

猪瘟疫实时荧光重组酶聚合酶扩增检测方法的建立及应用

杨俊, 聂福平, 王昱, 史梅梅, 谢晓倩, 王国民, 李贤良, 吴蕊, 张欢, 唐昌杰, 李应国*

(重庆海关技术中心, 重庆 400020)

摘要 [目的] 建立猪瘟疫病毒(CSFV)快速、灵敏的检测方法。[方法] 选择 CSFV 基因组中保守的 5' 端非编码区(NTR)作为研究对象, 根据重组酶聚合酶扩增(RPA)原理, 设计特异性 RPA 引物和 exo 探针, 并对反应温度和时间进行优化, 建立检测猪瘟疫病毒的实时荧光 RPA 方法。[结果] 该研究建立的方法能在 39 °C 恒温条件下 30 min 内得到检测结果, 实现了快速检测 CSFV 的目的。该方法仅对 CSFV 的核酸有扩增反应, 而对猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)、猪胸膜肺炎放线杆菌(APP)、副猪嗜血杆菌(HPS)、猪肺炎支原体(Mhp)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪圆环病毒 2 型(PCV-2)、猪水疱病病毒(SVDV)和猪细小病毒(PPV) 8 种常见猪病病原的检测结果均为阴性, 表现出良好的特异性, 对含有 CSFV 目的片段的重组质粒的最低检测限为 8.3×10^2 copies/ μ L。同时使用新建立的 CSFV 实时荧光 RPA 检测方法和国家标准(GB/T 16551—2020)中的实时荧光 RT-PCR 对采集自重庆某养猪场的 33 份临床样本进行 CSFV 核酸检测, 以验证 CSFV 的实用性, 结果显示, 2 种方法检出的阴、阳性样本完全一致。[结论] 该研究建立的 CSFV 实时荧光 RPA 方法反应条件温和、核酸扩增迅速、检测结果特异、灵敏, 为 CSF 的诊断提供了新的选择。

关键词 猪瘟疫病毒; 核酸检测; 等温扩增; 重组酶聚合酶扩增; 聚合酶链反应

中图分类号 S852.65⁺1 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)20-0166-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.20.043

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Development and Application of Real-Time RPA Method for Detection of Classical Swine Fever Virus

YANG Jun, NIE Fu-ping, WANG Yu et al (Chongqing Customs Technology Center, Chongqing 400020)

Abstract [Objective] To establish a rapid and sensitive detection method for Classical Swine Fever Virus (CSFV). [Method] The 5' conserved non coding region (NTR) in CSFV genome was selected as the research object. According to the principle of recombinase polymerase amplification (RPA), specific RPA primers and exo probe were designed. The reaction temperature and time were optimized, and then a real-time fluorescent RPA method for the detection of CSFV was established. [Result] The method established in this study could obtain the detection results within 30 minutes under the constant temperature of 39 °C, and realize the purpose of rapid detection of CSFV. The method only amplified the nucleic acid of CSFV, but was not suitable for transmissible gastroenteritis virus (TGEV), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), *Haemophilus parasuis* (HPS), *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), porcine circovirus type 2 (PCV-2), porcine vesicular disease virus (SVDV) and porcine parvovirus (PPV) 8 common swine pathogens were all negative, and showed good specificity, and the minimum detection limit for the recombinant plasmid containing the CSFV target fragment was 8.3×10^2 copies/ μ L. The developed CSFV real-time fluorescent RPA method and the real-time fluorescent RT-PCR in the national standard (GB/T 16551-2020) were used at the same time to detect CSFV nucleic acid in 33 clinical samples collected from a pig farm in Chongqing to verify the practicability of CSFV. The results showed that the negative and positive samples detected by the two methods were completely consistent. [Conclusion] The CSFV real-time fluorescence RPA method established in this study has mild reaction conditions, rapid nucleic acid amplification, specific and sensitive detection results, which provides a new choice for the diagnosis of CSF.

Key words Classical swine fever virus; Nucleic acid test; Isothermal amplification; Recombinase polymerase amplification (RPA); Polymerase chain reaction

猪瘟疫, 又被称为古典猪瘟疫(classical swine fever, CSF)、烂肠瘟, 是一种感染了猪瘟疫病毒(classical swine fever virus, CSFV)而引起的高度接触性的急性传染病。该病流行广泛, 发病率 and 死亡率高, 是世界动物卫生组织(OIE)规定的通报类传染病^[1], 在我国《进境动物检疫疫病名录》中列为一类传染病。

