2022 年第 39 卷第 11 期

云南省部分地区牛冠状病毒检测及其 *N* 基因序列分析

张松梅[1]，王鑫文[2]，代　琦[2]，邓成松[1]，鲁金强[1]，余世祥[1]，吴绍伟[1]，张以芳[2]，柴　俊[2]

（1. 德宏州尚善品味农业有限公司，云南梁河　679200；
2. 云南农业大学动物医学院，云南昆明　650201）

摘　要：为深入了解云南省牛冠状病毒（bovine coranarirus，BCoV）在不同地区、不同年龄牛群中的流行情况，2021—2022 年采集大理、陆良、石林、寻甸等 4 个地区 5 家牛场不同年龄牛的粪便样品 357 份（腹泻样品 61 份、非腹泻样品 296 份）进行 BCoV RT-PCR 检测，并对 BCoV 阳性样品进行 *N* 基因测序分析。结果显示：在 357 份粪便样品中，检出 BCoV 阳性 51 份，总样品检出率为 14.29%，5 家牛场均有阳性检出，场阳性率为 100%；1 周龄、1 周龄—1 月龄、1~6 月龄、1 岁以上牛粪便样品的 BCoV 检出率分别为 10.00%、19.23%、10.81%、17.31%；腹泻样品 BCoV 检出率为 36.07%，非腹泻样品为 9.78%。通过扩增得到 4 条完整的 BCoV *N* 基因序列；经同源性与遗传进化分析，4 条 *N* 基因序列高度保守，相互间核苷酸同源性为 99.0%~99.8%，与国内参考毒株处于同一小分支，亲缘关系近，核苷酸同源性为 97.7%~99.9%，与美国 4-17-03、7-16-23、4-17-25 和日本 GF2020 等毒株处于同一个大分支且遗传距离较近；与美国原始毒株 Mebus 处于不同的大分支，亲缘关系较远，核苷酸同源性为 98.1%~98.2%。结果表明：云南省牛群中可能广泛存在 BCoV 流行，1 周龄—1 月龄犊牛感染发病风险最高，调运或引种导致 BCoV 在国内传播的可能性较大。因此，需加强 BCoV 流行的监测与控制，严格进行检疫，加快疫苗研发和应用。

关键词：牛冠状病毒；流行病学调查；*N* 基因
中图分类号：S852.65　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1005-944X（2022）11-0035-06
DOI：10.3969/j.issn.1005-944X.2022.11.007　　**开放科学（资源服务）标识码（OSID）**：

Detection of Bovine Coronavirus and Analysis on Its *N* Gene Sequence in Some Areas of Yunnan Province

Zhang Songmei[1]，Wang Xinwen[2]，Dai Qi[2]，Deng Chengsong[1]，Lu Jinqiang[1]，
Yu Shixiang[1]，Wu Shaowei[1]，Zhang Yifang[2]，Chai Jun[2]

（1. Dehong Prefecture Shangshan Taste Agriculture Co.，Ltd.，Lianghe，Yunnan　679200，China；
2. College of Veterinary Medicine，Yunnan Agricultural University，Kunming，Yunnan　650201，China）

Abstract：In order to investigate the prevalence of bovine coronavirus（BCoV）in different regions and cattle population at different ages in Yunnan Province，357 fecal samples（61 diarrhea and 296 non-diarrhea samples）were collected from the cattle at different ages in 5 farms in Dali，Luliang，Shilin and Xundian from 2021 to 2022

收稿日期：2022-09-11　**修回日期**：2022-09-27
基金项目：德宏州基层专家工作站项目；云南农业大学德宏养瑞牛科技小院项目；
云南农业大学兽医公共卫生省创新团队项目（202105AE160014）
同等贡献作者：张松梅，王鑫文
通信作者：柴　俊。E-mail：1620728462@qq.com
张以芳。E-mail：zyfkm@qq.com

