

猪流行性腹泻病毒冻干 qLAMP 检测体系的建立

欧泽娜, 陈洵, 万锈琳, 石磊

(暨南大学食品安全与营养研究院, 广东广州 510632)

摘要: 为建立猪流行性腹泻病毒 (Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV) 实时荧光定量 LAMP (Quantitative LAMP, qLAMP) 与冻干技术结合的快速检测方法。该实验根据 PEDV 的高度保守序列设计了引物并进行筛选, 建立 PEDV 的 qLAMP 检测方法。筛选棉子糖、甘露醇和牛血清蛋白作为冻干辅料并优化, 将最佳的配方与等温扩增试剂 (除甜菜碱) 混合后进行冷冻干燥处理。优化主干燥升温方式和二次干燥时间, 制作出一条适合等温扩增试剂的冻干曲线, 并以此制备 PEDV qLAMP 冻干检测试剂盒。结果显示: 通过对冻干成品性状、溶解性及剩余水分含量的测定, 确定了主干燥后期采用一步升温的方式进行升温, 解析干燥时间为 3.5 h。PEDV qLAMP 冻干检测体系的最低检测限为每微升 157 copies, 与工艺优化前相比, 其检测速率得到提升。对猪瘟病毒、猪伪狂犬病毒等 5 种病原无扩增反应, 重复性实验变异系数均小于 5%, 常温条件下保存 30 d, 在 4 °C 条件下至少保存 12 个月。该研究通过使用冻干技术建立了 LAMP 检测方法, 具有现场操作简便快捷、检测效果好、储存时间长, 适用于基层现场快速检测。

关键词: 猪流行性腹泻病毒; 环介导等温扩增; 冷冻干燥

文章编号: 1673-9078(2023)03-306-312

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.3.0337

Establishment of A Freeze-dried qLAMP Detection System for Porcine Epidemic Diarrhea Virus

OU Zena, CHEN Xun, WAN Xiulin, SHI Lei

(Food Safety and Nutrition Research Institute, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: To establish a rapid detection method for Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) using real-time quantitative LAMP (qLAMP) combined with freeze-drying technique, primers were designed and screened according to the highly conserved sequence of PEDV, then a qLAMP detection method for PEDV was established in this work. Raffinose, mannitol and bovine serum albumin were used as the lyophilized excipients and subjected to optimization, then the optimal formulation was mixed with isothermal amplification reagents (except betaine) for freeze-drying. The main dry heating method and the secondary drying time were optimized, and a freeze-drying curve suitable for isothermal amplification reagents was established, then the lyophilized PEDV qLAMP kit was prepared. The results showed that: through the determination of the properties, solubility and residual moisture content of the freeze-dried product, an one-step heating approach was adopted in the later stage of the main drying process, with the desorption drying time being 3.5 h. The lower detection limit of the PEDV qLAMP freeze-drying detection system was 157 copies/ μ L, and the detection rate was improved compared with that before the process optimization. There was no amplification reaction to 5 pathogens including swine fever virus and porcine pseudorabies virus, with the coefficient of variation of repeatability experiments smaller than 5%. The kit can be stored at room temperature for about 30 days and at 4 °C for at least 12 months. In this study, the qLAMP detection method was established through using freeze-drying technique. The method is simple, fast and effective for on-site operation and the kit has a long storage time, thus is suitable for rapid on-site detection in actual operation sites.

Key words: porcine epidemic diarrhea virus; loop-mediated isothermal amplification; freeze-drying

引文格式:

欧泽娜,陈洵,万锈琳,等.猪流行性腹泻病毒冻干 qLAMP 检测体系的建立[J].现代食品科技,2023,39(3):306-312.

OU Zena, CHEN Xun, WAN Xiulin, et al. Establishment of a freeze-dried qLAMP detection system for porcine epidemic diarrhea virus [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(3): 306-312.

收稿日期: 2022-03-24

基金项目: 国家重点研发计划畜禽养殖专项 (2016YFD0500600)

作者简介: 欧泽娜 (1996-), 女, 硕士, 研究方向: 食品安全快速检测技术, E-mail: 944573647@qq.com

通讯作者: 石磊 (1961-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全快速检测技术, E-mail: leishi@jnu.edu.cn

猪流行性腹泻 (Porcine Epidemic Diarrhea, PED) 是由猪流行性病毒 (Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV) 引起的急性肠道病, 不同阶段均可感染发病, 仔猪感染后病情严重且病死率极高^[1,2]。1971 年, 英国首次发现 PEDV 疫情^[3], 于 2010 年年底, 在我国华南地区大规模爆发, 随后迅速传播到我国其他养猪地区, 此次疫情给我国养猪业带来了极大的损失^[4]。生猪感染 PEDV 之后会进一步和大肠杆菌等病原体发生混合感染, 对生猪养殖造成一定威胁。PEDV 是一种寄生在脊髓动物的 RNA 病毒^[5], 具有多种重要的结构和功能蛋白, 在病毒感染过程中发挥着多种作用^[6,7]。研究表明, 核衣壳蛋白 (N) 作为一种抗原, 在 PEDV 感染早期, 就可诱导强烈的细胞免疫反应, 刺激机体产生免疫, 产生高水平的抗 N 蛋白抗体^[8], 因此可以利用此特点在 PEDV 早期感染建立快速准确的诊断方法。

