doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.03.01

小鹅瘟病毒荧光 RPA 恒温快速检测方法的建立与应用

高 远[1],徐龙涛[2],冯宗玲[3],曲光刚[4],李本科[5*]

(1.荣成市畜牧业发展中心,山东荣成 264399;2.齐鲁动物保健品有限公司,济南 250100;3.滨州市科技创新发展研究院,山东滨州 256600;4.山东省滨州畜牧兽医研究院,山东滨州 256600;5.滨州市农业技术推广中心,山东滨州 256600)

[收稿日期] 2021-10-12　[文献标识码]A　[文章编号]1002-1280(2022)03-0001-10　[中图分类号]S852.65

[摘　要]　为快速检测小鹅瘟病毒,以小鹅瘟病毒 VP3 基因保守片段为靶点,利用重组酶聚合酶扩增技术(RPA)建立了一种准确高效的小鹅瘟病毒 RPA 恒温快速检测方法,对检测方法的灵敏度、特异性进行评价,并与传统 PCR 和 Real-time PCR 方法进行比较。结果表明,该检测方法可检测到 10 copies/μL 的病毒核酸,具有较高的灵敏度;只特异性地扩增小鹅瘟病毒,而与鹅副黏病毒、鹅源鸭瘟病毒、小鹅流行性感冒病毒、鹅副伤寒病毒、大肠杆菌和曲霉菌均未发生交叉反应,特异性良好;变异系数低于 6%,具有很好的重复性;临床样品检测中与 Real-time PCR 符合率为 99%。该方法可以很好地应用于小鹅瘟的大规模临床样本检测,为小鹅瘟病毒的高通量检测和流行病学调查提供技术手段。

[关键词]　小鹅瘟病毒;重组酶聚合酶扩增技术(RPA);恒温快速检测

Rapid Detection of Goose Parvovirus Based on Isothermal Recombinase Polymerase Amplification Assay

GAO Yuan[1], XU Long-tao[2], FENG Zong-ling[3], QU Guang-gang[4], LI Ben-ke[5*]

(1. *Animal Husbandry Development Center of Rongcheng City*, *Rongcheng*, *Shandong* 264399, *China*; 2. *Qilu Animal Health Products Co., LTD.*, *Jinan* 250100, *China*; 3. *Binzhou Institute of Science and Technology Innovation and Development*, *Binzhou*, *Shandong* 256600, *China*; 4. *Shandong Binzhou Animal Science and Veterinary Medicine Academy*, *Binzhou*, *Shandong* 256600, *China*; 5. *Binzhou Agricultural Technology Extension Center*, *Binzhou*, *Shandong* 256600, *China*)

Corresponding author: *LI Ben-ke*, *E-mail*: *bzvacenter@163.com*

Abstract: Based on the recombinase polymerase amplification (RPA) technology, and the conserved fragment of VP3 gene as the target, an accurate and efficient constant temperature method for detecting goose parvovirus was

基金项目:山东省重点研发计划(重大科技创新工程)项目(2019 JZZY010720)

作者简介:高 远,本科,从事动物防疫研究;徐龙涛,本科,从事兽用生物制品研究。二人为共同第一作者。

通讯作者:李本科。E-mail:bzvacenter@163.com

established. The sensitivity and specificity of the detection method were evaluated and compared with traditional PCR and Real - time PCR. Results showed that the method was highly sensitive with a detection limit of 10 copies/μL of viral nucleic acid. This method also exhibited a good specificity without any cross reaction with goose paramyxovirus, goose distemper virus, gosling influenza virus, goose paratyphoid virus, *E. coli* and the coefficient of variation of this method was less than 6%, which indicated good repeatability. The test of clinical samples showed that the coincidence rate between this method and real - time PCR was 99%. This method can be applied to the detection of gosling disease in large scale clinical samples, and provide a novel method for the high throughput detection and epidemiological investigation of gosling disease virus.

Key words: goose parvovirus; recombinase polymerase amplification (RPA); isothermal and rapid detection

小鹅瘟是一种常见的水禽急性或亚急性败血性传染病,临床特征主要表现为厌食、渴欲增强、无力、不愿活动,常表现出摇头症状[1]。该病的发病病程短,传染性强,死亡率高,可高达 90% ~100%,但发病率和致死率随着雏鹅的日益长大而下降[2]。该病由小鹅瘟病毒(Goose parvovirus, GPV)引起。1956 年我国学者方定一在扬州首次发现并分离到第一株小鹅瘟病毒,1961 年他又用鹅胚分离到一株与鸡新城疫及鸭肝炎病毒无关的新病毒,并将该病命名为小鹅瘟,病原体称为小鹅瘟病毒[3]。此后许多国家都报道过该疾病,包括英国和瑞典等,对全球的养鹅业造成了严重危害和巨大的经济损失。GPV 主要感染雏鹅和番鸭,其它家禽能够天然抵抗该病毒的感染[4]。GPV 属于细小病毒科、细小病毒属,是一种无包膜的单链 DNA 病毒,基因组长度约为 5100 bp,包含两个开放阅读框(ORF):位于 5'端的 ORF1 编码参与病毒复制的非结构蛋白和调控蛋白,位于 3'端的 ORF2 编码结构蛋白 VP1、VP2 和 VP3。表面结构蛋白表现出病毒的遗传变异,编码这些结构蛋白的基因突变改变了病毒的免疫特性。由于 VP2 和 VP3 基因区域同时包含保守区和可变区而被专门用于检测病毒进化和遗传变异。

