

黄金,李思远,谢玲玲,等. 牛冠状病毒 TaqMan 荧光定量检测方法的建立及国内部分地区流行病学调查[J]. 江苏农业科学,2023,51(17):29-33.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.17.004

牛冠状病毒 TaqMan 荧光定量检测方法的建立 及国内部分地区流行病学调查

黄金^{1,2}, 李思远^{1,7}, 谢玲玲⁴, 周迪⁴, 杨蓉⁴, 王松⁵, 周华⁶, 蔡旭航^{1,7}, 李基棕^{1,2,3}, 李彬^{1,2,3}

(1. 江苏省农业科学院兽医研究所/农业农村部兽用生物制品工程技术重点实验室, 江苏南京 210014;

2. 南京农业大学动物医学院, 江苏南京 210095; 3. 江苏大学生命科学学院食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013;

4. 贵州省种畜禽种质测定中心, 贵州贵阳 550018; 5. 贵州省草地技术试验推广站, 贵州贵阳 550025;

6. 黔西市动物疫病预防控制中心, 贵州黔西 551500; 7. 西北农林科技大学动物医学院, 陕西杨凌 712100)

摘要:牛冠状病毒(BCoV)在全球广泛存在,在临床上能引起牛腹泻以及呼吸道感染,给养殖业带来巨大经济损失。为快速批量检测临床样品、分析国内的 BCoV 隐性感染及流行情况,根据 BCoV 的 *N* 基因序列设计了引物和探针,建立了 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 检测方法,对其特异性、敏感性、重复性进行评估,并将其与靶向 BCoV 的 *N* 基因的常规 RT-PCR 方法进行对比。利用本方法对采集自我国西藏、江苏、河北、贵州、安徽等 5 个省份的 22 个未发病牛场的 35 份口腔拭子样品和 244 份粪便样品进行检测以了解流行情况。结果表明,质粒标准品拷贝数的对数与 C_T 值呈现良好稳定的负线性关系,标准曲线为 $y = -3.4418x + 39.5840$, $r^2 = 0.9994$, $E = 98.2\%$;最低检测拷贝数为 6.0×10 拷贝/ μL ,重复性变异系数均 $< 5\%$;对临床样品进行检测,检出率明显高于常规 RT-PCR 方法。对 22 个牛场的 279 份病料进行检测,结果显示 BCoV 的总体阳性率为 73.12%,牛场阳性率为 100.00%。本研究成功建立了靶向 BCoV *N* 基因、灵敏度高、特异性好的荧光定量 RT-PCR 检测方法,并初步掌握了我国 5 个省份 BCoV 的流行现状,为后续 BCoV 研究奠定了基础。

关键词:牛冠状病毒;TaqMan 荧光定量;样品检测;隐性感染;RT-PCR

中图分类号:S852.65⁺3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)17-0029-05

牛冠状病毒(bovine coronavirus, BCoV)隶属于套式病毒目冠状病毒科冠状病毒属,为有囊膜的基因组为线性单股正链的 RNA 病毒^[1],临床上常引起犊牛出血性腹泻、成年牛冬季痢疾和呼吸道疾病。该病毒在世界范围内广泛存在,除感染牛以外,也可以感染野生反刍动物,如羊驼、麋鹿等。1988 年,研究人员从德国 1 名儿童腹泻样品中分离出 1 株与 BCoV 基因组关系密切的毒株,提示 BCoV 存在跨物种传播的可能^[2]。BCoV 已严重影响病畜的生长发育和养牛业的健康发展,给养牛业造成了巨大的经济损失。

不同病原引起犊牛腹泻在临床和病理变化上极为相似,而利用 PCR 技术进行检测具有灵敏度高、特异性强、快速简单等优点,在病原诊断和流行病学调查方面具有十分重要的地位。BCoV 的全基因组大小约为 32 kb,能编码 5 种主要结构蛋白,而其中高度保守的 *N* 基因序列常常被作为诊断 BCoV 病的靶向基因^[3]。在此理论基础上,本研究以 *N* 蛋白核苷酸序列为靶向,建立了检测 BCoV 的 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 方法,能够实现特异、灵敏、快速批量检测临床样品,便于开展 BCoV 的流行病学调查;本研究对我国 5 个省份的 22 个 BCoV 未发病牛场共 279 份牛样品进行筛查,旨在了解我国不同地区 BCoV 的流行感染情况,为我国部分地区的流行病学调查提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 病料、菌株及临床样品