环介导等温扩增 (Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP) 是一步扩增反应, 利用链置换 DNA 聚合酶识别六个独立的靶 DNA 内的区域并驱动靶标启动 DNA 合成^[9,10]。在 LAMP 反应体系中加入荧光染料可实现实时检测^[11]。但 LAMP 试剂中含有的酶、dNTP 等成分无法在相对高温的条件下稳定存在, 需要储存于 -20 °C 的环境中, 且试剂反复冻融对于试剂性能有一定的影响, 因此对于试剂的运输、储存及使用等过程有较高的要求。真空冷冻干燥, 是将溶液在低温条件下结晶, 由固态直接升华为气态的一种干燥过程, 最终去除水分并保留其他有效组分, 包括预冻、升华干燥和解析干燥三个过程^[12]。但在冷冻和干燥过程中, 体系中的酶可能会经受多种压力, 导致其生物活性的损失, 因此需要添加合适的稳定辅料。本研究基于 PEDV 的 N 蛋白设计引物并建立实时荧光环

介导等温扩增体系 (qLAMP), 通过添加合适的冷冻干燥辅料, 进行冷冻干燥, 实现简化步骤、降低成本、便于储存的目的, 为疾病的早期诊断提供有效途径, 实现生猪从养殖、屠宰、加工、运输到销售整个产业链的质量监控, 给猪肉食品的来源提供一定的安全保障。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验病毒株与样本

猪流行性腹泻病毒阳性样本由华南农业大学惠赠; 猪流行性腹泻病毒质粒由生工生物工程 (上海) 有限公司合成; 猪瘟病毒活疫苗、猪伪狂犬病活疫苗、猪繁殖与呼吸综合征活疫苗、猪败血性链球菌病活疫苗等购于广东永顺生物制药股份有限公司; 猪圆环病毒 2 型活疫苗 (LG 株) 购于哈尔滨维科生物技术开发公司。

1.1.2 实验试剂耗材

Bst DNA 聚合酶, 购自天根生物科技有限公司; SYTO-9 荧光染料, 购自 Life Technologies Corporation; 引物, 订自生工生物工程 (上海) 有限公司; 病毒总核酸快速抽提试剂盒 (R4410) 购自广州美基生物科技有限公司; HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 购自南京诺唯赞生物科技有限公司。

1.1.3 主要仪器设备

实时荧光 PCR 仪, 美国 ABI (Applied Biosystem) 公司; -80 °C 冰箱, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 漩涡混合器, 德国 IKA 公司; 掌上离心机, 北京索莱宝科技有限公司; 微量移液器 (2~1 000 μL), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

表 1 PEDV qLAMP 引物序列

Table 1 PEDV qLAMP primers sequence used in this study

| Group | Primer sequence (5'-3') |
|---------------|---|
| PEDV-N1-F3 | TCGAAGGAACGTGACCTCAA |
| PEDV-N1-B3 | CACGAACAGCCACATTACCA |
| PEDV-N1-FIP | CCGAAGCAAGCTGCTACGCTAGACATCCCAGAGTGGAGG |
| PEDV-N1-BIP | AAGGTGTTGATGCGTCAGGCTACCAAAGAGCAATGCTGCAAC |
| PEDV-N1-LoopF | ATTTTCGCCCTTGGGAATTCT |
| PEDV-N1-LoopB | CTCAGATCGCCAGTTTAGCAC |
| PEDV-N2-F3 | GCAATGGCAACAATAGGTC |
| PEDV-N2-B3 | GAATTCCTCCTCCACTCTGG |
| PEDV-N2-FIP | TTGACTGGTTCCTGTTATTGACTGGGTAATTCACAGAATCGTGGA |
| PEDV-N2-BIP | ACCGTGGTGGTGTAAACATCACGGCTTCTGCTGTTGCTTA |
| PEDV-N2-LoopF | TGCCTCCTCTGTTCTGAGA |
| PEDV-N2-LoopB | CTGGTGGCTGCTGTCAA |

1.2 试验方法

1.2.1 病毒核酸提取及引物的合成

病毒核酸按照广州美基生物科技有限公司的病毒总核酸快速抽提试剂盒、南京诺唯赞生物科技股份有限公司的 HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 说明书进行操作。针对猪流行性腹泻病毒核衣壳蛋白 N 基因组保守序列设计引物并从中筛出 2 套, 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 引物序列如表 1 所示。

