

研究报告

鸡新城疫病毒 RT-TaqMan-LAMP 检测方法的建立及应用

容敏靖¹, 王曼², 刘昱², 时国强³, 柳梦思³, 石磊^{*1,2}, 叶蕾^{*1}

1 暨南大学食品安全与营养研究院, 广东 广州 510632

2 河北农业大学生命科学学院, 河北 保定 071000

3 河北三狮生物科技有限公司, 河北 石家庄 050035

容敏靖, 王曼, 刘昱, 时国强, 柳梦思, 石磊, 叶蕾. 鸡新城疫病毒 RT-TaqMan-LAMP 检测方法的建立及应用[J]. 微生物学通报, 2023, 50(8): 3506-3514.

RONG Minjing, WANG Man, LIU Yu, SHI Guoqiang, LIU Mengsi, SHI Lei, YE Lei. Development and application of RT-TaqMan-LAMP method for detecting Newcastle disease virus in chicken[J]. Microbiology China, 2023, 50(8): 3506-3514.

摘要: 【背景】新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)的传染可能会引发作为二类传染病之一的新城疫(Newcastle disease, ND), 给养禽业带来巨大的经济损失, 因而早期、精准的 NDV 筛查是防治 ND 暴发的关键。【目的】针对新城疫病毒(NDV)建立结合 TaqMan 探针的反转录环介导等温扩增技术(RT-TaqMan-LAMP)快速检测方法。【方法】根据 NDV F 基因序列设计特异性引物组和 TaqMan 探针, 以重组质粒 pMD-NDV-F 为阳性标准品优化反应条件, 验证该方法的特异性、灵敏性和重复性, 同时与国家标准(GB/T 16550—2020)中推荐的 RT-qPCR 方法比较, 对 70 份实际样本进行验证。【结果】最佳反应条件为 61 °C 60 min。引物和探针最优浓度: 1.6 μmol/L (FIP/BIP)、0.2 μmol/L (F3/B3)、0.8 μmol/L (LF/LB)、0.2 μmol/L (GTP)。最低检测限为 1.651×10^2 copies/μL, 灵敏度是 LAMP 方法的 100 倍。无非特异性扩增, 与禽流感病毒(avian influenza virus, AIV)、鸡毒支原体(Mycoplasma gallisepticum, MG)、鸡滑液囊支原体(Mycoplasma synoviae, MS)、鸡传染性囊病毒(infectious bursal disease virus, IBDV)及疱疹病毒(herpes virus, HSV)均无交叉反应, 批次内和批次间变异系数(coefficient of variation, CV)均小于 3%。在 70 份临床样品的检测中本方法比 RT-qPCR 方法多检测出 1 份阳性样本, 经 2 次复测二者的符合率为 98.57%。【结论】本研究建立的 NDV RT-TaqMan-LAMP 检测方法特异性强、灵敏度高、重复性好, 并能有效避免非特异性扩增, 可用于 NDV 的精准检测和流行病预防。

关键词: 新城疫病毒; 环介导等温扩增技术; TaqMan 探针; 精准检测

资助项目: 石家庄市高层次科技创新创业人才项目(05202001)

This work was supported by the Shijiazhuang High-level Science and Technology Innovation and Entrepreneurship Talent Project (05202001).

*Corresponding authors. E-mail: SHI Lei, leishi@jnu.edu.cn; YE Lei, yelei@inu.edu.cn

Received: 2022-11-17; Accepted: 2022-12-25; Published online: 2023-02-14

Development and application of RT-TaqMan-LAMP method for detecting Newcastle disease virus in chicken

RONG Minjing¹, WANG Man², LIU Yu², SHI Guoqiang³, LIU Mengsi³, SHI Lei^{*1,2}, YE Lei^{*1}

