

# Development of a Duplex RT-PCR Targeting Both N Gene and S Gene for Detection of Porcine Epidemic Diarrhea Virus

Yiyang Sang, Hao Wu, Guanglan Tu, Tao Sun, Heng'an Wang\*

Shanghai Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai  
Email: [hawang@sjtu.edu.cn](mailto:hawang@sjtu.edu.cn)

Received: Dec. 6<sup>th</sup>, 2017; accepted: Dec. 20<sup>th</sup>, 2017; published: Dec. 27<sup>th</sup>, 2017

---

## Abstract

To improve the correct probabilities for detection of clinical samples, a duplex RT-PCR targeting both N gene and S gene for detection of Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) was developed. In a 20  $\mu$ L reaction system,  $10^5$  copies of PEDV cDNA could be detected and with no cross reaction with Transmissible Gastroenteritis Virus (TGV), Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV), Pseudorabies Virus (PRV), Porcine Circovirus 2 (PCV2), Swine epidemic encephalitis B (SEEBV), Swine fever virus (SFV), showing high sensitivity and specificity. The results of clinical sample detection indicated that the established duplex RT-PCR could meet clinical detection and make up the defect of singleplex RT-PCR.

## Keywords

Porcine Epidemic Diarrhea Virus, Duplex RT-PCR, N Gene, S Gene

---

## 猪流行性腹泻病毒双重RT-PCR检测方法的建立

桑益旻, 吴昊, 涂光岚, 孙涛, 王恒安\*

上海交通大学农业与生物学院, 上海市兽医生物技术重点实验室, 上海  
Email: [hawang@sjtu.edu.cn](mailto:hawang@sjtu.edu.cn)

收稿日期: 2017年12月6日; 录用日期: 2017年12月20日; 发布日期: 2017年12月27日

\*通讯作者。

## 摘要

为提高临床检测的准确性, 基于N基因和S基因, 建立了检测猪流行性腹泻病毒(Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV)的双重RT-PCR检测方法。在20  $\mu$ L反应体系中, 该双重RT-PCR可检测 $10^5$ 拷贝的PEDV cDNA, 检测传染性胃肠炎病毒、繁殖与呼吸障碍综合征病毒、伪狂犬病毒和圆环病毒2型、乙型脑炎病毒、猪瘟病毒等几种猪病疫苗毒的结果均为阴性, 表明该方法具有良好的特异性和灵敏性。临床样品检测结果表明该双重RT-PCR能满足临床检测需要, 可一定程度弥补单重RT-PCR漏检的不足。

## 关键词

猪流行性腹泻病毒, 双重RT-PCR, N基因, S基因

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

猪流行性腹泻是由猪流行性腹泻病毒(Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV)引发的急性肠道传染病, 1978年从比利时发病猪病料中分离病毒获得成功, 毒株命名为CV777 [1]。2010年7月, 我国发现新的强毒力的PEDV毒株, 并爆发一轮全国性的PED疫情[2] [3], 美国于2013年发现PEDV强毒株[4], 随后爆发了猪流行性腹泻全美大流行。

CV777毒株的全基因组序列于2001年公布[5], PEDV为单链正义RNA病毒, 其基因组全长约28 Kb, 编码4种主要结构蛋白: 纤突蛋白S、小膜蛋白E、膜蛋白M和核衣壳蛋白N。目前, GenBank已收录PEDV基因组序列431个, 研究发现PEDV的变异比较快[6], 且临床粪便样品成分复杂, 有时会影响常规单重RT-PCR检测结果的准确性, 而猪群发病时能否快速、准确地检测PEDV是决定防控效果的关键因素之一。

本研究基于N和S基因, 建立了检测PEDV的双重RT-PCR检测方法, 有望弥补单重RT-PCR准确性欠缺的不足。

## 2. 材料和方法

### 2.1. 材料

#### 2.1.1. 病毒材料

猪流行性腹泻病毒毒株SH-2012-5由孙涛教授实验室保存; 猪的几种常见病毒病活疫苗(TGEV, PRRSV, PRV, PCV2, SEEBV, SFV)为中牧公司产品; 临床哺乳仔猪粪便样本收集自上海及周边省份发病猪场。

