

DOI:10.13350/j.cjpb.220106

· 论著 ·

犬库布病毒 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用

高岩^{1,2}, 赵冠宇^{2,3}, 李卓昕^{2,4}, 仇相书^{2,5}, 陈珊¹, 高旭^{1*}, 鲁会军^{2*}, 金宁一^{2*}

(1. 延边大学农学院, 吉林延吉 133002; 2. 中国农业科学院长春兽医研究所; 3. 吉林大学动物医学院; 4. 吉林农业大学动物科技学院; 5. 西北农林科技大学动物医学院)

【摘要】 **目的** 建立可检测狐狸物种中犬库布病毒(CaKoV)的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法。 **方法** 利用 PCR 方法扩增狐狸 CaKoV 的 3D 基因 504 bp, 将其克隆到 pEASY-Blunt 载体, 构建重组质粒作为阳性质粒, 以其为模板建立 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法, 验证其灵敏度、特异性和重复性。 **结果** 建立的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法检测目的基因在 $6.12 \times 10^1 \sim 6.12 \times 10^8$ 拷贝/ μl 时呈良好的线性关系, 相关系数为 0.994, 斜率为 -4.369, 灵敏度 6.12×10^1 拷贝/ μl 。该方法对于 CPV、CDV 和 CCV 未出现特异性扩增。所有标准曲线在溶解温度为 86.49 °C 时出现单一的特异峰。使用本方法检测 2021 年辽宁、山东地区的 253 份狐狸临床标本, 总阳性率为 7.91%。 **结论** 建立的 CaKoV SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法敏感、特异, 用于狐狸 CaKoV 感染的快速检测。

【关键词】 犬库布病毒; 实时荧光定量 PCR; 狐狸; 3D 基因; 检测方法

【中图分类号】 S852.65

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)01-0022-04

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Jan; 17(1): 22-25, 30.]

Development and use of a SYBR Green I Real-Time PCR technique for detection of CaKoV

GAO Yan^{1,2}, ZHAO Guan-yu^{2,3}, LI Zhuo-xin^{2,4}, QIU Xiang-shu^{2,5}, CHEN Shan¹, GAO Xu¹, LU Hui-jun², JIN Ning-yi² (1. College of Agriculture, Yanbian University, Yanji, Jilin 133002, China; 2. Changchun Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences; 3. College of Veterinary Medicine, Jilin University; 4. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University; 5. College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University)

【Abstract】 **Objective** To establish a SYBR Green I real-time fluorescent quantitative PCR detection method that can detect Canine kobuvirus (CaKoV) in fox species. **Methods** The 504 bp 3D gene of fox CaKoV was amplified by PCR and clone it into pEASY-Blunt vector; Construct this recombinant plasmid as a positive plasmid, which is used a template to establish the SYBR Green I real-time fluorescence quantitative PCR detection method to determine the detection range and analyze the sensitivity, specificity and reproducibility of this experiment. **Results** The SYBR Green I real-time fluorescence quantitative PCR detection method showed a consistent linear relationship with a correlation coefficient of 0.994 at 6.12×10^1 to 6.12×10^8 copies/ μl , slope of -4.369 and sensitivity of 6.12×10^1 copies/ μl . This method showed nonspecific amplification for CPV, CDV, and CCV. All standard curves showed a single specific peak at a melting temperature of 86.49 °C. The total positive rate was 7.91% in the test for 253 clinical specimens of foxes from Liaoning and Shandong in 2021. **Conclusion** The CaKoV SYBR Green I real-time fluorescent quantitative PCR method is characterized by high sensitivity and high specificity, and is suitable for the fast detection of CaKoV infection in foxes.

