

DOI:10.13350/j.cjpb.220107

· 论著 ·

猪逆转录病毒 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用*

曾嘉庆¹, 高岩^{1,2}, 仇相书^{1,3}, 李成辉^{1,2}, 曾博宇^{1,4}, 张赫^{1**}, 鲁会军^{1**}, 金宁一^{1,2,3**}(1. 中国农业科学院长春兽医研究所, 吉林长春 130122; 2. 延边大学农学院;
3. 西北农林科技大学动物医学院; 4. 扬州大学兽医学院)

【摘要】 目的 开发一种能够准确、灵敏、特异检测猪逆转录病毒(PERV)的荧光定量 PCR 方法。方法 根据 GenBank 数据库中 PERV Gag 基因的高度保守序列, 设计 1 对特异性引物, 建立用于检测 PERV 的 SYBR Green I qPCR 检测方法, 并验证其灵敏性、重复性和特异性。结果 建立的标准曲线具有良好的线性关系, 线性相关系数 $R^2 = 0.998$ 。该方法检测 PERV 下限为 2.04×10^2 copies/ μ l, 批内批间变异程度较低, 变异系数小于 2%, 且与 PCV2、PRRSV、PEDV、TGEV 和 SVA 等均无交叉反应。利用该 qPCR 方法对采集的 49 份猪组织样品进行检测, 阳性率为 81.63%, 高于普通 PCR 阳性检出率的 73.47%。结论 建立的快速、定量检测 PERV 的 SYBR Green I qPCR 方法敏感、特异, 具有一定的应用前景。

【关键词】 猪逆转录病毒; SYBR Green I 荧光定量 PCR; Gag 基因

【中图分类号】 S852.65

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)01-0026-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Jan; 17(1): 26-30.]

Establishment and application of a SYBR Green I real-time quantitative PCR for detection of Porcine Endogenous Retrovirus

ZENG Jia-qing¹, GAO Yan^{1,2}, QIU Xiang-shu^{1,3}, LI Cheng-hui^{1,2}, ZENG Bo-yu^{1,4}, ZHANG He¹, LU Hui-jun¹, JIN Ning-yi^{1,2,3} (1. Changchun Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130122, China; 2. College of Agriculture, Yanbian University; 3. College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University; 4. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University)

【Abstract】 **Objective** To develop an accurate, sensitive and specific quantitative PCR method for the detection of porcine endogenous retrovirus (PERV). **Methods** A SYBR Green I real-time quantitative PCR method was established based on the highly conserved sequences of PERV Gag gene in GenBank database. The sensitivity, repeatability and specificity of the established detection method were verified. **Results** The results show that the standard curve had good linearity (the linear correlation coefficient $R^2 = 0.998$). The method achieved a lower limit of detection of 2.04×10^2 copies/L and low variation degree between batches, (the coefficient of variation less than 2%). Besides, there was no cross reaction with PCV2, PRRSV, PEDV, TGEV and SVA. The positive rate of 49 samples was 81.63%, which was higher than 73.47%. **Conclusion** A SYBR Green I qPCR method has been successfully established for the rapid and quantitative detection of PERV

【Key words】 Porcine endogenous retrovirus; SYBR Green I real-time quantitative PCR; gag gene

*** 逆转录病毒(Endogenous Retrovirus, ERV)会诱发许多疾病, 包括肿瘤、白血病和免疫缺陷等^[1-2]。猪逆转录病毒(Porcine Endogenous Retrovirus, PERV)的前体 DNA 广泛存在于猪的基因组中, 一旦发生转录和翻译, 会导致 PERV 病毒蛋白的表达和病毒粒子的释放^[3-4]。PERV 是单股正链 RNA 病毒, 属于逆转录病毒科、 γ 逆转录病毒属的成员。PERV 基因组由 5' 和 3' 端的非编码区以及中间的核心蛋白基因(Gag)、多聚酶基因(Pol)以及囊膜基因(Env)组成。研究表明猪在发生黑色素瘤或断奶仔猪多系统衰竭综合征(Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome,

PMWS)、猪繁殖与呼吸综合征(Porcine Reproductive and Respiratory Disease, PRRS)时, PERV mRNA 的表达增强, 这可能是 PERV 引起的直接致病作用或间