#### 2.1.2. 试剂

RNA抽提试剂TRIZOL LS、无RNase的DNase I为Invitrogen公司产品; 反转录试剂盒为Takara公司产品; PCR扩增试剂盒ES Taq PCR mix为全式金公司产品; Gel Extraction Kit为OMEGA公司产品; Generuler 1Kb DNA Ladder为Fermentas公司产品; 引物由上海生工公司合成。

## 2.2. 方法

### 2.2.1. 病毒 RNA 提取及 cDNA 制备

保存毒株及病毒样品以 PBS 适当稀释后, 4°C, 12,000 rpm 离心 5 min。取上清 250  $\mu\text{L}$  与 750  $\mu\text{L}$  TRIZOL LS Reagent 混合, 室温放置 5 min。加入 200  $\mu\text{L}$  三氯甲烷, 剧烈振荡 15 s, 室温放置 5 min。4°C, 12,000 rpm 离心 15 min。取上层无色水相 500  $\mu\text{L}$  与 500  $\mu\text{L}$  异丙醇混合, 室温放置 5 分钟。4°C, 12,000 rpm 离心 8 min。弃去上清, 用 1 mL 75%乙醇洗涤沉淀, 4°C, 7500 rpm 离心 5 min。弃上清, 晾干 3 分钟, 用 55°C 预热的 RNase free ddH<sub>2</sub>O 20  $\mu\text{L}$  溶解 RNA 沉淀, 并用无 RNase 的 DNase I 处理。

取 8  $\mu\text{L}$  RNA 溶液(<5  $\mu\text{g}$ )与 1  $\mu\text{L}$  随机引物、1  $\mu\text{L}$  dNTPs 混匀, 65°C 保温 5 分钟后, 在冰上迅速冷却数分钟。加入 4  $\mu\text{L}$  5  $\times$  Prime Script II Buffer、0.5  $\mu\text{L}$  RNase inhibitor、1  $\mu\text{L}$  Prime Script II RTase、4.5  $\mu\text{L}$  RNase free ddH<sub>2</sub>O, 混匀。经 30°C 10 min、42°C 60 min、70°C 15 min 孵育, 得 cDNA, -80°C 保存备用。

### 2.2.2. N、S 基因单重 RT-PCR

根据 GenBank 已收录的 PEDV 基因组序列, 利用 Multi-alignment 软件分析, 分别在 N 基因和 S 基因的保守区域设计引物, 其中引物对 P1: 5'-ATGGCTTCTGTCAGTTTTTC-3' 和 P2: 5'-CGAAGTGGCTCTGGATTTGTT-3' 用于 N 基因的 RT-PCR 扩增, 引物对 P3: 5'-ATGAAGTCTTTAACCTAC-3' 和 P4: 5'-GCAACACGGGACCAATCATT-3' 用于 S 基因的 RT-PCR 扩增。优化引物设计和反应条件后, N、S 基因的单重 RT-PCR 扩增体系均为 20  $\mu\text{L}$ : 1  $\mu\text{L}$  cDNA 模板、1  $\mu\text{L}$  上游引物、1  $\mu\text{L}$  下游引物、10  $\mu\text{L}$  ES Taq Master Mix、7  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O; 扩增程序为: 95°C 3 min; 95°C 10 s、58°C 30 s、72°C 45 s, 30 个循环; 72°C 10 min。

### 2.2.3. N、S 基因双重 RT-PCR

N/S 基因双重 RT-PCR 的反应体系为 20  $\mu\text{L}$ : 1  $\mu\text{L}$  cDNA 模板、1  $\mu\text{L}$  各个引物、10  $\mu\text{L}$  ES Taq Master Mix、5  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O; 优化后扩增循环为: 95°C 3 min; 95°C 10 s、58°C 30 s、72°C 60 s, 30 个循环; 72°C 10 min。

### 2.2.4. 特异性试验

采购几种常见猪病毒活疫苗, 病毒 RNA 同上抽提并进行反转录, 病毒 DNA 按常规方法抽提。首先测试 N、S 基因单重 RT-PCR 的特异性, 在单重 RT-PCR 表现良好特异性的基础上, 再测试 N/S 基因双重 RT-PCR 的特异性。

