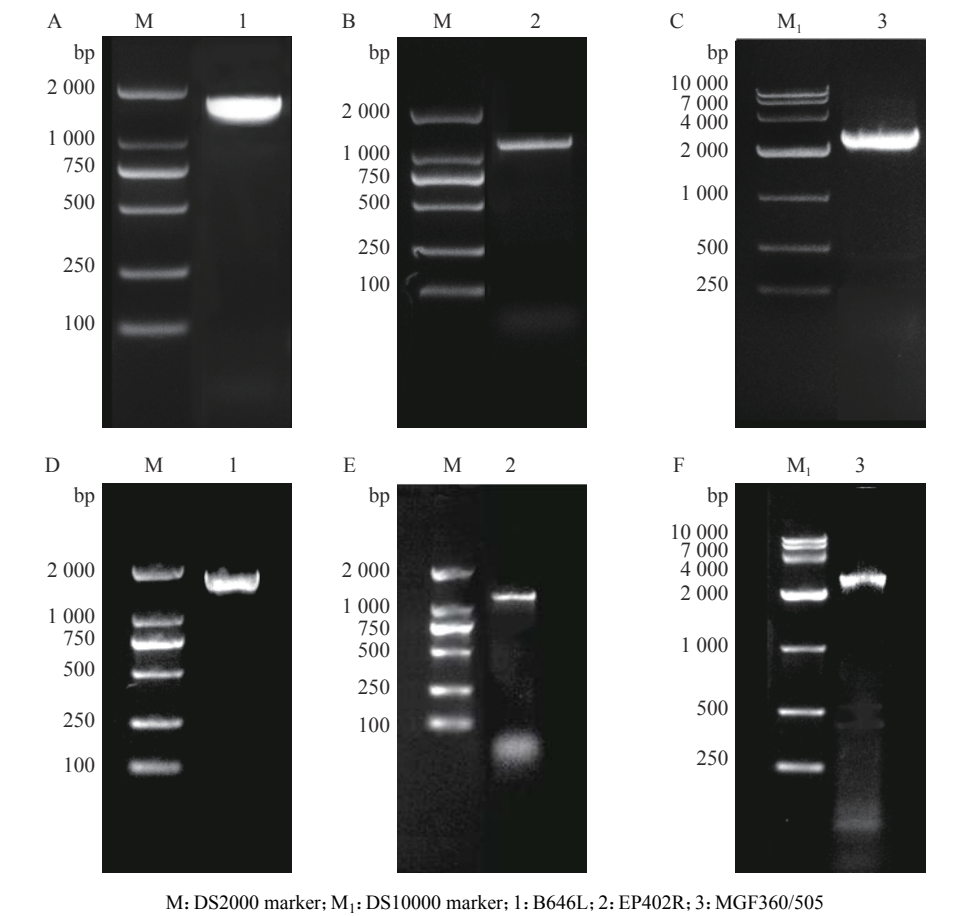


图 1 PCR 扩增产物结果 (A~C) 以及质粒鉴定结果 (D~F)

Fig. 1 PCR amplification product results (A~C) and plasmid identification results (D~F)