重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)是一种新型的等温核酸扩增技术, 在较低温度下, 15~30 min 即可完成检测, 具有反应条件温和、扩增效率高的优点, 并且通过在反应体系中加入荧光探针可实现对扩增对象的实时检测。该研究基于 RPA 检测技术, 针对 CSFV 基因组的 5' 端非编码区高度保守序列设计并合成了特异性的引物和 exo 探针, 成功建立了实时荧光重组酶聚合酶扩增检测

猪瘟疫病毒的方法, 以期对猪瘟疫快速诊断提供新的选择。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 毒株。猪瘟疫病毒(classical swine fever virus, CSFV)疫苗株(石门株)、猪传染性胃肠炎病毒(transmissible gastroenteritis, TGEV)(IND 型)、猪传染性胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP)(AP76)、副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*, HPS)(SH0165)、猪肺炎支原体(*Mycoplasma hyopneumoniae*, Mhp)(168-L)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRSV)(BIAH-001)、猪圆环病毒 2 型(porcine circovirus Type 2, PCV-2)(PM167)、猪水疱病病毒(swine vesicular virus, SVDV)、猪细小病毒(porcine parvovirus, PPV)疫苗株(cp99), 由重庆海关技术中心动物检疫实验室保存。

1.1.2 主要试剂。TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction kit、PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis kit、Premix Taq™、DL2000 DNA Marker、TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction kit、PMDTM19-T Vector Cloning kit、DH5a 感

基金项目 重庆市技术创新与应用发展专项面上项目(cstc2019jsex-msxmX0346)。

作者简介 杨俊(1983—), 男, 重庆人, 高级兽医师, 硕士, 从事动物疫病病原检测方法研究。* 通信作者, 研究员, 博士, 从事外来动物疫病防控研究。

收稿日期 2021-12-11

受态细胞、TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification kit, 购自宝生物工程(大连)有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 购自天根生化科技(北京)有限公司; Twist Amp exo kit, 购自英国 Twist Dx 公司。

1.1.3 主要仪器。 Genie II 等温扩增荧光检测系统(英国 OptiGene); NanoDrop oneC 微量核酸蛋白浓度测定仪(美国 Thermo Scientific); Veriti 96 多功能梯度 PCR 仪器(美国 Applied Biosystems); GelDoc XR+凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad); Centrifuge 5417R 高速离心机(德国 Eppendorf)。

1.2 试验方法

1.2.1 引物和探针。 CSFV 5'NTR 由 360~374 个碱基组成, 具有高度保守性。该研究选择该部分序列作为扩增对象, 从 NCBI 下载 CSFV 基因组 5'NTR 序列进行分析, 参考 Twist Amp exo kit 关于 RPA 引物和 exo 探针的设计要求, 利用 Primer premier 5 软件设计 RPA 引物和 exo 探针, 委托 TAKARA 公司合成。引物及探针序列如下: CSFV-RPA-F: 5'-GC-CATGCCCATAGTAGGACTAGCAAACGGAGGGAC-3'; CSFV-RPA-R: 5'-CTCGAGGTGGGCTTCTGCTCACGTCGAAGTACTGA-3'; CSFV-RPA-P: 5'-GTAGTGGCGAGCTCCCTGGGTGTCTA-AGT(FAM)-(THF)CT(BHQ1)-GAGTACAGGACAG-(P)-3'; 其中, FAM 为羧基荧光素, THF 为四氢呋喃, BHQ1 为黑洞猝灭剂 1, P 为磷酸盐基团。

1.2.2 病毒核酸的提取。 使用 TaKaRa 公司的 MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction kit 试剂盒分别提取 CSFV、TGEV、PRRSV、SVDV 的 RNA 以及 PCR-2 和 PPV 的 DNA, 使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒分别提取 APP、HPS 和 Mhp 的 DNA, 以上操作过程均在生物安全柜中进行。RNA 提取完成后立即使用 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis kit 反转录合成第一链 cDNA。cDNA 和 DNA 均置 -20 °C 冷冻保存备用。

1.2.3 质粒标准品的构建。 CSFV 核酸 RNA 提取后立即进行反转录合成 cDNA, 以该 cDNA 作为模板, 用设计的 CSFV RPA 引物(CSFV-RPA-F/CSFV-RPA-R)进行 PCR 反应。将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 确定得到预期大小的扩增子并回收, 连接到 PMD™-19T 载体, 转化到 DH5α 感受态细胞, 从阳性克隆中提取质粒, 利用紫外可见核酸蛋白分析仪(NanoDrop oneC)测定其浓度, 根据公式: 拷贝数 = [浓度 (ng/μL) × 6.02 × 10²³ × 10⁻⁹] / (DNA 长度 × 660) 计算质粒拷贝数, -20 °C 保存备用。