### 2.2.5. 灵敏性试验

以实验室已建立的 TaqMan 探针荧光定量 RT-qPCR 定量检测毒株 SH-2012-5 样品, 调整其 cDNA 浓度为  $1.0 \times 10^9/\mu\text{L}$ , 用灭菌 ddH<sub>2</sub>O 作连续 10 倍梯度稀释, 用于单重和双重 RT-PCR 的灵敏度测试。

### 2.2.6. 双重 RT-PCR 检测临床样品

利用建立的双重 RT-PCR 检测临床发病仔猪的粪便样品。

## 3. 结果

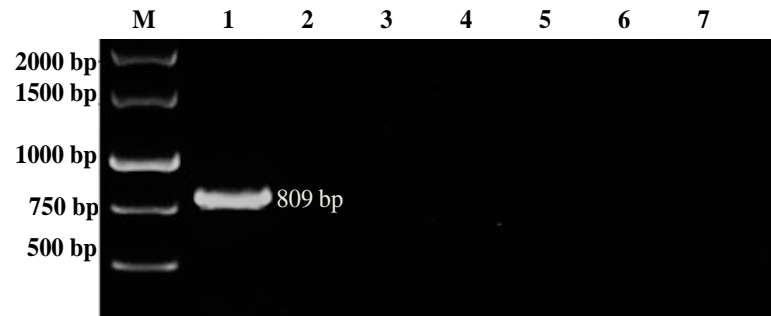
### 3.1. N、S 基因单重 RT-PCR 的特异性

由图 1 可见, 针对 N 基因的引物对只在 PEDV 中扩增出 800 bp 左右的片段, 扩增产物与预期的 809 bp 大小一致, 进一步的测序分析确认该扩增产物为 PEDV 的 N 基因, 而 TGEV、PRRSV、PRV、PCV2、SEEBV 和 SFV 的扩增结果均为阴性。针对 S 基因的引物对只在 PEDV 中扩增出 550 bp 左右的产物, 扩

增产物与预期的 559 bp 大小一致(图 2), 测序分析确认该扩增产物为 PEDV 的 S 基因, 而 TGEV、PRRSV、PRV、PCV2、SEEBV 和 SFV 的扩增结果也均为阴性, 上述结果表明两对引物的特异性良好。

### 3.2. N、S 基因单重 RT-PCR 的灵敏性

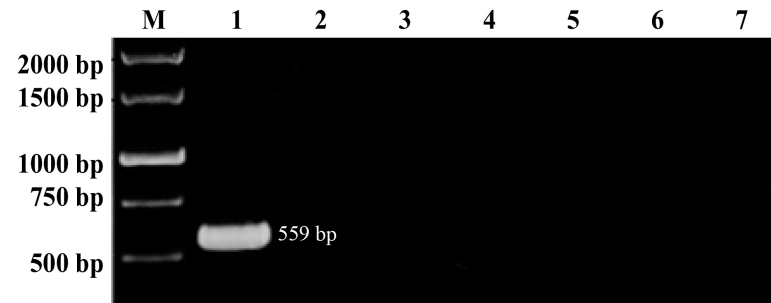
N 基因单重 RT-PCR 可检测  $1 \times 10^4$  拷贝的毒株 SH-2012-5 的 cDNA (图 3)。S 基因单重 RT-PCR 则可检测  $1 \times 10^5$  拷贝的病毒 cDNA (图 4)。



M: DNA Marker; 1~7: PEDV, TGV, PRRSV, PRV, PCV2, SEEBV and SFV, respectively

**Figure 1.** Specificity test of single-plex RT-PCR for N gene amplification

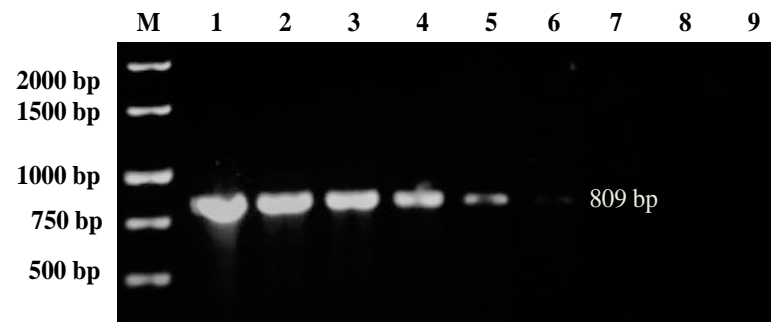
**图 1.** N 基因单重 RT-PCR 特异性试验



M: DNA Marker; 1~7: PEDV, TGV, PRRSV, PRV, PCV2, SEEBV and SFV, respectively

**Figure 2.** Specificity test of single-plex RT-PCR for S gene amplification

**图 2.** S 基因单重 RT-PCR 特异性试验



M: DNA Marker; 1~9:  $10^9$ 、 $10^8$ 、 $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$  拷贝数的 PEDV cDNA

