

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.08.01

非洲猪瘟病毒实时荧光 LAMP 检测方法的建立与应用

王 林,高晓龙,吴 迪,张 玮,张启龙,栗云鹏,程汝佳,杜 鹃,李 蕊,王 培,
冯小宇,韦海涛,周德刚,刘晓冬,宋彦军*

(北京市动物疫病预防控制中心,北京 102629)

[收稿日期] 2020-04-01 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 08-0001-08 [中图分类号] S852.659.6

[摘 要] 为建立一种快速简便、灵敏度高、准确性好的非洲猪瘟病毒恒温快速检测方法,根据 ASFV P72 基因保守区域设计特异性引物,优化引物浓度、反应温度、反应时间,建立了一种基于 SYTO9 荧光染料的非洲猪瘟病毒实时荧光 LAMP 快速检测方法。结果表明,该方法在 63 ℃ 条件下扩增 40 min,该方法灵敏度高,最低可检测限为 10 copies/ μ L;特异性良好,与猪伪狂犬病毒、猪瘟病毒、美洲型猪繁殖与呼吸综合征病毒、欧洲型猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪流行性腹泻病毒无交叉反应;重复性好,变异系数低于 5%。对 70 份临床样本检测,4 份血液样品和 9 份脾脏样品检测阳性,与荧光定量 PCR 检测结果符合率为 100%。该方法灵敏度高、特异性强、重复性好、符合率高,适用于非洲猪瘟现场快速诊断。

[关键词] 非洲猪瘟病毒;实时;荧光环介导等温扩增

Establishment and Application of Real-time Fluorescent LAMP for Detection of African Swine Fever Virus

WANG Lin, GAO Xiao-long, WU Di, ZHANG Wei, ZHANG Qi-long, LI Yun-peng,
CHENG Ru-jia, DU Juan, LI Rui, WANG Pei, FENG Xiao-yu, WEI Hai-tao, ZHOU De-gang,
LIU Xiao-dong, SONG Yan-jun*

(Beijing Animal Disease Prevention and Control Center, Beijing 102629, China)

Abstract: In order to develop a simple, highly-sensitive and accurate loop-mediated isothermal nucleic acid amplification (LAMP) for rapid detection of African Swine Fever Virus, specific primers were designed based on the highly conserved region of P72 gene of ASFV. By optimizing primer concentration, temperature and time, the SYTO9 real-time fluorescent LAMP for rapid detection of ASFV was established. The results manifested that the real-time fluorescent LAMP assay was performed in 63℃ for 40 min, the assay was capable of detecting 10 copies/ μ L, and no cross-reaction with PRV, CSFV, PRRSV (A), PRRSV (E), PEDV. A total of 70

基金项目:北京市科技计划课题(Z191100004019008)

作者简介:王 林,高级兽医师,博士,主要从事动物传染病诊断与防治研究;高晓龙,与王林为共同第一作者。

通讯作者:宋彦军。E-mail:song_jun131@sina.com

clinical samples including blood, tissue and feed collected were examined by this method. The result showed that 4 blood samples and 9 spleen samples were positive, and the agreement of positive rate between real-time fluorescent LAMP and qPCR was 100%. Overall, the real-time fluorescent LAMP in this study is rapid, simple and effective and this method therefore suitable for clinical samples in field.

Key words: African Swine Fever Virus; real-time; fluorescent LAMP

非洲猪瘟(African Swine Fever, ASF)是由非洲猪瘟病毒(African Swine Fever Virus, ASFV)感染家猪和野猪引起的一种高度接触性的烈性传染病,致死率几乎 100%,世界动物卫生组织(OIE)将其列为法定报告传染病。自 1921 年肯尼亚首次发生非洲猪瘟疫情以来,该病给全球养猪业造成严重威胁和巨大经济损失。上世纪中叶非洲猪瘟通过航空运输传入欧洲,相继在意大利、葡萄牙、法国、比利时、荷兰等国家暴发疫情,经过二三十年的努力,除意大利撒丁岛外,欧洲其他国家成功将该病根除;但 2007 年,格鲁吉亚暴发非洲猪瘟疫情后,该病持续向全球蔓延,在俄罗斯、白俄罗斯、波兰等东欧国家和地区广泛流行^[1]。我国自 2018 年 10 月发生首例非洲猪瘟疫情以来^[2],迅速蔓延全国 31 个省份,截至 2019 年 10 月全国共报告 158 起非洲猪瘟疫情,共扑杀生猪百万余头,导致我国生猪养殖遭受毁灭性打击,甚至给我国经济、政治、社会带来严重的影响。鉴于当前无有效商品化疫苗可用^[3],因此非洲猪瘟的早期快速准确诊断对该病的防控具有非常重要的意义。

