

网络出版时间:2021-05-17 11:28 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2021.11.002  
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20210517.1036.009.html

# 猪萨佩罗病毒 *TaqMan* 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立

李倩倩<sup>1</sup>, 赵福杰<sup>1</sup>, 丁庆文<sup>1</sup>, 张云飞<sup>1</sup>, 郑兰兰<sup>1,2</sup>

(1 河南农业大学 动物医学院, 河南 郑州 450002; 2 河南省动物性食品安全重点实验室, 河南 郑州 450002)

**[摘要]** **【目的】**建立快速、特异、灵敏的猪萨佩罗病毒(porcine sapelovirus, PSV) *TaqMan* 实时荧光定量(RT-qPCR)检测方法,为临床快速检测 PSV 提供新方法。**【方法】**参照 GenBank 中 PSV 的全基因序列,针对 PSV 5'端保守区设计 1 对特异性引物,PCR 扩增目的片段,将目的片段克隆至 pMD-18T 载体,构建阳性重组质粒,并以阳性质粒标准品为模板,建立标准曲线。在此基础上,设计特异性引物与探针,进行反应体系和反应条件优化,建立 PSV *TaqMan* RT-qPCR 检测方法,并对方法的敏感性、特异性和重复性进行验证。应用建立的方法对 2018—2019 年在河南不同地区猪场收集的 83 份样品(粪便样品 39 份,肠道样品 44 份)进行检测。**【结果】**建立了 PSV *TaqMan* RT-qPCR 检测方法,该方法的灵敏度为  $3.88 \times 10^1$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ;与猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒、猪  $\delta$  冠状病毒和猪繁殖与呼吸综合征病毒均无交叉反应,特异性良好;批内与批间变异系数均小于 1.0%,重复性较好。临床样品检测结果表明,*TaqMan* RT-qPCR 检测 PSV 呈阳性的样品有 31 份(22 份粪便样品,9 份肠道样品)检出率为 37.3%(31/83),显著高于普通 PCR 检测结果(检出率 12.0%(10/83))。**【结论】**建立了 *TaqMan* RT-qPCR 检测方法,该方法灵敏度高,特异性好。

**[关键词]** 猪萨佩罗病毒; 5'非编码区; *TaqMan* 实时荧光定量 PCR; 河南

**[中图分类号]** S852.65<sup>+</sup>9.6

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2021)11-0010-07

## Establishment of a *TaqMan* fluorescent real-time quantitative PCR for detection of porcine sapelovirus

LI Qianqian<sup>1</sup>, ZHAO Fujie<sup>1</sup>, DING Qingwen<sup>1</sup>, ZHANG Yunfei<sup>1</sup>, ZHENG Lanlan<sup>1,2</sup>

(1 College of Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China;

2 Henan Key Laboratory of Animal Food Safety, Zhengzhou, Henan 450002, China)

**Abstract:** **【Objective】**This study established a rapid, efficient and stable *TaqMan* fluorescent real-time quantitative PCR(RT-qPCR)method for the detection of the porcine sapelovirus (PSV), which provide a new method for clinically rapid detection of PSV. **【Method】**A pair of specific primers were designed by selecting conservative region of 5'UTR based on complete sequences of PSV from GenBank. The target fragment was amplified by PCR and cloned into pMD-18T vector to construct a positive standard plasmid. Taking the positive plasmid as the template, the standard curve was established. Another pair of primers and probe were designed, and reaction system and conditions were optimized. The sensitivity, specificity and reproducibility of the assay were verified. This method was used to test 83 samples (39 feces samples and 44

**[收稿日期]** 2020-12-03

**[基金项目]** 国家重点研发计划项目(2018YFD0501205)

**[作者简介]** 李倩倩(1994—),女,河南洛阳人,在读硕士,主要从事病原微生物和分子病毒学研究。  
E-mail:2923798780@qq.com

**[通信作者]** 郑兰兰(1982—),女,河南开封人,副教授,博士,主要从事病原微生物和分子病毒学研究。  
E-mail:lanlan@henau.edu.cn

intestinal samples) collected from swine farms in different regions of Henan from 2018 to 2019.【Result】The *TaqMan* RT-qPCR method for detection of PSV was established with sensitivity of  $3.88 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$ . There was no cross-reaction with porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), porcine transmissible gastroenteritis virus (TGEV), porcine delta coronavirus (PDCoV) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), indicating this method had good specificity. The coefficients of variation (CV) of intra-assay and inter-assay were less than 1.0%, which indicated that this method had good repeatability. The results of clinical samples showed that 31 samples (22 feces samples and 9 intestinal samples) were positive for PSV by *TaqMan* RT-qPCR with detection rate of 37.3% (31/83), which was significantly higher than 12.0% (10/83) by conventional PCR.【Conclusion】The *TaqMan* RT-qPCR assay established in this study had high sensitivity and specificity.

