

王莎莎,王吉,岳秉飞. 牛冠状病毒荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(4): 69 – 73.
Wang SS, Wang J, Yue BF. Establishment of a fluorescent quantitative PCR detection method for bovine coronavirus and its preliminary application [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(4): 69 – 73.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.04.012

牛冠状病毒荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用

王莎莎,王 吉*,岳秉飞*

(中国食品药品检定研究院,北京 102629)

【摘要】 目的 建立特异灵敏的牛冠状病毒(bovine coronavirus,BCV)荧光定量 PCR 检测方法,并对牛源性样本进行筛查。方法 根据 Genbank 中登录的 BCV 的 N 基因序列设计 TaqMan 引物探针,建立基于 TaqMan 探针法的 BCV PCR 检测方法,对收集到的牛源样本进行 BCV 筛查,并对部分阳性样本的 PCR 产物进行测序鉴定。结果 建立了能够特异检测 BCV 的 TaqMan 探针法荧光定量 PCR 检测方法,其标准曲线相关系数 Slope 为-3.417,相关系数 r^2 为 0.999,扩增效率 Eff 为 96.195%。该方法检测 BCV 的灵敏度为 40 copies。使用该方法检测 64 份牛肛拭子样本检出率为 1.5%,检测 33 份牛源生物制品检出率为 6%,部分阳性样本的 PCR 产物经测序比对为 BCV 核酸序列,说明 BCV 在国内牛群中流行,牛源相关生物制品中有感染 BCV 的潜在风险。结论 经测序验证,建立的方法能够灵敏的检测样本中的 BCV 核酸,应加强牛源相关生物制品中 BCV 的监测,避免人感染 BCV 的潜在风险。

【关键词】 牛冠状病毒;TaqMan 探针法荧光定量 PCR 方法;检测和初步应用

【中图分类号】 R-33 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-7856(2019) 04-0069-05

Establishment of a fluorescent quantitative PCR detection method for bovine coronavirus and its preliminary application

WANG Shasha, WANG Ji*, YUE Bingfei*
(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the prevalence of bovine coronavirus (BCV) in bovine herds and bovine-derived bioproducts. **Methods** A fluorescent quantitative PCR (FQ-PCR) method for BCV was developed based on a pair of primers and a TaqMan probe, in accordance with the published sequence of BCV. **Results** The assay could specifically detect BCV and had good sensitivity, with a limit of detection of 40 copies. The FQ-PCR method achieved a good linear relationship within the template concentration range from 10^3 to 10^7 copies/ μ L, with a correlation of 0.999. The amplification efficiency of the assay was 96.195%. A total of 64 bovine rectal swabs and 33 bovine-derived bioproducts were subjected to the FQ-PCR assay, and the positivity rates were 1.5% and 6%, respectively. The positive sample was amplified with another pair of primers for the N gene. **Conclusions** The results of this study demonstrated that the PCR

[基金项目] 中国食品药品检定研究院学科带头人基金项目(2015X5)。
[作者简介] 王莎莎(1989—),女,免疫学硕士研究生。E-mail: wangsha0316@126.com
[通信作者] 岳秉飞,男,研究员,研究方向:实验动物学,E-mail: y6784@126.com。王吉,女,副研究员,从事微生物学和免疫学研究,E-mail: wj_nd_jds@sina.com。* 共同通信作者

product had 99% similarity to BCV, suggesting the existence of a BCV epidemic in bovine herds and the potential risk of BCV contamination in bovine-derived bioproducts.

