

四种食源性病毒多重反转录-聚合酶链反应检测研究

寇晓霞 吴清平 姚琳 张菊梅

【摘要】 目的 建立同时检测诺如病毒、轮状病毒、星状病毒和甲肝病毒多重 RT-PCR 检测方法。**方法** 以四种食源性病毒的高度保守区为靶序列设计特异引物,优化反应体系和条件,确定多重 RT-PCR 检测四种病毒的特异性和灵敏度,并初步应用于临床样本中四种病毒的同时检测。**结果** 在灵敏度试验中得到的轮状病毒、诺如病毒和星状病毒稳定的最高检测限均为 50 pg/ml,甲肝病毒为 100 pg/ml。在 128 份临床粪便样本中,其中轮状病毒阳性 62 份(48.44%),诺如病毒阳性 8 份(6.25%),星状病毒阳性 11 份(8.59%),甲肝病毒阳性 4 份(3.12%)。**结论** 研究所建立的多重 RT-PCR 方法,在实际应用中能同时处理大量的样本,提高 PCR 检测方法的能力,可以应用于临床病例的诊断和流行病学调查等研究。

【关键词】 食源性病毒;多重反转录-聚合酶链反应;检测

Studies on simultaneous detection of four foodborneviruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction KOU Xiao-xia^{*}, WU Qing-ping, YAO Lin, ZHANG Ju-mei. *Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China*

Corresponding author: WU Qing-ping, Email: wuqp203@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To establish a method for simultaneous detection of norovirus (NV), rotavirus (RV), astrovirus (AV) and hepatitis A virus (HAV) by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Methods** Specific primers of the four viruses were designed based on the high conserved sequences, the reaction system and conditions optimized and the specificity and sensitivity confirmed. The method was then applied to detect the four viruses in clinical samples. **Results** The steady detection limits were 100 pg/ml for hepatitis A virus, 50 pg/ml for rotavirus, norovirus and astrovirus respectively. When the developed method was used to detect clinical fecal samples, 62(48.44%) were identified as rotavirus, 8(6.25%) as norovirus, 11(8.59%) as astrovirus and 4(3.12%) as hepatitis A virus in a total of 128 samples. **Conclusion** Data from our study showed that multiplex RT-PCR system could be used to simultaneously detect the four viruses in routine monitoring and risk assessment in disease outbreaks with high specificity and sensitivity.

【Key words】 Foodbornevirus; Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction; Detection

诺如病毒(NV)、轮状病毒(RV)、星状病毒(AV)和甲肝病毒(HAV)被认为是食源性疾病的主要病因^[1],并在近年来引起了多起大规模流行性食源性疾病的暴发。RT-PCR方法被认为是检测食源性病毒最有效的方法^[2]。但是常规的PCR都是单一地扩增,即每个反应只能扩增一个模板,在实际应用中很难同时处理大量的样品。多重PCR技术的

建立和应用提高了PCR的能力,可以应用于临床病例的诊断和流行病学调查等研究^[3,4]。本实验的主要目的是建立同时检测四种病毒的多重RT-PCR检测方法,探讨其特异性和灵敏度水平,为进一步将建立的检测方法应用于除临床样本以外的水、食品等其他病毒含量较低的样本食源性病毒的检测打下基础。

材料与与方法

1. 阳性病毒株: 试验所用NV、RV、AV和HAV阳性粪便分离株由广州市儿童医院及南方医院新生儿科、广东省疾病预防控制中心提供,经本实验室检

基金项目:广东省科技计划资助项目(2007A050100001)

作者单位:510070 广州,广东省微生物研究所广东省菌种保藏与应用重点实验室(寇晓霞、吴清平、张菊梅);中国科学院武汉病毒研究所(姚琳)

通讯作者:吴清平,Email: wuqp203@yahoo.com.cn

测确证,用来建立多重RT-PCR检测方法。

2. 临床样本:总共 128 份腹泻样本,自 2006 年 9 月至 2007 年 4 月,收集于临床上初步诊断为非细菌性胃肠炎的患者,患者年龄 2~15 岁。患者有水样便至少 24 h,伴有恶心、呕吐和发热等症状。粪样收集后在 24 h 内送回实验室,用 pH 值 7.4 的 PBS 稀释成 10% 的悬液,4℃、10 000 r/min 离心取上清,0.22 μm 的无菌滤膜过滤除菌后,分别用传统方法及已经建立并优化的单一、多重 RT-PCR 和 NASBA 法进行检测。

