

## 实验技术与方法

## 重组酶聚合酶扩增技术快速检测猪肉及其制品中 ASFV、PDCoV 和 SVA

舒佳新<sup>1</sup>, 陈传君<sup>1</sup>, 谢礼<sup>2</sup>, 张婧<sup>2</sup>, 安徽<sup>2</sup>, 杨苗<sup>2</sup>, 郑晶<sup>2</sup>, 帅培强<sup>2</sup>, 余姓鸿<sup>1,2</sup>, 郑巧<sup>1,2</sup>, 韩国全<sup>1</sup>, 林华<sup>2</sup>  
(1. 四川农业大学食品学院, 四川 雅安 625014; 2. 成都海关技术中心, 四川 成都 610041)

**摘要:**目的 建立非洲猪瘟病毒(ASFV)、猪 Delta 冠状病毒(PDCoV)和 A 型塞内卡病毒(SVA)多重重组酶聚合酶扩增(RPA)快速检测方法。方法 以重组质粒为模板进行 RPA 检测,并优化温度、时间、引物探针配比等反应条件,建立多重 RPA 检测方法,应用于实际样本的检测;与实时荧光聚合酶链式反应(qPCR)结果对比,评价所建立方法的准确率。结果 本方法可在 20 min 内实现对 3 种病毒的同时检测,特异性良好;对 ASFV、PDCoV、SVA 灵敏度分别为 940、770、570 copies/ $\mu$ L;用于实际核酸样本检测,准确率分别为 93.33%、100.00%、100.00%。结论 本文建立的多重 RPA 方法快速、便捷,适合猪肉及其制品中 ASFV、PDCoV、SVA 的现场初筛。

**关键词:**重组酶聚合酶扩增技术;非洲猪瘟病毒;A 型塞内卡病毒;猪 Delta 冠状病毒

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2023)07-1013-08

DOI:10.13590/j.cjfh.2023.07.007

### Rapid detection of ASFV, PDCoV, and SVA in pork and its products by recombinant enzyme polymerase amplification

SHU Jiixin<sup>1</sup>, CHEN Chuanjun<sup>1</sup>, XIE Li<sup>2</sup>, ZHANG Jing<sup>2</sup>, AN Wei<sup>2</sup>, YANG Miao<sup>2</sup>, ZHENG Jing<sup>2</sup>, SHUAI Peiqiang<sup>2</sup>, YU Xinghong<sup>1,2</sup>, ZHENG Qiao<sup>1,2</sup>, HAN Guoquan<sup>1</sup>, LIN Hua<sup>2</sup>

(1. Sichuan Agricultural University Food College, Sichuan Ya'an 625014, China;  
2. Chengdu Customs Technology Center, Sichuan Chengdu 610041, China)

**Abstract: Objective** To establish a rapid detection method for multiple recombinant enzyme polymerase amplification (RPA) of African swine fever virus (ASFV), Porcine Delta coronavirus (PDCoV), and Seneca virus type A (SVA). **Methods** RPA detection was carried out using recombinant plasmid as a template, and reaction conditions such as temperature, time, and primer probe ratio were optimized. Multiple RPA detection methods were established, which were applied to the detection of actual samples, and the accuracy of the established method was evaluated by comparing with the results of real-time fluorescence polymerase chain reaction (qPCR). **Results** Simultaneous detection of the three viruses can be achieved within 20 min with good specificity. Sensitivity to ASFV, PDCoV, and SVA was 940, 770, and 570 copies/ $\mu$ L, respectively. The accuracy rates for actual sample detection were 93.33%, 100.00%, and 100.00%, respectively. **Conclusion** The established multiple RPA method is fast and convenient, and it is suitable for on-site preliminary screening of ASFV, PDCoV, and SVA in pork and pork products.

**Key words:** Recombinant enzyme polymerase amplification technology; African swine fever virus; Seneca virus type A; Porcine Delta coronavirus

猪肉是人类机体补充蛋白质的重要来源,一直

以来在我国的传统饮食文化中占据重要地位。我国养殖业处于向规模化养殖转型的快速发展阶段,生猪及猪肉制品进出口体量大,微生物污染风险贯穿供应链始终,外来传染性疫病易通过猪群迅速传播蔓延,产生公共卫生安全问题,既可能严重影响养殖业,同时致使消费者面临食品原料肉安全风险问题。

我国作为猪肉生产贸易大国,保障猪肉及其制品的食用安全性关乎民生问题,需从源头上控制原料猪肉的质量安全。生鲜猪肉及其制品流通环节复杂、国际贸易量大,若携带动物疫病病原,则有成为病原传播风险点的可能。快速准确检测相关病

收稿日期:2022-06-23

基金项目:四川省重点研发项目(2020YFS0469);海关总署科研项目(2019HK045)

作者简介:舒佳新 女 硕士研究生 研究方向为食品质量与安全与控制 E-mail:Shujx1998@163.com

通信作者:韩国全 男 副教授 研究方向为微生物与食品安全 E-mail:hans\_980306@sicau.edu.cn

林华 男 正高级兽医师 研究方向为动物传染病病原分子生物学 E-mail:cdclh@126.com

韩国全和林华为共同通信作者

毒方法的研究对于外来疫病防控与肉类检疫具有现实意义,可切断传染源,保证肉制品流通安全,保障养殖业健康发展。

非洲猪瘟(African swine fever, ASF)由非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)引发,被世界卫生组织(World Organization for Animal Health, WOA)列入法定通报动物疫病名录,我国将其列为一类动物疫病,自2018年传入以来,对我国生猪养殖、畜产品贸易等造成巨大负面冲击,而猪肉、水饺、香肠、猪血等食品中检出ASFV事件的出现,引发居民高度关注<sup>[1-3]</sup>。广泛流行的外来动物疫病猪Delta冠状病毒(Porcine Delta coronavirus, PDCoV)和A型塞内卡病毒(Seneca virus type A, SVA)为RNA病毒,具有强重组和变异能力,可导致仔猪死亡<sup>[4-5]</sup>,病死猪作为原料流入市场将影响食品安全,引起专业领域重视。此外,PDCoV可能存在禽类与哺乳动物间的种间传播,不能排除人类因接触受污染的猪而感染的可能<sup>[6]</sup>。迄今为止,仍无针对此3种病毒的商品化疫苗,因此对其进行快速准确诊断和鉴定尤为重要。

