



口蹄疫病毒可视化 RT-LAMP 检测方法的建立

王伟华¹, 刘桂梅¹, 吴奇强², 黄鹏波², 白 鸽², 王国超²

(1. 渭南职业技术学院, 陕西渭南 714000; 2. 渭南市动物疫病预防控制中心, 陕西渭南 714000)

摘 要 旨在建立口蹄疫病毒可视化逆转录环介导等温核酸扩增(RT-LAMP)快速检测方法。以猪口蹄疫灭活疫苗为材料,设计两对 RT-LAMP 引物,建立 FMDV 可视化 RT-LAMP 检测方法,并与普通 PCR 检测方法进行比较,同时进行特异性试验和敏感性试验。对从油佐剂疫苗中提取 FMDV 核酸方法进行比较结果发现,用商品化试剂盒提取时,3 种样品处理方法对病毒 RNA 提取量没有显著影响;Trizol 法提取 RNA 时,从油佐剂疫苗中直接提取,获得的 RNA 量最大,与其他 2 种方法差异极显著($P < 0.01$)。建立了口蹄疫病毒可视化 RT-LAMP 方法,该方法检测到模板 RNA 最低稀释度为 10^{-9} ,比 RT-PCR 方法灵敏 10 倍,特异性好。

关键词 口蹄疫病毒;逆转录环介导等温核酸扩增;检测

中图分类号 S852.65;Q78

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2018)12-1736-09

口蹄疫(Foot-and-mouth disease,FMD)是口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus,FMDV)引起的急性、烈性、高度接触性传染病,是世界动物卫生组织要求通报的动物疫病,中国将口蹄疫列为一类动物疫病的首位^[1-2]。口蹄疫传播迅速,宿主范围广,发病率高,易形成大规模流行,造成幼年动物死亡,使动物生产性能降低,对畜牧业的发展造成严重危害^[3]。本病流行于世界各地,目前在非洲、亚洲和欧洲的疫情最严重^[4-5]。动物感染 FMDV 后对幼畜心脏造成损害而导致死亡,引起成年奶牛奶产量下降、体质量降低和畜力下降等,影响其生产性能。此外,奶牛、山羊和绵羊等动物感染 FMDV,容易形成带毒状态,向外界长期排毒,甚至有的带毒时间长达 2~3 a,这也是 FMD 难以防范和根除的原因之一^[6-7]。为了控制和消灭 FMD,各国花费巨额开支来限制疫区或可疑疫区国家产品的出口或上市,给全球动物或动物性产品的贸易带来巨大影响。及时确定 FMDV 的感染对采取措施控制和消除口蹄疫至关重要,目前一般是现场采样后进行实验室检测^[8-9]。

环介导等温扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification,LAMP)自发明以来引起

各国科学家的关注,其操作方法、特异性、敏感性、扩增条件等方面均优于其他核酸扩增技术,在动物疫病病原的检测领域有着非常广阔的应用前景^[10]。目前,LAMP 在口蹄疫病原检测方面有广泛的应用研究^[11-12]。吴绍强等^[13]根据灭活的口蹄疫亚洲 I 型病毒基因组的 3D 区域设计 3 对引物,优化体系中的成分、反应条件和温度,确定体系的敏感性和特异性,建立口蹄疫病毒亚洲 I 型的逆转录环介导等温核酸扩增(Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification,RT-LAMP)检测方法,为 FMDV 现场检测提供一种简便快速的解决方案。秦智锋等^[14]通过将 RNA 的反转录与 LAMP 技术相结合,根据 FMDV 的 3D 基因设计 3 对特异性引物,建立 FMDV 的 RT-LAMP 检测方法,仅需要 75 min 就可以完成 RNA 的提取和检测,所建立的检测方法灵敏,与实时荧光定量 PCR 灵敏度相当,而且简单,不需要复杂的仪器,是适合基层和现场检测的分子生物学检测方法,使 LAMP 技术用于口蹄疫的检测成为可能,具有很高的实用价值。李健等^[15]根据口蹄疫病毒多聚蛋白基因保守区段设计 RT-LAMP 的特异性引物,探究 RT-LAMP 灵敏性和特异性,建立快速检测 FMDV 的 RT-

收稿日期:2018-07-25

修回日期:2018-09-09

基金项目:陕西省农业科技创新转化项目(NYKJ-2015-021)。

第一作者:王伟华,男,博士,副教授,研究方向为动物疫病预防控制。E-mail: 278954165@qq.com

LAMP 方法,同时评价该方法的灵敏性和特异性,所建立的方法可检测到 10^{-5} 稀释度的目标病毒核酸量,比普通 RT-PCR 的灵敏性高 100 倍,比荧光 PCR 高 10 倍。

LAMP 不仅适用于实验室检测,也适用于条件较差的基层实验室或者场区现场检测。它不需要经历模板的高温变性、不同温度的长时间循环、复杂繁琐的电泳和紫外观测等过程,目的基因的扩增和检测可以一步完成,扩增效率高^[16-17]。具有不需要使用特殊的仪器设备、操作过程简单、反应时间短、有较高的灵敏度和特异性的优点,而且对于结果的观察和判定直观,可以用肉眼直接观察反应液颜色的变化,迅速地对结果进行判定。