3. 试剂:酶联免疫试剂盒(RV、HAV、AV),分别购自卫生部兰州生物制品研究所、浙江省医学科学院、Dako 公司。TRizol 试剂盒购自 Gbicol 公司;反转录聚合酶 MLV、RNasin、Taq DNA 聚合酶购自 Promega 公司;dNTP 购自上海 Sangon 公司。

4. 引物:以 RV 的 VP7 基因设计各血清型通用的引物 P1/P2^[5-7];以 NV RNA 多聚酶区为靶序列,采用对 G I 和 G II 型通用的引物 JV12/JV13^[8];以 RV 的 ORF1 为靶序列,采用引物 Mon340/Mon348^[9];对 HAV 以 VP1/VP3 外壳蛋白的交叉区为靶序列,采用引物 HAV3/HAV5^[10,11]。引物由北京赛百盛生物工程公司合成,引物序列见表 1。

5. 阳性毒株的确证:用 ELISA 检测 RV 抗原,采用卫生部兰州生物制品研究所生产的 RV 检测试剂盒,按说明书操作。NV 用电镜法进行确证,方法参照文献[12]。

6. RNA 抽提:用 Gbicol 公司生产的 TRizol 试剂盒抽提病毒 RNA,按说明书操作。在分光光度计上测定所提取的 RNA 浓度和纯度。

7. 多重 RT-PCR 检测:建立同时检测四种病毒的多重 PCR 反应体系。RT 和 PCR 一步完成。反应体系为 2.5 μl 10× PCR buffer、20 U RNasin、MLV 200 U, dNTP 300 μmol/L, RV 引物 P1/P2 各 0.2 μmol/L, NV 引物 JV12/V13 各 0.5 μmol/L, AV

引物 Mon340/Mon348 各 0.4 μmol/L, HAV 引物 HAV3/HAV5 各 0.4 μmol/L, TaqE 2.5 U, MgCl₂ 3.5 mmol/L, 模板 3 μl, 加水至 25 μl。采用降落 PCR 进行扩增,条件为:变性 94℃ 5 min, 94℃ 40 s, 55℃ 1 min, 72℃ 40 s, 退火温度每降低 1℃ 5 个循环, 15 个循环后退火温度降至 52℃ 进行 25 个循环, 共 40 个循环后, 72℃ 延伸 10 min。将 RV、NV、AV 及 HAV 的 RNA 进行 10 倍梯度系列稀释, 分别按上述反应体系和条件进行扩增, 确定多重 RT-PCR 的灵敏度。

8. 产物分析:1.4% 琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物,以 Gold view 染料替代 0.5 μg/ml EB, 凝胶成像分析系统 UV I 观察结果。

结 果

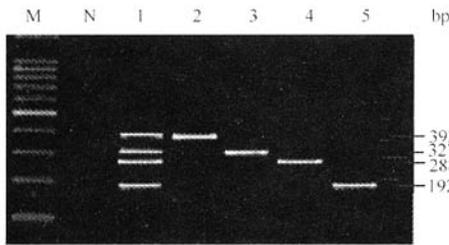
1. 多重 RT-PCR 特异性:实验中首先验证了四种病毒各自的单一 RT-PCR 特异性。如图 1 所示,从上往下依次是 RV 392 bp, NV 327 bp, AV 288 bp, HAV 192 bp。在进行多重 RT-PCR 扩增之前,对几种病毒任意进行了组合,优化多重 RT-PCR 的检测结果。图 2 是 RV 和 NV 的两重检测结果;图 3 是 RV、NV 和 HAV 三重检测结果。

由电泳图可以看到,无论是四种病毒的单一还是多重扩增中,均得到清晰的与预期大小相同的特异性条带,无任何非特异性条带产生。并对扩增产物进行测序,测序结果与 GenBank 上已有的序列对比表明,本研究从粪便样本中检测所得的 RV 序列与 DQ096293 相似性达到 99%, NV 的序列与 X86557(G2)相似性达 96%; HAV 与 AB253605 相似性达到 98%; AV 与 L23513 相似性达 97%。

