



## 鉴别猪流行性腹泻病毒基因型的一步法双重 qRT-PCR

何海健<sup>1\*</sup> 吴媛<sup>1\*</sup> 刘正奎<sup>2</sup> 王志鹏<sup>2</sup> 陈琳<sup>2</sup> 王磊<sup>2</sup> 宋厚辉<sup>2</sup> 王晓杜<sup>2\*\*</sup>

1 金华职业技术学院 农业与生物工程学院, 金华 321007; 2 浙江农林大学 动物科技学院/浙江省畜禽绿色生态健康养殖应用技术研究重点实验室/动物健康互联网检测技术浙江省工程实验室, 杭州, 311300

\*同等贡献作者

\*\*通讯作者, [xdwang@zafu.edu.cn](mailto:xdwang@zafu.edu.cn)

**摘要** 猪流行性腹泻病毒(*Porcine epidemic diarrhea virus*, PEDV)是目前导致猪(*Sus scrofa domestica*)群严重腹泻的主要病原体之一,临床中危害最严重的是PEDV变异毒株(G II型)。建立快速准确的诊断方法可鉴别临床上PEDV的基因型,有利于开展不同基因型的PEDV防控。本研究针对PEDV的纤突蛋白(spike, S)基因N端的相对保守区设计1对引物,同时针对变异毒株(G II型)和经典毒株(G I型)的差异区域设计2个探针,探针采用5-羧基荧光素(5-carboxyfluorescein, FAM)(G II型)和5-六氯荧光素氨基磷酸酯(5-hexachloro-fluorescein hosphoramidite, HEX)(G I型)荧光信号分别标记,通过扩增条件摸索、特异性、敏感性、重复性等实验,建立一种基于探针的一步法双重qRT-PCR检测技术,用于鉴别猪流行性腹泻病毒的不同基因型。结果显示:本研究建立了该方法的标准曲线,该方法在 $10^1\sim 10^8$ 拷贝数/ $\mu\text{L}$ 范围内,检测G II毒株( $R^2=0.9892$ )和G I型毒株( $R^2=0.9914$ )具有较好的扩增效率, $C_t$ 值与浓度之间具有较好线性关系;检测灵敏度分别为G II毒株7.34拷贝数/ $\mu\text{L}$ 和 $2.3\times 10^2$ 半数组织培养感染剂量(tissue culture infective dose,  $TCID_{50}$ )/0.1 mL、G I型毒株4.32拷贝数/ $\mu\text{L}$ 和 $4.3\times 10^3$   $TCID_{50}$ /0.1 mL;G I型和G II型之间没有交叉反应,且与猪 $\delta$ 冠状病毒(*Porcine deltacoronavirus*, PDCoV)、猪传染性胃肠炎病毒(*Transmissible gastroenteritis virus*, TGEV)、猪瘟病毒(*Classic swine fever virus*, CSFV)、猪轮状病毒(*Porcine rotavirus*, RV)、日本脑炎病毒(*Japanese encephalitis virus*, JEV)及猪细小病毒(*Porcine parvovirus*, PPV)等病毒核酸之间没有交叉反应,特异性较好;组间和组内变异系数低,重复性好;临床样品检测结果与病毒分离方法符合率为100%。本研究为临床疑似PEDV感染病料的检测提供快速准确的鉴别方法,并可确定其基因型,为防控该病提供技术支持。

**关键词** 猪流行性腹泻病毒(PEDV), TaqMan 探针, qRT-PCR, 基因型

中图分类号 S885.3 文献标识码 A

## A Single-step Duplex qRT-PCR for the Identification of *Porcine epidemic diarrhea virus* Genotypes

HE Hai-Jian<sup>1\*</sup> WU Yuan<sup>1\*</sup> LIU Zheng-Kui<sup>2</sup> WANG Zhi-Peng<sup>2</sup> CHEN Lin<sup>2</sup> WANG Lei<sup>2</sup> SONG Hou-Hui<sup>2</sup> WANG Xiao-Du<sup>2\*\*</sup>

1 School of Agricultural and Biological Engineering, Jinhua Polytechnic, Jinhua 321007, China; 2 College of Animal Science and Technology, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, China; 3 Key Laboratory of Applied Technology on Green-Eco-Healthy Animal Husbandry of Zhejiang Province, Hangzhou 311300, China; 4 Zhejiang Provincial Engineering Laboratory for Animal Health Inspection and Internet Technology, Hangzhou 311300, China

基金项目:浙江省自然科学基金(No. LY16C180001)、金华市重点研发计划农业类项目(No. 2016-2-013 和 No. 2018-2-004)和浙江省科技重点研发计划项目(No. 2018C02028)

收稿日期:2019-01-27 接受日期:2019-04-15

\* The authors who contribute equally

\*\* Corresponding author, xdwang@zafu.edu.cn

**Abstract** *Porcine epidemic diarrhea virus* (PEDV) is one of the important pathogens that affect severe diarrhea in 3~10 day-old piglets (*Sus scrofa domestica*). Now the variant strain (G II type) causes serious loss in farms. In order to differentiate the genotypes of PEDV, a rapid and accurate diagnostic method is established and used to detect PEDV from clinical diarrhea samples, those are advantageous to the prevention and control of these diseases. In this study, a pair of primers based the N-terminal domain of the PEDV S gene were designed, and 2 probes were designed in the light of the different regions of PEDV spike gene (S) from the variant strains (G II) and the classical strains (G I). The 5' end of those probes were individually marked by 5-carboxyfluorescein (FAM) (G II) and 5-hexachloro-fluorescein phosphoramidite (HEX) (G I) fluorescent signals. One single-step duplex qRT-PCR based on specific probes was established to distinguish different genotypes of PEDV by experiments on amplification conditions, specificity, sensitivity, repeatability, and so on. Firstly, the standard curves were established. Within the range of  $10^{-1}$ ~ $10^8$  copies/ $\mu$ L, this method showed good amplification efficiency for G II strain ( $R^2=0.9892$ ) and G I strain ( $R^2=0.9914$ ), and there was a good linear relationship between Ct value and concentration as well. Secondly, the sensitivity was 7.34 copies/ $\mu$ L or  $2.3 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub> (tissue culture infective dose)/0.1 mL for G II strain, 4.32 copies/ $\mu$ L or  $4.3 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/0.1 mL for G I strain, respectively. Thirdly, there was no cross-reaction between G II and G I strains, in addition between PEDV and other pathogens about *Porcine deltacoronavirus* (PDCoV), *Classic swine fever virus* (CSFV), *Transmissible gastroenteritis virus* (TGEV), *Porcine rotavirus* (RV), *Japanese encephalitis virus* (JEV), *Porcine parvovirus* (PPV). Therefore, the specificity of this method was good. In the end, the coefficient of variation between and within groups was low, so the reproducibility was good. In detecting clinical samples by this method, the results were 100% consistent with virus isolation. This study are useful tools for quantifying viral load, detecting PEDV, and differentiating PEDV genotypes, and providing one technique for the prevention and control of PEDV.