* **【基金项目】** 国家重点研发计划资助项目(No. 2017YFD0501803)。

** **【通讯作者】** 张赫, E-mail: hezhangvs@126.com;
鲁会军, E-mail: huijun_lu@126.com;
金宁一, E-mail: ningyik@126.com

【作者简介】 曾嘉庆(1997-), 男, 江苏沛县人, 在读硕士研究生, 主要从事分子病毒学研究。E-mail: jiaqzeng@126.com

接导致的免疫功能缺陷^[5-6]。值得注意的是,PERV 是一种泛嗜性病毒,还能够感染包括人、水貂、猫和非人灵长类动物在内的多种细胞。

2008年,Wu等^[7]采用常规PCR技术对我国猪感染PERV情况进行了大规模调查,明确了PERV 3种亚型感染率。目前已建立了PERV多种检测方法,如常规PCR、TaqMan 荧光定量PCR(Real Time Quantitative PCR,qPCR)、微滴式数字PCR(Droplet Digital PCR,DDPCR)等^[8-9]。病毒分离培养及常规PCR等检测方法的灵敏性及准确性有待提升,且无法实现定量;TaqMan qPCR和DDPCR检测方法的设计成本较高,不能满足实际检测的时效性与普适性。因此,PERV及时准确且操作简易的检测技术的开发应用,对于精准评估我国猪感染PERV情况,充实PERV的流行病学资料以及猪源异种移植的研究具有重要意义。

本研究基于PERV Gag序列保守区设计特异性引物,在此基础上建立操作简易、敏感性高、重复性好、特异性强的PERV SYBR Green I qPCR检测方法,并优化扩增反应条件,以期用于猪PERV的感染检测。

材料与与方法

1 材料

1.1 病毒株与样品来源 PERV、PRRSV、猪圆环病毒(Porcine Circovirus type 2,PCV2)、猪流行性腹泻病毒(Porcine Epidemic Diarrhea virus,PEDV)、猪传染性胃肠炎病毒(Porcine Transmissible Gastroenteritis virus,TGEV)、塞内卡病毒(Senecavirus A,SVA)的核酸样品均由本实验室制备并保存。49份猪血液和组织样品采自吉林省长春市某猪场。

1.2 主要试剂 SYBR Green I PCR Master Mix和Nuclease-Free Water购自美国Promega公司;Trans-Start FastPfu Fly DNA Polymerase和pEASY-Blunt Cloning Kit购自北京Transgen公司;2×Taq PCR Mix、DNA提取试剂盒和D2000 DNA Marker购自北京TIANGEN公司;DL5000 DNA Marker购自南京Vazyme公司;质粒小提试剂盒购自杭州AXYGEN公司;CFX96 Real-Time PCR仪购自美国BIO-RAD公司。

2 方法

2.1 引物设计与合成 参考GenBank中PERV的全基因组序列(HQ536007.1,HQ540592.1,HM159246.1,EU789636.1,KY484771.1),利用MegAlign寻找PERV Gag保守区域,使用Primer 5设计相应片段的特异性片段扩增引物和检测引物(表1)。引物由吉林省库美生物工程有限公司合成。

表1 PERV特异性引物
Table 1 PERV specific primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequences	产物长度(bp) Product length	退火温度 TM(°C)
PERV-Gag-F	GTCCGACTCTTTTGCCTGCTT	2162	60
PERV-Gag-R	AACCCATCCCTGCGGTTTC		
PERV-q-F	AGGCGGTTACCCCTTTTG	128	60
PERV-q-R	TCAGCCTCCTGTAACCCCTTC		

2.2 质粒标准品的制备 吸取PERV病毒液200 μ L,使用DNA提取试剂盒提取PERV基因组DNA,以此为模板,以PERV-Gag-F/R为引物进行PCR反应,扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测分析后切胶回收。回收产物克隆至pEASY-Blunt载体,PCR验证后交由上海生工生物工程公司测序,测序正确后将其作为标准质粒保存备用,命名为pEASY-Blunt-PERV-Gag,并计算拷贝数。拷贝数=质粒浓度($\text{ng}/\mu\text{l}$) $\times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23} / (\text{质粒长度} \times 660)$ 。