2. 多重 RT-PCR 灵敏度:由于这四种食源性病毒难培养或不可培养,因此本研究以可检到的 RNA 量为灵敏度指标,探讨单一及多重 RT-PCR 的检测灵敏度水平。实验中将抽提的核酸在分光光度计上

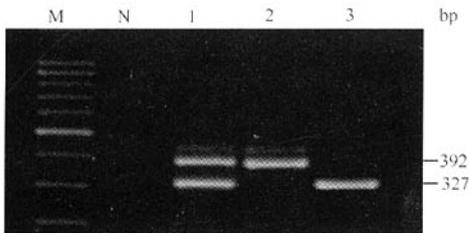
表1 四种病毒引物序列

病毒	基因	引物	极性	序列(5'-3')	位置	产物大小(bp)
NVs	RdRp	JV12	+	ATACCACTATGATGCAGATTA	4552~4572	327
	RdRp	JV13	-	TCATCATCACCATAGAAAGAG	4858~4878	
RVs	VP7	P1	+	GGCTTTAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	1~28	392
	VP7	P2	-	GATCCTGTTGGCCATCC	376~392	
AVs	ORF1a	Mon340	+	CGTCATTGTTGTTCATACT	1182~1203	288
	ORF1a	Mon348	-	ACATGTGCTGCTGTTACTATG	1450~1470	
HAV	VP1	HAV3	+	CTCCAGAATCATCTCCAAC	2208~2226	192
	VP3	HAV5	-	CAGCACATCAGAAAGGTGA	2035~2054	



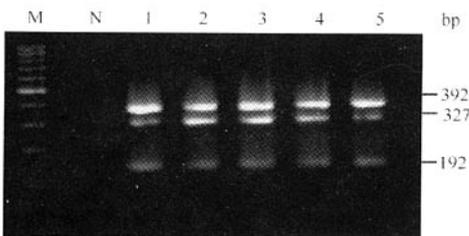
注: M: 100 bp DNA Marker; N: 阴性对照; 1: 四种病毒多重 RT-PCR 扩增; 2~5: RV、NV、AV 和 HAV 单一扩增

图1 四种病毒单一及多重 RT-PCR 扩增结果



注: M: 100 bp DNA Marker; N: 阴性对照; 1: RV 和 NV 同时扩增; 2, 3: RV、NV 单一扩增

图2 RV、NV 的两重 RT-PCR 扩增结果



注: M: 100 bp DNA Marker; N: 阴性对照; 1~5: RV、NV 和 HAV 同时扩增

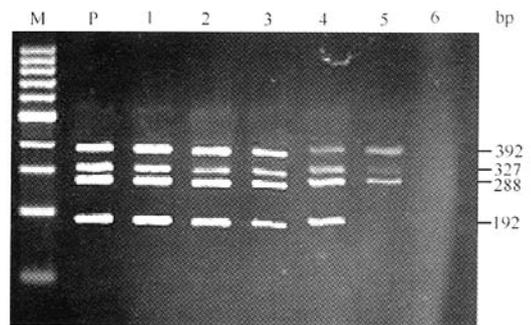
图3 RV、NV 和 HAV 的三重 RT-PCR 扩增结果

进行定量,然后取一定量的 RNA 进行系列梯度稀释,分别进行 RT-PCR,将能检测到的最高稀释度所对应的 RNA 量定义为该病毒 RT-PCR 检测法的灵敏度。实验中共设立了 6 个稀释度,所对应的核酸量依次为 50 ng、10 ng、5 ng、100 pg、50 pg、10 pg。

在这两组实验中,6 个稀释度同时进行 RT-PCR 检测,并在多次试验后的结果表明,在多重 RT-PCR 中,可得到的可重现性稳定的最高检测限为, RV、NV 和 AV 均为 50 pg, HAV 为 100 pg; 如图 4 所示。其中 1~6 分别表示 RNA 的稀释度为 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 。

3. 临床样本检出率: 试验所用 128 份腹泻样本,针对每种病毒分别采用传统的 ELISA、电镜检测法、单一及多重 RT-PCR 法同时对所有样本进行检测。经 ELISA 试剂盒检测的 RV 阳性 58 份

