

孙金博, 陈宏朋, 李芳韬, 等. CSFV/PRV 三重荧光定量 PCR 与 PRV 双重微滴式数字 PCR 检测方法的建立及性能比较 [J]. 畜牧与兽医, 2026, 58 (10): 67–76.

Sun J B, Chen H P, Li F T, et al. Establishment and performance comparison of a triplex fluorescence quantitative PCR for CSFV and PRV and a duplex droplet digital PCR for PRV detection [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2026, 58 (10): 67–76.

CSFV/PRV 三重荧光定量 PCR 与 PRV 双重微滴式数字 PCR 检测方法的建立及性能比较

孙金博^{1,2}, 陈宏朋¹, 李芳韬¹, 赵俊杰¹, 徐璐¹, 王海东², 刘业兵¹, 夏应菊^{1*}

(1. 国家猪瘟参考实验室/中国兽医药品监察所, 北京 100081;

2. 山西农业大学动物医学学院, 山西 晋中 030800)

摘要: 猪瘟病毒 (CSFV) 与伪狂犬病病毒 (PRV) 监测是猪场疫病防控的重要手段, 本研究旨在建立 CSFV、PRV 三重荧光定量 PCR (qPCR) 与 PRV 双重微滴式数字 PCR (ddPCR) 方法并进行比较。针对 CSFV E2、PRV gE 和 PRV gH 基因序列的保守区域设计用于构建三重 qPCR 体系的特异性引物和探针, 对构建的三重 qPCR 检测方法进行优化, 建立标准曲线并进行敏感性、特异性和重复性试验。结果显示, 该三重 qPCR 方法标准曲线相关系数 (R^2) 均大于 0.99, 对 PRV gE 基因的最低检测限为 100 copies/ μ L, 对 CSFV E2 和 PRV gH 的最低检测限为 10 copies/ μ L, 对常见猪病原体及健康猪样品检测结果均为阴性, 组内与组间变异系数 (CV) 均小于 5%, 表现出良好的敏感性、特异性和重复性。使用该方法对 235 份组织样品和 35 份全血样品进行检测, CSFV 和 PRV 检测结果与国标检测方法的符合率分别为 98.7% (232/235) 和 100% (80/80)。基于上述 PRV 引物探针建立了双重 ddPCR 方法并制备配套的核酸对照品 PRV-DNA-RM 与 PRV- Δ gE-DNA-RM, 对其定值分别为 (911.34 $\pm$ 42.92) 和 (1 280.8 $\pm$ 94.4) copies/ μ L; 2 种核酸对照品的稳定性评估显示, 其在 4 $^{\circ}$ C 及更低温度中可稳定保存 14 d 以上, 在 37 $^{\circ}$ C 可稳定保存至少 7 d。采用 20、10、5 和 1 copies/ μ L 的核酸对照品对所建立的 qPCR 和 ddPCR 方法进行了比较, qPCR 方法在检测通量及检测时长上更有优势, 而 ddPCR 方法对低拷贝数 ($\leq$ 5 copies) 的样品检测更为灵敏。综上, 本研究成功建立了可同时检测 CSFV E2、PRV gE 和 PRV gH 基因的 qPCR 和 ddPCR 方法及两种 PRV 核酸对照品, 可广泛用于 PRV 的核酸检测、疫苗特异性鉴定及检测方法的质量控制。

关键词: 猪瘟病毒; 伪狂犬病病毒; 多重荧光定量 PCR; 微滴式数字 PCR

中图分类号: S852.65 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2026)10-0067-10

Establishment and performance comparison of a triplex fluorescence quantitative PCR for CSFV and PRV and a duplex droplet digital PCR for PRV detection

SUN Jinbo^{1,2}, CHEN Hongpeng¹, LI Fangtao¹, ZHAO Junjie¹, XU Lu¹,

WANG Haidong², LIU Yebing¹, XIA Yingju^{1*}

(1. National Reference Laboratory for Classical Swine Fever/China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China;

2. College of Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030800, China)

Abstract: Classical swine fever (CSF) and pseudorabies (PR) are major diseases threatening swine health, and pathogen surveillance is a crucial measure for disease prevention and control on pig farms. In this study, specific primers and probes targeting the conserved regions of the CSFV E2, PRV gE, and PRV gH genes were designed to establish a triplex quantitative real-time PCR (qPCR) assay. The triplex qPCR was optimized, and a standard curve plot targeting each gene was performed. Subsequently, the sensitivity, specificity and repeatability of the method were evaluated. The results showed that the correlation coefficient (R^2) of the standard curves for each target in the triple qPCR detection method was greater than 0.99. The limit of detection (LOD) was 100 copies/ μ L for PRV gE, and 10 copies/ μ L for both CSFV E2 and PRV gH. All tested common swine pathogens and healthy pig samples yielded negative results. The intra- and inter-assay coefficients of variation (CV) were both below 5%, demonstrating excellent sensitivity, specificity, and repeatability. When applied to 235 tissue samples and 35 blood samples, the detection results for CSFV and PRV showed 98.7% (232/235) and 100% (80/80) concordance,

收稿日期: 2025-10-14; 修回日期: 2026-08-03

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFD1800805, 2022YFD1800605)

第一作者: 孙金博, 男, 硕士研究生

* 通信作者: 夏应菊, 高级兽医师, 主要从事猪瘟、非洲猪瘟等重要猪病检测技术及兽用标准物质方面的研究, E-mail: vet_xiayj@163.com。

respectively, compared with the national standard detection methods. Furthermore, a droplet digital PCR (ddPCR) assay was established based on the above primers and probes, and the corresponding nucleic acid reference materials PRV-DNA-RM and PRV-ΔgE-DNA-RM were prepared. Their assigned values were (911.34±42.92) copies/μL and (1 280.8±94.4) copies/μL, respectively. The stability of the two nucleic acid reference materials was evaluated, and it was determined that they could be stably stored at 4 °C and at lower temperatures for more than 14 days and at 37 °C for at least 7 days. Finally, the triplex qPCR and droplet digital PCR methods were compared using nucleic acid reference materials at 20/10/5/1 copies/μL, where the fluorescence quantitative PCR method had more advantages in terms of detection throughput and duration, while the digital PCR method was more sensitive in detecting samples with low copy numbers (≤5 copies). In conclusion, this study successfully established a triplex qPCR method that was able to simultaneously detect the CSFV E2, PRV gE and PRV gH genes, a ddPCR method and two PRV nucleic acid reference materials. These can be widely used for nucleic acid detection of pseudorabies virus in pigs, specific identification of vaccines and quality control of detection methods.