1 Institute of Food Safety and Nutrition, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China

2 College of Life Sciences, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei, China

3 Hebei Sanshi Biotechnology Limited Company, Shijiazhuang 050035, Hebei, China

Abstract: [Background] Newcastle disease (ND), one of the Class II infectious diseases induced by Newcastle disease virus (NDV), causes huge economic loss to the poultry industry. Thus, early and accurate screening of NDV is crucial for the prevention of ND outbreak. [Objective] To develop a rapid method for the detection of Newcastle disease virus (NDV) based on the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a TaqMan probe (RT-TaqMan-LAMP). [Methods] The specific primer pairs and TaqMan probes were designed according to the NDV F gene sequence, and the reaction conditions were optimized with the recombinant plasmid pMD-NDV-F as a positive standard to verify the specificity, sensitivity, and reproducibility of the method. With 70 samples, the method was compared with the RT-qPCR method recommended in the national standard (GB/T 16550—2020). [Results] The optimal reaction conditions are as follows: 61 °C, 60 min, 1.6 μmol/L (FIP/BIP), 0.2 μmol/L (F3/B3), 0.8 μmol/L (LF/LB), and 0.2 μmol/L (GTP). The lowest detection limit was 1.651×10^2 copies/μL, and the sensitivity was 100 folds that of LAMP. No non-specific amplification was observed, and no cross-reactivity with Avian influenza virus (AIV), Mycoplasma gallisepticum (MG), Mycoplasma bursalis (MS), infectious bursal disease virus (IBDV), and herpes simplex virus (HSV) was detected. The intra- and inter-batch coefficients of variation (CV) were <3%. The method detected one more positive sample than RT-qPCR in 70 clinical samples and the coincidence rate was 98.57% after two retests. [Conclusion] The NDV RT-TaqMan-LAMP method is highly specific and sensitive, with high repeatability, which can effectively avoid non-specific amplification and can be used for accurate detection of NDV and epidemic prevention.

Keywords: Newcastle disease virus; LAMP; TaqMan probe; rapid detection

新城疫(Newcastle disease, ND)是由新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)引发的一种发病率和死亡率极高的接触性、急性禽类传染病^[1]。该病以急性败死病为主要特征,致死率可达 85%–95%,而且 NDV 能够感染的禽类高达 240 多种,其中鸡、火鸡是主要的易感禽类,许多强毒力 NDV 都是从发病鸡体内分离,ND 是世界动物卫生组织公布的 A 类传染病之

—^[2-3],我国列为动物二类传染病^[4]。1926 年,ND 在英国的城市新城(Newcastle-upon-Tyne)首次发现,之后相继发生过 4 次大规模 ND 暴发;NDV 是一种单链 RNA 病毒,目前已知的有 15 198、15 192 和 15 186 nt 这 3 种长度,依次编码 6 种结构蛋白:F 蛋白、NP 蛋白、HN 蛋白、P 蛋白、L 蛋白和 M 蛋白,其中 F 基因编码的 F 蛋白与 NDV 的致病性有着密切关系,F

基因也被公认为分子检测中引物设计的理想靶标^[5]。近年来, ND 的流行整体呈下降趋势, 但免疫失败、免疫带毒等问题仍然存在, 给我国养禽业带来巨大的经济损失。因此, 早期、精准的 NDV 筛查成为防治 ND 暴发的关键。

目前, NDV 常用的检测方法有 RT-PCR、RT-qPCR、高通量测序等技术, 这些分子生物学检测方法特异性强、灵敏性高、操作简单, 但均需要昂贵的检测设备, 限制了 NDV 的快速筛查^[6-10]。21 世纪初, Notomi 等发明了环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP), 该方法利用 2-3 对引物及具有链置换和识别延伸作用的 *Bst* DNA 聚合酶, 在水浴锅等恒温设备下即可完成目标片段的扩增, 降低了核酸检测门槛, 有利于基层快速检测^[11]。但 LAMP 扩增产物长度不同, 在凝胶电泳后不容易分析, 电泳检测结果无法可视化, 荧光染料的添加又容易形成假阳性现象, 导致检测结果不准确^[12-14]。因此, 本研究使用荧光探针代替荧光染料, 在普通 LAMP 的基础上设计一条 TaqMan 探针, 通过对反应条件和反应体系进行优化, 建立 RT-TaqMan-LAMP 检测方法, 使其既具有 LAMP 法快速扩增、特异性高、所需设备成本不高的特点, 又可以有效避免非特异性扩增造成“假阳性”结果, 对扩增产物进行定性、定量分析, 为 LAMP 法的改革提供新思路。

1 材料与方 法

1.1 病毒核酸和临床样品

新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)、禽流感病毒(avian influenza virus, AIV)、鸡毒支原体(*Mycoplasma gallisepticum*, MG)、鸡滑液囊支原体(*Mycoplasma synoviae*, MS)、鸡传染性囊虫病病毒(infectious bursal disease virus, IBDV)及

疱疹病毒(herpes virus, HSV)的核酸由河北农业大学分离保存提供。重组质粒标准品 pMD-NDV-F 拷贝数为 1.651×10^8 copies/ μ L, 由生工生物工程(上海)股份有限公司制备并提供。临床样品采集自河北省多家养鸡场, 共 70 份疑似感染鸡 NDV 的气管咽拭子。