重组酶聚合酶扩增(Recombinase polymerase amplification, RPA)技术是一种新型快速核酸等温扩增技术,在体系中由两个相对的引物起始一个合成事件,整个过程进行迅速,一般可在数十分钟之内获得可检出水平的扩增产物<sup>[7-8]</sup>。其简化的扩增条件在很大程度上降低了对复杂仪器的依赖<sup>[9]</sup>,实时荧光RPA方法是在RPA基础上添加荧光标记并引入四氢呋喃(Tetrahydrofuran, THF)修饰位点的exo探针及核酸外切酶Ⅲ(Exonuclease Ⅲ, Exo Ⅲ),当探针与扩增产物内的靶序列杂交时,Exo Ⅲ在THF位点裂解探针,从而导致荧光基团与淬灭基团分离,产生荧光信号,实现扩增产物可视化实时监测<sup>[10]</sup>。目前,RPA技术已被用于食源性病毒<sup>[11]</sup>、食源性致病菌<sup>[12]</sup>、转基因植物<sup>[13]</sup>、肉制品掺假<sup>[14]</sup>等方面的检测。目前研究建立的RPA方法可用于不同病毒检测<sup>[15-17]</sup>,但多见于单重RPA,不能完全满足养殖单位一线检疫、食品生产企业自检、海关监管现场快检等情景。

本研究基于RPA技术,建立可同时检测ASFV、PDCoV及SVA的快速检测方法,以期推广至其他重大外来疫病病原的多重检测,同时为病原检测提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

猪肉或其制品实际样本24份(由成都口岸海关

于2019年10~12月截获)、ASFV阳性核酸样本6份(由猪肉制品提取总核酸获得并经四川省动物疫病预防控制中心验证)、猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)、猪圆环病毒1型(Porcine circovirus-1, PCV-1)、猪圆环病毒2型(Porcine circovirus-2, PCV-2)、伪狂犬病病毒(Pseudorabies virus, PRV)、猪蓝耳病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)、猪细小病毒(Porcine parvovirus infection virus, PPI)病毒核酸共6份,均由成都海关技术中心动检实验室保存并提供,所有样本于-75℃保存。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

NanoDrop微量核酸蛋白仪、Kingfisher Duo Prime全自动核酸提取仪、高速冷冻离心机(美国Thermo),样品研磨器(美国MP FastPrep),7500FAST定量PCR仪(美国ABI),FQD-16A便携式PCR仪(博日生物)。

TwistAmp<sup>®</sup>exo试剂盒(英国TwistDX),质粒小提试剂盒、TIANGEN<sup>®</sup>磁珠法病毒DNA/RNA提取试剂盒、RNase-Free ddH<sub>2</sub>O(北京天根生化科技有限公司),PrimeScript<sup>™</sup>RT reagent Kit(Perfect Real Time)反转录试剂盒(TAKARA宝生物工程(中国)有限公司),引物、探针由上海生工生物公司合成,质粒穿刺菌(pUC57)由北京六合华大基因生物公司合成。

## 1.2 方法

### 1.2.1 引物探针的筛选

根据ASFV P54基因、PDCoV N基因和SVA全基因组序列,通过NCBI在线工具进行序列分析和比对,利用Primer 6软件设计引物5组引物探针,并用TwistAmp<sup>®</sup>exo试剂盒筛选。将体系加入含冻干酶的反应管中,包括:Primer Free Rehydration buffer 29.5 μL、上下游引物(浓度为10 nmol/μL)各2.1 μL、TwistAMP<sup>®</sup>exo探针(浓度为10 nmol/μL)0.6 μL、模板2 μL、RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 11.2 μL,最后加入MgOAc 2.5 μL(280 mmol/L),充分混匀后置于FQD-16A PCR仪中39℃恒温预热4 min,取出反应管充分颠倒混匀并瞬时离心,重置后继续等温扩增反应,反应程序设置每20 s为一循环,收集荧光信号,共计20 min。每个反应设置3个平行,并以RNase-Free ddH<sub>2</sub>O作为空白对照。

### 1.2.2 重组质粒的制备

将质粒穿刺菌划线培养后挑单菌落进行扩大培养,使用质粒小提试剂盒提取其DNA,冻存于-75℃待用,用核酸蛋白测定仪测定质粒浓度。DNA拷贝数计算公式如下:

$$\text{模板拷贝数} = \frac{\text{质粒DNA浓度} \times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23}}{(\text{载体长度} + \text{目的基因长度}) \times 660} \quad (1)$$