1.2.4 CSFV 实时荧光 RPA 反应条件的优化。 Twist Amp exo kit 提供的反应管中已经预混了各种酶, 按其说明书要求, 向反应管中加入 Rehy-dration Buffer 29.5 μL, ddH₂O 8.2 μL, 10 μmol/L 上、下游引物各 2.1 μL, 10 μmol/L 探针 0.6 μL, 模板 5 μL, 向反应管的盖子中加入 Mg²⁺ 2.5 μL, 盖上盖, 瞬时离心后立即将反应管置于 OptiGene Genie II 等温扩增荧光检测系统, 分别在 35、37、39、40、42 °C 下反应 40 min, 根据扩增曲线, 确定最适反应温度和最佳反应时间。

1.2.5 CSFV 实时荧光 RPA 特异性试验。 RPA 引物长度为

30~35 nt, exo 探针长度为 46~52 nt, 比普通 PCR 和荧光定量 PCR 的引物、探针都更长, 理论上具有更高的特异性。为了验证 CSFV 实时荧光 RPA 的特异性, 选择 CSFV、TGEV、APP、HPS、Mhp、PRRSV、PCV-2、SVDV、PPV 的 cDNA 或 DNA 作为模板, 以无菌去离子水作为阴性对照, 在确定的最佳反应条件下进行检测, 评价方法的特异性。

1.2.6 CSFV 实时荧光 RPA 敏感性试验。 为测试 CSFV 实时荧光 RPA 检测方法的敏感性, 将扩增片段转化入 DH5α 感受态细胞中, 提取质粒并测定浓度, 计算拷贝数作为标准品。将质粒标准品进行 10 倍连续稀释, 取各个稀释度的质粒分别作为模板, 在最佳反应条件下进行 RPA 扩增, 确定该方法的最低检出限。

1.2.7 临床样品检测。 从重庆某养猪场采集 20 份血清样本、5 份淋巴结样本、5 份肝脏样本和 3 份肾脏样本, 分别提取核酸, 用建立的 CSFV 实时荧光 RPA 方法进行猪瘟病毒核酸检测, 以评价其在实际检测中的效果, 同时, 采用国家标准 GB/T 16551—2020 对所有样本进行猪瘟病毒实时荧光 RT-PCR 检测, 比较 2 种方法的符合性。

2 结果与分析

2.1 标准品的制备 将 CSFV 扩增片段转化入 DH5α 感受态细胞中, 提取含有 CSFV 核酸片段的重组质粒进行测序, 将测序结果提交 NCBI 进行 BLAST 比对, 结果显示, 插入的核酸片段大小为 124 bp, 与预期一致, 与 CSFV 具有高度同源性, 相似度达到 99% 以上。经紫外可见核酸蛋白分析仪测定, 该质粒浓度为 25.5 ng/μL, A₂₆₀/A₂₈₀ 值为 1.87, 计算出拷贝数为 8.3 × 10⁹ copies/μL。

2.2 CSFV 实时荧光 RPA 反应条件的优化 将配制好的反应体系分别在 35、37、39、40、42 °C 下进行 RPA 反应, 检测荧光强度。试验结果显示(图 1), 随着反应温度升高, 检测到荧光信号所需的时间更短, 且最终的荧光强度也更高, 但当反应温度超过 39 °C 后, 荧光信号反而出现下降; 随着时间延伸, 荧光信号不断积累, 但 30 min 以后, 荧光强度不再升高, 说明反应进入平台期。综上, CSFV 实时荧光 RPA 最佳反应温度和反应时间分别为 39 °C、30 min。

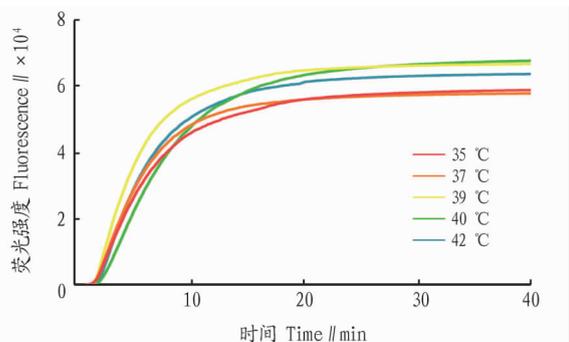
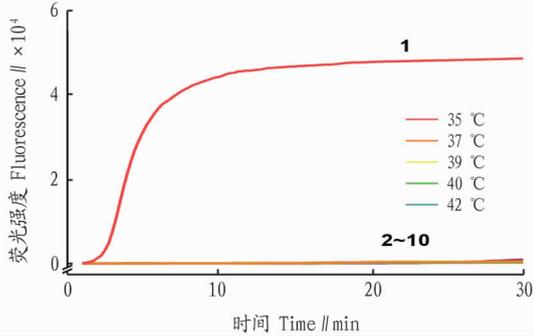