1.2 主要试剂和仪器

Tris-HCl、氯化钾、氯化镁、硫酸镁和甜菜碱购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; 硫酸铵购自国药集团化学试剂有限公司; 吐温-20 购自金克隆(北京)生物技术有限公司; *Bst* DNA Polymerase Large Fragment 购自 New England Biolabs Incorporated 公司; dNTPs 购自 TaKaRa 公司; SYTO-9 绿光荧光核酸染色剂购自 Life Technologies Corporation 公司; *Taq* DNA 聚合酶、核酸提取试剂盒(磁珠法)和 cDNA 第 1 链反转录试剂盒购自河北三狮生物科技有限公司。2×LAMP Mix: Tris-HCl 20 mmol/L, 氯化钾 10 mmol/L, 氯化镁 8 mmol/L, 甜菜碱 1 mol/L, 硫酸铵 10 mmol/L, 吐温-20 0.1%, dNTPs 1.6 mmol/L。

全自动核酸提取纯化仪和实时荧光定量 PCR 仪购自河北三狮生物科技有限公司。

1.3 引物、探针的设计与合成

根据 GenBank 中 NDV F 基因(GQ245800.1)的保守序列, 使用 LAMP 引物设计网站(<https://primerexplorer.jp/e/>)设计 LAMP 引物组, 包含 1 对内引物(FIP/BIP), 1 对外引物(F3/B3)和 1 对环引物(LF/LB), 并使用 Beacon Designer 7 在 F 基因片段的 399-416 上设计 1 条 TaqMan 探针(GTP), 探针的 5'端使用 FAM 作为荧光报告基团, 3'端使用 BHQ1 作为荧光淬灭基团。引物和探针均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 见表 1。

表 1 引物和探针序列

Table 1 Primer and probe sequences

Name of primer or probe	Sequence (5'→3')	Position
FIP (F1c-F2)	GCTACACTGCCAATAACAGC-GGAGGAAGGAGAAAAAACG	F1c: 358-378 F2: 328-347
BIP (B1c-B2)	AGCAGCTGCGGCCCTAATAC-TTAAGCCGGAGGATGTTGG	B1c: 408-427 B2: 446-464
F3	AAGGGTCTGTGTCCACGT	308-325
B3	GGTTGCAGCAATGCTCTC	466-483
LF	ACTGCCAATAACGGCACCTATAA	350-372
LB	CATCCTCCGGATTAAGGAGAGC	450-471
GTP	(FAM) ACAGATAACAGCAGCCGC (BHQ1)	399-416

FIP 引物序列中的“-”表示引物序列由前后两段独立的序列“F1c”和“F2”连接组成; BIP 引物序列同理

The “-” in FIP indicates that the primer sequence consists of two independent sequence junctions of “F1c” and “F2”; BIP primer sequences are the same.

1.4 LAMP 方法检测引物的初步验证

以 10 倍倍比稀释的重组质粒标准品 pMD-NDV-F ($1.651 \times 10^8 - 1.651 \times 10^2$ copies/ μ L) 为模板进行 LAMP 扩增。LAMP 方法的检测体系包含: 2×LAMP Mix 12.5 μ L, *Bst* DNA Polymerase Large Fragment (8 U/ μ L) 1 μ L, SYTO-9 绿光荧光核酸染色剂 0.5 μ L, FIP/BIP (20 μ mol/L) 2 μ L, F3/B3 (10 μ mol/L) 0.5 μ L, LF/LB (40 μ mol/L) 0.5 μ L, 模板 1 μ L, ddH₂O 补足至 25 μ L。反应条件: 61 $^{\circ}$ C, 60 min。根据检测结果中是否出现特异性扩增初步验证引物的可行性。

1.5 RT-TaqMan-LAMP 方法反应条件的优化和标准曲线的绘制

RT-TaqMan-LAMP 方法检测体系包含: 2×LAMP Mix 12.5 μ L, *Bst* DNA Polymerase Large Fragment (8 U/ μ L) 1 μ L, *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 1 μ L, FIP/BIP (20 μ mol/L) 2 μ L, F3/B3 (10 μ mol/L) 0.5 μ L, LF/LB (40 μ mol/L) 0.5 μ L, GTP (10 μ mol/L) 0.5 μ L, 模板 1 μ L, ddH₂O 补足 25 μ L。反应时间为 60 min。分别对反应温度(61、63、65 $^{\circ}$ C)、FIP/BIP 初浓度(10、15、20 μ mol/L)、F3/B3 初浓度(10、20、30 μ mol/L)、LF/LB 初浓度(20、30、40 μ mol/L)

和 GTP 的初浓度(10、20、30 μ mol/L)等条件进行优化, 根据检测结果确定 RT-TaqMan-LAMP 检测方法的最适反应条件和最优反应体系。

在最优的反应条件和反应体系下, 对 10 倍倍比稀释的重组质粒标准品 pMD-NDV-F ($1.651 \times 10^8 - 1.651 \times 10^2$ copies/ μ L)进行 RT-TaqMan-LAMP 扩增, 以重组质粒标准品 pMD-NDV-F 拷贝数的负对数为横坐标、C_t 值为纵坐标建立标准曲线。

