



# 猪流行性腹泻病毒 RT-PCR 检测方法的建立

张秋桢, 刘高鹏, 刘 芹, 姜永厚  
(浙江理工大学生命科学与医药学院, 杭州 310018)

**摘 要:** 猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)是造成猪腹泻的一种主要肠道病毒。为建立一种能快速、准确和适于大批量样品的检测 PEDV 方法,根据 PEDV N 蛋白基因保守序列特征设计了一对特异性引物,并对退火温度和循环数等条件进行了优化。结果显示:建立的 RT-PCR 方法特异性地扩增出 PEDV 目的条带,对非靶标病毒均无交叉反应,最低检测限可达 5 拷贝/ $\mu$ L;应用该方法对浙江 40 份健康猪粪便样品进行检测, PEDV 检出率为 12.5%。结果表明,该文所建立检测 PEDV 的方法具有较高的特异性和灵敏度,可用于临床诊断和流行病学调查。

**关键词:** 猪流行性腹泻病毒;RT-PCR;检测;特异性;灵敏度  
**中图分类号:** S854.43;S852.651      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1673-3851 (2022) 07-0629-06

## Establishment of a RT-PCR detection method for porcine epidemic diarrhea virus

ZHANG Qiuya, LIU Gaopeng, LIU Qin, JIANG Yonghou

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

**Abstract:** Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) is a major enterovirus causing porcine diarrhea. In order to establish a rapid and accurate PCR method suitable for the detection of PEDV in a large number of samples, a pair of specific primers were designed based on the sequence characteristics of PEDV N protein genes in this study, and the annealing temperature and cycle number were optimized. The results have shown that the established RT-PCR method specifically amplified the PEDV target without cross-reaction to non-target viruses, and the minimum detection limit of the method reached 5 copies/ $\mu$ L. 40 fecal samples from healthy pigs were detected by this method, and the detection rate of PEDV was 12.5%. The results indicate that the established RT-PCR method has good specificity and sensitivity, which can be used for clinical diagnosis and epidemiological investigation of PEDV.

**Key words:** porcine epidemic diarrhea virus; RT-PCR; detection; specificity; sensitivity

### 0 引 言

猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)属于冠状病毒科(*Coronaviridae*)中甲型冠状病毒属(*Alphacoronavirus*),基因组单链正义 RNA,大小约为 28 kb,由至少 7 个开放阅读框

(Open reading fram, ORF)组成;PEDV 编码 4 种结构蛋白(S、E、M 和 N)和 4 种非结构蛋白(1a、1b、3a 和 3b)<sup>[1]</sup>。由 PEDV 引起猪流行性腹泻(Porcine epidemic diarrhea, PED)是一种具有高传染性和破坏性的肠道疾病,感病的猪临床症状为呕吐、厌食、发烧以及水样腹泻,死亡率接近 100%<sup>[2]</sup>。自 1971

收稿日期: 2022-04-11      网络出版日期:2022-06-02  
基金项目: 浙江省基础公益研究计划项目 (2018C37051, LGC21C180002)  
作者简介: 张秋桢(1996—),女,江苏南通人,硕士研究生,主要从事病毒分子诊断方面的研究。  
通信作者: 姜永厚, E-mail: yonghoujiang@zstu.edu.cn

年在英国养猪场首次发现以来,全球关于 PEDV 的报道越来越多<sup>[3-4]</sup>。2010 年以后,高致病性变异株在亚洲和美洲等国家引起了大规模的猪腹泻病,造成了严重的经济损失<sup>[5-7]</sup>,新 PEDV 变异株的出现及其广泛传播引起了人们的高度关注。PEDV 在猪群中引起的症状与其他腹泻病毒,如猪传染性胃肠炎病毒(Transmissible gastroenteritis virus, TGEV)、猪德尔塔冠状病毒(Porcine deltacoronavirus, PDCoV)和猪急性腹泻综合征病毒(Swine acute diarrhea syndrome coronavirus, SADS-CoV)相似,临床上难以区分<sup>[8]</sup>。因此,快速和及时地检测潜在的 PEDV 是预防和控制 PED 的首要措施之一。

