

# 复可托产品及原料中 6 种猪病毒基因膜芯片检测方法研究

洪亮<sup>1</sup>, 王福云<sup>2</sup>, 潘映秋<sup>1</sup>, 卢敏<sup>1</sup>(1.台州市药品检验研究院, 浙江 台州 318000; 2.浙江丰安生物制药有限公司, 浙江 台州 318000)

**摘要:** 目的 利用基因膜芯片技术建立复可托产品及原料中 6 种猪病毒快速检测方法。方法 设计 6 种猪病毒特异性引物及探针, 对样本核酸进行多重 PCR 扩增, 进一步利用基因膜芯片技术进行产物杂交并分析判定。结果 建立的检测方法特异性强, 稳定性好, 灵敏度高, 综合检测限为  $1.0 \times 10^5$  copies·mL<sup>-1</sup>, 满足日常检验要求。结论 建立了 6 种猪病毒 PCR-基因膜芯片技术的快速筛查方法, 可保障复可托产品及原料的质量安全, 该技术可进一步应用于养殖场和市场的猪肉检测, 为政府监管部门提供有力的技术支持。

**关键词:** 复可托; 猪病毒; 基因膜芯片; 多重 PCR

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2022)23-3110-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.23.009

引用本文: 洪亮, 王福云, 潘映秋, 等. 复可托产品及原料中 6 种猪病毒基因膜芯片检测方法研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(23): 3110-3116.

## Study on Detection Method of Six Porcine Viruses in Fucotto Products and Raw Materials by Gene Membrane Chip

HONG Liang<sup>1</sup>, WANG Fuyun<sup>2</sup>, PAN Yingqiu<sup>1</sup>, LU Min<sup>1</sup>(1.Taizhou Institute for Drug Control, Taizhou 318000, China; 2.Zhejiang Feng'an Biopharmaceutical Co., Ltd., Taizhou 318000, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish a rapid detection method of six porcine viruses in fucotto products and raw materials by using gene membrane chip technology. **METHODS** Six specific primers and probes of porcine viruses were designed to amplify the sample nucleic acid by PCR, and the products were hybridized and analyzed by gene membrane chip technology. **RESULTS** The established detection method had strong specificity, good stability and high sensitivity. The comprehensive detection limit was  $1.0 \times 10^5$  copies·mL<sup>-1</sup>, which meet the requirements of daily inspection. **CONCLUSION** The rapid screening method of PCR gene membrane chip technology for six porcine viruses has been established, which can ensure the quality and safety of fucotto products and raw materials. This technology can be further applied to the detection of pork in farms and markets, and provide strong technical support for government regulators.

**KEYWORDS:** fucotto; porcine virus; gene membrane chip; multiplex PCR

复可托(脾氨肽口服冻干粉)是自新鲜猪脾提取得到的多肽及核苷酸类物质加甘露醇作赋形剂制成的冻干品。该药品为免疫调节剂, 能触发和增强机体细胞免疫功能, 促进机体免疫平衡, 主要受众为免疫力低下的婴幼儿、老年人及肿瘤患者等。复可托在新冠肺炎疫情中作为抗疫药品, 使用量大大增加。因其终产品不进行高温灭菌, 只通过透析和过滤方式(通过  $0.45 \mu\text{m}$  粗滤和  $0.22 \mu\text{m}$  除菌过滤)去除病原微生物, 所以有必要对去除效果进行安全性综合评估。产品出厂微生物检验执行中国药典 2020 年版四部无菌检查法, 对细菌和真菌进行控制<sup>[1]</sup>, 为帮助企业提高产品质量, 加强风险管控能力, 本研究选择合适的病毒, 对复可托产品建立常见病毒的精准检测平台, 以降低原料可能携带的人畜共患和常见猪病毒造成

产品污染的风险, 确保产品安全、可靠。笔者所在课题组调研了猪所携带的病原微生物的性质及其对人类的致病性, 根据动物疫病对猪和人类生产和健康的危害程度, 参照农业农村部发布的《一、二、三类动物疫病病种名录》和《人畜共患传染病名录》, 选择 6 种病原微生物(猪蓝耳病毒、经典猪瘟病毒、非洲猪瘟病毒、乙脑病毒、口蹄疫病毒、猪伪狂犬病毒)进行控制。

常见猪病毒性疾病的诊断方法包括传统病原学检测、免疫学检测及分子生物学检测。传统病原学检测包括病毒分离鉴定、电子显微镜检测等。这些方法虽具有技术成熟的优势, 但其固有的局限性, 比如检测时间长, 操作繁琐, 依赖检验人员的经验, 往往需要培养活病毒才能检测等。常见免疫学检测技术包括酶联免疫吸附法(ELISA)

基金项目: 台州市科技计划项目(20ywb109)