1.6 RT-TaqMan-LAMP 方法的特异性试验

分别以 NDV、AIV、MG、MS、IBDV 及 HSV 的核酸样品为模板, 应用建立的 RT-TaqMan-LAMP 检测体系进行检测, 评估 RT-TaqMan-LAMP 检测方法的特异性。

1.7 RT-TaqMan-LAMP 方法的灵敏性试验

以 10 倍倍比稀释的重组质粒标准品 pMD-NDV-F ($1.651 \times 10^8 - 1.651 \times 10^2$ copies/ μ L) 作为模板, 设置 ddH₂O 为阴性对照。利用建立的 RT-TaqMan-LAMP 方法进行检测, 比较本研究建立的 RT-TaqMan-LAMP 与 1.4 中 LAMP 方法的灵敏性。

1.8 RT-TaqMan-LAMP 方法的重复性试验

采用本研究建立的方法分别对高、中、低

浓度的重组质粒标准品 pMD-NDV-F (1.651×10^7 、 1.651×10^5 和 1.651×10^4 copies/ μL) 进行检测, 各设置 3 次重复, 同时设置 ddH₂O 为阴性对照, 计算 C_t 值的变异系数(CV 值), 评估批内重复性。将上述 3 个浓度的重组质粒标准品在 3 个时间点进行 3 次重复实验, 评估批间重复性。采用 SPSS22.0 进行数据统计, CV 值为标准差与平均数的比值。

1.9 RT-LAMP、RT-qPCR 方法对比评价

依据 1.4 中 RT-LAMP 方法, 以及国家标准(GB/T 16550—2020) ND 诊断技术中推荐的 RT-qPCR 方法^[15], 分别平行做 1.6—1.8 中的特异性、灵敏度和重复性试验, 并与本文所建立的 RT-TaqMan-LAMP 方法作对比。

1.10 临床样品的检测

对 70 份疑似感染鸡 NDV 的气管咽拭子进行检测, 将每份气管咽拭子头掰下后放入含 1 mL 生理盐水的离心管中涡旋 30 s, 取 200 μL 混匀液, 利用核酸提取试剂盒(磁珠法)进行核酸提取后, 利用 cDNA 第 1 链反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA, 采用本研究所建立的 RT-TaqMan-LAMP 方法检测。同时以国家标准(GB/T 16550—2020) ND 诊断技术中推荐的 RT-qPCR 检测这些样品, 比较两种方法的检测结果, 并计算二者的符合率。

2 结果与分析

2.1 LAMP 方法检测引物的初步验证结果

以 10 倍倍比稀释的重组质粒标准品 pMD-NDV-F (1.651×10^8 — 1.651×10^2 copies/ μL) 为模板, ddH₂O 为阴性对照, 采用 LAMP 法进行检测。结果显示, LAMP 法对重组质粒标准品 pMD-NDV-F 的最低检测浓度为 1.651×10^4 copies/ μL , 相关性系数 R^2 为 0.992,

表明设计的 NDV 各引物具有可行性。但测试中部分阴性对照会出现非特异性扩增(C_t 值为 58), 造成检测结果“假阳性”的现象, 如图 1 所示。

2.2 RT-TaqMan-LAMP 方法反应条件的优化和标准曲线的绘制结果

利用正交试验优化后得出 RT-TaqMan-LAMP 检测方法的最适反应温度、引物和探针的浓度, 优化后的反应体系为: 2 \times LAMP Mix 12.5 μL , *Bst* DNA Polymerase Large Fragment (8 U/ μL) 1 μL , *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μL) 1 μL , FIP/BIP (20 $\mu\text{mol/L}$) 2 μL , F3/B3 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , LF/LB (40 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , GTP (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , 模板 1 μL , ddH₂O 补足 25 μL 。反应条件为: 61 $^{\circ}\text{C}$, 60 min。

在最优的反应条件和反应体系下, 以重组质粒标准品 pMD-NDV-F 为模板进行 RT-TaqMan-LAMP 扩增, 获得扩增曲线。得到标准曲线的曲线方程为: $y = -4.206x + 50.095$, 相关性系数 R^2 为 0.996, 如图 2 所示, 表明本实验建立的方法在 1.651×10^8 — 1.651×10^2 copies/ μL 浓度范围内与 C_t 值有良好的线性关系。