【Keywords】 bovine; TaqMan FQ-PCR method; bovine coronavirus detection

牛冠状病毒 (bovine coronavirus, BCV) 是一类具有包膜,基因组为 27~30 kb 大小的线性单股正链的 RNA 病毒^[1],具有感染性,是所有 RNA 病毒中最大的。BCV 是冠状病毒科冠状病毒属成员,目前冠状病毒共分为 α 、 β 、 γ 以及新假定的一个属共四类,牛冠状病毒和鼠肝炎病毒以及 SARS 冠状病毒等同属 β 类冠状病毒^[2]。BCV 与人肠道冠状病毒 4408 株在抗原性和基因序列具有很高的相似性,存在潜在感染人的风险。BCV 是引起新生犊牛腹泻和成年牛冬痢、呼吸道疾病的主要病原,在全球普遍流行。BCV 经常与其他多种病原引发混合感染,难于诊断,通常需要实验室病毒分离、血清检测或者分子学检测方法进行诊断。本研究建立了 BCV 特异的 TaqMan 探针法实时荧光定量 PCR (fluorescence quantitative PCR, FQ-PCR) 检测方法,能够实现快速批量检测牛群中 BCV 的感染情况,并减少污染。该方法可应用于牛源性生物制品 BCV 污染的检测,为保证生物制品安全性提供依据,同时为开展 BCV 基因组的研究打下基础。

1 材料和方法

1.1 样品与毒种来源

牛冠状病毒核酸为哈尔滨兽医研究所惠赠,牛蓝舌病病毒 (bluetongue virus, BTV) 核酸为第二军医大学惠赠,牛疱疹病毒 1 型 (bovine herpesvirus 1, BHV-1)、牛副流感病毒 3 型 (bovine parainfluenza virus 3, BPIV3)、牛病毒型腹泻病毒 (bovine viral diarrhea virus, BVDV)、呼肠孤病毒 III 型病毒 (reovirus 3, Reo3)、小鼠肝炎病毒 (mouse hepatitis virus, MHV) 为本实验室保存。牛肛拭子 63 份 G1~G63,牛鼻拭子 63 份 B1~B63 采集于 2016 年内蒙古牛群,牛源性生物制品 33 份 NY1~NY33 为本实验室 2015 年应急检测样品。

1.2 主要试剂与仪器

FQ-PCR Mix 购自 ABI; FQ-PCR 引物探针由 ABI 公司合成。RNA 快速提取试剂盒 RNeasy Mini Kit (250) (批号:154043816) 购自 Qiagen, AMV 逆转录试剂盒 AMV Reverse Transcriptase (批号:0000290291) 购自 Promega, TaqMan Universal PCR Master Mix (批号:1704286) 购自 ABI。荧光定量 PCR 仪 ABI7500 Fast 购自 ABI 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 引物设计

选择 BCV N 基因保守区域设计引物探针,序列如表 1 所示。

1.3.2 质粒标准品的制备

由 TaKaRa 公司合成 BCV (NCBI ID: AF058942) 7851~8090 bp 的 cDNA 序列,转入 pMD19-T 载体中,构建 BCV FQ-PCR 的标准质粒 pMD19-BCVN,浓度为 4.0×10^{10} Copies/ μ L。

1.3.3 病毒 cDNA 的获取

将牛冠状病毒、牛疱疹病毒 I 型、牛副流感病毒 3 型、牛病毒型腹泻病毒、呼肠孤病毒 III 型、小鼠肝炎病毒、牛肛拭子 63 份;牛鼻拭子 63 份;牛源性生物制品 33 份等样品按照 RNA 快速提取试剂盒操作方法进行 RNA 提取。提取的 RNA 按照 Promega AMV 逆转录试剂盒获取 cDNA,保存于 -80°C 备用。

1.3.4 BCV FQ-PCR 扩增体系及标准曲线的建立

经条件优化,PCR 反应体系为: TaqMan Universal PCR Master Mix 10 μ L, 探针引物混合物 (10 μ mol/L) 1 μ L, 无 RNA 酶水 7 μ L, 模板 1 μ L。反应条件: 50°C 2 min; 95°C 10 min; 95°C 15 s, 60°C 1 min, 40 个循环。

将 pMD19-BCVN 作为标准品,进行 10 倍系列稀释为 $10^9 \sim 10^0$ copies/ μ L, 将其作为模板,按上述反应体系和反应条件进行 FQ-PCR 反应,每个稀释度做 3 个平行实验,选取线性较好的 7 个稀释度绘制标准曲线。

表 1 用于扩增 N 基因的引物与 TaqMan 探针序列
Table 1 Primers and TaqMan probe sequences for the N gene amplification

