

# 绵羊痘病毒和山羊痘病毒通用 RPA 检测方法的特异性试验

豆 玲<sup>1</sup>, 周 峰<sup>1\*</sup>, 高军军<sup>1</sup>, 王雪莹<sup>1</sup>, 王志宇<sup>2</sup>, 康文彪<sup>1\*</sup>

(1. 甘肃省动物疫病预防控制中心, 甘肃 兰州 730046; 2. 英科新创(苏州)生物科技有限公司)

**摘要:**应用我们建立的绵羊痘病毒和山羊痘病毒通用 RPA 检测方法, 通过对口蹄疫病毒、传染性脓疱皮炎病毒、鸡痘病毒、绵羊痘病毒、羊痘疫苗和羊痘重组质粒样本的检测, 验证绵羊痘病毒和山羊痘病毒通用 RPA 检测方法对绵羊痘/山羊痘病毒检测的特异性。结果显示该方法对羊痘疫苗、羊痘重组质粒、绵羊痘病毒核酸和山羊痘病毒核酸阳性样品能够在试纸条上显示出阳性条带, 而对其他样品不显示阳性条带。表明该方法具有良好的特异性, 在绵羊痘/山羊痘病毒检测中应用前景广阔。

**关键词:**重组酶聚合酶扩增技术(RPA); 山羊痘病毒; 试纸条; 绵羊痘病毒

[中图分类号] S852.65<sup>+</sup>4 [文献标识码] A [文章编号] 1004-6704(2023)03-0021-02

## Specificity Test of the Universal RPA Detection Method for Sheep Pox Virus and Goat Pox Virus

DOU Ling<sup>1</sup>, ZHOU Feng<sup>1\*</sup>, GAO Jun-jun<sup>1</sup>, WANG Xue-ying<sup>1</sup>, WANG Zhi-yu<sup>2</sup>, KANG Wen-biao<sup>1\*</sup>

(1. Animal Disease Prevention and Control Center, Lanzhou, Gansu 730046, China; 2. Yingke Xinchuang (Suzhou) Biotechnology Co., Ltd.)

**Abstract:** In this study, the previously established general RPA detection method for sheep pox virus and goat pox virus was used to detect foot-and-mouth disease virus, infectious pustular dermatitis virus, fowl pox virus, sheep pox virus, sheep pox vaccine and sheep pox recombinant plasmid samples. Based on this, we verified the specificity of the general RPA detection method for sheep pox virus and goat pox virus for the detection of sheep pox virus and goat pox virus. The results show that the method can show positive bands on the test strip for the positive samples of sheep pox vaccine, sheep pox recombinant plasmid, sheep pox virus nucleic acid and goat pox virus nucleic acid, but does not show positive bands for other samples. This shows that the method has good specificity and has broad prospects in the detection of sheep poxvirus and goat poxvirus.

**Key words:** Recombinase polymerase amplification (RPA); goat pox virus; test strips; sheep pox virus

根据快速准确诊断绵羊痘/山羊痘的实际需求, 我们成功建立了绵羊痘病毒和山羊痘病毒通用 RPA 检测方法, 为了保证该方法在应用中的准确性和可靠性, 我们选用临床症状与绵羊痘/山羊痘相似疫病的病原(口蹄疫病毒、传染性脓疱皮炎病毒)、其他痘病毒(鸡痘病毒)、绵羊痘病毒、羊痘疫苗和羊痘重组质粒样本进行了该 RPA 检测方法特异性试验研究。

## 1 材料与方

### 1.1 试验样品

1 份羊痘疫苗、3 份羊痘病毒核酸阳性样本

[收稿日期] 2022-08-04

[基金项目] 甘肃省农业农村厅科技项目(GNKJ-2021-24)

[作者简介] 豆玲(1984-), 女, 甘肃榆中人, 硕士, 高级兽医师, 从事动物疫病防控工作。E-mail: 398520691@qq.com

★[执笔作者] 周峰(1984-), 男, 重庆人, 本科, 高级兽医师, 从事动物疫病防控工作。E-mail: 195670041@qq.com

\*[通讯作者] 康文彪(1963-), 男, 甘肃临洮人, 本科, 研究员, 从事动物疫病防控及相关研究工作。E-mail: 1422351626@qq.com

(RPO35 基因片段克隆至载体 pUC57 后制作的重组质粒)、2 份口蹄疫病毒核酸阳性样本(疫苗)、2 份羊传染性脓疱皮炎病毒核酸阳性样本(疫苗)、2 份鸡痘病毒阳性样本(疫苗)、1 份阳性对照、2 份阴性对照。

### 1.2 主要试剂和仪器

核酸(DNA/RNA)提取试剂盒购自哈尔滨元亨公司。RPA 试剂盒(Twist Basic 及 Twist nfo)购自英国 Twist Dx 公司。HybriDetect 1 试纸条购自 Milenia 公司。国产 RPA 试剂购自先达公司。国产试纸条购自英科新创公司。恒温水浴锅购自 Heal force 公司。高速离心机购自 Eppendorf 公司。

