

陈炜, 梁齐章, 张佳雪, 等. 新型番鸭细小病毒荧光 RPA 恒温检测方法的建立 [J]. 福建农业学报, 2024, 39 (9): 1044–1050.

CHEN W, LIANG Q Z, ZHANG J X, et al. A Constant Temperature Fluorescent RPA Assay for Detecting Novel Muscovy Duck Parvovirus [J].

Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2024, 39 (9): 1044–1050.

新型番鸭细小病毒荧光 RPA 恒温检测方法的建立

陈 炜^{1,2}, 梁齐章^{2,3}, 张佳雪^{1,2}, 焦文龙^{1,2}, 林永强^{1,2}, 刘荣昌^{2,3},
傅秋玲^{2,3}, 傅光华^{2,3}, 朱 婷^{1*}, 黄 瑜^{2,3*}

(1. 福建农林大学动物科学学院, 福建 福州 350002; 2. 福建省农业科学院畜牧兽医研究所,

福建 福州 350013; 3. 福建省禽病防治重点实验室, 福建 福州 350013)

摘要: 【目的】建立新型番鸭细小病毒 (New-genotype muscovy duck parvovirus, N-MDPV) 荧光 RPA 恒温检测方法, 为基层提供可视化快速检测技术手段。【方法】以 N-MDPV 的 *VP3* 基因保守片段为靶点, 使用 EXO 荧光探针特定结合 *VP3* 基因保守片段, 设计特异的 RPA 扩增引物并利用重组酶聚合酶扩增技术扩增目的基因, 从而建立一种荧光 RPA 恒温检测 N-MDPV 的方法, 确定反应体系的最佳反应时间和温度, 分析该方法特异性和灵敏性; 对收集的病料进行核酸检测, 并与传统 PCR 和病毒分离鉴定方法检测结果进行比较。【结果】建立的荧光 RPA 恒温检测方法最佳反应温度为 39 ℃, 最佳反应时间为 30 min; 灵敏性高, 最低核酸检测限度可达 $10 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 对新型番鸭细小病毒核酸进行特异性扩增, 结果显示对鸭腺病毒 3 型 (Duck adenovirus type 3, DAdV-3)、禽腺病毒 4 型 (Fowl adenovirus serotype 4, FAdV-4)、鸭圆环病毒 (Duck circovirus, DuCV)、鸭瘟病毒 (Duck plague virus, DPV)、鸭病毒性肝炎病毒 (Duck hepatitis virus, DHV)、鸭坦布苏病毒 (Duck tembusu virus, DTMUV) 和新型鸭呼肠孤病毒 (Novel duck reovirus, NDRV) 的核酸均未有发生交叉反应, 特异性良好。利用本研究建立的 RPA 快检方法、传统 PCR 方法以及病毒分离鉴定方法对收集的 38 份鸭组织病料核酸样品进行检测, 结果显示阳性率分别为 36.8% (14/38)、36.8% (14/38) 和 31.6% (12/38); RPA 检测后呈阳性的样品经 PCR 方法检测与病毒分离鉴定方法检测均呈现阳性, 阳性符合率为 100%。【结论】该方法可以很好地应用于缺乏相应检测设备的基层进行新型番鸭细小病毒的大规模临床样本检测, 为新型番鸭细小病毒的可视化快速检测提供技术手段。

关键词: 新型番鸭细小病毒; RPA 恒温检测; 重组酶聚合酶扩增技术

中图分类号: S852.65

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2024) 09-1044-07

A Constant Temperature Fluorescent RPA Assay for Detecting Novel Muscovy Duck Parvovirus

CHEN Wei^{1,2}, LIANG Qizhang^{2,3}, ZHANG Jiaxue^{1,2}, JIAO Wenlong^{1,2}, LIN Yongqiang^{1,2}, LIU Rongchang^{2,3},
FU Qiuling^{2,3}, FU Guanghua^{2,3}, ZHU Ting^{1*}, HUANG Yu^{2,3*}

(1. College of Animal Sciences, Fujian Agriculture and Forestry university, Fuzhou, Fujian 350002, China; 2. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China; 3. Fujian Key Laboratory for Avian Diseases Control and Prevention, Fuzhou, Fujian 350013, China)

Abstract: 【Objective】A constant temperature fluorescent RPA assay for detecting novel Muscovy duck parvovirus (N-MDPV) was developed. 【Method】EXO fluorescent probes were specifically bound to the targeted conserved *VP3* fragment of N-MDPV. RPA amplification primers were designed to amplify the segment by using recombinant enzyme polymerase. An assay for detecting N-MDPV was established with reaction time and temperature optimized and specificity, sensitivity, and

收稿日期: 2024-05-09 修回日期: 2024-08-01

作者简介: 陈炜 (2000—), 男, 硕士研究生, 主要从事预防兽医学相关研究, E-mail: 18094121108@163.com

共同第一作者: 梁齐章 (1994—), 男, 博士, 助理研究员, 主要从事兽医病毒学相关研究, E-mail: 718928400@qq.com

* 通信作者: 黄瑜 (1965—), 男, 博士, 研究员, 主要从事动物传染病学相关研究, E-mail: huangyu_815@163.com; 朱婷 (1987—), 女, 博士, 副教授, 主要从事兽医病理学相关研究, E-mail: shenlansezhuzi@126.com