【Key words】 Canine kobuvirus; SYBR Green I Real-time PCR; fox; 3D gene; detection method

* 犬库布病毒(Canine kobuvirus, CaKoV)属于微小 RNA 病毒科, 库布病毒属成员。CaKoV 基因组全长 8.1~8.2 kb^[1-2]。有一个 5'非翻译区(UTR)、一个开放阅读框(ORF)和一个 3'UTR。ORF 含有 7 332~7 341 个核苷酸(nt), 编码 2 442~2 475 氨基酸(AA), 分为一个前导蛋白(L)、3 种结构蛋白(VP0, VP3 和 VP1)和 7 种非结构蛋白(2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 和 3D), 其中 3D 蛋白为保守区域^[3]。CaKoV 结构蛋白

形成病毒衣壳, 其与病毒颗粒的吸附和侵染有关。CaKoV 非结构蛋白和中间体参与 RNA 复制、多蛋白切

* **【通讯作者】** 高旭, E-mail: gaoxu@ybu.edu.cn;
鲁会军, E-mail: huijun_lu@126.com;
金宁一, E-mail: ningyik@126.com

【作者简介】 高岩(1995-), 男, 吉林人, 硕士, 研究方向为动物传染病分子生物学与免疫学。
E-mail: gy925331091@163.com

割和病毒粒子组装^[4]。

库布病毒(kobuvirus)于1989年在日本爱知县的急性胃肠炎病人粪便中首次发现,又名爱知病毒(Achivirus, AiV)。此后,在猪牛羊等动物中都检测到库布病毒。在国际病毒分类委员会公布的第十次病毒分类报告中将库布病毒进行了分类,分为 Achivirus A、B、C、D、E、F 六类^[5-6]。其中牛库布病毒(Bovine kobuvirus, BCoV)、羊库布病毒(Ovine kobuvirus, OKoV)属于爱知病毒 B 型;猪库布病毒(Porcine kobuvirus, PKoV)属于爱知病毒 C 型;CaKoV 属于爱知病毒 A 型,同型的还有人爱知病毒(Aichi virus 1)及鼠库布病毒(Murine kobuvirus)^[7-8]。

CaKoV 首次于2011年在美国腹泻犬的粪便中检测到,随后在英国、意大利、韩国、肯尼亚、日本、泰国和中国相继被发现,呈全球分布。CaKoV 可导致犬科动物严重腹泻或呼吸道症状,也有感染动物无症状^[3,7,9-12]。CaKoV 可通过粪便、口腔途径、污染的食物或水传播。此外, CaKoV 可在小脑、肺、扁桃体和肝脏中检测到,表明可导致严重的全身感染^[3,13-14]。

目前,我国只在西南地区^[15]、东北地区^[3]、安徽省^[1]、唐山市^[2]对犬的 CaKoV 的流行情况进行了少量的数据统计。本研究拟建立针对狐狸 CaKoV 的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法,并用于狐狸 CaKoV 感染检测。

材料与方法

1 材料

1.1 病毒 犬细小病毒(Canine Parvovirus, CPV)和犬瘟热病毒(Canine distempervirus, CDV)由延边大学预防兽医学实验室分离保存;犬冠状病毒(Canine coronavirus, CCV)由中国农业科学院长春兽医研究所分子病毒学与免疫学实验室保存。

1.2 主要仪器与试剂 TransStart FastPfu Fly DNA Polymerase 酶, Peasy-Blunt 载体及 DL2000 DNA Marker 均购自北京金全生物技术有限公司; UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒购自生工生物工程上海股份有限公司;质粒提取试剂盒购自杭州 AXYGEN 公司;M-MLV 逆转录酶和 SYBR Green I PCR Master Mix 购自美国 Promega 公司。Prism7500 型荧光定量 PCR 仪为美国 ABI 公司生产。

2 方法

2.1 引物设计与合成 根据 GenBank 中收录的 CaKoV 全基因组序列(MN449341.1),利用 Primer5.0 软件在 3D 序列保守区设计一对特异性引物,扩增片段大小为 504 bp, CaKoV F: 5'-CCCTGGAACAC-