1.2.2 qLAMP 反应体系的构建

参考等温扩增试剂盒 2×Isothermal Master Mix 的说明书, 配制 25 μL 的反应体系如下: RM 反应缓冲液 12.5 μL (含 SYTO-9 荧光染料)、引物混合液 1 μL (浓度比为:内引物:环引物:外引物=8:4:1)、*Bst* DNA 聚合酶 1 μL 、 ddH_2O /冻干辅料混合液 8.5 μL 、质粒模板 2 μL 。在实时荧光 PCR 仪上进行 61 $^\circ\text{C}$ 恒温扩增反应。

1.2.3 冻干辅料的筛选、优化及验证

选取常用的冻干保护辅料, 如棉子糖、甘露醇和

牛血清蛋白, 作为环介导等温扩增试剂的冻干保护剂配方。向等温扩增试剂(不含甜菜碱)中分别加入上述辅料, 以不添加任何辅料的等温扩增试剂作为对照。每种物质选择 3 种不同的浓度设计响应面试验, 将 17 种不同配方的混合试剂置于冻干机内进行冷冻干燥。将最优的辅料与 qLAMP 检测试剂(不含甜菜碱)混合冻干后, 观察冻干成品的外观及溶解性, 加入标准质粒和超纯水, 油封后进行扩增反应, 验证筛选的冻干辅料以及选用的冻干工艺对 qLAMP 检测体系的最低检出限的影响。

1.2.4 冻干曲线的优化

将最优的辅料与 qLAMP 检测试剂(不含甜菜碱)混合冻干后, 根据等温扩增试剂的共晶点调整冻干曲线, 主要针对主干燥过程中的升温方式(一步升温、梯度升温, 见图 1)、解析干燥中的干燥时间(3.5、6.5、9.5 h)进行优化。通过对冻干制品的性状、Ct 值(qLAMP 反应的荧光信号到达设定域值所经历的循环数)及剩余水分含量的测定, 优化出一条合适的 qLAMP 检测试剂的冻干曲线。

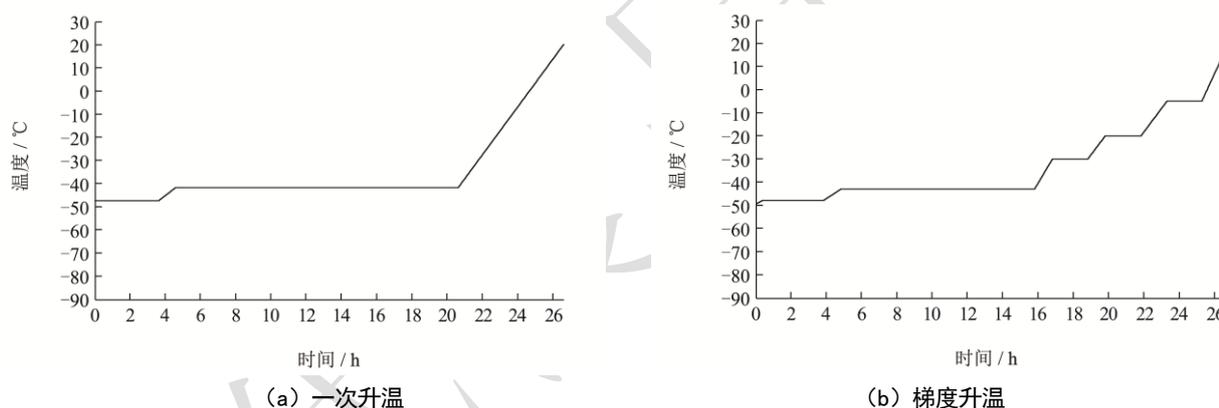


图 1 升华干燥的升温方式

Fig.1 Heating mode of main drying

1.2.5 检测性能及保存稳定性的评估

根据优化的冻干曲线进行冻干, 进行试剂检测性能及保存稳定性的评估, 主要包括: 冻干 qLAMP 检测试剂的最低检出限、特异性及批间重复性。最低检出限实验: 取冻干试剂成品, 复溶后以 1 $\text{fg}/\mu\text{L}$ 的低浓度 PEDV 质粒为模板, 设置 10 个重复。特异性: 分别对猪瘟疫病毒、猪伪狂犬病毒、猪败血性链球菌、猪圆环病毒 2 型、猪繁殖与呼吸综合征病毒的基因组 DNA/cDNA 进行检测, PEDV 阳性样本作为阳性对照, 扩增后分析扩增曲线以验证该方法的特异性。批间重复性: 将 3 个不同冻干批次的 qLAMP 固体试剂加水复溶后重复进行 3 次检测, 选取 1 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 和 10 $\text{fg}/\mu\text{L}$ 的 PEDV 阳性质粒作为模板, 通过样品的 Ct 值计算其变异系数, 来衡量该反应体系的重复性和稳定性,

以确定该方法的不同批次产品间的重复性。

将冻干试剂真空密封后, 平行保存在 4、25 和 37 $^\circ\text{C}$ 条件下, 之后依据一定的时间间隔取其中一份进行验证, 以 1 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 和 10 $\text{fg}/\mu\text{L}$ 的 PEDV 阳性质粒作为模板测定检出时间。