研究基于 LAMP 技术具有操作方便、快速灵敏的特点,本试验建立 FMDV 可视化 RT-LAMP 的检测方法,为口蹄疫的现场快速诊断提供一种可选用的方法。

1 材料与方法

1.1 疫苗、病毒

猪口蹄疫 O 型灭活疫苗(O/Mya98/XJ/2010 株+O/GX/09-7 株),口蹄疫 O 型、亚洲 I 型二价灭活疫苗(OHM/02 株+JSL 株),口蹄疫 O 型、A 型、亚洲 I 型三价灭活疫苗(OHM/02 株+AKT-III 株+Asia/KZ/03 株)均为天康生物股份有限公司产品;猪瘟病毒(Classical swine fever

virus,CSFV)全基因、猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus,PEDV)、猪传染性胃肠炎病毒(Transmissible gastroenteritis virus,TGEV)和猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus,PRRSV)的 RNA,由西北农林科技大学兽医公共卫生学科平台实验室提供。

1.2 主要试剂

病毒总 RNA/DNA 的小量纯化试剂盒、RNAiso Plus(9109)Trizol,购自大连宝生物工程有限公司;Bst DNA 聚合酶大片段、AMV 反转录酶、 $10\times$ ThermoPol 反应缓冲液、MgSO₄(#B1003S)均购自 New England BioLabs 公司; $10\,000\times$ SYBR Green I 核酸染料购自 Solarbio 公司;Betaine 购自天津格里斯医药化学技术有限公司;Quant One Step RT-PCR Kit(KR113)购自北京天跟生化技术有限公司。

1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 中已经发布的 O、A、Asia I 血清型猪 FMDV 的核苷酸序列,用生物软件进行序列比对选择其中高度保守的序列,根据北京兰谱生物科技有限公司公布的 LAMP 引物设计网站设计两对扩增引物,并交西安擎科泽西生物科技有限公司合成。查询国家标准中发表的 FMDV 检测引物序列进行合成。所用引物序列如表 1 所示。

表 1 口蹄疫病毒 RT-LAMP 引物
Table 1 RT-LAMP primers used for FMDV detection

引物名称 Primer	位置 Position	引物序列 Primer sequence
F3	7 899~7 916	5'- ATGGCCTCGAAGACCCTT -3'
B3	8 067~8 084	5'- TTATGCGTCACCGCACAC -3'
FIP	7 936~7 957	5'-CCTGCCACGGAGATCAACTTCT-
	7 896~7 915	GAGGCTATCCTCTCCTTTGC-3'
BIP	7 978~7 998	5'-CTGACGAGTACCGGCGTCTCT-
	8 039~8 058	CCCAACGCAGGTAAAGTGAT-3'
FMDV-F	7 857~7 878	5'- ACTGGGTTTTACAAACCTGTGA -3'
FMDV-R	7 947~7 963	5'- GCGAGTCCTGCCACGGA -3'

1.4 疫苗中 FMDV 总 RNA 的提取

对猪口蹄疫油佐剂灭活疫苗采用 3 种处理方式,分别为直接用口蹄疫灭活疫苗、直接离心法、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻融离心法,分别按试剂盒法和 Trizol 法提取病毒总 RNA。分析样品处理方法对 RNA 提取量的影响。

1.5 建立口蹄疫病毒 RT-LAMP 反应体系

口蹄疫病毒 RT-LAMP 的反应体系为 $25\text{ }\mu\text{L}$,反应体系包含: $1.0\text{ }\mu\text{L}$ Bst DNA 聚合酶($8\text{ U}/\mu\text{L}$)、 $0.5\text{ }\mu\text{L}$ AMV 反转录酶($10\text{ U}/\mu\text{L}$)、 $1.0\text{ }\mu\text{L}$ Betaine($5\text{ }\mu\text{mol}/\mu\text{L}$)、 $3.5\text{ }\mu\text{L}$ dNTPs(10 mmol/L)、 $2.5\text{ }\mu\text{L}$ $10\times$ Themopol Reaction Buff-

er、1.5 μL MgSO_4 (100 mmol/L)、0.5 μL 外引物 F3/B3 (10 pmol/ μL)、4.0 μL 内引物 FIP/BIP (10 pmol/ μL)、2.0 μL RNA 模板 (阴性对照不加模板), RNase-Free ddH₂O 补齐总体积。

RT-LAMP 反应在恒定条件下进行, 对反应时间和温度进行优化。

1.5.1 RT-PCR 和 RT-LAMP 引物 PCR 鉴定

将合成的 FMDV RT-PCR 检测引物和设计合成的 RT-LAMP 引物进行 PCR 扩增, 取 10 μL 产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.5.2 最适反应温度的确定 AMV 反转录酶最适作用温度为 37~42 $^{\circ}\text{C}$, 为确定最适反应温度, 分别设置 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min 反转录, 再 63.5 $^{\circ}\text{C}$ 恒温 1 h; 42 $^{\circ}\text{C}$ 30 min 反转录, 再 63.5 $^{\circ}\text{C}$ 恒温扩增 1 h。

1.5.3 RT-LAMP 反应最佳引物浓度的确定 设置不同引物浓度组, 一组为外引物 F3 和 B3 各 0.25 μL , 内引物 FIP 和 BIP 各 2 μL , 即外引物浓度为 0.10 pmol/ μL , 内引物浓度为 0.80 pmol/ μL ; 另一组为外引物 F3 和 B3 各 0.5 μL , 内引物 FIP 和 BIP 各 4 μL 。即外引物终浓度为 0.20 pmol/ μL , 内引物终浓度为 1.60 pmol/ μL 。反应条件按照“1.5.2”中确定的最佳条件进行。