作者简介: 洪亮, 男, 副主任药师 E-mail: letgohl@163.com

和胶体金免疫技术,操作简单方便,经济实惠,但假阳性率高,无法进行定量检测,其灵敏度、特异性亟待加强以满足市场的高要求<sup>[2]</sup>。常见分子生物学检测方法有荧光定量 PCR(qPCR)技术、多重 PCR 技术、恒温扩增技术、基因芯片技术等。常规的 PCR 类方法能够分别检测多种猪病毒性疾病,但该类方法受技术本身限制,存在检测通量低、检测成本高、耗时长、核酸污染风险等问题。基因膜芯片检测技术是从多重 PCR 检测技术发展并完善的一种高通量核酸检测技术,是一种基于高分子材料膜的可视化基因芯片技术。该技术利用反向斑点杂交原理,将人工合成的碱基序列作为探针固定在硝酸纤维素膜或尼龙膜上,同时利用多对带生物素标记的引物对待测靶标基因进行扩增,如果待测物中含有与探针碱基互补的序列,当杂交时特定序列会被探针捕获,通过酶-底物显色,产生肉眼可辨的信号<sup>[3]</sup>。由于需要检测的病毒种类繁多,利用多重 PCR 结合基因膜芯片技术可有效提升检测效率,一次性检测数十种指标,从而克服普通 PCR 技术耗时长、效率低等局限。鉴于此,本研究在 PCR-基因膜芯片技术的基础上,建立 6 种猪病毒快速筛查方法,从而保障复可托产品的质量安全,进一步将其应用于养殖场和市场的猪肉检测,期望为政府监管部门提供有力的技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 病毒核酸样本及标准菌株** 口蹄疫病毒(批号:2021011)、猪蓝耳病毒(批号:2021011)、猪伪狂犬病毒(批号:2021011)、经典猪瘟病毒(批号:2020002)、乙脑病毒(批号:2021011)5 个核酸质控品购自邦德盛生物科技有限公司,为全长灭活病毒;非洲猪瘟阳性质粒(批号:20200930)购自北京亿森宝生物公司,经过测序确认序列正确无误;大肠埃希氏菌 O157:H7、单增李斯特氏菌、创伤弧菌、蜡样芽孢杆菌、肠道侵袭性大肠埃希氏菌、类志贺邻单胞菌、河流弧菌标准菌株均购自中国工业微生物菌种保藏中心,经鉴定确认后保存,菌种编号分别为 21530,21633,21615,21261,10662,10380,21612;表皮葡萄球菌、白色念珠菌均购买自美国模式培养物研究所 ATCC,经鉴定确认后保存,菌株编号为 26069,98001;猪圆环病毒、猪流感病毒由四川华汉三创生物科技有限

公司提供核酸,经测序确认后备用。

**1.1.2 试剂** 病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒(离心柱型,批号:W9719)、无酶水(批号:W9927)均购自天根生化科技(北京)有限公司;鲑鱼精 DNA 钠盐溶液(Amresco,批号:03650047);基因膜芯片试剂盒[四川华汉三创生物科技有限公司,批号:20210725,内含尼龙膜、去活化液、去活化清洗液、0.1%十二烷基硫酸钠、杂交清洗液、酶标孵育液(使用前将碱性磷酸酶标记的链霉亲和素按 1:2 000 的比例加至酶标孵育液中并轻轻摇晃混匀)、孵育清洗液 1、孵育清洗液 2、显色液(5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸和氯化硝基四氮唑兰)等];PCR 引物及探针[生工生物工程(上海)股份有限公司];SuperRT One Step RT-PCR Kit(江苏康为世纪,批号:23821);RT-PCR 法试剂盒:猪蓝耳病毒核酸检测试剂盒(批号:H20211220)、乙脑病毒核酸检测试剂盒(批号:H20211210)、口蹄疫病毒核酸检测试剂盒(批号:H20211210)均购自上海辉睿生物科技有限公司;猪瘟病毒核酸检测试剂盒(批号:21122508/2)、非洲猪瘟病毒核酸检测试剂盒(批号:21101750/2)、猪伪狂犬病毒核酸检测试剂盒(批号:21122507/2)均购自深圳生科原生物有限公司。

**1.1.3 仪器** ME204 分析天平(瑞士梅特勒公司);C1000 梯度 PCR 扩增仪、Universal Hood II 凝胶成像系统(美国伯乐公司);ViiA7 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);ST8R 低温高速冷冻离心机、NanoDrop One 超微量核酸蛋白测定仪(美国赛默飞公司);MFS-24 基因膜芯片检测工作站(四川华汉三创生物科技有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 PCR 引物及探针设计** 在序列分析及引物设计时,参考 GenBank、PubMed 等多个数据库中的信息序列,查找资料,在各病毒保守基因和特异性基因中进行研究筛选,分别选取猪蓝耳病毒的 *ORF7* 基因、经典猪瘟病毒的 5'-UTR 基因、非洲猪瘟病毒的 *VP72* 基因、乙脑病毒的 5'-UTR 基因、口蹄疫病毒的 3D 基因、猪伪狂犬病毒的 *gB* 基因作为各致病菌鉴定基因<sup>[4-9]</sup>,同时选择动物线粒体 *16S rRNA* 基因作为体系内参对照。引物和探针的设计由 Primer Premier 5.0、oligo 7 软件及 NCBI BLAST 在线设计结合完成,信息见表 1。选取不同的病毒核酸模板(所有模板的加入量保持一致)与对应候选引物组中的每对引物分别进行 PCR 扩