引物名称 Primer names	引物序列 (5'-3') Primer sequences	序列位置 Primer loations	扩增子大小 (bp) PCR product size
BCVF	TCCTGGTAAGCAATCCAGTAGTAGAG	7922~7947	117
BCVR	GCTCTTCTACCCCTGGTTTGAAC	8016~8038	
探针	(FAM) CTGATCGGCCCCACTTAA (MGB)	7981~7997	/

1.3.5 BCV FQ-PCR 检测方法的特异性、灵敏性、准确性和稳定性检测

使用建立的荧光定量 PCR 方法检测 BCV、牛疱疹病毒 1 型、牛副流感病毒 3 型、牛病毒性腹泻病毒、呼肠孤病毒 III 型、小鼠肝炎病毒、牛蓝舌病毒的病毒核酸,并设立阴性对照 N/C(空白样品)检测 BCV 实时荧光定量 PCR 检测方法的特异性;使用 $4.0 \times 10^9 \sim 4.0 \times 10^0$ copies/ μL 稀释的标准质粒作为模板,进行 BCV FQ-PCR 反应,每个稀释度做三个平行,检测方法的灵敏性;用 BCV FQ-PCR 检测方法对 3 份不同阳性样品进行重复检测,评价本发明方法的准确性和稳定性。

1.3.6 BCV FQ-PCR 污染实验

将 $10^0 \sim 10^{-7}$ 梯度稀释的 BCV 病毒液和 $10^0 \sim 10^{-7}$ 梯度稀释的 BCV RNA 0.1 mL 与 0.2 mL 的鼠神经生长因子混合后按 1.3.3 所述方法获取 cDNA,并使用 BCV FQ-PCR 方法进行检测,验证其适用性,每个稀释度做 3 个平行。

1.3.7 BCV FQ-PCR 的应用

使用建立的 FQ-PCR 方法检测 63 份牛肛拭子,63 份牛鼻拭子以及 33 份牛源生物制品中 BCV 的感染情况。如有阳性结果,使用 PCR 引物 BCV-PF: 5'-CGATGAGGCTATTCCGACTAGG-3'; BCV-PR: 5'-GCTTAGTTACTTGCTGTGGC-3' (未发表) 对其进行 PCR 扩增,产物送北京英潍捷基公司进行测序鉴定,以进一步验证。

2 结果

2.1 BCV FQ-PCR 扩增体系及标准曲线的建立

使用 4.0×10^9 copies/ μL 到 4.0×10^3 copies/ μL 的标准质粒作为模板进行 FQ-PCR 反应,扩增曲线如图 1,构建的标准曲线如图 2。扩增曲线各稀释度间距均匀,标准曲线相关系数 Slope 为 -3.417 (在 -3 ~ -3.5 之间), r^2 值为 0.999 (>0.99) 说明相关性高,定量结果有效,扩增效率 Eff 为 96.195% (90%~110%之间)。标准品及待测样本 3 个重复的标准差 (CT_{SD} 值)均小于 0.218。

2.2 BCV FQ-PCR 特异性检测

如图 3 所示,建立的 BCV FQ-PCR 检测 BHV-1、BPIV3、BVDV、Reo3、BTV 均无 S 型扩增曲线,而 BCV 有 S 型扩增曲线,CT 值为 22,阴性对照无 S 型扩增曲线,说明该方法能特异的检测 BCV。

2.3 BCV FQ-PCR 灵敏性检测

如图 4 所示, $4.0 \times 10^9 \sim 4.0 \times 10^1$ copies/ μL 各稀释度的 3 个平行实验均有 S 型扩增曲线, 10^1 copies/ μL 标准品检测的 CT 值为 34.088,拷贝数为 43.45copies,而 10^0 copies/ μL 的 3 个平行实验只有 1 个实验有 S 型扩增曲线,CT 值>35,说明 BCV FQ-PCR 检测方法最小能可靠的检测到 40copies 的样品。同时确定该检测方法的判定标准为样品循环阈值 (CT) ≤ 35 ,同时拷贝数 (Copies) ≥ 10 ,判定该样品检测结果为阳性;循环阈值 (CT) ≥ 35 、拷贝数 (Copies) < 10 ,或者循环阈值 (CT) < 35 、拷贝数 (Copies) ≥ 10 ,或者循环阈值 (CT) < 35 、拷贝数 (Copies) < 10 ,此样品超出检测限,不能确定被检样品是阳性样品,结果判为阴性。