国内外研究人员针对非洲猪瘟病毒建立了多种核酸检测方法^[4],主要有 PCR、荧光定量 PCR、数字 PCR^[5]、恒温 RPA-LFD^[6]以及纳米孔测序^[7]等,但这些方法存在检测时间长、操作繁琐、设备要求高、成本高、易污染等问题。虽然恒温 RPA-LFD 检测方法反应时间仅为 20 min,但其利用免疫层析试纸条进行结果判读仍需 10~15min,操作繁琐同样不利于非洲猪瘟的现场快速诊断,而环介导等温快速检测方法(Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP)具有特异性好、灵敏度高、操作方便等优点^[8-9],且多位研究人员也针对口蹄疫^[10]、禽流感^[11]、圆环 3 型^[12]、中东呼吸综合征病毒^[13]

以及西尼罗河病毒^[14]等多种疾病建立了 LAMP 恒温快速检测方法。

因此,本研究基于 LAMP 扩增技术针对 ASFV p72 基因保守区域设计特异性引物组建立 ASFV 恒温快速检测方法,并通过向 LAMP 反应体系中添加 SYTO9 荧光染料实现对扩增反应的实时监控和结果判定,同时对该方法的灵敏度、特异性、重复性、符合率和适用仪器等进行评价。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器和试剂 便携式 MA-1610 型等温荧光 PCR 仪(购自北京兰伯瑞生物技术有限责任公司)、ABI QuantStudio 7 荧光定量 PCR 仪、Loop^{amp} DNA 扩增试剂盒(购自荣研生物科技(中国)有限公司)、SYTO9(购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司)、DNA 核酸提取试剂盒(购自杭州博日科技有限公司)

1.1.2 毒株与样品 非洲猪瘟病毒 p72 基因保守区域 DNA 质粒由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;

非洲猪瘟阳性样本核酸、猪伪狂犬病毒(PRV)、猪瘟病毒(CSFV)、美洲型猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV-JXA1 株)、欧洲型猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV-LV 株)、猪流行性腹泻病毒(PEDV)等均由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 Genbank 已发表的 ASFV Georgia 株(GenBank: MH910495.1),运用“环介导等温扩增法引物设计辅助软件(<http://primerexplorer.jp/>)在线设计非洲猪瘟病毒 p72 基因的内引物、外引物和环引物,引物序列见表 1,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.2 引物筛选 将人工合成的 ASFV p72 基因保守区域 DNA 质粒稀释成浓度为 1×10^4 copies/ μ L 和无 RNase 水作为阳性模板和阴性模板,63℃ 扩增 120 min,根据阳性反应时间、“S 型”扩增曲线和非特异性曲线等结果综合分析,筛选 ASFV 实时荧光 LAMP 快速检测方法的最佳引物组。

表 1 基于 ASFV p72 基因设计的 LAMP 扩增引物
Tab 1 LAMP Primers designed for the P72 gene of ASFV

组别	引物名称	序列(5' - 3')
A	内引物 FIP	AGCTGCAGAACTTTGATGGAAATTTAAACATTTCCGTAAGTCTCA
	内引物 BIP	ACGGAGGCAATGCGATTAAAAATATTCCTCCCGTGGCTTC
	外引物 F3	CGTATCCGATCACATTACCT
	外引物 B3	ATATGACCACTGGGTTGG
	环引物 LB	CCGATGATCCGGGTGCGAT
B	内引物 FIP	CATGAGCAGTTACGGAAATGTTTTTGTTCATCTATATCTGATATTAGCC
	内引物 BIP	AATTTCCATCAAAGTTCTGCACTTTTAATCGCATTGCCTCC
	外引物 F3	TACAGCTCTTCCAGACGC
	外引物 B3	TAATCATCATCGCACCCG
	环引物 LB	GTAATCTGATCGGATACGTAACCG