目前,GPV 的检测方法多种多样,主要包括病原学检测、血清学检测和分子生物学检测。病原学检测方法主要是病毒的分离鉴定[5],是检测小鹅瘟最经典和最准确的方法之一,但是该方法检测所需时间长,操作复杂,不满足小鹅瘟临床快速检测的需求。血清学检测主要包括琼脂免疫扩散试验[6]、病毒中和试验[7]、酶联免疫吸附试验[8]、反向间接血凝试验[9]、免疫荧光抗体法[10]、免疫过氧化物酶染技术[11]、对流免疫电泳法[12]和精子凝集抑制试验[13]等,但是上述方法均存在不同的缺点,或检测灵敏度低,或检测时间长,或操作复杂等。分子生物学检测主要有 PCR 检测、核酸探针技术、荧光定量 PCR 检测和环介导等温扩增(LAMP)等。2006 年,李福伟等[14]建立了检测 GPV 的 PCR 检测方法,并针对保守序列 VP3 设计了一对特异性引物,成功扩增出 GPV VP3 基因的目的片段,敏感性可达到8 pg。2005 年,布日额等[15]建立了另一种核酸探针方法,以 SCPD 为底物的化学发光的地高辛标记核酸探针检测 GPV,该方法特异性、敏感性和适用性都很强,但其技术性要求较强,操作繁琐,且检测成本较高,不适宜临床上的推广与应用。2010 年,龙朕等[16]根据 GPV 的保守序列 NS 基因建立了荧光 PCR 检测方法,结果表明,该方法具有良好的敏感性和特异性,但是该方法需要荧光定量 PCR 仪,不方便携带,不满足现场检测的需求。2012 年,金文杰等[17]建立了 LAMP 技术应用于 GPV 的快速诊断,缩短了检测时间,但是该方法不仅需要设计三对特异性引物,而且极易出现假阳性。

重组酶聚合酶扩增技术(Recombinase polymerase amplification, RPA)是 2006 年由英国科学家研发的一种核酸恒温扩增技术。它是利用多种酶参与,如

重组酶、单链结合蛋白、外链核酸酶 III 和链置换 DNA 聚合酶,在体外模拟生物体内 DNA 复制,恒温条件下短时间内实现靶基因大量扩增。重组酶与引物结合形成复合物,在双链 DNA 中寻找同源序列,一旦定位到同源序列,就会发生链交换反应,形成并启动 DNA 合成,模板上的靶区进行指数级扩增,被取代的 DNA 链与单链结合蛋白结合,防止进一步的替代。RPA 技术自 2006 年首次引入我国便受到了广泛关注,随后出现了大量关于该技术的研究,近年来取得显著进展[18-19]。RPA 技术可在 37~42 ℃恒温条件下快速扩增,DNA 扩增到可检测水平所需的时间取决于样品的 DNA 拷贝数,结果一般可以在 20 min 内观察到。RPA 检测对样品制备要求低,具有恒温、快速、便携、灵敏度高、特异性强和操作简单等优点[20],是目前有望替代 PCR 技术的核酸等温扩增方法,具有广阔的应用前景。本研究以 VP3 基因为目的基因建立了检测 GPV 的 RPA 恒温快速检测方法。

1　材料与方法

1.1　病毒核酸及临床样本　鹅副黏病毒、鹅源鸭瘟病毒、小鹅流行性感冒病毒、鹅副伤寒病毒、大肠杆菌、曲霉菌和 GPV 均保存于齐鲁动保实验室;小鹅瘟临床病料由山东养鹅厂提供。

1.2　GPV 标准质粒的构建　根据 GenBank 公布的 GPV 的全基因组序列,利用分子生物学软件 primer premier 5.0,针对 VP3 保守区域设计一对特异性引物(表 1)。引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。

表 1　GPV 扩增引物

Tab 1　Amplification primer of GPV

引物名称	基因序列(5′-3′)
GPV-F	5′CATGCCATGGCAGAGGGAGGAGGC 3′
GPV-R	5′CGGGATCCTTACAGATTTTGAGTTAGATATCTGGTTC 3′

根据设计的引物扩增出 1605 bp 的 VP3 片段,并构建重组质粒 GPV-VP3-18T,转化至 DH5α 大肠杆菌感受态细胞,经菌液 PCR 鉴定阳性菌株,使用质粒提取 Mini 试剂盒Ⅰ(OMEGA, USA)提取质粒DNA。用 NanoDrop-2000 分光光度计(NanoDrop, Wilmington, USA)定量质粒 DNA 的浓度,将重组质粒送上海生工测序鉴定。

1.3　荧光 RPA 恒温快速检测方法引物与探针的设计　根据 GenBank 收录的 GPV 的 VP3 序列,利用primer premier 5.0 软件,根据 RPA 引物设计原则,设计 GPV VP3 基因特异性的引物和探针(表 2),并由上海生物工程技术服务有限公司合成。

表 2　GPV 的 RPA 引物和探针

Tab 2　RPA primers and probes of GPV

引物和探针	序列(5'-3')
GPV-F1	CTCTGGAATTTCAATGAGGTAGACAGCAGC
GPV-F2	CATTCACAGGACTTAGACAGGCTGATGAAC
GPV-F3	TATGGCACCATGGGCCGCAATTGGCTGCCAAG
GPV-R1	TATCTGTTCCGCCTGTATAGGCCCTAACTC
GPV-R2	AGTAGCTGATACAGGTCCGGGTTGCAGGAG
GPV-probe	AAAGGCGCTTATGGCACCATGGGCCGCAAT[FAM-dT]G[THF]C[BHQ1-dT]GCCAGGACCTAAATTC-3 spacer

1.4　核酸的提取及反转录　使用 AXYGEN 试剂盒(AXYGEN,美国)提取 GPV、鹅副黏病毒、鹅源鸭瘟病毒、小鹅流行性感冒病毒、鹅副伤寒病毒的核酸,用 20 μL 无核酸酶水洗脱病毒中的核酸,使用 NanoDrop-2000 分光光度计测定病毒核酸的浓度。使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(康为世纪,中国)提取大肠杆菌和曲霉菌的基因组 DNA。所有核酸样品提取完成后,-20 ℃保存备用。