2.4 BCV FQ-PCR 准确性和稳定性检测

起始浓度分别为 4.0×10^6 copies/ μL 、 4.0×10^5 copies/ μL 、 4.0×10^4 copies/ μL 的标准品的最终实测值的均值分别为 4.78×10^6 、 3.89×10^5 、 3.7×10^4 copies/ μL ,对应 CT_{SD} 值分别为 0.038、0.113、0.102,CV 值分别为 0.228、0.547、0.424。3 个浓度梯度 3 次重复实验 Ct 值的变异系数 (CV) 均小于 5%,表明方法重复性、稳定性良好。

2.5 BCV FQ-PCR 污染实验

BCV FQ-PCR 检测 BCV 病毒液的污染实验结果显示其检测 $10^0 \sim 10^{-5}$ 稀释度的 CT 值平均值分别为 21.11、23.51、27.14、30.46、32.16、34.75, 10^{-6} BCV 病毒液的 CT 值平均值为 37,超出检测限。BCV FQ-PCR 检测 BCV RNA 污染实验结果显示其 $10^0 \sim 10^{-2}$ 稀释度的 CT 值平均值分别为 25.88、30.17、33.7, 10^{-3} BCV RNA 的 CT 值平均值为 36.49,超出检测限。污染实验结果说明 BCV FQ-PCR 在检测 BCV 病毒和 BCV RNA 污染的样品时有很好的适用性。

2.6 BCV FQ-PCR 的初步应用

检测 63 份牛肛拭子、63 份牛鼻拭子以及 33 份牛源生物制品中 BCV 的感染情况,检测结果如表 1 所示。其中仅有 1 份牛肛拭子 G63 和 2 份牛源生物制品 NY12、NY17 出现阳性结果,G63 的 CT 值为 34.506,NY12、NY17 的 CT 值分别为 33.78 和 34.21。使用 1.5 中所述的引物进行 2 次 PCR 扩增后 G63、NY12 可以得到 457 bp 比较明显的扩增条带,测序结果在 NCBI 上比对,与 BCV B1-28F 株 (NCBI 序列号: KU558923) 的同源性为 99%,与人冠状病毒 OC43 株 (NCBI 序列号: KF530072) 的同源性为 97%。

表 2 BCV FQ-PCR 初步应用检测结果
Table 2 Results of preliminary application of the BCV FQ-PCR assay

样本名称 Samples	牛肛拭子 Bovine rectal swab	牛鼻拭子 Bovine nose swab	牛源生物制品 Bovine derived bioproduct
样本数量 Number	63	63	33
阳性率 Positive rate	1/63 (1.5%)	0	2/33 (6%)

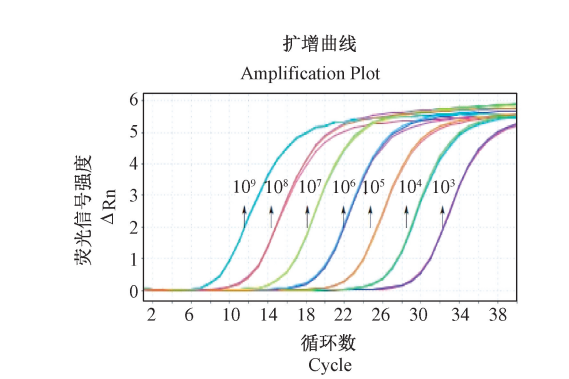


图 1 BCV 10³ ~ 10⁹ copies/μL 扩增曲线
Figure 1 BCV 10³ ~ 10⁹ copies/μL amplification curve

