

牡蛎和粪便中 G I、G II 型诺如病毒实时聚合酶链反应检测方法的建立

孙亚萍 程民 宋士利 张心会 李蓉

【摘要】目的 建立适用于牡蛎和粪便中快速、特异、灵敏的 G I、G II 型诺如病毒(NV)定量分型诊断方法。**方法** 通过对 G I、G II 型 NV 基因组保守序列的比对分析,设计高度特异的引物和探针,建立以 TaqMan 探针为基础的实时聚合酶链反应方法(TaqMan Real-time RT-PCR)。**结果** 该方法对 NV 核酸检测高度特异,且 G I 和 G II 型之间无交叉反应,最低检出限达 10^2 copies/ μ l。对 90 份新鲜牡蛎样品和 37 份腹泻粪便标本分别用常规 RT-PCR 和笔者建立的 TaqMan Real-time RT-PCR 进行 NV 检测,发现牡蛎样品中后者的检出率明显高于前者,而粪便标本中两者无明显差别。同时对阳性标本的测序分析证实结果准确可靠。**结论** 研究中建立的 TaqMan Real-time RT-PCR 方法可用于海产品标本及粪便中 NV 定量及分型检测,可作为应对 NV 胃肠炎暴发的有效诊断方法。

【关键词】 实时聚合酶链反应; 诺如病毒; 基因型

Study on the use of TaqMan Real-time PCR to detect genogroup I and II norovirus in oysters and patients' stool samples SUN Ya-ping*, CHENG Min, SONG Shi-li, ZHANG Xin-hui, LI Rong.

*Yuhang Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 311100, China

Corresponding author: LI Rong. National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China. Email: rongli579@126.com

【Abstract】Objective To develop a rapid, specific and sensitive diagnostic method for quantification and typing of genogroup I and II norovirus in oyster shellfish and stool samples from patients who had eaten them. **Methods** Specific primers and probe, following large scale norovirus genome consensus analysis were designed and subsequently a TaqMan based Real-time PCR assay to detect both G I and G II were established. **Results** This method showed high specificity for norovirus nucleic acid detection, and no cross-reaction among norovirus G I and G II. The limit on detection of NV genomes was 10^2 copies/ μ l. A total of 90 oysters and 37 stool specimens with diarrhea were tested for norovirus by conventional reverse transcriptional PCR (RT-PCR) assay as well as the TaqMan Real-time PCR, respectively. The norovirus detection rate in oysters by TaqMan PCR was significantly higher than that by conventional RT-PCR, but no differences between the two PCR methods were found when detecting the stool samples. Reliability of the Real-time PCR for norovirus detection was further confirmed by DNA sequencing of the positive samples. **Conclusion** This TaqMan Real-time PCR assay was proved to be a useful method for quantification and typing for norovirus in routine monitoring of both oyster shellfish and clinical samples. This method is recommended to be an effective diagnostic method for outbreak-associated gastroenteritis due to norovirus.

【Key words】 Real-time PCR; Norovirus; Genogroup

诺如病毒(NV)是急性病毒性胃肠炎暴发和散发的主要病原体之一。NV 胃肠炎暴发主要通过污染的食物和水引起,人间传播和通过感染者呕吐物产生的气溶胶是主要的传播途径^[1-3]。食物中海产品已成为食源性 NV 胃肠炎的重要病因。通过志愿者研究发现, NV 感染剂量很低(10~100 个拷

贝数的病毒粒子)即可发病。NV 胃肠炎暴发的控制和预防非常困难,因此,建立快速有效的诊断方法对于控制 NV 胃肠炎非常必要。本研究致力于解决牡蛎中病毒浓缩提取方法,建立了针对 G I、G II 型 NV 均适用的检测方法,并成功用于粪便和牡蛎样品的检测。

材料与方 法

1. 材料:

(1)病毒株:来源于日本国立感染症研究所 II 部提供的已证实为 NV(G I 及 G II 型)阳性病毒株的

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30671752)