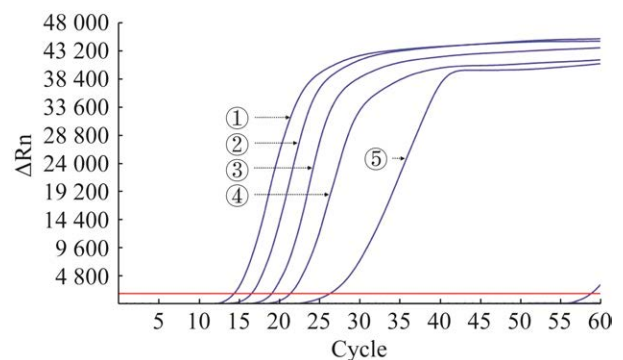


图 1 LAMP 方法的扩增曲线

Figure 1 Amplification curve of LAMP. ①: 1.651×10^8 copies/ μL ; ②: 1.651×10^7 copies/ μL ; ③: 1.651×10^6 copies/ μL ; ④: 1.651×10^5 copies/ μL ; ⑤: 1.651×10^4 copies/ μL .

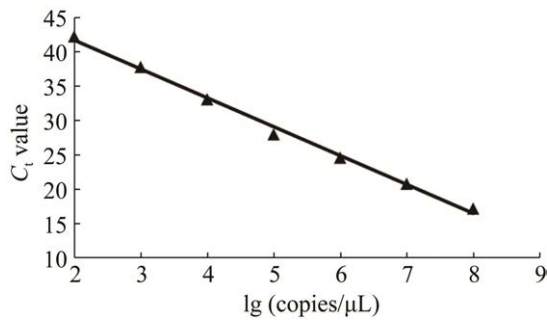


图2 RT-TaqMan-LAMP 的标准曲线

Figure 2 Standard curve of the RT-TaqMan-LAMP.
▲: NDV.

2.3 RT-TaqMan-LAMP 方法的特异性试验结果

以 RT-TaqMan-LAMP 检测方法分别对 NDV、AIV、MG、MS、IBDV 及 HSV 的核酸样品进行检测。结果显示, 只有鸡 NDV 扩增后出现典型“S”型扩增曲线, 而其他核酸样品均未出现扩增曲线, 如图 3 所示, 表明 RT-TaqMan-LAMP 方法特异性较强。

2.4 RT-TaqMan-LAMP 方法的灵敏性试验结果

以 10 倍倍比稀释的重组质粒标准品 pMD-NDV-F 作为模板, 利用建立的 RT-TaqMan-LAMP 方法进行。如图 4 所示, 结果表明本研究建立的 RT-TaqMan-LAMP 检测方法对重组质粒标准品 pMD-NDV-F 的最低检测限为 1.651×10^2 copies/μL, 并且无非特异性扩增, 而 LAMP 法对重组质粒标准品 pMD-NDV-F 的最低检测限为 1.651×10^4 copies/μL。以上结果表明本研究建立的 RT-TaqMan-LAMP 方法灵敏度是 LAMP 方法的 100 倍, 具有较高的灵敏度, 而且避免了“假阳性”结果的出现。

2.5 RT-TaqMan-LAMP 方法的重复性试验结果

将浓度为 1.651×10^7 、 1.651×10^5 和 1.651×10^4 copies/μL 的重组质粒标准品 pMD-NDV-F

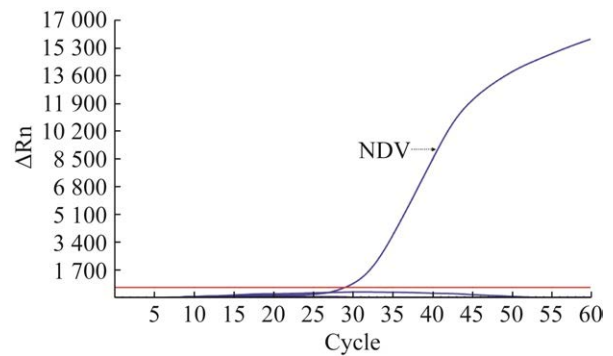


图3 RT-TaqMan-LAMP 特异性检测结果

Figure 3 Specificity of the RT-TaqMan-LAMP.

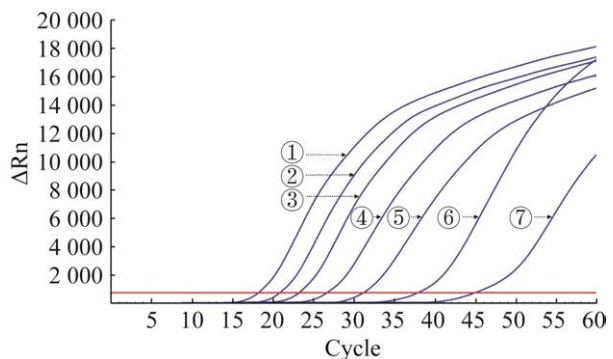


图4 RT-TaqMan-LAMP 线性扩增结果

Figure 4 Linear amplification of RT-TaqMan-LAMP.
①: 1.651×10^8 copies/μL; ②: 1.651×10^7 copies/μL;
③: 1.651×10^6 copies/μL; ④: 1.651×10^5 copies/μL;
⑤: 1.651×10^4 copies/μL; ⑥: 1.651×10^3 copies/μL;
⑦: 1.651×10^2 copies/μL.

