

猪急性腹泻综合征病毒 RT-PCR 检测方法的建立及应用

司广斌, 陈志飞, 梁文清, 陈一波, 贺东生

(华南农业大学兽医学院, 广东广州 510642)

摘要: 为建立一种鉴定猪急性腹泻综合征病毒 (SADS-CoV) 的 RT-PCR 方法, 根据 NCBI 登录的 SADS-CoV *N* 基因保守区域序列, 设计了 3 对引物 (P1、P2 和 P3), 通过对 SADS-CoV 及其他 6 种病毒进行检测, 筛选出最合适的引物, 然后对退火温度、引物浓度、dNTPs 浓度、*rTaq* DNA 聚合酶浓度和循环次数等反应条件进行了优化。结果显示, P3 引物对 SADS-CoV 特异性最好, 与其他病毒无交叉反应。敏感性试验显示, 该方法最低检测限可达 9.55×10^2 copies/ μL ; 重复性试验显示该方法重复性良好。运用建立的 RT-PCR 方法, 对广东省的 21 份临床样品进行检测, 结果检出 SADS-CoV 阳性样品 4 份, 阳性样品的测序结果与其 RT-PCR 完全一致。结果表明, 本研究成功建立了一种鉴定 SADS-CoV 的 RT-PCR 方法, 且该方法具有检测快速、成本廉价、特异性强、敏感性高和重复性好的优点, 可以用于 SADS-CoV 的临床诊断。

关键词: 猪急性腹泻综合征病毒; *N* 基因; RT-PCR; 诊断

中图分类号: S855.3 文献标识码: B 文章编号: 1005-944X (2020) 11-0076-06

DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2020.11.015 开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Establishment and Application of a RT-PCR Assay for Detection of Porcine Acute Diarrhea Syndrome Coronavirus

Si Guangbin, Chen Zhifei, Liang Wenqing, Chen Yibo, He Dongsheng

(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

Abstract: In order to establish a RT-PCR assay for detection of porcine acute diarrhea syndrome virus (SADS-CoV), three pairs of primers (P1, P2 and P3) were designed based on *N* gene sequence of SADS-CoV registered in NCBI, and the most appropriate primer was selected through the detection of SADS-CoV and other six kinds of viruses, followed by the optimization of reaction conditions including annealing temperature, primer concentration, dNTPs concentration, *rTaq* DNA polymerase concentration, cycle index, etc. The results showed that P3 primer was with the best specificity against SADS-CoV, and failed to react with other viruses. It was shown that, by sensitivity test, the lowest detection limit was 9.55×10^2 copies/ μL ; the established assay was with good repeatability as tested. 21 clinical samples from Guangdong were detected by the RT-PCR assay, 4 positive samples were found, which was consistent with the sequencing results. Therefore, a RT-PCR assay was successfully established for detection of SADS-CoV, which was characterized by rapid detection, low cost, strong specificity, high sensitivity and good repeatability, and could be used for identification of SADS-CoV in practice.

Key words: SADS-CoV; *N* gene; RT-PCR; diagnosis

收稿日期: 2020-07-27 修回日期: 2020-09-05

基金项目: 广东省生猪产业体系疾病岗位资金资助项目

通信作者: 贺东生

2017年2月,广东省发生以急性呕吐和水样腹泻为主要症状的哺乳仔猪严重疫情,但临床中均未检测到与猪腹泻相关的病毒。经过病原分离鉴定,最终确认疫情由1种新型猪肠道冠状病毒(swine enteric alphacoronavirus, SeACoV)引起,而该冠状病毒与已报道的蝙蝠冠状病毒 HKU-2 株具有遗传关系^[1]。另一研究^[2]也得出同样结论,新型病毒与 HKU-2 株具有较高的氨基酸同源性(>90%),并将其命名为猪肠道 α 冠状病毒(porcine enteric alphacoronavirus, PEAV),随后,Zhou等^[3]将其命名为猪急性腹泻综合征病毒(swine acute diarrhea syndrome coronavirus, SADS-CoV)。