1.6 RT-LAMP 产物的鉴定和可视化观察

1.6.1 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RT-LAMP 产物有特异性的梯状条带, 为了将各片段明显区分开, 可适当延长电泳时间。停止电泳后, 放置于凝胶成像仪中在合适的波长条件下观察。

1.6.2 RT-LAMP 产物的可视化观察 RT-LAMP 反应结束后, 在反应液中加入 1 μL 的 SYBR Green I 染料, 观察反应液是否有颜色变化, 当反应液为阳性时呈现明显的绿色, 阴性时呈淡橙色。肉眼观察颜色变化后, 在紫外灯下照射, 观察反应管是否有荧光产生, 阳性管可产生强烈的荧光, 阴性不产生荧光。

1.7 口蹄疫病毒的 RT-PCR 检测

按照 Quant 一步法 RT-PCR 试剂盒说明书进行检测。反应体系为 25 μL , 包括: 2.5 μL 10 $\times$ RT-PCR Buffer、1.0 μL 超纯 dNTPs (10 mmol/L)、5.0 μL 5 $\times$ RT-PCR Enhancer、0.25 μL RNasin (40 U/ μL)、1.75 μL Hotmaster Taq 聚合酶 (2.5 U/ μL)、0.25 μL Quant RTase (一步法)、1.5 μL 引物 FMDV-F (10 pmol/ μL)、1.5 μL 引物 FMDV-R (10 pmol/ μL)、2.0 μL RNA

模板, RNase-Free ddH₂O 补齐总体积。

反应条件: 50 $^{\circ}\text{C}$ 30 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.8 RT-PCR 产物的鉴定

取 RT-PCR 产物 10 μL 加入到加样孔中, 电泳 30 min 左右。取出凝胶放置于凝胶成像系统中, 在紫外灯照射下观察结果, 阳性在 106 bp 的位置出现条带。

1.9 RT-LAMP 敏感性试验

将提取的 FMDV 模板利用核酸蛋白检测仪测定阳性样品其 RNA 浓度后, 将其稀释不同的倍数, 按 10 倍倍比稀释^[18], 稀释成 11 个稀释度 100~10⁻¹⁰, 利用上文中的 RT-LAMP 方法和常规的 RT-PCR 方法同时检测, 比较两种不同检测方法的敏感性, 两者反应后产物的检测用琼脂糖凝胶电泳方法, 并在 RT-LAMP 反应产物中加入 SYBR Green I 核酸染料观察荧光变化。

1.10 RT-LAMP 方法特异性试验

根据建立的 RT-LAMP 反应体系和反应条件, 分别加入 FMDV、CSFV、PEDV、TGEV、PRRSV 等 RNA, 用琼脂糖凝胶电泳检测, 并在 RT-LAMP 反应产物中加入 SYBR Green I 核酸染料观察荧光变化, 以检验所建立 RT-LAMP 检测方法的特异性^[19]。

同时做 FMDV、CSFV、PEDV、TGEV、PRRSV 的 RT-PCR 检测, 按“1.7”中的 RT-PCR 反应体系, 根据以下程序进行 RT-PCR 扩增。

FMDV、PEDV 反应条件与“1.7”中相同。

CSFV、PRRSV 反应条件: 50 $^{\circ}\text{C}$ 30 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s; 55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s; 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

TGEV 反应条件: 50 $^{\circ}\text{C}$ 30 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 53 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

反应结束后, 取 RT-PCR 产物 10 μL 做琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 不同样品处理方法和 RNA 提取方法的 RNA 提取量比较

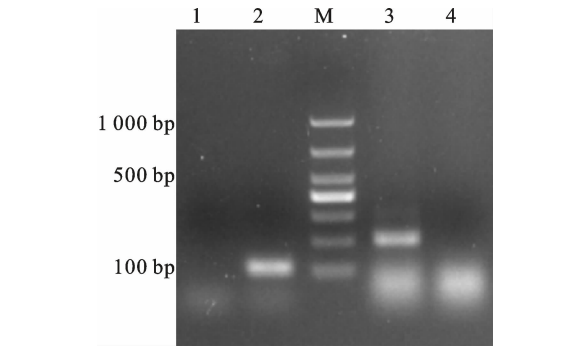
以直接使用疫苗、直接离心法、-20 $^{\circ}\text{C}$ 冻融离心法 3 种方法处理, 并比较提取 RNA 的试剂盒法和 Trizol 法, 用核酸蛋白检测仪测定 RNA

浓度并进行统计学分析。结果显示,采用试剂盒法提取 RNA 时,−20 ℃冻融离心法处理的样品 RNA 提取量较大;采用 Trizol 法提取疫苗中 RNA 时,直接从油佐剂疫苗中提取 RNA 的量最大。

比较试剂盒法和 Trizol 法,结果显示在直接使用油佐剂疫苗样品时,Trizol 提取 RNA 的量最大。在−20 ℃冻融离心法处理样品时,试剂盒法提取 RNA 的量较大。