Keywords: classical swine fever virus; porcine pesudorabies virus; triplex qPCR; droplet digital PCR

猪瘟 (classical swine fever, CSF) 是一种高度接触性、高发病率和死亡率的病毒性疾病,是世界动物卫生组织规定必须申报的疫病,对我国生猪养殖产业构成巨大威胁。虽然 CSF 兔化弱毒疫苗的使用控制了 CSF 在我国的大规模流行,但仍有温和型 CSF 偶有暴发^[1]。伪狂犬病 (pseudorabies, PR) 首次报道于 20 世纪 50 年代,由猪疱疹病毒 1 型引起,感染可导致仔猪高死亡率、育肥猪生长迟缓和母猪繁殖失败^[2],常与其他病原混合感染,2011 年在我国多地流行由变异株引起的伪狂犬病^[3]。因此,针对 CSF 和 PR 的有效防控手段是保障养猪业健康和稳定发展的基础。尽管传统的隔离消毒和疫苗免疫等措施已广泛应用,但仍难以完全阻断病毒传播,因此,建立高效、准确的病原检测技术用于早期实验室诊断,对于 2 种疫病的防控尤为重要。

相较于传统单一荧光定量 PCR (qPCR),多重 qPCR 技术可在同一反应体系中实现多靶标基因的同步扩增,显著提升了检测效率。目前,多位研究者已经建立了针对不同病原的多重检测体系,且相关试验数据也证实了其在敏感性、特异性和重复性等指标上的显著优势,为混合感染场景下的病原诊断提供了可靠的技术支撑^[4-7]。然而,多重 qPCR 在一个体系中同时检测多个靶标,引物及探针可能存在相互干扰,或者多个靶标的扩增效率在多重体系中存在竞争性抑制关系,因此选择合适的引物探针、优化反应条件和体系对多重 qPCR 而言尤其重要。此外,qPCR 结果的准确性高度依赖标准曲线的精确性,这导致其定量精度相对有限,且构建标准曲线的方法也存在一些局限性,如依赖标准品质量、不同实验室间以及不同型号仪器间的检测结果存在一定差异。

微滴式数字 PCR (ddPCR) 是一种绝对定量的核酸检测技术,通过将反应体系分割为成千上万个微反应单元,在每个单元中独立完成扩增,再根据荧光信号终点读数和泊松分布统计分析,实现目标基因的绝对拷贝数计算,这个过程不依赖标准曲线,且上万

个微反应单元相当于将多重体系拆分为多个单重体系进行反应,可有效缓解多重 qPCR 中引物和探针相互干扰及多个靶标竞争性抑制的问题,对低拷贝的样品具有更高的敏感性。

本研究基于猪瘟病毒 (CSFV) E2 基因、伪狂犬病病毒 (PRV) gE 基因和 PRV gH 基因设计多重 qPCR 检测体系。其中 E2 蛋白是 CSFV 的保护性蛋白,其基因在病毒复制中较为稳定,且具有较高的保守性和特异性;gE 基因是 PRV 的主要毒力基因,目前商品化 PRV 疫苗基本均缺失该基因,因此 gE 基因可作为区分 PRV 疫苗株感染和野毒株感染的检测指标^[8-9];gH 基因是 PRV 基因组中较保守的基因^[10],在不同基因型的伪狂犬病病毒中同源性在 95%~100%之间,可与 gE 基因联合使用,实现 PRV 疫苗株和野毒株的通用检测。此外,为进一步提升检测体系的准确性与标准化程度,本研究在三重 qPCR 基础上建立了 ddPCR 方法,制备了 PRV 野毒株和疫苗株的核酸对照品,并以 gH 基因为靶基因,通过 ddPCR 对 PRV 核酸对照品进行了拷贝数定值,为该病原的鉴别检测提供含量确定、安全、可靠的质控品,用于检测实验室的质量控制、检测试剂盒质量研究、实验室比对,然后使用构建的核酸对照品对所建立的 qPCR 方法和 ddPCR 方法进行了比较。

1 材料与方法

1.1 主要试验材料

用于本方法建立的 CSFV C 株 (CVCC AV1412)、石门株病毒 (CVCC AV1411) 核酸和 PRV HuB/WH/2024,用于本方法特异性检测的猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒 (PRRSV)、牛病毒性腹泻病毒 (BVDV)、猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV)、猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 以及用于构建 PRV 核酸对照品的 HuB/WH/2024 和商品化疫苗 (Bartha K61 株),均由中国兽医药品监察所国家猪瘟参考实验室鉴定及保存;重组弱毒株 JS-2012-ΔgE/gI-E2 核酸样品由中

国农业科学院上海兽医研究所童武副研究员馈赠。2×GC-rich PCR MasterMix (KT206-01) 购自天根生化科技(北京)有限公司; Cycle-Pure Kit (D6492-01) 购自北京索莱宝科技有限公司; T Easy Vector System I (A1360) 购自普洛麦格(北京)生物技术有限公司; HyperProbe Mixture (CW3003M) 购自江苏康为世纪生物科技股份有限公司; *Ex Taq*TM Version 2.0 plus dye (RR902A)、MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver. 5.0 (9766)、DL2000/1000 DNA Marker (3427A、3591B)、DH5α 感受态细胞(9057) 购自北京宝日医生物技术有限公司; Probe dPCR SuperMix (23003) 购自北京新羿生物科技有限公司。

190 份猪瘟病毒阳性组织样品核酸、45 份猪瘟病毒阴性组织样品核酸, 45 份伪狂犬病病毒阳性组织样品核酸以及 35 份全血样品, 均由本实验室保存。

qPCR 仪 (LightCycler[®] 480 II, 上海罗氏制药有限公司), ddPCR 仪 (D-50, 北京新羿生物科技有限公司)。

1.2 引物、探针设计与合成

根据 NCBI 中 CSFV C 株 (GenBank: AF326963.1) E2 基因、PRV JS-2012 株 (GenBank: KP257591.1) gE 和 gH 基因的 CDS 区域, 利用 Primer 3 Plus 设计特异性引物和探针。试验所用引物与探针序列见表 1, 由上海生工生物工程技术有限公司和北京六合华大基因科技有限公司合成。

表 1 质粒构建用 PCR 引物及三重 qPCR 引物探针信息		
名称	序列 (5'→3')	产物大小/ bp
PRV gE F	GTGCTCGTGATGACCCACAA	627
PRV gE R	CCCATTCGTCAC TTCGGTT	
PRV gH F	GGGCCGTACTACTTTTACC	
PRV gH R	CATGCGATCCGTGTAGTC	876
CSFV E2 F	CTGCAAGGAAGATTACAGGT	1 014
CSFV E2 R	TCTCGGAAGTAATCTGAGTG	
qPCR gE F	CTGGCTCTGCGTGCTGTG	
qPCR gE R	CGTCGTGCGCTGCTAGT	137
qPCR gE P	CY5-TACACCAGCCTGCCCACGC-MGB	
qPCR gH F	GAGACCCTGCTCCGCA	113
qPCR gH R	AGGCTGAAGGGCYCGTT	
qPCR gH P	HEX-GCGCCAACTCCACCATCCCCAGC-BHQ2	
qPCR E2 F	CAATAGGCTGGACGGGTGT	114
qPCR E2 R	CACAATCCATTCTGTGCGGAA	
qPCR E2 P	FAM-CATAGAGTGCACAGCAGTGAGCCC-BHQ2	

1.3 重组质粒的构建与鉴定

以 CSFV C 株病毒 cDNA 和 PRV HuB/WH/2024 株病毒 DNA 为模版, 使用表 1 中引物分别扩增获得 E2、gE 和 gH 部分 PCR 片段。纯化回收并连接至 p-GEM-T 载体 (3 015 bp), 转化至 DH5α 感受态细胞中, 挑取阳性克隆进行质粒提取和 PCR 验证, 并对序列进行测序。使用分光光度计测定质粒浓度, 并按公式计算拷贝数。拷贝数 (copies/μL) = 6.02×10²³×质粒浓度 (ng/μL) ×10⁻⁹/ [质粒大小 (bp) ×660]。