**Keywords** *Porcine epidemic diarrhea virus* (PEDV), TaqMan probe, qRT-PCR, Genotype

猪流行性腹泻(porcine epidemic diarrhea, PED)是目前危害养殖场仔猪 (*Sus scrofa domestica*)生产的重要病毒性腹泻疾病之一,其病原为猪流行性腹泻病毒 (*Porcine epidemic diarrhea virus*, PEDV)。1978年比利时科学家鉴定 PEDV 为猪腹泻的病原之一(Pensaert, de Bouck, 1978);2001年 Kocherhans 等人获得其全长序列,随后科研人员经体外连续传代致弱,研制出疫苗毒株 PEDV(CV777株)(Kocherhans et al., 2001),为 PEDV 的防控做出重要贡献。2010年以来,我国爆发的 PEDV 主要为变异毒株(Chen et al., 2011),2013年美国、韩国、泰国及欧洲也相继爆发该病(Cho et al., 2014; Dastjerdi et al., 2015; Huang et al., 2013; Sun et al., 2018; Temeeyasen et al., 2014; Van Diep et al., 2018),新的变异毒株给我国及世界其他养猪国家和地区带来严重的经济损失。

PEDV 属于冠状病毒科  $\alpha$  型冠状病毒亚科,其

病毒粒子包含几个主要结构蛋白:纤突蛋白(spike, S)、核蛋白(nucleoprotein, N)、基质蛋白(membrane protein, M)和小包膜蛋白(envelope protein, E)(Park et al., 2011)。PEDV S 蛋白在病毒粒子表面形成棒状同源三聚体,其作为 I 型跨膜糖蛋白包含 N 端的信号肽(1~18 位氨基酸(amino acid, aa))、大的胞外域(19~1327 aa)、跨膜结构域(1328~1350 aa)、短的 C 端尾巴(1351~1386 aa)(Li et al., 2016)。PEDV S 的功能包括:S1 亚基(1~729 aa)的结构域(19~233 aa 和 501~629 aa)介导与受体(氨基肽酶)的结合,S2 亚基(730~1386 aa)的结构域(891~908 aa)介导病毒进入细胞时囊膜与细胞膜的融合(Li et al., 2016)。仔猪抗 PEDV 感染作用的抗体是来自母猪的乳汁中的中和抗体,而其最主要的中和抗原表位分别位于 PEDV S 蛋白的 1~229 aa (Li et al., 2017)、499~638 aa (Chang et al., 2002)、639~789 aa (Sun et al., 2008)、1 371~1 377 aa (Cruz et al., 2008)等结构域,

不同毒株的中和表位差异非常显著。科研人员依据 PEDV S1 基因的生物信息学分析,将临床分离的 PEDV 毒株分为两个基因型,经典毒株为基因 I 型(G I 型)、变异毒株为基因 II 型(G II 型)(Zuo et al., 2018),G I 型相比 G II 型而言,在第 167 及 175~185 位核苷酸存在 12 个碱基的缺失,这是基因型之间差异最显著的标志(Zhao et al., 2014)。目前鉴定该病毒的方法较多,但其各有优缺点:病毒分离鉴定方法准确可靠,但时间过长、有时不易分离获得病毒;核酸检测包括普通逆转录 PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)、qRT-PCR 等,具有快速、准确、敏感等特点。在已经建立的 qRT-PCR 检测技术中,一般都基于 *M* (membrane protein)或 *N* (nucleo protein)基因保守区设计的引物或探针,不能区分 PEDV 基因型,不利于及时开展有针对性疫苗设计和防控措施制定。因此本研究基于 PEDV S 基因序列的相对保守序列设计扩增引物,确保能扩增出样本中的 PEDV S 基因片段,同时依据不同基因型之间的该基因差异显著性标志,设计特异结合的探针,分别用不同荧光基团标记,构建能鉴别 PEDV 基因型的一步法双重 qRT-PCR,可用于临床腹泻病料中 PEDV 病毒核酸的检测和基因分型,以期为规模化猪场防控该病提供及时数据支持,也为变异毒株疫苗的效力检验和攻毒保护实验提供技术支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 病毒和质粒

猪流行性腹泻病毒(*Porcine epidemic diarrhea virus*, PEDV)变异毒株(PEDV/YJH/2015)、猪  $\delta$  冠状病毒(*Porcine deltacoronavirus*, PDCoV)、猪传染性胃肠炎病毒(*Transmissible gastroenteritis virus*, TGEV)、猪瘟疫病毒(*Classic swine fever virus*, CSFV)、日本脑炎病毒(*Japanese encephalitis virus*, JEV)和猪细小病毒(*Porcine parvovirus*, PPV)为浙江农林大学动物预防医学与公共卫生实验室分离保存。PEDV (PEDV/CV777/2001)、TGEV 和猪轮状病毒(*Porcine rotavirus*, RV)构成的 PEDV/TGEV/RV 三联疫苗作为经典毒株代表购自哈尔滨维科生物工程有限公司;质粒 pGH-T Vector 购自上海捷瑞生物工程有限公司。

#### 1.1.2 引物和探针

根据表 1 中的参考毒株和同属冠状病毒(PD-CoV)核苷酸序列,利用生物信息学软件进行比对分析,选取基因型内部相对保守、基因型之间差异显著的区段(nt 20740~20925),使用 Primer Premier 5.0 生物软件设计 1 对 qRT-PCR 引物,分别在其内部各设计 1 条探针,其中变异毒株(G II 型)探针使用 5-羧基荧光素(5-carboxy fluorescein, FAM)、经典毒株探针(G I 型)使用六氯荧光素(hexachloro fluorescein, HEX)标记,引物及探针序列见表 2,引物和探针均由苏州金唯智生物技术有限公司合成。

#### 1.1.3 临床样品

120 份临床样品为浙江农林大学动物健康检测中心保存的送检肛门拭子(108 份)和 12 份腹泻仔猪小肠病料组织,其中 12 份病料组织经实验室利用非洲绿猴(*Chlorocebus sabaeus*)肾细胞(vero)分离获得 12 株 PEDV 病毒。

## 1.2 方 法

### 1.2.1 阳性标准品的制备

RNA 提取:PEDV/YJH/2015 病毒(感染复数(multiplicity of infection, MOI)=5)感染 Vero 细胞 48 h 的细胞所收集沉淀或者三联疫苗,加入磷酸盐缓冲液 200  $\mu$ L,然后加入 1 mL TRIzol 试剂,振荡混匀,静置 5 min;随后加入 200  $\mu$ L 氯仿,振荡 15~30 s,室温静置 3 min;4  $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 15 min,将上清液转移到新的焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)处理的离心管中;加入等体积异丙醇,轻轻混合管中的液体,室温静置 10 min;4  $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 10 min,将上清液丢弃,剩下沉淀加入 75% 乙醇,上下轻微颠倒,室温静置 10 min,4  $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 2 min,弃去上清液,沉淀用无 RNase 的 ddH<sub>2</sub>O 溶解。

