上海地方标准

《猪肠道冠状病毒多重 RT-PCR 检测技术》

编制说明

一、背景及任务来源

1　任务来源

2020 年 3 月 10 日，上海市市场监督管理局关于印发《2020 年度上海市地方标准制（修）订项目申请指南》的通知（沪市监标技[2020]105 号），批准制定《猪冠状病毒多重 RT-PCR 检测技术》上海市地方标准，项目编号为 67，完成期限为两年。

2　猪冠状病毒的流行与危害

冠状病毒是自然界常见的一种 RNA 病毒，极易发生基因重组和病毒变异。对于生猪养殖业来说，猪冠状病毒一直是影响猪体健康的重要传染病原。目前已知的猪冠状病毒有 6 中，分别为猪流行性腹泻（PEDV）、猪传染性胃肠炎（TGEV）、猪呼吸道冠状病毒（PRCV）、猪血凝性脑脊髓炎（PHEV）、猪德尔塔冠状病毒（PDCoV）及猪急性腹泻综合征冠状病毒（SADS-CoV）。PEDV、TGEV 和 PDCoV 是引起猪只腹泻的常见病原，且它们之间的混合感染现象备受关注。据报道，PEDV/PDCoV 混合感染率达 33%-50%。虽然 TGEV 检出率有所下降，但临床也存在 TGEV/PEDV、TGEV/PDCoV 混合感染现象。PEDV、TGEV 和 PDCoV 都能引起仔猪发生呕吐和水样腹泻，严重还会导致厌食、脱水等症状，潜伏期短，传播迅速。这 3 种病临床症状相类似且常有混合感染情况，给病原的鉴别诊断带来了一定难度。

3　猪冠状病毒检测技术研究进展

临床诊断猪冠状病毒，一般主要从病原学检测、免疫学诊断和分子生物学诊断方面着手。病原的分离鉴定是最传统的病原学检测手段，常用 Vero 细胞分离 PEDV，ST 细胞分离 TGEV 以及 LIC-PK 细胞分离 PDCoV。研究证实，胰蛋白酶、弗林蛋白酶以及 TMPRSS2 蛋白酶等参与冠状病毒 S 蛋白的激活，在冠状病毒的感染和释放中起重要作用，可通过添加蛋白酶增加相关病毒的分离率。但该方法操作较复杂且好事较长，临床应用有一定困难。免疫学诊断技术如血清中和试验、酶联免疫吸附试验（ELISA）和胶体金试纸条检测技术等，在鉴别诊断方法或多或少存在缺陷，准确率较低。分子生物学技术是实验室最常规的操作，为快速诊断相关病毒提供了强有力的手段。在实际生产中，人们根据不同需求，运用传统生物技术结合近代基因工程衍生出荧光定量 PCR、原位 PCR、多重 PCR 和恒温隔绝式 PCR 等一些新型的 PCR 方法。其中针对 M 基因、N 基因和 S 基因保守区域设计引物的 RT-PCR

法是目前临床应用中最常用的方法，特异性好，成本低，结果准确。与单重 RT-PCR 方法相比，多重 RT-PCR 方法可实现单次多病原的同时检测，省时省力。目前，国内众多学着建立了多种针对 PEDV、TGEV 和 PDCoV 的多重 PCR 方法，适用于临床批量快速检测，但至今尚未有 PEDV、TGEV 和 PDCoV 多重 PCR 方法的操作标准。

二　国内外猪冠状病毒检测技术标准调研

国外关于猪冠状病毒检测技术的标准较少，仅 1 个（表 1），而且是血清学检测技术。

统计国内 PEDV、TGEV 和 PDCoV 检测技术的相关标准（表 2），可见，PEDV 单一检测技术的相关标准较多，包含 1 个国家标准和 8 个地方标准；TGEV 单一检测技术标准较少，仅有 2 个地方标准；PDCoV 检测技术标准最少，仅 1 个地方标准和 1 个行业标准。关于猪冠状病毒多重检测技术的相关标准，共有 5 个，均是 PEDV/TGEV 双重检测技术，其中 1 个是国家标准，4 个是地方标准。

目前，上海尚无 PEDV、TGEV 和 PDCoV 多重 PCR 检测技术的相关标准，因此建立该标准，可以规范临床样品检测。

表 1. 国外猪冠状病毒相关标准

标准号	标准名称	标准来源
NF U47-024:2010	Detection of antibodies against porcine coronaviridae (respiratory coronaviridae and transmissible gastroenteritis) by virus neutralisation test	AFNOR