增检验引物扩增效率测试。PCR 产物经 1.5%~2% 的琼脂糖凝胶电泳, 目的条带送生工生物工程公司测序进行确认, 与目标基因一致。在试验过程中根据实际情况对加样体系和扩增程序进行调整, PCR 体系加样及扩增程序参照表 2~3, 单重体系测试时用单对引物替代表 2 中的混合引物 Mix, 其余组分不变。结果经 1.5%~2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 选择仅目的靶标有单一、清晰及规定浓度条带, 其余靶标模板无扩增的引物, 见图 1。再根据基因膜芯片杂交原理, 进行 5'-biotin 修饰, 合成, 探针 5'端以 NH<sub>2</sub>C6 修饰, 探针信息见表 1。

表 1 多重 PCR 引物、探针信息

Tab. 1 Multiplex PCR primer and probe information

名称	引物/探针序列(5'-3')
内参	上引 ACGACCTCGATGTTGGATCAG
	下引 bio-GGTCTGAACTCAGATCACGTAGG
	探针 NH <sub>2</sub> C6-AGGGTTCGTTTGTTCACGATTAATAGT
猪蓝耳病毒	上引 bio-AATTCATCACTTCCAGATGCCG
	下引 TGCCACCCAACACGAGGC
	探针 NH <sub>2</sub> C6-GGATGTACTTGGCGCCTAGCAAGCA
经典猪瘟病毒	上引 GTAGTTCGACGTGAGCAGGAG
	下引 bio-CAGCAGAGATTTTTATACTAGCCTGTAG
	探针 NH <sub>2</sub> C6-GGTACGACCTGATAGGGTGCTGCAGAGGCCAC
非洲猪瘟病毒	上引 bio-GAATACCAACCCAGCGGTCA
	下引 CAAGATCGGCCGTGGTGATA
	探针 NH <sub>2</sub> C6-TTCTCTTGCTCTGGATACGTTAATATGA
乙脑病毒	上引 bio-AAGCACAATCGGAGGGAAGG
	下引 GCCTCTCTTGCCACAATCCT
	探针 NH <sub>2</sub> C6-CATTCTCRTCCARGGTCCCTGGTTTTGTGTCC
口蹄疫病毒	上引 bio-CCGTGGGACCATACAGGAGA
	下引 CGTTCACCCATCGCAGGTAA
	探针 NH <sub>2</sub> C6-GGCGAGTCTGCCACRGAGATCAACTTC
猪伪狂犬病毒	上引 bio-GGCAAGTGCCTCCAAG
	下引 GGCGAAGGATCGTAGGG
	探针 NH <sub>2</sub> C6-GTCACCTTGTGGTTGTTGCGCACGTACTCG

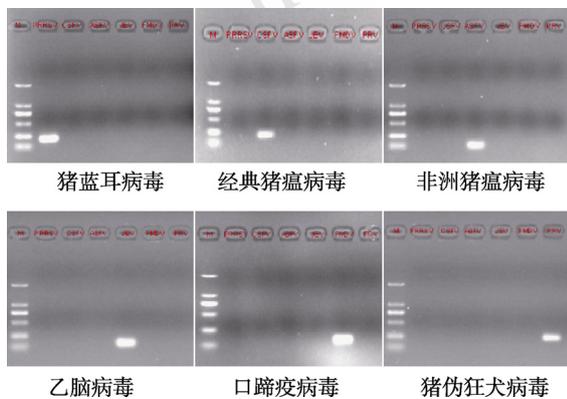


图 1 引物筛选凝胶电泳结果

Fig. 1 Gel electrophoresis results of primers

1.2.2 核酸提取 样本使用病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒(离心柱型)提取核酸, 提取后的 RNA 用无酶水进行梯度稀释, DNA 用实验室配制的 20 ng·μL<sup>-1</sup> 鲑鱼精 DNA 钠盐溶液进行梯度稀释。核酸经 Nanodrop One 检测质量浓度, A<sub>260 nm</sub>/A<sub>280 nm</sub> 为 1.6~2.2, 适宜后续使用。