作者单位:311100 杭州市余杭区疾病预防控制中心检验科(孙亚萍、宋士利、张心会);中国疾病预防控制中心营养与食品安全所(程民、李蓉)

通讯作者:李蓉,Email:rongli579@126.com

粪便悬液标本各 1 份。

(2)检测标本:杭州市余杭区第一医院 2005 年收集的经粪便常规检测疑为病毒性腹泻粪便标本,分别取自 37 例患者;购自杭州海产品市场的新鲜牡蛎 90 个。

(3)引物及探针的设计:以 NV(G I 及 G II 型)全长 cDNA 序列为模板,使用 ABI7000 型实时荧光定量 PCR (Real-time RT-PCR) 仪(美国 Applied Biosystems 公司)随机软件分析 TaqMan 引物和探针位点,选择比较保守的 G II 和 G I 型 NV 基因组序列 RNA 依赖的 RNA 多聚酶区域与衣壳蛋白区的连接区域为扩增区域,从中选择最佳组合,并经试验验证其特异性符合要求,引物探针由上海生工生物工程技术有限公司合成,其序列见表 1。

表1 用于 Real-time RT-PCR 扩增 G I、G II 型 NV 的寡核苷酸引物和探针

| 基因型 | 引物和探针 | 核苷酸序列(5'~3') ^a |
|------|-------|---|
| G I | F(P1) | CCATGTTCGGYTGGATGCGNNTTYC |
| | R(P2) | TGGGGCGTCCTTAGACGCCATCAT |
| | probe | FAM-GACAGGAGATYGGGATCTCTCTGYCC-TAMRA ^b |
| G II | F(P1) | TGCCAGACAAGAGTCAATGTTTA |
| | R(P2) | AGCAGCGTCATTCGACGCCATCT |
| | probe | FAM-CTAAGCACATGGGAGGGGATCGCAA-TAMRA ^b |

注:^a代表简并引物中的核苷酸序列:Y=T 或 C, N=any;

^bFAM代表荧光报告基团,TAMRA 代表荧光淬灭基团

(4)标准品的制备:按照 DNA 纯化试剂盒说明书纯化回收目的 DNA 片段。应用 T 载体构建 NV G I 及 G II 型克隆,用 PCR 方法鉴定并筛选出阳性克隆后,提取质粒,经美国 Applied Biosystems 公司的 377 测序仪测序,制备的标准品其序列与预期完全相符。用紫外分光光度计测 A₂₆₀ 值定量,用 DEPC 水调整储备液至 10¹⁰ copies/μl,置 20℃ 保存备用。分别将 G I 型及 G II 型标准品贮存液(2×10¹⁰ copies/μl)梯度稀释为 2×10⁸, 2×10⁷, 2×10⁶, 2×10⁵, 2×10⁴ 和 2×10³, 2×10², 2×10¹ copies/μl 8 个浓度,各取 5μl 为模板进行 PCR 扩增,制作标准曲线。

2. 方法:

(1)牡蛎的前处理及悬液的制备:以 3 个牡蛎的消化腺为 1 个样品,注意避免样品间的交叉污染。将消化腺置匀浆器中快速匀浆后,将匀浆液放入灭菌的三角烧瓶中,加入 7 倍样品质量的甘氨酸缓冲液,调节 pH 值至 7.5,室温下充分振荡后分装于

50 ml 离心管中,4℃,5800 r/min 离心 30 min。然后向上清液中加入等体积的 PEG6000,轻微混匀,4℃ 沉淀 4 h 后,4℃,5800 r/min 离心 30 min。弃上清,沉淀用 1.5 ml NaH₂PO₄ 重悬,4℃,12 000 r/min 离心 30 min。将上清液移至新的 1.5 ml 无 RNA 酶的离心管中,并调节 pH 值 7.4,置于 -20℃ 中保存备用。