BCoV 病料、牛病毒性腹泻病毒(bovine viral diarrhea virus, BVDV)、牛轮状病毒(bovine rotavirus,

收稿日期:2022-11-11

资助项目:国家重点研发计划(编号:2021YFD1801101);江苏省自然科学基金(编号:BK20221432)。

作者简介:黄金(1999—),女,江西省赣州市人,硕士研究生,从事动物传染病防治和诊断技术研究。E-mail:1748916481@qq.com。

通信作者:李基棕,博士,副研究员,从事家畜重要疫病的病原学、致病机制与免疫防控技术研究, E-mail:lijizong22@sina.com;李彬,博士,研究员,从事动物腹泻病防控技术、重要猪病感染与免疫的分子机制、新型疫苗和诊断试剂开发等研究, E-mail:libinana@

126.com。

BRV)、牛星状病毒(bovine astrovirus, BAstV)、牛副流感病毒(bovine parainfluenza virus, BPIV)、牛传染性鼻气管炎病毒(infectious bovine rhinotracheitis virus, IBRV)、牛腺病毒(bovine adenovirus, BAV)、牛呼吸道合胞体病毒(bovine respiratory syncytial virus, BRSV)、牛源大肠杆菌 K99、牛源产气荚膜梭菌的核酸样品,均由江苏省农业科学院兽医所实验室保存。

用于临床样品检测的样品:279 份样品,2021 年 2 月至 2022 年 7 月采集自西藏、江苏、河北、贵州、安徽各地的 22 个牧场,其中,河北 7 个牧场 56 份,西藏 9 个牧场 94 份,江苏 4 个牧场 66 份,贵州 1 个牧场 31 份,安徽 1 个牧场 32 份。所有样品均于江苏省农业科学院兽医所实验室 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2 主要试剂

RNA 提取试剂盒、HiScript[®] II RT SuperMix for qPCR、2 × Phanta Max Master Mix (Dye Plus)、AceQ[®] qPCR Probe Master Mix 等,均购自 Vazyme 公司;质粒提取试剂盒、胶回收提取试剂盒,购自 Omega Bio - Tek 公司;pMD19 - T 载体,购自 TaKaRa 公司;DNA Marker 购自南京擎科生物科技有限公司。

1.3 引物合成

根据 BCoV (GenBank, MW711303.1) N 蛋白核苷酸序列,选择 N 基因保守区域设计 TaqMan 法的特异性检测引物(BCoV - F, BCoV - R)和探针及构建质粒标准品的引物(N - F, N - R),由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,详见表 1。

表 1 用于扩增 N 基因的引物和探针

引物名称	引物序列(5'→3')	扩增片段大小(bp)
BCoV - F	TGCTGCCACGATGCTATTTTT	101
BCoV - R	TGGTTACTAGCCGACCCAGAAGAC	
探针	FAM - CTATCTTGGAAACAGGACCGCATGCCA - BHQ1	
N - F	CGGGATCCATGTCTTTTACTCCTGGT	1 376
N - R	CCGCTCGAGTTATATTTCTGAGGTGTC	

1.4 标准品的构建与鉴定

2021 年 2 月,通过临床样品检测鉴定得到 BCoV 阳性病料。对 BCoV 阳性病料进行处理后,采用 RNA 提取试剂盒获取 RNA,反转录为 cDNA,以其为模板,采用引物 N - F、N - R 进行 PCR 扩增;获得 PCR 产物跑核酸胶,胶回收后连接至 pMD19 - T 载体;转化 Trans5 α 、挑菌、提质粒,经常规 PCR 鉴定