作为高、中、低浓度样品进行 RT-TaqMan-LAMP 检测, 分别做批内和批间的重复性试验, 结果显示 C_t 值的 CV 值均小于 3% (表 2), 表明 RT-TaqMan-LAMP 方法检测体系稳定性较好, 具有良好的重复性, 检测结果稳定可靠。

2.6 常见检测方法的评价结果

与常规检测方法 RT-LAMP、RT-qPCR 对比结果如表 3 所示, 本文所建立改良 RT-LAMP 方法中 TaqMan 探针能明显增强检测特异性, 检测体系更灵敏、更稳定, 因此效果更佳。

表 2 RT-TaqMan-LAMP 的批内、批间重复性试验结果

Table 2 Intra-batch and inter-batch reproducibility test of the RT-TaqMan-LAMP

Concentration of combinant plasmid standards (copies/ μ L)	<i>n</i>	Intra-batch variation test		Inter-batch variation test	
		C_t values	Coefficient of variation (%)	C_t values	Coefficient of variation (%)
1.651×10^7	3	20.99 \pm 0.34	0.17	21.05 \pm 0.05	0.24
1.651×10^5	3	28.08 \pm 0.09	0.33	28.26 \pm 0.14	0.48
1.651×10^4	3	32.08 \pm 0.60	1.87	31.44 \pm 0.72	2.30

表 3 三种 NDV 检测方法结果的比较

Table 3 Comparison of the results of three NDV detection methods

Item	Specificity	Sensitivity (copies/ μ L)	Reproducibility (CV, %)		
			High concentration	Middle concentration	Low concentration
RT-qPCR	-	1.651×10^3	0.632	0.824	2.931
RT-LAMP	+	1.651×10^4	1.375	2.445	5.123
RT-TaqMan-LAMP	-	1.651×10^2	0.167	0.331	1.868

+: 扩增结果中出现非特异性扩增; -: 扩增结果中未出现非特异性扩增

+: A non-specific amplification in the result; -: No non-specific amplification in the result.

2.7 临床样品的检测结果

通过 RT-TaqMan-LAMP 检测方法和新城疫诊断技术(GB/T 16550—2020)推荐的 RT-qPCR 法分别对 70 份收集的样品进行检测。结果显示, RT-TaqMan-LAMP 检测方法检测出 15 份阳性样品, 阳性检出率为 21.43% (15/70); GB/T 16550—2020 推荐的 RT-qPCR 法检测出 14 份阳性样品, 阳性检出率为 20.00% (14/70)。二者总体符合率为 98.57%。不一致的 1 份样品为 RT-TaqMan-LAMP 检测为“弱阳性”(C_t 值为 50.26), 而国标法检测为阴性, 重新对样品进行核酸提取和反转录后, 分别采用 2 种方法 2 次复测后均为阳性结果, 表明该方法可以用于精准定量检测 NDV, 而且检测准确性高于荧光定量 RT-qPCR 方法。

3 讨论与结论

目前, 我国对 ND 的综合防控主要通过建立和健全生物安全体系、采取科学合理的免疫

程序、加强免疫监测以及注重药物的治疗等方面提高鸡群的抵抗力, ND 的发生数量和发生频率都在不断降低, 但是免疫后仍有很多 ND 的存在; ND 疫苗并不能完全清除病毒, 只能够降低致死率, 为家禽提供临床保护, 降低病毒载量, 不能消除已经存在的感染并阻止病毒的感染和复制^[16]。因此, 快速且准确的检测方法是防控 NDV 的关键, NDV 的检测方法主要为分子生物学检测法。分子生物学检测的方法包括 RT-PCR、RT-qPCR 和 LAMP 检测方法, LAMP 检测方法通常设计两对引物, 即内引物和外引物, 后续 LAMP 体系增加了两条环引物以加快反应速度, 分别结合于目的片段上, 特异性较强。同时, 恒温扩增不需要变温循环设备, 所需的检测设备和仪器成本低廉^[17-18]。近年来, LAMP 法已成为实验室医学中最有效的等温扩增技术之一^[19]。在 *Bst* DNA 聚合酶存在的条件下, LAMP 法可以将微量的目标基因在 1 h 内扩增到 10^9 copies^[20], 但多条引物之间容易互补