1.2.3 方法的建立与优化 按照 Loop^{amp} DNA 扩增试剂盒说明书进行配制 ASFV 荧光 LAMP 基础反应体系 18.5 μ L,包含 2 $\times$ LAMP 反应液 12.5 μ L,外引物(F3/B3,浓度为 5 μ M)各 1 μ L、内引物(FIP/BIP,浓度为 40 μ M)各 1 μ L、环引物 LB(浓度为 20 μ M)1 μ L、Bst DNA 聚合酶 1 μ L,SYTO9 荧光染料(1 mM)1 μ L,DNA 模板 2 μ L,无 DNA 酶水补足至 25 μ L。反应条件为 63℃,1 min,50cycles。

以浓度为 1×10^5 copies/ μ L 的 DNA 质粒为模板,分别在 61℃、63℃、65℃、67℃ 等 4 个温度条件下进行扩增,根据阳性反应时间确定最佳反应温度。

分别以浓度为 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^1$ copies/ μ L 的 p72 基因质粒为模板,在最佳反应温度时进行扩增,根据最低检测限来确定最佳反应时间。

1.2.4 灵敏度验证 将浓度为 1×10^6 copies/ μ L 的 p72 基因质粒进行 10 倍系列稀释,稀释至 1×10^0 copies/ μ L 同时进行实时荧光 LAMP 检测,每个浓度做 3 个重复,验证该方法灵敏性。

1.2.5 特异性验证 将本实验室保存的 ASFV 核酸(经实验室检测不含 PRV、CSFV、PRRSV、PEDV、FMDV、PCV2 和 PCV3 等病毒核酸)和 PRV、CSFV、

PRRSV - JXA1 株、PRRSV - LV 株、PEDV 提取核酸后进行实时荧光 LAMP 检测,验证该方法的特异性。

1.2.6 重复性验证 分别以浓度为 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^1$ copies/ μ L 的 p72 基因质粒为模板,进行实时荧光 LAMP 扩增,每个稀释度重复 4 次,根据其 Ct 值计算变异系数,评价该方法的重复性。

1.2.7 仪器适用性验证 使用浓度为 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^1$ copies/ μ L 的 p72 基因质粒为模板,分别在 ABI QuantStudio 7 荧光定量 PCR 仪和便携式 MA - 1610 型等温荧光 PCR 仪进行实时荧光 LAMP 扩增,对本方法适用仪器进行验证。

1.2.8 临床样本检测 分别采用本研究建立的 ASFV 实时荧光 LAMP 快速检测方法和《非洲猪瘟病毒检测操作规程(试行)》“非洲猪瘟核酸检测技术(方法一)”规定的实时荧光 PCR 检测方法,对本实验室采集的 20 份饲料、30 份血液、20 份脾脏等 70 份样品进行检测,分析该方法的符合率。

2 结果与分析

2.1 引物筛选 分别使用设计的 ASFV - LAMP 扩增引物组 A 和 B 对 1×10^5 copies/ μ L DNA 合成质粒和阴性对照 63℃ 扩增 2h。结果(图 1)显示,A 组引物在 29 min 出现明显的“S”型扩增曲线且阴

性对照无非特异性扩增,而 B 组引物在 75 min 才检出阳性 DNA 模板,A 组引物阳性检出时间优于 B 组,因此选择 A 组引物为 ASFV 实时荧光 LAMP 检测引物。