采用反转录试剂盒 TransScript® Ⅱ One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 去除基因

组 DNA 并合成鹅副黏病毒与小鹅流行性感冒病毒 cDNA。在 Rase Free Microtube 管中加入 7.0 μL 模板 RNA、1.0 μL 下游引物、1.0 μL TransScript®Ⅱ RT/RI Enzyme Mix、1.0 μL gDNA Remover、10.0 μL 2×TSⅡ Reaction Mix 配制溶液。混合液在 50 ℃孵育 30 min后,85 ℃加热 5 s。得到的 cDNA 溶液于 -20 ℃保存备用。

1.5　荧光 RPA 恒温扩增方法的建立　荧光 RPA 恒温扩增方法反应体系为:溶解剂 10 μL,上游引物 1 μL,下游引物 1 μL,探针 0.3 μL,激活剂 1 μL,模板 1 μL,加入去离子水至 25 μL;最佳反应条件为:40 ℃条件下反应 20 min。除激活剂和模板外,其余以混合溶液的形式加入含有冻干粉的 0.2 mL EP 管中,涡旋混合离心。将核酸加到反应管中,将激活剂加到反应管盖上。上下颠倒混合后,瞬时离心;离心后,荧光值由恒温荧光检测仪读取,每 30 s 监测一次荧光值。以重组质粒 GPV - VP3 - 18T 为模板,以 RNase 游离水为阴性对照,对该方法的引物浓度、反应温度和反应时间等条件进行优化,具体操作如下:利用同一探针,上下游引物采用3 个浓度梯度(0.6 μmol/L、0.8 μmol/L、1 μmol/L),确定最佳引物浓度;利用最佳引物浓度采用 3 个反应梯度温度(38 ℃、40 ℃、42 ℃),确定该方法的最佳反应温度。荧光值由恒温荧光检测仪读取,每 30 s 监测一次荧光值。恒温荧光检测仪检测结果为阳性且出现标准 S 型曲线判为检测出阳性结果。

1.6　RPA 的敏感性和特异性测定　为测定建立的荧光 RPA 检测方法的敏感性,将已构建的重组质粒 DNA 进行连续的 10 倍稀释,作为荧光 RPA 检测方法敏感性试验的标准品。每个稀释浓度的标准品加入 1 μL 作为反应模板进行 RPA 反应扩增以确定该方法的最低检测拷贝数。同时,以鹅常见疾病不同病原体基因组 DNA 或 RNA 作为模板分析该荧光 RPA 检测方法的特异性。采用优化后的方法分别对鹅副黏病毒 cDNA、鹅源鸭瘟病毒 DNA、小鹅流行性感冒病毒cDNA、鹅副伤寒病毒 DNA、大肠杆菌 DNA 和曲霉菌 DNA 进行检测,以 GPV 的阳性样品为阳性对照,以无菌水作为阴性对照,根据检测结果确定该方法的特异性。

1.7　RPA 的重复性测定　分别以浓度为 1×10^3、1×10^2、1×10^1 copies/μL 的 GPV - VP3 - 18T 标准质粒为模板进行 RPA 扩增,每个稀释度重复三次,根据其 Ct 值计算变异系数,评价该方法的重复性。

1.8　RPA、PCR 和 Real - time PCR 的敏感性比较　对已建立的 GPV PCR[21] 和 GPV Real - time PCR[22] 检测方法与本研究建立的 GPV RPA 检测方法进行敏感性比较。使用 AXYGEN 试剂盒提取 GPV 的基因组 DNA 并将提取的核酸进行 10 倍倍比稀释作为模板,同时用 PCR、Real - time PCR 和 RPA 三种检测方法进行检测,比较三种方法的检测敏感度。

1.9　临床病料的检测　从山东省不同的养殖场或农户采集了 100 份疑似组织、血液和体液样本,使用AXYGEN 试剂盒提取核酸,采用本研究建立的 RPA 方法和 Real - time PCR 方法进行检测,分析两种方法的符合率。

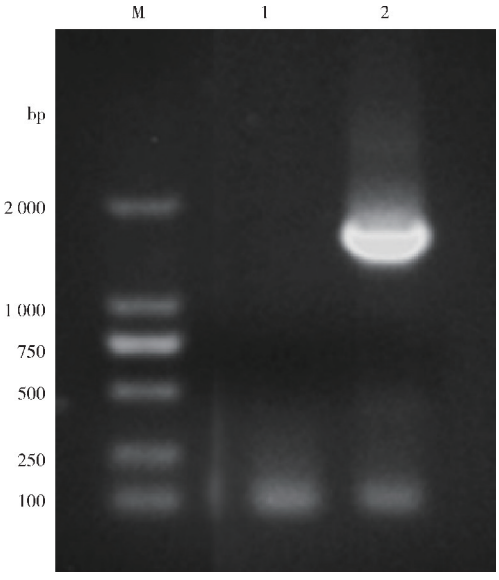
2　结果与分析

2.1　GPV VP3 基因 PCR 扩增　通过 PCR 方法扩增靶标基因 VP3,PCR 产物进行凝胶电泳成像(图 1),结果表明本研究成功扩增出 GPV VP3 目的条带,目的片段大小约为 1605 bp,与预期大小一致。

2.2　菌液 PCR 鉴定结果　挑取单菌落过夜培养后进行菌液 PCR 鉴定,泳道 6 的阴性结果成立,泳道1 - 5 的结果为 GPV 阳性(图 2),根据结果将检测为阳性菌液的样本进行质粒提取并测序。测序结果显示 5 个阳性质粒插入片段均为目的基因,表明 VP3 基因标准质粒构建成功。