2.3 PERV SYBR Green 荧光定量PCR方法的建立及反应条件的优化

2.3.1 反应体系及程序 以重组质粒pEASY-Blunt-PERV-Gag为模板,以出现最高的荧光值、最小的样品C_q值及在溶解曲线中出现特异性峰为指标,分别优化退火温度、引物浓度以及循环次数等条件。确定最佳反应体系为:质粒模板1.0 μ L,2×SYBR Green I Master Mix 10.0 μ L,上、下游引物(20 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各0.2 μ L,Nuclease-Free Water补足至20.0 μ L。同时设置阴性对照(NTR)。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,共40个循环。

2.3.2 标准曲线的建立 使用Nuclease-Free Water对标准质粒pEASY-Blunt-PERV-Gag进行10倍梯度稀释,选取 $2.04 \times 10^2 \sim 2.04 \times 10^7$ copies/ μL 的6个质粒为模板进行qPCR扩增,绘制标准曲线及溶解曲线。

2.3.3 敏感性检测 将标准质粒pEASY-Blunt-PERV-Gag 10倍稀释至 $2.04 \times 10^1 \sim 2.04 \times 10^8$ copies/ μL 后作为模板,分别进行SYBR Green I Real-time PCR和常规PCR扩增,比较该方法和普通PCR检测的最低拷贝对应的质粒稀释浓度。试验设阴性对照(NTR)。

2.3.4 重复性检测 选取3个不同梯度稀释倍数($2.04 \times 10^4 \sim 2.04 \times 10^6$ copies/ μL)的标准质粒,以此作为模板分别进行SYBR Green I Real-time PCR,每个稀释倍数的标准质粒做3个重复,进行批内和批间平行试验。通过比较C_q值及变异系数CV,检验qPCR方法的可重复性与可靠性。

2.3.5 特异性检测 以猪常见病毒PCV2、PRRSV、PEDV、TGEV和SVA的DNA/cDNA为模板,采用

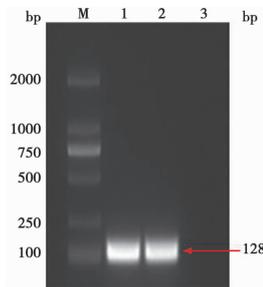
优化的反应体系和反应条件进行 SYBR Green I Real-time PCR, 分析其特异性。试验设阴性对照(NTR)。

2.4 临床样品检测 取 49 份猪血液和组织样品(包括肝脏、脾脏、肾脏、肺脏、脑、肠、淋巴结、肌肉、子宫及膀胱等), 使用 DNA 提取试剂盒提取 PERV 基因组 DNA, 用建立的 qPCR 方法检测 PERV 并与常规 PCR 检测结果相比较。

结果

1 标准质粒的构建及鉴定

以标准质粒 pEASY-Blunt-PERV-Gag 为模板, 利用引物 PERV-q-F/R 扩增出 128 bp 目的片段, 与预期大小一致, 阴性对照无此片段(图 1)。使用 Kpn I 和 Xho I 对载体的多克隆位点进行双酶切鉴定, 获得约 2 162 bp 的酶切片段(图 2)。将重组质粒送至生工公司测序后与参考序列比对, 片段插入位置正确, 标准质粒构建成功。经计算标准质粒 pEASY-Blunt-PERV-Gag 的拷贝数为 2.04×10^{10} 拷贝/ μL 。

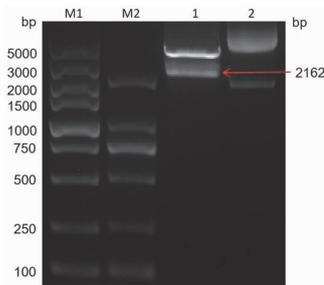


M DL2000 DNA Marker 1,2 PERV 目的片段 3 阴性对照(NTR)

图 1 重组质粒 pEASY-Blunt-PERV-Gag 的目的片段鉴定

M DL2000 DNA Marker 1,2 Target segment of PERV 3 Negative control (NTR)