后,将阳性质粒送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,将测序正确的 BCoV 重组质粒作为标准品,测浓度,计算拷贝数。

1.5 优化反应体系及条件

20.0 μL 反应体系(Mix 10.0 μL , 探针 0.2 μL , 上下游引物各 0.4 μL , 染料 0.4 μL , 模板 2.0 μL , ddH₂O 6.6 μL),优化退火温度 T_m ($55\sim 65\text{ }^{\circ}\text{C}$),通过分析 C_T 值和扩增曲线,确定最佳 T_m ;再以优化的最佳 T_m 对浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的引物用量(0.2 ~ 1.2 μL)及 10 $\mu\text{mol/L}$ 的探针用量(0.1 ~ 1.0 μL)进行优化。

1.6 标准曲线的建立

将标准品稀释 $10^1\sim 10^{12}$ 倍后作为检测模板,采用 TaqMan 荧光定量 RT - PCR 方法检测,获得拷贝数与 C_T 值的线性关系,从而建立标准曲线。

1.7 特异性检验

以 BCoV、BVDV、BRV、BAstV、BPIV、IBRV、BAV、BRSV、牛源大肠杆菌 K99、牛源产气荚膜梭菌的 cDNA/DNA 为模板,以标准品 (6.0×10^3 拷贝/ μL) 为阳性对照,ddH₂O 为阴性对照加以扩增。

1.8 敏感性检验

将稀释的标准品作为模板,ddH₂O 为阴性对照扩增,每个稀释度做 3 次重复,与常规 RT - PCR 进行比较。

1.9 重复性检验

对 6×10^4 、 6×10^6 、 6×10^8 拷贝/ μL 稀释度的标准品进行批内重复性试验,每个检测浓度设置 3 次重复,分 3 个时间段。

1.10 样品检测

在 35 份牛口腔拭子样品中加入 500 μL 已灭菌的 PBS,涡旋,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 3 min 后,取病毒上清液 200 μL 加入 400 μL 的 RL 裂解,获得总 RNA,反转录为 cDNA;244 份牛粪样品各取 1 g 加 500 μL 已灭菌的 PBS 充分涡旋,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 5 min,步骤同上。以获得的 cDNA 为模板,利用建立的 TaqMan 法进行 BCoV 检测,选 10% 阳性 PCR 产物送公司测序。

1.11 2 种 RT - PCR 符合率的比较试验

将 35 份牛口腔拭子和 244 份牛粪便样品的 cDNA 分别用建立的荧光定量方法和常规 RT - PCR 分别检测,比较检测结果,同时送去测序,计算 2 种方法的符合率。

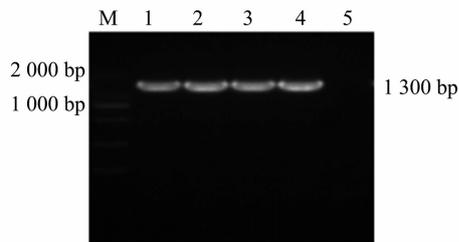
2 结果与分析

2.1 重组质粒的鉴定

以病料 BCoV 的 cDNA 为模板,利用引物 N-F/R 进行 PCR 扩增,样品跑胶后获得 N 基因片段全长,大小约为 1 300 bp(图 1);切胶回收连于 pMD-19T 载体,转化入 Trans5 α ,挑菌、摇菌提质粒鉴定,阳性质粒送测序,结果在 NCBI 上与 BCoV 其他株比对,同源率为 100.00%,说明重组质粒构建成功。测得浓度为 263.47 ng/ μ L,相应的拷贝数为 6.0×10^{12} 拷贝/ μ L。

2.2 反应条件的优化结果

最佳反应体系及条件如下: AceQ[®] qPCR Probe Master Mix 10.0 μ L, 探针 0.2 μ L, 上下游引物各 0.4 μ L(10 μ mol/L), 染料 0.4 μ L, 模板 2.0 μ L, ddH₂O 6.6 μ L。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s,