图 1 猪瘟病毒实时荧光 RPA 检测方法的优化

Fig. 1 Optimization of real-time fluorescent RPA detection method for swine fever virus

2.3 CSFV 实时荧光 RPA 特异性试验 为了验证 CSFV 实时荧光 RPA 检测方法的特异性, 选择 CSFV、TGEV、APP、

HPS、Mhp、PRRSV、SVDV、PPV、PCV-2 等猪场常见的猪病作为研究对象,提取核酸后分别用建立的实时荧光 RPA 方法进行扩增,结果见图 2。随着反应时间的进行,CSFV 阳性样品在反应开始 6 min 后荧光强度逐渐升高,相比之下,其他样本和阴性对照在 30 min 之内都无荧光信号产生,说明该方法对上述除 CSFV 之外的常见猪病病原无反应,特异性良好。

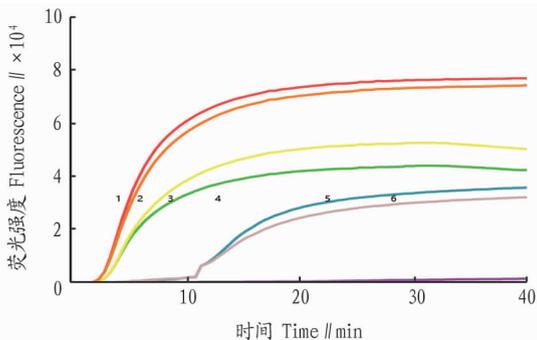


注:1.猪瘟病毒;2~10.猪传染性胃肠炎病毒、猪传染性胸膜肺炎放线杆菌、副猪嗜血杆菌、猪肺炎支原体、猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪圆环病毒 2 型、猪水泡病病毒、猪细小病毒、阴性对照
Note:1. CSFV; 2-10. TGEV, APP, HPS, Mhp, PRRSV, PCV-2, SVDV, PPV, Negative control

图 2 猪瘟病毒实时荧光 RPA 检测方法的特异性

Fig.2 Specificity of the real-time fluorescent RPA detection method for swine fever virus

2.4 CSFV 实时荧光 RPA 敏感性试验 经测定 CSFV 重组质粒浓度为 8.3×10^9 copies/ μL ,将该质粒进行连续 10 倍稀释,取每个稀释度的质粒 $5 \mu\text{L}$ 分别作为模板,用建立的实时荧光 RPA 方法进行检测,结果显示(图 3),随着质粒浓度的降低,能够检测到荧光信号的时间也随之延后,而且最终的荧光信号强度也相应降低,当 CSFV 重组质粒浓度降至 8.3×10^2 copies/ μL 以下,检测不到荧光信号,因此,该 CSFV 实时荧光 RPA 方法最低检出限为 8.3×10^2 copies/ μL ,灵敏度较好。



注:1~6 为 $8.3 \times 10^7 \sim 8.3 \times 10^2$ copies/ μL

图 3 猪瘟病毒实时荧光 RPA 检测方法的敏感性

Fig.3 Sensitivity of real-time fluorescent RPA detection method for swine fever virus

2.5 临床样品检测 从重庆某养猪场采集了 33 份样本,同时使用建立的 CSFV 实时荧光 RPA 方法和国家标准方法对这些样本进行猪瘟病毒核酸检测,结果显示(表 2),RPA 方

法从 20 份血清样本中检出 2 份 CSFV 核酸阳性,从 5 份淋巴结样本中检出 2 份 CSFV 核酸阳性,从 5 份肝脏样本中检出 1 份 CSFV 核酸阳性,从 3 份肾脏样本中检出 1 份 CSFV 核酸阳性,与国家标准的实时荧光 RT-PCR 检测结果完全一致。

表 2 猪瘟病毒临床样本检测结果

Table 2 Detection results of clinical samples of CSFV

样品 Sample	实时荧光 RPA 检测 Detection of real time fluorescence RPA		实时荧光 RT-PCR 检测 Detection of real time fluorescence RT-PCR	
	阳性 Positive	阴性 Negative	阳性 Positive	阴性 Negative
血清 Serum	2	18	2	18
淋巴结 Lymph Gland	2	3	2	3
肝脏 Liver	1	4	1	4
肾脏 Kidney	1	2	1	2
合计 Total	6	27	6	27