1.2.3 多重实时荧光 RPA 方法的建立及优化

使用 TwistAmp<sup>®</sup> exo 试剂盒建立多重实时荧光 RPA 方法,根据试剂盒说明书以及预实验结果配制反应体系(50 μL): Primer Free Rehydration buffer 29.5 μL, ASFV、PDCoV、SVA 上下游引物各 1.5 μL, 探针各 0.5 μL, 模板 2 μL(ASFV、PDCoV、SVA 质粒核酸提取物用 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 稀释至 10<sup>-7</sup>), RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 5.5 μL, MgOAc 2.5 μL。对多重 RPA 反应体系和条件,包括扩增时间(10~60 min)、温度(37~41 °C)、引物探针配比进行优化,反应过程同 1.2.1,确定最佳反应体系和条件,以 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 作为空白对照。

1.2.4 特异性试验

采用 1.2.3 确定的反应体系和参数检测 ASFV、PDCoV、SVA 质粒(稀释度为 10<sup>-7</sup>)、CSFV、PCV- I、PCV- II、PRV、PRRSV、PPI 核酸(CSFV、PRRSV 为 RNA 病毒,按试剂盒说明书进行反转录为 cDNA 后作为模板),对多重 RPA 检测方法的特异性进行评估。

1.2.5 灵敏度及稳定性试验

将 ASFV、PDCoV、SVA 质粒核酸提取物分别用 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 以 10<sup>-7</sup>、10<sup>-8</sup>、10<sup>-9</sup>、10<sup>-10</sup> 进行系列稀释,根据公式(1)计算拷贝数,各病毒质粒稀释液逐一作为模板,采用 1.2.3 优化后的反应体系和参数进行 RPA 反应,统计其拷贝数,能检测到荧光信号的最低拷贝数浓度即为该方法的灵敏度,每个浓度进行 3 次检验以评价该方法的稳定性。

1.2.6 实际样品检测

为了验证建立方法的适用性,对实验室保存的 24 份猪肉或其制品及 6 份 ASFV 阳性核酸样本进行检测。猪肉及其制品在生物安全二级实验室进行取样,用无菌剪刀挑取样品非脂肪、非结缔组织

部分约 5 g,放入含研磨珠的 15 mL 离心管中,加入 4 mL PBS 缓冲溶液后进行匀浆处理,使用 TIANGEN<sup>®</sup>磁珠法病毒 DNA/RNA 提取试剂盒提取核酸,并按照 PrimeScript<sup>™</sup> RT reagent Kit (Perfect Real Time)说明书进行反转录后,分别对应采用 WOH 推荐 qPCR 方法<sup>[18]</sup>、出入境检验检疫行业标准方法<sup>[19]</sup>、DALL 等<sup>[20]</sup>建立的 qPCR 方法以及前期建立的单重实时荧光 RPA 方法(引物探针与本实验相同)和本实验建立的多重实时荧光 RPA 方法检测。

2 结果

2.1 引物探针筛选

根据 ASFV、PDCoV、SVA 保守序列分别设计 5 组引物探针(引物探针序列未给出),并进行相对性能评估,首先配合某一个正向引物筛查所有反向引物,挑选最佳反向引物,再使用其筛查所有正向引物,如此便可以在 16~20 次反应中找到良好的引物对(图 1),首先用上游引物 F3 对所有下游引物进行筛选,根据结果选择效果最好的下游引物 R4 对上游引物进行筛选,最终确定符合实时荧光 RPA 反应检测所需且能够满足使用的引物探针,序列列表 1。

	R1	R2	R3	R4	R5
F1					
F2					
F3	-	+	+	+++	++
F4					
F5					

	R1	R2	R3	R4	R5
F1				-	
F2				++	
F3	-	+	+	+++	++
F4				++++	
F5				++	

注:- 为阴性,+ 为阳性,+ 数量代表阳性强弱

图 1 RPA 引物筛选示意图

Figure 1 Diagrammatic sketch of RPA primer screening

表 1 引物探针序列

Table 1 Sequence of primer and probe

名称	引物探针序列	产物长度/bp
ASFV	F-5'-ACTGGCTTGCCTACACTTGCTGTACTCG-3'	194
	R-5'-ATCGTGGTCTTAGTCATCATATTATCATCGTTCT-3'	
	P-CTGCTGATCTTGATAAGGATTTATAAACTG[FAM-dT][A][THF][A][BHQ1-dT]CTTCCTCCTCAATAG[C3-spacer]	
PDCoV	F-5'-AAGCCTACTCATCTCAGTTTCGTGGCA-3'	242
	R-5'-GCTCCCGAACCCTTAACCCAAGTAACAC-3'	
	P-ACTCCGATTCTCCATCCTTTGCCTTTTAT[CY5-dT][THF][BHQ1-dT]ACTGGCACAGGTCCC[C3-spacer]	
SVA	F-5'-TAGAGGCACAGAGGCAACATCCAACC-3'	289
	R-5'-CTCACAGCCATAAAGGGACTAACAGCAT-3'	
	P-CTCACTCATTTACACACAAAACTGTGTTG[HEX-dT][A][THF][C][BHQ1-dT]ACAAGATTTGGCCCT[C3-spacer]	