SADS-CoV属于冠状病毒科 α 冠状病毒属,是一种有包膜的、单股正链RNA病毒。其基因组大小约为2.7 kb,包含9个开放阅读框(ORFs),分别是非结构多聚蛋白ORF1a和ORF1b,结构蛋白Spike(S)、包膜蛋白(E)、膜蛋白(M)和核衣壳蛋白(N),以及辅助蛋白NS3a、NS7a和NS7^[1, 2, 4]。电镜下观察,病毒颗粒直径为100~120 nm,具有典型的冠状病毒表面投影^[1]。目前尚无证据表明SADS-CoV能够感染人类,但可感染蝙蝠、小鼠、大鼠、沙鼠、仓鼠、猪、鸡等非灵长类动物和人类等多种细胞系,所以监测该病毒是否具有跨物种传播的潜在威胁就显得尤为重要^[5]。2017年,SADS-CoV造成广东省24 693头仔猪死亡,2019年,SADS-CoV再次暴发,造成约2 000头仔猪死亡^[3, 6]。2018年,福建省也相继发现了SADS-CoV,表明病毒感染的范围正逐步扩大,对养猪业造成了严重威胁^[7-8]。人工感染试验表明,SADS-CoV对新生仔猪具有高致病性,可以引起新生仔猪腹泻,并且出现明显的肠道损伤^[9]。SADS-CoV既可单独感染,也可与猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)、猪德尔塔冠状病毒(porcine deltacoronavirus, PDCoV)、猪传染性胃肠炎病毒(porcine transmissible gastroenteritis virus, TGEV)和轮状

病毒(rotavirus, RV)混合感染^[10],所以建立一种简便、快速的SADS-CoV检测方法尤为重要。

RT-PCR检测方法因其快速、简便、特异性好和灵敏度高等特点而被广泛应用。本研究根据SADS-CoV的N基因,建立SADS-CoV的RT-PCR检测方法,并使用该方法进行SADS-CoV的快速筛选和疾病监测,以期对SADS-CoV的流行病学调查提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 主要试验材料及病料样品

SADS-CoV毒株,由本实验室从广东省某发生腹泻的猪场中鉴定并保存;TGEV、PDCoV、PEDV以及猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)、塞内加谷病毒(Seneca Valley virus, SVV)和猪捷申病毒(porcine teschovirus, PTV)等毒株,由本实验室分离鉴定并保存;21份临床待检样品,来自于2019年广东省某腹泻猪场的肠道组织。

1.2 主要试剂和仪器

RNA提取试剂盒,购自Axygen公司;DL 1 000 DNA Marker、Taq DNA聚合酶、dNTP、M-MLV反转录酶、DH5 α 感受态细胞、质粒提取试剂盒、pMD19-T克隆载体等,购自TakaRa公司;高速冷冻离心机,购自Eppendorf公司;Biometra TOne 96G热循环仪,购自Jena公司;凝胶成像系统,购自BioRed公司。

1.3 病料样品处理及模板制备

将肠道组织样品剪碎,加入PBS缓冲液充分研磨,反复冻融3次后8 000 r/min离心10 min;取200 μ L上清液,参照RNA提取试剂盒说明书提取病毒总RNA,-80 $^{\circ}$ C保存备用;用反转录试剂盒,将提取的RNA反转录成cDNA,-20 $^{\circ}$ C保存备用。

1.4 引物设计与特异性筛选

用MEG6.0对GenBank收录的12条SADS-CoV全基因组序列进行比对,根据其保守区域N

基因，用 Primer 5.0 软件设计 3 对特异引物 P1、P2、P3（表 1）。引物由睿博生物科技有限公司合成。以 SADS-CoV、TGEV、PDCoV、PEDV、PRRSV、SVV 和 PTV 等病毒的 cDNA 为模板，分别用上述 3 对引物在同等条件下进行 PCR 扩增，从中选出特异性强、扩增效率高的引物，用于 SADS-CoV RT-PCR 检测方法的建立。

表 1 SADS-CoV N 基因保守区域引物设计

引物名称	引物序列	扩增长度 /bp
P1	P1-F: 5'-CCATTGTCACCTCTTTGCG-3'	356
	P1-R: 5'-GTCAGGTCTGGTGGTAATTG-3'	
P2	P2-F: 5'-CACTCCAGATCAACAGATTG-3'	313
	P2-R: 5'-CGAGACTGTGAACGTGAAGC-3'	
P3	P3-F: 5'-CAGATTGGTTATTGGGTTG-3'	316
	P3-R: 5'-GACTTTGATTGCGAGAAC-3'	