**Figure 3.** Sensitivity test of single-plex RT-PCR for N gene amplification

**图 3.** N 基因单重 RT-PCR 灵敏性试验

### 3.3. N、S 基因双重 RT-PCR 的特异性

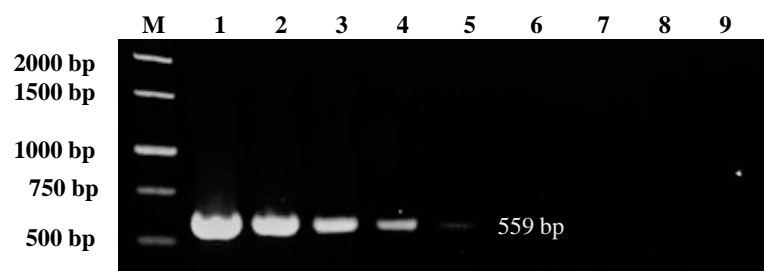
由图5可见,只有PEDV的扩增产物为两条带,且大小与单重RT-PCR的扩增产物大小一致,而TGEV、PRRSV、PRV、PCV2、SEEBV和SFV的扩增结果均为阴性。

### 3.4. N、S 基因双重 RT-PCR 的灵敏性

图6显示两条特异性条带,大小分别与单重RT-PCR一致,可检测 $10^5$ 拷贝的毒株SH-2012-5的cDNA。

### 3.5. 双重 RT-PCR 检测临床样品

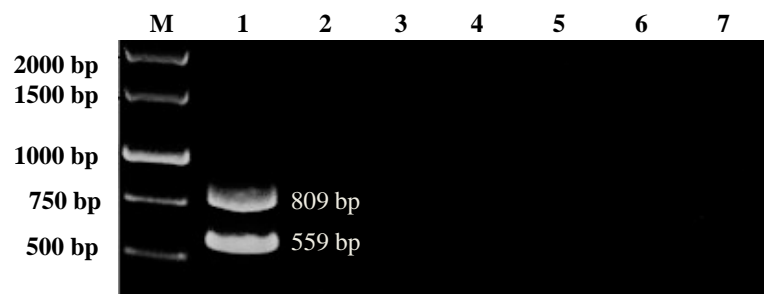
利用所建立的双重 RT-PCR 检测 10 个临床样本, 其中, 9 个样本可扩增两个特异性条带, 但有 1 个



M: DNA Marker; 1~9:  $10^9$ 、 $10^8$ 、 $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$ 拷贝数的 PEDV cDNA