to detect BCoV by RT-PCR，followed by analysis on the *N* gene sequence for BCoV positive samples. The results showed that，for the 357 samples，51 positive samples were detected，with a total detection rate of 14.29%，and they were from all the 5 farms，with a farm positive rate of 100%；the detection rates of the samples from the cattle at 1 week old，1 week to 1 month old，1 to 6 months old and over 1 year old were 10.00%，19.23%，10.81% and 17.31% respectively；those of diarrhea and non-diarrhea samples were 36.07% and 9.78%，respectively. Four complete BCoV *N* gene sequences were obtained by amplification，which，by analysis on homology and genetic evolution，were highly conserved，with a nucleotide homology from 99.0% to 99.8%，locating at the same sub-branch with the domestic reference strain，with close genetic relationship and the nucleotide homology from 97.7% to 99.9%；they were at the same large branch with American strain 4-17-03，7-16-23，4-17-25 and Japanese strain GF2020，with a close genetic distance；but they were at different large branch with American original strain Mebus，with a distant genetic relationship and the nucleotide homology from 98.1% to 98.2%. In conclusion，BCoV might be widely prevalent in the cattle population in Yunnan Province，especially the calves at 1 week to 1 month old，which might be caused by transportation or introduction. Therefore，it was necessary to strengthen the monitoring，control and quarantine against the virus，and speed up the development and application of corresponding vaccines.

Key words：BCoV；epidemiological investigation；*N* gene

牛冠状病毒（bovine coronavirus，BCoV）是引起犊牛腹泻的常见病原。15 日龄内犊牛感染 BCoV 后死亡率较高，而成年牛多呈一过性或隐性感染，死亡率较低，但长期带毒。BCoV 可使感染牛群出现腹泻、产奶量下降、免疫力降低等问题，严重者甚至死亡，即使病愈也会对其生长、生产性能有一定负面影响，对养牛业造成较大经济损失。

BCoV 为单股正链 RNA 病毒，属于套病毒目冠状病毒科正冠状病毒亚科 β 冠状病毒属成员[3]，基因组全长 27~30 kb，包括 10 个开放阅读框（ORF1~10），两端是 5' 和 3' 非翻译区域。其中，ORF1 编码多聚蛋白 PPIA，ORF3、ORF4、ORF8、ORF9 和 ORF10 分别编码血凝素酯酶蛋白、刺突糖蛋白（S）、包膜蛋白（E）、膜蛋白（M）和核衣壳蛋白（N）等结构蛋白[4]，其中 *N* 基因较为保守，常用于检测引物设计和诊断试剂研发。

BCoV 在我国广泛存在[1-2，5，8-11]，但在其云南省的流行情况未见详细报道。本研究针对云南省部分地区规模化牛场和周边散养牛场不同年龄奶牛和肉牛样品进行 BCoV 检测及分子流行病学调查，以补充云南省 BCoV 分子流行病学数据及其遗传特征，从而为云南省牛 BCoV 感染防控提供参考。

1 材料与方法

1.1 病料来源与处理

样品来自 2021—2022 年云南省大理、陆良、石林、寻甸等 4 个地区 5 家牛场不同年龄牛的粪便样品 357 份（表 1），包括 61 份腹泻样品和 296 份非腹泻样品。取样品加入适量无菌 PBS 缓冲液稀释混匀，反复冻融 3 次，按照 RNA 提取试剂盒说明书进行病毒总 RNA 提取，根据反转录试剂盒说明书进行 cDNA 合成，并置于 −20 ℃保存备用。

表 1 2021—2022 年 4 个地区不同年龄牛粪便样品信息统计

单位：份

采样地点	种类	不同年龄牛采样数量				
		1 周龄	1 周龄—1 月龄	1~6 月龄	1 岁及上	合计
大理	奶牛	0	0	90	0	90
陆良（牛场 1）	奶牛	0	0	49	20	69
陆良（牛场 2）	奶牛	0	20	57	27	104
石林	奶牛	20	6	27	4	57
寻甸	肉牛	0	0	36	1	37
合计		20	26	259	52	357

1.2 主要试剂和仪器

RNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、核酸染料、DL 2 000 DNA Marker、DL 5 000 DNA Marker、2×Easy *Taq*SuperMix、感受态细胞 DH5α、PMD19-T 载体、AMP、IPTG、

X-gal，均购自北京全式金生物有限公司；LB 肉汤、LB 琼脂，购自青岛海博生物科技有限公司；试验所用仪器，均由云南农业大学动物医学院预防兽医实验室提供。

1.3 引物设计与合成

参考 GenBank 已公布的 BCoV 毒株（AF391542、EF424616、MN982199.1）序列，利用引物设计软件 Primer 5.0 和 oligo 7，针对 *N* 基因设计 1 对检测引物以及 1 对扩增完整 *N* 基因的引物。引物具体信息见表 2，由昆明擎科生物科技有限公司委托合成。