1.2.3 PCR 扩增 以“1.2.2”项下提取的病毒阳性核酸为模板, 按表 2 依次加入多重 PCR 反应液、酶 Mix、多重 PCR 引物 Mix, 模板核酸 2~5 μL(100~200 ng), 最后用 ddH<sub>2</sub>O 补足 20 μL, 按表 3 的 PCR 扩增程序进行试验。多重 PCR 引物 Mix 先按每对引物 1:1 比例原则添加, 实际根据体系检测情况, 对各引物量或不同靶标的修饰与非修饰引物之间的量等进行微调, 以期反应效果达到最优。经多次实验摸索, 所有引物终浓度按照表 4 来配制多重 PCR 引物 Mix。扩增产物如>24 h 不使用, 则放置于-20 °C 冰箱中冻存, 以免降解。

表 2 PCR 加样体系

Tab. 2 PCR sample adding system

试剂名称	加入体积/μL	工作浓度
2×Multiplex RT-PCR Buffer	10	1×
Multi RT Enzyme Mix	0.4	-
混合引物 Mix/单对引物	0.4	单个引物 0.2~0.6 μmol·L <sup>-1</sup>
核酸模板	2~5	100~200 ng
RNase Free Water	补足至 20	-

表 3 PCR 扩增程序

Tab. 3 PCR amplification procedure

程序名称	温度/°C	时间	循环数
反转录/UNG 酶消化	45	30 min	1
变性	95	2 min	1
变性	94	30 s	38
退火	55	30 s	
延伸	68	30 s	
后延伸	68	5 min	1
保存	4	∞	-

表 4 调整后的引物终浓度

Tab. 4 Adjusted final primer concentration μmol·L<sup>-1</sup>

名称	上游引物	下游引物
内参	0.20	0.31
猪蓝耳病毒	0.60	0.31
经典猪瘟病毒	0.40	0.60
非洲猪瘟病毒	0.24	0.16
乙脑病毒	0.30	0.20
口蹄疫病毒	0.45	0.30
猪伪狂犬病毒	0.30	0.20

**1.2.4 膜芯片制备** 首先将尼龙膜裁成 1.1 cm×1.1 cm 的膜条, 后将裁好的膜条放置于双蒸水中浸泡 15 min, 再 15×SSC 浸泡 15 min, 取出放在滤纸上 60 °C 烘干, 待膜条降至室温后, 按图 2 膜芯片探针布局图上顺序依次点上内参探针(10~20 μmol·L<sup>-1</sup>)、各检测靶标探针(10~20 μmol·L<sup>-1</sup>)、阳性探针(positive control probe, PC)(5 μmol·L<sup>-1</sup>)以及阴性探针(negative control probe, NC)(5 μmol·L<sup>-1</sup>)。

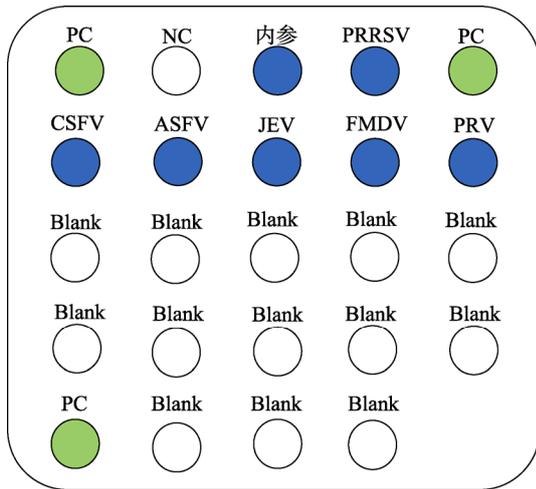


图 2 基因膜芯片探针布局图

PC-阳性探针; NC-阴性探针; PRRSV-猪蓝耳病毒; CSFV-经典猪瘟疫病毒; ASFV-非洲猪瘟病毒; JEV-乙脑病毒; FMDV-口蹄疫病毒; PRV-猪伪狂犬病毒。

**Fig. 2** Gene membrane chip probe layout diagram  
PC-positive control probe; NC-negative control probe; PRRSV-porcine reproductive and respiratory syndrome virus; CSFV-classical swine fever virus; ASFV-African swine fever virus; JEV-Japanese encephalitis virus; FMDV-foot-and-mouth disease virus; PRV-porcine pseudorabies virus.

**1.2.5 杂交显色** 将“1.2.3”项下扩增的 PCR 产物经 95 °C 热变性 5 min, 并在热变性程序结束后立即取出置于冰盒上 3~5 min 后再进行杂交反应。杂交流程见表 5, 整个流程均为仪器自动完成。

表 5 杂交流程

**Tab. 5** Hybridization flow chart

步骤名称	使用试剂	反应温度/°C	反应时间/min
去活化	去活化液	37	8
去活化清洗	去活化清洗液	60	5
杂交	杂交液	50	10
杂交清洗	杂交清洗液	52	3
杂交清洗	杂交清洗液	52	3
酶标	酶标液(含 AP-SA)	42	10
酶标清洗 1	酶标清洗液 1	42	3
酶标清洗 2	酶标清洗液 2	42	3
酶标清洗 2	酶标清洗液 2	42	3
显色	显色液	37	10
显色清洗	显色清洗液	37	1

