

侯恩慧, 陈秋勇, 吴学敏, 等. 猪流行性腹泻病毒荧光 RT-RAA 检测方法的建立及初步应用 [J]. 福建农业学报, 2024, 39 (10): 1146-1151.
HOU E H, CHEN Q Y, WU X M, et al. Fluorescent RT-RAA for Diagnosing Epidemic Diarrhea in Pigs [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2024, 39 (10): 1146-1151.

猪流行性腹泻病毒荧光 RT-RAA 检测方法的建立及初步应用

侯恩慧^{1,2}, 陈秋勇², 吴学敏², 丘镜莉², 吴仁杰²,
周伦江², 刘玉涛², 马玉芳^{1*}, 王隆柏^{1,2*}

(1. 福建农林大学动物科学学院/福建省兽医中药与动物保健重点实验室, 福建 福州 350002; 2. 福建省农业科学院畜牧兽医研究所/福建省畜禽疫病防治工程技术研究中心, 福建 福州 350013)

摘要:【目的】建立一种快捷、灵敏、简便检测猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 的 RT-RAA 检测方法, 以提高猪流行性腹泻病毒临床检测效率。【方法】针对 PEDV S 基因片段保守区设计引物和探针, 构建标准质粒 PEDV-S, 通过特异性、敏感性、重复性测定及条件优化, 建立检测 PEDV 重组酶介导链置换核酸扩增荧光法 (RT-RAA)。【结果】在 42 °C 恒温作用 20 min 的条件下, 建立的检测方法对检测猪传染性胃肠炎病毒 (porcine transmissible gastroenteritis virus, TGEV)、猪瘟病毒 (classical swine fever virus, CSFV)、伪狂犬病病毒 (porcine pseudorabies virus, PRV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 和猪轮状病毒 (porcine rotavirus, PoRV) 等猪源病毒均为阴性, 猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 为阳性; 最低检出限为 4.43×10^2 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的标准质粒; 重复性结果显示, 相同浓度标准质粒的差异性很小; 利用建立的 RT-RAA 方法检测 40 份猪病毒样本, 阳性率为 7.5% (3/40), 与实时荧光定量 PCR 检测结果相同。【结论】本研究建立的 PEDV RT-RAA 检测方法具有快速简便、耗时短、特异性高、灵敏度强和重复性好等特点, 适用于对 PEDV 的快速诊断。

关键词: 猪流行性腹泻病毒; S 蛋白; RT-RAA

中图分类号: S855.3

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2024) 10-1146-06

Fluorescent RT-RAA for Diagnosing Epidemic Diarrhea in Pigs

HOU Enhui^{1,2}, CHEN Qiuyong², WU Xuemin², QIU Jingli², WU Renjie²,
ZHOU Lunjiang², LIU Yutao², MA Yufang^{1*}, WANG Longbai^{1,2*}

(1. College of Animal Science, Fujian Agriculture and Forestry University/Fujian Provincial Key Laboratory of Veterinary Traditional Chinese Medicine and Animal Health, Fuzhou, Fujian 350002, China; 2. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences/Fujian Provincial Engineering Research Center for Animal and Poultry Disease Control, Fuzhou, Fujian 350013, China)

Abstract: 【Objective】 A rapid fluorescence RT-RAA to detect porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) was developed and tested for field application. 【Methods】 Primers and probes were designed for the conserved region of PEDV-S gene fragment, and a standard plasmid was constructed. Through condition optimization followed by tests for assay specificity, sensitivity, and repeatability, a recombinant enzyme-mediated chain replacement nucleic acid amplification fluorescence RT-RAA for detecting PEDV was established. 【Results】 Under a constant temperature of 42 °C for 20 min, the assay detected PEDV as positive, while negative on the porcine transmissible gastroenteritis virus (TGEV), classical swine fever virus

收稿日期: 2024-06-20 修回日期: 2024-08-15

作者简介: 侯恩慧 (1998—), 男, 硕士, 主要从事中西兽医结合与动物保健研究, E-mail: 2054584054@qq.com

* 通信作者: 马玉芳 (1970—), 女, 教授, 主要从事中西兽医结合与动物保健研究, E-mail: myfau850@sohu.com; 王隆柏 (1977—), 男, 研究员, 主要从事生猪疫病防控技术研究, E-mail: wanglongbai@163.com

基金项目: 福建省科技计划公益类专项 (2021R10260016); 福建省科技重大专项 (2021NZ029023); 福建省农业高质量发展超越“5511”协同创新工程项目 (XTCXGC2021008)

(CSFV), porcine pseudorabies virus (PRV), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), porcine rotavirus (PoRV) and other porcine viruses. It had a minimum detection limit of 4.43×10^2 standard plasmid copies μL^{-1} , a reproducibility showing little difference between the standard plasmids of the same concentration, and a positive rate of 7.5% (3 out of 40) on PEDV specimens comparable to that obtained by RT-qPCR. 【Conclusion】 The newly developed fluorescence RT-RAA for PEDV detection was considered appropriate for rapid diagnosis of epidemic diarrhea in pigs.