基金项目: 国家现代农业产业 (水禽) 技术体系建设专项 (CARS-42); 福建省百千万工程领军人才项目 (FJTMT-2014); 福建省农业科学院自由探索科技创新项目 (ZYTS202423); 福建省种业创新与产业化工程项目 (Zycxny2021014)

accuracy tested on the collected nucleic acid of disease material in comparison with traditional PCR and virus isolation identification methods. 【Result】 The optimized assay reaction temperature and time were 39 °C for 30 min to achieve a lowest sensitivity for nucleic acid detection at 10 fg · μL⁻¹. The nucleic acid of N-MDPV was specifically amplified without any cross reaction with those of duck adenovirus type 3, fowl adenovirus type 4, duck circovirus, duck plague virus, duck hepatitis virus, duck tembusu virus, and novel duck reovirus. Along with the conventional PCR and the virus isolation and identification methods, the newly developed assay detected the nucleic acid on 38 duck tissue specimens with a positive rate of 36.8% (14/38) in comparison to those at 36.8% (14/38) for the PCR and 31.6% (12/38) for the isolation and identification method. In addition, 100% coincidence rates of the assay and the two other methods on positive samples as well as of the assay and the PCR on the positive clinical samples were secured. 【Conclusion】 The new RPA method to rapidly and visually detect N-MDPV demonstrated to be highly specific, sensitive, and accurate. It was deemed appropriate for clinical applications.

Key words: novel Muscovy duck parvovirus; constant temperature fluorescent RPA assay; recombinase polymerase amplification technology

0 引言

【研究意义】 番鸭细小病毒病又称“番鸭三周病”，其病原是番鸭细小病毒（Muscovy duck parvovirus, MDPV）^[1]，仅侵害番鸭，感染鸭出现张口呼吸和腹泻等症状，病死鸭出现肺出血、胰腺出血或（和）白色坏死点、十二指肠黏膜出血。该病原主要引起3周龄内雏番鸭发病死亡^[2]。2008年，在福建地区的雏半番鸭出现“短喙、生长迟缓”的疫病，通过对该类病例开展流行病学调查和病原学研究，确定其病原为与MDPV在基因组、感染宿主范围、抗原性和致病性上存在较大差异的新型番鸭细小病毒（New-genotype muscovy duck parvovirus, N-MDPV）^[3]。在宿主选择上，该病毒不仅侵害番鸭，还侵害半番鸭和白改鸭；在致病性上，不仅引起经典番鸭细小病毒所致病变，还引起感染鸭短喙和生长迟缓，对我国养鸭业能造成巨大的危害以及经济损失。因此建立针对该病原的快速检测方法对疫病防控具有重要意义。【前人研究进展】 目前番鸭细小病毒病的检测方法有常规PCR法、荧光定量PCR法、环介导等温扩增（LAMP）法、分离鉴定法等。PCR与荧光定量PCR技术作为传统检测病原体的方法，能够在极低病原核酸量的情况下检测出疫病，从而作为常用的检测手段推广。但所需的仪器设备往往存在基层缺乏或过于贵重、不易操作等问题。LAMP检测方法则需要多对引物、更高的温度（63 °C）和更长的运行时间^[4]，在基层实际中需要花费大量的时间与人力，也存在检测中由于气溶胶污染假阳性高等问题。重组酶聚合酶扩增（RPA）技术所需的酶主要是链置换DNA聚合酶、结合单链核酸的重组酶和单链结合蛋白，3种酶之间进行紧密合作能快速扩增目的片段，在常温条件下反应30 min即可完成对目的片段的扩增，在反应过程时模拟生

物体内DNA复制流程，使反应更为精确稳定，操作简单便捷，尤其适用于基层^[5]。在实地检测中使用冻干酶粉可以有效解决传统酶活性降解导致反应效率下降或气溶胶污染导致假阳性高等问题。目前，RPA技术已经在多种病原的检测上得到了应用，如鸭腺病毒3型（DAdV-3）^[6]、猪流行性腹泻病毒（Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV）^[7]、口蹄疫病毒（Foot-and-mouth disease virus, FMDV）^[8]、非洲猪瘟病毒（Infection with african swine fever virus, ASFV）^[9]等。RPA扩增技术在37~42 °C条件下进行核酸快速扩增，可在极短时间内观察到结果。极低核酸浓度下RPA体系仍能进行大量扩增，具有恒温、快速、便携、灵敏度高、特异性强和操作简单等优点^[10]，有较大的市场应用前景。【本研究切入点】 目前已有基于环介导等温扩增（LAMP）的番鸭细小病毒VP3高度保守基因的检测方法^[4]，说明以该基因作为检测靶标切实可行，但尚未见应用RPA技术检测N-MDPV的报道。【拟解决的关键问题】 本研究基于N-MDPV的VP3基因，建立荧光RPA检测方法，该方法可以应用于N-MDPV的大规模临床样本检测，为N-MDPV的快速检测提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验毒株