目前检测 PEDV 的方法很多,主要有病毒分离鉴定、酶联免疫吸附测定(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、免疫荧光技术(Immunofluorescence, IF)、环介导等温扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)、反转录酶-聚合酶链锁反应(Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)和定量 RT-PCR(Quantitative RT-PCR, QRT-PCR)等<sup>[9]</sup>。其中,病毒分离与鉴定非常耗时,LAMP 需要高特异性引物且容易污染,ELISA 在乳猪免疫系统不成熟且抗体较少的状况下检测效率较低,QRT-PCR 具有高度敏感性但需昂贵的仪器和试剂<sup>[10-11]</sup>。与其他方法相比,RT-PCR 简便、快速、低廉并具有较好的特异性和灵敏度,已成为广泛应用的方法之一<sup>[12]</sup>。目前已有利用 RT-PCR 检测 PEDV 的相关报道,但灵敏度较低,或无法同时检测变异毒株和传统毒株<sup>[13-15]</sup>。因此,本文以 PEDV 的保守序列 N 蛋白基因为靶标位点,拟建立一种快速、特异和灵敏的可检测包括高致病性变异株在内 PEDV 的 RT-PCR 方法,为猪流行性腹泻早期防控和临床检测提供新的技术手段。

## 1 实验部分

### 1.1 模板与样品来源

PEDV 疫苗株(编号为 037718)来自哈尔滨维科生物技术开发公司,猪腹泻病毒包括猪博卡病毒(Porcine bocavirus, PBoV)、猪星状病毒(Porcine astrovirus, PAsV)、猪轮状病毒 C 组(Porcine group C rotaviruses, RVC)和猪圆环病毒 2 型(Porcine circovirus 2, PCV2)和猪传染性胃肠炎病毒(Transmissible gastroenteritis virus, TGEV)均保存于本实验室,40 份无明显腹泻症状猪粪便样品采集于浙江养殖场,样品均保存于-80℃备用。

### 1.2 仪器和试剂

Fresco 21 离心机(Eppendorf 公司,德国);PowerPac 电泳仪(Bio-Rad, 美国);PCR 扩增仪(Thermo 公司,美国);Nanodrop 2000 超微量分光光度计(Thermo 公司,美国);Tanon3500R 凝胶成像系统(上海天能科技有限公司)。

PUCm-T vector, AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒和 AxyPrep 体液病毒 DNA/RNA 小量试剂盒(Axygen 公司,美国),Hiscrypt@1st strand cDNA Synthesis Kit 和 2×Taq Master Mix 和 DH5α 感受态(诺唯赞公司,南京)。

### 1.3 核酸提取和反转录

参照 Nan 等<sup>[16]</sup>的方法进行样品前处理,具体过程为:取 150 mg 粪便样品,按照 1:10(*w/v*)的比例加入 1×PBS 缓冲液悬浮,6000 r/min 涡旋震荡 2 min,置于 4℃ 10 min;以 12000 r/min 离心 10 min,取上清液、备用。病毒 RNA 的提取和反转录分别按照 AxyPrep™ 体液病毒 DNA/RNA 小量制备试剂盒和 Hiscrypt@1st strand cDNA Synthesis Kit 进行。

### 1.4 引物设计

参考已有的 PEDV 序列(GenBank 登录号为 KC189944),应用 Premier 5.0 在病毒 N 蛋白的基因区域设计 1 对特异性引物(上游引物 PEDV-F:5'-AACACGGCGACTACTCAGC-3',下游引物 PEDV-R:5'-GCCTTCTTTAGCAACCCAG-3'),引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

### 1.5 PCR 扩增和质粒标准品构建

PCR 反应体系如下:2×Master Mix 10 μL, 100 nmol/L PEDV 上下游引物各 0.4 μL, cDNA 模板 1 μL,补 ddH<sub>2</sub>O 至 20 μL。反应参数为:95℃预变性 3 min,95℃变性 20 s,45℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,72℃延伸 5 min,35 个循环。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳,目的条带割胶回收,并连接至 pUCm-T Vector 载体中。连接产物转化 DH5α 感受态,具体方法按照南京诺唯赞大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5α 感受态操作进行。菌液 PCR 筛选出的阳性克隆由苏州金唯智有限公司测序鉴定,序列正确的阳性质粒即为质粒标准品。利用 Nanodrop 测量浓度后,根据阿伏伽德罗常数计算纯化质粒的拷贝数,并按照 10 倍梯度进行系列稀释。

### 1.6 循环数和退火温度优化

在已建立的 PCR 体系基础上进行扩增条件的优化,包括循环数(30、35、40 个循环和 45 个循环)以及退火温度(40.0~65.0℃)。

1.7 特异性实验

根据优化后的反应体系,同时对 PEDV 和其他几种非靶标病毒(PBoV、PAstV、PCV2、TGEV 和 RVC)进行特异性分析,以 ddH<sub>2</sub>O 为阴性对照。