(2)粪便悬液的制备:取 0.1 g 粪便或 0.1 ml 水样便置于 1.5 ml EP 管中,向其中加入 1 ml 含抗生素的 PBS 缓冲液中,将粪便制成 10% (g/ml) 的悬液。然后室温振荡混匀后放置 5 min,最后 4000 r/min 离心 5 min,置于 -20℃ 储存备用。

(3)病毒核酸(RNA)的提取:对粪便和牡蛎样本的悬液采用 QIAamp mini viral RNA kit (QIAGEN)提取核酸,所提 RNA 用 20 μl DEPC 处理灭菌 dH₂O 溶解待用,或置于 -80℃ 储存备用。

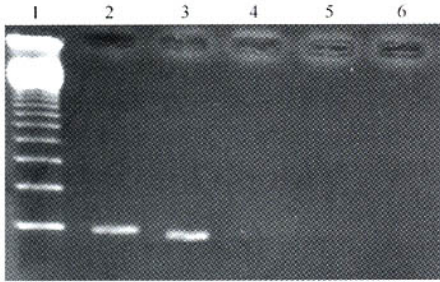
(4)反转录(RT)反应:在 0.5 ml PCR 管中加入 RNA 5 μl,10 mmol/L dNTP 混合物 1 μl,500 μg/ml 随机引物 1 μl,DEPC 水 6 μl,65℃ 孵育 5 min,冰盒上放置至少 1 min。然后再加入 0.75 μl 0.1 mol/L DTT (invitrogen),0.75 μl 10 U/μl AMV-RT (promega),50 U/μl RNA 酶抑制剂 0.5 μl (invitrogen),混匀,短暂离心收集。之后 37℃ 孵育 50 min。70℃ 15 min 终止反应,冰上冷却或 -20℃ 保存。

(5)Real-time PCR 扩增:用 TaKaRa 公司的 RT-PCR 试剂盒进行 PCR 反应。一个样品的 RT 产物要同时应用 2 管分别进行 NV G I、G II 型检测,同时以 10 倍稀释的标准品制备两型的标准曲线。每次检测均应设立阳性及阴性对照。G I、G II 型检测均采用 25 μl 反应体系,其中反转录产物 3 μl,PCR 反应混合液 15 μl,引物 P1、P2 (10 μmol/L) 各 0.5 μl,探针 (33 μmol/L) 各 0.5 μl,DEPC 水补足 25 μl。Real-time PCR 反应在 ABI PRISM 7000 PCR 仪上进行。PCR 反应条件为:37℃ 10 min;95℃ 15 min;95℃ 15 s,56℃ 1 min,40 个循环。产物的相对定量可分别通过与 G I、G II 型标准品扩增标准曲线 C_t 相比较得到。

(6)序列分析:按照 DNA 纯化试剂盒说明书纯化回收目的 DNA 片段。应用 T 载体构建 G I 及 G II 型克隆,用 PCR 方法鉴定并筛选出阳性克隆后,提取质粒,经美国 Applied Biosystems 公司的 377 测序仪测序鉴定,PCR 产物阳性标本确定为 NV 毒株。

结 果

1. 引物的特异性:应用上述 G I、G II 引物分别进行普通 PCR 扩增,产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,结果除 NV G I、G II 型阳性标本显示目的条带外,星状病毒(AV)、轮状病毒(RV)阳性标本及 NV 阴性标本均无非特异性扩增条带出现(图 1)。



注: 1: DNA Ladder Marker; 2, 3: NV G II、G I 型 PCR 结果; 4~6: 依次为 RV、AV、NV 阴性对照 PCR 结果

图1 普通 PCR 试验的凝胶电泳检测结果

2. 探针的特异性:为了验证建立的 Real-time RT-PCR 反应体系的特异性,分别提取 NV、RV 和 AV 的 RNA,反转录生成 cDNA,应用上述探针引物进行针对 NV 的 Real-time PCR 扩增。由图 2 可见,除已知 NV 阳性标本出现扩增曲线外,且扩增曲线光滑度好,并有明显的指数增长期,其他两种病毒及阴性对照的检测结果均呈阴性,提示所建立的 Real-time PCR 体系对 NV 有较好的特异性。