新型番鸭细小病毒FJM3株（N-MDPV）、鸭腺病毒3型（Duck adenovirus type 3, DAdV-3）、禽腺病毒4型（Fowl adenovirus serotype 4, FAdV-4）、鸭圆环病毒（Duck circovirus, DuCV）、鸭瘟病毒（Duck plague virus, DPV）、鸭病毒性肝炎病毒（Duck hepatitis virus, DHV）、鸭坦布苏病毒（Duck tembusu virus, DTMUV）和新型鸭呼肠孤病毒（Novel duck reovirus, NDRV）均由福建省农业科学院禽病研究分离、鉴定和保存。

1.1.2 主要试剂

FJM3全基因组质粒^[11]；动物病毒DNA/RNA快速提取试剂盒5.0购自西安天隆科技有限公司；RPA引物购自生工生物工程（上海）股份有限公司；RPA扩增试剂及EXO探针购自深圳易致生物有限公司；核酸Marker DL2000购自Thermo（美国）公司；离心管购自Corning（美国）公司。

1.2 试验方法

1.2.1 荧光RPA恒温检测引物和探针设计

在GenBank上查找N-MDPV的VP3基因序列以供筛选，根据RPA引物设计原则，使用Primer premier 5.0设计N-MDPV VP3基因的特异性引物和探针（表1），由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表1 N-MDPV的RPA引物和探针

Table 1 RPA primers and probes of N-MDPV

引物和探针 Primers and probes	序列（5'-3'） Sequence (5'-3')
N-MDPV-228F	AGGCCTTATGGCACCATGGCCGCAATTGG
N-MDPV-228R	CCTAAATATTTGGGCTGGATGCTGGAAG
N-MDPV-193F	ACTCACACAGAACAGCAGAGGCTCCAGCATCC
N-MDPV-193R	TAGTGTTCATTGTTACAGTCTTGCC
N-MDPV-230R	CCAAGAACATCAAGATCTGAACCTCGTAGGAG
N-MDPV-250R	AAACCATTCTGGTAAAGCTCCAAGAACATC
N-MDPV-probe	5'ACAGATCTGGCAGCACTGCAGCAGGAATAA AFGHQATTATGGTAACGGACG -C3 Spacer

1.2.2 核酸的提取

使用动物病毒DNA/RNA快速提取试剂盒5.0（天隆科技，中国）提取N-MDPV、鸭腺病毒3型、禽腺病毒4型、圆环病毒、鸭瘟病毒、鸭病毒性肝炎病毒、鸭坦布苏病毒和新型鸭呼肠孤病毒的核酸，使用NanoDrop-2000分光光度计进行病毒核酸的浓度测定，为保证数值精确，重复3次取平均值。

1.2.3 RPA反应体系的建立

荧光RPA恒温扩增反应体系为：Reaction Buffer（2×）10 μL，E-mix（2×）2 μL，P-mix（2×）2 μL，探针（4 μmol·L⁻¹）0.6 μL，上游引物（10 μmol·L⁻¹）0.84 μL，下游引物（10 μmol·L⁻¹）0.84 μL，DNA模板1 μL。加去离子水补齐至18 μL；最后向反应管盖内侧滴入2 μL激活剂，避免激活剂提前进入反应管内，否则会导致反应提前。轻弹数次混匀或者上下倒置甩匀，瞬时离心，重复3次（需确保混匀，避免剧烈震荡涡旋），将反应管放入荧光仪中开始读数。反应时间30 min。

1.2.4 最优反应温度确定

共设5个孵育温度：26、35、39、42、45 °C。根据最优引物配置反应体系，配出5管完全相同的扩增试剂，在设计温度下孵育30 min后立即取出，在蓝光切胶仪下进行观察。

1.2.5 最优反应时间确定

共设5个孵育时间：10、20、30、40、50 min。配制相同的扩增试剂与阴性对照，置于确定的最优反应温度下，按设计时间进行孵育，反应结束后立即取出。先完成反应的在-20 °C下冻存，待全部处理完成反应后，在蓝光切胶仪下进行观察。

1.2.6 敏感性试验

为测定建立的检测方法的敏感性，将已构建的重组质粒进行连续的十倍倍比稀释，并以单个梯度稀释重组质粒作为检测方法敏感性试验的标准品。梯度稀释的重组质粒DNA作为反应模板，进行RPA反应扩增以确定该方法的最低检测核酸浓度。

1.2.7 特异性试验

以常见禽病的不同病原体基因组核酸作为模板进行扩增，验证检测方法的特异性。采用优化后的检测方法分别对鸭腺病毒3型、禽腺病毒4型、鸭圆环病毒、鸭瘟病毒、鸭病毒性肝炎病毒、鸭坦布苏病毒和新型鸭呼肠孤病毒进行DNA检测，加入去离子水的反应体系作为阴性对照，加入VP3阳性质粒的反应体系为阳性对照，根据检测结果检验该方法的特异性。

1.2.8 RPA和PCR的敏感性比较

对已建立的N-MDPV PCR检测方法与RPA检测方法进行敏感性比较。提取N-MDPV的基因组核酸，用去离子水进行十倍倍比稀释，采用两种检验方式进行测定，并依据所测定到的最低核酸扩增含量对比两种方式的灵敏度。