1.5 重组质粒构建

以 SADS-CoV 阳性 cDNA 为模板，使用特异性检测引物进行 PCR 扩增；PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定，用胶回收试剂盒回收目的片段；将目的片段克隆至 pMD19-T 载体，并转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞，筛选出阳性克隆接入含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中，37 $^{\circ}$ C 培养 8 h；用质粒提取试剂盒提取重组质粒，送睿博生物有限公司测序验证。

1.6 PCR 扩增反应条件优化

PCR 反应体系为 25 μ L：2.5 μ L 的 10 \times PCR buffer，2.0 μ L 的 dNTPs 混合物（2.5 mmol/L），各 1.0 μ L 的上、下游引物，0.5 μ L 的 rTaq DNA 聚合酶，2 μ L 的 cDNA 模板溶液（10.0 ng/ μ L）和 16.0 μ L 的无核酸酶水。以无核酸酶的水为模板作为阴性对照。PCR 反应程序为：95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min；95 $^{\circ}$ C 变性 30 s，55 $^{\circ}$ C 退火 30 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 25 s，30 个循环；最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。以上为初始 PCR 体系组成部分及反应程序。通过优化单一变

量，其他条件不变，针对先行优化的反应条件，选择出最优结果后，直接将其运用到下一反应条件继续优化。所有优化条件的 PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭（EB）染色，在凝胶成像系统上观察结果，以最亮的靶条带作为最优结果。

1.6.1 退火温度优化 固定其他条件不变，设置 44、46、48、50、52、54、56 和 58 $^{\circ}$ C 共 8 个温度梯度，应用上述反应条件分别进行 PCR 扩增。

1.6.2 引物浓度优化 筛选出最佳退火温度后，固定体系内其他变量，进行引物浓度优化。设置 0.04、0.08、0.16、0.20、0.24、0.28、0.32 和 0.36 μ mol/L 共 8 个引物混合浓度梯度，应用上述优化后反应条件分别进行 PCR 扩增。

1.6.3 rTaq DNA 聚合酶浓度优化 设置 0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12、0.14 和 0.16 U/ μ L 共 8 个 rTaq DNA 聚合酶浓度梯度，应用上述优化后反应条件分别进行 PCR 扩增，根据扩增效果确定最佳浓度。

1.6.4 dNTPs 混合物浓度优化 设置 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35 和 0.40 mmol/L 共 8 个 dNTPs 混合物浓度梯度，应用上述优化后反应条件分别进行 PCR 扩增，确定最优浓度。

1.6.5 循环次数优化 设置 15、20、25、30、35、40 共 6 个循环次数梯度，应用上述优化后反应条件分别进行 PCR 扩增，确立最佳循环次数。

1.7 敏感性试验

测定重组质粒浓度并换算成拷贝数，对其进行 10 倍系列稀释后，分别作为模板，利用优化后的 RT-PCR 进行扩增，确定该方法的敏感性。

1.8 重复性试验

分别提取不同批次的 3 个阳性样品，每个样品 3 个重复，进行 3 次重复测定，验证 RT-PCR 的可靠性。

1.9 临床检测

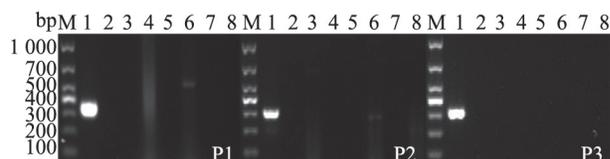
使用 RNA 提取试剂盒提取 21 份病料样品总

RNA, 利用建立的 RT-PCR 方法进行检测, 并以 SADS-CoV 提取的 RNA 作为阳性对照。RT-PCR 产物以 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

2 结果

2.1 特异性扩增引物的选择

以 SADS-CoV 的阳性质粒、TGEV、PDCoV、PEDV、PRRSV、SVV 和 PTV 等病毒的 cDNA 为模板, 同时以无菌水做阴性对照, 分别用 P1、P2 和 P3 引物对扩增, 扩增产物分别为 356、313 和 316 bp (图 1)。3 对引物对中, 只有引物对 P3 能够特异性地以 SADS-CoV cDNA 为模板扩增出 316 bp 的单一目的条带, 并且其他病毒 cDNA 均无特异性扩增条带。由此可知 P3 引物对特异性好, 因此选择 P3 引物对作为本研究的扩增引物。