2.3　引物的筛选　所有设计的 GPV 引物组合均有 S 型的扩增曲线,其中 GPV - F1 和 GPV - R1 组合所得的荧光值为 4000,Ct 值为 7.0(图 3),均为最佳,故确定最佳引物组合为GPV - F1和 GPV - R1。

2.4　引物浓度优化　测试引物浓度分别为 0.6 μmol/L、0.8 μmol/L、1 μmol/L,其中引物浓度为 1 μmol/L 时出峰时间最早,且其荧光值最高(图 4),故最佳引物浓度选择 1 μmol/L。

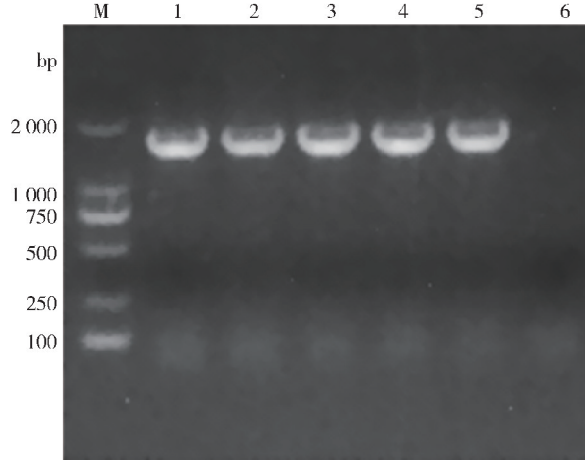


M:DL-2000 DNA 分子质量标准;1:阴性对照;2:PCR 扩增产物

M: DL-2000 DNA Marker; 1: Negative control; 2: PCR products

图 1　GPV VP3 基因 PCR 扩增结果

Fig 1　Agarose gel electrophoresis of the GPV-VP3 PCR products



M:DL-2000 DNA 分子质量标准;1-5:菌液样品;6:阴性对照

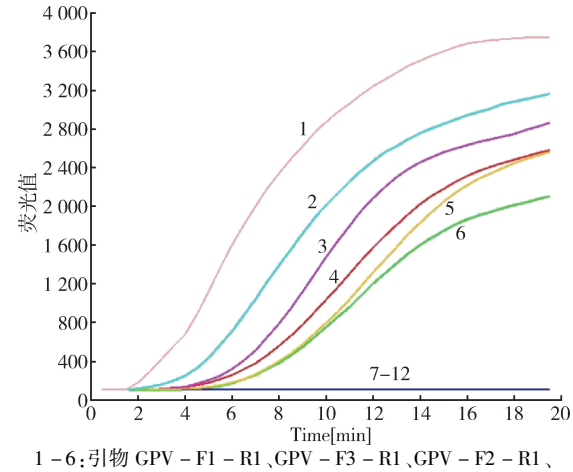
M: DL-2000 DNA Marker; 1-5: PCR products of randomly picked colonies; 6: Negative control

图 2　菌液 PCR 鉴定结果

Fig 2　PCR identification results of recombinant bacteria

2.5　反应温度优化　GPV RPA 方法采用的反应温度分别为 38 ℃、40 ℃、42 ℃,其中 40 ℃出峰时间最早,Ct 值为 6.0,其荧光值最高,为 4500(图 5),故最佳反应温度确定为 40 ℃。

2.6　敏感性和特异性试验结果　GPV RPA 检测方法只扩增出 GPV 核酸,其他病毒或细菌的核酸均为阴性,无交叉反应,说明该方法具有很好的特异性(图 6)。GPV 荧光 RPA 检测方法最低能够检测到 10 copies/μL 的标准质粒(图 7)。



1-6:引物 GPV-F1-R1、GPV-F3-R1、GPV-F2-R1、GPV-F1-R2、GPV-F2-R2、GPV-F3-R2;

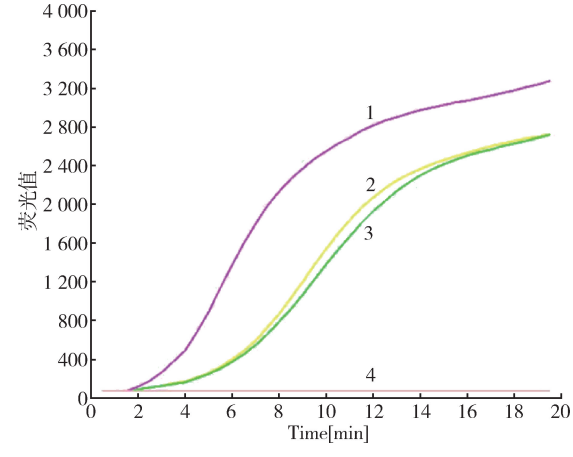
7-12:引物阴性对照 GPV-F1-R1、GPV-F1-R2、GPV-F2-R1、GPV-F2-R2、GPV-F3-R1、GPV-F3-R2

1-6:Primers GPV-F1-R1、GPV-F3-R1、GPV-F2-R1、GPV-F1-R2、GPV-F2-R2、GPV-F3-R2;

7-12:Negative control of primers GPV-F1-R1、GPV-F1-R2、GPV-F2-R1、GPV-F2-R2、GPV-F3-R1、GPV-F3-R2