(45.31%)、AV 阳性 11 份 (8.59%)、HAV 4 份 (3.12%)。用电镜初步检测观察所得 NV 阳性 7 份 (5.47%)。其中,经卫生部兰州生物制品研究所生产的 RV ELISA 试剂盒检测的 58 份 RV 阳性样本,再采用本试验选用的引物及优化的试验体系及条件扩增, RV 阳性数为 58 份,与 ELISA 检测的符合率为 100%; 并在另 50 份 ELISA 检测中呈 RV 阴性的样品中检出 RV 阳性 4 份,在 NV 电镜阴性的样品中,多检出 NV 阳性样本 1 份。因此 RV 阳性数为 62 份 (48.44%), NV 8 份 (6.25%)。三种检测方法的检出率见表 2。



注: M: 100 bp DNA Marker; P: 阳性对照; 1~6 依次对应于 RNA 模板为 50 ng、10 ng、5 ng、100 pg、50 pg、10 pg 多重 RT-PCR 扩增结果

图4 多重 RT-PCR 同时检测四种病毒灵敏度电泳结果

表2 多重 RT-PCR 与 ELISA、电镜对临床样本中四种病毒的检出率

方法	RV	HAV	NV	AV
单一 RT-PCR	62(48.44)	4(3.12)	8(6.25)	11(12.5)
多重 RT-PCR	62(48.44)	4(3.12)	8(6.25)	11(12.5)
ELISA	58(45.31)	4(3.12)	-	11(12.5)
电镜	-	-	7(5.47)	-

注: 括号外数据为阳性样本份数, 括号内数据为阳性检出率 (%)

讨 论

迄今为止, RT-PCR 被证明是检测 RNA 病毒的有效方法。有很多研究表明传统的 PCR 灵敏度高于电镜和 ELISA。本研究建立的在粪便样本中同时检测四种病毒多重 RT-PCR 检测方法, 既保留了常规 PCR 的特异性、敏感性, 又减少了操作步骤及试剂。

高度特异性扩增所需的片段是 PCR 的最基本要求, 多重 PCR 要求不同引物能在同一反应体系中进行特异性扩增, 然而影响 PCR 特异性的因素很多, 包括模板、引物性质及质量、反应条件的控制等等。本试验中对反应体系和条件分别进行了优化,

以确保在最小的成本和时间下,扩增的效率最高。从多重 PCR 反应的条件来看,经过反复摸索研究发现,在进行 RT-PCR 扩增前对模板链进行变性时,变性液中可直接加入引物混合物,同时与模板一起进行 97℃ 5 min 变性,甚至变性后可以不用置于冰上,因为模板链复性的同时,引物与模板也会结合,而且会比模板本身两条链结合得快。另外,引物间的比例及其浓度在多重 PCR 中仍是一个关键的指标,本研究采用了各型引物的优化混合,取得较满意的结果。如果各引物直接 1:1 混合,加大模板的量也能得到相应的结果。从多重 PCR 的特异性来说,4 种型特异性引物之间没有交叉反应。值得指出的是,虽然本研究的多重 PCR 模式可同时检测四种食源性病毒,但在 128 份样本中没有发现两种以上病毒共同感染的样本。