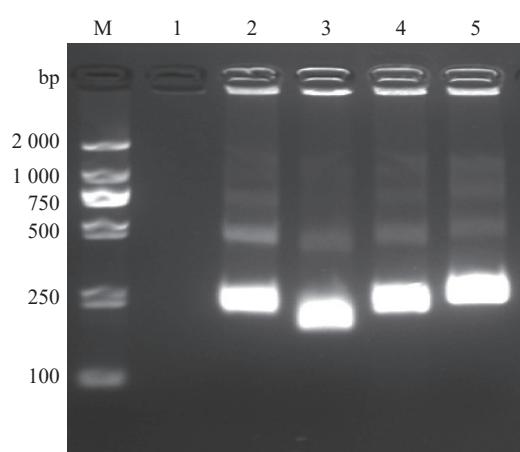
1.2.9 临床病料的检测

收集38份疑似组织、血液样本，使用核酸快速提取试剂盒提取核酸，利用建立的RPA方法、传统PCR方法和病毒分离鉴定法进行检测，分析3种方法的符合率。

2 结果与分析

2.1 N-MDPV VP3基因RPA扩增

以ddH₂O作为阴性对照，采用4对引物分别进行RPA扩增目的基因，并对扩增产物凝胶电泳成像（图1），结果显示阴性对照未见条带，RPA扩增技术成功扩增出目的基因，基因片段在193~250 bp，符合预期设计条带大小。



M: DL 2000 DNA 分子质量标准; 1: 阴性对照; 2~5: 引物 RPA 扩增产物。

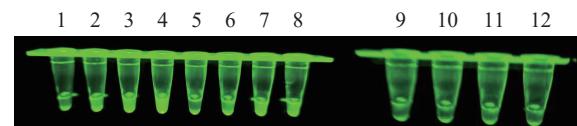
M: DL 2000 DNA marker; 1: negative control; 2~5: RPA products.

图 1 N-MDPV VP3 基因 RPA 荧光扩增结果

Fig. 1 RPA amplification on VP3 of N-MDPV

2.2 RPA 扩增引物的筛选

如图 2 所示, 所有设计的 N-MDPV 引物组合均有荧光, 不同探针浓度对荧光效率存在影响, 本研究发现 $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组的荧光效果相对较好, 其中 N-MDPV-193F 和 N-MDPV-250R 组合所得的荧光效果最佳, 且不同引物阴性对照未见荧光, 故确定最佳引物组合为 N-MDPV-193F 和 N-MDPV-250R。



1~4 (探针浓度 $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$): N-MDPV-228F-228R, N-MDPV-193F-193R, N-MDPV-193F-230R, N-MDPV-193F-250R; 5~8 (探针浓度 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$): N-MDPV-228F-228R, N-MDPV-193F-193R, N-MDPV-193F-230R, N-MDPV-193F-250R; 9~12 (阴性对照): N-MDPV-228F-228R, N-MDPV-193F-193R, N-MDPV-193F-230R, N-MDPV-193F-250R。

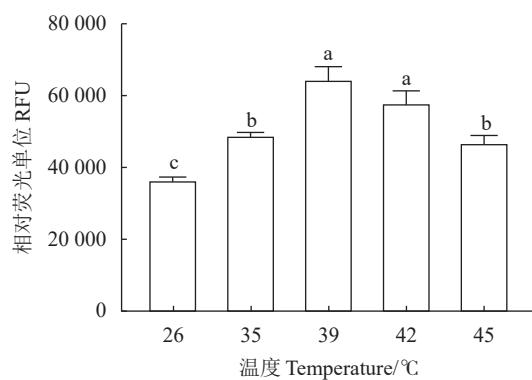
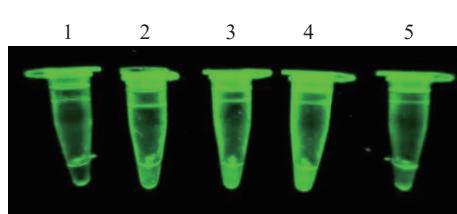
1~4 (with probe concentration at $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$): N-MDPV-228F-228R, N-MDPV-193F-193R, N-MDPV-193F-230R, N-MDPV-193F-250R, respectively; 5~8 (with probe concentration at $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$): N-MDPV-228F-228R, N-MDPV-193F-193R, N-MDPV-193F-230R, N-MDPV-193F-250R, respectively; 9~12 (negative control): N-MDPV-228F-228R, N-MDPV-193F-193R, N-MDPV-193F-230R, N-MDPV-193F-250R, respectively.

图 2 N-MDPV 荧光 RPA 检测不同引物扩增结果

Fig. 2 Amplification of primers of RPA for N-MDPV

2.3 反应温度优化

对 N-MDPV RPA 检测方法反应温度优化结果 (图 3) 表明, 反应温度 26°C 、 35°C 时荧光温度较弱, 可能是酶在较低温度下活性不佳, 45°C 时荧光强度也见明显下降, 可能是高温导致反应酶温度失活。 39°C 时反应荧光均值最高, 为 63655 RFU (图 3), 故最佳反应温度确定为 39°C 。



1~5 分别为 26 、 35 、 39 、 42 、 45°C 。不同小写字母表示不同温度之间差异显著 ($P<0.05$)。

1~5: 26 , 35 , 39 , 42 , and 45°C , respectively. Different lowercase letters indicate significant differences between different temperatures at $P<0.05$.