图 3　不同引物的扩增结果

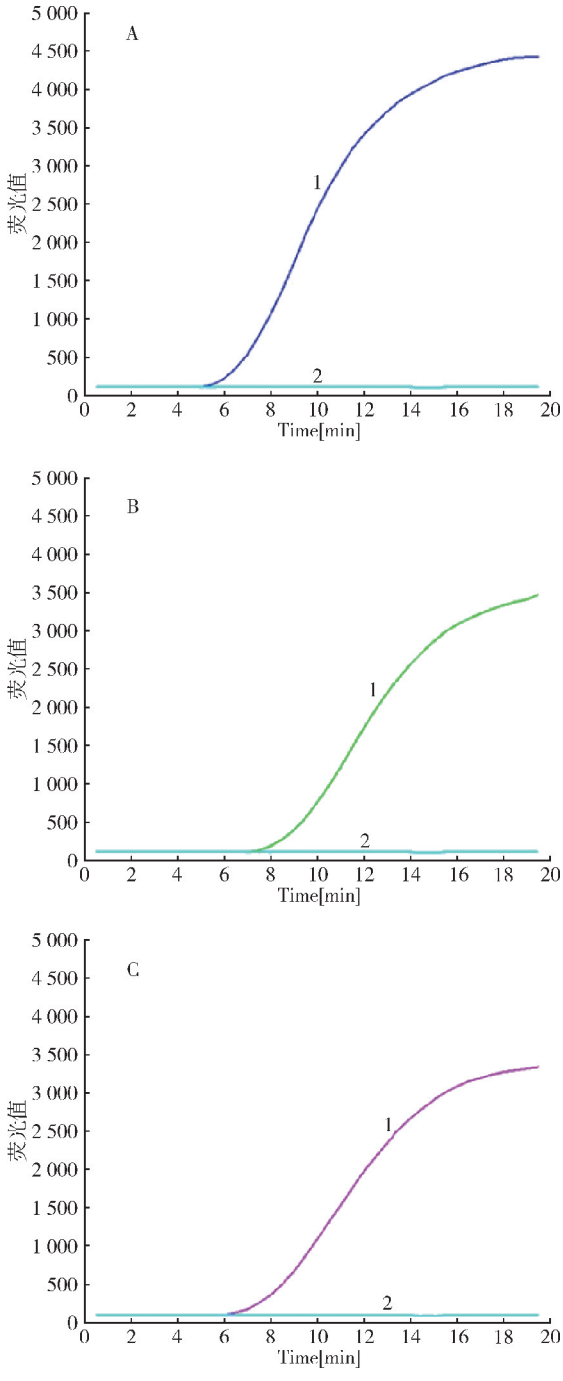
Fig 3　Amplification results of different primers



1: 1 μmol/L primers; 2: 0.8 μmol/L primers; 3: 0.6 μmol/L primers; 4: Negative control

图 4　不同浓度引物的扩增结果

Fig 4　Amplification results of different concentration primer



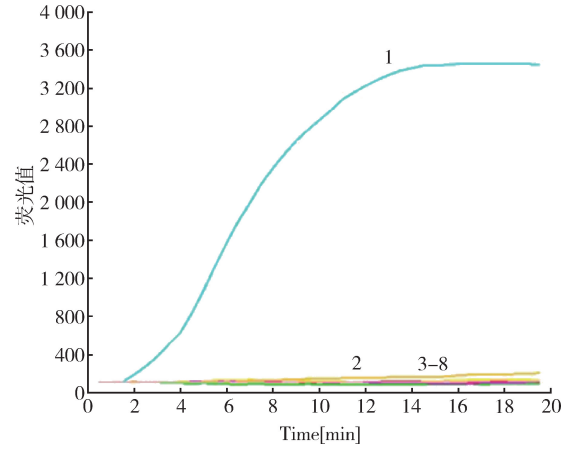
A：38 ℃；B：40 ℃；C：42 ℃

1：Positive control；2：Negative control

图 5　不同反应温度的扩增结果

Fig 5　Amplification results of different reaction temperature

2.7　重复性实验结果　以三种不同拷贝数的标准质粒为模板进行三次重复实验来验证该方法的重复性，拷贝数为 1000 copies/μL 时，Ct 值为 7.3、7.3、8.0，变异系数为 5.36%，荧光值为 4600、4500、4500，重复性良好（图 8A）；拷贝数为 100 copies/μL 时，Ct 值为 9.3、9.3、9.0，变异系数为 1.88%，荧光值为 4000、3900、3850，重复性良好（图 8B）；拷贝数为 10 copies/μL时 Ct 值为 10.0、10.0、10.3，变异系数为 1.71%，荧光值为 2600、2700、2500，重复性良好（图 8C）。结果表明该方法重复性良好。

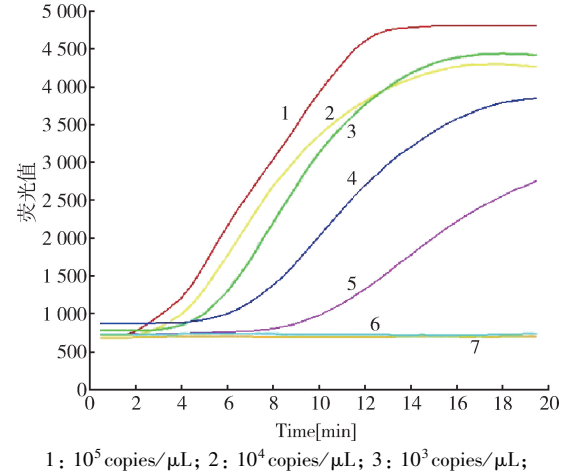


1：GPV 病毒；2：阴性对照 3：鹅副黏病毒；4：鹅源鸭瘟病毒；5：小鹅流行性感冒病毒；6：鹅副伤寒病毒；7：大肠杆菌；8：曲霉菌

1：GPV；2：Negative control；3：goose paramyxo virus；4：goose distemper virus；5：gosling influenza virus；6：goose paratyphoid virus；7：*E. coli*；8：aspergillus