Key words: porcine epidemic diarrhea virus; S protein; fluorescence RT-RAA

0 引言

【研究意义】猪流行性腹泻 (porcine epidemic diarrhea, PED) 是由猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 引起的一种接触性传染病, 临床表现和猪传染性胃肠炎极其相似, 表现为以水样便腹泻、呕吐和脱水为主要表征的肠道疾病。该病可以感染所有日龄阶段的猪, 尤其是新生仔猪, 一旦发病, 其死亡率高达 100%^[1]。1971 年 PED 在欧洲首次被报道, 随后蔓延到世界许多地区; 2010 年我国多个省份突然爆发了 PED, 美国、加拿大和墨西哥也大规模爆发, 仅 2014 年就导致美国近千万头仔猪死亡, 占美国所有仔猪的近十分之一^[2], 给全球生猪养殖业带来了巨大的经济损失。PEDV 是一种单股、正链 RNA 病毒, 具有冠状结构特征。全基因组约长 28 kb, 包括 5'端帽、5'和 3'非翻译区、3'poly-A 尾部以及 7 个开放阅读框^[3]。ORF2 和 ORF4~6 编码 4 种结构蛋白, 包括 S、E、M 和 N 蛋白。其中, S 蛋白是 PEDV 主要的免疫蛋白, 在 PEDV 存活和逃避宿主免疫中起着至关重要的作用, 为机体产生中和抗体的主要蛋白, 在免疫监测中处于优先地位^[4]。利用 S 蛋白建立 PEDV 快速检测方法具有较高的可行性。【前人研究进展】PEDV 的检测方法主要包括病毒分离鉴定、中和试验、酶联免疫吸附试验等^[5]。这些方法虽然灵敏性和特异性均较高, 但在现实操作中过程繁琐、时间长、仪器价格昂贵、需要专业人员才能操作, 而且 ELISA 试剂盒多为进口, 成本高^[6]。重组酶介导核酸等温扩增 (RAA) 是一种新型检测技术, 具有快速、简单、低成本等优点, 不需要复杂的热环境, 在恒温条件下就能快速检测, 相对于其他检测方法, 优势显著^[7]。近年来, 该方法在病毒、细菌的研究中得到成功应用。Mao 等^[8] 研究报道, 猴痘病毒 (monkeypox virus, MPXV) 在 RAA 中对于其他痘病毒, 如牛痘病毒 (vaccinia virus, VACV) 具有特异性和非交叉反应性。Nie 等^[9] 报道采用乙脑病毒 (japanese encephalitis virus, JEV) 的 RT-RAA 方法对母猪流产胎儿和公猪的肿胀睾丸样本进行检测, 检出率仅为 6.49%。此外, RAA 还被应用于人类疾病

检测。Zhao 等^[10] 采用 RAA 方法对人泌尿生殖系统中的血吸虫进行检测, 与尿液显微镜检查具有 100% 的一致性。【本研究切入点】对于利用 PEDV 的 S 蛋白建立 RT-RAA 检测方法目前尚未见报道。【拟解决的关键问题】本研究根据 PEDV S 基因的高度保守区, 设计多对引物和探针, 建立针对 PEDV 的 S 基因荧光 RT-RAA 检测方法, 测定其敏感性、特异性和重复性, 并进行临床初步应用, 为研究 PED 的诊断与防控提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 病毒及临床样品

PEDV 以及猪传染性胃肠炎病毒 (porcine transmissible gastroenteritis virus, TGEV)、猪瘟病毒 (classical swine fever virus, CSFV)、伪狂犬病病毒 (porcine pseudorabies virus, PRV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)、猪轮状病毒 (porcine rotavirus, PoRV) 等猪源病毒由福建省农业科学院畜牧兽医研究所收集保存; 40 份疑似 PEDV 感染临床样品为 2020–2024 年采自福建省 19 个家庭农场 (表 1)。

表 1 疑似猪流行性腹泻病料收集的来源信息

Table 1 Information source and collection of suspected porcine epidemic diarrhea specimens

地区 Region	样本数 (份) / 来源猪场 (个) Samples/Farms
宁德 Ningde	5/2
三明 Sanming	6/2
龙岩 Longyan	10/6
漳州 Zhangzhou	8/3
莆田 Putian	11/6
合计 Total	40/19

1.2 主要试剂

pMD19-T 购自 TaKaRa 公司; Trelief5 α 感受态细胞购自擎科公司; 引物和探针均由亚尚生物工程有限公司合成; RT-RAA 核酸扩增试剂盒 (荧光型) 购自杭州众测生物科技有限公司; 高保真聚合酶购自诺唯赞生物公司; 质粒提取试剂盒及胶回收试剂盒购自艾科瑞公司。

1.3 引物及探针的设计与筛选

从 GenBank 基因数据库中下载 25 株 PEDV 的 S 基因序列，通过 DNAMAN 生物信息学软件分析 PEDV 的 S 基因的高度保守区域（图 1），利用 Primer 5.0 软件对 PEDV 的 S 基因设计多对引物、探针。引物、探针信息见表 2。