注:FAM-dT、CY5-dT、HEX-dT、BQH-dT、THF 和 C3-spacer 均为探针修饰基团

## 2.2 重组质粒提取

3种病毒阳性质粒浓度及其拷贝数数据见表2。

表2 质粒浓度及拷贝数

Table 2 Calculation of plasmid concentration and copy number

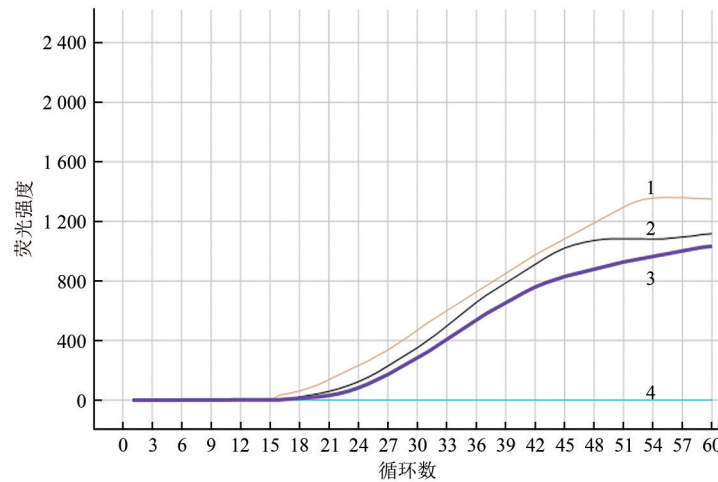
	质粒长度/bp	质粒浓度/(ng/ $\mu\text{L}$ )	拷贝数/(copies/ $\mu\text{L}$ )
ASFV	194	203.0	$9.4 \times 10^{10}$
PDCoV	242	205.2	$7.7 \times 10^{10}$
SVA	289	199.4	$5.7 \times 10^{10}$

## 2.3 多重RPA反应条件优化

通过对反应时间、温度及引物探针配比进行多

重RPA反应优化,最终确定反应体系:Primer Free Rehydration buffer 29.5  $\mu\text{L}$ , ASFV、PDCoV、SVA上下游引物各1.5  $\mu\text{L}$ 、探针各0.5  $\mu\text{L}$ ,模板2  $\mu\text{L}$  (ASFV、PDCoV、SVA质粒核酸提取物稀释度为 $10^{-7}$ ,拷贝数分别为 $9.4 \times 10^3$ 、 $7.7 \times 10^3$ 、 $5.7 \times 10^3$  copies/ $\mu\text{L}$ ), MgOAc 2.5  $\mu\text{L}$ , RNase-Free ddH<sub>2</sub>O补足50  $\mu\text{L}$ ;反应程序:具体参照1.2.1,反应温度为39  $^{\circ}\text{C}$ ,时间为20 min,即60个循环。

在此反应条件下,ASFV、PDCoV、SVA扩增曲线平稳,Ct值相差较小,荧光强度基本相当,满足多重实时荧光RPA反应的需求(图2)。



注:1~3分别为ASFV、SVA、PDCoV质粒(稀释度为 $10^{-7}$ )扩增曲线,4为阴性对照

图2 最佳反应条件下多重实时荧光RPA结果时间扩增结果

Figure 2 Multiple real-time fluorescence RPA results under optimal reaction conditions

## 2.4 特异性实验

对所建立多重实时荧光RPA方法进行特异性测定,在ASFV、PDCoV、SVA、CSFV、PCV-I、PCV-II、PRV、PRRSV、PPI DNA或cDNA中随机挑选组合1种目标病毒及两种非目标病毒混合作为模板,按照2.3反应条件进行扩增。结果显示仅3种目标病毒出现典型扩增,其他病毒未出现,表明该方法用于同时检测ASFV、PDCoV、SVA具有良好的特异性(图3)。

## 2.5 灵敏度及稳定性试验

多重实时荧光RPA方法检测ASFV、PDCoV、SVA灵敏度结果如图4,表明ASFV质粒最大稀释倍数为 $10^{-8}$ 时出现典型扩增,即对应检出限为940 copies/ $\mu\text{L}$ (图4a);同样能检测到 $10^{-8}$ 倍稀释的PDCoV质粒样品(浓度为770 copies/ $\mu\text{L}$ ),另外,稀释倍数为 $10^{-9}$ 时在第44个循环(13 min, 20 s)时扩增信号被检出,但其时间过长且荧光强度低,非典型扩增,不计为阳性,所以该方法检测PDCoV灵敏度为770 copies/ $\mu\text{L}$ (图4b);当SVA质粒样品稀释倍数为 $10^{-8}$ 时,荧光强度不高但具有典型扩增曲线,表明多重RPA方法

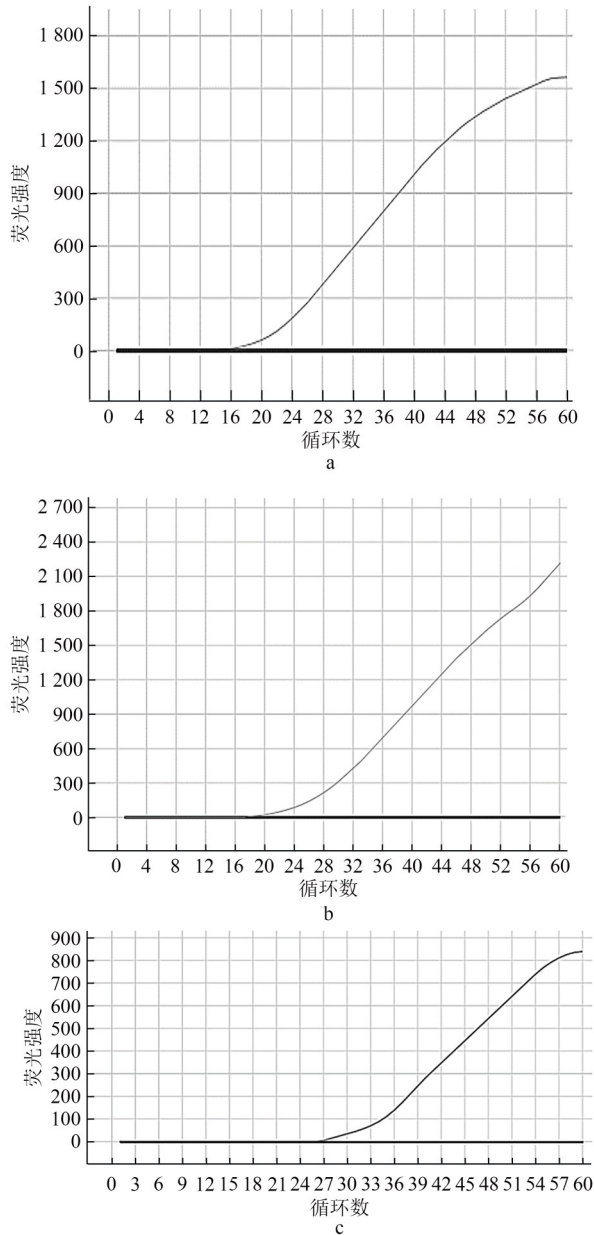
对于SVA灵敏度为570 copies/ $\mu\text{L}$ (图4c)。各浓度3次检测数据如表3,变异系数(CV%)为1.19%~6.27%,表明该方法稳定性良好。