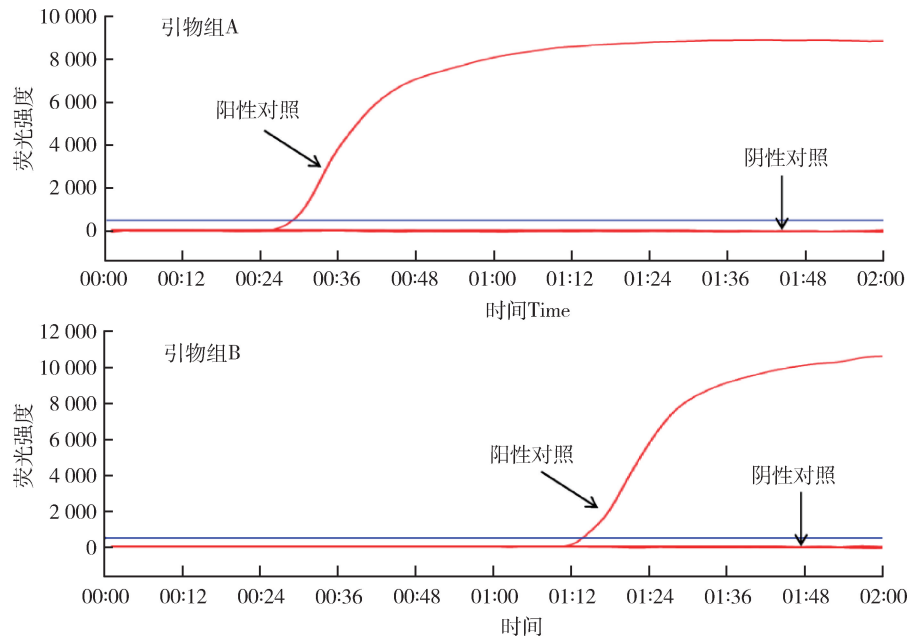


图 1 ASFV 实时荧光 LAMP 引物筛选

Fig 1 Primers screening of real – time fluorescent LAMP for ASFV

2.2 方法的建立与优化 经优化后的 ASFV 实时荧光 LAMP 快速检测方法反应体系为 25 μ L, 分别为 2 $\times$ LAMP 反应液 12.5 μ L, 外引物 (F3/B3, 浓度为 5 μ M) 各 1 μ L、内引物 (FIP/BIP, 浓度为 40 μ M) 各 1 μ L、环引物 LB (浓度为 20 μ M) 1 μ L、Bst DNA 聚合酶 1 μ L, SYTO9 荧光染料 (1mM) 1 μ L, DNA 模

板 2 μ L, 无 DNA 酶水 3.5 μ L。
最佳反应温度优化结果 (图 2) 显示, 61 $^{\circ}$ C 时 Ct 值为 21.89, 63 $^{\circ}$ C 时 Ct 值为 19.57, 65 $^{\circ}$ C 时 Ct 值为 21.06, 67 $^{\circ}$ C 时 Ct 值为 25.75, 表明同一模板浓度条件下, 63 $^{\circ}$ C 扩增时间最短, 因此最佳反应温度为 63 $^{\circ}$ C。