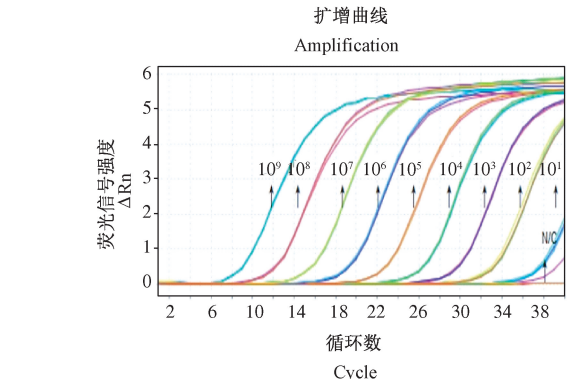
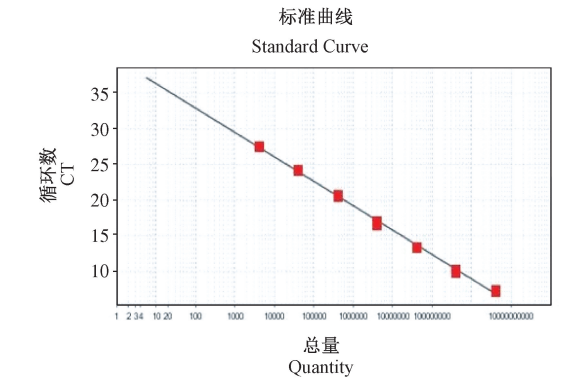
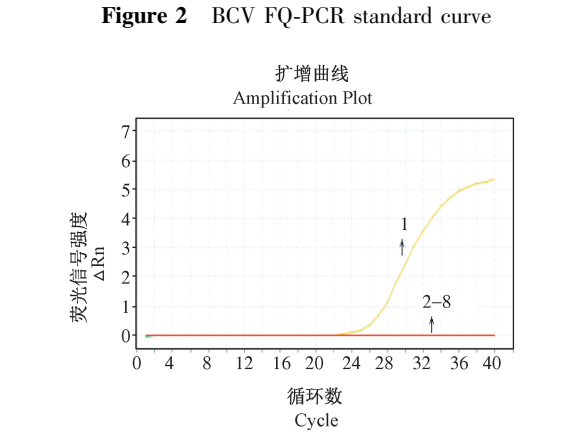


图 4 BCV FQ-PCR 灵敏度检测扩增曲线
Figure 4 BCV FQ-PCR sensitivity test amplification curves



注:斜率: -3.417, Y 轴截距: 39.686, 相关系数: 0.999, 扩增效率: 96.195%。

图 2 BCV FQ-PCR 标准曲线
Note. Slope: -3.417, Y-Inter: 39.686, r²: 0.999, Eff%: 96.195.



注: 1: BCV; 2-8: BHV-1、BPIV3、BVDV、Reo3、MHV、BTV、N/C。

图 3 BCV FQ-PCR 特异性实验扩增曲线
Figure 3 BCV FQ-PCR specificity test amplification curves

3 讨论

BCV 检测方法有很多,但常规检测方法存在耗时长、灵敏性差等不足, FQ-PCR 技术以其灵敏度高、速度快、特异性强等优点在基因表达水平分析、突变和多态性研究、病原体的定性和定量检测等方面得到广泛应用。该方法提供了检测 BCV 的 FQ-PCR 的引物和探针, 以实现样品的批量检测, 有很高的灵敏度和特异性。国内有一些学者建立了 BCV 的染料法荧光定量 PCR^[3], TaqMan 探针法比染料法荧光定量 PCR 特异性更高^[4]。

为了准确检测 BCV, 研究人员选取保守性较高, 且与 MHV 序列差异较大的 N 基因进行引物探针设计。所建立的 FQ-PCR 检测方法, 以重组质粒为标准品, 建立的标准曲线各稀释度间距均匀, 其标准曲线相关系数 Slope 为 -3.417, 相关系数 r² 为 0.999, 扩增效率 Eff 为 96.195%。该方法检测 BCV 的敏感度为 40 copies, 经特异性验证确定其对 BHV-1、BPIV3、BVDV、Reo3、MHV、BTV 等病毒无交叉反应, 准确性和稳定性检测验证该方法 3 个浓度梯度 3 次重复实验 Ct 值的变异系数 (CV) 均小于 5%, 有很好的稳定性和准确性。

