



猪流行性腹泻病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立

南 沛, 刘高鹏, 戴小燕, 姜永厚
(浙江理工大学生命科学与医药学院, 杭州 310018)

摘 要: 为开发一种快速、准确检测猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)的实时荧光定量 PCR 方法, 根据引物设计原则在病毒基因组序列保守区设计了一对 PEDV 特异性引物, 通过系统优化建立了 EvaGreen 实时荧光定量 PCR 方法, 对其特异性、灵敏度和重复性进行了分析, 并将该方法应用于 90 份临床样品检测。结果表明: 该实时荧光定量 PCR 可以特异性地检测 PEDV, 对其他非靶标病毒无交叉反应, 最低检测限为 5 copies/ μ L; 使用 3 个不同浓度的标准品进行批内和批间重复, Ct 值的变异系数在 2.8% 以下, 表明该方法重复性好; 临床样品中 PEDV 的阳性率为 48.9%。建立的实时荧光定量 PCR 是一种快速、准确、高度灵敏且特异的检测方法, 可用于 PEDV 流行病学调查和临床诊断。

关键词: 猪病毒; 腹泻; 实时荧光定量 PCR; 熔解曲线分析; 检测

中图分类号: S852.65.11

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851(2021)09-0711-06

Establishment of an EvaGreen real-time fluorescence quantitative PCR assay for porcine epidemic diarrhea virus

NAN Pei, LIU Gaopeng, DAI Xiaoyan, JIANG Yonghou

(College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: The purpose of this study is to develop an EvaGreen-based real-time fluorescence quantitative PCR assay to detect porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) rapidly and accurately. A pair of specific primers for PEDV was designed in the conserved region of virus genome sequence according to the primer design principle. After system optimization, an EvaGreen real-time fluorescence quantitative PCR method was established, and its specificity, sensitivity and repeatability were analyzed. Subsequently, the established assay was applied to the detection of 90 clinical samples. The result revealed that the assay can specifically detect PEDV, and no cross-reaction was observed with other non-target viruses. The limit of detection of this assay was 5 copies/ μ L. Standards with 3 different concentrations were used for within-run and between-run repetition. The coefficient of variation (CV) of Ct value was less than 2.8%, which indicated that the proposed method had good repeatability. The positive rate of PEDV in the clinical samples was 48.9%. In summary, the real-time fluorescence quantitative PCR assay established in this work is a rapid, accurate, highly sensitive and specific detection method, which can be used for epidemiological investigation and clinical diagnosis of PEDV.

Key words: porcine virus; diarrhea; real-time fluorescence quantitative PCR; melting curve analysis; detection

0 引言

猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)为冠状病毒家族(Coronaviridae)中冠状病毒属(Alphacoronavirus),是一种有包膜的、直径为95~190 nm的正义单链RNA病毒,基因组长约28 kb,包括5'端和3'端的非翻译区和至少7个开放阅读框^[1]。PEDV是一种急性、高致病性的冠状病毒,感染猪群会表现出呕吐、水样腹泻和脱水等特征,不同年龄段的猪都能被感染,但对新生仔猪的致死率尤其高,约80%~100%^[2]。PEDV最早于1971年在英国被记录为一种类似于猪传染性胃肠炎(Porcine transmissible gastroenteritis virus, TGEV)的病原体,于1978年在比利时被鉴定为一种新的冠状病毒,并被命名为PEDV^[3-4];PEDV几乎在全球范围内大量流行,席卷了欧洲^[5]、亚洲^[6]和北美^[7]等地区,造成了严重的经济损失。2002年以后,欧洲范围内仅有零星的PEDV报道^[2]。中国在1984年1月至2010年10月间,PEDV呈现零星或区域性发生,2010年之后一种PEDV的变异株(GIIa)在全国范围内迅速传播,现已经报道的多个变异株对中国预防和治疗PEDV造成了重大挑战^[8-9]。因此,对PEDV的临床诊断显得非常重要。