Fig. 1 Identification of target fragment of recombinant plasmid pEASY-Blunt-PERV-Gag



M1 DL5000 DNA Marker M2 DL2000 DNA Marker 1 质粒 pEASY-Blunt-PERV-Gag 双酶切产物 2 质粒 pEASY-Blunt-PERV-Gag

图 2 重组质粒 pEASY-Blunt-PERV-Gag 双酶切鉴定

M1 DL5000 DNA Marker M2 DL2000 DNA Marker 1 Double digestion product of plasmid pEASY-Blunt-PERV-Gag 2 Plasmid pEASY-Blunt-PERV-Gag

Fig. 2 Double enzyme digestion identification of recombinant plasmid pEASY-Blunt-PERV-Gag

2 qPCR 标准曲线

将梯度稀释的 $2.04 \times 10^2 \sim 2.04 \times 10^7$ copies/ μL 共 6 个浓度的 PERV 质粒模板, 采用确定的最佳反应条件进行 qPCR 反应。结果显示, Cq 值与标准质粒的浓度呈现良好的线性关系, 线性回归方程: $Y = -5.363X + 55.831$, 相关系数 R^2 值为 0.998(图 3)。

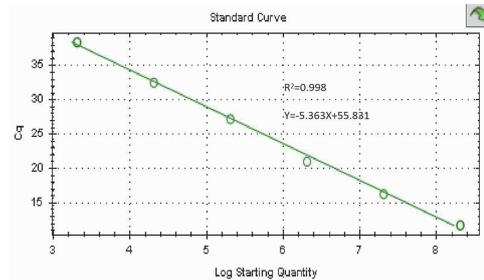


图 3 PERV qPCR 标准曲线

Fig. 3 Standard curve of PERV qPCR

3 熔解曲线

PERV SYBR Green I Real-time PCR 的熔解曲线显示, 标准质粒在 83°C 左右出现了单一、狭窄波峰, 且阴性对照无熔解峰(图 4), 表明试验中未出现污染和引物二聚体, 引物特异性较强。

4 qPCR 的敏感性

SYBR Green I Real-time PCR 对质粒标准品的检测下限为 2.04×10^2 copies/ μL (图 5), 常规 PCR 方法对相应质粒标准品的检测下限为 2.04×10^4 copies/ μL (图 6), 表明建立的 qPCR 法敏感性较高。

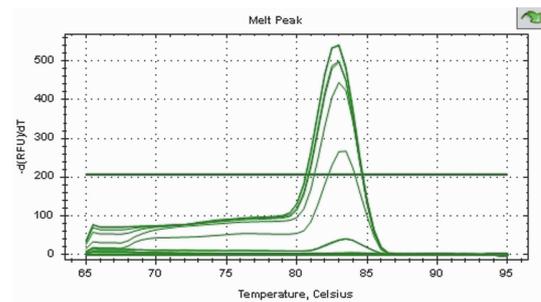
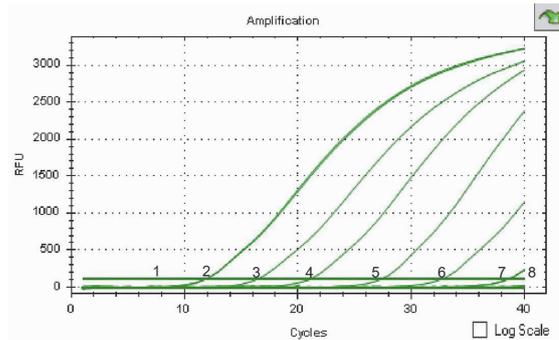


图 4 PERV qPCR 熔解曲线

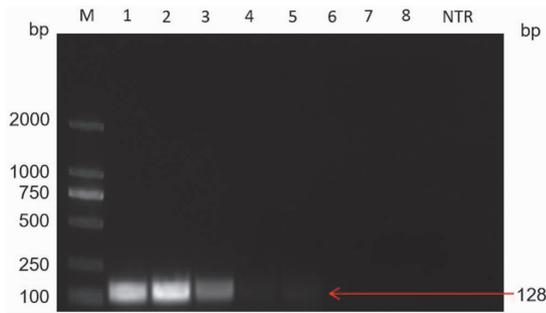
Fig. 4 PERV qPCR melting curve



1—8 $2.04 \times 10^8 \sim 2.04 \times 10^1$ copies/ μL

图 5 PERV qPCR 敏感性试验

Fig. 5 PERV qPCR sensitivity test



M DL2000 DNA Marker 1~8 $2.04 \times 10^8 - 2.04 \times 10^1$ copies/ μ L 3 阴性对照(NTR)