表 2 BCoV 引物信息

引物名称	序列（5'—3'）	扩增基因	扩增长度 /bp
BCoV-F	ATGAGGCTATTCCGACTAGGT	*N*	450
BCoV-R	TGGGTGCGATGTCTGCAAG		
BCoV N-F	CTTGGACACCGCATTGTTGAG	*N*	1 412（含 *N* 全基因 1 347 bp）
BCoV N-R	TGCCGACATAAGGTTCATTCTC		

1.4 样品 RT-PCR 检测与 BCoV *N* 基因测序

以 1.1 中处理好的 cDNA 为模板，用所设计的 BCoV 检测引物进行 PCR 扩增。反应体系 25.0 μL：2×Easy *Taq*SuperMix 12.5 μL，dH_2O 9.5 μL，BCoV 上下游检测引物各 1.0 μL，模板 1.0 μL。PCR 反应程序：94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 40 s，58.5 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 2 min，扩增 35 个循环。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。以 BCoV 检测为阳性的 cDNA 为模板，利用设计的 *N* 基因扩增引物进行 PCR 扩增，PCR 反应体系与检测相同。反应程序：94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 40 s；59 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 2 min，35 个循环。扩增产物经电泳后用胶回收试剂纯化，连接至 pMD19-T 载体，转化至 DH5α 感受态细胞中，经蓝白斑筛选，提取重组克隆质粒进行 PCR 鉴定，然后送昆明生工生物科技有限公司测序。对测序结果使用 DNAstar 软件剪切拼接，将拼接序列在 NCBI 上进行 BLAST 比对，用 DNAstar、MEGA 7.0 等软件进行同源性分析、遗传进化树绘制。

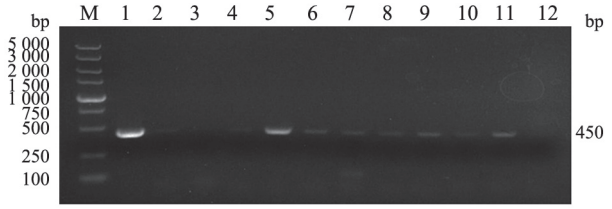
2 结果与分析

2.1 样品 RT-PCR 检测

通过 RT-PCR 方法对 357 份样品进行 BCoV 检测，共检出 51 份阳性样品，平均阳性检出率为 14.29%，4 个地区 5 家牛场均有阳性检出，阳性检出率为 11.53%~17.54%（表 3）。阳性样品扩增出与预期目的片段大小相符的 450 bp 条带，部分样品的 1% 琼脂糖凝胶电泳结果见图 1。

表 3 临床样品 BCoV 阳性检测结果统计

地区	检测样品数 / 份	阳性样品数 / 份	阳性检出率 /%
大理	90	12	13.33
陆良（牛场 1）	69	8	11.59
石林	57	10	17.54
陆良（牛场 2）	104	14	13.46
昆明	37	5	13.51
总计	357	51	14.29



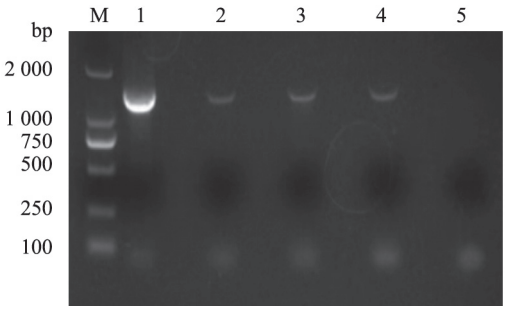
M. DL 5 000 DNA Marker；1~11. 样品；12. 阴性对照。

图 1 部分样品的 BCoV PCR 检测结果

不同年龄牛的样品中均检出 BCoV 阳性，其中，1 周龄—1 月龄犊牛的阳性检出率最高，为 19.23%（5/26），1 岁及以上次之，为 17.31%（9/52），1 周龄和 1~6 月龄相对偏低，分别为 10.00%（2/20）和 10.81%（28/259）。腹泻和非腹泻样品中均有 BCoV 阳性检出，其中腹泻样品阳性检出率为 36.07%（22/61），非腹泻样品为 9.78%（29/296）。