**1.2.6 结果判读** 杂交反应结束后, 对照膜芯片点阵图判读检测结果。结果有效前提: 芯片上阳性质控点(PC)显色, 阴性质控点(NC)不显色。依据靶标实际显色的情况判定实验结果, 将显色位点位置与图 2 相对应查看即可知道该样品检测出的猪病毒种类。结果通过仪器自动判读, 判读程序设置有判读标准, 当出现斑点, 即可提取斑点灰度值, 根据斑点的灰度值来判读结果的有无。而肉眼观察只是属于辅助手段, 斑点深浅判断以检测限浓度的阳性斑点的灰度值作为参考。

**1.2.7 多种猪病毒膜芯片检测方法的测试和评价** 收集复可托样品及其原料、市场上和养殖场猪肉、猪脾、猪肝、阳性样本(质控品)等, 提取相应样本中的核酸, 使用已建立的多种猪病毒膜芯片检测方法分别进行特异性、检测限、稳定性测试和应用性评价。

**方法特异性测试:** 使用稀释保存的阳性模板猪蓝耳病毒、经典猪瘟疫病毒、非洲猪瘟病毒、乙脑病毒、口蹄疫病毒、猪伪狂犬病毒及阴性靶标模板大肠埃希氏菌 O157:H7、单增李斯特氏菌、表皮葡萄球菌、白色念珠菌、创伤弧菌、蜡样芽孢杆菌、肠道侵袭性大肠埃希氏菌、类志贺单胞菌、河流弧菌、猪圆环病毒、猪流感病毒等, 测试多重方法的特异性, 平行测试 3 次。

**方法检测限测试:** 使用制备的病毒阳性样本再进行梯度稀释后检测多重体系的检测限, 按照“1.2”项下方法进行试验, 各梯度核酸加样量为 1 μL, 平行测试 3 次。

**方法稳定性测试:** 选择检测限测试得到的多重体系最低浓度的核酸进行方法的稳定性测试, 每个样本重复 3 次。

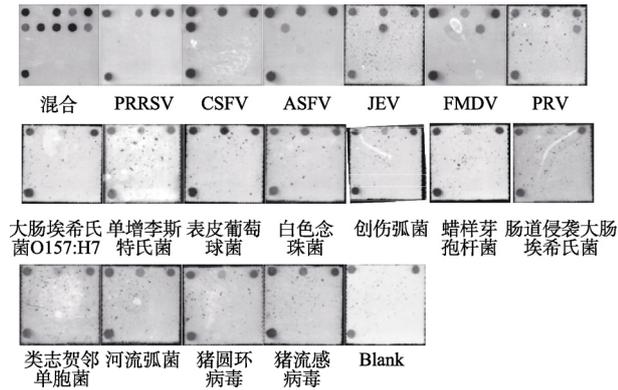
**方法应用性评价:** 收集复可托不同规格(每支 2 mg 和每支 4 mg)样品各 3 批及其原料猪脾 6 批, 市场上和养殖场猪肝 3 批, 猪肉 3 批共计 18 个样本, 按照病毒 DNA/RNA 提取试剂盒(离心柱型)说明书中的操作步骤进行核酸提取, 按“1.2”项下方法进行检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 方法特异性测试

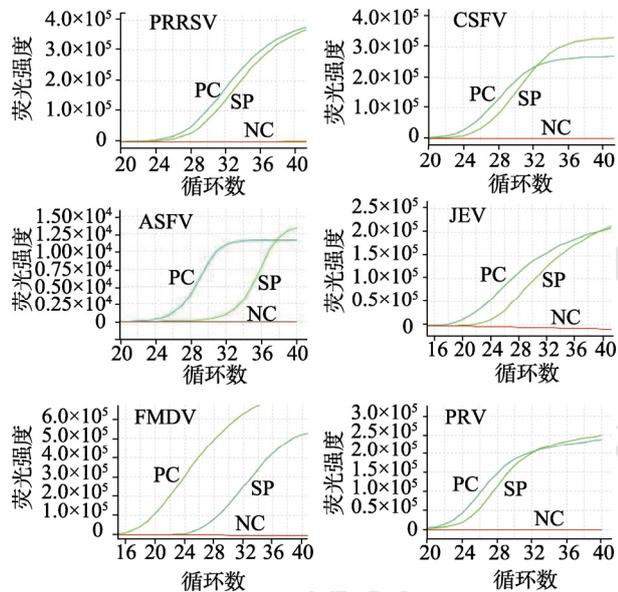
6 种阳性混合靶标对应靶点均显色, 单个阳性靶标模板仅对应靶点显色, 其余靶点未显色; 各阴性靶标模板无阳性靶点显色, 均为阴性结果, 结果见图 3。同时用市面上单重病毒 RT-PCR 检测试剂盒进行比对实验, 结果一致, 见图 4。证明多