图 3 N-MDPV 荧光 RPA 检测方法不同反应温度的扩增结果

Fig. 3 Amplifications at varied reaction temperature of RPA for N-MDPV

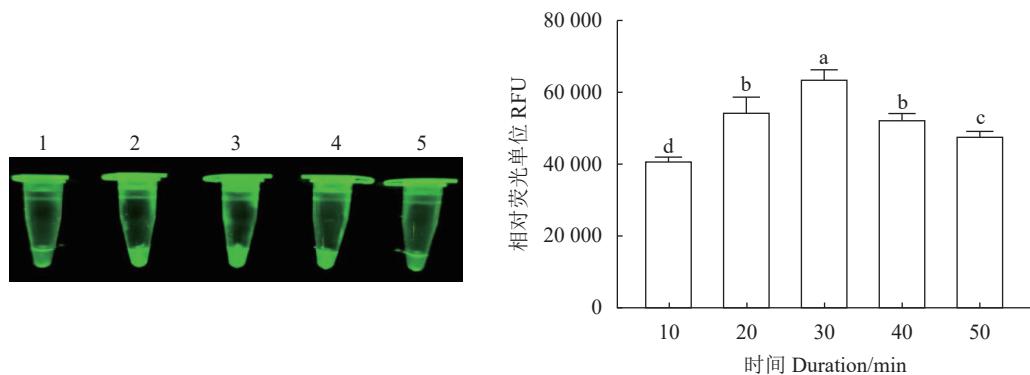
2.4 反应时间优化

由图 4 可知, 不同反应时间处理的扩增结果总体差异较小, 但当反应时间超过 30 min 后, 可能由于出现非特异性扩增, 反应体系的荧光强度随着时间的延长而下降。推测是反应时间过长导致反应体系内错配概率上升, 引起大量非特异性扩增。由图 4 可知, 在 30 min 时反应体系的荧光值最高, 均值达

到 64071 RFU 。由此确定最优反应时间为 30 min , 满足快速检测需求。

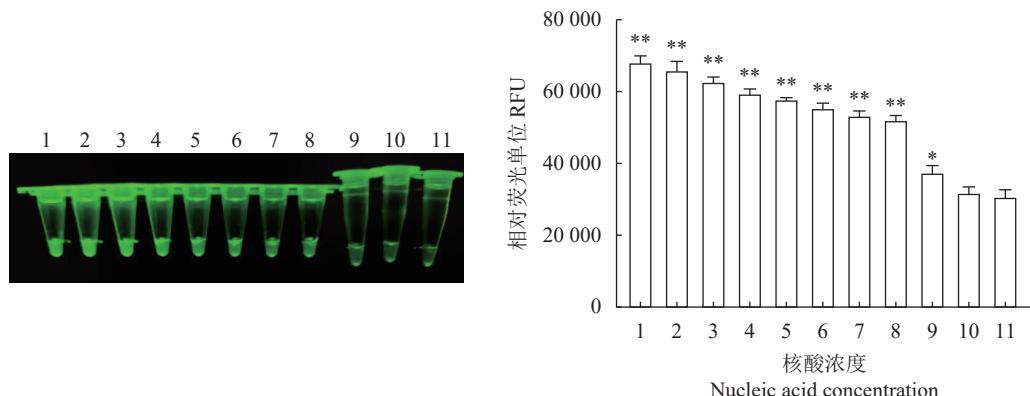
2.5 敏感性试验结果

经测定, 设计质粒浓度 $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 以 10 倍系列稀释成 $100\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、 $10\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、 $1\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、 $100\text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、 $10\text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、 $1\text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、 $100\text{ fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、 $10\text{ fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、 $1\text{ fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、 $1\text{ ag}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 进行 RPA 敏感性试验, 结果 (图 5)



1~5 分别为 10、20、30、40、50 min。不同小写字母表示不同时间之间差异显著 ($P<0.05$)。
1~5: 10, 20, 30, 40, and 50 min, respectively; Different lowercase letters indicate significant differences between different times at $P<0.05$.

图 4 N-MDPV 荧光 RPA 检测方法不同反应时间的扩增结果
Fig. 4 Amplifications under varied reaction time of RPA for N-MDPV



1: 100 ng·μL⁻¹; 2: 10 ng·μL⁻¹; 3: 1 ng·μL⁻¹; 4: 100 pg·μL⁻¹; 5: 10 pg·μL⁻¹; 6: 1 pg·μL⁻¹; 7: 100 fg·μL⁻¹; 8: 10 fg·μL⁻¹; 9: 1 fg·μL⁻¹; 10: 1 ag·μL⁻¹; 11: 阴性对照。*、**: 与阴性对照相比, 差异显著 ($P<0.05$) 或极显著 ($P<0.01$)。
1: 100 ng·μL⁻¹; 2: 10 ng·μL⁻¹; 3: 1 ng·μL⁻¹; 4: 100 pg·μL⁻¹; 5: 10 pg·μL⁻¹; 6: 1 pg·μL⁻¹; 7: 100 fg·μL⁻¹; 8: 10 fg·μL⁻¹; 9: 1 fg·μL⁻¹; 10: 1 ag·μL⁻¹; 11: negative control; * and **: significant difference from negative control at $P<0.05$ and extremely significant difference from negative control at $P<0.01$, respectively.