RT-PCR 扩增目的片段:依据一步法 RT-PCR 试剂盒(Takara Bio, 大连)说明书,按照如下体系:2 $\times$ 一步法缓冲液(1 step buffer) 10  $\mu$ L, PEDV-P-V-F/R 引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L,一步法酶混合物(primestrip 1 step enzyme mix) 1  $\mu$ L, PEDV RNA 2  $\mu$ L,无 RNase 的 ddH<sub>2</sub>O 配足总体积至 20  $\mu$ L。反应条件为:50  $^{\circ}$ C 30 min;94  $^{\circ}$ C 2 min,94  $^{\circ}$ C 30 s,60  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 30 s,共 30 个循环;72  $^{\circ}$ C 10 min,4  $^{\circ}$ C 2 min。PCR 产物经快速片段纯化试剂盒(天根生物,北京)

纯化回收。

**TA 克隆:** 上述纯化的 PCR 产物按照 pGH-T Vector 试剂盒(捷瑞生物, 上海)说明书进行操作, 连接产物转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  感受态细胞, 37  $^{\circ}$ C 培养 18~24 h, 挑取克隆进行菌落 PCR 鉴定, 阳性克隆送生物公司(杰萌生物, 杭州)测序鉴定, 鉴定阳性的质粒(变异毒株 pSL1005 和经典毒株 pSL1006), 测定浓度, -20  $^{\circ}$ C 保存作为标准品备用。

### 1.2.2 引物和探针浓度确定

利用阳性标准品(pSL1005)作为模

trip 1 step enzyme mix) 0.5  $\mu$ L, 阳性标准品 2  $\mu$ L; 反应条件为 95  $^{\circ}$ C 30 s, 94  $^{\circ}$ C 10 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环, 分别在 FAM 和 HEX 通道收集信号。

### 1.2.3 qRT-PCR 标准曲线的建立

将 1.2.1 得到的阳性标准品质粒(pSL1005 和 pSL1006)以 10 倍梯度稀释成  $10^1 \sim 10^8$  拷贝数/ $\mu$ L, 以 1.2.2 得到的优化条件进行 qRT-PCR 扩增, 扩增体系为: 2 $\times$ 一步法缓冲液(1 step buffer) 10  $\mu$ L, PEDV-P-V-F/R 引物 0.2  $\mu$ mol/L, Taqman 法荧光定量的探针(带 FAM 或者 HEX 标记)浓度按照 0.1 和 0.4  $\mu$ mol/L 分组确定, 一步法酶混合物(primestrip 1

step enzyme mix) 0.5  $\mu$ L, 阳性标准品 2  $\mu$ L; 反应条件为 95  $^{\circ}$ C 30 s, 94  $^{\circ}$ C 10 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环。每个浓度梯度重复 3 个样品, 以阳性重组质粒拷贝数为横坐标, 以各浓度下的循环数( $C_t$  值)为纵坐标建立 TaqMan 探针 qRT-PCR 标准曲线, 其中拷贝数计算公式: 拷贝数(拷贝/ $\mu$ L)=质粒浓度( $\mu$ g/ $\mu$ L) $\times$ 阿弗加德罗常数/重组质粒分子量。

### 1.2.4 qRT-PCR 敏感性试验

将 1.2.1 得到的阳性标准品质粒(pSL1005 和 pSL1006)按照  $10^0$ 、 $10^1$ 、 $10^2$ 、 $10^3$  拷贝数/ $\mu$ L 分组, 每组设置 6 重复, 测定各浓度下的循环数( $C_t$  值)。以已知滴度的病毒按照  $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$ 、 $10^0$  半数组织培养感染剂量(tissue culture infective dose,  $TCID_{50}$ )/0.1 mL 或者  $5 \times 10^0$ 、 $1 \times 10^0$ 、 $2 \times 10^{-1}$ 、 $4 \times 10^{-2}$ 、 $8 \times 10^{-3}$ 、 $1.6 \times 10^{-3}$ 、 $3.2 \times 10^{-4}$ 、 $6.4 \times 10^{-5}$  ng/ $\mu$ L 分组, 每组设置 6 重复, 测定各浓度下的循环数( $C_t$  值), 两个实验所得结果用 PODLOD 计算程序(第 8 版)工具(Wilrich, Wilrich, 2009)分别计算本检测方法的不同模板的最低检测限值。

### 1.2.5 qRT-PCR 重复性实验

设置阴性对照, 以 3 个已知浓度( $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ )  $TCID_{50}$ /mL 的 PEDV RNA 样品为模板, 间隔 1 周重复 1 次, 重复 3 次/样品(组间); 以 3 个已知浓度( $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$   $TCID_{50}$ /mL)的 PEDV 病毒 RNA 样品为模板, 每个样品设置 6 个重复(组内), 计算组内和组间变异系数(CV):  $CV = S_c \times \sqrt{C_t} \times 100\%$ , 验证该方法的重复性。其中  $S_c$  为  $C_t$  的标准差,  $\bar{C}_t$  为  $C_t$  的平均值。

### 1.2.6 qRT-PCR 特异性实验

以 1.2.2 建立的 TaqMan 探针 qRT-PCR 方法, 同时以 PEDV 变异毒株、PEDV/TGEV/RV 三联疫苗、

表 1 PEDV 参考毒株及其序列号

Table 1 GenBank number of PEDV strains

毒株 Strains	基因序列号 GenBank No.	分离年份 Isolation year	基因型 Genotypes
PEDV/CV777	AF353511	2001	G I 型
PEDV/CH/AH-M	KJ158152	2011	
PEDV/DR13	JQ023162	2012	
PEDV/SD-M	JX560761	2012	
PEDV/CH1	JQ239429	2011	
PEDV/GD-B	JX088695	2012	G II 型
PEDV/IA1	KF468753	2013	
PEDV/USA/Minnesota84	KJ645707.1	2013	
PEDV/ZJ13LY1201	KY213245	2014	
PEDV/CH-HB	KY496314	2015	
PEDV/SLO-JH-11	KU297956	2015	
PEDV/JSCZ1601	KY070587	2016	
PEDV/MEX-QRO-01	MH013465	2017	
PDCoV/SHJS/SL	MF041982	2016	PDCoV
PDCoV/USA/ Minnesota159	KR265859	2014	

表 2 qRT-PCR 的引物及探针

Table 2 Primers and probes of qRT-PCR

引物和探针名称 Primers and probes name	序列(5'~3') Sequences
PEDV-P-V-F	CAAAATTTAATGTTTCAGG
PEDV-P-V-R	GGCTCTTGCGAAATGCCAAT
PEDV-variant-P	FAM-AGTTGAATTGACACCCTGGTTTT CACCAATA-MGB
PEDV-classic-P	HEX-GTTTCAATGCCTGTGCCACAGTA CCAG-MGB

PDCoV、CSFV、JEV 的 RNA 和 PPV 的 DNA 为模板, 设置阴性和阳性对照, 进行 qRT-PCR 检测, 在 FAM 和 HEX 通道收集荧光, 确定本研究所建立方法的特异性。