**Key words:** porcine sapelovirus (PSV); 5' UTR; *TaqMan* RT-qPCR; Henan

猪萨佩罗病毒 (porcine sapelovirus, PSV) 是球形、无囊膜、直径约 30 nm 的单股正链 RNA 病毒, 属于小 RNA 病毒科, 萨佩罗病毒属<sup>[1]</sup>。PSV 全基因组大小约为 7.5 kb, 含有一个开放阅读框, 编码 4 个结构蛋白 (VP1~VP4) 和 7 个非结构蛋白 (2A~2C, 3A~3D)<sup>[2]</sup>。由于 PSV 最初是从腹泻猪的肠道中分离得到, 故曾命名为猪肠道病毒 (porcine enterovirus, PEV) 8 型, 属于 PEV II 群<sup>[3]</sup>。PSV 只有一种血清型, 可感染家猪和野猪<sup>[4]</sup>, 引起猪腹泻、肺炎、繁殖障碍、脑脊髓炎等多系统综合征, 同时也可表现为无明显症状的亚临床感染<sup>[5]</sup>, 若不加以防控, 会给养猪业带来较大的威胁<sup>[6]</sup>。PSV 的发现最早可追溯到 20 世纪 60 年代的英国<sup>[7]</sup>, 之后在中国、西班牙、巴西、韩国<sup>[5,8-10]</sup> 等国家被相继报道, 在世界范围内分布广泛。Lan 等<sup>[5]</sup> 对中国华东地区 2009—2010 年收集的 960 份猪粪便样本进行流行病学调查, 结果发现, PSV 感染的阳性率为 17.2%, 且 10~20 周龄的猪感染率最高。Cano-Gómez 等<sup>[8]</sup> 对来自西班牙的 63 份猪腹泻样品进行检测, PSV 的阳性率为 6.4%, 而且发现该病毒与猪捷申病毒等病原存在混合感染现象。Son 等<sup>[10]</sup> 对 100 份猪腹泻病料进行检测, PSV 的感染率高达 34%, 但是单独感染 PSV 的阳性率仅为 5.9%。

目前, 针对 PSV 的检测方法主要有病毒分离与鉴定<sup>[5]</sup>、RT-PCR<sup>[2]</sup> 和间接免疫荧光<sup>[11]</sup> 方法等, 这些方法在临床检测中发挥了重要作用。但这些检测方法相对费时, 且敏感性较差, 不适宜进行 PSV 早期感染的诊断, 并且这些方法均不能对宿主体内病毒含量进行准确定量, 因此建立一种快速、可定量、灵敏的检测方法对 PSV 的临床诊断是非常必要的。本研究建立了 PSV *TaqMan* 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测方法, 并对该方法的敏感性、特异

性、重复性以及临床应用效果进行了验证, 以期对 PSV 的早期诊治提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 毒株和临床检测样品 猪萨佩罗病毒、猪传染性胃肠炎病毒 (transmissible gastroenteritis virus, TGEV)、猪  $\delta$  冠状病毒 (porcine deltacoronavirus, PDCoV)、猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 和猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV), 均由河南省动物性食品安全重点实验室鉴定并保存。临床病料 83 份, 为 2018—2019 年在河南不同地区猪场收集到的样本, 其中粪便样品 39 份 (河南省周口市 22 份, 平顶山市 7 份, 许昌市 4 份, 开封市 4 份, 新乡市 2 份), 肠道样品 44 份 (剖检自腹泻仔猪, 南阳市 17 份, 漯河市 7 份, 鹤壁市 5 份, 新乡市 4 份, 开封市 4 份, 周口市 4 份, 平顶山市 3 份)。

1.1.2 试剂及仪器 核酸纯化柱 (RNA 专用), 购自索莱宝生物科技有限公司; 反转录试剂盒、质粒提取试剂盒, 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; BM 2000+DNA Marker, 购自北京博迈德生物技术有限公司; DNA 凝胶回收试剂盒, 购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司; Premix Ex *Taq*<sup>TM</sup>、pMD-18T 载体、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; CFX96 实时荧光定量 PCR 仪, 购自 Bio-Rad 公司 (美国)。