当前,用于检测PEDV的方法主要有3种类型,包括病毒分离和鉴定、免疫学以及聚合酶链式反应技术^[1]。由于病毒纯化通常困难,传统的病毒分离鉴定并不适合批量临床样品的诊断,适合细胞培养的PEDV病毒株并不多。用于免疫学的检测方法包括酶联免疫吸附法、免疫组化技术和免疫荧光测试,但其在检测PEDV时存在缺陷,由于PEDV基因组具有高度变异性,很难收集大量的PEDV病毒株并产生高度特异的猪抗血清,而无法评价交叉反应中和抗体的效价^[10];由真核系统表达的重组蛋白在实验动物中产生的抗血清或单克隆抗体是探索PEDV抗原变异的替代方法,但重组蛋白的结构能否反映完整病毒中的蛋白仍需进一步确认,抗体的特异性也会受到实验动物背景的影响^[11]。PCR是目前病原体检测最有前途和最广泛使用的技术之一,包括普通PCR和实时荧光定量PCR方法^[12]。与普通PCR相比,实时荧光定量PCR具有明显的优势,如较高的灵敏度、无需通过琼脂糖凝胶显现结果,更加简便,且能对样品中的病毒含量进行定量测定^[13]。

本文拟建立一种基于EvaGreen染料的PEDV实时荧光定量PCR检测方法,并利用该方法分析浙

江省收集的90份猪粪便样本中PEDV的感染情况,为PEDV在临床样本中的感染提供数据支持,有助于猪流行性腹泻的早期诊断和预防。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

荧光定量PCR仪7300(ABI公司,美国);PCR仪和PowerPac电泳仪(Bio-Rad公司,美国);凝胶成像分析系统(上海天能科技公司);离心机(Eppendorf公司,德国);超微量分光光度计Nanodrop 2000(Thermo公司,美国);1×EG(Biotium公司,美国);AxyPrep™体液病毒DNA/RNA小量制备试剂盒和PCR纯化试剂盒均为美国Axygen产品;pUCm-T载体(上海生工生物工程公司);PCR Master Mix和RT Master Mix Kit(南京诺唯赞公司)。

1.2 病毒和样品

PEDV和TGEV疫苗株来自哈尔滨维科生物技术开发公司,PCV2细胞株、RVA和RVC阳性样品来自本实验室,90份猪粪便样品采集于浙江猪场,样品均保存在-80℃冰箱。

1.3 核酸提取和反转录

样品处理参考Jiang等^[14]的样品处理方法。将粪便样品以1:10(W/V)的比例重悬于1×PBS缓冲液中,于涡旋振荡器6000 r/min振荡2 min,在4℃静置10 min,12000 r/min离心5 min获得病毒核酸的粗提液;按照制造商的说明,使用AxyPrep™体液病毒DNA/RNA微量制备试剂盒从每个样品的上清液中提取病毒核酸;参考RT Master Mix Kit说明书使用随机六聚体引物进行病毒的cDNA合成,并将该cDNA立即用于扩增模板或在-80℃下保存。

1.4 引物设计

在GenBank序列数据库中下载PEDV的基因组序列,用DNASTar软件进行序列比对以确定PEDV特定的保守序列;使用Primer Premier 5软件设计了一组特异性引物,并由金唯智(苏州)公司进行引物合成,引物的详细信息如表1所示。

1.5 质粒标准品构建

PCR反应体系包括10 μL 2×Master Mix、250 nmol/L PEDV-F1/PEDV-R1引物、0.5 μL模板,添加ddH₂O至总体积为20 μL。PCR程序包括95℃预变性3 min、95℃变性30 s、55℃退火30 s、72℃延伸30 s、35个循环和72℃延伸5 min。

表 1 用于克隆测序和实时荧光定量 PCR 的 PEDV 引物

引物	序列(5'→3')	产物大小/bp	位置	参考序列
PEDV-F1	AACACGGCGACTACTCAGC	394	26206~26599	KC189944
PEDV-R1	GCCTTCTTTAGCAACCCAG			
PEDV-F2	GGCGGATACTGGAATGAGCAA	109	26441~26549	KC189944
PEDV-R2	GGTCGGCGTGAGGTCCTGTT			

PCR 产物通过 $1\times$ TAE 缓冲液进行 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。使用 PCR 纯化试剂盒纯化产物,并将其克隆到 pUCm-T 载体中,通过测序确认重组质粒构建体。使用 NanoDrop 2000 仪器分析质粒模板的浓度和纯度。质粒拷贝数(copies)计算按照参考文献[15];调节质粒浓度至 5×10^4 copies/ μ L,以 10 倍关系进行梯度稀释,直到稀释至 5 copies/ μ L,保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 用于后续实验。