## 2.6 实际样品检测

对实验室保存的实际样本及核酸样本,设立阳性、阴性对照,分别进行荧光PCR、实验室前期建立的单重实时荧光RPA和本实验所建立多重荧光RPA检测,以检验本方法的试验效果。检测结果阳性对照和阴性对照均正常,实时荧光PCR与单重实时荧光RPA结果一致,6份核酸样本检测结果为ASFV核酸阳性,所有样品均未检出PDCoV、SVA;而多重实时荧光RPA检测仅4份核酸样本呈ASFV阳性,所有样品均未检出SVA及PDCoV。多重实时荧光RPA检测ASFV、PDCoV、SVA准确率分别为93.33%、100%、100%,见表4。

## 3 讨论

本研究建立了猪肉及其制品中ASFV、PDCoV、SVA的多重实时荧光RPA检测方法,基于系列预实验,将反应体系中的引物探针初始添加量设置为

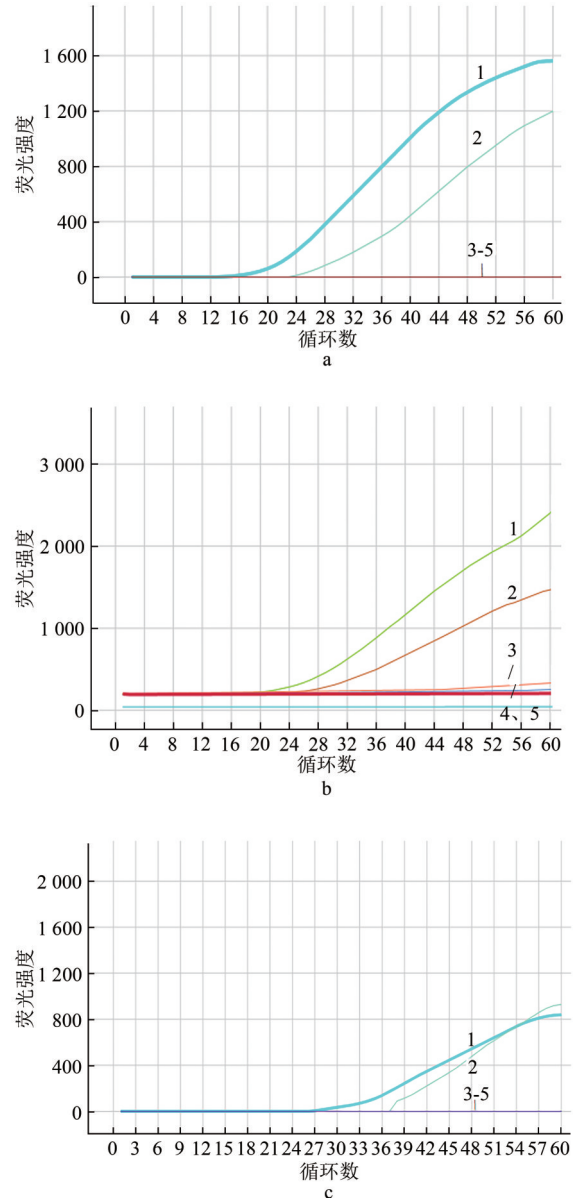


注:a、b、c为扩增曲线图,模板组合分别为:ASFV、PCV-I、PCV-II; PDCoV、PRRSV、PPI;SVA、PPI、PCV-I

图3 多重实时荧光RPA特异性试验

Figure 3 Multiple real-time fluorescence RPA specificity test

1.5、0.5  $\mu\text{L}$ ,在此基础上确定最佳反应时间;温度是影响实验扩增速率的重要因素,直接关系到酶活性<sup>[21]</sup>,进行温度优化实验,最终确定为 39  $^{\circ}\text{C}$ ,低于该反应温度,多重实时荧光 RPA 反应的荧光强度及反应速率均会下降,高于该反应温度则会发生二次扩增反应,有出现假阴性的可能。实验室前期已分别针对 ASFV、PDCoV、SVA 建立实时荧光 RPA,其灵敏度较高,分别为 94、77、57 copies/ $\mu\text{L}$ ,而多重实时荧光 RPA 由于引物探针添加量减少、不同引物探针之间相互影响等因素,检出限较高,应用于核酸样本检测时,多重 RPA 反应未检出的两份阳性核酸样本 Ct 值均大于 30,可能是由于样本浓度较低,低于