M—DL2000 DNA marker; 1-4—反转录 PCR 产物; 5—阴性对照
图1 BCoV 的 N 基因 PCR 扩增结果

60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。

2.3 扩增曲线和标准曲线的建立

将稀释成 $6 \times 10^7 \sim 6 \times 10^{12}$ 拷贝/ μ L 的标准品分别作为模板扩增,获得曲线。由图 2 可知,标准品在 $6 \times 10^7 \sim 6 \times 10^8$ 拷贝/ μ L 与 C_T 值呈现良好的负线性关系,得到标准曲线 $y = -3.4418x + 39.5840$, $r^2 = 0.9994$, 扩增效率 (E) 为 98.2%。

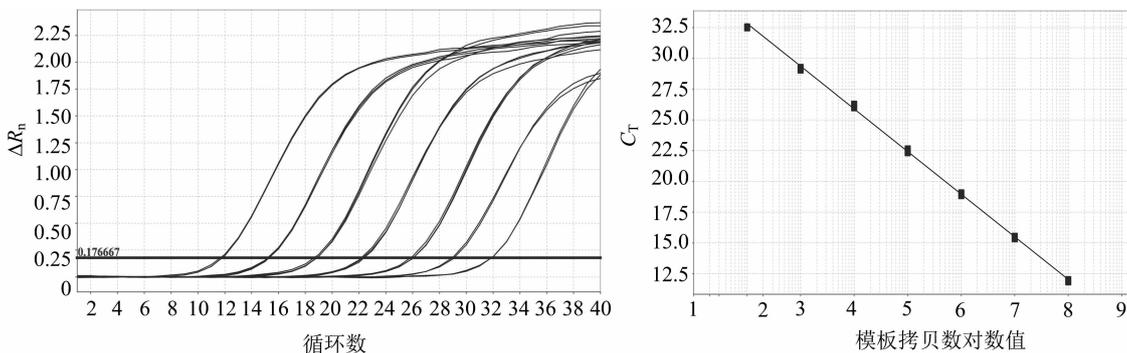


图2 BCoV 荧光定量 RT-PCR 方法扩增曲线(左)和标准曲线(右)

2.4 特异性检验结果

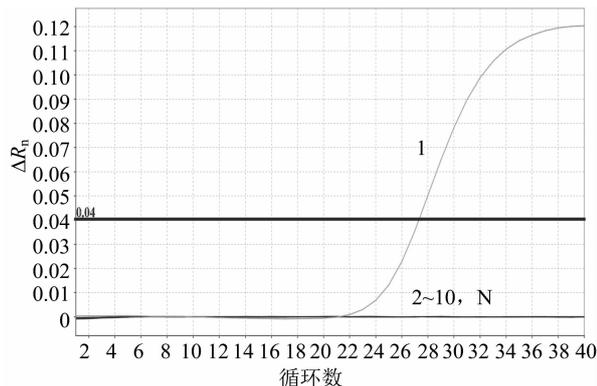
采用该方法对 BCoV 标准品及牛常见腹泻病原的核酸进行检测,结果(图 3)表明,BCoV 的标准品扩增结果为阳性,其他病原的核酸扩增结果均为阴性,表明该方法的特异性较强。

2.5 敏感性检验结果

采用该方法对经过 10 倍比稀释的标准品 ($6 \times 10^7 \sim 6 \times 10^{12}$ 拷贝/ μ L) 进行扩增,并设置 ddH₂O 为阴性对照。由图 4 可知,本方法对重组质粒标准品的最低检出拷贝数为 6.0×10^3 拷贝/ μ L, 对应 C_T 值约为 36, 敏感性为 6.0×10^3 拷贝/ μ L, 与文献报道的检测下限^[4] 几乎相同; RT-PCR 的最低检出拷贝数为 6.0×10^3 拷贝/ μ L, 表明该荧光定量方法敏感性更高。