M. DL 1 000 DNA Marker; 1. SADS-CoV; 2. TGEV; 3. PDCoV; 4. PEDV; 5. PRRSV; 6. SVV; 7. PTV; 8. 阴性对照。

图 1 引物特异性鉴定结果

2.2 PCR 反应条件优化

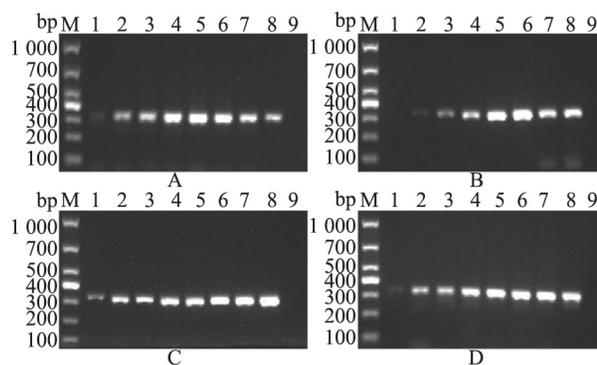
2.2.1 退火温度优化 固定其他试剂浓度及反应条件不变, 对特异性引物的退火温度进行优化, 随着退火温度升高, 目的条带亮度先增强然后逐渐减弱, 在退火温度为 52 °C 时, 电泳条带最亮, 扩增效率最高 (图 2-A)。

2.2.2 引物浓度优化 在上述最佳退火温度下, 通过对上、下游引物不同浓度的优化, 确定当上、下游引物浓度各为 0.28 $\mu\text{mol/L}$ 时, 扩增效率最高 (图 2-B)。

2.2.3 *rTaq* DNA 聚合酶浓度优化 设置 8 个 *rTaq* DNA 聚合酶浓度, 当 *rTaq* DNA 聚合酶浓度为 0.12 U/ μL 及以上时, 扩增效率趋于一致, 条带无显著性差异。因此确定最佳 *rTaq* DNA 聚合酶浓度

为 0.12 U/ μL (图 2-C)。

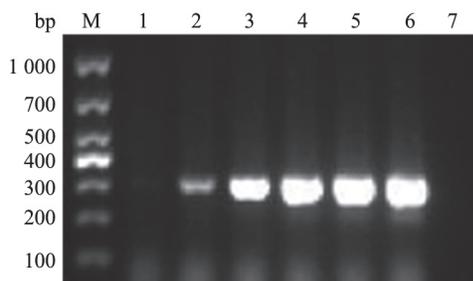
2.2.4 dNTPs 浓度优化 通道 5~8 均拥有相等亮度的目标条带 (图 2-D), 因此确定最佳 dNTPs 浓度为 0.25 mmol/L。



M. DL 1 000 DNA Marker; A: 1~8. 退火温度分别为 44、46、48、50、52、54、56、58 °C; 9. 阴性对照。B: 1~8. 引物浓度分别为 0.04、0.08、0.16、0.20、0.24、0.28、0.32 和 0.36 $\mu\text{mol/L}$; 9. 阴性对照。C: 1~8. *rTaq* DNA 聚合酶浓度分别为 0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12、0.14 和 0.16 U/ μL ; 9. 阴性对照。D: 1~8. dNTP 浓度分别为 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40 mmol/L; 9. 阴性对照。

图 2 退火温度、引物浓度、*rTaq* DNA 聚合酶和 dNTP 浓度的优化结果

2.2.5 循环次数 随 PCR 反应循环次数增加, 目标条带亮度逐渐增加, 当循环次数为 35 和 40 时, 条带亮度趋于一致, 因此最佳循环次数确定为 35 (图 3)。

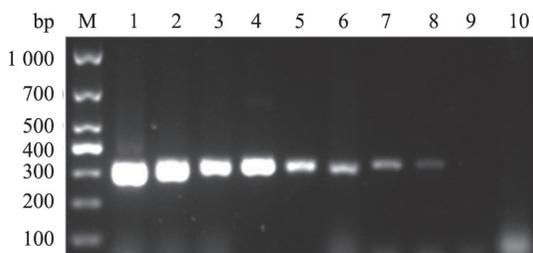


M. DL 1 000 DNA Marker; 1~6. 循环次数分别为 15、20、25、30、35、40; 7. 阴性对照。

图 3 最佳循环次数优化结果

2.3 敏感性试验

利用分光光度计测定重组质粒浓度为 31.5 ng/ μL , 换算为拷贝数 9.55×10^9 copies/ μL 。将重组质粒进行 10 倍倍比稀释后作为模板, 利用建立的 RT-PCR 方法进行检测。结果显示, 该方法最低检测限可达 9.55×10^2 copies/ μL (图 4)。