### 1.3 核酸提取

DNA 和 RNA 的提取按照周峰等文献中的方法进行提取, 保存。

### 1.4 RPA 扩增

按照表 1 配制 Rehydration Solution 溶液。

表 1 Rehydration Solution 溶液组分

组分	体积/ $\mu\text{L}$
上游引物 Forward Primer(10 $\mu\text{mol/L}$ )	2.1
下游引物 Reverse Primer(10 $\mu\text{mol/L}$ )	2.1
探针 Probe(10 $\mu\text{mol/L}$ )	0.6
Primer Free Rehydration Buffer	29.5
H <sub>2</sub> O	12.2

在试剂盒准备的 8 联管中配制 Rehydration

表 2 引物序列

引物 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequence
上游引物 Forward Primer	5-AAGTTAACCATTCTTCATTGACGGCAGTTG[THF]ATTATTTGATAAAAC-C3-3'
下游引物 Reverse Primer	5-Biotin-TGTTCCGAGAAGAGAAGGTAATCGTTATTG[THF]TTTAAATCCCGATTT-C3-3'
探针 Probe	5-FAM-AGTTAATAAGGGCCATCTAACTCTATTGTT[THF]AATCCATGTTTTATA-C3-3'

## 2 结果

特异性试验结果如图 1 所示。从图 1 可以看出,建立的绵羊痘病毒和山羊痘病毒通用 RPA 检测方法的特异性良好,对羊痘疫苗、羊痘重组质粒、绵羊痘病毒核酸和山羊痘病毒核酸阳性样品能够在试纸条上显示出阳性条带,口蹄疫病毒、传染性脓疱皮炎病毒和鸡痘病毒均无阳性条带出现。

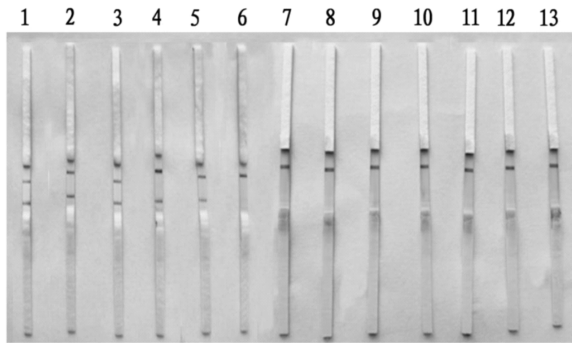


图 1 特异性试验结果

1:阳性对照;2:羊痘疫苗;3、4、5:绵羊痘病毒核酸阳性样本;6、7:阴性对照;8、9:口蹄疫病毒核酸阳性样本;10、11:传染性脓疱皮炎病毒核酸阳性样本;12、13:鸡痘病毒核酸阳性样本

## 3 讨论

绵羊痘/山羊痘是由绵羊痘/山羊痘病毒引起的动物传染病,以绵羊和山羊的体温升高、全身性丘疹或结节、水疱、内脏病变为特征,特别是肺部具有明显的病变特征。其病原绵羊痘病毒/山羊痘病毒的分子生物学检测方法常用的有普通 PCR 和荧光定量 PCR,RPA 替代 PCR 检测技术主要优势在于不

Solution 溶液完成后,总体积为 46.5  $\mu\text{L}$ ,混匀复溶。将 2.5  $\mu\text{L}$  醋酸镁与 1  $\mu\text{L}$  模板混合均匀后,加入 8 联管中,随后将 8 联管放入水浴锅中,37 $^{\circ}\text{C}$  反应 15min。反应结束后,取 5  $\mu\text{L}$  反应产物至 1.5 mL 离心管中,用稀释液 20 倍稀释,混匀后,将试纸条插入离心管中,等待 15 min 后查看反应结果。反应体系最终镁离子浓度为 21 mmol/L。

需要特定昂贵的温控仪器即可快速定量扩增目的 DNA 或 RNA 病毒,该方法克服了对传统 PCR 检测设备的依赖,在临床和现场操作中简单、快捷、实用性强。在成功建立绵羊痘病毒和山羊痘病毒通用 RPA 检测方法的基础上,本文对改进方法检测的特异性进行了研究,从试验结果看,我们建立的绵羊痘病毒和山羊痘病毒通用 RPA 检测方法对绵羊痘/山羊痘病毒的检测具有很好的特异性。

## 4 结论

本研究对我们建立的绵羊痘病毒和山羊痘病毒通用 RPA 检测方法的特异性开展了试验研究,结果表明,该方法对绵羊痘和山羊痘病毒核酸的检测具有很好的特异性,在绵羊痘/山羊痘病毒的临床检测上应用前景广阔。

### 参考文献:

- [1] 周峰,王志宇,张梅等.绵羊痘病毒和山羊痘病毒通用 RPA 检测方法的建立与优化[J].中国兽医科学,2022,52(7):830-836.
- [2] 吴海燕,孙秀峰.山羊痘和绵羊痘研究进展[J].动物医学进展,2011,32(12):104-109.
- [3] 景志刚,董浩,狄栋栋等.重组酶聚合酶扩增技术研究进展[J].生物技术进展,2016,32(6):47-53.
- [4] 刘昂,程逸文,安琪等.羊源多杀性巴氏杆菌重组酶聚合酶扩增诊断方法的建立[J].中国畜牧兽医,2021,48(10):3752-3760.
- [5] 颜新敏,吴国华,李健,朱海霞等.羊痘在中国的流行现状分析[J].中国农学通报,2010,26(24):6-9.