1.4 核酸的提取

按照核酸提试剂盒说明书，提取 PEDV、TGEV、CSFV、PRV、PCV、PRRSV、PoRV 核酸，并保存于 -80 ℃ 备用。

1.5 重组质粒标准品的构建

根据 PEDV S 基因序列设计引物（PEDV-DF/DR），

XJ646580.1	AGTATTCCCACCAACTTTAGTATGAGTATTAGGACAGAATATTTACAGCTTTACAACACGCCTGTTAGTGTGATTGTGCCAC
XH406270.1	AGTATTCCCACCAACTTTAGTATGAGTATTAGGACAGAATATTTACAGCTTTACAACACGCCTGTTAGTGTGATTGTGCCAC
XY775036.1	AGTATTCCCACCAACTTTAGTATGAGTATTAGGACAGAATATTTACAGCTTTACAACACGCCTGTTAGTGTGATTGTGCCAC
MH053413.1	AGTATTCCCACCAACTTTAGTATGAGTATTAGGACAGAATATTTACAGCTTTACAACACGCCTGTTAGTGTGATTGTGCCAC
MH593090.1	AGTATTCCCACCAACTTTAGTATGAGTATTAGGACAGAATATTTACAGCTTTACAACACGCCTGTTAGTGTGATTGTGCCAC
MK533002.1	AGTATTCCCACCAACTTTAGTATGAGTATTAGGACAGAATATTTACAGCTTTACAACACGCCTGTTAGTGTGATTGTGCTAC
MK648470.1	AGTATTCCCACCAACTTTAGTATGAGTATTAGGACAGAATATTTACAGCTTTACAACACGCCTGTTAGTGTGATTGTGCCAC
MN368685.1	AGTATTCCCACCAACTTTAGTATGAGTATTAGGACAGAATATTTACAGCTTTACAACACGCCTGTTAGTGTGATTGTGCCAC
MN893407.1	AGTATTCCCACCAACTTTAGTATGAGTATTAGGACAGAATATTTACAGCTTTACAACACGCCTGTTAGTGTGATTGTGCCAC
MT031819.1	AGTATTCCCACCAACTTTAGTATGAGTATTAGGACAGAATATTTACAGCTTTACAACACGCCTGTTAGTGTGATTGTGCCAC
MT090137.1	AGTATTCCCACCAACTTTAGTATGAGTATTAGGACAGAATATTTACAGCTTTACAACACGCCTGTTAGTGTGATTGTGCCAC
MZ216021.1	AGTATTCCCACCAACTTTAGTATGAGTATTAGGACAGAATATTTACAGCTTTACAACACGCCTGTTAGTGTGATTGTGCCAC
MZ570135.1	AGTATTCCCACCAACTTTAGTATGAGTATTAGGACAGAATATTTACAGCTTTACAACACGCCTGTTAGTGTGATTGTGCCAC
OM948923.1	AGTATTCCCACCAACTTTAGTATGAGTATTAGGACAGAATATTTACAGCTTTACAACACGCCTGTTAGTGTGATTGTGCCAC
OP171884.1	AGTATTCCCACCAACTTTAGTATGAGTATTAGGACAGAATATTTACAGCTTTACAACACGCCTGTTAGTGTGATTGTGCTAC
OQ122084.1	AGTATTCCCACCAACTTTAGTATGAGTATTAGGACAGAATATTTACAGCTTTACAACACGCCTGTTAGTGTGATTGTGCCAC
OQ349203.1	AGTATTCCCACCAACTTTAGTATGAGTATTAGGACAGAATATTTACAGCTTTACAACACGCCTGTTAGTGTGATTGTGCCAC
OR125555.1	AGTATTCCCACCAACTTTAGTATGAGTATTAGGACAGAATATTTACAGCTTTACAACACGCCTGTTAGTGTGATTGTGCCAC
OR125556.1	AGTATTCCCACCAACTTTAGTATGAGTATTAGGACAGAATATTTACAGCTTTACAACACGCCTGTTAGTGTGATTGTGCCAC
OR604196.1	AGTATTCCCACCAACTTTAGTATGAGTATTAGGACAGAATATTTACAGCTTTACAACACGCCTGTTAGTGTGATTGTGCTAC
OR604211.1	AGTATTCCCACCAACTTTAGTATGAGTATTAGGACAGAATATTTACAGCTTTACAACACGCCTGTTAGTGTGATTGTGCTAC
OR992086.1	AGTATTCCCACCAACTTTAGTATGAGTATTAGGACAGAATATTTACAGCTTTACAACACGCCTGTTAGTGTGATTGTGCCAC
OR992087.1	AGTATTCCCACCAACTTTAGTATGAGTATTAGGACAGAATATTTACAGCTTTACAACACGCCTGTTAGTGTGATTGTGCCAC
PP395567.1	AGTATTCCCACCAACTTTAGTATGAGTATTAGGACAGAATATTTACAGCTTTACAACACGCCTGTTAGTGTGATTGTGCCAC
PP395578.1	AGTATTCCCACCAACTTTAGTATGAGTATTAGGACAGAATATTTACAGCTTTACAACACGCCTGTTAGTGTGATTGTGCCAC