图6 PERV常规PCR敏感性试验

M DL2000 DNA Marker 1~8 $2.04 \times 10^8 - 2.04 \times 10^1$ copies/ μ L 3 Negative control (NTR)

Fig. 6 PERV conventional PCR sensitivity test

5 qPCR的重复性

以拷贝数浓度分别为 2.04×10^4 、 2.04×10^5 、 2.04×10^6 copies/ μ L 的标准品分别进行批内和批间重复试验,结果见表2。其中批内变异系数 CV 为 0.15%~0.47%,批间变异系数为 0.67%~1.27%,表明方法的稳定性高,重复性好。

表2 PERV qPCR 批内与批间重复性试验结果
Table 2 PERV qPCR repeatability test results within and between batches

标准质粒浓度 (copies/ μ L) Standard plasmid	批内变异 CV within groups		批间变异 CV between the group	
	$\bar{x} \pm s$	CV(%)	$\bar{x} \pm s$	CV(%)
2.04×10^6	18.15 \pm 0.09	0.47	18.33 \pm 0.22	1.19
2.04×10^5	25.78 \pm 0.15	0.15	25.60 \pm 0.17	0.67
2.04×10^4	31.27 \pm 0.32	0.32	31.04 \pm 0.40	1.27

6 qPCR的特异性

利用建立的 SYBR Green I Real-time PCR 方法对 PCV2、PRRSV、PEDV、TGEV 和 SVA、ddH₂O 进行检测,其中 PERV 核酸检测结果为阳性,其余病毒核酸与阴性对照检测结果均为阴性(图7),表明建立的 PERV SYBR Green I Real-time PCR 方法特异性良好。

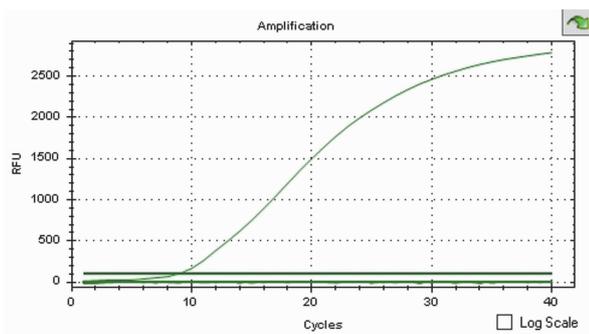


图7 PERV qPCR 特异性试验
Fig. 7 PERV qPCR specificity test

7 临床样品检测情况

对 2021 年采自吉林省长春市某猪场的 49 份猪血液、组织样品采用建立的 SYBR Green I qPCR 方法检测 PERV,阳性率为 81.63%(40/49)(表3);常规 PCR 检测 PERV 的阳性率为 73.47%(36/49)。2 种方法的阳性符合率为 91.84%。计算 2 种方法的总符合率 $[100\% \times (\text{共同认定结果阳性数} + \text{共同认定结果阴性数}) / \text{样品总数}]^{[10]}$,PERV qPCR 方法的灵敏性、准确性均高于常规 PCR 方法。

表3 猪场临床样品检测结果
Table 3 Test results of clinical samples in pig farms

方法 Method	常规 PCR The conventional PCR		累计(份) Grand total
	阳性数(份) Positive No.	阴性数(份) Negative No.	
qPCR	阳性数(份) Positive No.	4	40
	阴性数(份) Negative No.	9	9
合计 Total	36	13	49