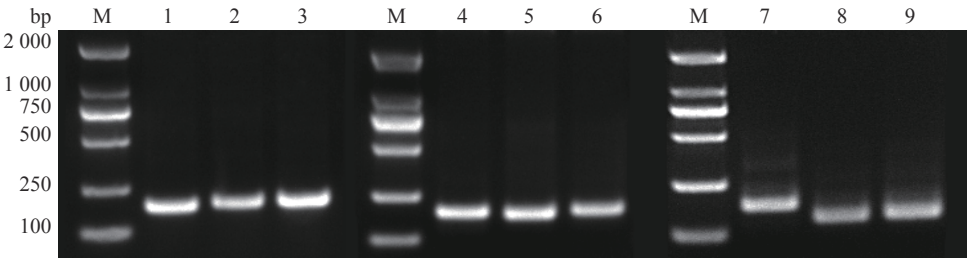


图 2 普通 PCR 对不同引物的检测结果

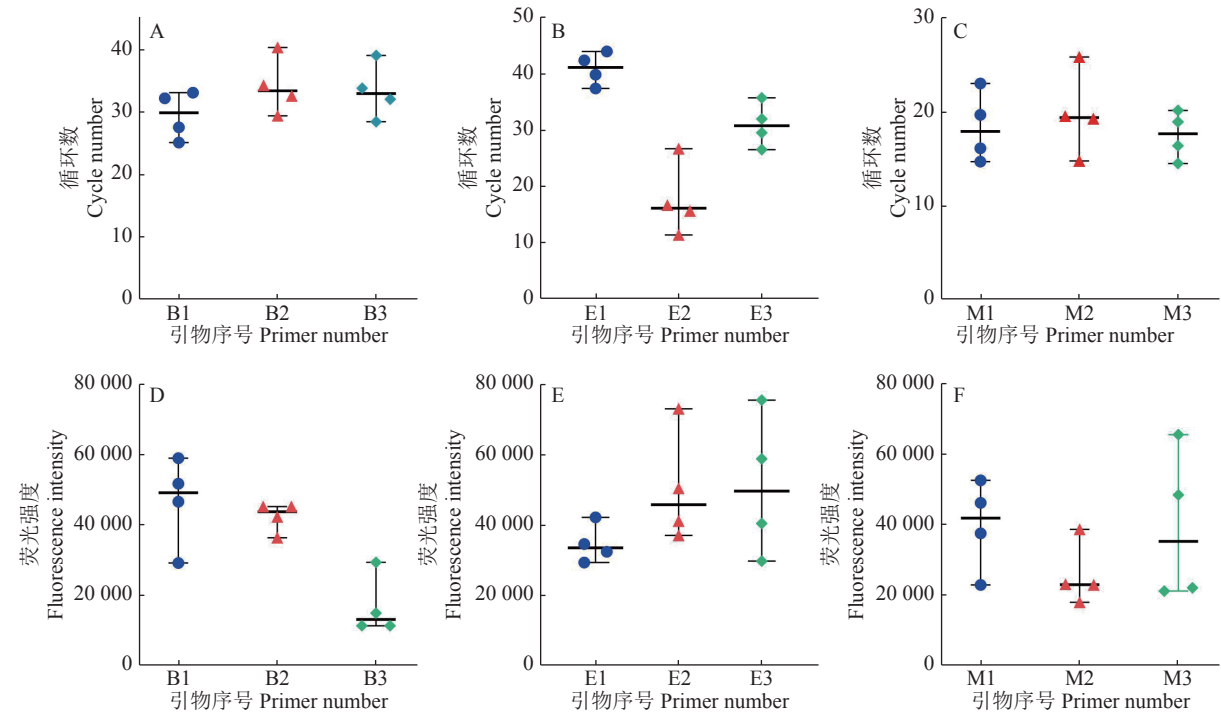
Fig. 2 Normal PCR detection results of different primers

1 对引物。以反应管内的荧光信号到达设定的阈值 ($\Delta Rn=5\,000$) 时所经历的循环数 (Cycle number) 最低为原则, 且荧光值最大为选择标准。分析后, B646L-ERA-F1/R1、EP402R-ERA-F2/R2、MGF-ERA-F1/R1 分别为常规 ERA-ASFV-B646L、ERA-ASFV-EP402R、ERA-ASFV-MGF 方法的最优引物对 (图 3)。