XJ646580.1	ATATGTTTGAATGGTAACTCTCGTTGTAACAAT TACTACCCAGTACACTGCAGCATGTAAGACCATAGAGTCAGCATTACAAC
XH406270.1	ATATGTTTGAATGGTAACTCTCGTTGTAACAAT TACTACCCAGTACACTGCAGCATGTAAGACCATAGAGTCAGCATTACAAC
XY775036.1	ATATGTTTGAATGGTAACTCTCGTTGTAACAAT TACTACCCAGTACACTGCAGCATGTAAGACCATAGAGTCAGCATTACAAC
MH053413.1	ATATGTTTGAATGGTAACTCTCGTTGTAACAAT TACTACCCAGTACACTGCAGCATGTAAGACCATAGAGTCAGCATTACAAC
MH593090.1	ATATGTTTGAATGGTAACTCTCGTTGTAACAAT TACTACCCAGTACACTGCAGCATGTAAGACCATAGAGTCAGCATTACAAC
MK533002.1	ATATGTTTGAATGGTAACTCTCGTTGTAACAAT TACTACCCAGTACACTGCAGCATGTAAGACCATAGAGTCAGCATTACAAC
MK648470.1	ATATGTTTGAATGGTAACTCTCGTTGTAACAAT TACTACCCAGTACACTGCAGCATGTAAGACCATAGAGTCAGCATTACAAC
MN368685.1	ATATGTTTGAATGGTAACTCTCGTTGTAACAAT TACTACCCAGTACACTGCAGCATGTAAGACCATAGAGTCAGCATTACAAC
MN893407.1	ATATGTTTGAATGGTAACTCTCGTTGTAACAAT TACTACCCAGTACACTGCAGCATGTAAGACCATAGAGTCAGCATTACAAC
MT031819.1	ATATGTTTGAATGGTAACTCTCGTTGTAACAAT TACTACCCAGTACACTGCAGCATGTAAGACCATAGAGTCAGCATTACAAC
MT090137.1	ATATGTTTGAATGGTAACTCTCGTTGTAACAAT TACTACCCAGTACACTGCAGCATGTAAGACCATAGAGTCAGCATTACAAC
MZ216021.1	ATATGTTTGAATGGTAACTCTCGTTGTAACAAT TACTACCCAGTACACTGCAGCATGTAAGACCATAGAGTCAGCATTACAAC
MZ570135.1	ATATGTTTGAATGGTAACTCTCGTTGTAACAAT TACTACCCAGTACACTGCAGCATGTAAGACCATAGAGTCAGCATTACAAC
OM948923.1	ATATGTTTGAATGGTAACTCTCGTTGTAACAAT TACTACCCAGTACACTGCAGCATGTAAGACCATAGAGTCAGCATTACAAC
OP171884.1	ATATGTTTGAATGGTAACTCTCGTTGTAACAAT TACTACCCAGTACACTGCAGCATGTAAGACCATAGAGTCAGCATTACAAC
OQ122084.1	ATATGTTTGAATGGTAACTCTCGTTGTAACAAT TACTACCCAGTACACTGCAGCATGTAAGACCATAGAGTCAGCATTACAAC
OQ349203.1	ATATGTTTGAATGGTAACTCTCGTTGTAACAAT TACTACCCAGTACACTGCAGCATGTAAGACCATAGAGTCAGCATTACAAC
OR125555.1	ATATGTTTGAATGGTAACTCTCGTTGTAACAAT TACTACCCAGTACACTGCAGCATGTAAGACCATAGAGTCAGCATTACAAC
OR125556.1	ATATGTTTGAATGGTAACTCTCGTTGTAACAAT TACTACCCAGTACACTGCAGCATGTAAGACCATAGAGTCAGCATTACAAC
OR604196.1	ATATGTTTGAATGGTAACTCTCGTTGTAACAAT TACTACCCAGTACACTGCAGCATGTAAGACCATAGAGTCAGCATTACAAC
OR604211.1	ATATGTTTGAATGGTAACTCTCGTTGTAACAAT TACTACCCAGTACACTGCAGCATGTAAGACCATAGAGTCAGCATTACAAC
OR992086.1	ATATGTTTGAATGGTAACTCTCGTTGTAACAAT TACTACCCAGTACACTGCAGCATGTAAGACCATAGAGTCAGCATTACAAC
OR992087.1	ATATGTTTGAATGGTAACTCTCGTTGTAACAAT TACTACCCAGTACACTGCAGCATGTAAGACCATAGAGTCAGCATTACAAC
PP395567.1	ATATGTTTGAATGGTAACTCTCGTTGTAACAAT TACTACCCAGTACACTGCAGCATGTAAGACCATAGAGTCAGCATTACAAC
PP395578.1	ATATGTTTGAATGGTAACTCTCGTTGTAACAAT TACTACCCAGTACACTGCAGCATGTAAGACCATAGAGTCAGCATTACAAC