1.1.3 引物和探针的设计与合成 从 GenBank 下载 PSV 的全基因序列, 选择其保守的 5' UTR 设计 2 对特异引物 F1/R1 和 F2/R2 及探针 P (表 1), 引物和探针由上海生工生物工程技术有限公司合

成,探针 P 的 5'端标记 FAM 荧光报告基团,3'端标记 TAMRA-N 荧光淬灭基团。

表 1 引物与探针信息

Table 1 Information of primers and probe

| 引物及探针<br>Primer and probe | 序列(5'→3')<br>Sequence(5'→3')         | 扩增产物长度/bp<br>Product size | 退火温度/℃<br>Annealing temperature |
|---------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| F1                        | TGCTCCTTTGGTGATTCTGG                 | 200                       | 58.0                            |
| R1                        | CGACCCTATCAGGCAGTATAGA               |                           |                                 |
| F2                        | ACTTGACGAGCGTCTCTTTG                 | 105                       | 56.0                            |
| R2                        | CGACCCTATCAGGCAGTATAGA               |                           |                                 |
| P                         | FAM-AGTGAGCTTCCAGGTTGGGAAACC-TAMRA-N |                           | 60.0                            |

注:探针序列中 5'端和 3'端分别用 FAM 和 TAMRA-N 标记。  
Note:The 5' and 3' ends of the probe sequence were labeled with FAM and TAMRA-N, respectively.

1.2 核酸提取及反转录

将病毒样品和临床样品经无菌处理后,参照 TRIzol 总 RNA 提取说明书提取 PSV、TGEV、PD-CoV、PEDV 和 PRRSV 等的总 RNA,利用 Vazyme 反转录试剂盒反转录为 cDNA,−20 ℃ 保存。

1.3 阳性质粒标准品的制备

以 PSV cDNA 为模板进行 PCR 扩增,并设以 ddH<sub>2</sub>O 代替模板的处理作为阴性对照。PCR 反应体系为:2×Rapid Taq Master Mix 13 μL,ddH<sub>2</sub>O 9 μL,F1 和 R1 引物各 0.5 μL,模板 2 μL。PCR 反应程序为:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 5 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后,使用 V-ELUTE Gel Mini Purification Kit 回收目的片段,将目的片段连接到 pMD-18T 载体上,将连接产物转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,经氨苄抗性的固体 LB 平板培养基筛选后挑取疑似单一菌落,扩大培养,送菌液到武汉奥科鼎盛生物科技有限公司进行测序鉴定。提取阳性重组质粒,测定浓度之后计算拷贝数,用去离子水将重组质粒稀释成(3.88×10<sup>0</sup>)~(3.88×10<sup>9</sup>) 拷贝/μL 的溶液,作为模板标准品,用于标准曲线的绘制。

1.4 PSV TaqMan RT-qPCR 检测方法的建立

1.4.1 荧光定量 PCR 反应体系和条件的优化 以 3.88×10<sup>5</sup> 拷贝/μL 的标准质粒为模板,进行 TaqMan RT-qPCR 反应,反应总体积为 25 μL: Premix Ex Taq™ 12.5 μL,模板 cDNA 3 μL,10 μmol/L 引物 F2、R2 各 0.25,0.4,0.5,0.75 或 1.0 μL,5 μmol/L 探针 P 0.5,0.8,1.0,1.5 或 2.0 μL,其余用 ddH<sub>2</sub>O 补齐。依据引物和探针的退火温度分别在 56,58,60,62 ℃ 退火进行反应。对比不同条件下的反应结果,确定最终反应体系与反应条件。

1.4.2 标准曲线的建立 选取(3.88×10<sup>2</sup>)~

(3.88×10<sup>8</sup>) 拷贝/μL 的标准质粒作为模板,同时设置阴性对照(以 ddH<sub>2</sub>O 代替模板),采用 1.4.1 节优化的反应体系与反应条件进行 RT-qPCR 扩增,以读取的循环阈值(C<sub>t</sub>)为 y 轴,以标准质粒含量(拷贝/μL)的常用对数值为 x 轴,绘制 C<sub>t</sub> 与质粒含量的标准曲线。

1.4.3 敏感性试验 分别用(3.88×10<sup>0</sup>)~(3.88×10<sup>9</sup>) 拷贝/μL 的质粒作为模板,采用 1.4.1 节优化的反应体系与反应条件进行试验,测定该方法敏感性。同时进行普通 PCR 敏感性测定。