表 2. 国内猪冠状病毒相关标准

	标准号	标准名称	标准类型
PEDV	GB/T 34757-2017	猪流行性腹泻病毒 RT-PCR 检测方法标准	国家
	DB22/T3087-2019	猪流行性腹泻病毒经典与变异毒株鉴别 qPCR 法	地方
	DB37/T3005-2017	猪流行性腹泻病毒分离与 RT-PCR 检测技术	地方
	DB13/T2404-2016	猪流行性腹泻病毒 RT-PCR 检测方法	地方
	DB34/T2515-2015	猪流行性腹泻病毒 RT-PCR 检测方法	地方
	DB45/T1012-2014	猪流行性腹泻病毒（PEDV）的检测 RT-PCR 法	地方
	DB21/T2251-2014	猪流行性腹泻病毒 RT-PCR 检测方法	地方
	DB34/T3407-2019	猪流行性腹泻病毒 IgA 抗体间接 ELISA 检测方法	地方
	DB14/T1804-2019	猪流行性腹泻病毒抗体 ELISA 检测方法	地方
TGEV	DB21/T2325-2014	猪传染性胃肠炎病毒 RT-PCR 检测方法	地方
	DB45/T1007-2014	猪传染性胃肠炎病毒的检测 R T-PCR 法	地方
PDCoV	DB12/T1019-2020	猪德尔塔冠状病毒 RT-PCR 检测方法	地方
	SN/T5124-2019	猪 Delta 冠状病毒检疫技术规范	行业
多重检测技术	GB/T36871-2018	猪传染性胃肠炎病毒、猪流行性腹泻病毒和猪轮状病毒多重 RT-PCR 检测方法标准	国家
	DB33/T2254-2020	猪流行性腹泻病毒与猪传染性胃肠炎病毒双重荧光定量 RT-PCR 检测方法	地方

	DB34/T2404-2016	猪传染性胃肠炎病毒与猪流行性腹泻病毒二重 RT-PCR 检测方法	地方
	DB32/T2607-2013	猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒与猪 A 群轮状病毒检测技术多重 RT-PCR 法	地方
	DB41/T706-2011	猪传染性胃肠炎病毒与猪流行性腹泻病毒二重 RT-PCR 鉴别诊断试验方法	地方

三、标准编制过程与内容

1. 基因的选择

猪冠状病毒 M 和 N 基因都具有很高的保守性，分别比对已有 PEDV、TGEV 和 PDCoV 毒株的 M 和 N 基因。结合引物设计原则和分析，选取 PEDV M 基因、TGEV N 基因和 PDCoV M 基因中保守性能最高的区域，分别设计一对特异性引物。

2. 引物的设计与合成

从 GenBank 选取具有代表性的 PEDV、TGEV 和 PDCoV 毒株，分别针对其 M、N 和 M 基因进行序列保守性分析，并根据保守片段设计特异性引物。具体序列见表 3。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

表 3. 引物序列及扩增片段

引物名称	引物序列（5’-3’）	扩增长度（bp）	扩增目的
PEDV-F	GATACTTTGGCCTCTTGTGT	332	M基因
PEDV-R	ATTGACTTACCTGTACGC		
TGEV-F	ACCAGATAGAAGTCACGTT	226	N基因
TGEV-R	TCAACCTGTGTGTCATCAAA		
PDCoV-F	ACTTATTCTGCTTTGGCTGCT	504	M基因
PDCoV-R	GAAGTGGTTATGGTGTGAAGTC		

3. 阳性 cDNA 模板的制备

分别提取 PEDV、TGEV 和 PDCoV 的总 RNA，具体步骤：300μL 上述病毒液中加入 750μL 预冷的 TRIzol 试剂中；加入 200μL 氯仿，剧烈振荡 15s，室温放置 3～5min；4℃，12,000r/min 离心 15min，吸取上层无色水相约 400μL 转移至新的 RNase-free EP 管中；加入等体积的异丙醇，混匀，-20℃放置 10min；4℃，12,000r/min 离心 10min，弃上清；加入 1mL 75%的乙醇洗涤沉淀；4℃，12,000r/min 离心 10min，弃上清；室温干燥，加入 20μL RNase-free H_2O 溶解 RNA， -70℃保存或立即反转录。