1.8 敏感性实验

将计算好拷贝数的质粒标准品进行 10 倍系列梯度稀释,取 8 个浓度梯度( $5\times10^7\sim5$  拷贝/ $\mu\text{L}$ )分别作为模板,以最低检出量作为该实验的灵敏度。

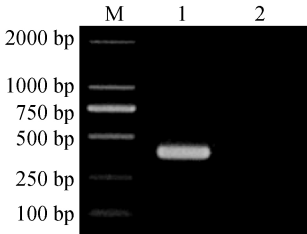
1.9 临床样品的检测

应用上述建立的 RT-PCR 对采集于浙江省养殖场的 40 份健康猪粪便样品进行检测。

2 结果与分析

2.1 质粒标准品制备

以 PEDV 反转录产物 cDNA 为模板,利用 PEDV-F 和 PEDV-R 引物对 PCR 扩增,PCR 产物电泳结果如图 1 所示。从图 1 中可以看出:PEDV 在约 400 bp 处存在与预期大小一致的特异性目的条带;目的条带回收后克隆至 pUCm-T 质粒中,测序结果表明该载体中插入的外源片段为 PEDV 的 N 蛋白的基因部分序列。



M.DL2000 DNA Marker;1.PEDV 扩增产物;2.阴性对照

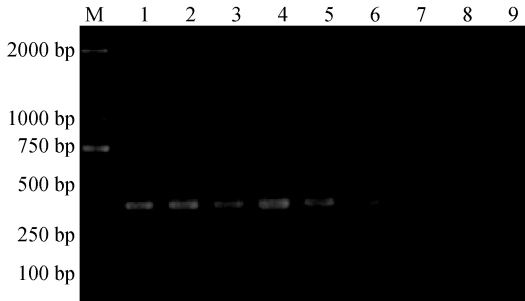
图 1 PEDV 重组质粒构建

2.2 退火温度优化

对 PEDV 退火温度进行优化探索,结果如图 2 所示。从图 2 中可以看出:PEDV 在 40.0~65.0℃ 均能有效扩增出目的条带,在 50.0~55.0℃ 扩增效率最高。考虑到引物特异性、二聚体形成等因素,最终选择 55.0℃ 作为该反应的退火温度。

2.3 循环数优化

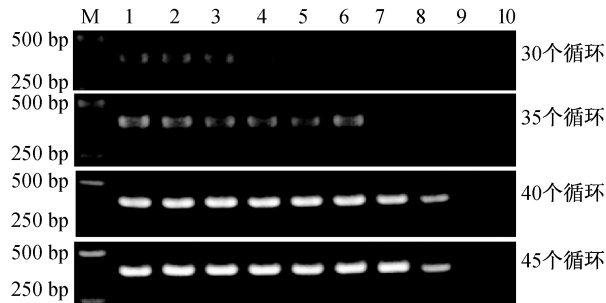
对 PCR 反应循环数进行优化探索,结果如图 3 所示。从图 3 中可以看出:在 30 个循环下最低检出量为  $5\times10^3$  拷贝,在 35、40 和 45 个循环下最低检出量均可达 5 拷贝,且在一定范围内循环数越多条带越亮。基于 PCR 反应时间及特异性等问题,最终选择 40 个循环作为 PCR 反应参数。根据退火温度和循环数优化的结果,确定 RT-PCR 反应参数为:95℃ 预变性 3 min,95℃ 变性 20 s,55℃ 退火 30 s,



M.DL2000 DNA Marker;1.40.0℃;2.41.7℃;3.44.7℃;4.49.4℃;5.55.0℃;6.59.7℃;7.63.0℃;8.65.0℃;9.阴性对照

图 2 PEDV RT-PCR 退火温度比较

72℃ 延伸 30 s,72℃ 延伸 5 min,40 个循环。

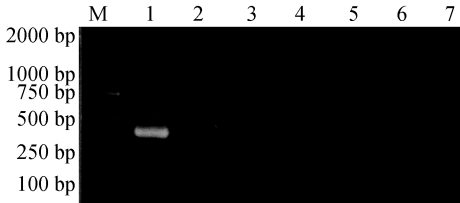


M.DL2000 DNA Marker;泳道分别表示不同浓度质粒拷贝数:  
1. $1.5\times10^7$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ ;2. $2.5\times10^6$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ ;3. $3.5\times10^5$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ ;  
4. $4.5\times10^4$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ ;5. $5.5\times10^3$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ ;6. $6.5\times10^2$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ ;  
7. $7.5\times10^1$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ ;8. $8.5\times10^0$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ ;9. $9.5\times10^{-1}$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ ;  
10.阴性对照