CCAAGGCCGCT-3'; CaKoV R: 5'-TCTGGTTGC-CATAGATGTGGTG-3',引物由吉林省库美生物工程有限公司合成。

2.2 重组质粒的构建 利用 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒提取阳性样本 RNA,根据 M-MLV 反转录酶反转录体系将 RNA 反转录为 Cdna,以其作为模板,使用引物 CaKoV F/R 扩增 504 bp 的目的基因片段。将目的基因片段克隆至 Peasy-Blunt 载体上构建重组质粒,经库美生物工程有限公司测序后与 NCBI 登录的标准序列比对。计算其浓度为 6.21×10^9 拷贝/ μl ,对其进行 10 倍梯度稀释,取 $6.12 \times 10^8 \sim 6.12 \times 10^1$ 共计 8 个稀释度的重组质粒作为标准品模板。

2.3 CaKoV 荧光定量 PCR 方法的建立及反应条件的优化

2.3.1 反应体系及条件 Qpcr 反应总体积为 20 μl ,其中 2 \times SYBR Green I 荧光染料为 10 μl ,上、下游引物(20 pmol/L)各 0.2 μl ,质粒模板 1.0 μl ,无核酸水补足至 20 μl ,同时设置不加质粒阴性对照。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 40 个循环。

2.3.2 标准曲线的建立 选 A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0 之间的质粒进行 10 倍梯度稀释,选取 $6.12 \times 10^8 \sim 6.21 \times 10^1$ 拷贝/ μl 的质粒作为模板进行荧光定量 PCR 扩增,利用软件 7500 Software v2.0.6 进行分析,绘制标准曲线及溶解曲线。

2.3.3 重复性检测 以 10 倍梯度稀释的 3 个梯度 $6.12 \times 10^6 \sim 6.21 \times 10^4$ 拷贝/ μl 的标准质粒作为模板进行组间和组内的平行试验,连续扩增 3 次,计算组间和组内的 Ct 值误差,评价其重复性。

2.3.4 特异性检测 以 CPV、CDV、CCV 的 cDNA 为模板,用优化的反应体系和反应条件进行 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR,分析其特异性,试验设无核酸水阴性对照。

2.3.5 灵敏度检测 将 10 倍梯度稀释的标准品质粒作为模板分别进行 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 扩增,分析该方法检测 CaKoV 的灵敏度。

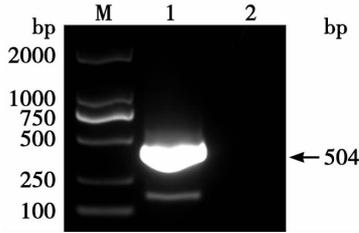
2.3.6 动物组织样品的检测 采集 253 份狐狸肺脏,采用总 RNA 抽提试剂盒提取基因组 RNA 并反转录成 cDNA,使用建立的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法进行检测。

结果

1 目的基因扩增及标准质粒的制备与鉴定

利用 CaKoV 特异性引物 CaKoV-F/R 扩增出 504 bp 的目的基因片段,与预期的结果相符(图 1)。将目

的基因片段纯化并克隆到 pEASY-Blunt 载体上,送至库美生物有限公司测序并与 NCBI 登录的标准序列比对,同源率为 99.41%。



M DNA 标志物(DL2000) 1 3D 基因 PCR 产物 2 阴性对照
图 1 CaKoV-3D(504bp)基因 PCR 鉴定

M DNA marker (DL2000) 1 3D gene PCR product 2 Negative control

Fig. 1 PCR identification result of CaKoV-3D (504bp) gene

2 实时荧光定量 PCR 标准曲线的建立

将标准品质粒 10 倍梯度稀释,选择其中的 $6.12 \times 10^8 \sim 6.21 \times 10^1$ 拷贝/ μl 进行 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 扩增,自动生成的标准曲线见图 2,其斜率为 -4.369,截距为 46.680,相关系数为 0.994。建立的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法具有较高的扩增效率,阴性对照未出现非特异性扩增。