图 1 引物及探针所在 S 基因保守区域

Fig. 1 Conserved region of S gene in which primers and probes are located

表 2 引物和探针
Table 2 Primers and probes

名称 Name	序列 (5'-3') Sequence
PEDV S-DF	AAATCTGGCAGTATTGGCTAC
PEDV S-DR	ATCGGCTGAAAGAATGTCC
PEDV S-F1	TATTCCCACCAACTTTAGTATGAGTATTAG
PEDV S-F2	GTATTCCCACCAACTTTAGTATGAGTATTA
PEDV S-F3	AGTATTCCCACCAACTTTAGTATGAGTATT
PEDV S-R1	TAATGCTGACTCTATGGTCTTACATGCTGC
PEDV S-R2	GTTGTAATGCTGACTCTATGGTCTTACATG
PEDV S-R3	TGTAATGCTGACTCTATGGTCTTACATGCT
PEDV S-P	GACAGAATATTTACAGCTTTACAACACGCC(i6FAMdT) (THF)(iBHQ1dT)TAGTGTTGATTGTGC-C3spacer

以逆转录 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，预期扩增产物大小为 969 bp。将胶回收的产物与 pMD19-T 载体连接，经 PCR 检测后，送至生工生物工程（上海）股份有限公司测序鉴定，重组质粒经测序正确后作为标准质粒。通过分光光度计测定浓度，计算拷贝数。

1.6 RT-RAA 反应体系

根据荧光型 RT-RAA 核酸扩增试剂盒说明书，配置 50.0 μL 反应体系，包括 buffer A 缓冲液 25.0 μL 、引物 F (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 2.0 μL 、引物 R (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 2.0 μL 、探针 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.6 μL 、buffer B 缓冲液 2.5 μL 、样本 5.0 μL ，最后加 ddH₂O 至 50.0 μL 。混匀后 10 s 低速离心，荧光定量 PCR 仪测定吸光值。

1.7 引物筛选及反应条件优化

将构建好的标准质粒作为模板，设置不同上、下游引物组合处理，筛选出起峰时间最早、荧光信号最强的最佳引物对；确定最佳引物后，以标准质粒作为模板，在 37、39、42 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 20 min，确定最佳反应温度；采用确定的最佳试验条件，将反应时间设定为 17、20、25 min 进行 RT-RAA 反应，确定最佳反应时间。

1.8 特异性试验

通过建立的 RT-RAA 检测方法对 TGEV、CSFV、PRV、PCV、PRRSV、PoRV 病毒核酸进行检测，评价方法的特异性。

1.9 重复性试验

以 10^2 、 10^3 、 10^5 拷贝 $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的 3 种标准质粒浓度作为模板进行荧光 RT-RAA 反应，重复 3 次，以评估检测方法的重复性。

1.10 灵敏度试验

将标准质粒用无核酸酶水进行 10 倍倍比稀释，选用 $10^0\sim 10^6$ 标准质粒作为模板进行 RT-RAA 反应，评价方法的敏感性。

1.11 临床检测

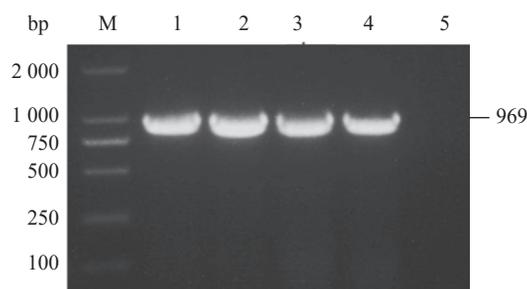
利用本研究所建立的荧光 RT-RAA 检测方法和

Ren 等^[11]建立的实时荧光定量 PCR 检测方法，对 2020–2024 年采集的 40 份猪组织样品进行检测，比较两者检测结果。

2 结果与分析

2.1 重组标准质粒的鉴定

以引物 PEDV-DF/DR 进行 PCR 扩增，结果（图 2）显示在 969 bp 左右有目的条带，和预期结果一致。测序结果显示重组标准质粒构建成功，经测定其质量浓度为 47.1 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ，拷贝数为 4.43×10^{10} 。



M: DL2000 Marker; 1~4: PEDV S 基因扩增; 5: 阴性对照。

M: DL2000 marker; 1-4: PEDV S gene amplification; 5: negative control.