1.4 三重 qPCR 反应体系优化

对 CSFV E2、PRV gE 和 PRV gH 三重 qPCR 反应体系进行引物浓度、探针浓度、*Taq* HS 酶 (5 U/μL) 添加量和退火温度的优化。将鉴定后的 3 个质粒分别稀释至 1×10⁵ copies/μL, 等比例混合后取 2 μL 作为模板, 引物终浓度设置为 0.32、0.36、0.4、0.44、0.48 μmol/μL, 探针终浓度设置为 0.12、0.16、0.2、0.24、0.28 μmol/μL, *Taq* HS 酶添加量设置为 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 μL。反应条件: 95 ℃ 30 s; 95 ℃ 10 s, 退火温度设置为 58 ℃、59 ℃、60 ℃、61℃、62 ℃, 退火时间 30 s, 进行 45 个循环。在出现典型扩增曲线、无非特异性扩增的同时, 优先选择 Ct 值更小、荧光信号强度更高的反应体系作为优化结果。

1.5 三重 qPCR 标准曲线建立

将 10 倍倍比稀释的 pGEMT-CSFV-E2、pGEMT-PRV-gE 和 pGEMT-PRV-gH (10⁷ ~ 10³ copies/μL) 等比混合, 取 3 μL 作为 qPCR 模板, 每个稀释度做 3 个重复, 并设立灭菌无酶水为阴性对照。经优化后的反应体系扩增后, 以质粒拷贝数的对数值作为横坐标, 以测得 Ct 值的平均值作为纵坐标绘制标准曲线。

1.6 三重 qPCR 敏感性试验

将 10⁴ ~ 10⁰ copies/μL 的 pGEMT-CSFV-E2、pGEMT-PRV-gE 和 pGEMT-PRV-gH 等比混合作为模板, 使用优化后反应体系进行三重 qPCR 反应, 能够扩增出曲线的质粒的最低拷贝数, 即为本试验建立的方法的检测敏感度。

1.7 三重 qPCR 特异性试验

使用本试验建立的方法对 CSFV (石门株)、PRRSV、BVDV、TGEV 和 PCV2 的 cDNA 和 DNA 进行扩增, 以 pGEMT-CSFV-E2、pGEMT-PRV-gE 和 pGEMT-PRV-gH 为阳性对照, 以灭菌无酶水为阴性对照, 检测该方法的特异性。

1.8 三重 qPCR 重复性试验

将 10⁷、10⁵ 和 10³ copies/μL 的 pGEMT-CSFV-E2、pGEMT-PRV-gE 和 pGEMT-PRV-gH 等比混合作为模板, 使用优化后的反应体系进行三重 qPCR 重

复性检测, 每个稀释度 3 个重复, 分别进行组内和组间重复性试验, 组间重复试验为 3 次独立的试验。使用 Excel 软件分析和评价本方法的重复性。

1.9 临床样品检测及符合率试验

对实验室保存的 235 份猪瘟病毒组织样品核酸(阳性 190 份, 阴性 45 份), 45 份已确定为伪狂犬病毒阳性组织样品核酸以及 35 份临床全血样品使用本试验建立的三重 qPCR 方法检测, 使用 pGEMT-CSFV-E2、pGEMT-PRV-gE 和 pGEMT-PRV-gH 三种质粒作为阳性对照, 灭菌无酶水为阴性对照; 设立以 gE/gI 基因缺失型 PRV 病毒为载体, 嵌合 CSFV E2 蛋白的重组弱毒株 JS-2012-ΔgE/gI-E2^[11] 检验本方法对野毒株和疫苗株感染的鉴别效果; 最后与 GB/T 16551—2020《猪瘟诊断技术》^[12]、GB/T 35911—2018《伪狂犬病病毒荧光 PCR 检测方法》^[13] 所公布的 CSFV 和 PRV 的检测方法进行比较, 并根据 WS/T 505—2017《定性测定性能评价指南》^[14] 来计算本方法与国标检测方法的总符合率与阳性符合率。另外, 使用 gE 缺失的猪伪狂犬商品化疫苗和猪伪狂犬野毒, 以及自建的 2 种猪伪狂犬核酸对照品的 DNA 为模板进行同时检测, 确定本方法是否可用于对 PR 活疫苗和 PR 疫苗毒核酸对照品的鉴别检验。

1.10 PRV ddPCR 方法的建立

使用 Probe dPCR SuperMix 产品说明书中的反应程序: 95 ℃ 10 min; 94 ℃ 30 s, 60 ℃ 1 min, 45 个循环; 12 ℃ 5 min。在此基础上, 上下游引物和探针终浓度设置为 400、500、600、700 nmol/L 和 150、200、250、300、350 nmol/L, Probe dPCR Super Mix 15 μL, ddH₂O 补充至 30 μL。根据扩增结束后阴性和阳性微滴的区分程度来确定最佳反应体系。

1.11 PRV 核酸标准品构建

将实验室保存的 HuB/WH/2024 及 Bartha K61 接种敏感细胞系 PK15 细胞, 接毒后 37 ℃ 5% CO₂ 下孵育至细胞病变 (CPE) 比例达到 70%~90%, 将细胞冻融后, 取上清液, 加入上清液体积 10% 的商品化核酸保护剂, 充分混匀后 4 ℃ 静置 1 h 以灭活病毒。取灭活后病毒进行 10 倍系列稀释接种 PK15, 并设立不接毒细胞作为阴性对照, 设立未灭活病毒接种作为阳性对照, 在 37 ℃ 5% CO₂ 下连续盲传 3 代, 每天在镜下检查细胞病变, 确定病毒是否灭活彻底。灭活后得到的 PRV 病毒液作为标准品的候选物, 分别命名为 PRV-C 和 PRV-ΔgE-C。

1.12 PRV 核酸标准品的定值

使用核酸保护剂将 PRV-C 和 PRV-ΔgE-C 进行 10、100、1 000 倍稀释, 提取核酸, 对核酸进行拷贝数初步定值。根据定值结果, 进一步稀释候选物病毒

液, 使其拷贝数在 10²~10³ copies/μL。对稀释后的候选物进行 500 μL/支分装, -80 ℃ 冻存, 作为 PRV 核酸标准品, 命名为 PRV-DNA-RM 和 PRV-ΔgE-DNA-RM。

取 PRV-DNA-RM 和 PRV-ΔgE-DNA-RM 核酸对照品各 3 支, 通过 ddPCR 对其进行定值。由于疫苗株缺失 PRV gE 基因, 因此采用 PRV gH 基因作为检测靶标。

1.13 PRV 核酸对照品稳定性试验

为了测试核酸对照品在不同温度环境下的稳定性, 自 -80 ℃ 冰箱内取野毒株和疫苗株核酸对照品, 在 -20 ℃、4 ℃ 下分别保存 1、3、7、14 d, 或 37 ℃ 保存 1、3、5、7 d 进行耐老化试验, 进行 ddPCR 检测, 分析不同保存条件下核酸对照品的稳定性。