1.6 实时荧光定量 PCR 特异性

为了评估实时荧光定量 PCR 的特异性,分别以 PEDV 和其它四种非靶标病毒做模板进行特异性分析,ddH₂O 为空白阴性对照。PCR 反应体系为 10 μ L 的 $2\times$ Master Mix、 $1\times$ EG、200 nmol/L 正反引物(PEDV-F2 和 PEDV-R2),ddH₂O 补足反应体积至 20 μ L。在 ABI 7300 荧光定量 PCR 仪上进行 PCR 扩增:95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 min、95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s、55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s 和 40 个循环。熔解曲线反应参数为:95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min、95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 15 s 收集荧光信号。

1.7 实时荧光定量 PCR 灵敏度和标准曲线建立

通过预先稀释的梯度质粒模板($5\times 10^7\sim 5$ copies/ μ L)来确定该 PCR 反应的灵敏度。每个浓度进行 3 次重复实验,荧光定量 PCR 的反应体系和参数同 1.6。

通过对阈值循环(Ct)值(y 轴)与不同梯度模板稀释液中存在的初始拷贝数的对数(x 轴)进行线性回归分析,从而获得荧光 PCR 的标准曲线以及相关系数(R^2),按照参考文献[16]计算反应的扩增效率,所得曲线用于确定临床样品中的 PEDV 的基因组拷贝数。

1.8 实时荧光定量 PCR 重复性试验

分别选取 PEDV 质粒模板为 5.0×10^6 、 5.0×10^4 copies/ μ L 和 5.0×10^2 copies/ μ L 的含量进行荧光定量 PCR 批内、批间重复试验。批内重复即一次荧光定量 PCR 的 3 次重复试验;批间重复即选取 3 个不同时间段内的荧光 PCR 试验。

1.9 临床样品的检测

根据建立的实时荧光定量 PCR 方法对 90 份临

床样品进行检测,PCR 的反应体系和参数同 1.6。

2 结果与分析

2.1 实时荧光定量 PCR 特异性分析

对 PEDV 进行荧光定量 PCR 和熔解曲线分析结果显示,熔解曲线峰型单一,无杂峰,熔解温度 T_m 值为 83.3 $^{\circ}\text{C}$,而对 PCV2、TGEV、RVA 和 RVC 四种非靶标病毒未扩增出其他非特异性峰(见图 1),表明该方法具有较好的特异性。

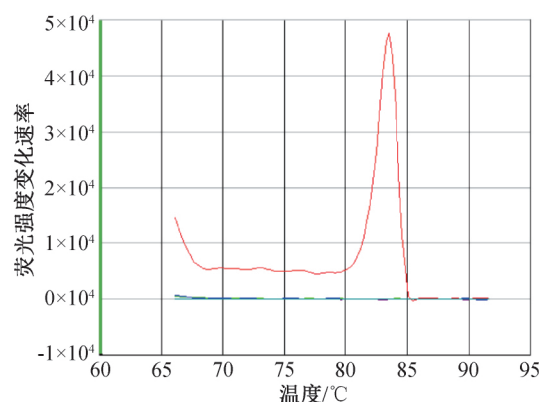


图 1 PEDV 实时荧光定量 PCR 的特异性分析

2.2 实时荧光定量 PCR 标准曲线及灵敏度分析

以预先稀释的梯度 PEDV 质粒标准品($5\times 10^7\sim 5$ copies/ μ L)作为 PCR 扩增的模板,进行 EvaGreen 荧光定量 PCR 检测,可检测到的最小质粒浓度为 5 copies/ μ L(见图 2)。在 $50\sim 5\times 10^7$ copies/ μ L 模板梯度范围建立的标准曲线的线性回归方程为 $y = -3.383622x + 35.902451$,扩增效率为 97.5%,具有良好的线性相关性($R^2 > 0.99$)(见图 3)。