以上述提取的RNA为模板进行反转录：10μL RNA、1μL Random Primer、4μL M-MLV Reaction Buffer(5×)、1μL dNTP Mixture(10mM each)、1μL M-MLV RT(200U/μL)、1μL Ribonuclease Inhibitor(40U/μL)、2μL RNase-free H_2O，42℃作用60min，70℃灭活15min。制备的cDNA置于-20℃保存，备用。

4. 阳性质粒的制备

以上述cDNA为模板，利用表1引物，分别进行PCR扩增。配制PCR反应体系：取2μL阳性 cDNA、10μL 5×PCR Buffer、3μL dNTP、1μL *pfu*聚合酶，上、下引物（10μM）各1μL，用水补到50μL。加完上述试剂后盖紧管盖，瞬间离心后，放入PCR仪上，进行扩增。PCR程序为：94℃变性4min；然后94℃35s，55℃35s，72℃35s，循环30次；72℃延伸5min；16℃放置10min。结果可见（图1），PEDV M基因、TGEV N基因和PDCoV M基因均成功扩增，特异性较好，大小正确，与预期相符。

进一步将扩增正确的 PEDV M 基因、TGEV N 基因和 PDCoV M 基因片段切胶回收，并克隆入 pEASY Blunt Zero Vector，通过提质粒鉴定（图 2），可见 T-PEDV/M、T-TGEV/N、T-PDCoV/M 质粒大小分别为 4288bp、4182bp、4460bp，与预期相符。序列测定证实，插入各片段无碱基突变，证实获得构建正确的 T-PEDV/M、T-TGEV/N、T-PDCoV/M 阳性质粒。

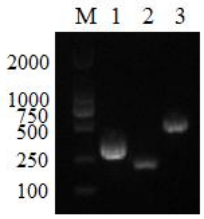

图 1. 猪肠道冠状病毒 PCR 扩增结果

M: DL2,000 DNA Marker; 1: PEDV M 基因; 2: TGEV N 基因; 3: PDCoV M 基因

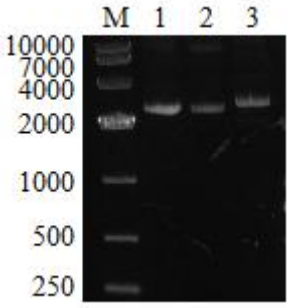

图 2. 猪肠道冠状病毒阳性质粒的鉴定

M: DL10,000 DNA Marker; 1: T-PEDV/M 质粒; 2、T-TGEV/N 质粒; 3: T-PDCoV/M 质粒

5. 多重 PCR 扩增体系的建立与优化

以上述构建的阳性质粒为模板，进行多重 PCR 扩增，体系为：3 种阳性质粒各 0.5μL、3 种检测引物各 0.4 μL、10μL PCR Mix、7.3μL RNase-free H_2O。PCR 仪上进行反应，95℃ 3min，95℃ 30s、55℃ 30s、72℃ 30s（30 个循环），72℃ 5min。

5.1 退火温度的确定

选取退火温度 47℃、49℃、51℃、53℃、55℃、57℃、59℃，分别进行多重 PCR 鉴定。结果如图 3，这 7 个退火温度均能扩增出 3 条大小正确的条带，55℃时扩增条带最亮。因此选取 55℃为最佳退火温度。

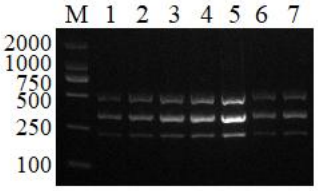

图 3. 多重 PCR 退火温度的筛选

M: DL 2, 000 DNA Marker; 1-7: 退火温度分别为 47℃、49℃、51℃、53℃、55℃、57℃、59℃

5.2 引物浓度的确定

将引物稀释为 10μM，分别添加 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8μL 引物，进行多重 PCR 鉴定。结果如图 4，仅当添加 0.1μL 引物时，PCR 条带较浅；当引物添加量为 0.6 和 0.8μL 时，PCR 扩增条带最清晰。因此，选取添加 0.6μL 引物（10μM）为最佳引物浓度。