图 5 N-MDPV 荧光 RPA 检测方法的敏感性
Fig. 5 Sensitivity of constant temperature fluorescent RPA assay

显示在 $10 \text{ fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 时还有较强荧光, 在核酸浓度 $1 \text{ fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 时荧光强度呈现显著差异 (图 5), 说明建立的荧光 RPA 检测方法最低检测限度为 $10 \text{ fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。

2.6 特异性分析

利用建立的 RPA 检测方法对不同病毒的核酸进行检测, 并设置阴性对照。结果 (图 6) 显示 N-MDPV RPA 检测方法只扩增出 N-MDPV 核酸, 其他病毒的核酸和去离子水样品均为阴性, 无交叉反应, 图 6 显示以 N-MDPV 病毒质粒为模板的检测体系测得的荧光值与其他病毒样品有显著差异, 说明该方法具有很好的特异性。

2.7 RPA 和 PCR 的敏感性对比

按照优化后的反应条件, 同时使用 PCR 和 RPA 两种检测方法以相同稀释倍数的核酸作为模板进行检测对比。结果显示 RPA 检测方法较 PCR 检测方法的检测下限更低, PCR 检测方法检测限为核酸

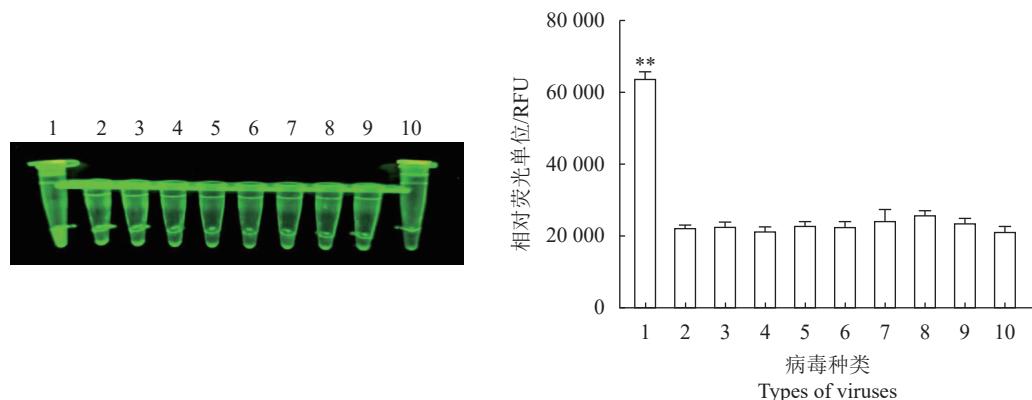
稀释倍数 $10 \text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ (图 7), 而 RPA 检测方法检测限为核酸稀释倍数 $10 \text{ fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ (图 8)。

2.8 临床病料的检测结果

对收集的 38 个临床样本采用已建立的 RPA 方法、常规 PCR 方法和病毒分离鉴定法同时进行检测, 结果显示 (表 2), RPA 方法 N-MDPV 阳性率为 36.8% (14/38), 病毒分离鉴定法检测 N-MDPV 阳性率为 31.6% (12/38), PCR 方法检测 N-MDPV 阳性率为 36.8% (14/38)。其中, 病毒分离鉴定法的 12 份阳性样品与常规 PCR 法检测出的 14 份阳性样品与 RPA 检测的 14 份阳性样品结果一致, 均来自同一份临床样品。表明建立的 RPA 方法与常规 PCR 方法的检测结果完全相同, 可在基层应用于 N-MDPV 的检测。

3 讨论

RPA 是近年来新兴的一种常温扩增技术, 检测原



1: 新型番鸭细小病毒; 2: 鸭腺病毒 3 型; 3: 禽腺病毒 4 型; 4: 鸭腺病毒 3 型+鸭坦布苏病毒; 5: 鸭瘟病毒; 6: 鸭病毒性肝炎病毒; 7: 鸭圆环病毒; 8: 鸭坦布苏病毒; 9: 新型鸭呼肠孤病毒; 10: 阴性对照。**: 与阴性对照相比, 差异极显著 ($P<0.01$)。

1: new-genotype muscovy duck parvovirus; 2: duck adenovirus type 3; 3: fowl adenovirus serotype 4; 4: duck adenovirus type 3 + duck tembusu virus; 5: duck plague virus; 6: duck hepatitis virus; 7: duck circovirus; 8: duck tembusu virus; 9: novel duck reovirus; 10: negative control. **: extremely significant difference from negative control at $P<0.01$.