### 1.2.7 临床样品的检测及结果比较

以 1.2.2 建立的 PEDV TaqMan 探针 qRT-PCR 方法, 检测 2016~2017 年浙江农林大学动物健康检测中心收集的浙江省部分地区规模化生猪养殖场送检的 90 份临床病料(肛门拭子), 所检测结果与该检测中心所检测结果进行比较; 利用本实验分离鉴定的 12 个 PEDV 样品, 进行检测, 检测结果与病毒分离结果进行比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 PEDV 基因型之间差异分析及探针设计

依据文献报道, 选取基因 I 型的 5 株经典毒株、基因 II 型的 8 株变异毒株和同种属的 2 株 PDCoV, 借助 CLC Sequence Viewer 8 软件, 对 17 株病毒的 S 基因进行比对分析(图 1), 发现 PEDV 病毒在 nt 110~128 和 nt 277~296 高度保守, 但 167、175~185 nt 处存在典型差异(缺失), 因此本研究在保守区域设计上、下游引物, 在变异毒株 S 基因(G II 型)的 nt 163~193 设计 5'端带 FAM 标记的探针, 经典

毒株(G I 型)的 180~206 nt 设计 5'端带 HEX 标记的探针。

### 2.2 qRT-PCR 方法阳性质粒的构建

以表 2 中引物分别扩增变异株(G II 型)(nt 186)和经典株(G I 型)(nt 174)的 S1 基因部分片段, 利用 TA 克隆构建 G I 和 G II 的阳性标准质粒, 质粒 PCR 和生物公司测序验证其准确性, 结果表明变异株 pGH-T-PEDV-S-Variant (pSL1005) 和经典株 pGH-T-PEDV-S-Classic (pSL1006) 阳性标准品构建成功(图 2)。

### 2.3 qRT-PCR 方法扩增条件的确定

依据 1.2.2 分别对引物和探针进行筛选和优化, 结果表明: 上下游引物终浓度各 0.2  $\mu\text{mol/L}$  时能出现典型扩增曲线, 荧光值达到 10 000 以上, 确定为本研究的最佳引物浓度; 基于引物浓度条件, 筛选探针最佳浓度, FAM 探针信号通路中 0.1  $\mu\text{mol/L}$  有典型扩增曲线, 荧光值达到 6 000 以上, HEX 探针信号通路中, 0.2  $\mu\text{mol/L}$  有典型扩增曲线, 荧光值达到 6 000 以上(图 3), 因此, 取以上浓度确定为探针最佳浓度。

### 2.4 qRT-PCR 标准曲线的建立

将阳性对照质粒按照 10 倍梯度稀释成  $10^1 \sim 10^8$  拷贝数/ $\mu\text{L}$ , 采用 2.3 中扩增条件, 构建 G I 和 G II

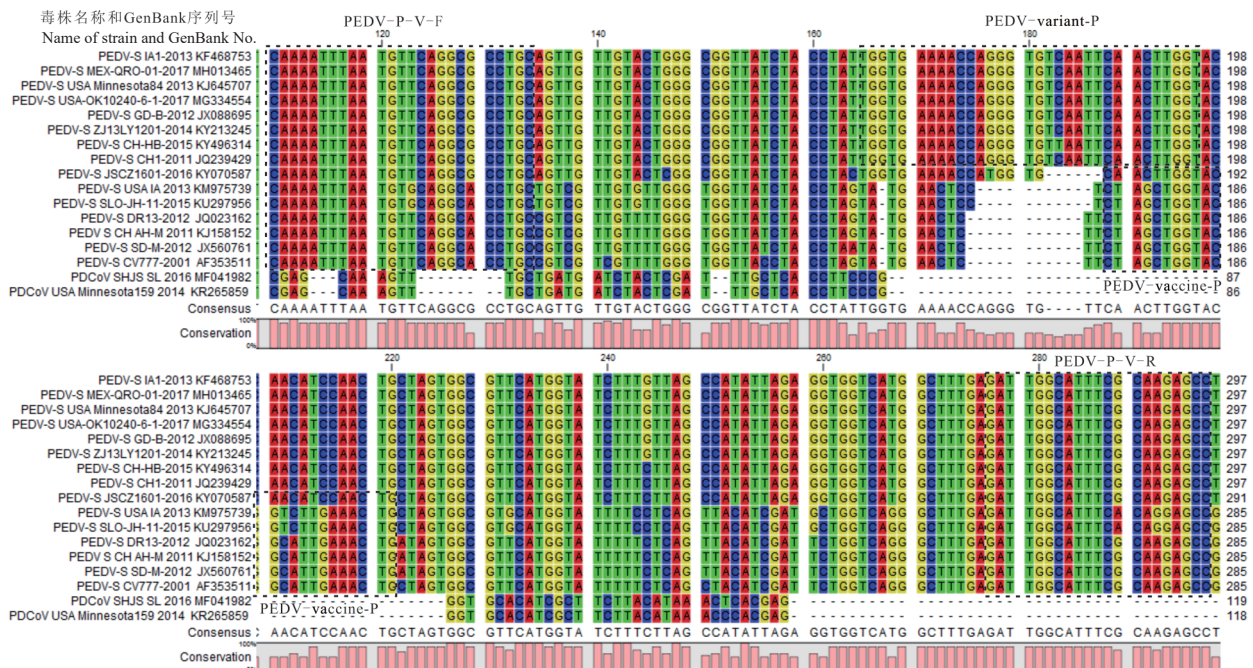


图 1 qRT-PCR 的引物和探针序列对比

Figure 1 Alignment of primers and probes sequences for qRT-PCR

的标准曲线,结果表明(图4):针对G II型建立的方法在 $100^{-8}$ 拷贝数/ $\mu\text{L}$ 范围内扩增,其浓度和循环数之间具有良好的线性关系,其方程为 $Y(Ct\text{值})=-2.912 \times X(\text{浓度的对数})+32.94$ ,  $R^2=0.9892$ ,斜率( $Slope$ )=-3.29;针对G I型建立的方法在 $10^{0-8}$ 拷贝

数/ $\mu\text{L}$ 范围内扩增,其浓度和循环数之间具有良好的线性关系,其方程为 $Y(Ct\text{值})=-2.85 \times X(\text{浓度的对数})+32.97$ ,  $R^2=0.9914$ , $Slope=-3.32$ 。

## 2.5 qRT-PCR的敏感性

依据1.2.4的方法,以阳性质粒为模板,依据1.2.4的方法,获得G II型检测方法的检测下限为7.34拷贝/ $\mu\text{L}$ ,G I型检测方法的检测下限为4.32拷贝/ $\mu\text{L}$ (表3);以病毒RNA为模板,G II型检测方法的检测下限为 $2.3 \times 10^2 TCID_{50}/0.1\text{ mL}$ (图5A)或 $6.4 \times 10^{-5}\text{ ng}/\mu\text{L}$ (图5C),G I型检测方法的检测下限为 $4.3 \times 10^3 TCID_{50}/0.1\text{ mL}$ (图5B)或 $4 \times 10^{-2}\text{ ng}/\mu\text{L}$ (图5D)。