2.6 重复性检验结果

在不同时间段用 3 个不同稀释度的标准品分别进行重复性试验,结果(表 2)表明,该方法的批内和



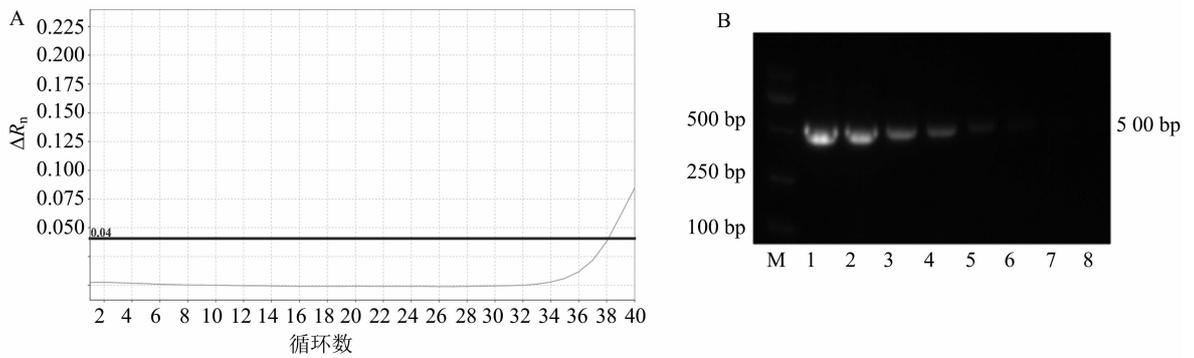
1—BCoV 重组质粒标准品; N—阴性对照; 2~10—BVDV、BRV、BAstV、BPIV、IBRV、BAV、BRSV、牛源大肠杆菌 K99、牛源产气荚膜梭菌

图3 特异性检验结果

批间的变异系数均低于 5%, 具有良好的重复性。

2.7 常规 RT-PCR 和 TaqMan 法荧光定量 RT-PCR 检测方法的比较

由表 3 可知, 常规 RT-PCR 对牛口腔拭子样品



A. 荧光定量 PCR 最低检出拷贝数的分析。TaqMan 荧光定量 RT-PCR 扩增曲线揭示了 6.0×10^4 和 6.0×10^6 拷贝/ μL BCoV 重组质粒的荧光值。B. 10 倍比稀释的 BCoV 重组质粒在 PCR 中的最低检出拷贝数的分析。M—DL 2 000 DNA marker; 1~7— $6 \times 10^8 \sim 6 \times 10^2$ 拷贝/ μL 重组质粒; 8—阴性对照

图4 最低检出拷贝数的确定

表2 TaqMan 法荧光定量 RT-PCR 的重复性 ($n=3$)

DNA 浓度 (拷贝/ μL)	批内重复试验的 C_T 值		批间重复试验的 C_T 值	
	$\bar{x} \pm s$	CV (%)	$\bar{x} \pm s$	CV (%)
6×10^4	26.19 ± 0.26	0.67	26.65 ± 0.31	0.84
6×10^6	19.33 ± 0.18	0.57	204.22 ± 0.26	0.20
6×10^8	12.98 ± 0.42	1.05	13.51 ± 0.72	0.96

($n=35$) 和牛粪样品 ($n=244$) 的检出率分别为 80.00% 和 34.01%, TaqMan 法荧光定量 RT-PCR 检测方法则为 91.42% 和 70.49%; 2 种方法检测牛口腔拭子的阳性符合率为 87.50%, 检测牛粪样品的阳性符合率为 48.25%。测序结果经比对后发现, 荧光定量方法判定为阳性的均为 BCoV 片段, 表明本研究建立的方法准确性相对更高。

表3 RT-PCR 和 TaqMan 法荧光定量 RT-PCR 检测结果

检测方法	牛口腔拭子样品 ($n=35$)		牛粪样品 ($n=244$)	
	检出率 (%)	阳性符合率 (%)	检出率 (%)	阳性符合率 (%)
本试验方法	91.42	87.50	70.49	48.25
RT-PCR	80.00		34.01	