图 6 N-MDPV 荧光 RPA 检测方法的特异性

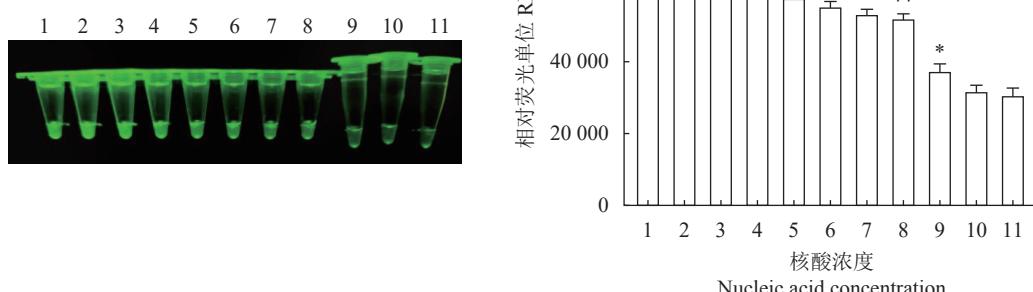
Fig. 6 Specificity of constant temperature fluorescent RPA assay



M: DL 2000 DNA 分子质量标准; 1: 100 ng·μL⁻¹; 2: 10 ng·μL⁻¹; 3: 1 ng·μL⁻¹; 4: 100 pg·μL⁻¹; 5: 10 pg·μL⁻¹; 6: 1 pg·μL⁻¹; 7: 100 fg·μL⁻¹; 8: 10 fg·μL⁻¹; 9: 1 fg·μL⁻¹; 10: 1 ag·μL⁻¹; 11: 阴性对照。

Fig. 7 Sensitivity of constant temperature fluorescent RPA assay

理是在扩增目的靶标片段过程中, 重组酶与引物结合形成的复合物与 DNA 结合, 并沿核酸链寻找同源序列, 引物定位同源序列后, 发生链交换反应形成并启动 DNA 合成, 采用的扩增酶在一定条件温度下就具有核酸扩增作用。相较于 PCR 等现有分子诊断技术, RPA 恒温扩增具有以下优点: 首先, RPA 快速检测方法对于温度的要求并不苛刻, 在偏远地区有便携式发热设备即可开展检测, 在不具备昂贵设备的基层环境具有明显优势, 成本相对较低。其次, RPA 试剂使用冻干粉的形式制备, 可长期在室温下保存且不失去活性, 与其他液体试剂相比, 反应体系于一管内配置不易受气溶胶污染且稳定。第三, PCR 扩增时核苷酸的非正常配对会导致探针失效或失去灵敏度,



1: 100 ng·μL⁻¹; 2: 10 ng·μL⁻¹; 3: 1 ng·μL⁻¹; 4: 100 pg·μL⁻¹; 5: 10 pg·μL⁻¹; 6: 1 pg·μL⁻¹; 7: 100 fg·μL⁻¹; 8: 10 fg·μL⁻¹; 9: 1 fg·μL⁻¹; 10: 1 ag·μL⁻¹; 11: 阴性对照。*: **: 与阴性对照相比, 差异显著 ($P<0.05$) 或极显著 ($P<0.01$)。

1: 100 ng·μL⁻¹; 2: 10 ng·μL⁻¹; 3: 1 ng·μL⁻¹; 4: 100 pg·μL⁻¹; 5: 10 pg·μL⁻¹; 6: 1 pg·μL⁻¹; 7: 100 fg·μL⁻¹; 8: 10 fg·μL⁻¹; 9: 1 fg·μL⁻¹; 10: 1 ag·μL⁻¹; 11: 阴性对照; * and **: significant difference from negative control at $P<0.05$ and extremely significant difference from negative control at $P<0.01$, respectively.

图 8 N-MDPV 荧光 RPA 检测方法的敏感性

Fig. 8 Sensitivity of constant temperature fluorescent RPA assay

表2 N-MDPV RPA 与 PCR 方法、病毒分离法临床样本检测结果比较

Table 2 Comparison between detections by constant temperature fluorescent RPA assay and PCR on clinical samples

检测方法 Detecting Method	样品数 No. of samples	阳性样品数 No. of positive	阴性样品数 No. of negative	阳性率 Positive rate%
RPA恒温检测				
RPA constant temperature detection	38	14	24	36.8
常规 PCR Conventional PCR	38	14	24	36.8
病毒分离鉴定法 Virus isolation and identification method	38	12	26	31.6

最终导致检测结果不理想, RPA 扩增反应则容许微量错配, 不影响最终结果。因此 RPA 具有良好的应用前景。

得益于酶体系和单链结合蛋白的协作, RPA 无需变性即可在常温条件下快速扩增目标序列, 相较于 PCR 也具有更好的扩增敏感性。在此基础上, 荧光探针法 RPA 加入了 EXO 酶和 EXO 荧光探针, 酶对底物的识别与切割保证了反应的特异性。本研究针对 N-MDPV 保守性序列 VP3 设计多对引物, 通过试验筛选到最佳扩增引物对, 并优化反应温度和反应时间, 最佳反应条件为 39 °C 孵育 30 min。在灵敏性方面, 本研究建立的 RPA 检测方法最低检测核酸限度可达 $10 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 相较常规 PCR 敏感性提高了 100 倍^[12]。该方法特异性强, 与鸭腺病毒 3 型 (DAdV-3)、禽腺病毒 4 型 (FAdV-4)、鸭圆环病毒 (DuCV)、鸭瘟病毒 (DPV)、鸭病毒性肝炎病毒 (DHV)、鸭坦布苏病毒 (DTMUV) 和新型鸭呼肠孤病毒 (NDRV) 均无交叉反应。临床病料 RPA 检测结果与 PCR 方法的阳性检出率完全一致, 高于病毒分离鉴定法。此外, 与 LAMP 检测方法相比, RPA 检测方法仅需要一对引物和一个探针, 操作简单便捷快速, 有效填补了 LAMP 检测技术假阳性高的问题, 为基层快检提供了新的技术^[4]。该方法在基层检测试验流程可控制在 1 h 内, 相较 LAMP 检测时间缩短一半以上, 更加方便快捷。随着生物制造产业的不断发展, 引物探针和试剂生产成本的下降, 该类技术必然会得到更大的推广与应用。