3 讨论与结论

我国于 1954 年研制出猪瘟免化弱毒疫苗(HCLV),并大规模地进行疫苗接种,现成功控制了该病的大流行,但目前猪瘟仍呈散发流行的新态势,增大了猪瘟防控的难度。此外,家猪和野猪都是 CSFV 的宿主,野猪可能在 CSFV 的流行和传播中发挥重要作用。即便某地区的家猪中已经根除了 CSFV,如果同地区的野猪群中仍有该病流行,仍有可能将病毒传入养殖场中^[2]。

快速可靠的诊断对于及时实施 CSFV 控制措施至关重要,由于目前猪瘟常以非典型形式出现,且症状与猪繁殖与呼吸综合征、伪狂犬病、猪细小病毒等相似,因此,需要进行实验室检测来确诊该病。CSFV 的实验室检测方法主要有 RT-PCR 试验^[3-11],该技术目前已比较成熟,有许多商品化的 CSFV 核酸检测试剂盒可供选择。为了实现 CSFV 的现场检测,有研究人员开发出了便携 RT-PCR 系统^[12]、引物-探针能量转移 RT-qPCR 系统^[13-14]等。为了替代 PCR 的热循环模式还诞生了很多等温扩增方法,如恒温隔绝式 RT-qPCR^[15]、环介导等温扩增(LAMP)^[16-21]和 RPA;CSFV 也可以通过传代细胞系,如猪肾细胞系 PK15 或 SK6 上培养分离而得到确诊,但病毒分离对环境洁净度要求极高,需要非常熟练的试验人员来操作,容易发生污染导致试验失败;此外,还可以使用血清学的方法来诊断 CSFV,如荧光抗体或免疫过氧化物酶测定法等^[22-23],但有研究指出,同属的牛病毒性腹泻病毒-黏膜病病毒(bovine viral diarrhea-mucosal disease virus, BVDB)和绵羊边界病病毒(border disease virus, BVD)在抗原性上与 CSFV 存在交叉反应,这 2 种病毒都能够感染猪,而且抗体水平通常比 CSFV 高^[24]。因此,血清学的方法在检测猪瘟病毒方面存在敏感性低、特异性差的问题,仅适用于发病猪的检测^[25]。

RPA 最早由 Niall Armes 于 2006 年提出,该技术包含 3 种核心蛋白、重组酶(T4 UvsX protein)、重组酶加载因子(T4 UvsY)和单链结合蛋白(T4 gp32)。重组酶在重组酶加载因子的协助下,寻找并侵入同源序列形成 D-环结构,启动链置换

换反应,DNA 聚合酶(Bsu 或 Sau)则在引物的 3-OH 端开始合成一条与父链完全一样的子链,最后,实现类似 PCR 结果的目标 DNA 指数扩增。相比 PCR 技术,RPA 的技术优势主要体现在:①反应效率高,节省时间。RPA 反应在恒温条件下进行,明显减少循环加温和降温的等待时间;反应具有高度的并行性,一条链上可以同时多个聚合酶的扩增。②对仪器设备的要求低,适合田间、基层实验室等开展核酸检测和研究。相比其他等温扩增技术,如基于核酸序列的扩增(NASBA)、信号介导的核酸扩增技术(SMART)、依赖解旋酶核酸扩增(HDA)、环介导等温扩增(LAMP)等,RPA 同样优势明显,具体表现在:①对核酸类型无要求,可以实现对 DNA 或 RNA 信号的放大,而 NASBA 只能扩增 RNA。②容易掌握,仅需设计一对稍长的特异引物(30~35 mer)即可进行 RPA 试验,也可以再设计一条带荧光标记的探针实现实时荧光检测;而 LAMP 技术需要多对引物,设计难度高,要筛选出合适的引物需要耗费大量工作。③RPA 的产物是双链 DNA 分子,可以利用许多 PCR 平台成熟的试剂和技术进行分析;LAMP 的扩增产物是一些大小不等的片段,对下游技术限制较大,无法进行直接克隆和测序,只能用于判断目的基因的存在,这也是 LAMP 方法最大的局限性。正因为 RPA 的上述优点,该技术自问世以来深受广大科研工作者喜爱,被称为有望替代 PCR 的新一代型核酸检测技术,在疫病诊断方面得到广泛应用。杨俊等^[26]建立了绵羊痘病毒和山羊痘病毒实时荧光重组酶聚合酶扩增检测方法,灵敏度高,特异性强,为绵羊痘病毒和山羊痘病毒的鉴别诊断提供了技术支持;Abd 等^[27]基于 RPA 技术,建立了可以检测所有的 7 个口蹄疫病毒血清型的方法;Wang 等^[28]建立了 PCV2 实时荧光 RPA 检测方法,灵敏度比普通 PCR 高 10 倍;王建昌等^[29]针对非洲猪瘟病毒 VP72 保守基因序列建立的 RPA 检测方法,在 38 °C 恒温反应 30 min 即可获得检测结果。