**Figure 4.** Sensitivity test of single-plex RT-PCR for S gene amplification

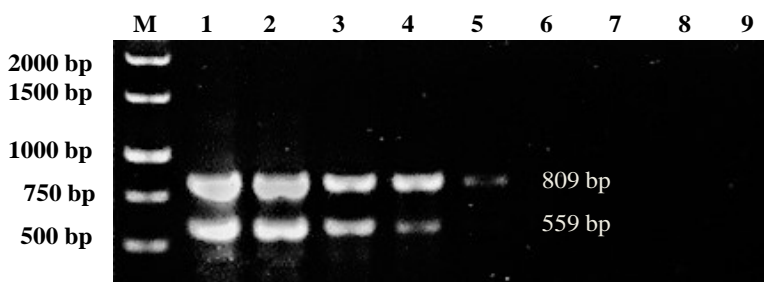
**图 4.** S 基因单重 RT-PCR 灵敏性试验



M: DNA Marker; 1~7: PEDV, TGEV, PRRSV, PRV, PCV2, SEEBV and SFV, respectively

**Figure 5.** Specificity test of duplex RT-PCR for N/S genes amplification

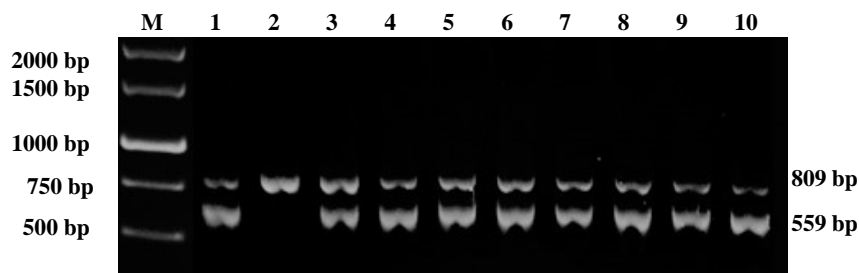
**图 5.** N/S 基因双重 RT-PCR 特异性试验



M: DNA Marker; 1~9:  $10^9$ 、 $10^8$ 、 $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$ 拷贝数的 PEDV cDNA

**Figure 6.** Sensitivity test of duplex RT-PCR for N/S genes amplification

**图 6.** N/S 基因双重 RT-PCR 灵敏性试验



M: DNA Marker; 1~10: Clinical fecal samples

**Figure 7.** Clinical fecal samples detected with duplex RT-PCR

**图 7.** 双重 RT-PCR 检测临床粪便样品

样品只扩增出一个条带(图 7), 该扩增产物测序结果证明其为 PEDV 的 N 基因。

#### 4. 讨论

仔猪感染 PEDV 后, 发病很急, 很多仔猪因剧烈腹泻而在感染后 2~3 天死亡[2], 因此, 及时、准确地确诊病原是防控该病的关键因素之一。但 PEDV 的变异比较快[6], 且临床粪便样品成分复杂, 应用常规单重 RT-PCR 检测有时候会出现假阴性的现象, 为此, 本研究经引物和反应条件优化, 在确认 N、S 基因单重 RT-PCR 的特异性和灵敏性基础上, 建立了基于 N 和 S 基因的双重 RT-PCR 检测方法。从图 7 的临床样品检测结果也可看出, 其中的 2 号样品仅扩增出一个条带, 如果仅使用针对 S 基因的单重 RT-PCR 进行检测就会因扩增结果阴性而导致疾病误判。

#### 资助项目

上海市科委攻关项目(课题编号: 15391901600)。

#### 参考文献 (References)

- [1] Pensaert, M.B., Debouck, P. and Reynolds, D.J. (1981) An Immunoelectron Microscopic and Immunofluorescent Study on the Antigenic Relationship between the Coronavirus-Like Agent, CV 777, and Several Coronaviruses. *Archives of Virology*, **68**, 45-52. <https://doi.org/10.1007/BF01315166>
- [2] Sun, R.Q., Cai, R.J., Chen, Y.Q., et al. (2012) Outbreak of Porcine Epidemic Diarrhea in Suckling Piglets, China. *Emerging Infectious Diseases*, **18**, 161-163. <https://doi.org/10.3201/eid1801.111259>
- [3] Sun, M., Ma, J.L., Wang, Y.N., et al. (2015) Genomic and Epidemiological Characteristics Provide New Insights into the Phylogeographical and Spatiotemporal Spread of Porcine Epidemic Diarrhea Virus in Asia. *Journal of Clinical Microbiology*, **53**, 1484-1491. <https://doi.org/10.1128/JCM.02898-14>
- [4] Stevenson, G.W., Hoang, H., Schwartz, K.J., et al. (2013) Emergence of Porcine Epidemic Diarrhea Virus in the United States: Clinical Signs, Lesions, and Viral Genomic Sequences. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **25**, 649-654.
- [5] Kocherhans, R., Bridgen, A., Ackermann, M., et al. (2001) Completion of the Porcine Epidemic Diarrhoea Coronavirus (PEDV) Genome Sequence. *Virus Genes*, **23**, 137-144. <https://doi.org/10.1023/A:1011831902219>
- [6] Lin, C.-M., Saif, L.J., Marthaler, D. and Wang, Q.H. (2016) Evolution, Antigenicity and Pathogenicity of Global Porcine Epidemic Diarrhea Virus Strains. *Virus Research*, **226**, 20-39. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.05.023>

**知网检索的两种方式：**

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2327-0810，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：[amb@hanspub.org](mailto:amb@hanspub.org)