1.4.4 特异性试验 按照 1.4.1 节建立的反应体系,分别以 PEDV、PDCoV、TGEV 和 PRRSV 核酸为模板,同时设 3.88×10<sup>5</sup> 拷贝/μL 的标准质粒为阳性对照,ddH<sub>2</sub>O 代替模板处理为阴性对照,进行 TaqMan RT-qPCR 扩增,重复 2 次,检验该方法的特异性。

1.4.5 重复性试验 分别选取 3.88×10<sup>2</sup>,3.88×10<sup>5</sup>,3.88×10<sup>8</sup> 拷贝/μL 的标准质粒作为模板,进行 3 次批内与批间 TaqMan RT-qPCR 反应,根据每次试验的 C<sub>t</sub> 值计算变异系数,验证该方法的重复性。

1.5 临床样品的检测

应用本研究建立的 TaqMan RT-qPCR 方法,对 2018—2019 年收集自河南部分地区猪场的 83 份样品进行检测,同时进行普通 PCR 检测,验证该方法的临床应用效果。

2 结果与分析

2.1 PSV TaqMan RT-qPCR 反应体系和条件的优化

经过对引物、探针用量和退火温度的优化,最终确定 RT-qPCR 反应体系如下: Premix Ex Taq™ 12.5 μL,引物 F2 和 R2 各 0.5 μL,探针 P 1 μL,cDNA 模板 3 μL,去离子水 7.5 μL。最佳反应条件为

95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,共 40 个循环。

2.2 PSV *TaqMan* RT-qPCR 标准曲线的建立

*Ct* 值(*y*)与标准质粒含量(拷贝/ $\mu$ L)的常用对数值(*x*)的回归方程为  $y=-3.515x+41.808$ ,相关系数  $R^2$  为 0.998(图 1),表明 *Ct* 值与倍比稀释的标准质粒之间具有良好的线性关系。

2.3 PSV *TaqMan* RT-qPCR 检测方法的敏感性

用建立的 *TaqMan* RT-qPCR 方法对  $(3.88\times 10^0)\sim(3.88\times 10^9)$  拷贝/ $\mu$ L 的标准质粒进行试验。结果显示,该方法对标准质粒的检测下限为  $3.88\times 10^1$  拷贝/ $\mu$ L(图 2),而普通 PCR 的检测下限为  $3.88\times 10^3$  拷贝/ $\mu$ L(图 3)。结果表明,*TaqMan* RT-qPCR 的敏感性是普通 PCR 的 100 倍。

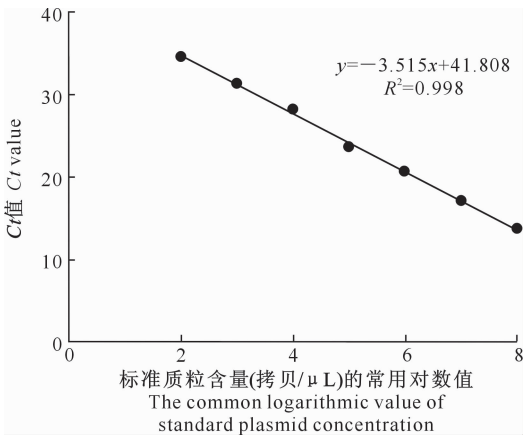
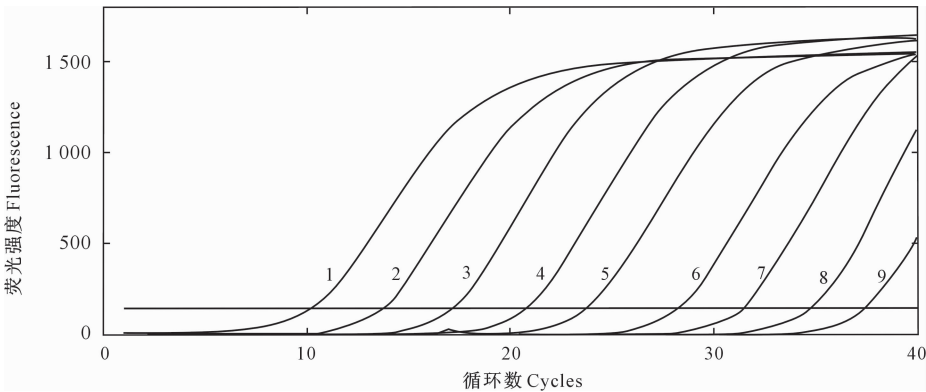
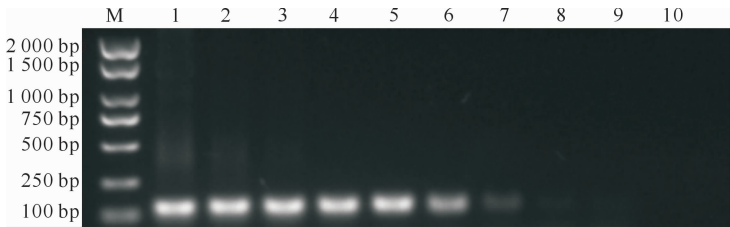