1.2.6 等温扩增冻干试剂盒的组装与使用方法

PEDV qLAMP 冻干检测试剂盒主要包括混合试剂冻干成品、超纯水、甜菜碱复溶液和标准阳性对照品溶液。现场使用时只需将甜菜碱复溶液加入试剂冻干品中溶解, 再加入标准阳性对照品和待测样品液, 同时用超纯水做空白对照, 加入石蜡油封盖, 置于实时荧光 PCR 仪上反应 40~50 min, 即可根据荧光曲线结果判定结果。

1.2.7 数据分析

稳定性实验的变异系数 CV 值的计算如公式 1。

$$CV = \frac{s}{\bar{a}} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

\bar{a} ——平均值;

s——标准差。

采用卡尔-费休库伦法测定冻干后的qLAMP检测试剂的剩余水分含量,利用水与Karl Fischer试剂进行化学反应。称量冻干样品装入进样口进行反应,经仪器计算,在显示屏上直接显示被测样品中水分的含量。经公式(2)换算后可以得出样品的水分含量。

$$X = \frac{M_1}{(M_2 - M_3) \times 100} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

X——样品中的水分含量, %;

M_1 ——电解样品的水分重量, μg ;

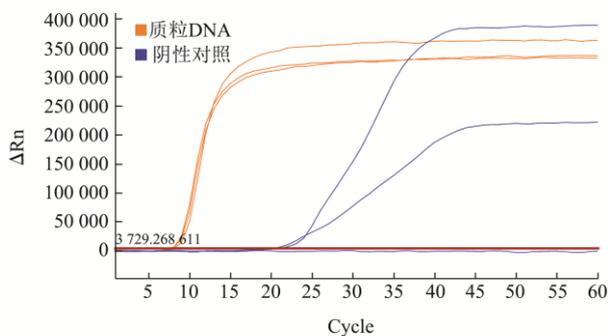
M_2 ——称量纸和样品的质量, mg;

M_3 ——称量纸的质量, mg。

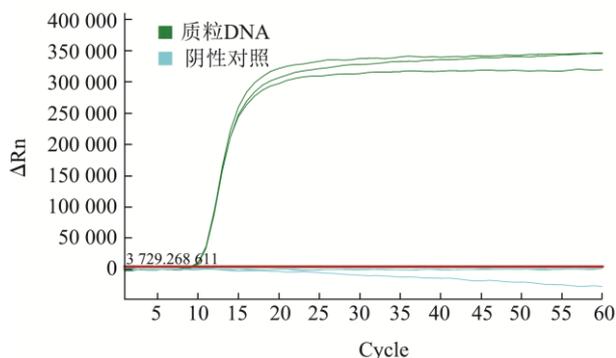
2 结果与讨论

2.1 结果

2.1.1 引物筛选结果



(a) 引物 PEDV-N1



(b) 引物 PEDV-N2

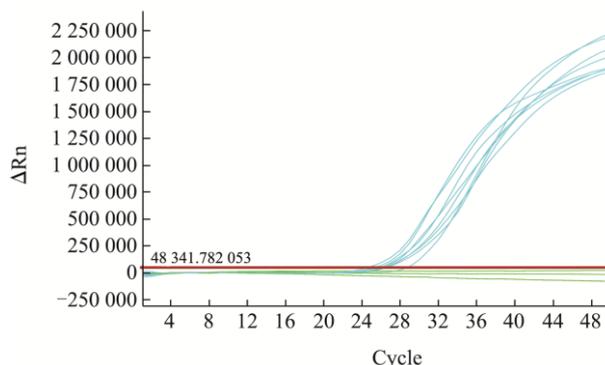
图2 PEDV引物筛选检测结果

Fig.2 PEDV primer screening test results

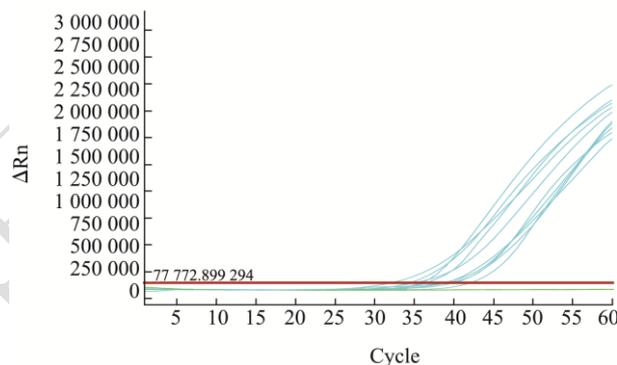
引物筛选结果如图2,两套引物和均有明显的扩

增反应发生,二者阳性样品均有出峰、扩增曲线呈“S”型,但阴性对照在20~25 min之间出现了明显的非特异性扩增,会在后续实验中干扰实验结果,因此选用第二套引物继续做后续分析。