2.2 口蹄疫病毒 RT-LAMP 反应体系

2.2.1 RT-PCR 引物和 RT-LAMP 引物鉴定
将 FMDV RT-PCR 检测引物和 RT-LAMP 引物进行 PCR 鉴定,结果见图 1。由图 1 可以看出, FMDV RT-PCR 检测引物和 RT-LAMP 引物加入阳性模板的都扩增出与预期理论值相符的片段。FMDV RT-PCR 检测引物扩增片段为 106 bp 左右,RT-LAMP 引物扩增片段为 200 bp 左右,表明设计合成的 RT-PCR 检测引物和 RT-LAMP 引物均可以对 FMDV 基因进行扩增。



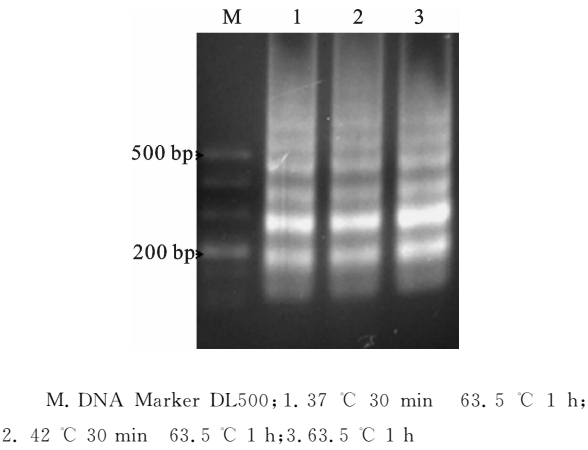
1. RT-PCR 检测引物阴性对照 Negative control with RT-PCR detection; 2. RT-PCR 检测引物阳性 Positive with RT-PCR detection; M. DNA Marker DL500; 3. RT-LAMP 引物阳性 Positive with RT-LAMP detection; 4. RT-LAMP 引物阴性对照 Negative control with RT-LAMP detection

图 1 RT-PCR 引物和 RT-LAMP 引物鉴定
Fig. 1 Identification with the detection of RT-PCR and RT-LAMP

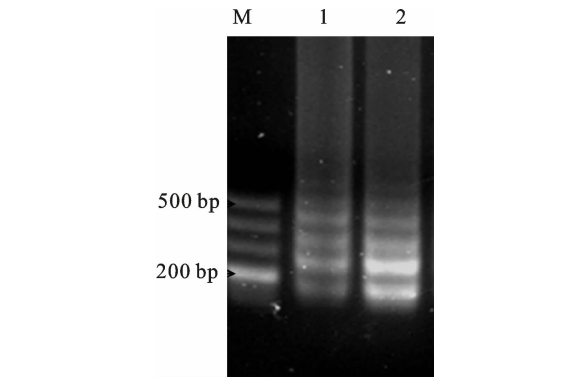
2.2.2 温度对 AMV 反转录酶的影响 温度依次设置 3 组,反应结束后各取出 10 μL 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,结果见图 2。由图 2 可以看出,3 组反应温度差距不大,AMV 反转录酶直接在 63.5 ℃恒温扩增 1 h 对结果无影响,因此将最佳反应温度和时间设定为 63.5 ℃恒温扩增 1 h。

2.2.3 RT-LAMP 反应引物浓度的优化 引物

浓度设置两组,反应结束后各取出 10 μL 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,结果见图 3。由图 3 可以看出,第 2 组比第 1 组的条带更加明显和清晰,即 RT-LAMP 反应体系外引物 F3 和 B3 各 0.5 μL,内引物 FIP 和 BIP 各 4 μL,即外引物浓度为 0.20 pmol/μL、内引物浓度为 1.60 pmol/μL 时更适宜。



M. DNA Marker DL500; 1. 37 ℃ 30 min 63.5 ℃ 1 h; 2. 42 ℃ 30 min 63.5 ℃ 1 h; 3. 63.5 ℃ 1 h
图 2 反应温度对 AMV 反转录酶转录的影响
Fig. 2 Effect of reaction temperature on AMV reverse transcriptase transcription



M. DNA Marker DL500; 1. F3/B3 0.25 μL、FIP/BIP 2 μL; 2. F3/B3 0.5 μL、FIP/BIP 4 μL

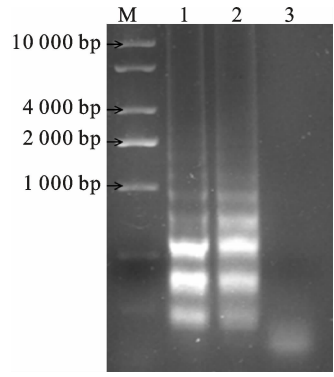
图 3 RT-LAMP 反应引物体积优化结果
Fig. 3 The optimization of primer volume in RT-LAMP reaction

2.3 口蹄疫病毒 RT-LAMP 产物的观察
根据上述已优化的反应体系,进行 RT-LAMP 反应,结束后各取出 10 μL 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,结果见图 4。再在反应管和阴性对照管中分别加入 1 μL SYBR Green I 核酸染料,观察到阳性管呈现明显的黄绿色,阴性对照为淡橙色(图 5-A)。在紫外灯下观察到阳性管中能发出荧光,而阴性对照不能(图 5-B)。