## 2.6 qRT-PCR的特异性

利用1.2.2建立的方法,分别以PEDV变异株(PEDV/YJH/2015)、PEDV经典株(CV777)、TGEV、PDCoV、CSFV、PPV和JEV的RNA/DNA为模板,进行qRT-PCR检测,结果表明(图6):在FAM通道,仅有PEDV变异株(G II型)出现荧光信号;在HEX

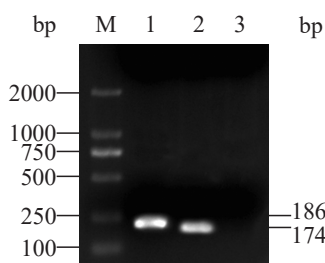


图2 PEDV变异株与经典株阳性质粒的PCR鉴定

Figure 2 Analysis of PCR amplification products of PEDV variant and classic strains

M: DNA 分子量标准 DL2000; 1: PEDV 变异株(pSL1005); 2: PEDV 经典株(pSL1006); 3: 阴性对照(水)

M: DNA Marker DL2000; 1: PEDV variant stains (pSL1005); 2: PEDV classic strains (pSL1006); 3: Negative control (H<sub>2</sub>O)

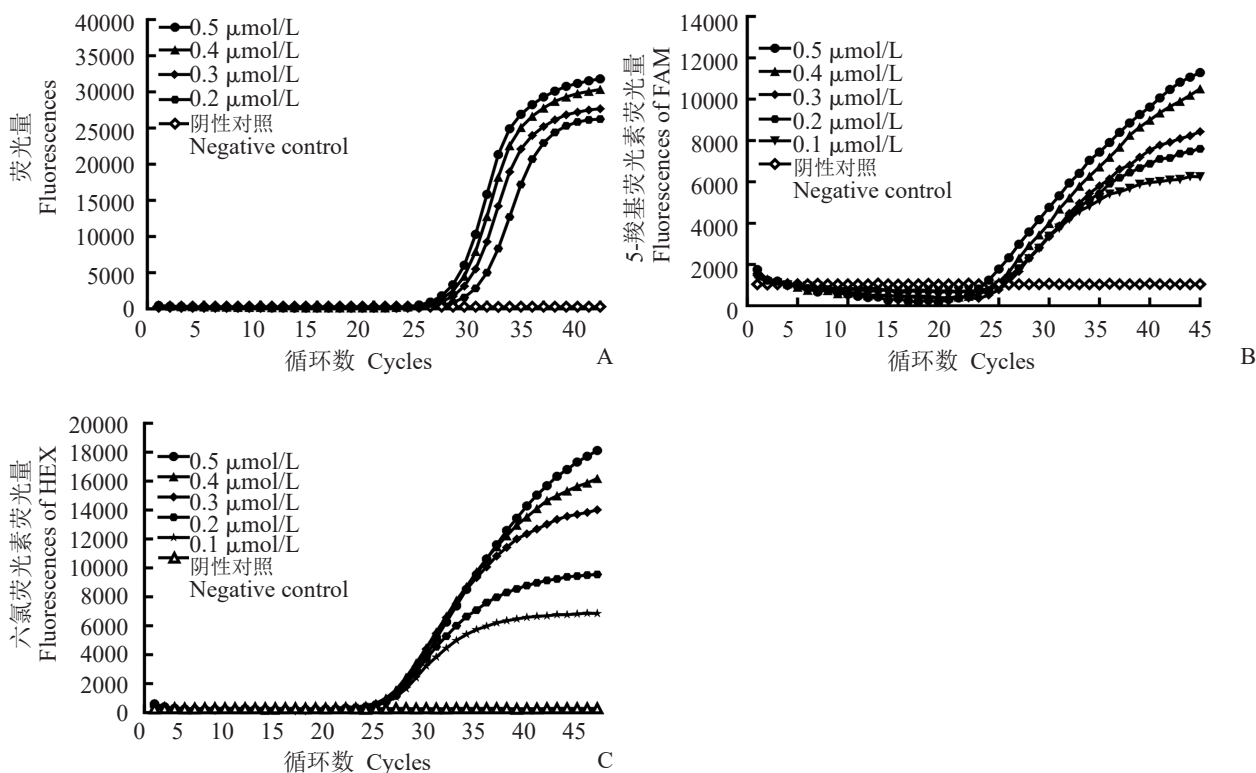


图3 qRT-PCR方法的引物和探针浓度筛选

Figure 3 Primers and probes concentration screening for qRT-PCR

A. 引物浓度筛选的扩增曲线。B. G II型探针(FAM)浓度筛选的扩增曲线。C. G I型探针(HEX)浓度筛选的扩增曲线

A. Curve of primer concentration screening. B. Curve of probe concentration screening for G II type (FAM). C. Curve of probe concentration screening for G I -type (HEX)