图 3 PEDV RT-PCR 不同循环数比较

2.4 特异性分析

根据上述确定的 PCR 优化体系,分别以 PEDV 和猪腹泻相关病毒 PBoV、PAstV、PCV2、TGEV 和 RVC 的 cDNA/DNA 为模板进行 PCR,结果如图 4 所示。从图 4 中可以看出:仅从 PEDV 模板中扩增出靶标片段,而在 PBoV、PAstV、PCV2、TGEV 和 RVC 样品及 ddH<sub>2</sub>O 中均检测不到目的条带,PCR 扩增具有较高的特异性。



M.DL2000 DNA Marker;不同泳道表示不同病毒模板;  
1.PEDV;2.PBoV;3.PAstV;4.PCV2;5.TGEV;6.RVC;  
7.ddH<sub>2</sub>O

图 4 PEDV RT-PCR 特异性检测

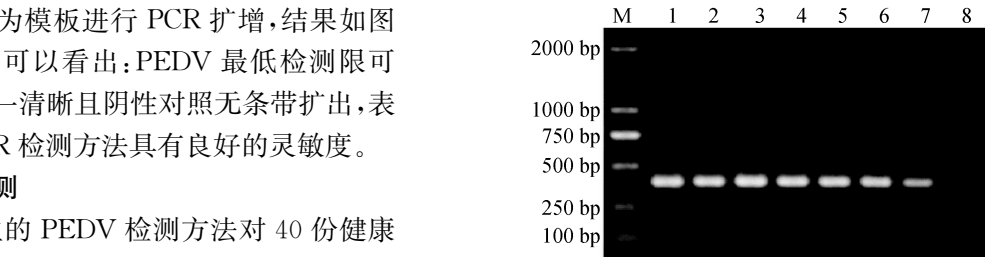
2.5 灵敏度分析

为进一步地确定本文建立的 PCR 检测灵敏度,分别以 10 倍系列稀释的浓度为  $5\times10^6\sim5$  拷贝/

μL 的 PEDV 质粒为模板进行 PCR 扩增,结果如图 5 所示。从图 5 中可以看出:PEDV 最低检测限可达 5 拷贝,条带单一清晰且阴性对照无条带扩出,表明本文建立的 PCR 检测方法具有良好的灵敏度。

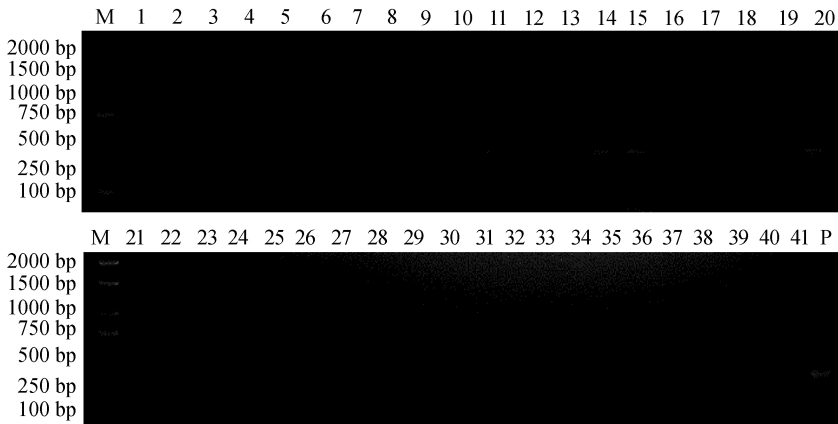
### 2.6 临床样品检测

利用本文建立的 PEDV 检测方法对 40 份健康猪粪便样品进行检测,结果如图 6 所示。从图 6 中可以看出:40 份猪粪便样品中有 5 份为阳性,阳性率为 12.5%(5/40);将这 5 份阳性样品 PCR 扩增产物进行测序和 BLAST 比对分析,确认 5 份阳性样品扩增产物均为 PEDV。



M:DL2000 DNA Marker;泳道分别表示不同浓度质粒拷贝数;  
1.5×10<sup>6</sup>拷贝/μL;2.5×10<sup>5</sup>拷贝/μL;3.5×10<sup>4</sup>拷贝/μL;  
4.5×10<sup>3</sup>拷贝/μL;5.5×10<sup>2</sup>拷贝/μL;6.5×10<sup>1</sup>拷贝/μL;  
7.5×10<sup>0</sup>拷贝/μL;8.ddH<sub>2</sub>O