2.4 RT-LAMP 方法敏感性

反应结束后 RT-LAMP 反应和 RT-PCR 反应产物各取出 10 μ L 置于琼脂糖凝胶电泳中检测,电泳结果见图 6 和图 7。由图 6 可以看出,RT-LAMP 反应产物随着 RNA 浓度的降低,条带亮度先变亮到达最适浓度后,条带亮度逐渐减弱,检测到模板 RNA 最低稀释度为 10^{-9} 。由图 7 可以看出,RT-PCR 反应产物随着 RNA 浓度的降低条带亮度都在逐渐减弱,检测到模板 RNA 最低稀释度为 10^{-8} 。

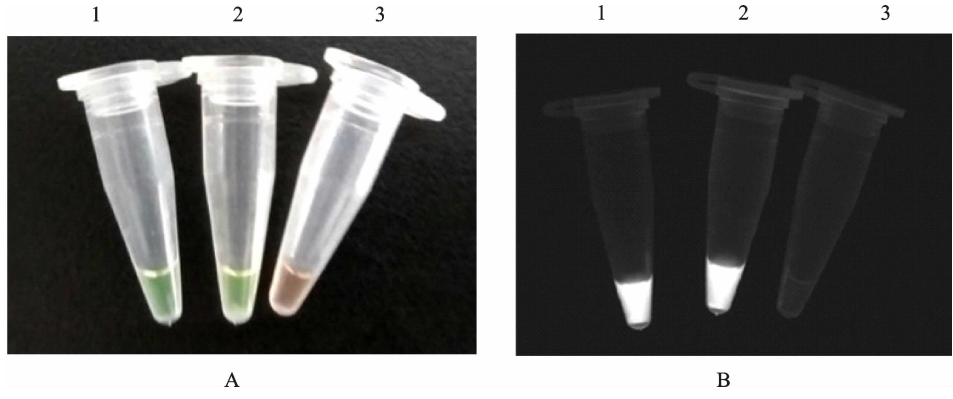
RT-LAMP 检测方法和 RT-PCR 检测方法检测模板 RNA 的最低稀释度分别是 10^{-9} 和为 10^{-8} ,表明 RT-LAMP 检测方法比 RT-PCR 检测方法更灵敏。



M. DNA Marker DL10 000;1~2. 阳性对照 Positive control;3. 阴性对照 Negative control

图 4 RT-LAMP 产物电泳结果

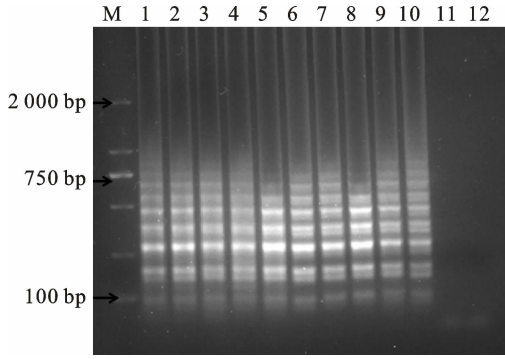
Fig. 4 Electrophoresis results of RT-LAMP product



1~2. 阳性对照 Positive control;3. 阴性对照 Negative control

图 5 RT-LAMP 产物加入 SYBR Green I 核酸染料观察(A)和紫外灯下观察(B)

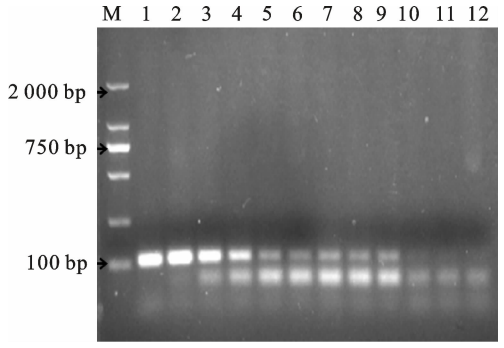
Fig. 5 SYBR Green I nucleic acid dyeing(A) and observation under UV light(B) of RT-LAMP products



M. DNA Marker DL2000;1~11. RNA 稀释度 $100 \sim 10^{-10}$ 倍 RNA dilution ratio of $100 \sim 10^{-10}$;12. 阴性对照 Negative control

图 6 RT-LAMP 敏感性试验

Fig. 6 Sensitivity detection of RT-LAMP method



M. DNA Marker DL2000;1~11. 代表 RNA 稀释度 $100 \sim 10^{-10}$ 倍 RNA dilution ratio of $100 \sim 10^{-10}$;12. 阴性对照 Negative control

图 7 RT-PCR 敏感性试验

Fig. 7 Sensitivity detection of RT-PCR method

2.5 RT-LAMP 方法特异性结果

用所建立的 RT-LAMP 方法分别检测 FMDV、CSFV、PEDV、TGEV、和 PRRSV 的 RNA，取 10 μL 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测，结果见图 8，仅看到 FMDV 样品出现明显的梯状条带，其余样品均没有条带出现。

同时设立这 5 种病毒的 RT-PCR 对照鉴定，结果见图 9，可以看到 FMDV 样品在 100 bp 的位置出现条带，CSFV 在 140 bp 位置出现条带，PEDV 在 672 bp 的位置出现条带，TGEV 在 276 bp 的位置出现条带，PRRSV 出现高致病性的条带在 400 bp 的位置，经 RT-PCR 鉴定每种病毒均出现特异性条带，证明 5 种病毒均为阳性。结合两者结果，说明所建立 RT-LAMP 方法具有良好的特异性。