产生非特异性扩增, 而染料无法特异性识别进而产生“假阳性”结果^[21-22]。因此, 本研究根据 NDV-F 基因的保守序列设计 LAMP 引物组, 又创新性地设计了 1 条 TaqMan 探针, 建立了 RT-TaqMan-LAMP 检测方法。

为确保该方法的特异性, 本研究与 NDV 高度同源的 AIV 及其他禽类常见病原菌(如 MG、MS、IBDV 及 HSV)核酸为模板进行检测, 结果显示本研究建立的 RT-TaqMan-LAMP 方法对上述病原菌核酸的检测结果均为阴性, 表明该检测方法特异性较强。本研究建立的 RT-TaqMan-LAMP 方法与 LAMP 法的检测时间基本一致, 但前者的灵敏度是后者的 100 倍, 最低检测病毒核酸浓度为 1.651×10^2 copies/ μ L。本研究重复性试验结果中批内、批间 C_t 值的 CV 值均小于 3%。在临床样品检测中, RT-TaqMan-LAMP 检测法与新城疫诊断技术(GB/T 16550—2020)中推荐的 RT-qPCR 检测结果符合率为 98.57%, 而且阳性检出结果更准确可靠, 表明所建立 NDV 的 RT-TaqMan-LAMP 检测方法结果稳定可靠、可在较短时间内检测 NDV。由于 NDV 为 RNA 病毒, 因此需要将提取的 RNA 反转录为 cDNA 才可以检测, 使得检测时间延长。本研究室后续将在 RT-TaqMan-LAMP 反应体系内引入新型反转录酶, 使得 RT-TaqMan-LAMP 可在“一管式”条件下反应, 让检测更加快速。

综上所述, 本研究建立的 NDV 的 RT-TaqMan-LAMP 检测方法可实现对临床样品中 NDV 的快速、准确检测, 这为开展 NDV 的精准检测和流行病学研究提供了可靠的检测手段。

REFERENCES

- [1] 孟繁星, 李永山, 牟素菁, 金忠元, 萧飒. 新城疫病毒对水禽致病性的研究进展[J]. 中国预防兽医学报, 2021, 43(12): 1339-1343.
MENG FX, LI YS, MOU SJ, JIN ZY, XIAO S.

- Advances in pathogenicity of Newcastle disease virus in waterfowl[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2021, 43(12): 1339-1343 (in Chinese).
- [2] 王杰煌, 朱婉君, 伍辉吉, 钟嘉诚, 张溢珊, 王贺, 刘英慧, 张济培, 陈济钊. 广东地区 8 株鹅源基因 XII 型新城疫病毒 F 蛋白基因遗传进化分析[J]. 中国预防兽医学报, 2020, 42(6): 617-621.
WANG JH, ZHU WJ, WU HJ, ZHONG JC, ZHANG YS, WANG H, LIU YH, ZHANG JP, CHEN JD. Genetic evolution analysis of the F protein genes of eight Newcastle disease viruses isolated from geese in Guangdong Province[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2020, 42(6): 617-621 (in Chinese).
- [3] MURULITHARAN K, YUSOFF K, OMAR AR, PEETERS BPH, MOLOUKI A. Rapid generation of a recombinant genotype VIII Newcastle disease virus (NDV) using full-length synthetic cDNA[J]. Current Microbiology, 2021, 78(4): 1458-1465.
- [4] 《一、二、三类动物疫病病种名录》及《三类动物疫病防治规范》发布[J]. 中国水产, 2022(8): 23-26.
“List of Diseases of Class I, II and III Animal Diseases” and “Code for Prevention and Control of Class III Animal Diseases” were issued[J]. China Fisheries, 2022(8): 23-26 (in Chinese).
- [5] MAKKI F, BOROOMAND Z, MAYAHI M, ABAD SHAPOURI MRS. Characterization of Newcastle disease virus in broiler flocks with respiratory symptoms in some provinces of Iran[J]. Molecular Biology Reports, 2021, 48(11): 7281-7291.
- [6] 张殿宸, 蔡俊呈, 袁庆力, 陈奕纯, 向斌, 廖明, 徐成刚, 任涛. 新城疫检测研究方法进展[J]. 养禽与禽病防治, 2020(8): 20-22.
ZHANG DC, CAI JC, YUAN QL, CHEN YC, XIANG B, LIAO M, XU CG, REN T. Progress in research methods of Newcastle disease detection[J]. Poultry Husbandry and Disease Control, 2020(8): 20-22 (in Chinese).
- [7] GOHM DS, THÜR B, HOFMANN MA. Detection of Newcastle disease virus in organs and faeces of experimentally infected chickens using RT-PCR[J]. Avian Pathology, 2000, 29(2): 143-152.
- [8] RASHID S, NAEEM K, AHMED Z, SADDIQUE N, ABBAS MA, MALIK SA. Multiplex polymerase chain reaction for the detection and differentiation of avian influenza viruses and other poultry respiratory pathogens[J]. Poultry Science, 2009, 88(12):