图 5 PEDV RT-PCR 灵敏度检测



M:DL2000 DNA Marker;泳道 1~40 分别表示不同样品;41.阴性对照;P.PEDV 质粒

图 6 PEDV RT-PCR 检测临床样品

## 3 讨论

PEDV 是造成猪病毒性胃肠炎的主要病原物,可使各年龄段的猪群发病,且对哺乳仔猪具有极高的致死率<sup>[17]</sup>。目前针对 PEDV 的防治以疫苗为主,而近年来高毒力变异 PEDV 毒株席卷全球养猪业,传统 PEDV 毒株(G I 基因组)疫苗无法有效防治变异毒株(G II 基因组),致使变异毒株迅速传播,导致大量生猪死亡,给生猪养殖业造成了巨大经济损失<sup>[18]</sup>。因此,及时有效地诊断 PEDV 对于切断猪病毒性胃肠炎病原体的传播和疾病的爆发具有重要意义。

在 PCR 检测方法建立过程中,引物设计是最为关键的因素,通常决定着 PCR 检测的特异性和敏感性。随着越来越多的变异株 PEDV 基因组数据被公开,早期建立的 PCR 所用的引物存在扩增效率低下或失效的可能。本文根据目前 GenBank 上已有的 PEDV 全长基因组在其高度保守的 N 蛋白基因区域设计了一对特异性引物,通过体系成分浓度、退火温度和循环数等反应参数的优化,建立了可用于检测包括高致病性变异株在内 PEDV 的 RT-PCR,

可特异性扩增 PEDV,而与 PBoV、PAstV、PCV2、RVA 和 TGEV 非靶标病毒无交叉反应,最低可检测 5 拷贝/μL 的核酸含量,比于学武等<sup>[19]</sup>建立的一步 RT-PCR 灵敏度高出约 43 倍(2.01×10<sup>3</sup> 拷贝/μL),远高于 He 等<sup>[3]</sup>报道的 PEDV RT-PCR 的灵敏度(1.51×10<sup>4</sup> 拷贝/μL),而与南沛等<sup>[20]</sup>(5 拷贝/μL)和李飞等<sup>[21]</sup>(10 拷贝/μL)建立的实时荧光定量 PCR 灵敏度相当。本文建立的 PEDV RT-PCR 检测方法具有较高的特异性和灵敏度,且成本较低,为早期低浓度病毒的大批量检测提供了重要的技术手段。

近几年流行病学调查显示,腹泻猪场 PEDV 阳性率多高于 50%,是引起猪腹泻最主要的病毒之一<sup>[7,22-25]</sup>。Zhang 等<sup>[25]</sup>调查了中国 11 个省份 324 份健康猪粪便样品,PEDV 感染率为 10.8%(35/324)。Wen 等<sup>[26]</sup>分析了浙江省养猪场临床健康生长育肥猪的 90 份粪便样品,经检测 PEDV 阳性率为 28.9%(26/90)。Ding 等<sup>[11]</sup>采集了河南、重庆、青海等 9 个省市的 398 份猪粪便样本,结果显示 PEDV 阳性率为 19.6%(78/398)。通过本文建立的 PEDV RT-PCR 方法对来自浙江 40 份健康猪粪

便进行检测,发现有5份样本存在 PEDV 感染,阳性检出率为 12.5%(5/40)。在健康猪中检出一定比例的 PEDV 阳性样本,但其检出率远低于腹泻猪,其原因可能是病毒 PEDV 处于感染的早期阶段、含量低而无法检测。

## 4 结 论

本文根据 PEDV N 蛋白基因进行特异性引物设计,通过优化反应体系和反应参数,建立了一种快捷、低廉、特异和灵敏的 RT-PCR 检测方法,最低检测限可以达到 5 拷贝/ $\mu\text{L}$ 。应用该方法对 40 份临床样品进行了检测和阳性扩增产物测序分析确认,进一步证明了该方法的临床适用性,为 PEDV 的早期防控及流行病学调查提供了技术支持。

## 参考文献:

[1] Jung K, Saif L J. Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis[J]. The Veterinary Journal, 2015, 204(2): 134-143.

[2] Li W T, van Kuppeveld F J M, He Q, et al. Cellular entry of the porcine epidemic diarrhea virus[J]. Virus Research, 2016, 226: 117-127.