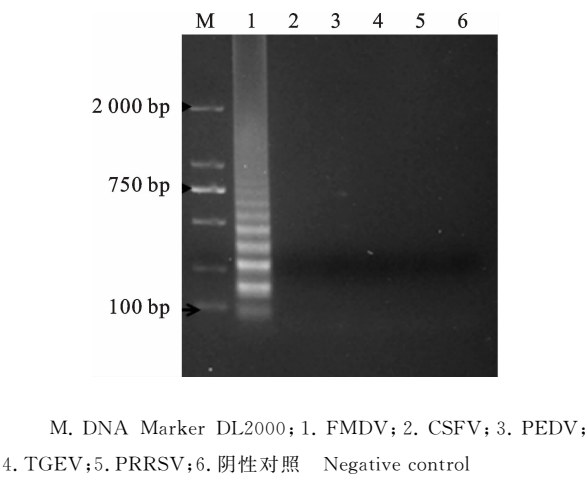


图 8 RT-LAMP 特异性试验

Fig. 8 Specific detection of RT-LAMP method

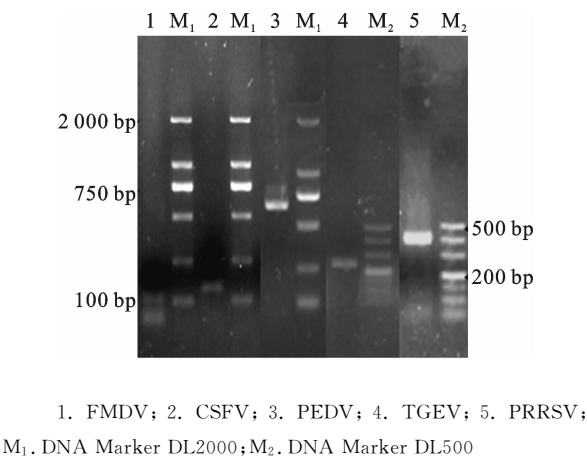


图 9 RT-PCR 对照鉴定

Fig. 9 RT-PCR identification of the control

3 讨论

根据不同的反应条件，可以将核酸扩增技术分为两类：非恒温扩增技术和恒温扩增技术，其代表方法分别是聚合酶链式反应(PCR)和环介导等温扩增技术(LAMP)^[20-21]。PCR 技术是 20 世纪 80 年代发明的核酸扩增技术，已成为重要的分子生物学研究方法，得到广泛的应用。LAMP 是 2000 年由日本科学家发明的核酸扩增技术，该技术具有操作简单、反应条件简单、快速、灵敏度高等优点，不仅适用于实验室检测，也适用于条件较差的基层实验室或者场区现场检测。该技术自发明以来引起各国科学家的关注，对其进行更深的研究及应用条件的探索，在病原微生物检测、动物胚胎性别区分、转基因食品检测等领域得到广泛应用^[22-23]，具有良好前景。

本试验是基于 LAMP 技术的操作方便、快速灵敏的特点，建立口蹄疫病毒可视化 RT-LAMP 的检测方法，为口蹄疫的现场快速诊断提供一种更加简便的方法。与吴绍强等^[13]建立的口蹄疫病毒亚洲 I 型的 RT-LAMP 检测方法不同，本研究建立口蹄疫病毒 O 型、A 型、亚洲 I 型 3 种血清型的通用检测，并与一步法的 RT-PCR 进行敏感性比较，所建立的 RT-LAMP 方法检测到模板 RNA 最低稀释度为 10⁻⁹，比 RT-PCR 方法灵敏 10 倍。

秦智锋等^[14]、李健等^[15]建立 FMDV 不同血清型的 RT-LAMP 检测方法，可以在短时间内完成 RNA 的提取和检测，均采用试剂盒法抽提核酸，其中秦智锋等采用 EZ1 Virus Mini Kit V2.0 抽提试剂盒，由仪器自动完成核酸抽提，所需的成本较高。赵毅等^[24]在口蹄疫疫苗种毒、灭活病毒液和白油乳化灭活疫苗病毒中提取病毒 RNA，建立口蹄疫病毒灭活疫苗中 VP1 基因 RNA 抽提方法。对从白油乳化灭活疫苗病毒提取的 RNA 进行探究，采用 6 种方法离心，即直接离心法、-20℃冻融离心法、1：1 加酒精冻融离心法、1：2 加酒精冻融离心法、1：3 加酒精冻融离心、加灭菌水混合后离心法。研究发现加入酒精冻融取下层清液效果最佳。在这些研究的基础上，本研究探究口蹄疫灭活疫苗中 RNA 的提取方式的不同对 RNA 提取量的影响，确定采用试剂盒法提取 RNA 时，-20℃冻融离心法处理的样品提取 RNA 量较大；采用 Trizol 法提取疫苗中 RNA

时,油佐剂疫苗直接提取法不需要经过反复冻融再离心取下清等繁琐步骤来处理,简化试验步骤,节省了时间,所测定的 RNA 浓度较高、效果最好。同时,对所建立的 RT-LAMP 体系进行优化,在最佳的反应条件和最佳的外、内引物浓度下,电泳后跑出来的特异性梯状条带更加清晰和明显。还进行了敏感性和特异性试验,确定与普通 RT-PCR 检测相比 RT-LAMP 方法具有更高的灵敏度和特异性。通过这些试验确定所建立的可视化 RT-LAMP 检测方法是一种特异性强、敏感性高、快速检测 FMDV 的方法。