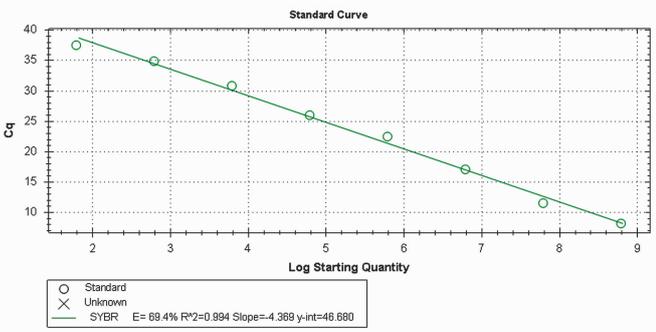


图 2 CaKoV 荧光定量 PCR 标准曲线

Fig. 2 Establishment of the standard curve with recombinant plasmids

3 重复性试验

将不同稀释倍数的标准品进行 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 扩增,通过统计软件分析扩增结果(表 1,2),其组内变异系数为 0.99%~1.75%,组间变异系数为 1.15%~1.56%。表明建立的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法重复性良好。

表 1 荧光定量 PCR 检测 CaKoV 的组内统计
Table 1 Statistics of CaKoV detection by SYBR Green I
Real-time PCR within the groups

标准模板(拷贝/ μl) Positive templatescopies	同一批次 3 个重复的 Ct 值 Ct value of intra assay			平均值 \pm 标准差 $\bar{x} \pm s$	变异系数 CV(%)
	1	2	3		
4.5×10^6	12.38	12.24	12.48	12.37 ± 0.12	0.99
4.5×10^5	17.55	17.40	16.96	17.30 ± 0.30	1.75
4.5×10^4	21.78	21.13	21.37	21.43 ± 0.33	1.52

表 2 荧光定量 PCR 检测 CaKoV 的组间统计
Table 2 Statistics of CaKoV detection by SYBR Green I
Real-time PCR between the groups

标准模板(拷贝/ μl) Positive templatescopies	同一批次 3 个重复的 Ct 值 Ct value of intra assay			平均值 \pm 标准差 $\bar{x} \pm s$	变异系数 CV(%)
	1	2	3		
4.5×10^6	12.53	12.34	12.64	12.52 ± 0.17	1.38
4.5×10^5	17.97	17.60	17.63	17.73 ± 0.20	1.15
4.5×10^4	21.73	21.83	22.37	21.98 ± 0.34	1.56

4 特异性试验

以 CPV、CDV、CCV 为模板,采用建立的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法进行扩增,验证方法的特异性。结果显示对照样品均未出现特异性扩增,表明该方法具有较高的特异性。

5 溶解曲线

对不同拷贝浓度的标准品质粒进行 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 扩增,进行溶解温度分析,结果见图 3。不同拷贝浓度标准品质粒的溶解温度均为 86.49°C ,波峰高度与标准品质粒拷贝浓度呈正相关。