图 1 PSV *TaqMan* RT-qPCR 标准曲线  
Fig. 1 Standard curve of PSV *TaqMan* RT-qPCR



1~9. 分别为  $(3.88\times 10^9)\sim(3.88\times 10^1)$  拷贝/ $\mu$ L 标准质粒的扩增结果  
1-9. Amplification of standard plasmids  $(3.88\times 10^9)-(3.88\times 10^1)$  copies/ $\mu$ L

图 2 PSV *TaqMan* RT-qPCR 检测方法的敏感性试验  
Fig. 2 Sensitivity test of PSV by *TaqMan* RT-qPCR method



M. DNA Maker BM 2000+;1~9. 依次为  $(3.88\times 10^9)\sim(3.88\times 10^1)$  拷贝/ $\mu$ L 标准质粒的扩增结果;10. 阴性对照  
M. DNA Maker BM 2000+;1-9. Amplification of standard plasmids  $(3.88\times 10^9)-(3.88\times 10^1)$  copies/ $\mu$ L;  
10. Negative control

图 3 PSV 普通 PCR 检测方法的敏感性试验

Fig. 3 Sensitivity test of PSV conventional PCR method

2.4 PSV *TaqMan* RT-qPCR 检测方法的特异性

特异性试验结果(图 4)表明,除阳性对照之外, PEDV、PDCoV、TGEV 和 PRRSV 的扩增结果均呈

阴性,说明该方法能够检测出 PSV,而不与其他病毒(PEDV、PDCoV、TGEV 和 PRRSV)出现交叉反应,具有良好的特异性。

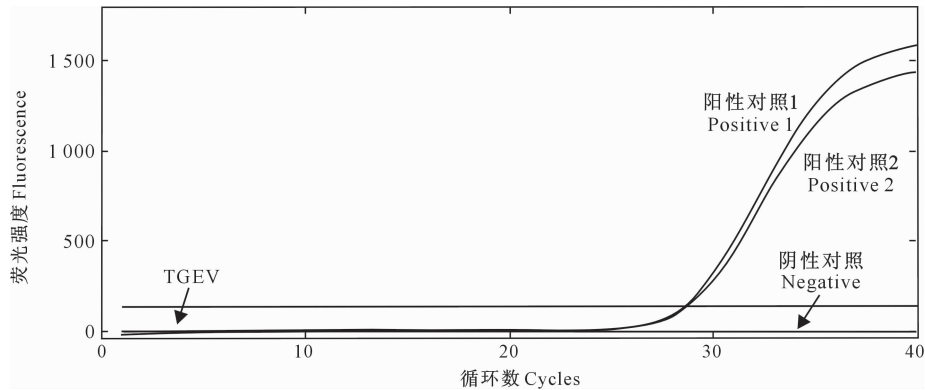


图 4 PSV TaqMan RT-qPCR 检测方法的特异性试验(以 TGEV 为例)

Fig. 4 Specificity test of PSV TaqMan RT-qPCR method (TGEV as example)

2.5 PSV TaqMan RT-qPCR 检测方法的重复性 显示批内与批间 Ct 值的变异系数均小于 1.0%(表 2),表明该方法的重复性较好。

分别以  $3.88 \times 10^2$ ,  $3.88 \times 10^5$ ,  $3.88 \times 10^8$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准质粒作为模板进行重复性试验,结果