该研究在开展过程中也发现 RPA 存在的不足,如扩增片段不能太长,超过 500 bp 则会明显降低其扩增效率,甚至无法扩增出目的片段;其次,由于其所需反应温度温和、反应速率快,往往在加样过程中扩增就已经开始,无法控制扩增起始时间,暂时无法实现荧光 PCR 的定量检测功能,但对于定性检测无任何影响。

该研究基于 RPA 检测技术,针对 CSFV 5'UTR 高度保守的序列,设计了特异性引物和探针,建立了实时荧光 RPA 检测方法,实现了 CSFV 的快速诊断。该方法与 APP、HPS、Mhp、PCV-2、PRRSV、SVDV、TGEV、PPV 无交叉反应,检出限达到 8.3×10^2 copies/ μ L,特异性好,敏感性高,为 CSFV 的快速、准确诊断提供了强有力的工具。

参考文献

[1] EDWARDS S, FUKUSHO A, LEFÈVRE P C, et al. Classical swine fever: The global situation[J]. *Veterinary microbiology*, 2000, 73(2/3): 103-119.
 [2] ZIMMERMAN J J, KARRIKER L A, RAMIREZ A, 等. 猪病学[M]. 赵德明, 张仲秋, 周向梅, 等译. 10 版. 北京: 中国农业大学出版社, 2014.
 [3] HOFFMANN B, BEER M, REID S M, et al. A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: Sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organisation for

Animal Health[J]. *Veterinary microbiology*, 2009, 139(1/2): 1-23.
 [4] HOFFMANN B, BEER M, SCHELP C, et al. Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever[J]. *Journal of virological methods*, 2005, 130(1/2): 36-44.
 [5] HOFFMANN B, BLOME S, BONILAURI P, et al. Classical swine fever virus detection: Results of a real-time reverse transcription polymerase chain reaction ring trial conducted in the framework of the European network of excellence for epizootic disease diagnosis and control[J]. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 2011, 23(5): 999-1004.
 [6] LE DIMNA M, VRANCKEN R, KOENEN F, et al. Validation of two commercial real-time RT-PCR kits for rapid and specific diagnosis of classical swine fever virus[J]. *Journal of virological methods*, 2008, 147(1): 136-142.
 [7] LEIFER I, BLOME S, BEER M, et al. Development of a highly sensitive real-time RT-PCR protocol for the detection of Classical swine fever virus independent of the 5' untranslated region[J]. *Journal of virological methods*, 2011, 171(1): 314-317.
 [8] MCGOLDRICK A, LOWINGS J P, IBATA G, et al. A novel approach to the detection of classical swine fever virus by RT-PCR with a fluorogenic probe (TaqMan)[J]. *Journal of virological methods*, 1998, 72(2): 125-135.
 [9] PATON D J, MCGOLDRICK A, BELAK S, et al. Classical swine fever virus: A ring test to evaluate RT-PCR detection methods[J]. *Veterinary microbiology*, 2000, 73(2/3): 159-174.
 [10] PATON D J, MCGOLDRICK A, BENS AUDE E, et al. Classical swine fever virus: A second ring test to evaluate RT-PCR detection methods[J]. *Veterinary microbiology*, 2000, 77(1/2): 71-81.
 [11] LE POTIER M F, LE DIMNA M, KUNTZ-SIMON G, et al. Validation of a real-time RT-PCR assay for rapid and specific diagnosis of Classical Swine Fever virus[J]. *Developments in biologicals*, 2006, 126: 179-186.
 [12] LIU L, LUO Y, ACCENSI F, et al. Pre-clinical evaluation of a real-time PCR assay on a portable instrument as a possible field diagnostic tool: Experiences from the testing of clinical samples for African and classical swine fever viruses[J]. *Transboundary and emerging diseases*, 2017, 64(5): E31-E35.
 [13] LIU L H, XIA H Y, BELAK S, et al. Development of a primer-probe energy transfer real-time PCR assay for improved detection of classical swine fever virus[J]. *Journal of virological methods*, 2009, 160(1/2): 69-73.
 [14] ZHANG X J, XIA H Y, EVERETT H, et al. Evaluation of a primer-probe energy transfer real-time PCR assay for detection of classical swine fever virus[J]. *Journal of virological methods*, 2010, 168(1/2): 259-261.
 [15] LUNG O, PASICK J, FISHER M, et al. Insulated isothermal reverse transcriptase PCR (iIRT-PCR) for rapid and sensitive detection of classical swine fever virus[J]. *Transboundary and emerging diseases*, 2016, 63(5): E395-E402.
 [16] CHEN H T, ZHANG J, MA L N, et al. Rapid pre-clinical detection of classical swine fever by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification[J]. *Molecular and cellular probes*, 2009, 23(2): 71-74.
 [17] CHEN L, FAN X Z, WANG Q, et al. A novel RT-LAMP assay for rapid and simple detection of classical swine fever virus[J]. *Virologica sinica*, 2010, 25(1): 59-64.
 [18] CHOWDRY V K, LUO Y Z, WIDÉN F, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay combined with a lateral flow dipstick for rapid and simple detection of classical swine fever virus in the field[J]. *Journal of virological methods*, 2014, 197: 14-18.
 [19] YIN S H, SHANG Y J, ZHOU G Q, et al. Development and evaluation of rapid detection of classical swine fever virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)[J]. *Journal of biotechnology*, 2010, 146(4): 147-150.
 [20] ZHANG X J, HAN Q Y, SUN Y, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification for visual detection of the HCLV vaccine against classical swine fever in China[J]. *Journal of virological methods*, 2011, 171(1): 200-205.
 [21] ZHANG X J, SUN Y, LIU L H, et al. Validation of a loop-mediated isothermal amplification assay for visualised detection of wild-type classical swine fever virus[J]. *Journal of virological methods*, 2010, 167(1): 74-78.
 [22] TURNER L W, BROWN L N, CARBREY E A, et al. Recommended minimum standards for the isolation and identification of hog cholera by the fluorescent antibody-cell culture technique[J]. *Proceedings, annual meeting of the United States animal health association*, 1968, 72: 444-447.