1.14 ddPCR 与 qPCR 方法检测极限比较

为了比较 ddPCR 与 qPCR 方法对低拷贝数样品检测的灵敏性, 将 PRV-DNA-RM 与 PRV-ΔgE-DNA-RM 核酸对照品进行系列稀释至 20、10、5、1 copies/μL, 分别使用 2 种方法同时进行检测, 在上样量相同的情况下比较 2 种方法在低拷贝样品的检测上是否有差异。

2 结果与分析

2.1 重组质粒鉴定

以 pGEMT-CSFV-E2、pGEMT-PRV-gE 和 pGEMT-PRV-gH 为模板, 使用表 1 中引物进行普通 PCR 扩增后, 经凝胶电泳分析, 对应扩增产物均处于凝胶中正确位置 (图 1), 成功构建质粒 E2 (4 029 bp)、质粒 gE (3 642 bp) 和质粒 gH (3 891 bp), 3 种质粒的浓度分别为 151、184 和 176 ng/μL, 根据拷贝数换算公式换算后, 分别为 3.42×10¹⁰, 4.61×10¹⁰ 和 4.13×10¹⁰ copies/μL, 命名为 pGEMT-CSFV-E2、pGEMT-PRV-gE 和 pGEMT-PRV-gH。

2.2 三重 qPCR 反应体系优化

经过对三重 qPCR 反应体系的优化, 最佳反应体系如下: 引物浓度 PRV gE 为 0.44 μmol/μL (1.1 μL), PRV gH 为 0.36 μmol/μL (0.9 μL), CSFV E2 为 0.32 μmol/μL (0.8 μL), 探针浓度 PRV gE 为 0.28 μmol/μL (0.6 μL), PRV gH 和 CSFV E2 为 0.16 μmol/μL (0.4 μL), Taq HS 酶添加量为 0.2 μL, HyperProbe Mixture 12.5 μL, 模板 2 μL, ddH₂O 补至 25 μL。反应条件为 95 ℃ 30 s; 95 ℃ 10 s, 60 ℃ 30 s, 45 个循环。

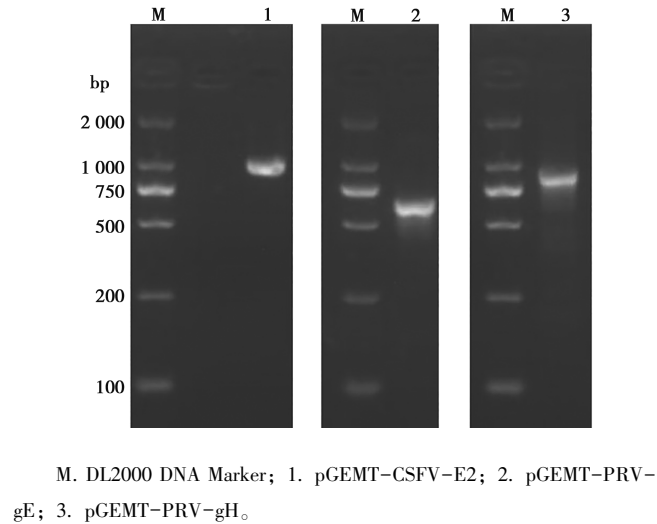


图 1 重组质粒 PCR 鉴定结果

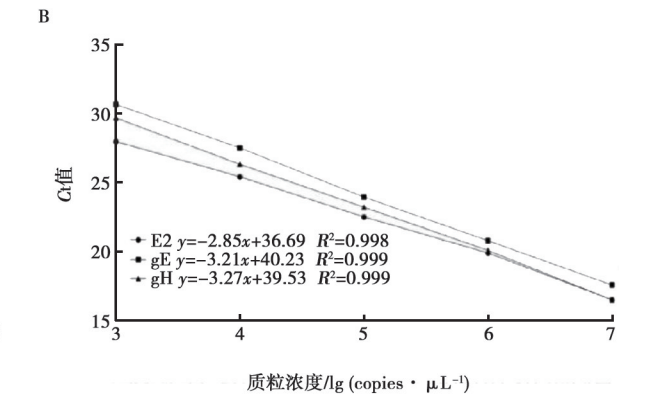
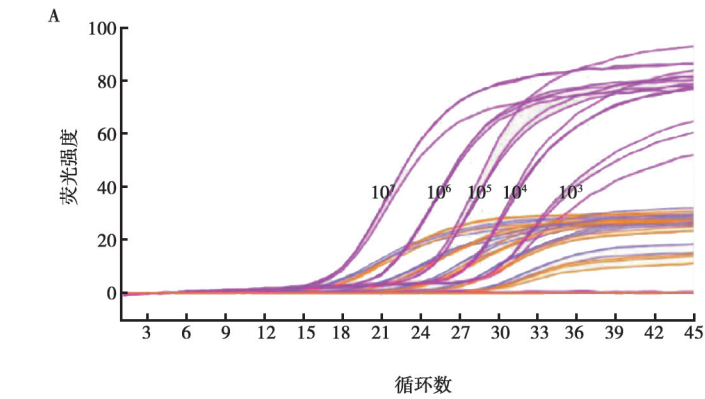


图 2 三重 qPCR 扩增曲线 (A) 及标准曲线 (B)

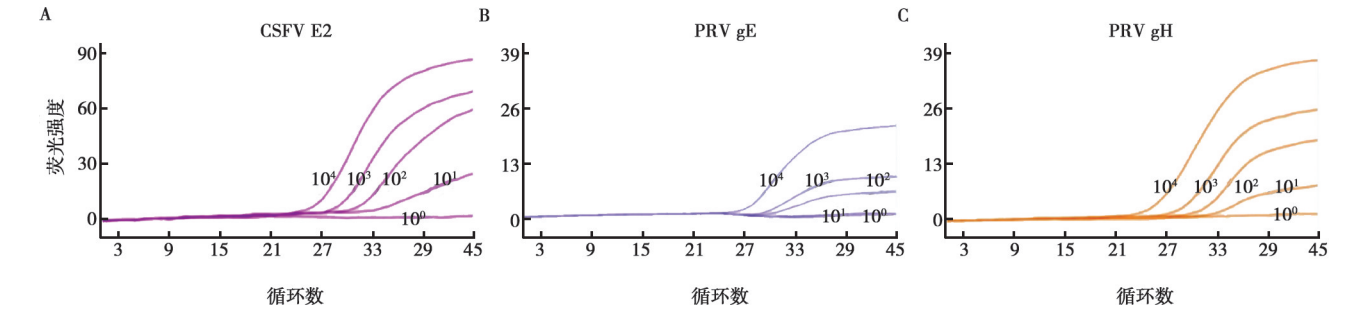


图 3 三重 qPCR 敏感性扩增曲线

2.5 三重 qPCR 特异性试验

应用三重 qPCR 体系对 3 种质粒以及 CSFV 石门株、PRRSV、BVDV、TGEV 和 PCV2 的 cDNA 和 DNA 进行扩增，并设立灭菌无酶水作为阴性对照。