由于 RT-LAMP 方法具有较高的敏感性,检测到模板 RNA 最低稀释度为 10^{-9} ,而且 RT-LAMP 方法扩增出的产物量极大,操作过程如果不规范,在开盖检测产物的过程中可能散布到环境中,形成气溶胶,残留在设备上,通过气溶胶和用具的污染可以引起假阳性的发生,所以操作一定要严格按照规定进行,注意消毒,防止气溶胶的污染^[25]。

由于口蹄疫是一种急性传染病,具有高度接触传染性,是世界动物卫生组织要求通报的动物疫病,对口蹄疫有严格的生物安全管理规定,分离口蹄疫病毒必须在有资质的实验室进行^[26],因此,常规的实验室对病原学的检测只能是对疑似病料的分子生物学检测,不能进行相关的临床检测。所以选择灭活疫苗为材料提取病毒的核酸。所建立方法的临床检测还需要在有资质的实验室与生产实践中进一步确认和验证。

参考文献 Reference:

- [1] 李长友,秦德超,肖 肖,等.一二三类动物疫病释义[M].北京:中国农业出版社,2011:1-9.
LI CH Y, QIN D CH, XIAO X, *et al.* List 1, 2 and 3 Animal Diseases[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2011: 1-9.
- [2] BRUNO R M, SALVATI A, BARZACCHI M, *et al.* Predictive value of dynamic renal resistive index for renal outcome in type 2 diabetes and essential hypertension: a prospective study [J]. *Cardiovascular Diabetology*, 2015, 14(1): 1-9.
- [3] BERGMANN I E, MALIRAT V L, NEITZERT E L. Non-capsid proteins to identify foot-and-mouth disease viral circulation in cattle irrespective of vaccination[J]. *Biologicals*, 2005, 33(4): 235-239.
- [4] CAPOZZO, ALEJANDRA VICTORIA, MARTINEZ, *et al.* Development of an in process control filtration-assisted chemiluminometric immunoassay to quantify foot and mouth disease virus non-capsid proteins in vaccine-antigen batches[J]. *Vaccine*, 2010, 28(40): 6647-6652.
- [5] 卢曾军,刘在新.口蹄疫病毒研究概况[J].中国兽医科技, 2003, 33(2): 69-74.
LU Z J, LIU Z X. Research overview of foot-and-mouth disease virus [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 2003, 33(2): 69-74.
- [6] 朱志坚,连凯琪,郑海学,等.口蹄疫病毒入侵宿主细胞研究进展[J].中国生物工程杂志, 2015, 35(5): 103-108.
ZHU ZH J, LIAN K Q, ZHENG H X, *et al.* The research progress about invasion of foot and mouth virus to cells[J]. *China Biotechnology*, 2015, 35(5): 103-108.
- [7] 魏玉明,钱振波.规模养殖猪场主要疫病流行病学和血清学调查报告[J].畜牧兽医杂志, 2017, 36(1): 97-101.
WEI Y M, QIAN ZH B. Report on epidemiological and serological of major diseases on scale swine farms[J]. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2017, 36(1): 97-101.
- [8] 王莉娟,徐天刚,赵云玲,等.口蹄疫诊断技术研究进展[J].中国畜牧兽医, 2005, 32(3): 41-44.
WANG L J, XU T G, ZHAO Y L, *et al.* The research progress on diagnosis technology of foot-and-mouth disease [J]. *China Animal Husbandry Veterinary Medicine*, 2005, 32(3): 41-44.
- [9] SAMUEL A R, KNOWLES N J. Foot-and-mouth disease virus: cause of the recent crisis for the UK livestock industry [J]. *Trends in Genetics*, 2001, 17(8): 421-424.
- [10] NOTOMI T, MORI Y, TOMITA N, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification: principle features and future prospects[J]. *Journal of Microbiology*, 2015, 53(1): 1-5.
- [11] ONO M, OKUDA Y, SHIBATA I, *et al.* Reproduction of adenoviral gizzard erosion by the horizontal transmission of fowl adenovirus serotype 1 [J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2007, 69(10): 1005-1008.
- [12] HANG M P, CHIE N, KAZUHIKO O, *et al.* Loop-Mediated isothermal amplification for rapid detection of Newcastle disease virus [J]. *American Society for Microbiology*, 2005, 43(4): 1646-1650.
- [13] 吴绍强,孙晓智,林祥梅,等.亚洲 I 型口蹄疫病毒环介导等温扩增检测方法的建立[J].检验检疫科学, 2008, 18(1): 9-12.
WU SH Q, SUN X ZH, LIN X M, *et al.* Loop-Mediated isothermal amplification of foot-and-mouth disease virus serotype Asia I [J]. *Inspection and Quarantine Science*, 2008, 18(1): 9-12.
- [14] 秦智锋,毕英佐,曾少灵,等.口蹄疫病毒 RT-LAMP 检测方法的建立[J].中国预防兽医学报, 2008, 30(5): 375-378.
QIN ZH F, BI Y Z, ZENG SH L, *et al.* Development of a novel RT-LAMP assay for foot-and-mouth disease virus [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2008, 30(5): 375-378.
- [15] 李 健,陈 沁,熊 炜,等.口蹄疫病毒 RT-LAMP 检测方法的建立[J].病毒学报, 2009, 25(2): 137-142.