综上所述, 本研究成功建立了一种 N-MDPV 的 RPA 恒温检测方法, 对 N-MDPV 现场检测试剂盒的开发和疫病防控具有重要意义。

参考文献:

- [1] 林世棠, 郁晓岚, 陈炳钿, 等. 一种新的雏番鸭病毒性传染病的诊断 [J]. 中国畜禽传染病, 1991, 13 (2): 25–26.
- LIN S T, YU X L, CHEN B D, et al. Diagnosis of a new viral infectious disease in Muscovy duck [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 1991, 13(2): 25–26. (in Chinese)
- [2] 胡奇林, 吴振尧, 周文漠, 等. 雏番鸭细小病毒病的流行病学调查 [J]. 中国兽医杂志, 1993, 29 (6): 7–8.
- HU Q L, WU Z Y, ZHOU W M, et al. Epidemiological investigation of parvovirus disease in Muscovy ducks [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 1993, 29(6): 7–8. (in Chinese)
- [3] 黄瑜, 万春和, 傅秋玲, 等. 新型番鸭细小病毒的发现及其感染的临床表现 [J]. 福建农业学报, 2015, 30 (5): 442–445.
- HUANG Y, WAN C H, FU Q L, et al. The identity and clinic infectious symptoms of the new genotype Muscovy duck parvovirus [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2015, 30(5): 442–445. (in Chinese)
- [4] 孟婷, 朱善元, 夏文龙, 等. 番鸭细小病毒 LAMP 检测方法的建立 [J]. 中国动物传染病学报, 2019, 27 (1): 25–29.
- MENG T, ZHU S Y, XIA W L, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of Muscovy duck parvovirus [J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2019, 27(1): 25–29. (in Chinese)
- [5] EULER M, WANG Y J, OTTO P, et al. Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of *Francisella tularensis* [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, 50(7): 2234–2238.
- [6] 刘孟啸, 蔡姝, 刘建钗, 等. 鸭腺病毒 3 型荧光 RPA 恒温快速检测方法的建立与应用 [J]. 中国兽药杂志, 2023, 57 (11): 8–15.
- LIU M X, CAI S, LIU J C, et al. Rapid detection of duck adenovirus type 3 based on isothermal recombinase polymerase amplification assay [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2023, 57(11): 8–15. (in Chinese)
- [7] 袁嘉康, 李林岳, 庞俊增, 等. 猪流行性腹泻病毒 RPA-LFD 检测方法的建立 [J]. 中国兽医学报, 2023, 43 (6): 1127–1132.
- YUAN J K, LI L Y, PANG J Z, et al. Establishment of RPA-LFD method for detection of porcine epidemic diarrhea virus [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2023, 43(6): 1127–1132. (in Chinese)
- [8] ABD EL WAHED A, EL-DEEB A, EL-THOLOTH M, et al. A portable reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of foot-and-mouth disease virus [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e71642.
- [9] 王建昌, 王金凤, 刘立兵, 等. 非洲猪瘟病毒 RPA 等温检测方法的建立 [J]. 中国动物检疫, 2016, 33 (7): 78–81, 94.
- WANG J C, WANG J F, LIU L B, et al. Rapid and sensitive detection of African swine fever virus by recombinase polymerase amplification [J]. *China Animal Health Inspection*, 2016, 33(7): 78–81, 94. (in Chinese)
- [10] DAHER R K, STEWART G, BOISSINOT M, et al. Recombinase polymerase amplification for diagnostic applications [J]. *Clinical Chemistry*, 2016, 62(7): 947–958.
- [11] 万春和, 傅秋玲, 陈翠腾, 等. 基因重组型番鸭细小病毒 FJM3 的全基因组特征 [J]. 中国兽医学报, 2016, 36 (11): 1836–1841.
- WAN C H, FU Q L, CHEN C T, et al. Molecular characterization of the genome for recombinant Muscovy duck parvovirus strain FJM3 [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2016, 36(11): 1836–1841. (in Chinese)
- [12] 刘家森, 姜骞, 司昌德, 等. 番鸭细小病毒与鹅细小病毒 PCR 鉴别诊断方法的建立 [J]. 中国兽医学报, 2007, 37 (6): 469–472.
- LIU J S, JIANG Q, SI C D, et al. Establishment of PCR assay for differentiation of Muscovy duck parvovirus from goose parvovirus [J]. *Veterinary Science in China*, 2007, 37(6): 469–472. (in Chinese)

(责任编辑: 张梅)