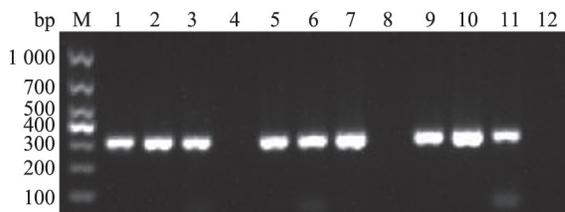


M. DL 1 000 DNA Marker ; 1~9. $9.55 \times 10^9 \sim 9.55 \times 10^1$ copies/ μ L ; 10. 阴性对照。

图4 RT-PCR 方法的敏感性试验结果

2.4 重复性试验

以 SADS-CoV cDNA 为模板，同一批次选取 3 个样品，进行 3 次重复性检验。结果显示（图 5），9 次扩增产物的电泳条带大小、亮度均一致，表明该方法重复性良好。



M. DL 1 000 DNA Marker ; 1~3、5~7 和 9~11. 不同批次样品的 3 个重复；4、8 和 12. 阴性对照。

图5 RT-PCR 的重复性试验结果

2.5 临床样品检测

将 21 份临床样品进行 RNA 提取后反转录为 cDNA，再用 RT-PCR 方法进行检测，检测结果（图 6）显示阳性 4 份、阴性 17 份，阳性率为 19.05%（4/21）。将 SADS-CoV 阳性样本的扩增产物进行测序，证实目的条带均为 SADS-CoV N 基因的特异性片段。测序分析结果和 RT-PCR 结果完全一致，进一步验证了建立的 RT-PCR 检测方法的特异性和准确性。



M. DL 1 000 DNA Marker ; 1~21. 临床样品； 22. 阳性对照； 23. 阴性对照。

图6 临床样品检测结果

3 讨论

SADS-CoV 是 2017 年在广东省发现的一种新型猪肠道冠状病毒，且已在广东省引起了两次严重疫情。回顾性调查表明，2016 年 8 月 SADS-CoV 就已经在猪群中存在^[10]，表明 SADS-CoV 在广东省已经存在较长一段时间。截至目前，该病还未在其他国家发现，因此需要进行适当规划和实施来防止 SADS-CoV 跨境传播。由于该病症状与其他病毒造成的腹泻相似，因此在临床检测中仅凭临床症状很难区分，使得诊断具有挑战性，需要借助实验室诊断。基于 TaqMan 和 SYBR 染料的实时荧光 RT-PCR 方法已经被用于 SADS-CoV 检测^[11-12]，但是该方法的应用受到 qPCR 仪器限制。实时逆转录环介导等温扩增（RT-LAMP）检测 SADS-CoV 的方法也已经建立^[13]。该方法可以用于 SADS-CoV 快速检测，但是相关酶的价格昂贵，不适用于大量样品检测。为避免 SADS-CoV 的广泛流行及减少相应经济损失，开发一种适用于大多数常规实验室的高灵敏度检测方法具有重要意义。

RT-PCR 技术是一种成熟的核酸扩增技术，自发明以来在病毒检测中得到了广泛应用。目前，该方法在动物病毒检测中仍发挥着重要作用，如诺如病毒和 TGEV 等^[14-15]。该方法具有耗时短、特异性好、灵敏度高、成本低等优点，而且可以与基因测序相结合，通过排除错误扩增的产物来确认 SADS-CoV 核酸的存在，从而证实 SADS-CoV 感染。此外，扩增产物区域的任何保守突变都可以用于对分子流行病学研究。这种方法也允许回顾性的流行病学追踪。本研究建立了一种 RT-PCR 方法，可用于检测流行地区猪肠道组织和粪便样本中的 SADS-CoV。

N 基因是 SADS-CoV 序列中保守的区域，本试验比对了 SADS-CoV 的 N 基因，设计了 3 对引物，从中筛选出最佳特异性扩增引物 P3，用于建立 SADS-CoV RT-PCR 检测方法。随后，对反应条件和反应体系进行了优化，包括退火温度、引物浓