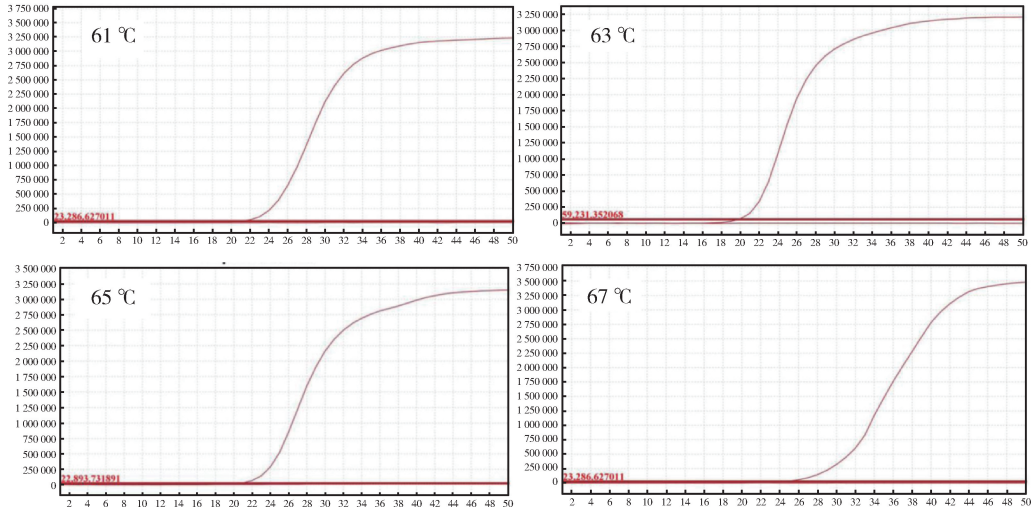


图 2 反应温度优化

Fig 2 Optimization of reaction temperature

2.3 灵敏度及最佳反应时间 以 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^0$ copies/ μL 的 p72 基因质粒为模板进行实时荧光 LAMP 扩增。结果(图 3)显示,ASFV 实时荧光 LAMP 检测方法最低检测限为 10 copies/ μL 。ASFV 实时荧光 LAMP 标准曲线(图 4)表明该检测方

法结果 Ct 值与模板浓度呈线性相关, R^2 为 0.992,表明线性关系良好。

由图 3 可知,本方法最低检测限为 10 copies/ μL ,重复 3 次的平均 Ct 值为 30.21,因此本方法最佳反应循环数为 40 cycles,即最佳反应时间为 40 min。

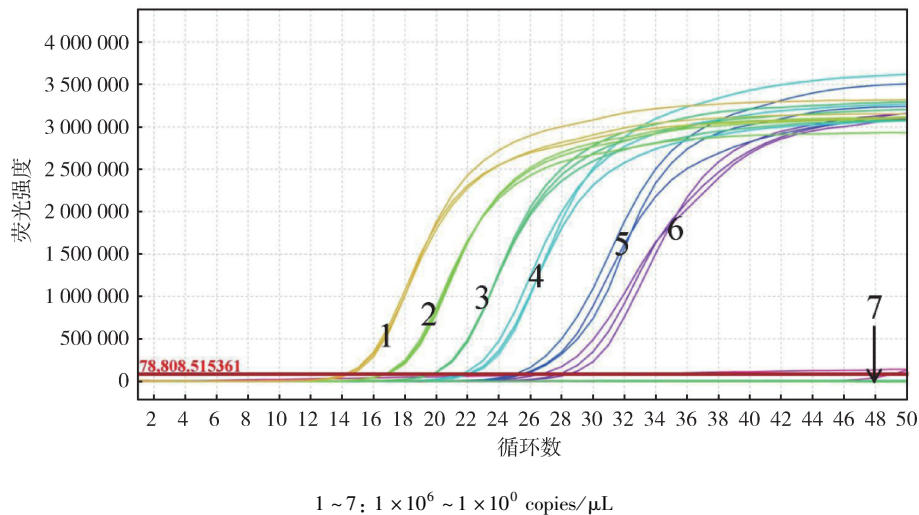


图 3 ASFV 实时荧光 LAMP 灵敏度验证

Fig 3 Sensitivity of ASFV real-time fluorescent LAMP

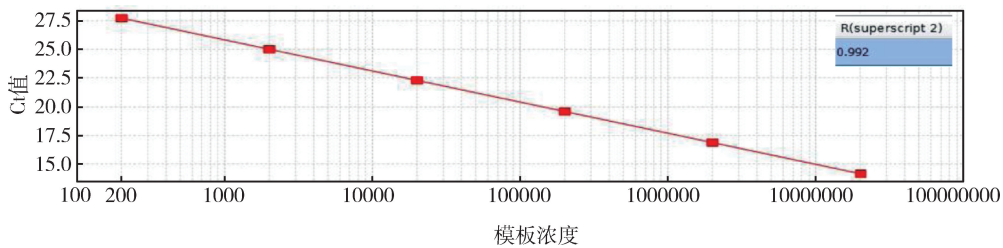


图 4 ASFV 实时荧光 LAMP 标准曲线

Fig 4 Standard curve of ASFV real-time fluorescent LAMP

2.4 特异性验证 采用 ASFV、PRV、CSFV、PRRSV-JXA1 株、PRRSV-LV 株、PEDV 进行实时荧光 LAMP 扩增,验证其特异性。结果(图 5)显示,除 ASFV 出现特异性扩增外,其余病毒检测均为阴性,表明该方法特异性良好。