| 表 2 PSV TaqMan RT-qPCR 检测方法的重复性                           |                                                                    |                  |                                    |
|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|------------------|------------------------------------|
| Table 2 Reproducibility test of PSV TaqMan RT-qPCR method |                                                                    |                  |                                    |
| 重复性试验<br>Reproducibility test                             | 标准质粒浓度/(拷贝· $\mu\text{L}^{-1}$ )<br>Standard plasmid concentration | Ct 值<br>Ct value | 变异系数/%<br>Coefficient of variation |
| 批内重复<br>Intra-assay                                       | $3.88 \times 10^8$                                                 | $13.67 \pm 0.02$ | 0.2                                |
|                                                           | $3.88 \times 10^5$                                                 | $23.19 \pm 0.06$ | 0.3                                |
|                                                           | $3.88 \times 10^2$                                                 | $34.53 \pm 0.11$ | 0.3                                |
| 批间重复<br>Inter-assay                                       | $3.88 \times 10^8$                                                 | $13.82 \pm 0.12$ | 0.8                                |
|                                                           | $3.88 \times 10^5$                                                 | $23.29 \pm 0.02$ | 0.1                                |
|                                                           | $3.88 \times 10^2$                                                 | $34.59 \pm 0.16$ | 0.4                                |

### 2.6 临床样品检测

PSV TaqMan RT-qPCR 方法对 83 份临床样本的检测结果显示,PSV 阳性样品有 31 份,检出率为 37.3%(31/83),其中粪便阳性样品 22 份,PSV 含量为  $(2.1 \times 10^3) \sim (8.5 \times 10^4)$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ;肠道阳性样品 9 份,PSV 含量为  $(3.7 \times 10^2) \sim (8.7 \times 10^3)$  拷贝/ $\mu\text{L}$ 。普通 PCR 方法检测呈阳性的样品有 10 份(粪便阳性样品 7 份,肠道阳性样品 3 份),检出率为 12.0%(10/83),检出率明显低于 TaqMan RT-qPCR 方法。普通 PCR 检测呈阳性的样品, TaqMan RT-qPCR 方法检测也均呈阳性。随机选取 3 份 TaqMan RT-qPCR 方法阳性而普通 PCR 方法检测阴性的样本进行测序鉴定,结果呈 PSV 阳性,表明本研究建立的方法检出率高,准确性好,可用于 PSV 的临床流行病学调查。

## 3 讨论

PSV 主要感染家猪和野猪,对任何年龄段的猪均有感染性,特别是断奶仔猪更易受到该病毒的感染<sup>[12-13]</sup>,是引起猪肠炎、肺炎、脑脊髓灰质炎和繁殖障碍等症状的重要病原体<sup>[14]</sup>。近年来,PSV 在猪群

中的感染呈上升趋势,且易与猪瘟病毒、猪细小病毒、猪捷申病毒、猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒等发生混合感染<sup>[15-16]</sup>,造成感染猪出现严重的临床症状,康复猪持续带毒,怀孕母猪流产或产死胎,给养猪业带来巨大的经济损失<sup>[17]</sup>。

PSV 的检测方法有病毒分离鉴定<sup>[18]</sup>、普通 RT-PCR<sup>[2]</sup>、荧光定量 PCR<sup>[17,19]</sup>、环介导扩增等温<sup>[20]</sup>和 ELISA<sup>[21]</sup>等技术。病毒分离是传统的鉴定方法之一<sup>[22-23]</sup>,Lan 等<sup>[5]</sup>分离了中国第一株猪萨佩罗病毒,并通过电镜观察到病毒的外部结构,但是该方法耗时长、需要无菌环境,对临床快速诊断有一定局限性;普通 PCR 可应用于大量样本的检测,检测成本较低,但不能对病原进行定量检测,且不适用于病毒的早期诊断。环介导扩增等温技术是一种新兴的基因扩增技术,采用恒温在较短时间就可实现核酸扩增,并且无需后续的核酸凝胶电泳过程,简化了试验过程,避免了可能出现的操作污染的发生<sup>[24]</sup>。ELISA 方法利用抗原抗体特异性结合的特点对病毒进行检测,但是抗体制备花费时间较长,因此也不能及时有效地用于临床诊断。

实时荧光定量 PCR 方法是基于 SYBR Green

Ⅱ 和探针法的一种检测方法,目前被广泛应用于病原的早期检测及流行病学调查<sup>[25]</sup>,由于其灵敏度较高,特异性较强,而且能够定量检测样品中的核酸含量,成为目前在临床检测上最准确的方法之一<sup>[26]</sup>。*TaqMan* 探针法既实现了 PCR 对核酸的高效扩增,规避了普通 PCR 技术因核酸含量低造成的漏检,又具有特异性强和灵敏性高的优点<sup>[27]</sup>。郭博等<sup>[17]</sup>建立的 PSV SYBR Green Ⅱ 实时荧光定量 PCR 检测方法,检测下限为  $6.37 \times 10^2$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ,而本研究建立的 *TaqMan* RT-qPCR 检测方法检测下限为  $3.88 \times 10^1$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ,相较于前者来说,灵敏度更高。