重方法特异性良好，所检测样本中无假阳性和无假阴性结果出现。



**图 3** 方法特异性测试结果  
PRRSV-猪蓝耳病毒；CSFV-经典猪瘟病毒；ASFV-非洲猪瘟病毒；JEV-乙脑病毒；FMDV-口蹄疫病毒；PRV-猪伪狂犬病毒。

**Fig. 3** Method specificity test results  
PRRSV-porcine reproductive and respiratory syndrome virus; CSFV-classical swine fever virus; ASFV-African swine fever virus; JEV-Japanese encephalitis virus; FMDV-foot-and-mouth disease virus; PRV-porcine pseudorabies virus.



**图 4** 荧光定量 PCR 检测结果  
PC-阳性对照；SP-样本；NC-阴性对照；PRRSV-猪蓝耳病毒；CSFV-经典猪瘟病毒；ASFV-非洲猪瘟病毒；JEV-乙脑病毒；FMDV-口蹄疫病毒；PRV-猪伪狂犬病毒。

**Fig. 4** RT-PCR detection results  
PC-positive control; SP-sample; NC-negative control; PRRSV-porcine reproductive and respiratory syndrome virus; CSFV-classical swine fever virus; ASFV-African swine fever virus; JEV-Japanese encephalitis virus; FMDV-foot-and-mouth disease virus; PRV-porcine pseudorabies virus.

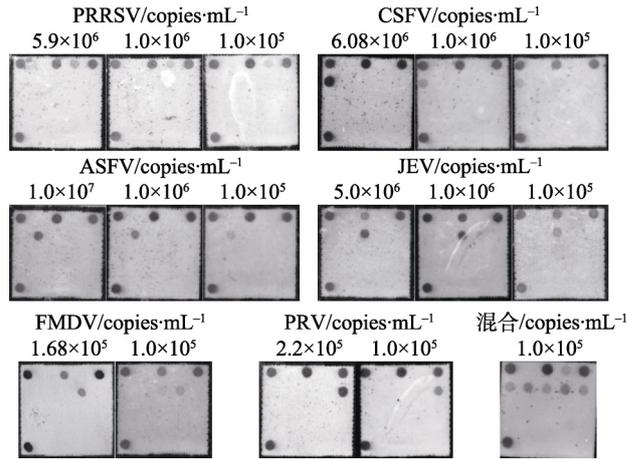
## 2.2 方法检测限测试

结果显示，使用购买的病毒阳性质控品进行检测，综合检测限可达  $1.0 \times 10^5$  copies·mL<sup>-1</sup>，见图 5。

## 2.3 方法稳定性测试

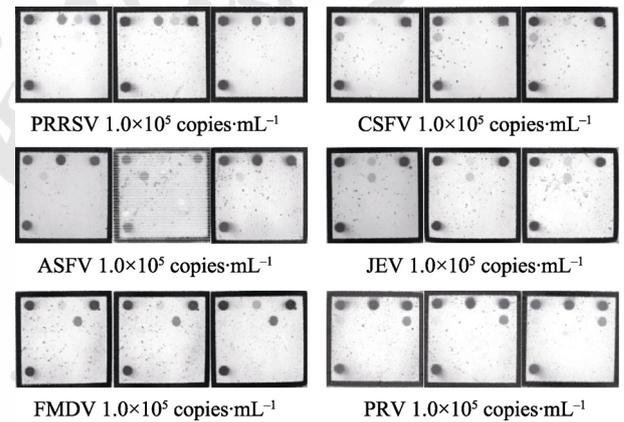
各靶标检测限浓度核酸重复性测试结果显示，3 个重复样检测结果一致，证明方法具有良好

的稳定性，见图 6。



**图 5** 方法检测限测定结果  
PRRSV-猪蓝耳病毒；CSFV-经典猪瘟病毒；ASFV-非洲猪瘟病毒；JEV-乙脑病毒；FMDV-口蹄疫病毒；PRV-猪伪狂犬病毒。

**Fig. 5** Method detection limit test result  
PRRSV-porcine reproductive and respiratory syndrome virus; CSFV-classical swine fever virus; ASFV-African swine fever virus; JEV-Japanese encephalitis virus; FMDV-foot-and-mouth disease virus; PRV-porcine pseudorabies virus.



**图 6** 方法稳定性测试结果  
PRRSV-猪蓝耳病毒；CSFV-经典猪瘟病毒；ASFV-非洲猪瘟病毒；JEV-乙脑病毒；FMDV-口蹄疫病毒；PRV-猪伪狂犬病毒。

**Fig. 6** Method stability test results  
PRRSV-porcine reproductive and respiratory syndrome virus; CSFV-classical swine fever virus; ASFV-African swine fever virus; JEV-Japanese encephalitis virus; FMDV-foot-and-mouth disease virus; PRV-porcine pseudorabies virus.