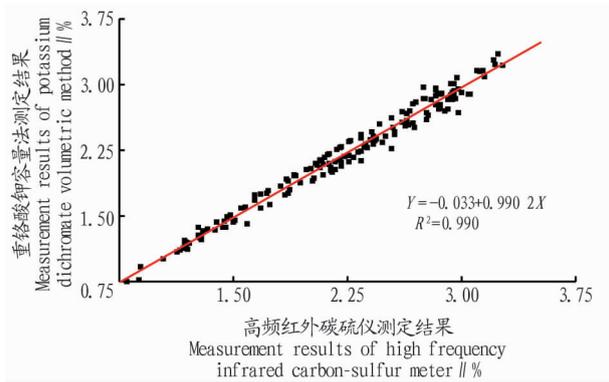


图1 耕地土壤有机质测定方法比对结果

Fig.1 Comparison result of the determination methods of soil organic matter in cultivated land

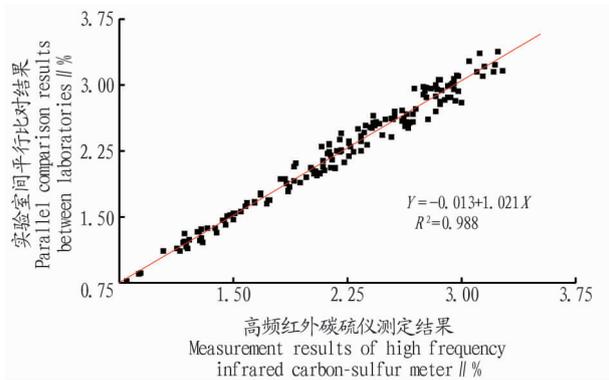


图2 实验室间平行比对结果

Fig.2 Parallel comparison results between laboratories

结果 RSD<10%的有 156 件,合格率为 97.5%;实验室间平行比对结果与高频红外碳硫仪测定结果 RSD<10%有 155 件,合格率为 96.9%,均满足平行试验的要求(合格率≥95%)。

3 结论

该研究建立了高频红外碳硫仪对耕地土壤有机质的测定方法,试样先用稀盐酸除去无机碳,并在助熔剂的作用下样品中的有机质组分完全燃烧,从而在检测系统中实现定量测定。通过对试验测定条件的优化,确定了该方法的称样量为 0.05 g,高纯铁和高纯钨粒的加入量分别为 0.4 和 1.5 g,在最佳的试验条件下,确定了该方法对土壤有机质测定的检出限为 0.028%,测定下限为 0.093%,标准物质平行测定结果显示其测定回收率在 100.51%~101.78%,RSD 在 1.48%~1.96%,

可见该方法的检出限、准确度和精密度满足试验检测的要求。将该方法运用于东至地区的耕地质量调查土壤有机质样品的测定中,并通过方法比对和实验室间平行测量比对,结果发现该方法测定结果与重铬酸钾容量法、实验室间测定的结果均呈极显著相关水平,说明该方法能够很好地运用于耕地质量调查土壤有机质测定实践。