图 2 PEDV S 基因 PCR 扩增

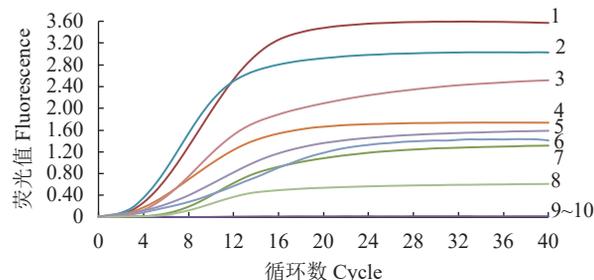
Fig. 2 PCR amplification of PEDV S gene

2.2 最佳引物对及反应条件优化

通过上、下游引物不同组合，进行实时荧光 RT-RAA 检测，结果（图 3）显示，F3/R3 引物对的扩增效果最好。通过比较不同温度条件下的起峰时间、荧光信号，结果（图 4）显示，当反应温度为 42 $^{\circ}\text{C}$ 时，扩增曲线效果最好。通过比较不同时间下的反应强度，结果（图 5）显示，当反应时间为 20 min 时，扩增曲线效果最好。因此，选择 42 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 20 min 为最适反应条件。

2.3 特异性试验

以 PEDV 及 TGEV、CSFV、PRV、PCV、PRRSV、PoRV 的核酸为模板，进行 RT-RAA 荧光扩增，结果

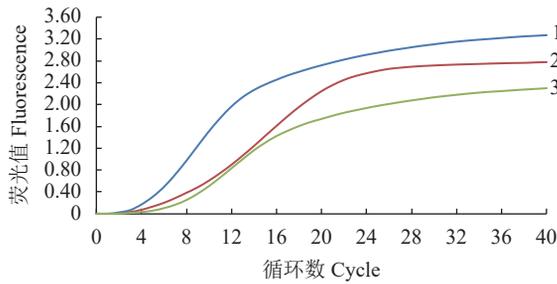


1: F3/R3; 2: F3/R2; 3: F1/R1; 4: F2/R3; 5: F3/R1; 6: F1/R2; 7: F2/R2; 8: F1/R3; 9: F2/R1; 10: 阴性对照。

1: F3/R3; 2: F3/R2; 3: F1/R1; 4: F2/R3; 5: F3/R1; 6: F1/R2; 7: F2/R2; 8: F1/R3; 9: F2/R1; 10: negative control.

图 3 荧光型 RT-RAA 引物筛选

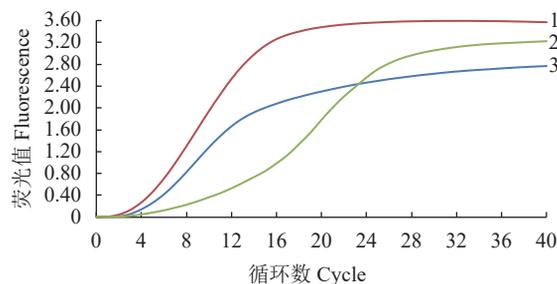
Fig. 3 Screening primers for fluorescence RT-RAA



1~3 分别为 42、39 和 37 °C。
1-3: 42, 39, and 37 °C, respectively.

图 4 荧光型 RT-RAA 反应温度的筛选

Fig. 4 Selection of reaction temperature for fluorescent RT-RAA

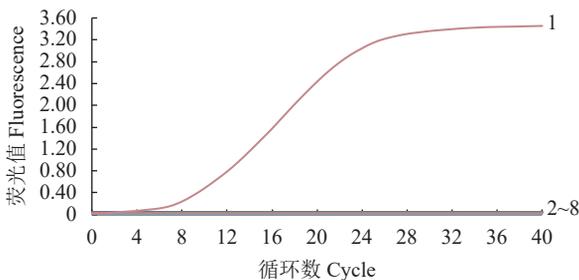


1~3 分别为反应 20、25、17 min。
1-3: 20, 25, and 17 min reaction time.

图 5 荧光型 RT-RAA 反应时间的筛选

Fig. 5 Selection of reaction time for fluorescent RT-RAA

(图 6) 显示, PEDV 产生明显荧光信号, 判定为阳性, 而其他均无扩增曲线, 判为阴性, 表明该方法具有很好的特异性。



1: PEDV-S; 2~8: TGEV、CSFV、PRV、PCV、PRRSV、PoRV、阴性对照。

1: PEDV-S; 2-8: TGEV, CSFV, PRV, PCV, PRRSV, PoRV, and negative control, respectively.

图 6 荧光型 RT-RAA 特异性试验

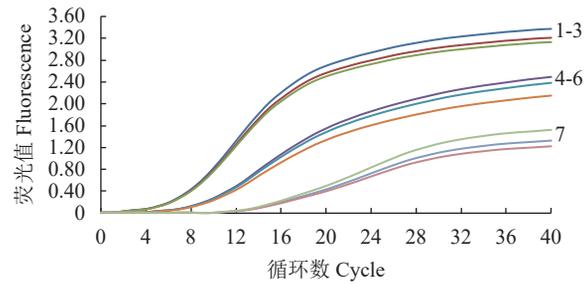
Fig. 6 Specificity of fluorescent RT-RAA

2.4 重复性试验

以 10^2 、 10^3 和 10^5 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的标准质粒为模板。通过建立的荧光 RT-RAA 进行的重复性试验, 结果 (图 7) 显示, 相同浓度标准质粒的差异很小, 说明本试验所建立的荧光 RT-RAA 具有良好的重复性。