污染实验结果说明 BCV FQ-PCR 在检测 BCV 病毒和 BCV RNA 污染的样品时有很好的适用性。污染实验中, 可以准确检测的 BCV 病毒稀释度为 10⁻⁵, 而 BCV RNA 的稀释度为 10⁻², 有可能是因为

RNA 在样品的处理过程中降解严重,虽然使用了无 RNase 的耗材,RNA 的降解有可能是使用的鼠神经生长因子或者别的一些原因。

2017 年北京制定了实验用牛的地方标准,BCV 并未被列入普通级实验用牛需要排除的病原体,然而实验用牛群感染 BCV 存在一定的病发风险,在进行使用牛做动物实验时也应做全面的考虑^[5]。Gomez 等^[6]对 286 份牛粪便样本进行 BCV 检测,发现在健康牛和腹泻牛粪便中均能检测出 BCV 核酸,且腹泻牛粪便样本的检出率高于健康牛粪便样本。建立的 BCV FQ-PCR 方法在内蒙古的健康牛群中检测出阳性样本也说明 BCV 在国内牛群中的普遍流行。BCV 可引发冬痢,冬痢的临床病症为腹泻,有时候便血、发烧、抑郁、牛奶减产、厌食症、有时也咳嗽和流鼻涕,致死性不高,然而 BCV 感染群体有很高的发病率,造成很大的经济损失^[7]。

使用 2 次 PCR 的方法对阳性样本进行了 BCV 片段扩增,G63 和 NY12 样品成功扩增出了 BCV 片段。测序显示其核酸序列与 BCV 和人冠状病毒都有很高的同源性,与人冠状病毒 4408 株的序列同源性高达 98%。这与文献报道一致^[8],且 BCV 在环境中存活时间较长^[9],人鼻粘膜、皮肤、口腔黏膜以及头发都有可能成为 BCV 的传播载体^[10],在人工饲养的牛群和野生反刍动物之间存在交叉感染^[11]。因此,为保证牛源性生物制品的安全性,要加强牛源生物制品的质量管理,建立的 BCV FQ-PCR 检测方法为高通量高敏感性的 BCV 检测提供了技术支持。

参考文献:

- [1] 殷震,刘景华.动物病毒学(第 2 版)[M].北京科学出版社,1997:697-698.
- [2] 耿合员,谭文杰.新近发现的冠状病毒研究进展[J].病毒学报,2013,29(1):65-70.
- [3] 沈付饶,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,(6):22-24.
- [4] 孙留霞,朱平军,李文华,等.牛冠状病毒检测方法的研究进展[J].上海畜牧兽医通讯,2014(5):20-22.
- [5] 薛麒,吴思捷,王锡乐,等.实验用牛微生物学质量控制标准的研究[J].实验动物科学.2017,(04):55-58.
- [6] Gomez DE, Arroyo LG, Poljak Z, et al. Detection of bovine coronavirus in healthy and diarrheic dairy calves[J].J Vet Intern Med, 2017, 31(6):1884-1891.
- [7] Toftaker I, Holmøy I, Nødtvedt A, et al. A cohort study of the effect of winter dysentery on herd-level milk production[J]. J Dairy Sci., 2017, 100(8):6483-6493.
- [8] Zhang XM, Herbst W, Kousoulas KG, et al. Biological and genetic characterization of a hemagglutinating coronavirus isolated from a diarrhoeic child[J].J Med Virol., 1994, 44(2):152-161.
- [9] Oma VS, Klem T, Tråvén M, et al. Temporary carriage of bovine coronavirus and bovine respiratory syncytial virus by fomites and human nasal mucosa after exposure to infected calves[J].BMC Vet Res., 2018, 14(1):14-22.
- [10] Wolff MH, Sattar SA, Adegbunrin O, et al. Environmental survival and microbicide inactivation of coronaviruses. [M]. Coronaviruses with Special Emphasis on First Insights Concerning SARS. Birkhäuser Basel, 2005:38343-38350.
- [11] Kim JH, Jang JH, Yoon SW, et al. Detection of bovine coronavirus in nasal swab of non-captive wild water deer, Korea [J].Transbound Emerg Dis., 2018, 65(3):627-631.

[收稿日期]2018-09-19