图 6　GPV 荧光 RPA 检测方法特异性实验结果

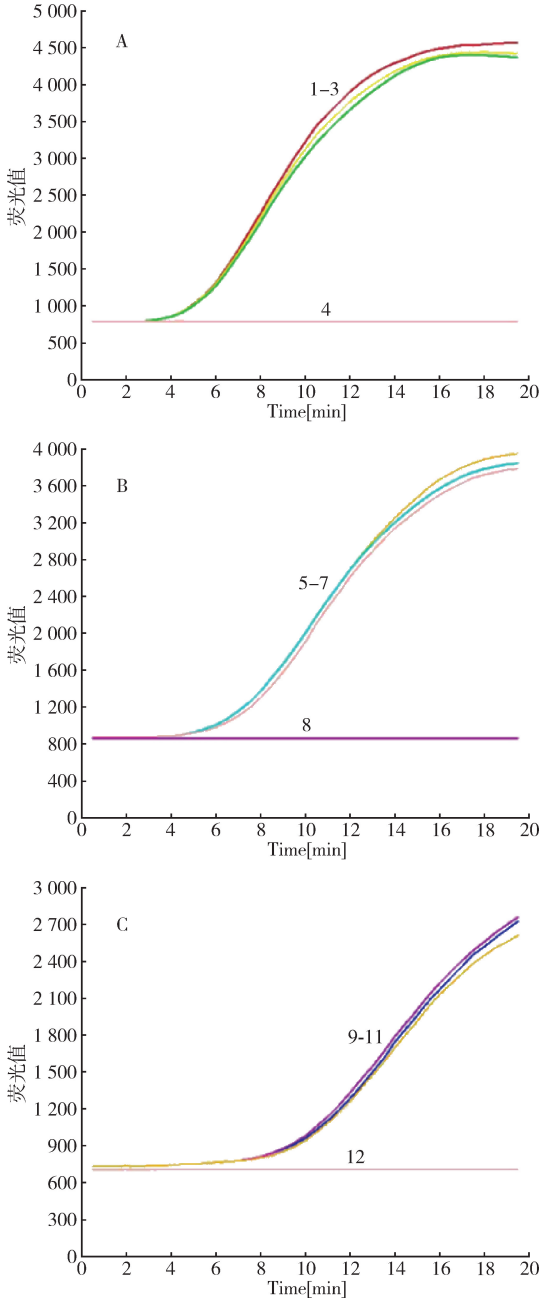
Fig 6　The specificity assay result of GPV fluorwscence RPA detection method



1：10^5 copies/μL；2：10^4 copies/μL；3：10^3 copies/μL；4：10^2 copies/μL；5：10^1 copies/μL；6：10^0 copies/μL；7：Negative control

图 7　GPV 荧光 RPA 检测方法敏感性实验结果

Fig 7　Sensitivity results of GPV EXO RPA detection method



A:模板拷贝数为 1000 copies/μL;

B:模板拷贝数为 100 copies/μL;

C:模板拷贝数为 10 copies/μL

1 -3:阳性模板;4:阴性对照;5 -7:阳性模板;

8:阴性对照;9 -11:阳性模板;12:阴性对照

A: 1000 copies/μL; B: 100 copies/μL; C: 10 copies/μL

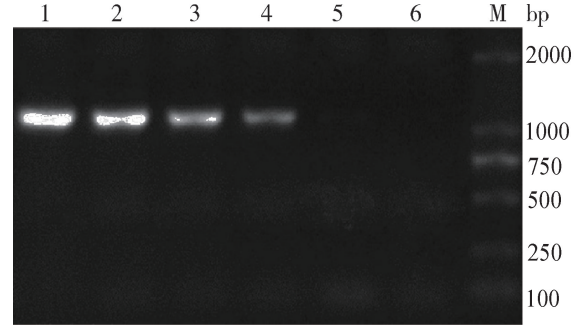
1 -3: Positive control; 4: Negative control; 5 -7: Positive control;

8: Negative control; 9 -11: Positive control; 12: Negative control

图 8　GPV 荧光 RPA 检测方法重复性实验

Fig 8　The repeated assay result of GPV fluorescence RPA detection method

2.8　RPA、PCR 和 Real - time PCR 的敏感性比对实验结果　按照已建立的检测条件,用相同稀释倍数的核酸作为模板同时利用 PCR、Real - time PCR 和 RPA 三种方法进行检测。其中,PCR 检测方法能够检测到的核酸稀释倍数为 10^3(图 9),Real - time PCR 检测方法能够检测到的核酸稀释倍数为 10^5(图 10),而 RPA 检测方法能够检测到的核酸稀释倍数为 10^4(图 11)。



1:10^0稀释;2:10^1稀释;3:10^2稀释;4:10^3稀释;

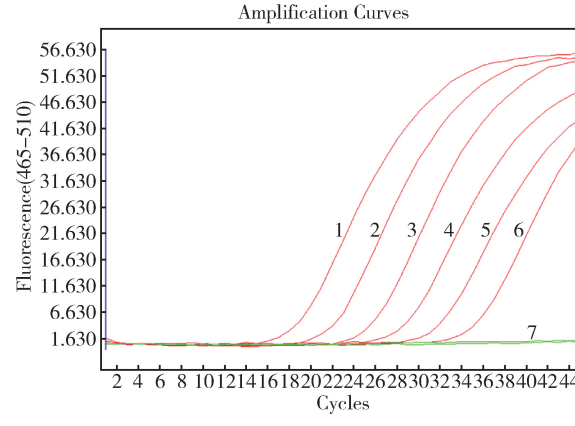
5:10^4稀释;6:10^5稀释;M:DL - 2000 DNA Marker

1: 10^0 dilution; 2: 10^1 dilution; 3: 10^2 dilution; 4: 10^3 dilution;

5: 10^4 dilution; 6: 10^5 dilution; M: DL2000 DNA Marker

图 9　GPV PCR 检测方法的敏感性结果

Fig 9　Sensitivity result of GPV PCR detection method



1:10^0稀释;2:10^1稀释;3:10^2稀释;4:10^3稀释;