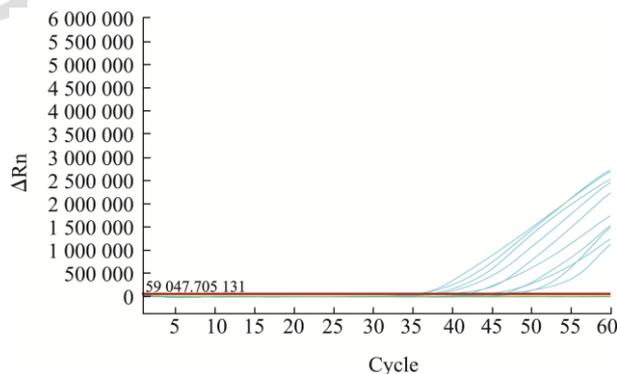
2.1.2 冻干辅料及冻干处理对检出限的影响



(a) 不加辅料不做冻干处理



(b) 加辅料后不做冻干处理



(c) 加辅料后做冻干处理

图3 qLAMP的最低检出限

Fig.3 The minimum detection limit of qLAMP

确定的最优的冻干辅料配方为棉子糖添加量为9.0%、甘露醇为3.0%、牛血清蛋白为1.5%。将冻干辅料与完整的qLAMP检测试剂(甜菜碱除外)进行冻干处理。冻干后体系外观较为饱满,加入甜菜碱溶液后复溶速度较快,经混匀离心之后的溶液澄清无悬浮物。qLAMP的最低检出限扩增结果如图3a所示,所建立的qLAMP体系(不加冻干辅料、不做冻干处理)的最低检出限为1 fg/ μL ,经换算为每微升

157 copies。加冻干辅料、不做冻干处理后混合试剂的检出时间延迟但在 40 min 内能完全检出, 见图 3b。加冻干辅料及做冻干处理后 1 fg/ μL 的质粒在 40 min 内未能完全检出, 见图 3c。因此后续仍需要对冻干工艺进行优化处理, 从而降低冷冻干燥工艺对体系的影响。

2.1.3 冻干曲线的优化

表 2 不同升温方式的 Ct 值及剩余水分含量

Table 2 Ct value and residual moisture content of different heating methods

| 组别 | 方法 | Ct 值 | 水分含量/% |
|----|------|-------|--------|
| A | 一步升温 | 19.80 | 2.44 |
| B | 梯度升温 | 21.45 | 2.30 |

表 3 不同解析干燥时间的 Ct 值及剩余水分含量

Table 3 Ct value and residual moisture content of different analytical drying time

| 组别 | 解析干燥时间/h | Ct 值 | 水分含量/% |
|----|----------|-------|--------|
| C | 3.5 | 20.25 | 0.84 |
| D | 6.5 | 20.16 | 0.69 |
| E | 9.5 | 20.25 | 0.59 |

表 4 不同冻干组别获得的冻干品的物理性状

Table 4 Physical properties of freeze-dried products obtained by different groups

| 组别 | 外观及复水效果 |
|----|-----------------------------|
| A | 整体外观圆滑, 加甜菜碱后迅速溶解, 复溶后澄清 |
| B | 部分管外观干裂, 加甜菜碱后也能迅速溶解, 复溶后澄清 |
| C | 部分管外观圆滑, 加甜菜碱后迅速溶解, 复溶后澄清 |
| D | 整体外观圆滑, 加甜菜碱后迅速溶解, 复溶后澄清 |
| E | 整体外观干裂、凹陷, 加甜菜碱后迅速溶解, 复溶后澄清 |

主干燥升温方式选择实验结果见表 2, 采用一步升温进行干燥 Ct 值较小, 这个处理方式对 *Bst* DNA 聚合酶的破坏更小, 剩余水分含量同样能保持在 2.5% 以下。两种方式所得样品表面均光滑, 采用梯度升温方式部分样品会出现萎缩, 但是总体符合冻干样品的质量要求 (表 4)。解析干燥实验结果如表 3 所示, 可以看出不同干燥时长的 Ct 值相差不大, 且剩余水分含量均能保持在 2% 以下。当解析干燥的干燥时间为 9.5 h 时, 冻干制品的表面出现干裂, 干燥时间为 3.5 h 和 6.5 h 时, 冻干产品外观较好, 加甜菜碱溶液后均能迅速溶解, 复溶后澄清 (表 4)。因此, 为减少整个冻干

表 5 PEDV qLAMP 冻干试剂盒的重复性

Table 5 Repeatability of PEDV qLAMP lyophilized kit

| 拷贝数/(fg/ μL) | 批内重复 Intra-assay | | | 批间重复 Inter-assay | | |
|--------------------------|------------------|------|-------|------------------|------|-------|
| | Ct 平均值 | SD | CV | Ct 平均值 | SD | CV |
| 10 | 30.15 | 0.34 | 1.13% | 30.23 | 0.23 | 0.77% |
| 10^3 | 24.43 | 0.30 | 1.23% | 25.03 | 0.66 | 2.62% |