讨论

近年来,PERV 因其在猪组织中普遍存在、高滴度重组病毒 A/C 亚型的出现、能够感染多种人源细胞系以及 PERV 整合后潜在的免疫缺陷和肿瘤发生引起了广泛关注^[11-14]。PERV 感染与猪的免疫抑制、传染病和肿瘤的发生密切相关,阻碍了养猪业的发展,同时潜在的人兽共患风险对猪源异种移植提出了挑战。因此,建立准确、特异、灵敏且操作简易的检测方法对于 PERV 的临床检测与异种移植的生物安全风险分析意义重大。

相比 Env 基因的复杂多变,PERV 的 Gag 基因和 Pol 基因在各猪种中较为保守。Argaw 等^[15]建立了检测 PERV Pol 基因的 TaqMan qPCR 法,其检测阈值达到 10 copies/ μ l,但 TaqMan qPCR 法除了需要合成引物,仍需要合成探针,成本较高。SYBR Green I qPCR 法仅需要合成特异性引物即可操作。马玉媛等^[16]以 PERV Pol 基因作为检测模板,在国内率先建立了 PERV SYBR Green I qPCR 方法,能够定量检测待检样品中含有的 PERV 拷贝数,检测阈值为 (1.38 ± 0.33) copies/cell,但是未能从特异性、敏感性及重复性等角度对方法作进一步评价及优化。本实验比对筛选出 PERV 多个代表毒株基于 Gag 的高度保守序列,以此建立 PERV SYBR Green I qPCR 检测方法。标准质粒浓度在 $2.04 \times 10^2 \sim 2.04 \times 10^7$ copies/ μ L 时,相关系数 R^2 为 0.998,高于 PERV Pol qPCR 法的 0.997^[16]。将建立的 PERV qPCR 法和常规 PCR 用于猪场样品检测,二者的阳性率分别为 81.63% 和 73.47%,符合国内地方猪群的 PERV 阳性率 30.46%~

95.40%^[7],阳性样品包括血液、肝脏、肾脏、脾脏及脑等,与文献[17-19]报道的 PERV 在猪体内的分布情况一致。因此可使用本研究建立的 qPCR 法筛选 PERV 感染的特有地方猪种,从而为异种移植优良供体的选育提供技术参考。

综上所述,本研究成功建立了 PERV SYBR Green I qPCR 检测方法,该方法敏感、特异,重复性好,可用于 PERV 的感染检测、器官组织的病毒载量分析及 PERV 的分子流行病学调查。

【参考文献】

[1] Tarlinton R., Meers J, Young P. Retroviral invasion of the koala genome[J]. Nature, 2006, 442(7098): 79-81.
 [2] Denner J, Tonjes RR. Infection barriers to successful xenotransplantation focusing on porcine endogenous retroviruses[J]. Clin Microbiol Rev, 2012, 25(2): 318-343.
 [3] Patience C, Switzer WM, Takeuchi Y, et al. Multiple groups of novel retroviral genomes in pigs and related species[J]. J Virol, 2001, 75(6): 2771-2775.
 [4] Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs[J]. Nat Med, 1997, 3(3): 282-286.
 [5] Dieckhoff B, Puhmann J, K Buscher, et al. Expression of porcine endogenous retroviruses (PERVs) in melanomas of Munich miniature swine (MMS) Trol[J]. Vet Microbiol, 2007, 123(1-3): 53-68.
 [6] Tucker A W, Mellencamp M M, Donadeu M, et al. Retroviremia in Commercial Pigs and Its Preliminary Association with Poor Health[J]. J Clin Microbiol 2006, 44(10): 3846-3847.
 [7] Wu J, Ma Y, Lv M, et al. Large-scale survey of porcine endogenous retrovirus in Chinese miniature pigs[J]. Comp Immunol Microb, 2008, 31(4): 367-371.
 [8] Luise Kr ger, Stillfried M, Prinz C, et al. Copy Number and Prevalence of Porcine Endogenous Retroviruses (PERVs) in German Wild Boars[J]. Viruses, 2020, 12(4): 419.
 [9] Lovatt A, Black J, Galbraith D, et al. High throughput detection of retrovirus-associated reverse transcriptase using an improved fluo-

rescent product enhanced reverse transcriptase assay and its comparison to conventional detection methods[J]. J Virol Methods, 1999, 82(2): 185-200.