2.3 ERA 方法条件优化

用最优的 1 对引物按表 2 试验方案进行 ERA 反应, 每个组合重复 4 次, 以设定的阈值所经历

的循环数最低为原则, 记录结果。9 组试验结果经过极差分析, 得出每个因素的最佳水平, 最终列出最佳反应体系。50 μL 反应体系中, ERA-ASFV-B646L: 42 $^{\circ}\text{C}$, 探针 0.48 μL , 上、下游引物各 3.15 μL , 激活剂 2 μL , 溶解剂 20 μL , ddH₂O 21.22 μL ; ERA-ASFV-EP402R: 42 $^{\circ}\text{C}$, 探针 0.24 μL , 上、下游引物各 2.10 μL , 激活剂 2 μL , 溶解剂 20 μL , ddH₂O 23.56 μL ; ERA-ASFV-MGF: 42 $^{\circ}\text{C}$, 探针 0.48 μL , 上、下游引物各 3.15 μL , 激活剂 2 μL , 溶解剂 20 μL , ddH₂O 21.22 μL 。



B1: B646L-ERA-F1/R1; B2: B646L-ERA-F2/R2; B3: B646L-ERA-F3/R3; E1: EP402R-ERA-F1/R1; E2: EP402R-ERA-F2/R2; E3: EP402R-ERA-F3/R3; M1: MGF-ERA-F1/R1; M2: MGF-ERA-F2/R2; M3: MGF-ERA-F3/R3