周期的时长, 选择 3.5 h 作为最佳的解析干燥时长。将预冻、主干燥、解析干燥单个环节进行优化后, 得到最佳的 PEDV qLAMP 试剂的冻干周期 (32 h): 预冻 2 h, 主干燥 26.5 h, 解析干燥 3.5 h。

2.1.4 等温扩增冻干试剂盒的最低检出限

扩增结果如图 4, 优化后的 PEDV qLAMP 检测体系对猪流行性腹泻病毒的最低检出限为 1 fg/ μL , 在 40 min 内完全检出。对比冻干工艺优化前, 缩短了实时荧光 LAMP 检测猪流行性腹泻病毒的检出时间。

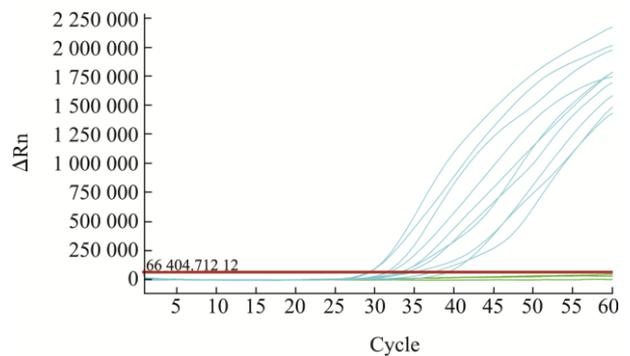


图 4 PEDV qLAMP 冻干试剂盒的最低检出限

Fig.4 Minimum detection limit for PEDV qLAMP lyophilized kit

2.1.5 等温扩增冻干试剂盒的特异性

扩增结果如图 5, 40 min 内, 建立的冻干 qLAMP 试剂盒能够检测出 PEDV 阳性样本, 对猪瘟病毒、猪伪狂犬病毒、猪败血性链球菌、猪圆环病毒 2 型、猪繁殖与呼吸综合征病毒等 5 种猪源性核酸均无扩增反应出现, 得出所建立的 PEDV 冻干 qLAMP 检测试剂具有良好的特异性。

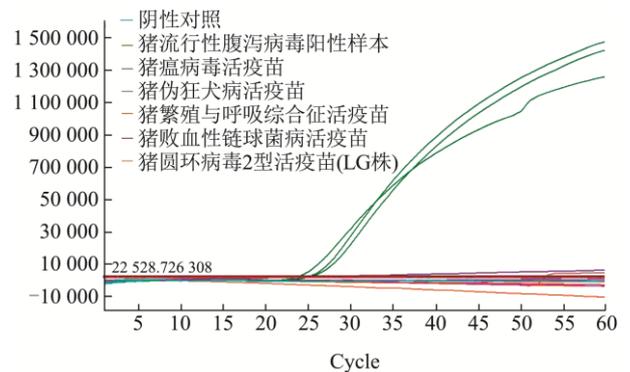


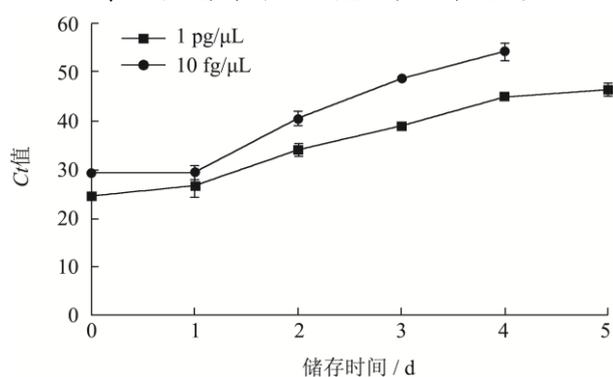
图 5 PEDV qLAMP 冻干试剂盒的特异性

Fig.5 Specificity of PEDV qLAMP lyophilized kit

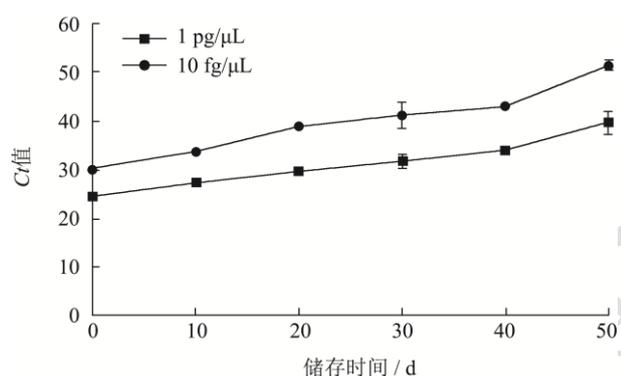
2.1.6 等温扩增冻干试剂盒的重复性

重复性结果如表 5 所示,可以看出每次结果的误差都比较小。批内重复性实验变异系数(CV)为 1.13%、1.23%;批间稳定性实验的 CV 为 0.77%、2.62%,二者 CV 均小于 5%、精密度好,说明本研究所建立的冻干 qLAMP 试剂的重复性及稳定性良好。