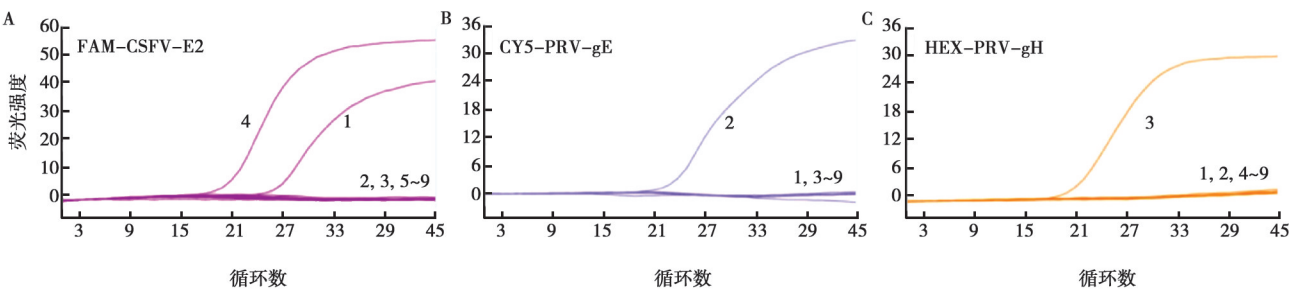
2.3 三重 qPCR 标准曲线建立

以 $10^7 \sim 10^3$ copies/ μL 的 3 种质粒等比混合作为模板，使用优化后的反应体系进行 qPCR 扩增，结果显示三种质粒标准曲线的 R^2 均大于 0.99 (图 2)，表明本试验建立的三重 qPCR 方法在稀释度范围内，重组质粒的 C_t 值与拷贝数之间存在良好线性关系。

2.4 三重 qPCR 敏感性

应用三重 qPCR 体系对分别对 $10^4 \sim 10^0$ copies/ μL 的 pGEMT-CSFV-E2、pGEMT-PRV-gE 和 pGEMT-PRV-gH 三种质粒的等比混合模板进行扩增，结果显示 (图 3)，本方法对 pGEMT-PRV-gE 的最低检测限为 100 copies/ μL ，对 pGEMT-CSFV-E2 和 pGEMT-PRV-gH 的最低检测限为 10 copies/ μL ，表明本三重 qPCR 方法灵敏性较高。

结果显示 (图 4)，仅 pGEMT-CSFV-E2、pGEMT-PRV-gE、pGEMT-PRV-gH 和 CSFV 石门株出现特异性扩增曲线，而非目的病原核酸和阴性对照均无特异性扩增曲线，表明本方法特异性较强。



曲线 1. CSFV (C 株); 2. PRV gE; 3. PRV gH; 4. CSFV (石门株); 5~9. 依次为 PRRSV、BVDV、TGEV、PCV2、阴性对照。

图 4 三重 qPCR 特异性扩增曲线

2.6 三重 qPCR 重复性试验

使用 pGEMT-CSFV-E2、pGEMT-PRV-gE 和 pGEMT-PRV-gH 分别在浓度为 10⁷、10⁵ 和 10³ copies/μL 下进行三重 qPCR 检测，3 种质粒的 3 个稀

释度在 2 种重复性试验中，Ct 值及拷贝数对数值的变异系数 (CV) 均小于 5% (见表 2)，表明本试验建立的方法重复性较好。

表 2 三重 qPCR 重复性结果

质粒	项目	质粒浓度/ (copies · μL ⁻¹)	组内重复			组间重复		
			均值	标准差	CV/%	均值	标准差	CV/%
pGEMT-CSFV-E2	Ct 值	10 ⁷	16.48	0.25	1.52	16.58	0.21	1.26
		10 ⁵	22.46	0.47	2.11	22.52	0.42	1.85
		10 ³	28.58	0.22	0.78	28.38	0.17	0.62
	拷贝数对数值	10 ⁷	7.09	0.09	1.24	7.06	0.09	1.23
		10 ⁵	4.99	0.16	3.29	4.93	0.17	3.43
		10 ³	2.85	0.08	2.7	2.91	0.10	3.41
pGEMT-PRV-gE	Ct 值	10 ⁷	17.59	0.11	0.61	17.68	0.25	1.43
		10 ⁵	23.96	0.68	2.82	23.95	0.28	1.16
		10 ³	30.69	0.39	1.27	30.75	0.25	0.81
	拷贝数对数值	10 ⁷	7.05	0.03	0.47	7.02	0.07	1.07
		10 ⁵	5.07	0.21	4.16	5.07	0.13	2.65
		10 ³	2.97	0.12	4.07	2.95	0.10	3.29
pGEMT-PRV-gH	Ct 值	10 ⁷	16.50	0.20	1.22	16.70	0.20	1.20
		10 ⁵	23.24	0.10	0.44	23.59	0.36	1.53
		10 ³	29.72	0.30	1.00	29.69	0.23	0.76
	拷贝数对数值	10 ⁷	7.04	0.06	0.87	6.98	0.06	0.93
		10 ⁵	4.98	0.03	0.62	4.87	0.10	2.03
		10 ³	3.00	0.09	3.06	3.01	0.08	2.61

2.7 三重 qPCR 方法的应用

使用本方法和 CSFV、PRV 的国标 qPCR 检测方法对实验室攻毒试验的 190 份 CSFV 阳性组织样品核酸、45 份阴性组织样品核酸和 45 份 PRV 阳性组织样品核酸，以及筛猪的 35 份血液样品进行检测。结果发现，CSFV 总符合率 98.7% (232/235)，阳性符

合率 99.5% (189/190) (表 3)；PRV 总符合率为 100% (80/80) (表 4)，说明本方法准确率高，可用于临床检测。在 JS-2012-ΔgE/gI-E2 中仅检测到 CSFV E2 和 PRV gH，无 PRV gE 基因的扩增曲线，在 2 种 PRV 核酸对照品、野毒和商品化疫苗中，仅有 PRV-DNA-RM 和野毒出现 gE 基因的扩增曲线，

说明本方法可实现对 PRV 野毒和疫苗毒的鉴别。

表 3 CSFV 三重 qPCR 符合率结果

三重 qPCR	国标方法		合计
	阳性	阴性	
阳性	188	1	189
阴性	2	44	46
合计	190	45	235

表 4 PRV 三重 qPCR 符合率结果

三重 qPCR	国标方法		合计
	阳性	阴性	
阳性	45	0	45
阴性	0	35	35
合计	45	35	80

2.8 PRV ddPCR 方法的建立

对 PRV dPCR 反应体系中引物和探针浓度进行优

化，根据阴性微滴与阳性微滴区分程度的大小，确定了 gE 和 gH 的上下游引物终浓度为 600 nmol/L，gE 探针浓度为 300 nmol/L，gH 探针浓度为 200 nmol/L。

2.9 PRV 核酸对照品的构建及定值

灭活后的病毒液在 PK15 细胞上盲传 3 代后，阳性对照孔的细胞出现间隙增大、变圆、散在的群体脱落等 CPE 现象，而阴性对照孔和灭活孔无 CPE 现象（图 5），证明病毒液已灭活成功；根据梯度稀释的病毒液测得的拷贝数结果，调整 PRV-C 和 PRV-ΔgE-C 的稀释比例后，最终 PRV-DNA-RM 拷贝数为 (911.34±42.92) copies/μL，PRV-ΔgE-DNA-RM 拷贝数为 (1 280.8±94.4) copies/μL，均落在 10²~10³ copies/μL 的范围内。