度、*rTaq* DNA 聚合酶浓度、dNTPs 浓度和循环次数。5 种反应条件的优化使该方法敏感性提高, 成本降低, 也避免了添加多余成分造成的不利影响和不必要浪费。SADS-CoV RT-PCR 方法检测限量可达 9.55×10^2 copies/ μ L; 并且样品的批内和批间重复性试验均能良好地扩增出目的条带, 表明重复性良好。同时, 对临床检测为阳性的样品进行测序分析, 发现测序结果与 GenBank 已发表核苷酸序列同源性为 100%, 进一步验证了该方法的可靠性。因此, 本研究建立的 RT-PCR 方法快速、灵敏、可靠、经济, 可用于实验室猪肠道组织和粪便样本中 SADS-CoV 检测、SADS-CoV 感染监测以及流行病学研究。

参考文献:

- [1] PAN Y F, TIAN X Y, QIN P, et al. Discovery of a novel swine enteric alphacoronavirus (SeACoV) in southern China[J]. *Veterinary microbiology*, 2017 (211): 15-21.
- [2] GONG L, LI J, ZHOU Q, et al. A new bat-HKU2-like coronavirus in swine, China, 2017[J]. *Emerging infectious diseases*, 2017, 23 (9): 1607-1609.
- [3] ZHOU P, FAN H, LAN T, et al. Fatal swine acute diarrhoea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin[J]. *Nature*, 2018, 556 (7700): 255-258.
- [4] FU X L, FANG B, LIU Y X, et al. Newly emerged porcine enteric alphacoronavirus in southern China: Identification, origin and evolutionary history analysis[J]. *Infection, genetics and evolution*, 2018 (62): 179-187.
- [5] YANG Y L, QIN P, WANG B, et al. Broad cross-species infection of cultured cells by bat HKU2-related swine acute diarrhoea syndrome coronavirus and identification of its replication in murine dendritic cells in vivo highlight its potential for diverse interspecies transmission[J]. *Journal of virology*, 2019, 93 (24): e01448-19.
- [6] ZHOU L, LI QN, SU J N, et al. The re-emerging of SADS - CoV infection in pig herds in southern China[J]. *Transboundary and emerging diseases*, 2019, 66 (5): 2180-2183.
- [7] LI K, LI H, BI Z, et al. Complete genome sequence of a novel swine acute diarrhoea syndrome coronavirus, CH/FJWT/2018, isolated in Fujian, China, in 2018[J]. *Microbiology resource announcements*, 2018, 7 (22): e01259-18.
- [8] 张誉瀚, 袁为锋, 张帆帆, 等. 2018 年江西及福建省新现猪急性腹泻冠状病毒的分子流行病学调查 [J]. *养猪*, 2019 (4): 113-117.
- [9] XU Z C, ZHANG Y, GONG L, et al. Isolation and characterization of a highly pathogenic strain of porcine enteric alphacoronavirus causing watery diarrhoea and high mortality in newborn piglets[J]. *Transboundary and emerging diseases*, 2019, 66 (1): 119-130.
- [10] ZHOU L, SUN Y, LAN T, et al. Retrospective detection and phylogenetic analysis of swine acute diarrhoea syndrome coronavirus in pigs in southern China[J]. *Transboundary and emerging diseases*, 2019, 66 (2): 687-695.
- [11] ZHOU L, SUN Y, WU J L, et al. Development of a *TaqMan*-based real-time RT-PCR assay for the detection of SADS-CoV associated with severe diarrhoea disease in pigs[J]. *Journal of virological methods*, 2018 (255): 66-70.
- [12] MA L, ZENG F W, CONG F, et al. Development of a SYBR green-based real-time RT-PCR assay for rapid detection of the emerging swine acute diarrhoea syndrome coronavirus[J]. *Journal of virological methods*, 2019 (265): 66-70.
- [13] WANG H N, CONG F, ZENG F W, et al. Development of a real time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method (RT-LAMP) for detection of a novel swine acute diarrhoea syndrome coronavirus (SADS-CoV) [J]. *Journal of virological methods*, 2018, 260: 45-48.
- [14] MOREIRA J, RODRIGUES D M, GILIOLI R, et al. A semi-nested RT-PCR assay for detection of norovirus in rat fecal samples[J]. *Experimental animals*, 2019, 68(2): 169-176.
- [15] 王黎, 李碧, 周远成, 等. 猪传染性胃肠炎病毒 RT-PCR 检测方法的建立及临床应用 [J]. *中国兽医学报*, 2015, 35 (2): 190-194.

(责任编辑: 高向向)