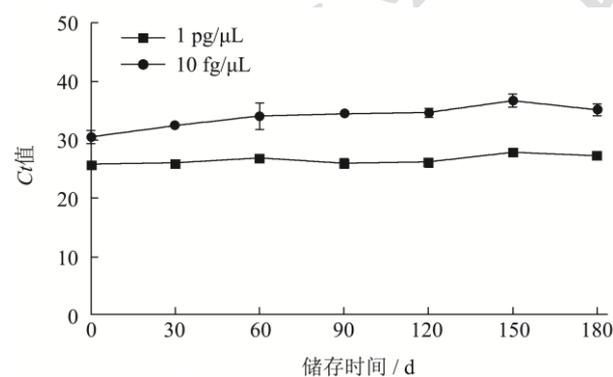
2.1.7 等温扩增冻干试剂盒的储存稳定性试验



(a) 37°C的保存效果



(b) 25°C的保存效果



(c) 4°C的保存效果

图 6 PEDV qLAMP 冻干试剂盒储存稳定性试验

Fig.6 Storage stability test of PEDV qLAMP lyophilized kit

PEDV qLAMP 冻干试剂盒在 37°C 加速破坏条件下的保存效果如图 6a, 3 d 内 10 fg/μL 的质粒能够在 50 min 内测出,而对于较高浓度的 1 pg/μL 质粒在第 5 天稳定测出。在室温(温度为 25°C)条件的保存效果如图 6b, 50 d 内 10 fg/μL 质粒能够在 50 min 内测出,而对于较高浓度的 1 pg/μL 质粒在 50 d 后能稳定

测出。在低温(温度为 4°C)条件的保存效果如图 6c, 6 个月后, 10 fg/μL 和 1 pg/μL 的质粒在 40 min 内稳定测出,冻干试剂整体外观圆滑,加水后迅速溶解,复水后澄清。在 37°C 储存 3 d、在室温贮存 30 d 后出现吸潮、溶解度下降的现象,在低温条件保存半年后效果稳定,性状与复溶解效果良好,质量较为稳定。由此判断,该试剂盒在高温加速破坏条件能保存 2~3 d,常温条件下保存 30 d,在 4°C 条件下至少保存 12 个月。

2.2 讨论

现阶段,分子生物学检测方法可实现快速鉴别诊断 PEDV 经典和变异毒株,但是普通 PCR、实时荧光 PCR、微滴式数字 PCR 方法需要专业人员操作和昂贵的机器,限制其应用到现场检测^[13]。qLAMP 技术作为一种新兴的检测方法,更适合基层快速检测应用^[14,15]。因试剂中含有的酶等成分无法在常温条件下运输、储存,研发一种简化现场操作步骤且能实现常温运输保存的检测试剂盒在猪流行性腹泻病毒防控中非常重要。冷冻干燥能够有效提高生物制品的稳定性,也为分子诊断试剂的长期保存提供了有效途径。例如,Wan 等^[16]组装了能够目测即食水果和蔬菜中沙门氏菌的 LAMP 试剂盒,冻干试剂在 4°C 下稳定 6 个月以上,在环境温度(24~30°C)下保存 3 d,仍保留足够的活性,而本研究所组装的试剂盒在常温条件下保存 30 d 左右,在 4°C 条件下保存 6 个月其检测性能变化不大,保存效果与其相当。Kumar 等^[17]研究冻干 LAMP 试剂盒,特异性良好,敏感性较冻干前有所下降。而本研究所组装的试剂盒在冻干工艺前后,其检测灵敏度没发生变化。实时荧光定量 PCR 检测重组质粒标准品的检测下限为每微升 10² copies^[18],本研究方法的 1 fg/μL 与其相当。本试剂盒在研究前期设计了一套液氮冻干系统直接冻干 qLAMP 试剂全组分,但因核算后,发现制作成本过高不利于产品的市面推广。通过对共晶点进行测定,发现甜菜碱对整个组分共晶点的影响较大,因此,我们将甜菜碱作为冻干后复溶液使用,从而减少了整个试剂盒的预算。该试剂盒在使用过程中只需要加入复溶液和核酸样本,即可上机检测,可有效的防止气溶胶污染。

3 结论

本研究针对 PEDV 的 N 蛋白设计特异性引物,成功建立起实时荧光 LAMP 检测方法通过筛选并优化冻干辅料添加量,得到最佳的添加辅料配方。通过优化冻干工艺,观察产品外观,剩余水分含量以及扩增反应的 Ct 值,确定主干燥后期采用一步升温方式进行