2.10 PRV 核酸对照品的稳定性

稳定性检验结果显示（图 6），PRV-DNA-RM 和 PRV-ΔgE-DNA-RM 可在 4℃ 或更低温度中，稳定保存至少 14 d，在 37℃ 的加速老化试验中，可稳定保存至少 7 d。

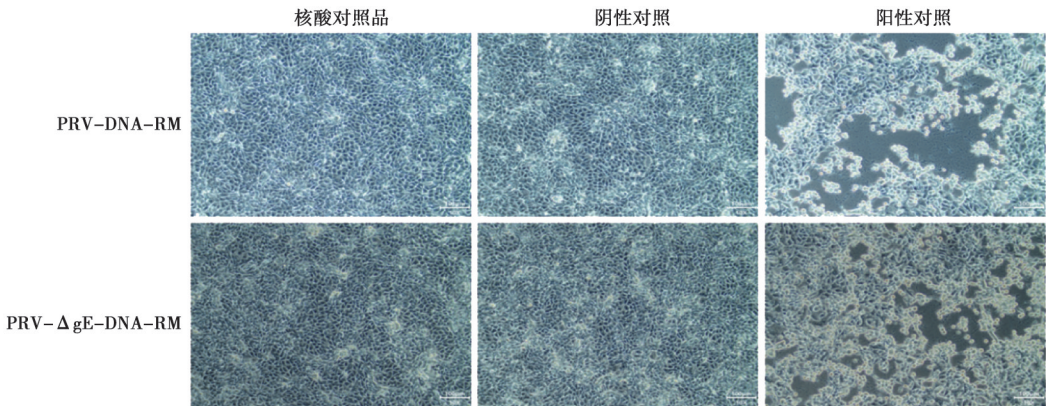


图 5 核酸对照品灭活验证结果（比例尺=100 μm）

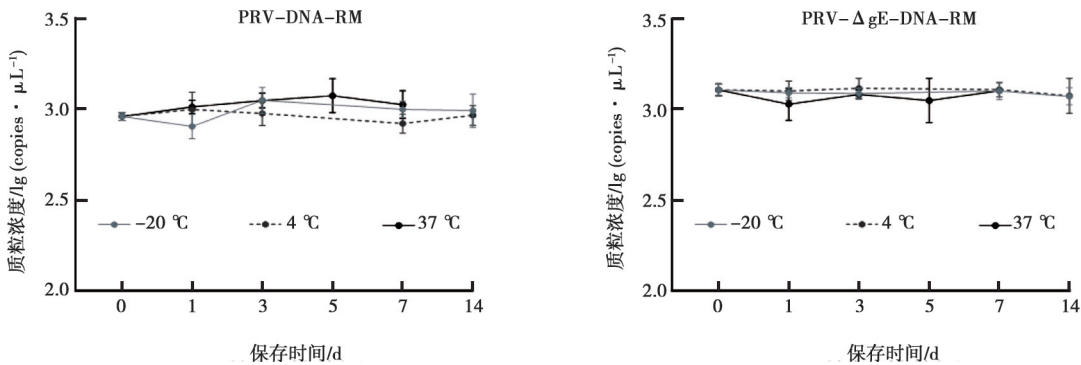


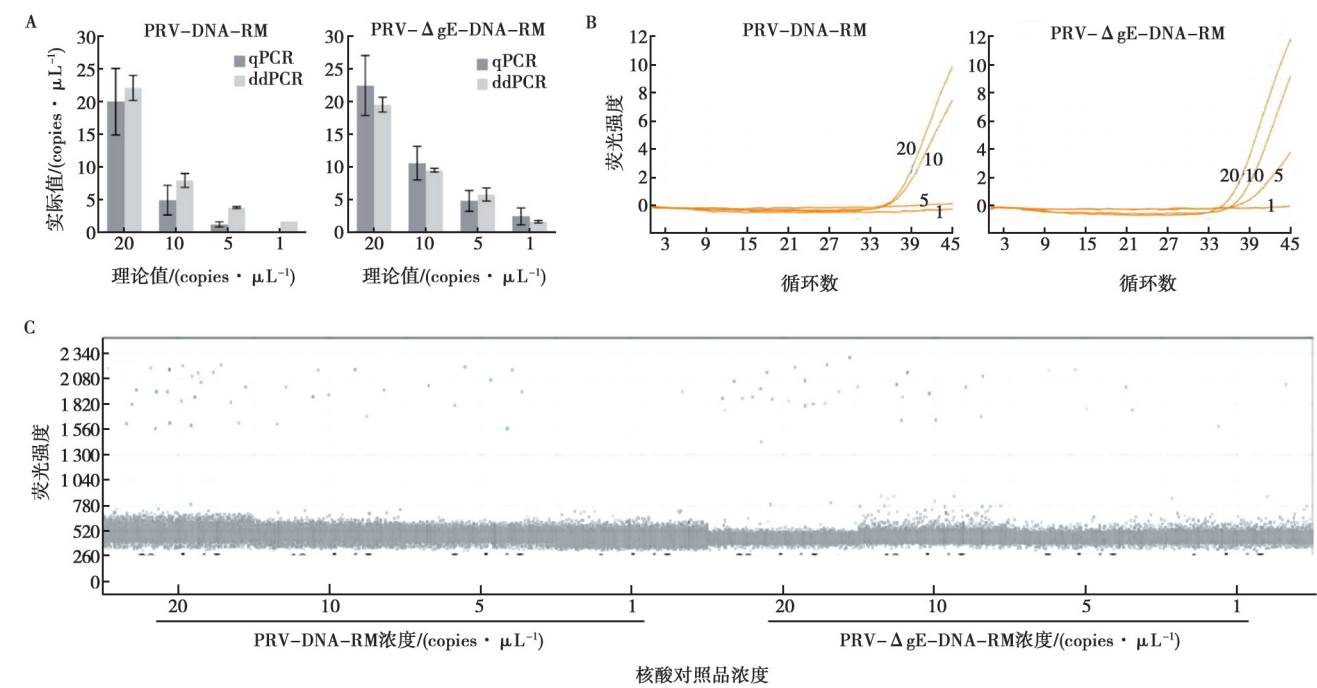
图 6 核酸对照品短期稳定性及加速试验结果

2.11 ddPCR 与 qPCR 方法检测极限的比较

低拷贝样品检测结果显示，qPCR 与 ddPCR 均能检出稀释至 5 copies/μL 的 PRV-DNA-RM 和 PRV-

ΔgE-DNA-RM 的 DNA，2 种方法对拷贝数为 5~20 copies/μL 的样品检测结果无明显差异，ddPCR 对于 10 copies/μL 以下样本的检测具有更高的敏感性，且

重复性更好。具体检测结果如图 7 和表 5 所示。



A. qPCR 与 ddPCR 比较结果；B. qPCR 扩增曲线（曲线上数字代表质粒浓度，单位为 copies/μL）；C. ddPCR 检测。

图 7 qPCR 与 ddPCR 检测极限比较

表 5 qPCR 与 ddPCR 检测比较

方法	检测极限	检测时长	检测通量
qPCR	2.65 copies/μL	约 40 min	384
ddPCR	1.5 copies/μL	1.5~3 h	96