本研究建立的四种病毒多重 RT-PCR 检测技术,可进行细致而深入的流行病学研究,为大规模突发性疾病暴发时病因的溯源打下了良好的技术基础。

参 考 文 献

- [1] 吴清平,寇晓霞,张菊梅. 食源性病毒及其检测方法. 微生物学通报, 2004, 31: 101-105.
- [2] Lees D. Viruses and bivalve shellfish. Intern J Food Microbiol, 2000, 59: 81-116.
- [3] Rohayem J, Berger S, Juretzek T, et al. A simple and rapid single-step multiplex RT-PCR to detect NV, astrovirus and adenovirus in clinical stool specimens. J Virol Meth, 2004, 118: 49-59.
- [4] Yan H, Yagyu F, Okitsu S, et al. Detection of norovirus (G I, G II), sapovirus and astrovirus in fecal specimens using reverse transcription single-round multiplex PCR. J Virol Meth, 2003, 114: 37-44.
- [5] Flores J, Sears J, Schael PI, et al. Identification of human RV serotype by hybridization to polymerase chain reaction-generated probes derived from a hyperdivergent region of the gene encoding outer capsid protein VP7. J Virol, 1990, 64: 4021-4024.
- [6] Gouvea V, Allen JR, Glass RI, et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of RV nucleic acid from stool specimens. J Clin Microbiol, 1990, 28: 276-282.
- [7] Le Guyader F, Dubois E, Menard D, et al. Detection of hepatitis A virus, RV, and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-semi-nested PCR. Appl Environ Microbiol, 1994, 60: 3665-3671.
- [8] Jiang X, Huang PW, Zhong WM, et al. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk-and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. J Virol Meth, 1999, 83: 145-154.
- [9] Belliot G, Laveran H, Monroe SS. Detection and genetic differentiation of human astroviruses: phylogenetic grouping varies by coding region. Arch Virol, 1997, 142: 1323-1334.
- [10] Cohen JI, Ticehurst JR, Purcell RH, et al. Complete nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus: comparison with different strains of hepatitis A virus and other picornaviruses. J Virol, 1987, 61: 50-59.
- [11] Schwab KJ, De Leon R, Sobsey MD. Concentration and purification of beef extract mock eluates from water samples for the detection of enteroviruses, hepatitis A virus, and Norwalk virus by reverse transcription-PCR. Appl Environ Microbiol, 1995, 61: 531-537.
- [12] O'Neil HJ, McCaughey C, Coyle PV, et al. Clinical utility of nested multiplex RT-PCR for group F adenovirus, rotavirus and norwalk — like virus in acute viral gastroenteritis in children and adults. J Clin Meth, 2002, 25: 335-343.

(收稿日期: 2007-10-11)
(本文编辑: 尹廉)

· 消息 ·

第二届全国儿童伤害防治研讨会暨世界防止虐待儿童日 宣传大会征文通知

第二届全国儿童伤害防治研讨会暨世界防止虐待儿童日宣传大会定于 2008 年 11 月 18 - 20 日在广东省深圳市召开。
会议主题: 关爱儿童, 远离伤害, 携手托起明天的太阳。主办单位: 中华预防医学会伤害预防与控制分会、深圳市疾病预防控制中心、《中华流行病学杂志》编辑部、《疾病控制杂志》编辑部、第四军医大学西京医院儿童医学中心、西安博爱儿童虐待防治救助中心。
征文内容: 儿童伤害的调查研究、儿童伤害发生的环境及社会因素、儿童伤害的治疗实验研究、群体儿童伤害的预防及应急干预、儿童急性中毒的诊治、自然灾害对儿童的伤害及其救治、儿童伤害后心理障碍的诊治、儿童虐待的临床研究和分析、儿童忽视的临床研究和分析、儿童摇晃综合征的临床研究和分析、儿童权利与儿童伤害的研究、留守/流浪儿童的健康问题与干预、安全社区与儿童伤害干预项目的效果评价。
征文要求: ①论著包括题目、作者、单位、摘要、关键词、材料与方法、结果、讨论、参考文献(不超过 10 条), 其中题目、作者、单位、摘要、关键词和图表同时用中英文; 必须附单位证明; ②摘要按目的、方法、结果、结论四段式撰写; ③作者简介包括姓名、出生年、性别、籍贯、学位、职称、主要研究方向; ④出席会议并希望在医学期刊刊出稿件者, 请注明“要求发表”; 已发表或不需发表的稿件, 请注明“只交流不刊出”; ⑤请同时邮寄纸质稿和电子版, 写明联系电话、传真号码、邮箱地址。
截稿日期: 要发表的稿件一定在 2008 年 8 月 15 日之前送达, 只交流不发表的稿件于 2008 年 10 月 10 日之前送达。
稿件寄送: 第四军医大学西京医院儿科张国成主任, 邮寄地址: 710032 西安市长乐西路 15 号, 电话: 029-84775395, 传真: 029-84773306, Email: zhangguoch538@sina.com
会议费用: 会务费每人 800 元(学生凭有效证件减半), 食宿费及差旅费自理。需要学分证书者另交 30 元证书工本费。