升温、解析干燥的时长为 3.5 h。在确定了完整的冻干周期后,建立起冻干 PEDV qLAMP 检测方法,可在 40 min 左右完成对猪流行性腹泻病毒的快速检测。冻干后体系外观饱满,加入甜菜碱溶液后快速复溶,经混匀离心之后的溶液澄清无悬浮物。该方法的最低检测浓度为 1 fg/ μ L,在冻干工艺前后,其检测灵敏度没发生变化。该试剂盒检测猪瘟病毒、猪伪狂犬病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪败血性链球菌、猪圆环病毒 2 型等 5 种猪源性核酸,结果均为阴性,说明其特异性良好,批内和批间重复性实验变异系数均小于 5%,说明本研究所建立的冻干 qLAMP 试剂的重复性及稳定性良好。在现场操作时只需要加入甜菜碱复溶液和样本核酸,即可上机检测。该试剂盒在 37 °C 下保存 2~3 d,室温条件下保存 30 d,在 4 °C 条件下至少保存 12 个月,且在操作方法上以及运输储存对比其他 PCR 方法都有明显优势。由此说明, PEDV qLAMP 冻干试剂盒将具有更加广阔的应用前景。

综上所述,本研究建立了利用真空冷冻干燥技术制备猪流行性腹泻病毒的 qAMP 检测体系的方法,通过不断的优化,初步解决了检测试剂常温储存和运输的问题,简化现场的操作步骤,缩短检测的时间,将为猪流行性腹泻的早期诊断、快速筛查及提供有效的诊断工具,对于我国猪流行性腹泻防控具有重要意义。

参考文献

- [1] Debouck P, Pensaert M. Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus, CV-777 [J]. American Journal of Veterinary Research, 1980, 41(2): 219-223.
- [2] Sun Jing, Li Qunjing, Shao Chunyan, et al. Isolation and characterization of Chinese porcine epidemic diarrhea virus with novel mutations and deletions in the S gene [J]. Veterinary Microbiology, 2018, 221: 81-89.
- [3] Pensaert M B, Bouck P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine [J]. Archives of Virology, 1978, 58(3): 243-247.
- [4] 霍金耀,陈陆,赵军,等.2010-2011 年华中地区猪流行性腹泻病毒流行毒遗传进化分析[A].中国畜牧兽医学动物传染病学分会.中国畜牧兽医学动物传染病学分会第十二次人兽共患病学术研讨会暨第六届第十四次教学专业委员会论文集[C].中国畜牧兽医学动物传染病学分会:中国畜牧兽医学,2012.
- [5] Jiang R, Scott R S, Hutt-Fletcher L M. Epstein-Barr virus shed in saliva is high in B-cell-tropic glycoprotein gp42 [J]. Journal of Virology, 2006, 80(14): 7281-7283.
- [6] Hu Yi, Xie Xiaohong, Yang Lingchen. A comprehensive view on the host factors and viral proteins associated with porcine epidemic diarrhea virus infection [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 762358.
- [7] Egberink H F, Ederveen J, Callebaut P, et al. Characterization of the structural proteins of porcine epizootic diarrhea virus, strain CV777 [J]. American Journal of Veterinary Research, 1988, 49(8): 1320-1324.
- [8] Saif L J. Coronavirus immunogens [J]. Veterinary Microbiology, 1993, 37(3-4): 285-297.
- [9] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): E63.
- [10] Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers [J]. Molecular and Cellular Probes, 2002, 16(3): 223-229.
- [11] Osorbin I P, Belousova E A, Zakabunin A I, et al. Comparison of fluorescent intercalating dyes for quantitative loop-mediated isothermal amplification (qLAMP) [J]. Biotechniques, 2016, 61(1): 20-25.
- [12] Getachew A, Edmundo B F, Jose M F. The Importance of understanding the freezing step and its impact on freeze-drying process performance [J]. Journal of pharmaceutical sciences, 2019, 108(4): 1378-1395.
- [13] 李天芝,于新友,梅建国,等.猪流行性腹泻病毒分子生物学检测方法研究进展[J].养猪,2016,5:81-84.
- [14] 吴迪,王林,栗云鹏,等.猪流行性腹泻病毒 RT-LAMP 检测方法的建立与应用[J].中国兽药杂志,2020,54(5):1-9.
- [15] Wang Y, Zhang D, Bai C X, et al. Using loop-mediated isothermal amplification for visual detection of porcine parvovirus 7 [J]. 3 Biotech, 2021, 11(2): 111.
- [16] Wan J J, Guo J P, Lu Z X, et al. Development of a test kit for visual loop-mediated isothermal amplification of Salmonella in spiked ready-to-eat fruits and vegetables [J]. Journal of Microbiological Methods, 2020, 169: 105830.
- [17] Kumar S, Sharma S, Bhardwaj N, et al. Advanced lyophilised loop mediated isothermal amplification (L-LAMP) based point of care technique for the detection of dengue virus [J]. Journal of Virological Methods, 2021, 293: 114168.
- [18] 冉伟,田宇,李梓健,等.基于 ORF3 基因检测猪流行性腹泻病毒荧光定量 RT-PCR 方法的建立与应用[J].中国预防兽医学报,2021,43(4):394-398.