- 2526-2531.
- [9] 李佳佳, 宋建领. 一株蛋鸡新城疫病毒的分离鉴定及全基因组序列分析[J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47(1): 221-228.
- LI JJ, SONG JL. Identification and complete genomic analysis of a Newcastle disease virus from a laying hen[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2020, 47(1): 221-228 (in Chinese).
- [10] 徐敏丽, 于江, 逯璐, 张玉玉, 任素芳, 陈智, 孙文博, 郭立辉, 吴家强, 张琳. 新城疫强毒特异性反转录荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 山东农业科学, 2021, 53(8): 112-118.
- XU ML, YU J, LU L, ZHANG YY, REN SF, CHEN Z, SUN WB, GUO LH, WU JQ, ZHANG L. Establishment and application of reverse transcription fluorescence quantitative PCR method for virulent NDV detection[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2021, 53(8): 112-118 (in Chinese).
- [11] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, YONEKAWA T, WATANABE K, AMINO N, HASE T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): e63.
- [12] UCHIBORI-ASANO M, UCHIYAMA T, JOURAKU A, SHINODA T. Development of allele-specific loop-mediated isothermal amplification (AS-LAMP) to detect the tebufenozide-resistant allele in the smaller tea tortrix, *Adoxophyes honmai* (Lepidoptera: Tortricidae)[J]. Applied Entomology and Zoology, 2022, 57(1): 93-99.
- [13] RAJKO-NENOW P, HOWSON ELA, CLARK D, HILTON N, AMBAGALA A, SVITEK N, FLANNERY J, BATTEN C. Development of a novel loop mediated isothermal amplification assay (LAMP) for the rapid detection of epizootic haemorrhagic disease virus[J]. Viruses, 2021, 13(11): 2187.
- [14] KHEIRANDISH F, FALLAHI S, MAHMOUDVAND H, ARABAN A, ANBARI K, ROUZBAHANI AK, AKBARI S. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of *Toxoplasma gondii* infection in women with spontaneous abortion[J]. Archives of Microbiology, 2021, 203(2): 763-769.
- [15] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 新城疫诊断技术: GB/T 16550—2020[S]. 北京: 中国标准出版社, 2020.
- State Administration for Market Regulation, Standardization Administration. Diagnostic techniques for Newcastle disease: GB/T 16550—2020[S]. Beijing: Standards Press of China, 2020 (in Chinese).
- [16] GETABALEW M, ALEMNEH T, AKEBEREGN D, GETAHUN D, ZEWDIE D. Epidemiology, diagnosis & prevention of Newcastle disease in poultry[J]. American Journal of Biomedical Science & Research, 2019, 3(1): 50-59.
- [17] 石磊, 王曼, 时国强, 董振国, 刘昱. 环介导等温扩增技术研究进展[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2021, 41(5): 565-571.
- SHI L, WANG M, SHI GQ, DONG ZG, LIU Y. Research progress of loop-mediated isothermal amplification technology[J]. Journal of Hebei University (Natural Science Edition), 2021, 41(5): 565-571 (in Chinese).
- [18] LIU L, BENYEDA Z, ZOHARI S, YACOUB A, ISAKSSON M, LEIJON M, LeBLANC N, BENYEDA J, BELÁK S. Assessment of preparation of samples under the field conditions and a portable real-time RT-PCR assay for the rapid on-site detection of Newcastle disease virus[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2016, 63(2): e245-e250.
- [19] SOROKA M, WASOWICZ B, RYMASZEWSKA A. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): the better sibling of PCR?[J]. Cells, 2021, 10(8): 1931.
- [20] PANG B, YAO S, XU K, WANG J, SONG XL, MU Y, ZHAO C, LI J. A novel visual-mixed-dye for LAMP and its application in the detection of foodborne pathogens[J]. Analytical Biochemistry, 2019, 574: 1-6.
- [21] LIU XW, ZOU DY, WANG CX, ZHANG XQ, PEI DX, LIU W, LI YW. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification assays for rapid detection of *bla*KPC producing *Serratia* spp. in clinical specimens: a prospective diagnostic accuracy study[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2021, 21(4): 308.
- [22] ORTEGA SF, SICILIANO I, PRENCIPE S, GULLINO ML, SPADARO D. Development of PCR, LAMP and qPCR assays for the detection of aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* in hazelnut[J]. Toxins, 2020, 12(12): 757.