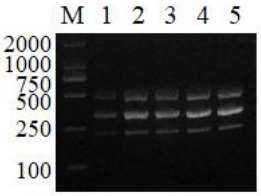

图 4. 多重 PCR 引物浓度的筛选

M: DL 2, 000 DNA Marker; 1-5: 引物添加量分别为 0.1 μL、0.2 μL、0.4 μL、0.6 μL、0.8 μL

6. 多重 PCR 体系最低检测限度的确定

将 3 种阳性质粒 10 倍倍比稀释后，进行 PCR 扩增。结果显示（图 5），T-PEDV/M、T-TGEV/N、T-PDCoV/M 阳性质粒最高稀释 10^{-6} 倍时，仍可以特异性扩增 PEDV、TGEV 和 PDCoV 目的片段。即该多重 PCR 体系检测 PEDV、TGEV 和 PDCoV 的核酸最低检测限度分别为 3.59×10^4copies/μL、8.79×10^4copies/μL、1.76×10^4copies/μL。

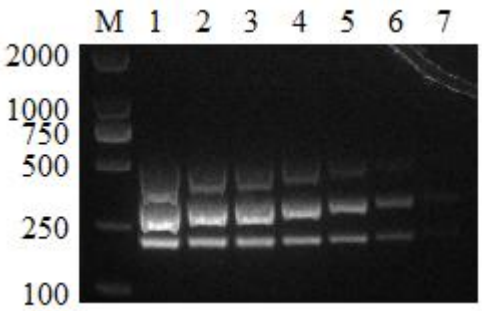

图 5. 多重 PCR 灵敏度的确定

M: DL 2, 000 DNA Marker; 1-7:阳性质粒分别稀释 10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}、10^{-6}、10^{-7} 倍

7. 多重 PCR 体系的特异性鉴定

各取 200 μL PEDV、PDCoV、TGEV、BVDV、CSFV、PRRSV、SIV 病毒液，提取 RNA 并反转录为 cDNA，分别以此为模板，进行多重 PCR 体系扩增。结果显示（图 6），仅 PEDV、PDCoV 和 TGEV 扩增出相应大小的目的条带，其余均为阴性。表明该多重 PCR 体系特异性较好。

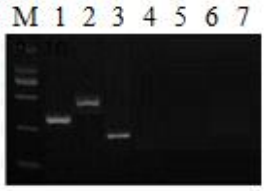

图 6. 多重 PCR 特异性鉴定

M: DL 2, 000 DNA Marker; 1: PEDV; 2: PDCoV; 3: TGEV; 4: BVDV; 5: CSFV; 6: PRRSV; 7: SIV;

8. 多重 PCR 体系的重复性检测

提取不同批次 PEDV、TGEV 和 PDCoV 质粒模板，按上述优化好的体系进行多重 PCR 扩增。结果显示（图 7），3 个批次的 PCR 结果相一致，均能特异性扩增出 PEDV、TGEV 和 PDCoV 目的条带。说明该多重 PCR 体系的重复性较好。

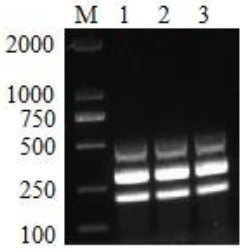

图 7. 多重 PCR 检测方法的重复性鉴定

9. 临床样品检测

9.1 样品采集

在上海某猪场共采集 65 份猪腹泻粪便样品。

9.2 样品处理

在装有粪便的 EP 管中加入 1mL 灭菌的 0.01M PBS（pH7.2），置于振荡仪上充分震荡 30s，静置 5min。-20℃/室温反复冻融 3 次后，12, 000r/min 离心 5min，取 300μL 上清，用于核酸提取，或置于-20℃保存备用。

9.3 样品检测

利用多重 PCR 检测方法和单一 PCR 检测方法，分别对采集的粪便样品进行检测。结果显示（表 4），多重 PCR 和单一 PCR 检测方法的符合率为 100%，其中 PEDV 与 PDCoV 混合感染 4 份，PEDV 和 TGEV 混合感染 1 份。表明该多重 PCR 体系特异性强，敏感性高，可适用于临床腹泻样品筛查。

表 4. 多重 PCR 检测技术的临床应用

样品数量	多重 PCR			单一 PCR		
	PEDV	TGEV	PDCoV	PEDV	TGEV	PDCoV
65	38	2	4	38	2	4