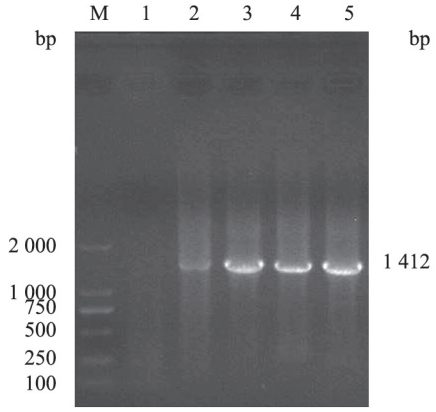
2.2 *N* 基因 PCR 扩增、克隆及鉴定

挑选各牛场最具代表性的 BCoV 阳性样品进行 *N* 基因扩增，结果成功扩增到 4 条长度为 1 412 bp 的 *N* 基因序列（BCoV-YN01、BCoV-YN02、BCoV-YN03、BCoV-YN04），经克隆鉴定与预期目的片段大小一致（图 2~3）。



M. DL 2 000 DNA Marker；1~4. 依次为 BCoV-YN01、BCoV-YN02、BCoV-YN03、BCoV-YN04；5. 阴性对照。

图 2　BCoV *N* 基因扩增结果



M. DL 2 000 DNA Marker；1~4. 依次为 BCoV-YN01、BCoV-YN02、BCoV-YN03、BCoV-YN04；5. 阴性对照。

图 3　BCoV *N* 基因克隆鉴定结果

2.3　*N* 基因序列分析

对测序序列进行拼接、剪切，获得 4 条长 1 347 bp 的完整 *N* 基因序列，分别为 BCoV-YN01-2021（大理）、BCoV-YN02-2021（陆良）、BCoV-YN03-2021（石林）、BCoV-YN04-2021（寻甸）。

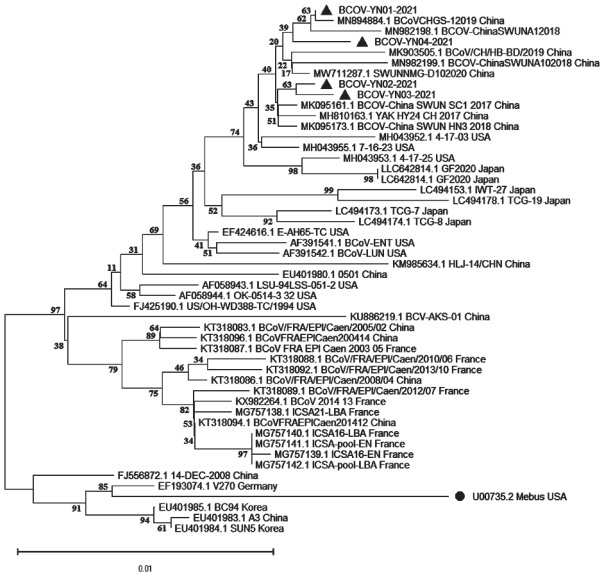
2.3.1　*N* 基因同源性及遗传进化分析　应用 DNAstar 软件中的 MegAlign 进行 4 条核苷酸序列及其推导氨基酸序列进行同源性分析，结果发现其同源性分别为 99.0%~99.8%、98.2%~100%。4 条 *N* 基因序列与 GenBank 中的 45 条（表 4）参考毒株 *N* 基因序列同源性为 97.7%~99.8%，氨基酸相似性为 97.3%~100%；与 15 条我国参考毒株核苷酸同源性为 97.7%~99.9%，氨基酸相似性为 98.0%~100%；与 Mebus 原始毒株核苷酸同源性为 98.1%~98.2%，氨基酸相似性为 98.4%~98.7%。将 4 条 *N* 基因序列与 GenBank 中 46 条各地区 BCoV 毒株 *N* 基因序列，用 MEGA 11 软件构建 NJ 进化树。从进化树（图 4）中可看出：4 条 *N* 基因序列与近几年的我国四川毒株构成一个小分支，亲缘关系较近；其中 BCoV-YN02-2021（陆良）和 BCoV-YN03-2021（石林）距离较近，BCoV-YN01-2021（大理）和 BCoV-YN03-2021（陆良）相距较远；4 条序列与美国 4-17-03、7-16-23、4-17-25 和日本 GF2020 等毒株处于同一个大分支且遗传距离较近，推测具有共同的祖先，与原始毒株 Mebus 处于不同的大分支且亲缘关系较远。