郭博等<sup>[17]</sup>采用 SYBR Green Ⅱ 实时荧光定量 PCR 检测方法对四川省部分地区的 58 份猪腹泻粪便进行检测,阳性率为 56.9%。孙杰等<sup>[21]</sup>采用 ELISA 方法对 2016 年采自江苏省 6 个不同地区猪场的 281 份临床血清样品进行了检测,PSV 抗体阳性率为 38.43%。本研究对 83 份临床样品进行 PSV 检测,结果显示,阳性率为 37.3% (31/83),说明 PSV 在中国的猪场已经普遍存在,需要引起重视。

本研究建立的 PSV *TaqMan* 实时荧光定量 PCR 方法,对 PSV 的流行病学调查提供了技术支撑,有利于我国猪群中 PSV 的监测和防控。

## [参考文献]

- [1] Tseng C H, Tsai H J. Sequence analysis of a duck picornavirus isolate indicates that it together with porcine enterovirus type 8 and simian picornavirus type 2 should be assigned to a new picornavirus genus [J]. *Virus Research*, 2007, 129(2): 104-114.
- [2] Chen J W, Chen F, Zhou Q F, et al. Complete genome sequence of a novel porcine sapelovirus strain YC2011 isolated from piglets with diarrhea [J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(19): 10898.
- [3] Kaku Y, Sarai A, Murakami Y, et al. Genetic reclassification of porcine enteroviruses [J]. *Journal of General Virology*, 2001, 82(2): 417-424.
- [4] Schock A, Gurrall R, Fuller H, et al. Investigation into an outbreak of encephalomyelitis caused by a neuroinvasive porcine sapelovirus in the United Kingdom [J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 172(3/4): 381-389.
- [5] Lan D, Ji W, Yang S, et al. Isolation and characterization of the first Chinese porcine sapelovirus strain [J]. *Archives of Virology*, 2011, 156(9): 1567.
- [6] Forman A J, Pass D A, Connaughton I D. The characterization and pathogenicity of porcine enteroviruses isolated in Victoria [J]. *Australian Veterinary Journal*, 1982, 58(4): 136-142.
- [7] Lamont P H, Betts A O. Studies on enteroviruses of the pig-IV: The isolation in tissue culture of a possible enteric cytopathogenic swine orphan (ECSO) virus (V13) from the faeces of a pig [J]. *Research in Veterinary Science*, 1960(1): 152-159.
- [8] Cano-Gómez C, García-Casado M A, Soriguer R, et al. Teschoviruses and sapeloviruses in faecal samples from wild boar in Spain [J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 165(1/2): 115-122.
- [9] Donin D G, Leme R D A, Alfieri A F, et al. First report of Porcine teschovirus (PTV), Porcine sapelovirus (PSV) and Enterovirus G (EV-G) in pig herds of Brazil [J]. *Tropical Animal Health and Production*, 2014, 46(3): 523-528.
- [10] Son K Y, Kim D S, Matthijnsens J, et al. Molecular epidemiology of Korean porcine sapeloviruses [J]. *Archives of Virology*, 2014, 159(5): 1175-1180.
- [11] 彭旺, 唐小明, 葛猛, 等. 猪萨佩罗病毒间接免疫荧光方法的建立与初步应用 [J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2017, 43(4): 423-426.
- [12] Peng W, Tang X M, Ge M, et al. Establishing and indirect immunofluorescence assay for antibody detection from Porcine Sapelovirus [J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences Edition)*, 2017, 43(4): 423-426.
- [13] McComick B M, Driesen S J, Connaughton I D, et al. Prevalence of enteroviral and parvoviral antibodies in pig sera [J]. *Research in Veterinary Science*, 1986, 41(3): 397-401.
- [14] Cropper M, Dunne H W, Leman A D, et al. Prevalence of antibodies to porcine enteroviruses and porcine parvovirus in body fluids of fetal pigs from small vs large litters [J]. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1976, 168(3): 233-235.
- [15] Knowles N J. Porcine enteric picornaviruses [J]. *Diseases of swine*, 2006(9): 337-345.
- [16] Prodělalová J. The survey of porcine teschoviruses, sapeloviruses and enteroviruses B infecting domestic pigs and wild boars in the Czech Republic between 2005 and 2011 [J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2012, 12(7): 1447-1451.
- [17] Shan T, Li L, Simmonds P, et al. The fecal virome of pigs on a high-density farm [J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(22): 11697-11708.
- [18] 郭博, 方和俊, 刘小琬, 等. 猪萨佩罗病毒实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立与初步应用 [J]. *中国兽医科学*, 2015, 45(9): 937-942.
- [19] Guo B, Fang H J, Liu X W, et al. Establishment and application of a real-time RT-PCR based on SYBR Green Ⅱ for detection of porcine sapelovirus [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2015, 45(9): 937-942.
- [20] Palmquist J M, Munir S, Taku A, et al. Detection of porcine teschovirus and enterovirus type Ⅱ by reverse transcription-polymerase chain reaction [J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2002, 14(6): 476-480.
- [21] Chen J W, Chen F, Zhou F Q, et al. Development of a minor groove binder assay for real-time PCR detection of porcine sapelovirus [J]. *Journal of Virology Methods*, 2014(198): 69-74.
- [22] Wang C, Yu D, Cui L, et al. Rapid and real-time detection of