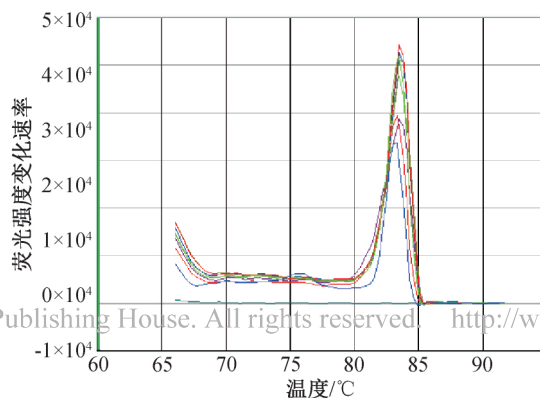
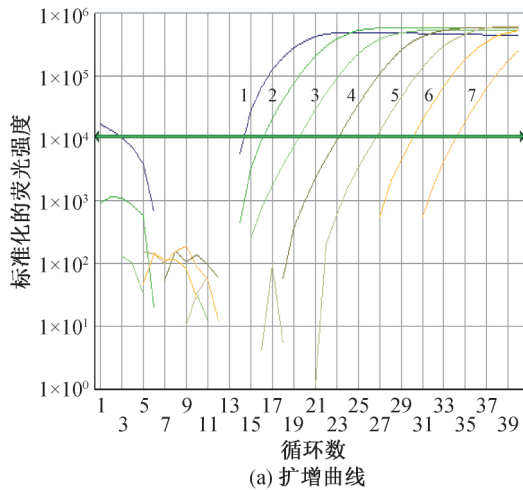
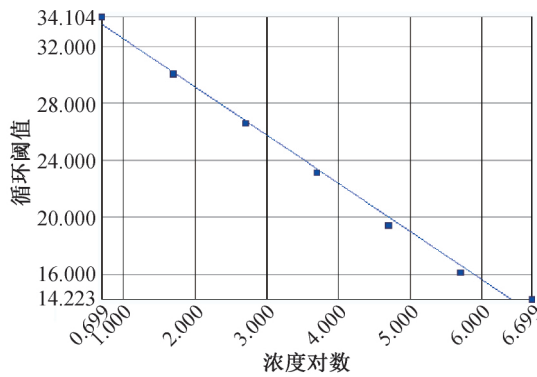


图 2 PEDV 实时荧光定量 PCR 灵敏度



(a) 扩增曲线



(b) 标准曲线

1: 5.0×10^7 copies/ μL ; 2: 5.0×10^6 copies/ μL ;3: 5.0×10^5 copies/ μL ; 4: 5.0×10^4 copies/ μL ;5: 5.0×10^3 copies/ μL ; 6: 5.0×10^2 copies/ μL ; 7: 50 copies/ μL

图3 PEDV实时荧光定量PCR

2.3 实时荧光定量PCR重复性试验分析

分别选取不同浓度的质粒标准品 (5.0×10^6 、 5.0×10^4 copies 和 5.0×10^2 copies) 进行实时荧光定量PCR体系的批内和批间重复性检测, 结果如表2所示。由表2可知, Ct值的变异系数小于2.8%, 建立的PEDV实时荧光定量PCR重复性良好。

表2 PEDV实时荧光定量PCR重复性

标准品/ (copies· μL^{-1})	批内重复		批间重复	
	Ct 平均值	变异系数/%	Ct 平均值	变异系数/%
5×10^6	14.78	1.85	14.76	2.74
5×10^4	23.07	0.57	23.06	0.35
5×10^2	31.64	1.35	31.73	2.06

2.4 临床样品的实时荧光PCR检测分析

利用建立的EvaGreen实时荧光定量PCR对90份临床样本进行检测, PEDV的阳性检出率为48.9%; 对部分阳性样品进行克隆测序, 测序序列经BLAST匹配均为PEDV基因组序列, 进一步证实PCR检测结果的可靠性。

3 讨论

猪流行性腹泻是一种具有高度传染性、对仔猪危害极大的肠道疾病, 破坏了养猪业的生产结构, 对全球猪肉行业造成了巨大的冲击和经济损失, 频繁的基因重组是造成PEDV致病多样性的主要原因, 也是目前疫苗研究的难点所在^[17]。PEDV的治愈率在感染初期要明显高于感染后期, 因此PEDV的早期临床检测诊断对及时、有效地控制病毒的传播起关键作用^[18]。本文开发了一种能够快速、灵敏和特异的检测出PEDV的实时荧光定量PCR方法, 对该疾病的临床诊断具有重要意义。