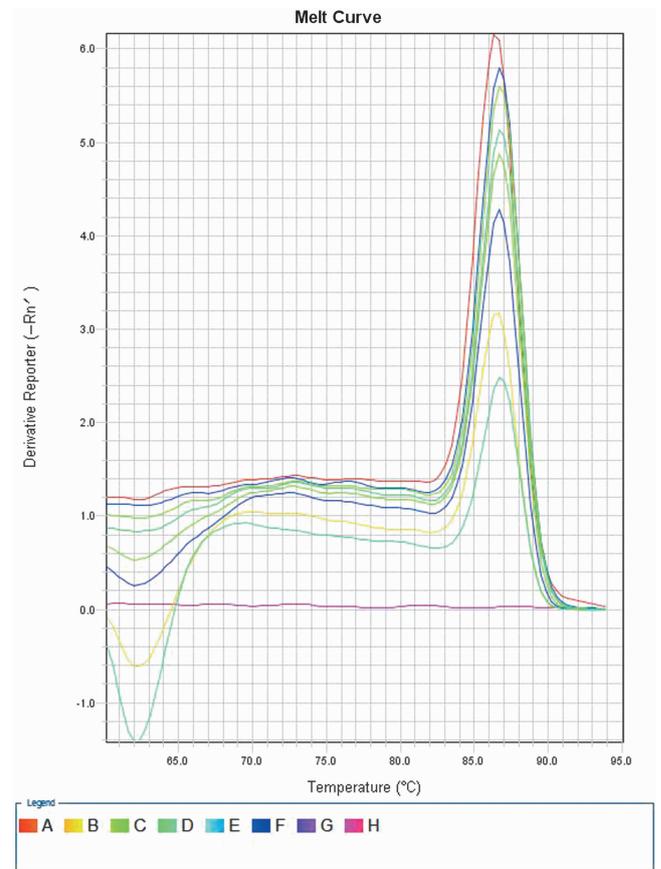


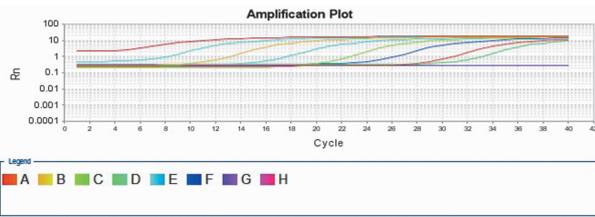
图 3 CaKoV 荧光定量 PCR 扩增产物溶解曲线

Fig. 3 Melting curve of the SYBR Green I Real-time PCR

6 灵敏度试验

分别用 $6.12 \times 10^8 \sim 6.21 \times 10^1$ 拷贝/ μl 的标准品作为模板进行 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 扩增,结果显示当反应体系中含有 6.12×10^1 拷贝/ μl 标

准质粒 DNA 时,仍然可产生特异性扩增,而阴性对照未观察到特异性扩增(图 4)。



1~8 $6.12 \times 10^8 \sim 6.21 \times 10^1$ 拷贝/ μl

图 4 实时荧光定量 PCR 检测 CaKoV 的灵敏度

1~8 $6.12 \times 10^8 \sim 6.21 \times 10^1$ copies/ μl

Fig. 4 Sensitivity analysis of the SYBR Green I Real-time PCR

7 动物组织样品的 CaKoV 检测

采用建立的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法对采自辽宁、山东地区狐狸养殖场的 253 份狐狸肺脏样品进行检测 CaKoV,其中山东省威海市样品的阳性率为 7.59% (12/158),辽宁省沈阳市、鞍山市样品的阳性率为 8.42% (8/95),总阳性率为 7.91% (20/253)(表 3)。

表 3 狐狸肺组织样品采集地及 CaKoV 检测结果
Table 3 Distribution of fox samples and detection results of Canine kobuvirus

样品编号 Sample number	样品采集地区 Sample area	Ct 值 Ct value	拷贝数(拷贝/ μl) Copy value(copies/ μl)
1	山东省威海市	30.22	8.23×10^2
2	山东省威海市	28.22	2.30×10^3
3	山东省威海市	29.38	1.27×10^2
4	山东省威海市	30.08	8.85×10^2
5	山东省威海市	20.68	1.10×10^5
6	山东省威海市	29.71	1.07×10^3
7	山东省威海市	31.86	3.55×10^2
8	山东省威海市	32.55	2.49×10^2
9	山东省威海市	32.17	3.03×10^2
10	山东省威海市	30.95	5.68×10^2
11	山东省威海市	32.03	3.25×10^2
12	山东省威海市	31.02	5.47×10^2
13	辽宁省沈阳市	27.35	3.59×10^3
14	辽宁省沈阳市	27.71	2.99×10^3
15	辽宁省沈阳市	31.65	3.96×10^2
16	辽宁省鞍山市	31.26	4.83×10^2
17	辽宁省鞍山市	31.88	3.51×10^2
18	辽宁省鞍山市	30.96	5.64×10^2
19	辽宁省鞍山市	31.58	4.11×10^2
20	辽宁省鞍山市	31.52	4.24×10^2