3 讨论

鉴于 CSF 和 PR 对养猪业造成的持续危害及现有防控手段的局限性，建立快速、可靠的分子生物学检测方法显得尤为重要，选择合适的靶基因是建立分子生物学检测方法的第一步，这与最终检测方法的特异性和敏感性相关。早期的研究者在 CSFV 基因序列的扩增中，使用过的靶基因包括 5' UTR^[15-16]、E2 基因^[17]和 NS5B 基因^[18]，以上基因片段都具有高度保守、GC 含量适中、二级结构较少、拷贝数较高等特点。在本研究中，为了保证检测的可靠性和一致性，选择 CSFV 的 E2 基因保守区域作为靶标设计引物探针。而针对 PRV 的检测，常用的靶基因包括 gB^[19]、gD^[20]和 gE，其中 gE 基因作为已确定的毒力基因，是目前所用的商品化 PRV 疫苗几乎都天然缺失或通过人工基因编辑所缺失掉的基因，故该基因也主要作为鉴别 PRV 野毒株感染和疫苗株感染的靶标^[6-7]；gB 蛋白是 PRV 的主要免疫原性蛋白，直接参与病毒

入侵宿主细胞，在进化中承受着更强的选择压力，导致其基因序列发生突变^[21-24]，从而出现引物探针扩增效率降低或假阴性的可能；gD 蛋白是诱导机体产生中和抗体的主要抗原之一，基于其强大的免疫原性，而被用于亚单位疫苗和重组活载体疫苗的构建。已有研究者建立了构建 gD 缺失型 PRV 病毒株的方法^[25]，后续研究通过动物试验证明了 gD 缺失型 PRV 作为生物安全活载体疫苗的有效性^[26]，不过我国目前未见商品化 gD 基因缺失型疫苗，且 gD 基因并没有像 gE 存在疫苗生产中必须敲除的规定，倘若此类疫苗上市，可能会对于使用 gD 基因作为靶基因的 qPCR 检测造成一些干扰。此外，与 gB 基因类似，在我国报道的多种 PRV 变异株中，也有许多 gD 基因的突变^[27-28]，而 gH 基因的变异较少或未曾明确报道。与 gB、gD 基因类似，gH 基因具有高度保守性，且编码序列（CDS）的 GC 含量与 gB、gD 差距很小，作为靶基因检测 PRV 的实例较为罕见，并且 gH 是 PRV 囊膜蛋白重要组分，参与细胞融合，促进病毒传播^[29]，但其遗传多样性研究较少。因此，本方法中针对 PRV 的检测，使用 gH 基因作为靶基因，配合 gE 基因提升检测结果的可靠性。

在本方法的敏感性试验中，针对 PRV gE 的检测，敏感性低于 PRV gH 和 CSFV E2，主要由于该基

因 GC 含量偏高,引物设计理想区域较难选择,最终选择的引物扩增长度大于 gH 基因和 E2 基因,造成该基因检测方法扩增效率低于另外 2 种靶标,且多重 qPCR 体系中不同引物对之间存在酶、dNTPs 等反应资源的竞争,而 gE 基因的扩增动力学可能稍低于 E2 和 gH 基因,导致其在低浓度模板下更晚达到荧光阈值,表现为灵敏度降低。在 gE 的引物设计中,综合引物溶解温度、自互补性、GC 含量等因素考虑下,本方法采用的引物已是最优选择。为进一步提高 qPCR 检测的敏感性,本研究选择了适合高 GC 含量模板扩增的酶进行优化后,发现对 gE 基因检测的敏感性有一定改善,后期也可尝试使用甜菜碱、二甲基亚砷等增强剂提高该基因检测的灵敏性。在前期研究建立的 CSFV 和 PRV 多重 qPCR 方法中,对 CSFV 的最低检测限分别为 100、46.2 和 34.4 copies/ μL ,对 PRV 的最低检测限分别为 100/46.2 和 8.59 copies/ μL ^[19,30-31],本方法对 CSFV 和 PRV 的最低检测限均为 10 copies/ μL ,具备更高的灵敏度。

在本方法的实际应用中仍存在诸多局限性,比如由于 PRV gE 检测敏感性低于 PRV gH,对 PRV 载量较低样品的检测可能会出现 gE 基因的漏检,因此,当检测 PRV gH 的 Ct 值较高 (Ct 值 ≥ 33) 时建议进行复测,并搭配数字 PCR 或病毒分离方法进行进一步验证。此外,该方法针对 CSFV E2 最保守区域设计引物,因此无法区分 CSFV 野毒与疫苗毒感染,对 CSFV 分型还需配套国标中的套式 PCR 方法及测序来确定。

在 qPCR 检测过程中存在多种影响因素可能导致检测结果差异,为了实现对检测过程的全面质量控制,使用经过准确定值的核酸对照品作为阳性对照和内参标准,已成为提高试验可靠性、实现不同实验室间结果可比性的关键手段。ddPCR 是在 qPCR 基础上发展起来的一种核酸绝对定量技术,该技术的高灵敏度使其特别适用于低浓度核酸样品的精准定量,因此在对照品定值和验证中表现出显著优势。本研究分别构建了 PRV 野毒株和疫苗株的核酸对照品,并通过 ddPCR 技术进行对照品定值,结果表明其拷贝数分别在 (911.34 ± 42.92) copies/ μL 和 $(1\ 280.8 \pm 94.4)$ copies/ μL ,稳定性试验表明,该对照品可在 4℃或更低温度条件下稳定存放至少 14 d,在 37℃环境中可稳定存放至少 7 d,满足多数质控品的运输与保存需求,最后,通过比较本试验中 qPCR 方法和 ddPCR 方法对核酸对照品的检测,发现 2 种方法对 5~20 copies/ μL 样品的检测结果基本一致,对于 5 copies/ μL 以下的样品, qPCR 最低检测限为 2.65 copies/ μL ,这与敏感性试验中 gH 的最低检测限不

同,可能与单一模板不存在竞争抑制有关, ddPCR 最低检测限为 1.5 copies/ μL ,比 qPCR 具有更高的检测敏感性。这与刘影等^[32]、兰德松等^[33]的研究结果一致,而 Sedlak 等^[34]的研究表明,在抑制性样本中, qPCR 的 Ct 值可能延迟或无法检出,而 ddPCR 仍能准确定量,更适合复杂样本的检测。不过, ddPCR 的检测时长会随着单次检测样本数量的增加而延长,同样检测 96 个样品, ddPCR 的检测时长约为 qPCR 的 2~3 倍,对于高拷贝样本 ($\geq 10^6$ copies/ μL),由于超过检测上限,会导致检测结果不精准,且通常数字 PCR 的检测成本更高,上样前的准备也更复杂,因此不适合大批量检测。