## 2.4 方法应用性评价

18 个实物样本中，6 种猪病毒膜芯片法检测结果见图 7。

鉴于上述样本均未检出相关靶标，为进一步进行验证，则选取复可托样品、猪脾、猪肉各 1 批，分为样本核酸、样本核酸掺入检测限浓度的单一病毒核酸、样本核酸掺入 6 种混合病毒核酸 3 个组别，然后按“1.2”项下步骤进行检测，同时用单重病毒 RT-PCR 检测试剂盒进行比对实验，来

证明猪病毒膜芯片法的可靠性。经实验比对分析, 2种方法结果一致, 符合预期, 见表6。通过上述实验可测出样本核酸6种猪病毒膜芯片法的检测时间约为2.2 h(PCR扩增约1 h, 杂交显色约1.2 h), 与单重 RT-PCR 方法检测时间相近(根据反应条件不同, 单一病毒 PCR 反应时间约为 1.5~2 h 不等); 若针对样品进行6种猪病毒检测, 由于 PCR 反应条件不同会造成实验时间的累加, 此外多重检测需配制不同的 PCR 反应体系, 因此 RT-PCR 法检测总时间约为膜芯片法的 2~6 倍。可见膜芯片法具有多重检测及快速的优势。

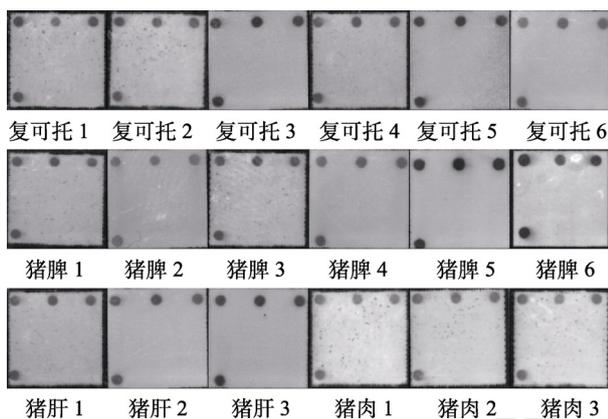


图7 样本应用性评价测试结果

Fig. 7 Sample applicability evaluation test results

表6 2种方法比对实验结果

Tab. 6 Experimental results of comparison of the two methods

样本名称	病毒种类	样本核酸		样本核酸+单一病毒核酸		样本核酸+6种病毒核酸	
		膜芯片法	RT-PCR法	膜芯片法	RT-PCR法	膜芯片法	RT-PCR法
复可托	猪蓝耳病毒	-	-	+	+	+	+
	经典猪瘟病毒	-	-	+	+	+	+
	非洲猪瘟病毒	-	-	+	+	+	+
	乙脑病毒	-	-	+	+	+	+
	口蹄疫病毒	-	-	+	+	+	+
	猪伪狂犬病毒	-	-	+	+	+	+
猪脾	猪蓝耳病毒	-	-	+	+	+	+
	经典猪瘟病毒	-	-	+	+	+	+
	非洲猪瘟病毒	-	-	+	+	+	+
	乙脑病毒	-	-	+	+	+	+
	口蹄疫病毒	-	-	+	+	+	+
	猪伪狂犬病毒	-	-	+	+	+	+
猪肉	猪蓝耳病毒	-	-	+	+	+	+
	经典猪瘟病毒	-	-	+	+	+	+
	非洲猪瘟病毒	-	-	+	+	+	+
	乙脑病毒	-	-	+	+	+	+
	口蹄疫病毒	-	-	+	+	+	+
	猪伪狂犬病毒	-	-	+	+	+	+

注: -表示未检出; +表示检出。

Note: - indicated not detected; + indicated detected.

### 3 讨论

本研究将多重 PCR 与基因膜芯片技术结合, 利用 6 对特异性引物, 可同时对 6 种特异基因片段进行检测, 并通过 PCR 产物与膜芯片上探针的杂交进一步保证检测结果的特异性与准确率, 检测所有步骤均通过仪器自动完成, 无须人工干预, 无须反复开管, 同时多重检测节省了试剂耗材及时间, 较 RT-PCR 法的检测效率更高、费用更低。

配制多重 PCR 引物 Mix 时, 需将各靶标筛选出来的每对特异性引物大致按照修饰引物与非修饰引物 3:2 的比例进行调配, 主要是让修饰引物过量, 形成一个不对称的 PCR 扩增, 让带修饰的产物数量最大化, 从而为后续的杂交显色提供便利。再根据实际体系检测情况, 对各引物量或不同靶标的修饰与非修饰引物之间的量进行微调。PCR 扩增程序中延伸温度从常规的 72 °C 调整到 68 °C, 有利于引物和模板更好地结合, 6 种模板扩增更加均匀, 避免出现某一产物扩增过强的情况; 循环数从 35 个增加到适宜的 38 个, 既满足体系检测需求, 又不会因循环数过多导致产生大量非特异扩增产物而与探针产生非特异性杂交。