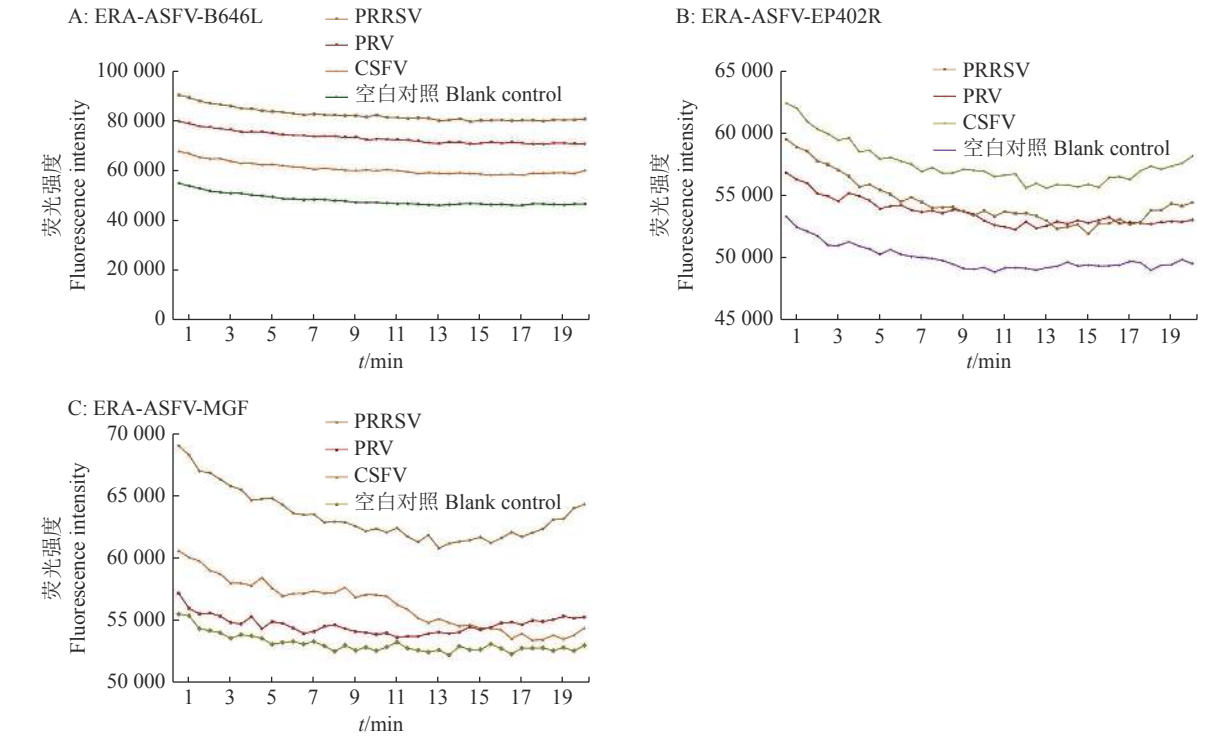
图 3 常规 ERA 对不同引物的检测结果

Fig. 3 Routine ERA detection results of different primer pairs

2.4 ERA 方法的特异性试验

对 PRRSV、CSFV、PRV 的 DNA 或 cDNA 进行 ERA 检测，ddH₂O 为空白对照。结果 (图 4) 显

示，该方法对其他 3 种病毒的 DNA 或 cDNA 无特异性扩增，表明该方法具有较强的特异性。



PRRSV: 猪繁殖和呼吸综合征病毒, PRV: 伪狂犬病毒, CSFV: 猪瘟疫病毒

PRRSV: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRV: Pseudorabies virus, CSFV: Classical swine fever virus

图 4 ERA-ASFV-B646L、ERA-ASFV-EP402R 和 ERA-ASFV-MGF 方法的特异性检测

Fig. 4 The specificity detection of ERA-ASFV-B646L, ERA-ASFV-EP402R and ERA-ASFV-MGF methods

2.5 ERA 方法的灵敏性试验

以拷贝数为 $10^0\sim10^6\text{ }\mu\text{L}^{-1}$ 梯度的 pMD18T-ASFV-B646L、pMD18T-ASFV-EP402R 和 pMD18T-ASFV-MGF 质粒为模板, 使用优化过的

ERA 方法进行检测。结果显示, ERA-ASFV-B646L、ERA-ASFV-EP402R 和 ERA-ASFV-MGF 方法检测所用时间分别为 16、7 和 13 min, 且对质粒拷贝数的检测限均为 $10^2\text{ }\mu\text{L}^{-1}$ (图 5)。

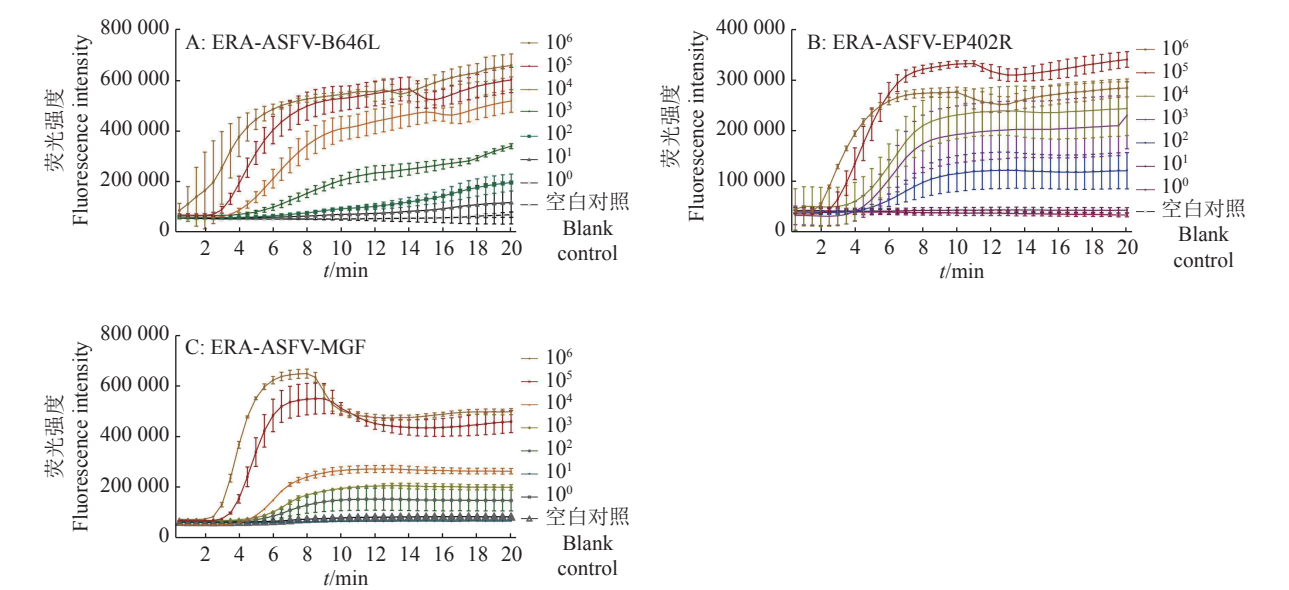


图 5 ERA-ASFV-B646L、ERA-ASFV-EP402R 和 ERA-ASFV-MGF 方法的灵敏性检测

Fig. 5 The sensitivity detection of ERA-ASFV-B646L, ERA-ASFV-EP402R and ERA-ASFV-MGF methods