2.5 重复性验证 采用 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^1$ copies/ μL 的 p72 基因质粒为模板进行实时荧光 LAMP 扩增,每个稀释度重复 4 次,结果如表 2 所示,变异系数

均小于 5%,说明该方法重复性良好。

2.6 适用仪器验证 利用 ASFV 实时荧光 LAMP 方法分别在 ABI QuantStudio 7 荧光定量 PCR 仪和便携式 MA-1610 型等温荧光 PCR 仪上对 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^1$ copies/ μL 浓度的质粒模板进行扩增,结果(图 6)显示,全部浓度的质粒均能检出,表明本方法仪器适用性好,既可适用于兽医诊断实验室常用的荧光定量 PCR 仪,也能适用于便携式恒温荧光 PCR 仪。

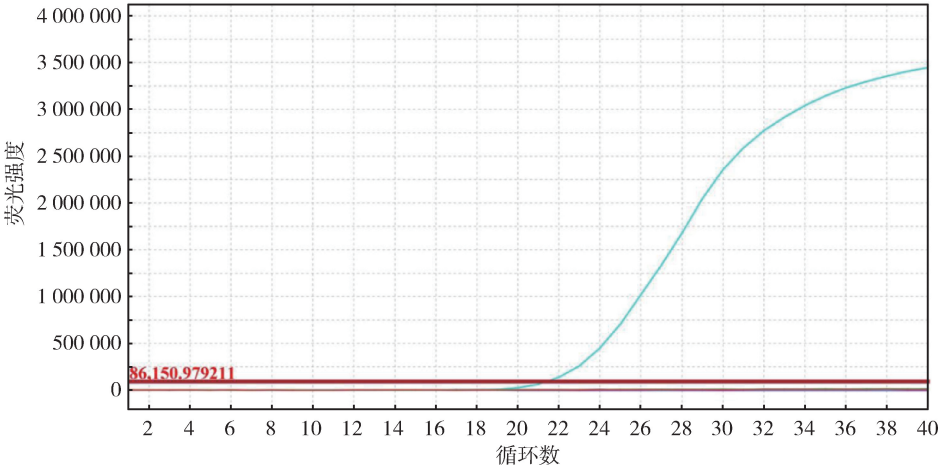


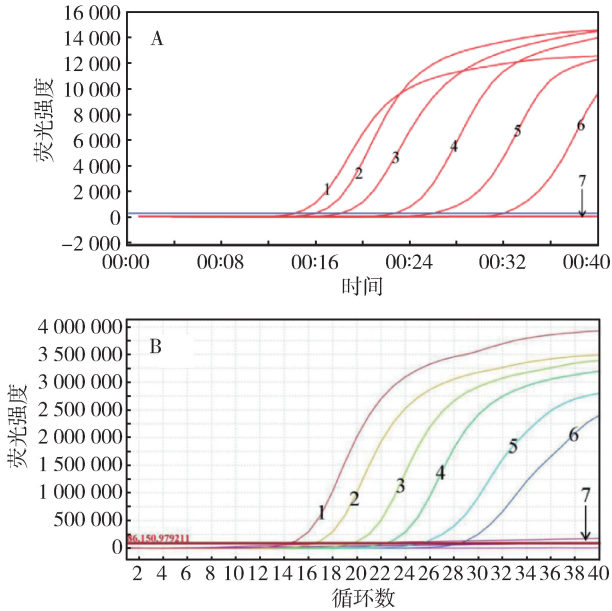
图 5 ASFV 实时荧光 LAMP 特异性验证

Fig 5 Specificity of ASFV real – time fluorescent LAMP

表 2 ASFV 实时荧光 LAMP 重复性验证

Tab 2 Repeatability of ASFV real – time fluorescent LAMP

DNA 含量 (copies/μL)	Ct 值	平均值	标准差	变异系数
1 × 10 ⁵	19.07	19.19	0.22	1.17%
	19			
	19.11			
	19.57			
1 × 10 ⁴	21.91	21.92	0.05	0.21%
	21.93			
	21.86			
	21.99			
1 × 10 ³	24.26	24.63	0.46	1.88%
	24.1			
	24.92			
	25.23			
1 × 10 ²	27.97	27.51	1.17	4.25%
	25.97			
	26.98			
	29.12			
1 × 10 ¹	32.64	31.2	1.55	4.98%
	32.44			
	30.97			
	28.75			