2.5 灵敏度试验

将标准质粒进行 10 倍倍比稀释, 以 $10^0 \sim 10^6$ 为



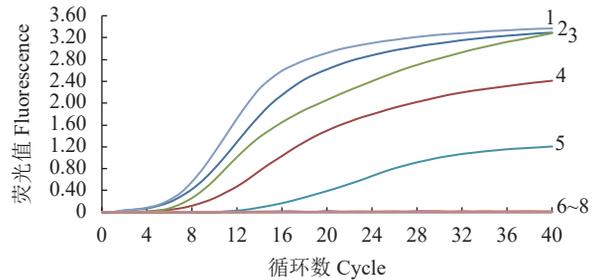
1~3: 1×10^5 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$; 4~6: 1×10^3 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$; 7~9: 1×10^2 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

1-3: 1×10^5 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$; 4-6: 1×10^3 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$; 7-9: 1×10^2 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

图 7 荧光型 RT-RAA 的重复性检测

Fig. 7 Repeatability of fluorescent RT-RAA

模板进行 RT-RAA 扩增, 结果 (图 8) 显示, 随着标准质粒拷贝数的降低, 出峰时间逐渐延长, 荧光强度逐渐减弱, 最低检出拷贝数为 10^2 拷贝数, 与常规 RT-PCR [12] 相比较, PEDV 荧光 RT-RAA 检测方法的最低检出拷贝数是常规 RT-PCR 检测方法的 1000 倍。表明该 RT-RAA 检测方法具有较高的灵敏度。



1~7: 标准质粒依次为 $10^6 \sim 10^0$ 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$; 8: 阴性对照。
1-7: standard plasmid at $10^6 \sim 10^0$ copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$; 8: negative control.

图 8 荧光型 RT-RAA 敏感性试验

Fig. 8 Sensitivity of fluorescence RT-RAA

2.6 临床样品检测

利用本试验所建立的 PEDV RT-RAA 检测方法对 40 份临床样本进行检测, 结果 (表 3) 显示, 3 份样品为阳性, 阳性率 7.5%, 与 RT-qPCR 方法结果相同, 说明本试验建立的荧光 RT-RAA 检测方法, 适用于对 PEDV 的临床检测。

表 3 临床样本的检测
Table 3 Detection on clinical samples

方法 Method	阳性样品 Number of positives/份	阴性样品 Number of negatives/份	总数 Total/份	阳性率 Positivity rate/%
RT-RAA	3	37	40	7.5
RT-qPCR	3	37	40	7.5

3 讨论与结论

PED 具有很强的传染性, 在全球许多地区的感染率和死亡率均较高, 给生猪养殖业造成重大经济损失 [13]。目前, 虽然有许多上市的 PED 疫苗, 包括

灭活疫苗、减毒活疫苗和亚单位疫苗等，但 PEDV 在长期的流行期间，会适应不同的地区环境^[14]。PEDV 研究的最新进展指出，目前尚无特有效的疫苗来防控该病^[15]，PEDV 仍然对养猪业的健康造成严重威胁。

近年来，许多学者建立了多种 PEDV 检测方法，主要包括 RT-PCR、RT-qPCR 和 LAMP 等。俞正玉等^[16]建立的 PRDV 的 RT-PCR 检测方法，最低可检测出 $10^3 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的 PEDV 样品，对华东地区采集的 318 份样品进行检测，PEDV 阳性率为 34.3%。Song 等^[17]建立了可同时检测包含 PEDV 在内的 4 种常见猪病的 TaqMan 多重荧光定量 RT-PCR 方法，最低检测下限为 10^1 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。Li 等^[18]建立并优化了一种 PEDV RT-LAMP 检测法，通过加入 SYBR Green I 荧光染料对 PEDV 进行检测，在 61.9 °C、59 min 或 80 °C、3 min 即可完成检测，灵敏度要比传统的 RT-PCR 高 100 倍。这些方法特异性和灵敏度虽然较高，但由于其操作繁琐、检测时间长、专业性强、不适合快速临床检测。RT-RAA 检测方法是近年来兴起的一种检测方法，能够克服以上检测方法检测时间长、操作繁琐等局限性，并已应用于多种病毒检测，如猪轮状病毒（PoRV）^[19]、猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）^[20]、禽流感病毒（avian influenza virus, AIV）^[21]等。在建立 RT-RAA 检测方法的过程中，引物和探针的选择与设计十分重要，但目前尚无专门的设计程序。因此，建立 RT-RAA 检测方法重中之重在于引物、探针的筛选。本研究对多株 PEDV S 蛋白序列进行比对，选择较为保守的区域设计了 3 对引物和 1 个探针，通过自由组合筛选出最佳引物对。此外，在 RT-RAA 反应体系化中，对反应温度的优化也十分重要，本研究将最佳引物温度逐渐提高至 42 °C 后，起峰速度、荧光信号均明显增强，因此选择 42 °C 为最佳反应温度，这样大大地提高了检测效率。