参考文献

- [1] ZHAO R, WU K N, LI X L, et al. Discussion on the unified survey and evaluation of cultivated land quality at county scale for China's 3rd national land survey: A case study of Wen County, Henan province [J]. Sustainability, 2021, 13(5): 2513.
- [2] LIU X W, ZHAO C L, SONG W. Review of the evolution of cultivated land protection policies in the period following China's reform and liberalization [J]. Land use policy, 2017, 67: 660-669.
- [3] 胡琼, 吴文斌, 项铭涛, 等. 全球耕地利用格局时空变化分析 [J]. 中国农业科学, 2018, 51(6): 1091-1105.
- [4] 王军, 李萍, 詹韵秋, 等. 中国耕地质量保护与提升问题研究 [J]. 中国人口·资源与环境, 2019, 29(4): 87-93.
- [5] 张静, 姚景良. 耕地资源现状与保护对策分析 [J]. 基层农技推广, 2015, 3(11): 88-89.
- [6] 吴克宁, 赵瑞, 赵华甫. 对当前我国耕地质量调查评价的思考 [J]. 中国土地, 2018(3): 19-20.
- [7] 安萍莉, 陈思宇, 孟丽君, 等. 三调耕地分等中全国标准耕作制度体系的确定 [J]. 中国农业大学学报, 2020, 25(8): 61-72.
- [8] 宋春雨, 张兴义, 刘晓冰, 等. 土壤有机质对土壤肥力与作物生产力的影响 [J]. 农业系统科学与综合研究, 2008, 24(3): 357-362.
- [9] 宋洪福, 袁红, 张亮, 等. 碳循环调控土壤肥力质量研究综述 [J]. 农业与技术, 2019, 39(16): 1-4.
- [10] 周伟峰, 朱岩岩, 张喜凤. 土壤有机质含量测定方法研究 [J]. 河南科学, 2019, 37(2): 270-274.
- [11] 郭艳. 土壤有机质不同测定方法的对比 [J]. 农业与技术, 2019, 39(18): 25-26.
- [12] 中华人民共和国农业部. 土壤检测 第 6 部分: 土壤有机质的测定: NY/T 1121.6—2006 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [13] 赵星, 宋江伟, 史旭峰. 燃烧-高频红外碳硫分析法测定土壤中全碳量 [J]. 云南地质, 2018, 37(2): 243-246.
- [14] 曾奕跃. 应用高频红外碳硫分析仪测定地质样品中碳、硫成分 [J]. 中国高新技术企业, 2014(16): 55-56.
- [15] WEI J H, SUN H F, YANG S J. The cycle measurement of sulfur blank value with the CS-444 infrared ray carbon sulfur analyzer [J]. Advanced materials research, 2011, 399/400/401: 2173-2176.
- [16] 殷陶刚, 窦向丽, 张旺盛, 等. 应用高频红外碳硫仪测定农用地土壤样品中有机质含量 [J]. 岩矿测试, 2020, 39(4): 631-638.
- [17] 李源, 尹肖尧, 常钟元. 高频红外碳硫仪测定土壤和沉积物中有机质 [J]. 化学分析计量, 2020, 29(6): 75-78.
- [18] 杨旭龙. 高频红外碳硫仪批量测定土壤中的有机碳含量 [J]. 化学工程师, 2021, 35(6): 18-20, 17.
- [19] 龚仓, 付桂花, 黄艳波. 高频燃烧-红外碳硫仪测定岩心钻探样品中碳硫 [J]. 黄金, 2016, 37(12): 77-80.
- [20] 合酶检测方法的建立 [J]. 中国兽医科学, 2019, 49(5): 544-550.
- [21] ABD EL WAHED A, EL-DEEB A, EL-THOLOTH M, et al. A portable reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of foot-and-mouth disease virus [J]. PLoS One, 2013, 8(8): 1-7.
- [22] WANG J C, WANG J F, LIU L B, et al. Rapid detection of Porcine circovirus 2 by recombinase polymerase amplification [J]. Journal of veterinary diagnostic investigation, 2016, 28(5): 574-578.
- [23] 罗勇. 猪瘟病毒套式 RT-PCR 检测方法的建立和种猪场猪瘟免疫与净化研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- [24] 胡春亮. 猪瘟病毒毒性腹泄病毒的应对措施研究 [J]. 中国动物保健, 2021, 23(6): 107, 109.
- [25] 杨俊, 聂福平, 周庆, 等. 绵羊痘病毒和山羊痘病毒实时荧光重组酶聚合酶检测方法的建立 [J]. 中国动物检疫, 2016, 33(7): 78-81, 94.

(上接第 169 页)