A:便携式 MA – 1610 型等温荧光 PCR 仪;B:ABI QuantStudio 7 荧光定量 PCR 仪;

1 ~ 6:1 × 10⁶ ~ 1 × 10¹ copies/μL;7:阴性对照

A: Portable isothermal fluorescence PCR(MA – 1610) ;

B: ABI QuantStudio 7;

1 ~ 6:1 × 10⁶ ~ 1 × 10¹ copies/μL;7: Negative control

图 6 ASFV 实时荧光 LAMP 方法不同仪器适用性验证

Fig 6 Verification for the applicability of ASFV real – time fluorescent LAMP in different PCR instruments

2.7 临床样品检测 采用本研究建立的 ASFV 实时荧光 LAMP 方法和标准方法 qPCR 同时对 70 份临床样品进行 ASFV 检测。结果(表 3)显示,LAMP 方法检测出 4 份血液样品、9 份脾脏样品检测阳性,其余样品均为阴性,与标准方法 qPCR 检测结果一致,符合率为 100%。

表 3 实时荧光 LAMP 和 qPCR 临床样品检测结果
Tab 3 Parallel test results between real-time
fluorescent LAMP and qPCR for clinical samples

样品类型	数量	结果	
		Real-time LAMP	qPCR
饲料	20	0/20	0/20
血液	30	4/30	4/30
脾脏	20	9/20	9/20

3 讨论与结论

自 2018 年 10 月我国暴发首例非洲猪瘟疫情以来,迅速蔓延至全国,给我国生猪养殖造成非常严重的损失。因此非洲猪瘟的现场快速诊断对于该病的发现、传播和控制具有重要的意义。LAMP 恒温快速检测技术能够针对保守区域设计 4-6 对引物,在 60~65℃ 恒温条件下 40~60 min 即可完成检测,具有方便、快捷、准确等优点,广泛用于细菌、寄生虫、病毒的现场快速检测。目前 LAMP 检测结果的判定主要有浊度法、钙黄绿素目视法、琼脂糖凝胶电泳法以及免疫层析法等,但浊度法对仪器设备要求高、钙黄绿素目视法对弱阳样品存在人为误判且成本高、琼脂糖凝胶电泳和免疫层析反应管开盖极易造成环境污染,造成 LAMP 检测技术难以在临床应用推广。Than Linh Quyen 等研究发现 SYTO9 作为一种激发波长和发射波长与 FAM 相近的 DNA 荧光染料(激发波长为 485 nm、发射波长为 498 nm),其具有信噪比高、灵敏度高、对扩增反应无抑制作用等优点,可用于 LAMP 扩增反应过程中的实时监控,有助于提高 LAMP 检测的准确性以及减少气溶胶污染^[15]。

因此,本研究针对非洲猪瘟病毒 P72 基因保守区域设计特异性 LAMP 检测引物,包括 2 条内引

物、2 条外引物和 1 条环引物,并对反应温度、时间等反应条件进行优化,同时通过在反应体系中添加适量的 SYTO9 荧光染料,建立了非洲猪瘟病毒 SYTO9 实时荧光 LAMP 快速检测方法。本方法反应时间短,在 63℃ 恒温条件下反应 40 min 即可完成扩增反应,最快 15~20 min 就能检测到 ASFV;灵敏度高,最低检测限为 10 copies/μL;特异性良好,PRV、CSFV、PRRSV、PEDV 等病毒不发生非特异性扩增;重复性好,变异系数均小于 5%;符合率高,与农业农村部推荐的荧光定量 PCR 方法符合率为 100%;适用仪器较广,不仅适用于等温荧光 PCR 仪,同时也适用于各种常规荧光定量 PCR 仪器。

综上所述,本研究建立的基于 SYTO9 荧光染料的非洲猪瘟病毒实时荧光 LAMP 快速检测方法具有反应快速(40 min)、灵敏度高、特异性强、重复性好、符合率高、操作简便、不易污染、适用仪器广等优势,可用于非洲猪瘟现场快速鉴别诊断,为非洲猪瘟现场应急检测和防控提供了一种新方法,更适合基层推广应用。

参考文献:

[1] Galindo I, Alonso C. African swine fever virus: a review[J]. Viruses, 2017, 9(5): 103.