[3] He D, Chen F, Ku X, et al. Establishment and application of a multiplex RT-PCR to differentiate wild-type and vaccine strains of porcine epidemic diarrhea virus[J]. Journal of Virological Methods, 2019, 272: 113684.

[4] Wood E N. An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhoea[J]. Veterinary Record, 1977, 100 (12): 243-244.

[5] 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): 1350-1353.

[6] Vlasova A N, Marthaler D, Wang Q H, et al. Distinct characteristics and complex evolution of PEDV strains, North America, May 2013-February 2014[J]. Emerging Infectious Diseases, 2014, 20(10): 1620-1628.

[7] Wang D, Fang L R, Xiao S B. Porcine epidemic diarrhea in China[J]. Virus Research, 2016, 226: 7-13.

[8] Jung K, Saif L J, Wang Q H. Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): An update on etiology, transmission, pathogenesis, and prevention and control [J]. Virus Research, 2020, 286: 198045.

[9] 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.

[10] Zhu Y, Wang G H, Cui Y D, et al. Establishment of a nanoparticle-assisted RT-PCR assay to distinguish field strains and attenuated strains of porcine epidemic diarrhea virus[J]. Archives Virology, 2016, 161(9): 2543-2547.

[11] Ding G, Fu Y, Li B, et al. Development of a multiplex RT-PCR for the detection of major diarrhoeal viruses in pig herds in China[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2020, 67(2): 678-685.

[12] Miller L C, Crawford K K, Lager K M, et al. Evaluation of two real-time polymerase chain reaction assays for Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) to assess PEDV transmission in growing pigs[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2016, 28(1): 20-29.

[13] 胡丽萍, 何奇松, 许瑞胜, 等. 猪流行性腹泻病毒一步法 RT-PCR 检测方法的建立与初步应用[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2018 (1): 12-14.

[14] 吴学敏, 陈如敬, 王隆柏, 等. 猪流行性腹泻病毒 RT-PCR 检测方法建立及初步应用研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(26): 59-62.

[15] 赵攀登, 赵胜杰, 王岩, 等. 猪流行性腹泻病毒变异毒株与传统毒株 RT-PCR 鉴别诊断方法的建立[J]. 中国动物传染病学报, 2019, 27(6): 94-98.

[16] Nan P, Wen D, Opriessnig T, et al. Novel universal primer-pentaplex PCR assay based on chimeric primers for simultaneous detection of five common pig viruses associated with diarrhea [J]. Molecular and Cellular Probes, 2021, 58: 101747.

[17] Wang Z L, Li X R, Shang Y J, et al. Rapid differentiation of PEDV wild-type strains and classical attenuated vaccine strains by fluorescent probe-based reverse transcription recombinase polymerase amplification assay [J]. BMC Veterinary Research, 2020, 16(1): 208.

[18] Lee C. Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus [J]. Virology Journal, 2015, 12: 193.

[19] 于学武, 王珊珊, 曹明慧, 等. 猪流行性腹泻病毒一步法 RT-PCR 检测方法的建立与初步应用[J]. 饲料工业, 2015, 36(10): 53-56.

[20] 南沛, 刘高鹏, 戴小燕, 等. 猪流行性腹泻病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 浙江理工大学学报 (自然科学版), 2021, 45(5): 711-716.

[21] 李飞, 曾喻兵, 江朝源, 等. 猪流行性腹泻病毒 SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立与应用 [J]. 中国兽医科学, 2021, 51(11): 1355-1360.

[22] Jiang C Y, He H J, Zhang C Y, et al. One-step triplex

reverse-transcription PCR detection of porcine epidemic diarrhea virus, porcine sapelovirus, and porcine sapovirus [J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2019, 31(6): 909-912.

[23] Cui J T, Qiao H, Hou C Y, et al. Characteristics of the spike and ORF3 genes of porcine epidemic diarrhea virus in Henan and Shanxi provinces of China [J]. Archives of Virology, 2020, 165(10): 2323-2333.

[24] 常新见, 周金柱, 殷杰, 等. 2017-2019 年华东地区猪场主要病毒性腹泻病原调查[J]. 畜牧兽医学报, 2020, 51(12): 3141-3150.

[25] Zhang Q, Hu R, Tang X, et al. Occurrence and investigation of enteric viral infections in pigs with diarrhea in China[J]. Archives of virology, 2013, 158(8): 1631-1636.

[26] 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.

(责任编辑:张会巍)