3　讨论

调查[2, 5-8]显示，BCoV 在我国广泛存在，各地 BCoV 抗原阳性率为 20%~35%。彭昊等[9]2020 年对广西 47 份粪便样品进行 RT-PCR 检测，发现 BCoV 检出率为 17%；何琪富[10]2019 年对青藏高原地区 336 份牦牛粪便进行 RT-PCR 检测，发现 BCoV 检出率为 69.05%；阿比克哈莫[11]2018 年用 PCR 法对我国 6 个省 14 个农场腹泻犊牛进行 BCoV 检测，发现平均检出率为 18.95%。本研究通过 RT-PCR 方法检测了云南省 4 个地区 5 家牛场牛的粪便样品，发现 BCoV 检出率为 11.53%~17.54%，平均为 14.29%。虽然本次检测的病毒阳性检出率比国内一些畜牧业大省低，但这 4 个地区 5 家牛场不同年龄牛的腹泻及非腹泻样品中均检出 BCoV 阳性，提示 BCoV 在云南省的流行范围可能较广，对云南省养牛产业发展构成了潜在威胁。本次检测发现，1 周龄—1 月龄犊牛 BCoV 检出率最高，为 19.23%，其原因可能与母源抗体下降而个体免疫机制不成熟有关；1 周龄和 1~6 月龄的牛群 BCoV 检出率最低，分别为 10.00% 和 10.81%，可能与 1 周龄阶段犊牛母源抗体较高，1~6 月龄阶段犊牛个体免疫机制逐渐成熟，对病毒免疫耐受有关；1 岁以上牛的 BCoV 检出率也较高（17.31%），可能与该年龄段牛群暴露于病毒的时间较长相关。由于奶牛发情、分娩前后机体免疫和荷尔蒙紊乱，分娩和产后 2 周时间内 BCoV 排

表 4　GenBank 中 BCoV 参考毒株信息

毒株名称	序列号	来源国家	分离年份	毒株名称	序列号	来源国家	分离年份
Mebus	U00735.2	美国	2003	YAK/HY24/CH/2017	MH810163.1	中国	2018
4-17-03	MH043952.1	美国	2018	BCoV-China/SWUN/HN3/2018	MK095173.1	中国	2018
4-17-25	MH043953.1	美国	2018	BCoV/CH/HB-BD/2019	MK903505.1	中国	2019
7-16-23	MH043955.1	美国	2018	BCV-AKS-01	KU886219.1	中国	2016
BCoV-ENT	AF391541.1	美国	2001	HLJ-14/CHN	KM985634.1	中国	2014
BCoV-LUN	AF391542.1	美国	2001	0501	EU401980.1	中国	2008
US/OH-WD388-TC/1994	FJ425190.1	美国	2008	A3	EU401983.1	中国	2008
LSU-94LSS-051-2	AF058943.1	美国	1998	BCoV/FRA/EPI/Caen/2005/02	KT318083.1	中国	2015
OK-0514-3 32	AF058944.1	美国	1998	BCoV/FRA/EPI/Caen/2008/04	KT318086.1	中国	2015
E-AH65-TC	EF424616.1	美国	2007	SWUN/NMG-D10/2020	MW711287.1	中国	2021
BCoV_2014_13	KX982264.1	法国	2016	BCoV/FRA/EPI/Caen/2014/12	KT318094.1	中国	2015
ICSA21-LBA	MG757138.1	法国	2018	BCoV/FRA/EPI/Caen/2004/14	KT318096.1	中国	2015
ICSA16-LBA	MG757140.1	法国	2018	14-DEC-2008	FJ556872.1	中国	2008
ICSA-pool-LBA	MG757142.1	法国	2018	TCG-8	LC494174.1	日本	2019
BCoV/FRA/EPI/Caen/2003/05	KT318087.1	法国	2015	IWT-27	LC494153.1	日本	2019
ICSA16-EN	MG757139.1	法国	2018	TCG-7	LC494173.1	日本	2019
ICSA-pool-EN	MG757141.1	法国	2018	GF2020	LC642814.1	日本	2021
BCoV/FRA/EPI/Caen/2010/06	KT318088.1	法国	20-2015	BC94	EU401985.1	韩国	2008
BCoV/FRA/EPI/Caen/2013/10	KT318092.1	法国	2015	SUN5	EU401984.1	韩国	2008
BCoV/FRA/EPI/Caen/2012/07	KT318089.1	法国	2015	BCO.44175	AH010063.2	加拿大	2000
BCoV/CH/GS-1/2019	MN894884.1	中国	2020	V270	EF193074.1	德国	2006
BCoV-China/SWUN/A1/2018	MN982198.1	中国	2020	BCoV-China/SWUN/A10/2018	MN982199.1	中国	2020