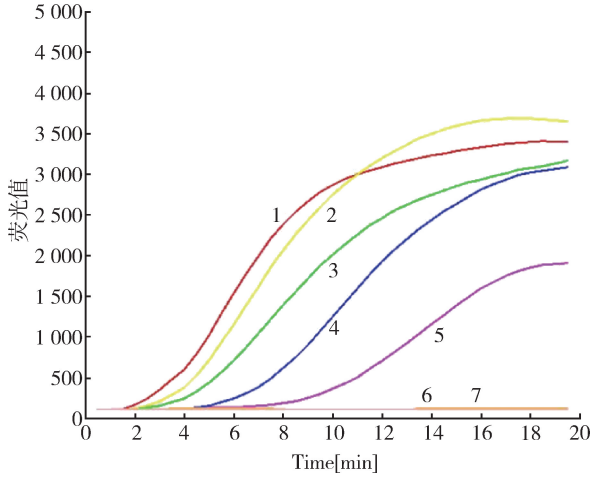
5:10^4稀释;6:10^5稀释;7:阴性对照

1: 10^0 dilution; 2: 10^1 dilution; 3: 10^2 dilution; 4: 10^3 dilution;

5: 10^4 dilution; 6: 10^5 dilution; 7: Negative control

图 10　GPV 荧光定量 PCR 检测方法的敏感性结果

Fig 10　Sensitivity result of GPV real - time fluorescence quantitative PCR detection method



1:10^0稀释;2:10^1稀释;3:10^2稀释;4:10^3稀释;
5:10^4稀释;6:10^5稀释;7:阴性对照

1: 10^0 dilution; 2: 10^1 dilution; 3: 10^2 dilution; 4: 10^3 dilution;
5: 10^4 dilution; 6: 10^5 dilution; 7: Negative control

图 11　GPV RPA 恒温快速检测方法的敏感性结果

Fig 11　Sensitivity result of GPV fluorescence RPA detection method

2.9　临床病料的检测结果　对收集到的 100 个临床疑似样本同时采用已建立的 RPA 方法和 Real－time PCR进行检测,结果见表 3,两种方法的符合率为 99%。

表 3　GPV RPA 与 Real－time PCR 方法临床样本检测符合性试验结果

Tab 3　Clinical sample test by GPV RPA and Real－time PCR

GPV RPA	Real－time PCR		总计	符合率
	阳性	阴性		
阳性	34	0	34	
阴性	1	65	66	99%
总计	35	65	100	

3　讨　论

GPV 主要感染各种鹅、番鸭和莫斯科鸭,该病毒对幼鹅致死率可达 100%,对大日龄鹅呈亚临床感染从而传染给幼鹅,给养鹅行业造成巨大损失。因此,GPV 的快速诊断是预防和控制该病的重要前提。本研究采用了一种基于 EXO 探针的 RPA 检测方法来检测 GPV,可以在 40 ℃恒温条件下20 min 内完成检测,检测限可达 10 copies/μL,仅可检测 GPV,变异系数低于 6%,具有良好的特异性和重复性;与 Real－time PCR 方法的符合率达到 99%。

根据已报道的 GPV PCR[21] 和 Real－time PCR[22] 检测方法,比较了 RPA 与该两种方法的敏感性。结果表明,RPA 的敏感性比 PCR 高 10 倍,但比 Real－time PCR 低 10 倍(图 9－图 11)。与环介导等温扩增(LAMP)[17] 检测方法检测 GPV 相比,LAMP 检测需要 3 对引物、更高的温度(62 ℃)和更长的运行时间,而 RPA 检测方法仅需要一对引物和一个探针,因此,该方法更简单,所需时间更短。

本研究建立的 GPV RPA 方法有以下优点:首先,RPA 试剂以冻干粉的形式制备,室温下可保存 12 周而不失去活性,与其他试剂相比,RPA 试剂稳定。其次,RPA 快速检测方法在恒温条件下进行,不需要昂贵的热循环器,成本更低。第三,合成的 RPA 引物和探针可容许有 5～9 个错配,对实验性能没有影响,而 Real－time PCR 错配会导致探针失效或失去灵敏度。第四,PRA 反应对常见的 PCR 抑制剂有一定的耐受性,从而保证了反应的稳定性。

本研究成功建立了一种 GPV 的 RPA 恒温检测方法,对 GPV 现场检测试剂盒的开发具有重要意义。

参考文献:

[1]　陈晓宏, 王本宏. 小鹅瘟的发病原理与检测方法[J]. 现代畜牧科技, 2016, 4(06): 178.
Chen X H, Wang B H. The pathogenesis and detection of Gosling plague[J]. Modern Animal Husbandry Science & Technology, 2016, 4(06): 178.

[2]　庄金秋, 梅建国, 莫 玲, 等. 小鹅瘟病毒实验室检测方法研究进展[J]. 水禽世界, 2014, 4(05): 40－44.
Zhuang J Q, Mei J G, Mo L, *et al*. Progress in laboratory

detection of Gosling plague virus[J]. ShuiQin ShiJie, 2014, 4(05): 40 – 44

[3] 张淑莹, 阮洪玲, 文双云, 等. 小鹅瘟诊断技术研究进展[J]. 吉林畜牧兽医, 2020, 41(06): 7 – 8.
Zhang S Y, Luan H L, Wen S Y, *et al*. Advances in diagnostic techniques of Gosling plague [J]. Jilin Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2020, 41(06): 7 – 8.

[4] 付 薇, 潘 杰, 龙剑明, 等. 小鹅瘟病毒荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2008, 4(06): 30 – 31.
Fu W, Pan J, Long J M, *et al*. Real – time Quantitative PCR assay for detection of Gosling Plague Virus[J]. Shanghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2008, 4(06): 30 – 31.