注:a、b、c为扩增曲线图,模板分别为 ASFV、PDCoV、SVA 质粒, 1~4 稀释度分别为  $10^{-7}$ ~ $10^{-10}$ , 5 为阴性对照

图4 多重实时荧光RPA法灵敏度

Figure 4 Sensitivity of multiple real-time fluorescence RPA method

该方法检测范围,出现假阴性现象,准确率不能达到 100%,与杨洋<sup>[22]</sup>针对 PCV2、PRV 及 PPV 所建立的 Multiplex real-time RPA 实验结果相似,3 种病毒灵敏度均大于 1 000 copies/ $\mu\text{L}$ ,疑似样品检出率平均为 88%。同样由王凤娇等<sup>[23]</sup>建立的食品中沙门菌、单核细胞增生李斯特菌和蜡样芽胞杆菌多重 RPA 快速检测方法的灵敏度(最低为  $1.44 \times 10^4$  CFU/mL),与荧光 RPA 灵敏度差异较大。此外,LI 等<sup>[24]</sup>所建立的双重 RT-RPA 检测方法,用于猪流行腹泻病毒和 PDCoV 的灵敏度为  $1 \times 10^2$  copies/ $\mu\text{L}$ ,检测目标减少,灵敏度有所提高。多重实时荧光 RPA 反应能同时扩增多种目标基因,其体系的配置并不是多种单

表3 多重实时荧光RPA法稳定性

Table 3 Stability of multiplex real-time fluorescence RPA method

病毒	稀释度	样品浓度/(copies/ $\mu$ L)	Ct值	平均数	标准偏差SD	变异系数CV/%
ASFV	$10^{-7}$	$9.4 \times 10^3$	13.38	13.03	0.42	3.26
			12.56			
			13.16			
	$10^{-8}$	$9.4 \times 10^2$	26.69	24.89	1.56	6.27
			23.86			
			24.13			
PDCoV	$10^{-7}$	$7.7 \times 10^3$	26.28	26.37	0.63	2.39
			25.79			
			27.04			
	$10^{-8}$	$7.7 \times 10^2$	36.26	37.17	1.19	3.19
			38.51			
			36.74			
SVA	$10^{-7}$	$5.7 \times 10^3$	19.30	19.16	0.23	1.19
			19.02			
			18.85			
	$10^{-8}$	$5.7 \times 10^2$	24.43	25.58	1.02	3.97
			25.94			
			26.36			

表4 样本检测结果

Table 4 Test results of samples

样品	ASFV			PDCoV			SVA		
	WOAH推荐 荧光PCR	单重实时 荧光RPA	多重实时 荧光RPA	行业标准 荧光PCR	单重实时 荧光RPA	多重实时 荧光RPA	参考文献 荧光PCR	单重实时 荧光RPA	多重实时 荧光RPA
猪肉或其制品(1-24)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
核酸样本1	Ct值:35.79	+	-	-	-	-	-	-	-
核酸样本2	Ct值:30.66	+	-	-	-	-	-	-	-
核酸样本3	Ct值:20.19	+	+	-	-	-	-	-	-
核酸样本4	Ct值:19.31	+	+	-	-	-	-	-	-
核酸样本5	Ct值:23.23	+	+	-	-	-	-	-	-
核酸样本6	Ct值:22.10	+	+	-	-	-	-	-	-
阳性率	20%(6/30)	20%(6/30)	13.33%(4/30)	-	-	-	-	-	-

注: +为阳性, -为阴性; WOAH手册规定 Ct值 $\leq$ 38.0, 则判定被检样品 ASFV 阳性

重实时荧光 RPA 反应体系的简单相加, 体系中寡核苷酸总量过多会导致底物被大量非特异性扩增耗尽, 而引物浓度过低, 造成反应时间过长, 长时间的反应意味着非特异性扩增发生概率增大<sup>[25]</sup>, 同时, 不同引物竞争重组蛋白, 不同反应之间存在相互抑制的可能性<sup>[23]</sup>。

试验结果表明, 多重实时荧光 RPA 检测方法具备良好的特异性, 与其他常见猪病病毒未产生交叉反应, 且实现同时检测 ASFV、PDCoV、SVA, 在现场快速检测上具有一定优势, 设备简单易推广, 适用于食品加工企业、生猪养殖企业对于生鲜猪肉及其制品中的 ASFV、PDCoV、SVA 检测, 有效防范病害生猪及产品流入市场, 也可用于海关口岸检疫及市场监管快检中低成本大规模初筛, 为外来疫病防控、食品安全监管提供了重要的技术支撑。

该方法存在局限性, 有待进一步研究优化, 例如灵敏度低无法实现对低浓度污染样品的检测, 是制约其发展的重要因素, 是未来此类方法的探究建立时应着重解决的问题。引物探针的设计是 RPA

方法的关键点, 如需进行高灵敏度的实验分析, 必须进行大量引物探针筛选研究<sup>[26]</sup>, 本实验根据每种病毒的靶序列设计了 5 对引物, 不足以满足高灵敏度的筛选要求, 可多加设计以供选择; 此外, 建立多重 RPA 方法时不应限于同一目标序列引物的互筛, 另需进行不同靶序列引物之间的筛选, 以降低其发生抑制反应的可能性, 并在此基础上进行条件优化。RPA 反应主要依靠酶催化及 MgOAc 促发, 尤其应考虑 MgOAc 添加量对反应造成的影响, 因其低添加量在实验过程中易产生系统误差, 影响实验结果, 操作人员须谨慎。此外, 本实验以质粒为对象进行研究, PDCoV、SVA 为 RNA 病毒, 因此在进行 RPA 扩增前对实际样本需先进行反转录, 较一步法扩增操作复杂化、耗时长, 加大 RNA 降解可能性, 存在交叉污染风险。另一方面, 将 RPA 或其产物与生物传感器、测流流动试纸条、CRISPR-Cas、微控流芯片等技术手段相结合集成化<sup>[27-30]</sup>, 在快速检测的同时保证灵敏度及准确性, 实现结果可视化、定量化, 有助于服务特定情景, 对于病原体前期防