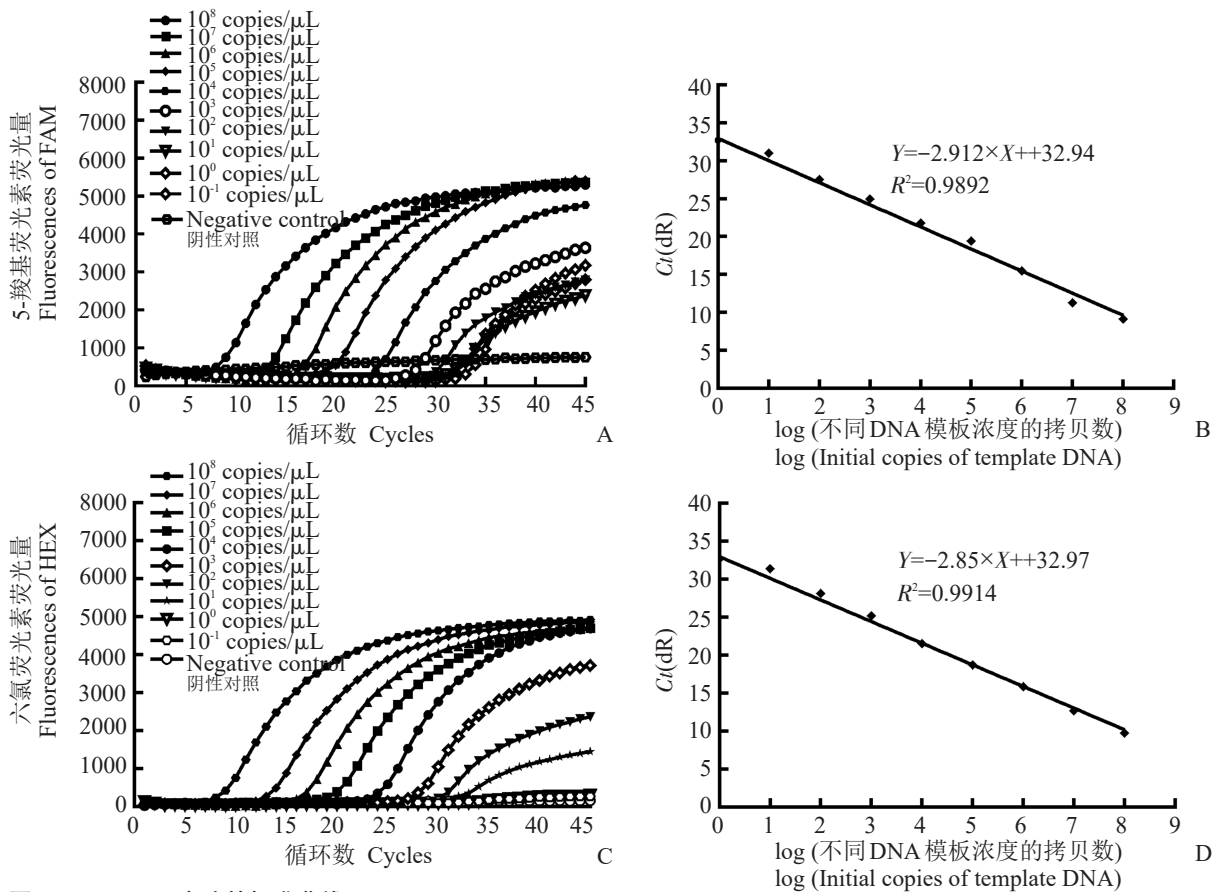


图4 qRT-PCR方法的标准曲线

Figure 4 Standard curve of qRT-PCR

A. G II 型探针(FAM)的扩增曲线。B. G II 型探针(FAM)的标准曲线。C. G I 型探针(HEX)的扩增曲线。D. G I 型探针(HEX)的标准曲线

A. Amplification curve of G II type (FAM) method. B. Standard curve of G II type (FAM). C. Amplification curve of G I type (HEX) method. D. Standard curve of G I type (HEX) method

表3 PEDV qRT-PCR检测方法的最低检测限

Table 3 The lowest limit of detection for qRT-PCR

浓度(拷贝数/ $\mu$ L) Concentration(Copies/ $\mu$ L)	阳性/总数 Positive/Total	
	G II type	G I type
$10^4$	6/6	6/6
$10^3$	6/6	6/6
$10^2$	6/6	6/6
$10^1$	6/6	6/6
$10^0$	2/6	3/6
0	0/6	0/6
检测下限 The lowest limit of detection	7.34 Copies/ $\mu$ L	4.32 Copies/ $\mu$ L

通道,仅有 PEDV(CV777)经典株(G I 型)有荧光信号;其他样品在 FAM 和 HEX 通道都没有荧光信号,说明该方法既在 G I 和 G II 之间没有交叉反应,同时在与 TGEV、PDCoV、RV、CSFV、PPV、JEV

等其他病毒之间也没有交叉反应。

## 2.7 qRT-PCR的重复性

以本实验方法阳性质粒(pSL1005 和 pSL1006)

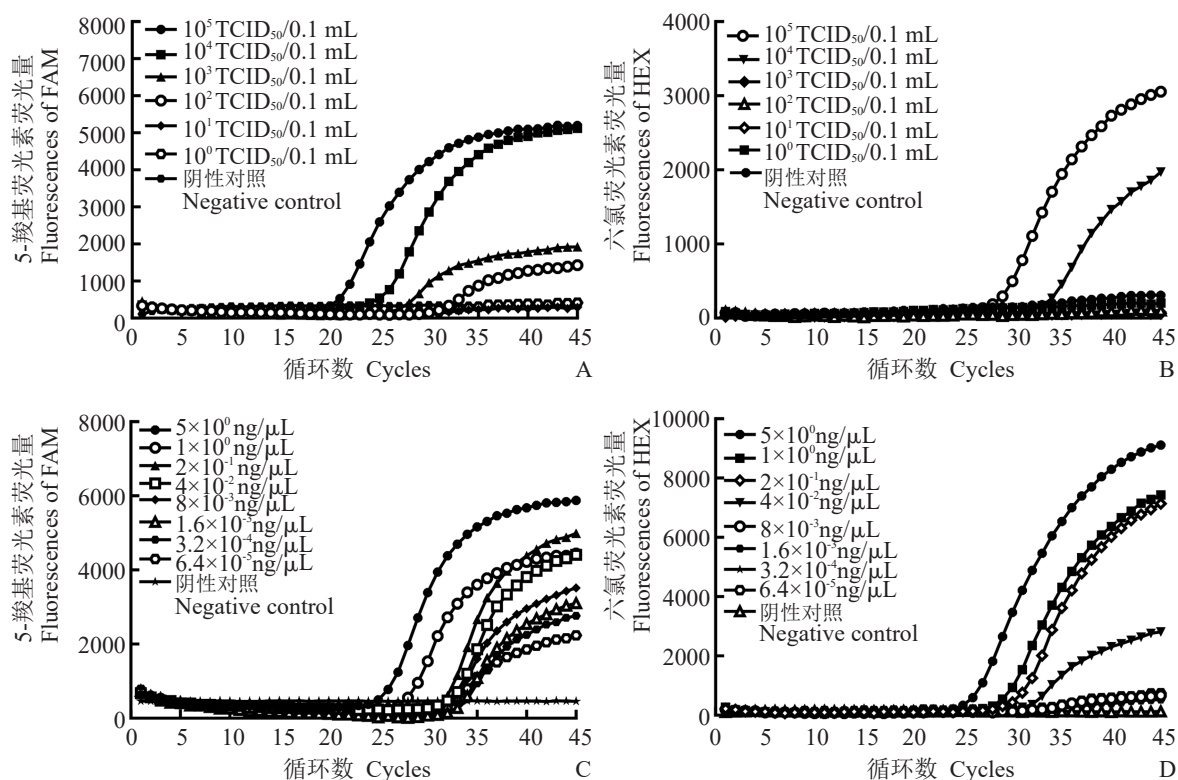


图5 qRT-PCR检测病毒RNA的检测下限

Figure 5 The lowest limit of detection for qRT-PCR about viral RNA

A. G II型病毒滴度的检测下限。B. G I型病毒滴度的检测下限。C. G II型病毒RNA浓度的检测下限。D. G I型病毒RNA浓度的检测下限

A. The lowest limit of detection for PEDV G II type virus titer. B. The lowest limit of detection for PEDV G I type virus titer. C. The lowest limit of detection for PEDV G II type RNA concentration. D. The lowest limit of detection for PEDV G I type RNA concentration