综上所述，本研究所建立的 PEDV RT-RAA 检测方法具有灵敏度强、特异性高和重复性好的特点，极大压缩了检测时间和成本，很适合基层对 PEDV 的快速检测，具有广泛的应用前景。

参考文献：

- [1] JUNG K, SAIF L J, WANG Q H. Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): An update on etiology, transmission, pathogenesis, and prevention and control [J]. *Virus Research*, 2020, 286: 198045.
- [2] LEE C. Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus [J]. *Virology Journal*, 2015, 12: 193.
- [3] ZHOU Z J, QIU Y, GE X Y. The taxonomy, host range and pathogenicity of coronaviruses and other viruses in the *Nidovirales* order [J]. *Animal Diseases*, 2021, 1(1): 5.
- [4] ZHANG Y Z, CHEN Y W, ZHOU J, et al. Porcine epidemic diarrhea virus: An updated overview of virus epidemiology, virulence variation patterns and virus-host interactions [J]. *Viruses*, 2022, 14(11): 2434.
- [5] WU X H, LIU Y J, GAO L G, et al. Development and application of a reverse-transcription recombinase-aided amplification assay for porcine epidemic diarrhea virus [J]. *Viruses*, 2022, 14(3): 591.
- [6] PEWLAOO S, PHANTHONG S, KONG-NGOEN T, et al. Development of a rapid reverse transcription-recombinase polymerase amplification couple nucleic acid lateral flow method for detecting porcine epidemic diarrhoea virus [J]. *Biology*, 2022, 11(7): 1018.
- [7] LI G, WU M L, LI J H, et al. Rapid detection of porcine deltacoronavirus and porcine epidemic diarrhea virus using the duplex recombinase polymerase amplification method [J]. *Journal of Virological Methods*, 2021, 292: 114096.
- [8] MAO L J, YING J X, SELEKON B, et al. Development and characterization of recombinase-based isothermal amplification assays (RPA/RAA) for the rapid detection of monkeypox virus [J]. *Viruses*, 2022, 14(10): 2112.
- [9] NIE M C, ZHOU Y C, LI F Q, et al. Epidemiological investigation of swine Japanese encephalitis virus based on RT-RAA detection method [J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 9392.
- [10] ZHAO S, ZHANG Q Q, WANG X Y, et al. Development and performance of recombinase-aided amplification (RAA) assay for detecting *Schistosoma haematobium* DNA in urine samples [J]. *Heliyon*, 2023, 9(12): e23031.
- [11] REN J, ZU C C, LI Y, et al. Establishment and application of a TaqMan-based multiplex real-time PCR for simultaneous detection of three porcine diarrhea viruses [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2024, 15: 1380849.
- [12] NIU J W, LI J H, GUAN J L, et al. Development of a multiplex RT-PCR method for the detection of four porcine enteric coronaviruses [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022, 9: 1033864.
- [13] LIANG W, ZHOU D N, GENG C, et al. Isolation and evolutionary analyses of porcine epidemic diarrhea virus in Asia [J]. *PeerJ*, 2020, 8: e10114.
- [14] ZHANG H L, HAN F F, YAN X G, et al. Prevalence and phylogenetic analysis of spike gene of porcine epidemic diarrhea virus in Henan province, China in 2015-2019 [J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2021, 88: 104709.
- [15] LI Z W, MA Z Q, LI Y, et al. Porcine epidemic diarrhea virus: Molecular mechanisms of attenuation and vaccines [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 149: 104553.
- [16] 俞正玉, 逢凤娇, 孙冰, 等. 猪流行性腹泻病毒变异株 RT-PCR 检测方法的建立 [J]. *江苏农业科学*, 2018, 46 (1): 116-118.
- [17] YU Z Y, PANG F J, SUN B, et al. Establishment of RT-PCR method for detection of porcine epidemic diarrhea virus mutant [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2018, 46(1): 116-118. (in Chinese)
- [18] SONG W B, FENG Y X, ZHANG J L, et al. Development of a multiplex reverse transcription-quantitative PCR (qPCR) method for detecting common causative agents of swine viral diarrhea in China [J]. *Porcine Health Management*, 2024, 10(1): 12.
- [19] LI C H, LIANG J L, YANG D, et al. Visual and rapid detection of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method [J]. *Animals*, 2022, 12(19): 2712.
- [20] WANG Y S, NIE M C, DENG H D, et al. Establishment of a reverse transcription recombinase-aided amplification detection method for porcine group A rotavirus [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022, 9: 954657.
- [21] XIA W L, CHEN Y, DING X, et al. Rapid and visual detection of type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus by real-time fluorescence-based reverse transcription recombinase-aided amplification [J]. *Viruses*, 2022, 14(11): 2526.
- [22] WANG S C, ZHUANG Q Y, JIANG N, et al. Reverse transcription recombinase-aided amplification assay for avian influenza virus [J]. *Virus Genes*, 2023, 59(3): 410-416.

(责任编辑：张梅)