2.8 临床样品的检测结果

本次试验共检测 279 份样品, 包括牛口腔拭子样品 35 份, 牛粪便样品 244 份。由表 4 可知, BCoV 的总检出率为 73.12%, 牛场阳性率为 100.00%。为验证本次试验检测数据的真实可靠性, 随机选取判定为阳性的样品进行测序验证, 结果与预期相符, 表明此方法可行。

3 讨论与结论

BCoV 是引起牛消化道和呼吸道疾病的主要病

表4 临床样品中 BCoV 的检测结果

省份	牛场数 (个)	阳性牛场数 (个)	样品数 (份)	阳性样品数 (份)	阳性率 (%)
河北	7	7	56	33	58.93
西藏	9	9	94	90	95.74
江苏	4	4	66	64	96.97
贵州	1	1	31	15	48.39
安徽	1	1	32	2	6.25
合计	22	22	279	204	73.12

原之一。1972 年, 美国的 Mebus 等曾在牛的腹泻病料中检出 BCoV 病原, 此后在世界各地均陆续大量报道了该病的发生^[5]。1985 年, 宋广林等首次报道了 BCoV 在我国大陆的存在情况^[6], 随后在我国各省多次成功检出 BCoV, 阳性率高达 70%, 说明此病毒已在我国长期持续存在。但目前尚未研发出有效的疫苗及药物, 因此, 早期采取合理有效的疫病监测手段, 及时淘汰阳性牛、隐形感染牛, 是减少畜牧养殖业经济损失, 遏制疾病传播的有效方法。

目前, 国内外检测 BCoV 的方法有很多种, 而实时荧光定量 PCR 检测速度快、敏感性好、特异性强、重复性强、准确率高, 适用于大量样本的快速检测。国内外有些学者先后建立了 BCoV 的 RT-PCR^[7]、染料法荧光定量 PCR^[8-9], 而 TaqMan 法比其特异性更高。谭烁等以 nsp10 为靶向, 建立了 BCoV 检测方法, 与国外利用 M 基因方法进行比较, 发现结果存在偏差, 研究发现存在偏差的可能原因是 M 基因变异^[4]。因此, 本研究选择了 BCoV 保守的基因 N 为靶向设计引物和探针, 避免传统检测方法中因为基因突变所产生的假阴性结果。本试验将重组质粒进行 10 倍比稀释作为标准品, 获得标准曲线 $y = -3.4418x + 39.5840$, $r^2 = 0.9994$, $E = 98.2\%$,

表明所建立的方法扩增效率高,重复性强;检测实验室保存的常见腹泻病原的核酸,结果表明建立的检测方法能准确检测出 BCoV,不产生交叉干扰;同时本试验的检测方法最低可检测到 6×10 拷贝/ μL 的核酸模板,与高辉等建立的荧光定量检测方法灵敏度在一个数量级上^[10]。采用建立的检测方法,对 5 个省份的 22 个未发病牧场进行流行病学调查,采用常规 RT-PCR 进行同步检测,检测结果基本相符并且荧光定量检出的阳性数量多于常规 RT-PCR,表明所建立的方法具有更高的灵敏性和准确性。