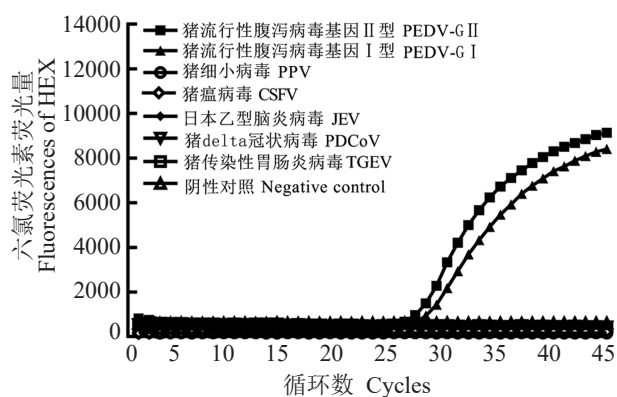


图6 qRT-PCR的特异性

Figure 6 Specific of qRT-PCR

的  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  拷贝/ $\mu$ L 为模板, 在 1.2.2 建立的条件下进行重复实验。重复 3 次/浓度进行组间测定, 重复 6 次/组进行组内测定。结果表明, G II 和 G I 型组内各浓度样品扩增曲线重复性较好, 组内与组间样品检测的  $C_t$  值的变异系数较小(表 4), 表明该检

测方法有较好的重复性。

## 2.8 qRT-PCR的临床样品检测

以 12 个腹泻小猪的小肠病料, 经实验室分离鉴定获得 12 株 PEDV 病毒, 经普通 RT-PCR 和测序方法验证都为 PEDV 变异株(G II 型), 然后采用本研究建立的鉴别猪流行性腹泻病毒基因型的一步法双重 qRT-PCR 方法对该分离样品进行检测, 结果显示, 每一个样品仅在 FAM 通道(G II 型)检测到荧光信号, 说明本检测方法与病毒分离方法符合率为 100%(图 7A)。利用浙江农林大学动物健康检测中心接收的 108 份临床样品(肛门拭子)进行检测(图 7B), 结果表明, 本方法所检测样品 G II 型阳性率为 32%(95% 置信区间(confidence interval, CI) = 22.8%, 42.9%), G I 型阳性率为 0%(95% CI = 0%, 4%)。



表4 qRT-PCR的重复性

Table 4 Reproducibility of qRT-PCR

基因型	质粒浓度(Copies/ $\mu$ L)	组内变异系数/(%)	组间变异系数/(%)
Genotypes	Concentration of plasmid	Coefficient of variation within groups	Coefficient of variation among groups
G I	$10^2$	0.38	0.22
	$10^3$	0.30	0.26
	$10^4$	0.32	0.28
G II	$10^2$	0.18	0.21
	$10^3$	0.28	0.24
	$10^4$	0.15	0.22

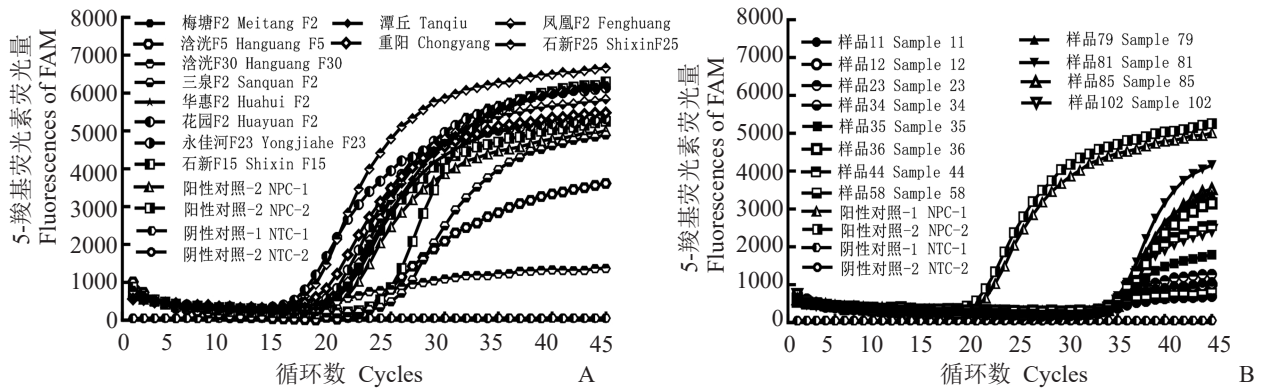


图7 临床样品的qRT-PCR检测结果

Figure 7 Results of clinic samples by qRT-PCR

A. 病毒分离鉴定为阳性样本的检测结果。B. 临床肛门拭子检测结果

A. Results of positive samples by virus isolation. B. Results of clinic anal swab samples

### 3 讨论

PEDV作为目前危害养猪业最重要的病原体,主要危害3~10日龄仔猪,常导致其严重水样腹泻、甚至脱水死亡,临床仔猪腹泻样品中PEDV核酸检出率高达80%以上。自2010年以来,临床样本检测和病毒分离结果表明,新的变异毒株广泛流行于我国及全世界主要养猪国家和地区,通过S基因的进化分析,几乎所有新的分离变异株都归于G II型,进化距离明显远离G I型(Temeeyasen et al., 2014)。而且分离PEDV变异株对技术要求比较高,一般检测实验室难以完成,且费时费力,不能满足临床检测需求。虽然前人建立了一些PEDV的快速检测方法,但存在费时和灵敏度不高(普通PCR技术)、不能区分基因型(单重qRT-PCR)等缺陷。因此,建立能及时从临床样本中检测出PEDV变异毒株,并区分其基因型的方法,将有利于防控该病。

Ren和Li(2011)建立了基于PEDV的N基因的

环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification RT-LAMP)方法。Jung和Chae(2005)建立点杂交RT-PCR方法,Zhang等(2016)基于M基因建立了区分PEDV和PDCoV的普通RT-PCR方法。Wang等(2014)建立了基于S基因的qRT-PCR方法。这些方法都是基于PEDV的N、M、S基因的保守区设计引物或探针,不能区分所检对象是经典株还是变异株,而本研究基于PEDV的S基因设计双荧光标记探针建立的方法能较好区分变异株和经典株。在灵敏度方面,Zhao等(2014)建立的变异和经典株的灵敏度均为 $5 \times 10^2$ 拷贝/ $\mu$ L,Yuan等(2015)建立的纳米辅助PCR检测PEDV的灵敏度达到 $2.7 \times 10^{-6}$  ng/ $\mu$ L,本研究建立的方法检测最低检测限分别达到G II型为7.34拷贝/ $\mu$ L和G I型为4.32拷贝/ $\mu$ L,针对病毒滴度最低检测限分别为G II型为 $2.3 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>/0.1 mL,G I型为 $4.3 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/0.1 mL,具有较高的灵敏度。目前临床中还有TGEV(Xia et al., 2018)和PDCoV(Li et al., 2018)和新发的猪严重腹泻冠状病毒(*Swine acute diarrhea syndrome corona*

virus, SADS-CoV)(Wang et al., 2018)流行,其与PEDV都属于冠状病毒属,其S基因具有一定的同源性,但本实验在设计引物和探针时选择PEDV所特有区段进行设计,避免了与这些病毒的交叉性,同时实验数据也证明本研究建立的检测方法对临床常见病毒TGEV、PDCoV、RV、CSFV、PPV、JEV等无交叉反应,保障了该检测方法的特异性。因此,本研究所建立的鉴别PEDV基因型的一步法双重qRT-PCR方法,具有灵敏度高、特异性强、同时区分基因型等特点,能为临床检测需求提供一种更好的检测技术。