综上,本研究建立了检测 CSFV 和 PRV 的三重 qPCR 方法以及 PRV 双重 ddPCR 方法,为 CSFV 和 PRV 的检测提供了选择,并使用配套建立的 PRV 核酸对照品对 2 种方法检测的灵敏性进行了比较,结果显示 2 种方法均有较高的敏感性、特异性和可重复性,当靶标在低拷贝数时, ddPCR 方法比 qPCR 方法的可重复性更高,显示出该方法对低拷贝数样品检测的优势,而三重 qPCR 方法则在检测的高通量和检测时长上优于 ddPCR 方法。2 种方法为 CSFV 和 PRV 的分子诊断、病毒载量监测和实验室质量控制提供了初步的技术基础和数据支持。

参考文献:

- [1] 渠雄周. 猪瘟病毒危害和流行情况及新型疫苗的研究现状 [J]. 河北农业, 2025 (4): 116-117.
- [2] Zheng H H, Fu P F, Chen H Y, et al. Pseudorabies virus: from pathogenesis to prevention strategies [J]. Viruses, 2022, 14 (8): 1638.
- [3] 刘璐瑶, 夏继桥, 李研, 等. 猪伪狂犬病的流行病学及综合防治 [J]. 猪业科学, 2025, 42 (8): 65-67.
- [4] 李玲, 邹宏, 徐璐, 等. ASFV、PRV 和 PCV2 多重荧光定量 PCR 检测方法的建立和应用 [J]. 中国预防兽医学报, 2023, 45 (8): 807-813.
- [5] 刘斌, 赵翠青, 刘立明, 等. 猪细小、猪伪狂犬和猪繁殖与呼吸综合征病毒三重 RT-qPCR 检测方法的建立及初步应用 [J]. 吉林农业科技学院学报, 2022, 31 (2): 1-5, 25.
- [6] 詹存林, 王庚, 孙秀秀, 等. PRRSV、SS 和 Pm 多重 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立与初步应用 [J]. 中国兽医学报, 2024, 44 (2): 231-236.
- [7] 邹宏, 夏应菊, 李玲, 等. 猪瘟病毒和牛病毒性腹泻病毒双重荧光定量 PCR 检测方法的建立和初步应用 [J]. 畜牧兽医学报, 2023, 54 (10): 4422-4427.
- [8] van Oirschot J T. Diva vaccines that reduce virus transmission [J]. J Biotechnol, 1999, 73 (2/3): 195-205.
- [9] van Oirschot J T, Rziha H J, Moonen P J L M, et al. Differentiation of serum antibodies from pigs vaccinated or infected with aujeszky's disease virus by a competitive enzyme immunoassay [J].

- J Gen Virol, 1986, 67 (6): 1179–1182.
- [10] 潘兹书, 张楚瑜, 赵伟光, 等. 伪狂犬病毒糖蛋白 H 基因片段的克隆、序列测定和分析 [J]. 武汉大学学报 (自然科学版), 2000 (2): 207–210.
- [11] Tong W, Zheng H, Li G X, et al. Recombinant pseudorabies virus expressing E2 of classical swine fever virus (CSFV) protects against both virulent pseudorabies virus and CSFV [J]. Antivir Res, 2020, 173: 104652.
- [12] GB/T 16551—2020 猪瘟诊断技术 [S].
- [13] GB/T 35911—2018 伪狂犬病病毒荧光 PCR 检测方法 [S].
- [14] WS/T 505—2017 定性测定性能评价指南 [S].
- [15] 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]. J Virol Meth, 1998, 72 (2): 125–135.
- [16] 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]. J Virol Methods, 2005, 130 (1/2): 36–44.
- [17] Risatti G R, Borca M V, Kutish G F, et al. The E2 glycoprotein of classical swine fever virus is a virulence determinant in swine [J]. J Virol, 2005, 79 (6): 3787–3796.
- [18] Postel A, Schmeiser S, Perera C L, et al. Classical swine fever virus isolates from Cuba form a new subgenotype 1.4 [J]. Vet Microbiol, 2013, 161 (3/4): 334–338.
- [19] 李欣, 杨莉, 刘光亮, 等. PRRSV、CSFV、PRV 和 PCV2 四重实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用 [J]. 动物医学进展, 2024, 45 (6): 7–14.
- [20] Yu X, Zhou Z, Hu D, et al. Pathogenic pseudorabies virus, China, 2012 [J]. Emerg Infect Dis, 2014, 20 (1): 102–104.
- [21] 张丁中, 黄剑波, 徐雷, 等. 一株 PRV 流行变异株的分离鉴定及致病性分析 [J]. 四川农业大学学报, 2025, 43 (5): 1324–1330, 1390.
- [22] 吴学敏, 陈秋勇, 陈如敬, 等. 猪伪狂犬病病毒福建新分离株 gB 基因的变异研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2016, 38 (10): 767–770.
- [23] 赵硕, 王若木, 党佳佳, 等. 2013—2018 年广西地区猪伪狂犬病病毒 gB、gE 与 TK 基因遗传变异分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2020, 51 (4): 810–819.
- [24] 高映雪, 蒋新华, 周荷田, 等. 2013—2018 年江西省猪伪狂犬病病毒流行株 gE 和 gB 基因遗传变异分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47 (1): 164–173.
- [25] Shiau A L, Liu C W, Wang S Y, et al. A simple selection system for construction of recombinant gD-negative pseudorabies virus as a vaccine vector [J]. Vaccine, 2002, 20 (7/8): 1186–1195.
- [26] Peeters B, Bienkowska-Szewczyk K, Hulst M, et al. Biologically safe, non-transmissible pseudorabies virus vector vaccine protects pigs against both Aujeszky’s disease and classical swine fever [J]. J Gen Virol, 1997, 78 (Pt 12): 3311–3315.
- [27] 徐宁, 葛桂阳, 李东丽, 等. 猪伪狂犬病毒的分离鉴定及其部分毒力基因序列遗传变异分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48 (5): 1794–1803.
- [28] 袁献宇, 杨龙斌, 何赞赞, 等. 安徽省猪伪狂犬病毒的分离鉴定及其主要毒力基因分子特征 [J]. 浙江农业学报, 2020, 32 (1): 43–56.
- [29] Vallbracht M, Rehwaltd S, Klupp B G, et al. Functional role of N-linked glycosylation in pseudorabies virus glycoprotein gH [J]. J Virol, 2018, 92 (9): e00084–18.
- [30] 王利丽, 路超, 李富强, 等. CSFV、PRRSV、PEDV 和 PRV 四重荧光定量 PCR 方法的建立及应用 [J]. 中国兽医科学, 2022, 52 (10): 1259–1267.
- [31] 王玉林. CSFV、PRV、PPV 多重 TaqMan: MGB 探针荧光定量 PCR 检测方法的建立与初步应用 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2022.
- [32] 刘影, 周建浩, 王东方, 等. 猪丁型冠状病毒微滴式数字 PCR 定量检测方法的建立 [J]. 中国兽医科学, 2025, 55 (3): 369–374.
- [33] 兰德松, 魏澍, 顾贵波, 等. 伪狂犬病病毒野毒株与 gE 基因缺失疫苗株微滴数字 PCR 鉴别方法的建立 [J]. 中国预防兽医学报, 2018, 40 (12): 1137–1141, 1156.
- [34] Sedlak R H, Kuypers J, Jerome K R. A multiplexed droplet digital PCR assay performs better than qPCR on inhibition prone samples [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2014, 80 (4): 285–286.