2.6 ERA 方法的重复性试验

以拷贝数为 10^5 、 10^4 和 $10^3\text{ }\mu\text{L}^{-1}$ 的标准质粒分别作为模板, 进行 3 次 ERA 扩增反应。结果(表 3)显示, 标准质粒浓度越高, 重复性越好, 但所构建的方法不适合非洲猪瘟的定量试验。

2.7 ERA 方法的临床样本验证

采用 ERA-ASFV-B646L、ERA-ASFV-

EP402R 和 ERA-ASFV-MGF 方法同时检测 ASFV 15 份阳性核酸样品和 50 份阴性核酸样品, 使用 GB/T 18648—2020 非洲猪瘟诊断技术标准^[8]提供的检测方法与之进行比较。结果显示, 本试验建立的 3 种检测方法的检测结果与推荐方法检测结果的符合率为 100%。所构建的方法适合非洲猪瘟的定性试验。

表 3 ERA-ASFV-B646L、ERA-ASFV-EP402R 和 ERA-ASFV-MGF 方法的重复性检测

Table 3 The repeatability detection of ERA-ASFV-B646L, ERA-ASFV-EP402R and ERA-ASFV-MGF methods

方法 Method	标准质粒拷贝数/ μL^{-1} Standard plasmid copy number	循环数 Cycle number	变异系数/% Coefficient of variation
ERA-ASFV-B646L	10^5	6.71	5.54
	10^4	8.79	6.15
	10^3	13.86	10.57
ERA-ASFV-EP402R	10^5	6.64	1.20
	10^4	8.30	9.15
	10^3	8.64	10.45
ERA-ASFV-MGF	10^5	6.92	5.95
	10^4	9.64	1.72
	10^3	11.73	5.61

3 讨论与结论

目前,我国非洲猪瘟疫情总体可控,大部分猪场正在通过改变传统养殖结构限制非洲猪瘟疫情对养猪行业的影响。在尚无有效的治疗药物和商品化疫苗的情况下,只能通过生物安全配合实验室检测来防控疫情^[9-10]。实验室检测方法种类很多,但各有优缺点^[11],ELISA 有着操作简单、重复性好等特点,但不适用于 ASFV 感染的暴发期,且存在假阳性的诊断^[12];LAMP 方法具有高特异性、高灵敏性的特点,但获得检测结果至少需要 40 min,也易产生假阳性结果^[13]。ERA 检测方法作为新型分子病原学诊断方法,在 37~42 ℃ 的条件下即可实现核酸扩增,仅需要 20 min 左右的检测周期,在适合条件下改变试验条件,依然可以保持较高的灵敏度和较强的特异性^[14-15];例如 Xia 等^[16]使用逆转录-酶促重组等温扩增技术 (Reverse transcription-enzymatic recombinase amplification, RT-ERA) 对新冠病毒 (COVID-19)RNA 的双基因同时检测,25 min 内得出结果,无需特殊设备就可进行简便的居家检测。

目前构建的 ERA-ASFV 核酸检测方法需要注意以下问题。首先,普通移液枪无法吸取精确体积的黏性溶解剂,导致结果的重复性不是很好;在添加含有溶解剂溶液的过程中,需要使用为吸取黏性液体而设计的移液器。其次,ERA 方法反应非常迅速,扩增曲线会在短时间内迅速上升并进入平台期;所以,当加入所有试剂成分后,需要立即检测荧光。另外,目前建立的 ERA-ASFV 方法只能在病毒检测中作为定性的方法;检测结束后,反应不会自行终止,需要高温灭活试管中的蛋白。