由于这 6 种猪病毒均属于国家严控的动物疫病类病毒, 出于生物安全考虑, 无法直接使用活病毒样本进行实验。除非洲猪瘟病毒外的其他 5 种猪病毒均使用全长灭活病毒提取的核酸作为阳性样本。而非洲猪瘟病毒属于高致病性微生物, 具有高度传染性, 无法购买到全长灭活病毒进行阳性实验, 查询大量资料得知, 市面上几乎全部的非洲猪瘟病毒 PCR 检测试剂盒都是基于 VP72 这个特异性基因片段进行引物设计和扩增的<sup>[10-11]</sup>, 所以本实验的非洲猪瘟病毒阳性样本为非洲猪瘟病毒的 VP72 质粒。

为保证 PCR 结果的准确性, 预防非特异性 PCR 扩增和污染。在扩增反应体系中加入 UNG 酶, 并在 dNTPs 基础上加入适量 dUTP。在 PCR 开始前增加 45 °C 的保温步骤, UNG 酶即可将反应体系中已有的含尿嘧啶的 DNA 污染物中的尿嘧啶碱基降解, 消除由于产物 DNA 污染产生的扩增, 从而在一定程度上保障扩增结果的特异性、准确性。高温情况下 UNG 酶失活, 不影响后续 PCR 扩增反应。

验证结果显示, 本研究依托基因膜芯片技术所建立的复可托产品及原料中 6 种猪常见病毒检测方法可在 4 h 内完成猪蓝耳病毒、经典猪瘟病

毒、非洲猪瘟病毒、乙型脑炎病毒、猪口蹄疫病毒、猪伪狂犬病毒共 6 种常见猪病毒快速筛查, 方法的整体检测限为  $1.0 \times 10^5$  copies·mL<sup>-1</sup>, 可满足常规市场检测需求。经过系统测试, 该基因膜芯片检测体系具有良好的特异性、可重复性、稳定性, 适用于复可托药品及原料、市场猪肉相关样本 6 种猪病毒的同时筛检。基因膜芯片方法能够同时进行多样品、多项目检测, 具有快速、灵敏、方便、准确、成本低、自动化、可视化、高通量的特点, 是目前传统方法所不具备的。因此, 本研究所建立的复可托产品及原料中 6 种猪常见病毒检测方法不仅可以应用在复可托产品及其原料的检测中, 还可扩展到一些养殖场、猪生鲜流通环节的相关检测部门, 为食品、药品原料及相关产品的流通保驾护航。

## REFERENCES

- [1] 中国药典. 四部[S]. 2020: 156-160.
- [2] HONG L. Discussion on various detection methods of salmonella from proficiency testing samples[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2021, 38(2): 207-211.
- [3] YANG D N, LIU M H, ZHANG X J, et al. Rapid screening of food-borne pathogens in non-prepackaged ready-to-eat foods by PCR-membrane chip technology[J]. J Food Saf Qual(食品安全质量检测学报), 2021, 12(2): 560-568.
- [4] LUO N, WANG Q, ZHANG X L, et al. Research on DNA microarray for detecting ten different virus from swine[J]. Chin J Animal Vet Sci(畜牧兽医学报), 2018, 49(10): 2249-2260.
- [5] 苟德明, 张利, 康康. 高致病性猪蓝耳病病毒的检测引物、探针及检测方法: 中国, CN104711369A[P]. 2015-06-17.
- [6] ZHANG Y, ZHOU C, SUN T, et al. Quantitative detection of the loop mediated isothermal amplification gene in the loop mediated isothermal amplification of Japanese encephalitis and dengue fever[J]. Int J Lab Med(国际检验医学杂志), 2017, 38(14): 1931-1934.
- [7] RAO P B. Simultaneous detection of swine viruses by an EvaGreen multiplex real-time PCR[D]. Hangzhou: Zhejiang Sci Tech University, 2014.
- [8] LU S, CHEN Z W. Research progress on porcine reproductive and respiratory syndrome[J]. Anhui Agric Sci(安徽农业科学), 2018, 46(26): 27-30.
- [9] WANG S C, SUN T, DONG H, et al. Optimization of PCR detection method for swine pseudorabies virus[J]. Swine Ind Sci(猪业科学), 2020, 37(4): 78-80.
- [10] 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]. J Food Saf Qual(食品安全质量检测学报), 2021, 12(19): 7646-7650.
- [11] CAI X L, OU X B, LI X P. Establishment and preliminary application of a duplex real-time PCR method for detection of African swine fever virus p72 and CD2v genes[J]. Prog Vet Med(动物医学进展), 2021, 42(11): 41-47.

收稿日期: 2022-01-28  
(本文责编: 李艳芳)