[10] 任亚初, 楚会萌, 程凯慧, 等. 牛传染性鼻气管炎病毒 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 中国预防兽医学报, 2019, 41(10): 1032-1036.
 [11] Deschamps J Y, Roux F A, P Sa, et al. History of xenotransplantation[J]. Xenotransplantation, 2010, 12(2): 91-109.
 [12] Bendinelli M, Matteucci D, Friedman H. Retrovirus-Induced Acquired Immunodeficiencies[J]. Adv Cancer Res, 1985, 45(6): 125-181.
 [13] Niu D, Wei HJ, Lin L, et al. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9 [J]. Science, 2017, 357(6357): 1303-1307.
 [14] Wegman-Points LJ, Teoh-Fitzgerald ML, Mao G, et al. Retroviral-infection increases tumorigenic potential of MDA-MB-231 breast carcinoma cells by expanding an aldehyde dehydrogenase (ALDH1) positive stem-cell like population [J]. Redox Biol, 2014, 2(1): 847-854.
 [15] Argaw T, Ritzhaupt A, Wilson C A. Development of a real time quantitative PCR assay for detection of porcine endogenous retrovirus[J]. J Virol Methods, 2002, 106(1): 97-106.
 [16] 马玉媛. 中国特有小型猪内源性反转录病毒的检测与特性分析[D]. 长春: 中国人民解放军军事医学科学院, 2009.
 [17] Blusch J H, Patience C, Martin U. Pig endogenous retroviruses and xenotransplantation [J]. Xenotransplantation, 2010, 9(4): 242-251.
 [18] Dieckhoff B, Kessler B, D Jobst, et al. Distribution and expression of porcine endogenous retroviruses in multi-transgenic pigs generated for xenotransplantation[J]. Xenotransplantation, 2010, 16(2): 64-73.
 [19] Zhang Y, X Xing, Huang L, et al. Screening pigs for xenotransplantation in China; investigation of porcine endogenous retrovirus in Diannan small-eared pigs[J]. Virus Genes, 2020, 56(2): 202-208.

【收稿日期】 2021-10-27 【修回日期】 2021-12-26

(上接 25 页)

[9] Reuter G, Boros A. Kobuviruses - a comprehensive review[J]. Rev Med Virol, 2011, 21(1): 32-41.
 [10] Oem JK, Choi J, Alfieri AF, et al. Canine kobuvirus infections in Korean dogs[J]. Arch Virol, 2014, 159(10): 2751-2755.
 [11] Di Martino B, Di Felice E, Ceci C, et al. Canine kobuviruses in diarrhoeic dogs in Italy [J]. Vet Microbiol, 2013, 166(1-2): 246-249.
 [12] 周秀蓉, 肖霜艳, 康桦华, 等. 动物库布病毒试验进展[J]. 中国动物保健, 2019, 21(11): 48-51, 53.
 [13] Kapoor A, Simmonds P, Dubovi E, et al. Characterization of a canine homolog of human Aichivirus [J]. J Virol, 2011, 85(21): 11520-11525.
 [14] Liu D, Liu F, Guo D, et al. One-step triplex PCR/RT-PCR to detect canine distemper virus, canine parvovirus and canine kobuvirus[J]. J Vet Med Sci, 2019, 81(7): 1040-1042.

[15] Li M, Yan N, Wang M, et al. Prevalence and genomic characteristics of canine kobuvirus in southwest China[J]. Arch Virol, 2018, 163(2): 459-466.
 [16] Woo PC, Huang Y, Liu X, et al. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis[J]. Viruses, 2010, 2(8): 1804-1820.
 [17] Haake C, Cook S, Pusterla N, et al. Coronavirus infections in companion animals: virology, epidemiology, clinical and pathologic features[J]. Viruses, 2020, 12(9): 1023.
 [18] Wang Y, Cui Y, Li Y, et al. Development of an SYBR Green I-based real-time PCR assay for the rapid detection of canine kobuvirus[J]. J Virol Methods, 2020, 285: 113944.
 [19] 李慧平, 我国部分省牛库布病毒的检测及基因组试验[D]. 重庆: 西南民族大学, 2020.

【收稿日期】 2021-09-30 【修回日期】 2021-12-22