讨论

CaKoV 是无囊膜单股正链 RNA 病毒,基因组全长 8.1~8.2 kb,有相对较高的 GC 含量(59%),其中 3D 基因为高度保守序列,因此选择 3D 基因作为 PCR 检测的目的基因片段^[10,16,17]。CaKoV 传染途径多且分布广泛,自 2011 年于美国报道后,呈现全球分布。CaKoV 可感染动物体内多种器官,症状表现为腹泻、

呕吐以及呼吸道症状,与感染其它犬科肠道病毒的症状相似,并且容易与其它犬科病毒共感染。因此,根据临床症状和病理变化很难区分患病动物所感染病毒^[17]。

狐狸为 CaKoV 易感动物,因此开发一种快速、准确的检测方法对狐狸养殖业具有重要意义。目前,常规 PCR 检测 CaKoV 的最低拷贝数为 1×10^3 拷贝/ μl ^[18],BKoV 的实时荧光定量 PCR 检测方法所能检出的最低拷贝数为 4.86×10^2 拷贝/ μl ^[19]。本实验中制备的模板在 6.21×10^1 拷贝/ μl 时依然可检测到特异性扩增,证明方法灵敏度高。用本实验建立的 CaKoV SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法检测犬科动物常见的其它肠道病毒,未出现交叉反应,体现了较高的特异性。其组内和组间变异系数小于 2%,表明该方法具有良好的稳定性和重复性。采用建立的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法检测采自辽宁、山东的 253 份狐狸肺脏样品,阳性率为 7.91%。表明 CaKoV 在养殖狐狸中呈流行趋势。CaKoV 传染途径多样化,感染动物易出现腹泻、呕吐、呼吸道症状以及全身多处器官共同感染情况,应及早发现并及时预防,避免对狐狸养殖业造成重大的经济损失。

本实验建立的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法稳定性、重复性及特异性良好,灵敏度高,可用于 CaKoV 的临床感染检测以及流行病学调查。

【参考文献】

- [1] Wang Y, Cui Y, Li Y, et al. Identification and full-genome sequencing of canine kobuvirus in canine fecal samples collected from Anhui Province, eastern China[J]. Arch Virol, 2020, 165(11): 2495-2501.
- [2] Wang Z, Jiang Y, Liu X, et al. Epidemiological and phylogenetic analysis of canine kobuviruses in Tangshan, China[J]. Arch Virol, 2020, 165(10): 2317-2322.
- [3] Li C, Wei S, Guo D, et al. Prevalence and phylogenetic analysis of canine kobuviruses in diarrhoeic dogs in northeast China[J]. J Vet Med Sci, 2016, 78(1): 7-11.
- [4] Miyabe F, M, Ribeiro J, Alfieri A. F, et al. Detection of canine kobuvirus RNA in diarrheic fecal samples of dogs with parvoviruses[J]. Braz J Microbiol, 2019, 50(3): 871-874.
- [5] Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AM, et al. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses [J]. Arch Virol, 2015, 160(7): 1837-1850.
- [6] Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AM, et al. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses[J]. Arch Virol, 2016, 161(10): 2921-2949.
- [7] Khamrin P, Maneekarn N, Okitsu S, et al. Epidemiology of human and animal kobuviruses[J]. Virusdisse, 2014, 25(2): 195-200.
- [8] Rivadulla E. and J. L. Romalde, A Comprehensive Review on Human Aichi Virus[J]. Virol Sin, 2020, 35(5): 501-516.

(下转 30 页)

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