[2] Bao J, Wang Q, Lin P, et al. Genome comparison of African swine fever virus China/2018/Anhui XCGQ strain and related European p72 Genotype II strains[J]. Transboundary and emerging diseases, 2019, 66(3): 1167-1176.

[3] Wang N, Zhao D, Wang J, et al. Architecture of African swine fever virus and implications for viral assembly[J]. Science, 2019, 366(6465): 640-644.

[4] 姜睿姣,张鹏飞,朱光恒,等. 非洲猪瘟检测技术进展[J]. 病毒学报, 2019, 35(03): 523-532.

Jiang R J, Zhang P F, Zhu G H, et al. Diagnostic Assays for African Swine Fever[J]. Chinese Journal of Virology, 2019, 35(03): 523-532.

[5] Wu X, Xiao L, Lin H, et al. Development and application of a droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) for detection and investigation of African swine fever virus[J]. Canadian Journal of Veterinary Research, 2018, 82(1): 70-74.

[6] Miao F, Zhang J, Li N, et al. Rapid and sensitive Recombinase

- polymerase amplification combined with lateral flow strip for detecting African swine fever virus[J]. *Frontiers in microbiology*, 2019, 10.
- [7] O'Donnell V K, Grau F R, Mayr G A, *et al.* Rapid Sequence – Based Characterization of African Swine Fever Virus by Use of the Oxford Nanopore MinION Sequence Sensing Device and a Companion Analysis Software Tool[J]. *Journal of clinical microbiology*, 2019, 58(1).
- [8] Kurata S, Kanagawa T, Yamada K, *et al.* Fluorescent quenching – based quantitative detection of specific DNA/RNA using a BODIPY® FL – labeled probe or primer [J]. *Nucleic acids research*, 2001, 29(6): e34 – e34.
- [9] Martineau R L, Murray S A, Ci S, *et al.* Improved performance of loop – mediated isothermal amplification assays via swarm priming[J]. *Analytical chemistry*, 2017, 89(1): 625 – 632.
- [10] Lim D R, Kim H R, Park M J, *et al.* An improved reverse transcription loop – mediated isothermal amplification assay for sensitive and specific detection of serotype O foot – and – mouth disease virus[J]. *Journal of virological methods*, 2018, 260: 6 – 13.
- [11] Yoshida H, Sakoda Y, Endo M, *et al.* Evaluation of the reverse transcription loop – mediated isothermal amplification (RT – LAMP) as a screening method for the detection of influenza viruses in the fecal materials of water birds[J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2011, 73(6): 753 – 758.
- [12] 姜辰龙, 严秀文, 张日腾, 等. 猪圆环病毒 3 型 LAMP 检测方法的建立与应用[J]. *畜牧兽医学报*, 2018, 49(6): 1314 – 1319.
- Jiang C L, Yan X W, Zhang R T, *et al.* Establishment and Application of LAMP Method for Detection of Porcine Circovirus Type 3 [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnia Sinica*, 2018, 49(6): 1314 – 1319.
- [13] Huang P, Wang H, Cao Z, *et al.* A rapid and specific assay for the detection of MERS – CoV [J]. *Frontiers in microbiology*, 2018, 9: 1101.
- [14] Cao Z, Wang H, Wang L, *et al.* Visual detection of west Nile virus using reverse transcription loop – mediated isothermal amplification combined with a vertical flow visualization strip [J]. *Frontiers in microbiology*, 2016, 7: 554.
- [15] Quyen T L, Ngo T A, Bang D D, *et al.* Classification of Multiple DNA Dyes Based on Inhibition Effects on Real – Time Loop – Mediated Isothermal Amplification (LAMP): Prospect for Point of Care Setting[J]. *Frontiers in microbiology*, 2019, 10: 2234. .

(编辑:陈希)