对 5 个省份 22 家牧场未发病的样品进行检测,牛场阳性率高达 100%,说明我国牛场 BCoV 的感染率很高,BCoV 广泛存在于牛场,但是常表现为不发病的隐性感染,潜伏性很强,通过临床表现观察不能检出。同时,有研究表明,BCoV 导致牛群的发病与环境有很大关系,牛群的群体抵抗力下降(如环境不良等),易发生 BCoV 病^[11],提示或许是我国牛场养殖不规范不合理,生物安全防控不到位,导致我国牛场感染率过高。在 5 个省份牛场对 BCoV 病原的检测中,5 个省份的检出率从 6.25%~96.97% 不等,5 个省份的阳性检出率差别大。其中,江苏、西藏的感染率高,河北、贵州次之,安徽的感染率最低,这与刘蓉菁等的结果^[12]一致。江苏、西藏、河北的感染率均高于 50%,提示该地区导致牛腹泻的主要病原很可能是 BCoV,需要引起高度重视;西藏、江苏的阳性率高于 90%,推测两省对于 BCoV 的生物安全防控不是特别到位,导致 BCoV 在各省内大范围传播;西藏地区主要为牦牛,推测牦牛与普通牛相比更易感 BCoV;或是牦牛的饲养方式与其他省份不同,牦牛的主要饲养方式是放牧,更容易导致病原的传播;或者西藏地区是否进化出使牦牛易感的特殊 BCoV 株;安徽省在此次检测中检出 BCoV,与杨海峰等的研究结果^[12]不一致,表明 BCoV 在我国的传染范围变大且持续存在。BCoV 是感染消化道和呼吸道的病原,因此本次研究统一采用检测口腔拭子和牛粪便的方法,结果表明口腔拭子的检出率明显高于牛粪便,呼吸道型 BCoV 明显高于腹泻型 BCoV,这与高辉等的调查结果^[10]是一致的,推测可能是呼吸道 BCoV 引发的呼吸道疾病综合征^[13-14]在临床上的表现症状轻,不易察觉;其次,本次结果提示在我国 BCoV 引起呼吸道感染的症状多于腹泻症状,但是由于本次口腔拭子样品有限,还需进一步检测研究。

本研究建立了一种以 BCoV 保守的 *N* 基因为靶向的 TaqMan 荧光定量方法,能够快速、特异、灵敏地检出 BCoV 的核酸;运用此检测方法对我国 5 省 22 个牧场进行流行病学调查,结果表明我国 5 省的 BCoV 总阳性率为 73.12%,牛场阳性率高达 100.00%。

参考文献:

- [1] 高国强,王梦心,刘明明,等. 牛冠状病毒 S 基因的序列分析及原核表达[J]. 中国畜牧兽医,2018,45(7):1740-1749.
- [2] Kin N, Miszczak F, Diancourt L, et al. Comparative molecular epidemiology of two closely related coronaviruses, bovine coronavirus (BCoV) and human coronavirus OC43 (HCoV-OC43), reveals a different evolutionary pattern[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2016,40:186-191.
- [3] Lapps W, Hogue B G, Brian D A. Sequence analysis of the bovine coronavirus nucleocapsid and matrix protein genes[J]. Virology, 1987,157(1):47-57.
- [4] 谭 烁,汤 承,何琪富,等. 牛冠状病毒 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 中国预防兽医学报, 2020,42(9):918-923.
- [5] Mebus C A, Stair E L, Rhodes M B, et al. Pathology of neonatal calf diarrhea induced by a coronavirus-like agent[J]. Veterinary Pathology, 1973,10(1):45-64.
- [6] 宋广林,董惠兰,滕 庆,等. 犊牛流行性腹泻病原研究[J]. 畜牧兽医学报,1985,16(2):121-124.
- [7] 何琪富,郭紫晶,李 然,等. 牛冠状病毒 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J]. 畜牧兽医学报,2018,49(10):2292-2298.
- [8] 沈付晓,杨建乐,赵贵民,等. 牛冠状病毒 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 中国兽医杂志, 2016,52(6):22-24,27.
- [9] Decaro N, Elia G, Campolo M, et al. Detection of bovine coronavirus using a TaqMan-based real-time RT-PCR assay[J]. Journal of Virological Methods, 2008,151(2):167-171.
- [10] 高 辉,李晓成,刘 莹,等. 牛冠状病毒实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J]. 黑龙江畜牧兽医,2022(6): 86-91.
- [11] Decaro N, Mari V, Desario C, et al. Severe outbreak of bovine coronavirus infection in dairy cattle during the warmer season[J]. Veterinary Microbiology, 2008,126(1/2/3):30-39.
- [12] 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):92-96.
- [13] Altekruze S F, Swerdlow D L, Stern N J. Microbial food borne pathogens. *Campylobacter jejuni* [J]. Veterinary Clinics of North America (Food Animal Practice), 1998,14(1):31-40.
- [14] Zhu Q H, Su M J, Li Z J, et al. Epidemiological survey and genetic diversity of bovine coronavirus in Northeast China [J]. Virus Research, 2022,308:198632.