●为原始毒株；▲为本研究获得序列。

图 4　BCoV *N* 基因遗传进化树

出量也可能比平时增加 65%~71%，因此这或许也是该年龄段病毒检出率较高的原因。本研究从非腹泻样品也检出 BCoV 阳性，说明存在牛的 BCoV 隐性感染，这与已发表的研究 [11] 结果相符。

N 蛋白作为衣壳蛋白，可以使 BCoV 的复制与释放更加高效，同时基因序列高度保守，并且在原核表达系统中能稳定表达，在不同毒株中核苷酸序列同源性可达 98% 以上，因而 *N* 基因通常作为 PCR 检测和 ELISA 试剂盒研发的靶基因。本研究获得的 4 条 BCoV *N* 基因全核苷酸序列与国内外毒株相似性较高；在遗传进化树中与其他国内流行毒株聚拢，呈单独进化趋势。由此推测，云南流行毒株与国内其他流行毒株存在共同的祖先，病毒随各

省间的动物调运或引种在全国范围内传播。

4 结论

综上所述：云南省牛群中可能广泛存在 BCoV 流行，尤其是 1 周龄—1 月龄犊牛感染发病风险较高；云南流行毒株与国内流行毒株亲缘关系较近，提示存在病原跨地区传播风险。因此，需加强 BCoV 流行的监测与控制，严格进行检疫，加快疫苗研发和应用。

参考文献：

[1] 苗艳，朱庆贺，陈亮，等 . 牛冠状病毒流行病学和疫苗研究进展 [J]. 中国兽药杂志，2022，56（7）：89-94.

[2] 邓飞，陈弟诗，陈斌，等 . 2020 年四川省部分地区腹泻牛群牛冠状病毒感染情况调查 [J]. 中国动物检疫，2021，38（9）：13-16.

[3] KOURTESIS A B，GÉLINAS A M，DEA S. Genomic and antigenic variations of the HE glycoprotein of bovine coronaviruses associated with neonatal calf diarrhea and winter dysentery[J]. Archives of virology，2001，146（6）：1219-1230.

[4] CHO K O，HASOKSUZ M，NIELSEN P R，et al. Cross-protection studies between respiratory and calf diarrhea and winter dysentery coronavirus strains in calves and RT-PCR and nested PCR for their detection[J]. Archives of virology，2001，146（12）：2401-2419.

[5] 杨海峰，粟灵琳，王婧，等 . 我国 14 省市呼吸道综合征患牛冠状病毒感染的检测 [J]. 畜牧与兽医，2019，51（11）：92-6.

[6] 魏硕佟，谢婧，熊新雪，等 . 牛呼吸道病毒多重 PCR 检测方法的建立及应用 [J]. 中国兽医学报，2021，41（11）：2126-2131.

[7] 邓飞，陈弟诗，陈斌，等 . 2020 年四川省部分地区腹泻牛群牛冠状病毒感染情况调查 [J]. 中国动物检疫，2021，38（9）：13-16.

[8] 赵霞玲，牛家强，次仁央金，等 . 牦牛腹泻病毒 BVDV、BCV、BRV 流行病学调查 [J]. 高原农业，2020，4（3）：298-302.

[9] 彭昊，吴翠兰，李军，等 . 广西部分地区牛腹泻病例的冠状病毒检测与分析 [J]. 动物医学进展，2020，41（11）：122-124.

[10] 何琪富 . 牦牛冠状病毒的分子检测及基因组研究 [D]. 成都：西南民族大学，2019.

[11] 阿比克哈莫 . 奶牛冠状病毒的分子检测、基因组特征及 ELISA 试剂盒的研制 [D]. 成都：西南民族大学，2019.

[11] MARTIN S W，NAGY E，SHEWEN P E，et al. The association of titers to bovine coronavirus with treatment for bovine respiratory disease and weight gain in feedlot calves[J]. Canadian journal of veterinary research，1998，62（4）：257.

（责任编辑：朱迪国）