控意义重大,有利于切断传播途径,保障食品安全。

## 参考文献

- [1] 贺稚非,余思洁,李洪军,等.非洲猪瘟病毒生物学特性及在猪肉生产中的防控措施研究[J].农业工程学报,2019,35(10):299-304.
- HE Z F, YU S J, LI H J, et al. Biological characteristics of African swine fever virus and its prevention and control measures in pork food production [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2019, 35 (10) : 299-304.
- [2] 宋晟,郭焜鹏,黄燕,等.非洲猪瘟病毒核酸荧光定量PCR检测方法研究[J].食品安全质量检报,2021,12(19):7646-7650.
- SONG S, GUO K P, HUANG Y, et al. Study on the fluorescent quantitative PCR method for the detection of African swine fever virus nucleic acid[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(19): 7646-7650.
- [3] WANG F X, ZHANG H, HOU L N, et al. Advance of African swine fever virus in recent years [J]. Research in Veterinary Science, 2021, 136: 535-539.
- [4] HE W T, JI X, HE W, et al. Genomic epidemiology, evolution, and transmission dynamics of porcine deltacoronavirus [J]. Molecular Biology and Evolution, 2020, 37(9): 2641-2654.
- [5] HOUSTON E, TEMEEYASEN G, PIÑEYRO P E. Comprehensive review on immunopathogenesis, diagnostic and epidemiology of Senecavirus A[J]. Virus Research, 2020, 286: 198038.
- [6] JI W W, PENG Q, FANG X Q, et al. Structures of a deltacoronavirus spike protein bound to porcine and human receptors [J]. Nature Communications, 2022, 13: 1467.
- [7] 张徐俞,黄俊,杨稳,等.重组酶聚合酶扩增结合 CRISPR-Cas12a 快速检测十足目虹彩病毒 1 方法的建立[J].微生物学通报,2021,48(12):4980-4988.
- ZHANG X Y, HUANG J, YANG W, et al. Rapid detection of decapod iridescent virus 1 by recombinase polymerase amplification combined with CRISPR-Cas12a[J]. Microbiology China, 2021, 48(12): 4980-4988.
- [8] KIM J Y, LEE J L. Development of a multiplex real-time recombinase polymerase amplification (RPA) assay for rapid quantitative detection of *Campylobacter coli* and jejuni from eggs and chicken products[J]. Food Control, 2017, 73: 1247-1255.
- [9] 王亚楠,陈昌国.重组酶聚合酶扩增技术研究进展[J].解放军医学杂志,2021,46(5):504-511.
- WANG Y N, CHEN C G. Advances in the research of recombinase polymerase amplification technology [J]. Medical Journal of Chinese PLA, 2021, 46(5): 504-511.
- [10] 徐健皓,李佳欣,白欣茹,等.基于实时荧光重组酶聚合酶扩增(RPA)技术的金黄色葡萄球菌快速检测方法的建立[J].军事医学,2022,46(6):441-446.
- XU J H, LI J X, BAI X R, et al. Establishment of a rapid detection method for *Staphylococcus aureus* based on real-time fluorescent recombinase polymerase amplification (RPA) [J]. Military Medical Sciences, 2022, 46(6): 441-446.
- [11] LIU W J, YANG Y T, DU S M, et al. Rapid and sensitive detection of goose parvovirus and duck-origin novel goose parvovirus by recombinase polymerase amplification combined with a vertical flow visualization strip [J]. Journal of Virological Methods, 2019, 266: 34-40.
- [12] HU J Q, WANG Y, DING H M, et al. Recombinase polymerase amplification with polymer flocculation sedimentation for rapid detection of *Staphylococcus aureus* in foodsamples [J]. International Journal of Food Microbiology, 2020, 331: 108691.
- [13] WANG X F, CHEN Y, CHEN X Y, et al. A highly integrated system with rapid DNA extraction, recombinase polymerase amplification, and lateral flow biosensor for on-site detection of genetically modified crops [J]. Analytica Chimica Acta, 2020, 1109: 158-168.
- [14] 苗丽,张秀平,王建昌,等.肉制品中鸡源性成分重组酶介导等温扩增检测方法的建立及应用[J].江苏农业学报,2019,35(4):954-959.
- MIAO L, ZHANG X P, WANG J C, et al. Establishment and application of real-time recombinase-aided amplification assay to detect chicken-derived ingredients in meat products [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2019, 35(4): 954-959.
- [15] SHAHRAJABIAN M H, SUN W L, CHENG Q. Different methods for molecular and rapid detection of human novel coronavirus [J]. Current Pharmaceutical Design, 2021, 27(25): 2893-2903.
- [16] WANG W W, ZHANG Y, HUANG Y, et al. Rapid and visual detection of the emerging novel duck reovirus by using a specific and sensitive reverse transcription recombinase polymerase amplification method [J]. Journal of Virological Methods, 2021, 291: 114098.
- [17] MA L, ZENG F W, HUANG B H, et al. Point-of-care diagnostic assay for rapid detection of porcine deltacoronavirus using the recombinase polymerase amplification method [J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2019, 66(3): 1324-1331.
- [18] FERNÁNDEZ-PINERO J, GALLARDO C, ELIZALDE M, et al. Molecular diagnosis of African swine fever by a new real-time PCR using universal probe library [J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2013, 60(1): 48-58.
- [19] 中华人民共和国海关总署.猪Delta冠状病毒检疫技术规范:SN/T 5124—2019[S].北京:中国标准出版社,2019.
- General Administration of Customs of the People's Republic of China. Quarantine protocol for porcine deltacoronavirus: SN/T 5124—2019[S]. Beijing: Standards Press of China, 2019.
- [20] DALL AGNOL A M, OTONEL R A A, LEME R A, et al. A TaqMan-based qRT-PCR assay for Senecavirus A detection in tissue samples of neonatal piglets [J]. Molecular and Cellular Probes, 2017, 33: 28-31.
- [21] GUMAA M M, CAO X A, LI Z C, et al. Establishment of a recombinase polymerase amplification (RPA) assay for the detection of *Brucella* spp. Infection [J]. Molecular and Cellular Probes, 2019, 47: 101434.
- [22] 杨洋.五种重要动物病毒快速恒温扩增检测技术的建立与应用[D].北京:中国农业科学院,2017.
- YANG Y. Development and evaluation of isothermal amplification assays for rapid detection of five important animal viruses [D].

- Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2017.
- [23] 王凤娇, 秦超, 廖倩, 等. 3种常见食源性致病菌多重重组酶聚合酶扩增检测方法研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(20): 8121-8127.
- WANG F J, QIN C, LIAO Q, et al. Detection of 3 kinds of common foodborne pathogenic bacteria by multiple recombinase polymerase amplification [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(20): 8121-8127.
- [24] 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.
- [25] KERSTING S, Rausch V, Bier F F, et al. Multiplex isothermal solid-phase recombinase polymerase amplification for the specific and fast DNA-based detection of three bacterial pathogens [J]. Mikrochimica acta, 2014, 181: 13-14.
- [26] DU Y P, LIU D, WANG M, et al. Preparation of DNA aptamer and development of lateral flow aptasensor combining recombinase polymerase amplification for detection of erythromycin [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2021, 181: 113157.
- [27] LIU X Q, YAN Q Y, HUANG J F, et al. Influence of design probe and sequence mismatches on the efficiency of fluorescent RPA [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2019, 35(6): 95.
- [28] BAI J, LIN H S, LI H J, et al. Cas12a-based on-site and rapid nucleic acid detection of African swine fever [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2830.
- [29] TIAN X X, WANG T, CUI X Y, et al. Rapid visual detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus via recombinase polymerase amplification combined with a lateral flow dipstick [J]. Archives of Virology, 2022, 167 (2) : 493-499.
- [30] CUI J Q, LIU F X, PARK H, et al. Droplet digital recombinase polymerase amplification (ddRPA) reaction unlocking via picoinjection [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2022, 202: 114019.

(上接第999页)

- 刘弘(上海市疾病预防控制中心)
- 刘长青(河北省疾病预防控制中心)
- 刘成伟(江西省疾病预防控制中心)
- 刘兆平(国家食品安全风险评估中心)
- 刘守钦(济南市疾病预防控制中心)
- 刘烈刚(华中科技大学公共卫生学院)
- 刘爱东(国家食品安全风险评估中心)
- 孙长颢(哈尔滨医科大学)
- 李宁(国家食品安全风险评估中心)
- 李黎(中华预防医学会)
- 李凤琴(国家食品安全风险评估中心)
- 李业鹏(国家食品安全风险评估中心)
- 李国梁(陕西科技大学食品与生物工程学院)
- 李静娜(武汉市疾病预防控制中心)
- 杨方(福州海关技术中心)
- 杨钧(青海省卫生健康委员会卫生监督所)
- 杨大进(国家食品安全风险评估中心)
- 杨小蓉(四川省疾病预防控制中心)
- 杨杏芬(南方医科大学公共卫生学院)
- 肖荣(首都医科大学公共卫生学院)
- 吴永宁(国家食品安全风险评估中心)
- 何更生(复旦大学公共卫生学院)
- 何来英(国家食品安全风险评估中心)
- 何洁仪(广州市疾病预防控制中心)
- 姜毓君(东北农业大学食品学院)
- 聂俊雄(常德市疾病预防控制中心)
- 贾旭东(国家食品安全风险评估中心)
- 徐娇(国家卫生健康委员会食品标准与监测评估司)
- 徐海滨(国家食品安全风险评估中心)
- 高志贤(军事科学院军事医学研究院)
- 郭云昌(国家食品安全风险评估中心)
- 郭丽霞(国家食品安全风险评估中心)
- 唐振柱(广西壮族自治区疾病预防控制中心)
- 黄薇(深圳市疾病预防控制中心)
- 黄锁义(右江民族医学院药学院)
- 常凤启(河北省疾病预防控制中心)
- 崔生辉(中国食品药品检定研究院)
- 章宇(浙江大学生物工程与食品学院)
- 章荣华(浙江省疾病预防控制中心)
- 梁进军(湖南省疾病预防控制中心)
- 程树军(广州海关技术中心)
- 傅武胜(福建省疾病预防控制中心)
- 谢剑炜(军事科学院军事医学研究院)
- 赖卫华(南昌大学食品学院)
- 裴晓方(四川大学华西公共卫生学院)
- 廖兴广(河南省疾病预防控制中心)
- 熊丽蓓(上海市疾病预防控制中心)
- 樊永祥(国家食品安全风险评估中心)