综上所述,本试验建立的 ERA-ASFV-B646L、ERA-ASFV-EP402R 和 ERA-ASFV-MGF 方法特异性强,对应的最低拷贝数检测限均为 $10^2 \mu\text{L}^{-1}$,分别在 16、7 和 13 min 内即可完成反应。参照 GB/T 18648—2020 非洲猪瘟诊断技术标准^[8]推荐方法,经过对比,与推荐检测方法结果一致。本研究结果可为 ASFV 检测提供一种新方法,并为今后 ASFV 的 ERA 多基因检测打下良好技术基础。

参考文献:

[1] ZHAO D, LIU R, ZHANG X, et al. Replication and virulence in pigs of the first African swine fever virus isol-

ated in China[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2019, 8(1): 438-447.

[2] 郝永义, 林艳丽, 王友亮. 非洲猪瘟研究进展[J]. *生物技术通讯*, 2019, 30(3): 449-454.

[3] BORCA M V, CARRILLO C, ZSAK L, et al. Deletion of a CD2-like gene, 8-DR, from African swine fever virus affects viral infection in domestic swine[J]. *Journal of Virology*, 1998, 72(4): 2881-2889.

[4] O'DONNELL V, HOLINKA L G, GLADUEL D P, et al. African swine fever virus Georgia isolate harboring deletions of MGF360 and MGF505 genes is attenuated in swine and confers protection against challenge with virulent parental virus[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(11): 6048-6056.

[5] 林彦星, 曹琛福, 杨俊兴, 等. 非洲猪瘟病毒实验室诊断方法的研究进展[J]. *中国兽医学报*, 2018, 38(10): 2020-2024.

[6] 郭正洋, 刘钟栋, 刘小青, 等. 重组酶聚合酶扩增技术的研究进展[J]. *食品科技*, 2018, 43(9): 55-59.

[7] TWISTDX. Appendix to the TwistAmpTM reaction kit manuals[Z/OL]. [2014-08-14]. <http://www.twistdx.co.uk/images/uploads/docs/Appendix.pdf>.

[8] 中国动物卫生与流行病学中心. 非洲猪瘟诊断技术: GB/T 18648—2020[S]. 北京: 中国标准出版社, 2020: 1-32.

[9] 任丽萍, 斯张国, 高宏. 非洲猪瘟流行现状、存在问题及防控[J]. *畜牧兽医科学(电子版)*, 2020(8): 66-67.

[10] 杨汉春. 非洲猪瘟的现实、挑战与策略[J]. *兽医导刊*, 2019(19): 9-10.

[11] 张丽, 罗玉子, 王涛, 等. 非洲猪瘟诊断技术发展现状与需求分析[J]. *中国农业科技导报*, 2019, 21(9): 1-11.

[12] 张蕾, 董春娜, 李静, 等. 非洲猪瘟病毒间接 ELISA 抗体检测方法的建立[J]. *病毒学报*, 2020, 36(4): 670-674.

[13] 王林, 高晓龙, 吴迪, 等. 非洲猪瘟病毒实时荧光 LAMP 检测方法的建立与应用[J]. *中国兽药杂志*, 2020, 54(8): 1-8.

[14] 李林, 刘拂晓, 樊晓旭, 等. 非洲猪瘟病毒实时荧光 RPA 快速检测方法的建立[J]. *中国动物检疫*, 2017, 34(8): 87-91.

[15] WANG R, ZHANG F, WANG L, et al. Instant, visual, and instrument-free method for on-site screening of GTS 40-3-2 soybean based on body-heat triggered recombinase polymerase amplification[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(8): 4413-4418.

[16] XIA S, CHEN X. Single-copy sensitive, field-deployable, and simultaneous dual-gene detection of SARS-CoV-2 RNA via modified RT-RPA[J]. *Cell Discovery*, 2020, 6(1). doi: 10.1038/s41421-020-0175-x.

【责任编辑 李庆玲】