- LI J, CHEN Q, XIONG W, *et al.* Establishment of RT-LAMP for rapid detection of foot-and-mouth disease virus [J]. *Chinese Journal of Virology*, 2009, 25(2): 137-142.
- [16] NOTOMI T, MORI Y, TOMITA N, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification: principle features and future prospects[J]. *Journal of Microbiology*, 2015, 53(1): 1-5.
- [17] 徐淑菲, 孔繁德, 苗 丽, 等. LAMP 技术研究进展及其在动物疫病检测中的应用[J]. *中国动物检疫*, 2017, 34(1): 75-80.
- XU SH F, KONG F D, MIAO L, *et al.* Research progress of LAMP technology and its application in animal diseases detection [J]. *China Animal Health Inspection*, 2017, 34(1): 75-80.
- [18] 李秀梅, 梁智选, 李 颖, 等. 环介导等温扩增技术与横向流动试纸条法快速检测单增李斯特菌的研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2016, 38(10): 804-808.
- LI X M, LIANG ZH X, LI Y, *et al.* Rapid and sensitive detection of *Listeria monocytogenes* by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral-flow dipstick [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2016, 38(10): 804-808.
- [19] 罗忠永, 王 印, 杨泽晓. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 LAMP 检测方法的建立[J]. *动物医学进展*, 2016, 37(3): 1-5.
- LUO ZH Y, WANG Y, YANG Z X. Development of a LAMP Method for PRRSV [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2016, 37(3): 1-5.
- [20] 蒋 涛, 曾光远, 唐顺明, 等. 环介导等温扩增技术原理及其在农业中的应用[J]. *江苏科技大学学报(自然科学版)*, 2017, 31(1): 107-113.
- JIANG T, ZENG G Y, TANG SH M, *et al.* Principle of loop-mediated isothermal amplification and its application in agriculture[J]. *Journal of Jiangsu University of Science and Technology (Natural Science Edition)*, 2017, 31(1): 107-113.
- [21] DUKES J P, KING D P, Alexandersen S. Novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of foot-and-mouth disease virus [J]. *Archives of Virology*, 2006, 151: 1093-1106.
- [22] 秦文韬, 王忠跃, 张 昊. 环介导恒温扩增技术及其在植物病毒检测中的研究进展[J]. *中国农学通报*, 2013, 29(21): 170-174.
- QIN W T, WANG ZH Y, ZHANG H. The progress of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and its application in detection of plant virus [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013, 29(21): 170-174.
- [23] PARIDA M, HORIOKE K, ISHIDA H, *et al.* Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(6): 2895-2903.
- [24] 赵 毅, 雷 震, 王玉红, 等. 口蹄疫病毒灭活疫苗中 VP1 基因 RNA 抽提方法的建立[J]. *中国畜牧兽医*, 2009, 36(2): 58-61.
- ZHAO Y, LEI ZH, WANG Y H, *et al.* The isolation method establishment of VP1 gene RNA in inactivated vaccine against foot-and-mouth disease [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2009, 36(2): 58-61.
- [25] POON L L M, LEUNG C S W, CHAN K H, *et al.* Detection of human influenza A viruses by loop-mediated isothermal amplification [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43: 427-430.
- [26] 范钦磊, 刘俊辉, 张衍海, 等. 口蹄疫区域化管理国际规则[J]. *动物医学进展*, 2015, 36(11): 114-117.
- FAN Q L, LIU J H, ZHANG Y H, *et al.* International rules of zoning and compartmentalisation for foot-and-mouth disease [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2015, 36(11): 114-117.

Establishment of a Visible Detection of Foot-and-Mouth Disease Virus by Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay

WANG Weihua¹, LIU Guimei¹, WU Qiqiang², HUANG Pengbo²,
BAI Ge² and WANG Guochao²

(1. Weinan Vocational & Technical College, Weinan Shaanxi 714000, China;

2. Animal Diseases Control & Prevention Centre of Weinan City, Weinan Shaanxi 714000, China)

Abstract To establish a visible detection of foot-and-mouth disease virus(FMDV) by Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP), using the vaccine against foot and mouth disease as materials and designing two RT-LAMP primers, the FMDV visualization RT-LAMP detection method was established, and compared with the common PCR method. The specificity test and sensitivity test were carried out simultaneously. The results showed that based on the comparison of the extraction of FMDV nucleic acid from oil adjuvant vaccine, the three sample treatments had no significant effect on the RNA extraction of the virus when extracted with the commercialization kit. The trizol method was used to extract RNA, and the amount of RNA obtained by direct extraction of oil adjuvant vaccine was the highest, which was significantly different from that of the other two methods ($P < 0.01$). A visualization RT-LAMP method to detection foot-and-mouth disease virus was established. The method was high specificity with the lowest detection limit of 10^{-9} dilution of RNA sample, 10-fold higher than that of RT-PCR, showed the method. The novel assay RT-LAMP was a rapid, simple, sensitive, and specific test for FMDV, and it could be applied in field conditions.

Key words Foot-and-mouth disease virus(FMDV); Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification(RT-LAMP); Detection

Received 2018-07-25

Returned 2018-09-09

Foundation item Shaanxi Province of Agricultural Science and Technology Innovation and Transformation Project(No. NYKJ-2015-021).

First author WANG Weihua, male, Ph. D, associate professor. Research area: prevention and control of animal diseases. E-mail: 278954165@qq.com

(责任编辑:郭柏寿 Responsible editor:GUO Baishou)