#### 4 结论

本研究基于PEDV的S基因5'端保守区域设计引物,基于变异毒株(G II型)和经典毒株(G I型)差异区域设计探针,分别用不同荧光标记,建立了一步法双重qRT-PCR方法,该方法在 $10^1 \sim 10^8$ 拷贝数/ $\mu\text{L}$ 范围内, $C_t$ 值与浓度之间具有较好的线性关系,其最低检测限分别达到G II型为7.34拷贝/ $\mu\text{L}$ 和 $2.3 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>/0.1 mL、G I型为4.32拷贝/ $\mu\text{L}$ 和 $4.3 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/0.1 mL,且该方法与TGEV、PDCoV、RV、CSFV、PPV、JEV等病原体之间没有交叉反应,特异性好;组间和组内变异系数低,重复性好;临床样品检测结果与病毒分离方法符合率为100%。本研究为疑似PEDV感染的病料检测提供快速准确的方法,并同时确定其基因型,为临床防控该病提供技术支持。

#### 参考文献

Chang S H, Bae J L, Kang T J, et al. 2002. Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against the *Porcine epidemic diarrhea virus*[J]. *Molecules and Cells*, 14(2): 295-299.

Chen J, Wang C, Shi H, et al. 2011. Complete genome sequence of a Chinese virulent *Porcine epidemic diarrhea virus* strain[J]. *Journal of Virology*, 86(24): 11538-11539.

Cho Y Y, Lim S I, Kim Y K, et al. 2014. Complete genome sequence of K14JB01, a novel variant strain of *Porcine epidemic diarrhea virus* in South Korea[J]. *Genome Announcements*, 2(3): e00505-14.

Cruz D J, Kim C J, Shin H J. 2008. The GPRLQPY motif located at the carboxy-terminal of the spike protein induces antibodies that neutralize *Porcine epidemic diarrhea virus*[J]. *Virus Research* 132(1-2): 192-196.

Dastjerdi A, Carr J, Ellis R J, et al. 2015. *Porcine epidemic diarrhea virus* among farmed pigs, Ukraine[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 21(12): 2235-2237.

Huang Y W, Dickerman A W, Pineyro P, et al. 2013. Origin, evolution, and genotyping of emergent *Porcine epidemic diarrhea virus* strains in the United States[J]. *mBio*, 4(5): e00737-00713.

Jung K, Chae C. 2005. RT-PCR-based dot blot hybridization for the detection and differentiation between *Porcine epidemic diarrhea virus* and transmissible gastroenteritis virus in fecal samples using a non-radioactive digoxigenin cDNA probe[J]. *Journal of Virological Methods*, 123(2): 141-6.

Kocherhans R, Bridgen A, Ackermann M, et al. 2001. Completion of the porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence[J]. *Virus Genes*, 23(2): 137-144.

Li C, Li W, Lucio de Esesarte E, et al. 2017. Cell Attachment domains of the *Porcine epidemic diarrhea virus* spike protein are key targets of neutralizing antibodies[J]. *Journal of Virology*, 91(12): e00273-17.

Li D, Feng H, Liu Y, et al. 2018. Molecular evolution of *Porcine epidemic diarrhea virus* and porcine deltacoronavirus strains in central China[J]. *Research in Veterinary Science*, 120: 63-69.

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

Park S J, Kim H K, Song D S, et al. 2011. Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Porcine epidemic diarrhea virus* (PEDV) field isolates in Korea[J]. *Archives of Virology*, 156(4): 577-585.

Pensaert M B, de Bouck P. 1978. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine[J]. *Archives of Virology*, 58(3): 243-247.

Ren X, Li P. 2011. Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of *Porcine epidemic diarrhea virus*[J]. *Virus Genes*, 42(2): 229-35.

Sun D, Feng L, Shi H, et al. 2008. Identification of two novel B cell epitopes on *Porcine epidemic diarrhea virus* spike protein[J]. *Veterinary Microbiology*, 131(1-2): 73-81.

Sun J, Li Q, Shao C, et al. 2018. Isolation and characterization of Chinese *Porcine epidemic diarrhea virus* with novel mutations and deletions in the S gene[J]. *Veterinary Microbiology*, 221: 81-89.

Temecyasen G, Srijangwad A, Tripipat T, et al. 2014. Genetic

- diversity of ORF3 and spike genes of *Porcine epidemic diarrhea virus* in Thailand[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 21: 205-213.
- Van Diep N, Sueyoshi M, Norimine J, et al. 2018. Molecular characterization of US-like and Asian non-S INDEL strains of *Porcine epidemic diarrhea virus* (PEDV) that circulated in Japan during 2013-2016 and PEDVs collected from recurrent outbreaks[J]. *BMC Veterinary Research*, 14(1): 96.
- Wang H, Cong F, Zeng F, et al. 2018. Development of a real time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method (RT-LAMP) for detection of a novel *Swine acute diarrhea syndrome corona virus* (SADS-CoV) [J]. *Journal of Virological Methods*, 260: 45-48.
- Wang L, Zhang Y, Byrum B. 2014. Development and evaluation of a duplex real-time RT-PCR for detection and differentiation of virulent and variant strains of *Porcine epidemic diarrhea viruses* from the United States[J]. *Journal of Virological Methods*, 207: 154-157.
- Wilrich C, Wilrich P T. 2009. Estimation of the POD function and the LOD of a qualitative microbiological measurement method[J]. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 92(6): 1763-1772.
- Xia L, Dai L, Yang Q. 2018. Transmissible gastroenteritis virus infection decreases arginine uptake by downregulating CAT-1 expression[J]. *Veterinary Research*, 49(1): 95.
- Yuan W, Li Y, Li P, et al. 2016. Development of a nanoparticle-assisted PCR assay for detection of *Porcine epidemic diarrhea virus*[J]. *Journal of Virological Methods*, 220: 18-20.
- Zhang J, Tsai Y L, Lee P Y, et al. 2016. Evaluation of two singleplex reverse transcription-insulated isothermal PCR tests and a duplex real-time RT-PCR test for the detection of *Porcine epidemic diarrhea virus* and *Porcine deltacoronavirus*[J]. *Journal of Virological Methods*, 234: 34-42.
- Zhao P D, Bai J, Jiang P, et al. 2014. Development of a multiplex TaqMan probe-based real-time PCR for discrimination of variant and classical *Porcine epidemic diarrhea virus*[J]. *Journal of Virological Methods*, 206: 150-155.
- Zuo Q, Zhao R, Liu J, et al. 2018. Epidemiology and phylogeny of spike gene of *Porcine epidemic diarrhea virus* from Yunnan, China[J]. *Virus Research*, 249: 45-51.

(责任编辑 张丽春)