[5] Kontrimavichus L M, Makogon V F, and Navrotkii V V. Epidemiological, clinical and pathological features of goose viral enteritis [J]. Vet Moscow, 1980, 7: 34 – 35.

[6] 霍 峰, 惠观涛. 应用琼脂扩散法检测小鹅瘟抗原抗体[J]. 中国兽医杂志, 2000, 4(02):21 – 22.
Huo F, Hui G T. Detection of gosling parvo virus antibodies by agar gel diffusion method [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2020, 4(02): 21 – 22.

[7] 赵 坤, 张慧辉. 鹅细小病毒感染的诊断与治疗[J]. 动物科学与动物医学, 2000, 4(02): 44.
Zhao K, Zhang H H. Diagnosis and treatment of Gosling parvo virus infection [J]. Animal Science and Veterinary Medicine, 2020, 4(02): 44.

[8] 朱少漩. 抗小鹅瘟病毒单克隆抗体及其在防治上的初步应用[J]. 江苏农学院学报, 1989(10): 3 – 5.
Zhu S X. Monoclonal antibodies against goose parvovirus and preliminary application in preventing and treating of gosling plague [J]. Journal of Jiangsu Agricultural College, 1989(10): 3 – 5.

[9] 徐为燕, 周阳生. 小鹅瘟病毒反向间接血球凝集试验的初步报告[J]. 畜牧兽医学报, 1981, 4(01): 23 – 26.
Xu W Y, Zhou Y S. A preliminary report on the reverse indirect hemagglutination test of the gosling pest virus [J]. Acta Veterinaria Et Zootechnica Sinica, 1981, 4(01): 23 – 26.

[10] 潘玉民, 董玉平, 石全瑞, 等. 小鹅瘟免疫荧光诊断方法的研究[J]. 中国兽医科技, 1990, 4(10): 8 – 12.
Pan Y M, Dong Y P, Shi Q R, *et al*. Study on immuno-fluorescence diagnosis of gosling plague[J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 1990, 4(10): 8 – 12.

[11] Roszkowski J, Gazdziński P, Kozaczyński W, *et al*. Application of the immunoperoxidase technique FDR the detection of Derzsy's disease virus antigen in cell culture and goslings [J]. Avian Pathology, 1982, 11(4): 571 – 578.

[12] 谢曼琳, 何月英, 林建军, 等. 用对流电泳试验检测小鹅瘟病毒[J]. 养禽与禽病防治, 1993, 4(02): 43 – 44.
Xie M L, He Y Y, Lin J J, *et al*. Determination of gosling plague virus by convection electrophoresis [J]. Poultry Husbandry and Disease Control, 1993, 4(02): 43 – 44.

[13] 盛佩良, 邹叔和, 刘道泉, 等. 雏番鸭小鹅瘟的诊断[J]. 畜牧与兽医, 1990, 4(01): 4 – 6.
Sheng P L, Zou S H, Liu D Q, *et al*. Diagnosis of goslings plague in Muscovy duck [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 1990, 4(01): 4 – 6.

[14] 李福伟, 张桂红, 吴玄光. 小鹅瘟的 PCR 诊断方法的建立[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2006, 4(06): 63 – 64.
Li F W, Zhang G H, Wu X G. Establishment of PCR diagnostic method for gosling plague [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary, 2006, 4(06): 63 – 64.

[15] 布日额, 王君伟, 吴金花, 等. 用地高辛标记核酸探针检测鹅细小病毒的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2004, 4(01): 102 – 105.
Bu R E, Wang J W, Wu j h, *et al*. Study on digoxigenin – labeled nucleic acid probe for detection of goose parvovirus [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2004, 4(01): 102 – 105.

[16] 龙 朕, 林 颖, 张桐源, 等. 小鹅瘟病毒荧光 PCR 检测方法的建立[J]. 现代畜牧兽医, 2010, 4(05): 51 – 54.
Long Z, Lin Y, Zhang T Y, Sheng M W, *et al*. Establishment and application of FL – PCR to detect goose parvovirus virus [J]. Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2010, 4(05): 51 – 54.

[17] 金文杰, 秦爱建, 钟 蕾, 等. 小鹅瘟病毒 LAMP 检测试剂盒及其检测方法 LAMP 专利[P]. 中国: CN101591713, 2009 – 05 – 25.
Jin W J, Qin A J, Zhong L, *et al*. Gosling plague virus LAMP

detection kit and its detection method LAMP patent [J]. China: CN101591713, 2009 - 05 - 25.

[18] Piepenburg, O, Williams C H, Stemple D, *et al*. DNA detection using recombination proteins[J]. PLoS Biol, 2006, 4(7): 204.

[19] Matthew H, Matt R, Daniel W, *et al*. Primed RPA: Primer design for recombinase polymerase amplification assays [J]. Bioinformatics, 2019, (4):682 - 684.

[20] Daher R K, Gale S, Maurice B, *et al*. Recombinase polymerase amplification for diagnostic applications [J]. Clinical Chemistry, 2016, 62(7): 947.

[21] 童艳梅, 李娴妍, 陈义旺, 等. 小鹅瘟病毒 PCR 检测条件的优化[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018, 4(15): 139 - 141.
Tong Y M, Li X Y, Chen Y W, *et al*. Optimization of PCR detection conditions for gosling plague virus [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2018, 4(15): 139 - 141.

[22] 李天芝, 于新友, 李书光, 等. 小鹅瘟病毒 SYBR Green Ⅰ荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 广东畜牧兽医科技, 2015, 40(03): 33 - 35, 38.
Li T Z, Yu X Y, Li S G, *et al*. SYBR Green Ⅰ real - time quantitative PCR assay for detection of gosling plague virus [J]. Guangdong Journal of Animal and Veterinary Science, 2015, 40(03): 33 - 35, 38.

(编 辑:李文平)