porcine sapelovirus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay [J]. Journal of Virology Methods, 2014(203):5-8.

[21] 孙 杰,朱 琳,焦 点,等. 猪萨佩罗病毒 3C 蛋白间接 ELISA 抗体检测方法的建立 [J]. 中国预防兽医学报,2018,40(8):697-701.

Sun J,Zhu L,Jiao D,et al. Development of an indirect ELISA for detection antibody to porcine sapelovirus using recombinant 3C protein as coating antigen [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine,2018,40(8):697-701.

[22] Abe M,Ito N,Sakai K,et al. A novel Sapelovirus-like virus isolation from wild boar [J]. Virus Genes,2011,43:243-248.

[23] Kim D S,Kang M I,Son K Y,et al. Pathogenesis of Korean Sapelovirus A in piglets and chicks [J]. Journal of General Virology,2016,97(10):2566-2574.

[24] 杨德全,鞠厚斌,葛菲菲,等. 环介导等温扩增技术及其在动物疫病诊断中的应用 [J]. 中国动物传染病学报,2011,19(2):75-81.

Yang D Q,Ju H B,Ge F F,et al. Loop-mediated isothermal amplification and its application in animal diseases diagnosis [J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases,2011,19(2):75-81.

[25] 刘孟良,王潇娣,徐薇薇,等. 猪嵴病毒 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. 中国兽医科学,2013,43(3):261-265.

Liu M L,Wang X D,Xu W W,et al. Development of a real-time fluorescent quantitative PCR assay for the detection of porcine kobuvirus [J]. Chinese Veterinary Science,2013,43(3):261-265.

[26] 董玲娟,张彦明,何 雷,等. 猪传染性胃肠炎病毒荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2012,40(2):13-19.

Dong L J,Zhang Y M,He L,et al. Establishment of RT-PCR for transmissible gastroenteritis virus [J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Sciences Edition),2012,40(2):13-19.

[27] 严菊英,卢亦愚,冯 燕,等. *TaqMan* 荧光定量 RT-PCR 快速检测甲 3 型流感病毒 [J]. 中国人兽共患病杂志,2005,21(2):169-172.

Yan J Y,Lu Y Y,Feng Y,et al. Rapid detection of influenza A3 virus by *TaqMan*-based real-time RT-PCR assay [J]. Chinese Journal of Zoonoses,2005,21(2):169-172.

(上接第 9 页)

[27] 徐 龙,曹小安,刘永生,等. 布鲁氏菌 BP26 蛋白对鼠源树突状细胞分化及抗原提呈作用 [J]. 江苏农业学报,2020,36(4):190-197.

Xu L,Cao X A,Liu Y S,et al. Antigen presentation effect and differentiation of murine dendritic cells stimulated by *Brucella* BP26 protein [J]. Journal of Jiangsu Agricultural Sciences,2020,36(4):190-197.

[28] 鲁友铭,李俊萱,吴胜昔,等. 布鲁氏菌 BP26 蛋白的原核表达及鉴定 [J]. 重庆理工大学学报,2019,33(10):185-190.

Lu Y M,Li J X,Wu S X,et al. Prokaryotic expression and identification of *Brucella* BP26 protein [J]. Journal of Chongqing University of Technology,2019,33(10):185-190.

[29] 高 花,韩 勇,翟晓鑫,等. MHC 分子抗原递呈机制的研究进展 [J]. 生命科学,2017(5):40-51.

Gao H,Han Y,Zhai X X,et al. The research progress of antigen presentation by MHC molecules [J]. Life Science,2017(5):40-51.