EvaGreen作为一种新型饱和染料, 与非饱和荧光染料的典型代表SYBR Green I相比, 克服了高浓度的染料对PCR的抑制作用以及受溶解温度影响致使扩增结果的可重复性和特异性差等缺点, 具有更高的灵敏度、特异性和可重复性, 可以精准反映DNA双链随着温度变化的解链情况, 甚至可以精确到单个碱基的差异^[14, 18-19]。与荧光探针相比, EvaGreen染料的检测方法不会受限于5'→3'核酸外切酶活性的DNA聚合酶来水解探针, 且成本更低^[20]。在文中对PEDV和其他4种与腹泻有关的病毒进行检测时, 除PEDV外其他均为阴性, 且PEDV产物熔解峰尖细特异; 在进行重复性实验时, 扩增产物的Ct值的变异系数低于2.8%, 表明建立的基于EvaGreen实时荧光定量PCR具有很好的特异性、重复性和准确度。

本文以质粒模板系列稀释浓度和对应Ct值建立标准曲线, 结果显示具有良好的扩增效率和线性关系。通过EvaGreen实时荧光定量PCR检测PEDV的检测限可以达到5 copies/ μL , 与Bigaul等^[20]建立的SYBR Green I实时荧光定量PCR的检测限(50 copies/5 μL)相似, 比吴洋^[21]建立的SYBR Green I实时荧光定量PCR的检测限(33 copies/ μL)提高了6倍, 检测限比传统普通PCR检测方法($5.9 \times 10 \sim 3.36 \times 10^4$ copies/ μL)至少灵敏10倍^[22-23]。本文建立的PEDV荧光定量PCR具有较高的灵敏度, 能够检测出样品中病毒滴度很低的PEDV并进行定量, 对于未表现出腹泻症状的早期PEDV感染者的临床诊断具有特殊意义。

猪群中PEDV的感染在中国比较普遍, 2010年10月, 中国出现了一种高毒力的PEDV病毒株, 能够感染不同年龄段的猪, 尤其是小于10 d的仔猪因PEDV感染而致死的比例可以高达80%~

100%^[24]。Li 等^[25]对 2011 年 1 月至 10 月中国 12 省的 57 个农场的 455 份临床样本通过反转录 PCR 进行 PEDV 检测,结果发现 61.11% 样品被检出为阳性。Zhang 等^[8]对 2012 年至 2018 年期间从江西、福建、浙江、湖南和广东五省的 168 个养猪场的 2987 个样本进行检测,发现 PEDV 感染率介于 50.21% 和 62.1% 之间,且变异型 PEDV 是导致严重腹泻的主要病毒。本文对浙江省的 90 份临床样本进行检测,其 PEDV 感染率为 48.9%,略低于其他报告的感染率,这可能主要是因为样品来自健康猪群以及较高的检测灵敏度。该数据也反映了临床健康样品中 PEDV 的早期存在,凸显及早发现 PEDV 对预防和控制病毒性腹泻的传播重要性。

4 结 论

本文开发的基于 EvaGreen 染料的实时荧光定量 PCR 方法,克服了传统 PCR 小批量、灵敏度低和需要扩增后的凝胶电泳等缺点,能够快速、便捷、灵敏和特异性地检测临床环境中 PEDV,最低检测限可以达到 5 copies/ μ L,在没有广谱适用的疫苗和 PEDV 仍旧普遍流行的情况下显得尤其重要,为猪病毒性腹泻流行病学调查及防控奠定一定基础。

参考文献:

- [1] Song D, Park B. Porcine epidemic diarrhoea virus: A comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines[J]. *Virus Genes*, 2012, 44(2): 167-175.
- [2] Choudhury B, Dastjerdi A, Doyle N, et al. From the field to the lab—an European view on the global spread of PEDV[J]. *Virus Research*, 2016, 226: 40-49.
- [3] Wood E N. An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhoea[J]. *The Veterinary record*, 1977, 100(12): 243-244.
- [4] Pensaert M B, De Bouck P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine[J]. *Archives of Virology*, 1978, 58(3): 243-247.
- [5] Debouck P, Pensaert M. Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus, CV 777 [J]. *American Journal of Veterinary Research*, 1980, 41(2): 219-223.
- [6] Kweon C H, Kwon B J, Jung T S, et al. Isolation of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in Korea[J]. *Korea Science*, 1993, 33(2): 249-254.
- [7] Stevenson G W, Hoang H, Schwartz K J, et al. Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in the United States; Clinical signs, lesions, and viral genomic sequences [J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2013, 25(5): 649-654.
- [8] Zhang F, Luo S, Gu J, et al. Prevalence and phylogenetic analysis of porcine diarrhea associated viruses in southern China from 2012 to 2018[J]. *BMC Veterinary Research*, 2019, 15(1): 470.
- [9] Wang D, Fang L, Xiao S. Porcine epidemic diarrhea in China[J]. *Virus Research*, 2016, 226: 7-13.
- [10] Lin C M, Saif L J, Marthaler D, et al. Evolution, antigenicity and pathogenicity of global porcine epidemic diarrhea virus strains [J]. *Virus Research*, 2016, 226: 20-39.
- [11] Lin C M, Gao X, Tomoichiro O, et al. Antigenic relationships among porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus strains [J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(6): 3332-3342.
- [12] Bigault L, Brown P, Bernard C, et al. Porcine epidemic diarrhea virus: Viral RNA detection and quantification using a validated one-step real time RT-PCR[J]. *Journal of Virological Methods*, 2020, 283: 113906.
- [13] Kim S H, Kim In J, Pyo H M, et al. Multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and quantification of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus [J]. *Journal of Virological Methods*, 2007, 146(1-2): 172-177.
- [14] Liu G, Jiang Y, Opriessnig T, et al. Detection and differentiation of five diarrhea related pig viruses utilizing a multiplex PCR assay [J]. *Journal of Virological Methods*, 2019, 263: 32-37.
- [15] Wen D, Liu G P, Opriessnig T, et al. Simultaneous detection of five pig viruses associated with enteric disease in pigs using EvaGreen real-time PCR combined with melting curve analysis[J]. *Journal of Virological Methods*, 2019, 268: 1-8.
- [16] Ji Z, Shi D, Shi H, et al. A porcine epidemic diarrhea virus strain with distinct characteristics of four amino acid insertion in the COE region of spike protein[J]. *Veterinary Microbiology*, 2021, 253: 108955.
- [17] Wang X, Xu X, Hu W, et al. Visual detection of porcine epidemic diarrhea virus using a novel reverse transcription polymerase spiral reaction method [J]. *BMC Veterinary Research*, 2019, 15(1): 116.
- [18] Zheng X W, Liu G P, Opriessnig T, et al. Rapid detection and grouping of porcine bocaviruses by an EvaGreen[®] based multiplex real-time PCR assay using melting curve analysis[J]. *Molecular and Cellular*

- Probes, 2016, 30(4): 195-204.
- [19] Bustin S A, Benes V, Garson J A, et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments[J]. *Clinical Chemistry*, 2009, 55(4): 611-622.
- [20] Bigault L, Brown P, Bernard C, et al. Porcine epidemic diarrhea virus: Viral RNA detection and quantification using a validated one-step real time RT-PCR[J]. *Journal of Virological Methods*, 2020, 283: 113906.
- [21] 吴洋. 猪腹泻相关病毒多重和 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2014: 19-36.
- [22] 刘莹, 贾敬亮, 刘涛, 等. 猪 Delta 冠状病毒和猪流行性腹泻病毒双重 RT-PCR 诊断方法的建立[J]. *中国兽医杂志*, 2020, 56(2): 30-5.
- [23] 温海京, 贾超伟, 刘芊麟, 等. 2 种猪冠状病毒双重 RT-PCR 检测方法的建立与应用[J]. *北京农学院学报*, 2019, 34(1): 51-55.
- [24] Wang X M, Niu B B, Yan H, et al. Genetic properties of endemic Chinese porcine epidemic diarrhea virus strains isolated since 2010[J]. *Archives of Virology*, 2013, 158(12): 2487-94.
- [25] Li W T, Li H, Liu Y B, et al. New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2012, 18(8): 1350.

(责任编辑:唐志荣)