3. NV G I、G II 型 Real-time PCR 标准曲线的建立及其灵敏度:以 G I 型及 G II 型标准品贮存液(2×10^{10} copies/ μ l)10 倍系列稀释为 2×10^8 , 2×10^7 , 2×10^6 , 2×10^5 , 2×10^4 , 2×10^3 , 2×10^2 , 2×10^1 copies/ μ l 8 个浓度,各取 5 μ l 为模板用该研究建立的 NV TaqMan Real-time PCR 法进行检测制作标准曲线。结果显示在 $10^2 \sim 10^8$ copies/ μ l 范围内有较好的线性关系(图 3)。G I 型及 G II 型曲线线性相关系数 R^2 分别为 0.997 和 0.996,由图 3 中 PCR 扩增曲线可见,模板浓度 $> 10^2$ copies/ μ l 的反应体系有明显的荧光增加,而 10 copies/ μ l 和阴性对照均无荧光增加。

4. 临床腹泻粪便标本及牡蛎样本检测:为评价本研究建立方法的实用性,对 37 份粪便标本和 90 份牡蛎标本采用上述前处理方法制备悬液,提取核酸,然后分别应用 Real-time RT-PCR 和普通 RT-PCR 两种方法检测,其中普通 RT-PCR 选择国际上

通用的 p289/p290 引物对。结果应用本研究建立的 Real-time RT-PCR 方法从粪便标本中检出 6 份 NV G II 型阳性标本,90 份牡蛎标本中检出 7 份 NV G II 型阳性标本,其中牡蛎及粪便样本中的 NV 检出限均可达到 10^2 copies/ μ l;而应用普通 RT-PCR 从粪便标本中检出 5 份 NV G II 型阳性标本,而牡蛎标本中仅检出 3 份 NV G II 型阳性标本,这可能由于牡蛎标本中 NV 含量较低,应用 Real-time PCR 方法对牡蛎中病毒含量检测结果多为 $10^2 \sim 10^4$ copies/ μ l 之间,而普通 RT-PCR 由于灵敏度的限制最低检测限仅能达到 10^3 copies/ μ l,这可能是造成牡蛎中采用两种方法 NV 检出率差别较大的直接原因。而粪便标本中由于本研究检测粪便标本数量较少,两种检测方法的检出率无明显差别。对牡蛎及粪便标本中检出的 13 份阳性标本通过测序分析及核酸序列的同源性比对,证实检测结果可靠,均为 NV G II/4 型,提示该方法可以应用于低浓度的 NV 污染样品的检测。

讨 论

目前国内有学者建立了粪便样本中的 NV 检测方法^[4],但对于环境及食品,尤其是牡蛎等食品中的 NV,由于受病毒的提取等技术问题所限,一直无法建立一种同时适用于牡蛎及粪便标本通用的检测方法。本研究采用灵敏快捷的 Real-time RT-PCR 检测技术,建立了同时适用于牡蛎及粪便标本中 NV 表达量检测试剂盒,在保持高敏感性的前提下尽量减少假阳性的干扰,克服了常规 PCR 检测技术的诸多难题。NV 的基因组序列复杂多变,且 TaqMan 探针对序列的变化非常敏感,因此通过对基因库中大量 NV 病毒株进行筛选比较,选择了基因组中核苷酸序列高度同源性的 ORF1-ORF2 连接区域进行引物探针设计,不仅实现了 NV 的特异性检测并可区分基因型(G I、G II 型)。在研究中我们对 37 份粪便标本及 90 份牡蛎标本分别采用 Real-time RT-PCR 和普通 RT-PCR 两种检测方法进行比较,结果在牡蛎和粪便标本中均检测出 10^2 copies/ μ l 的样品(灵敏性为 10^2 copies/ μ l),而且通过对阳性标本的测序分析证实检测结果准确可靠。同时对 90 份牡蛎标本的检测结果比较发现,牡蛎标本中 NV 含量较低,因此应用 Real-time RT-PCR 方法的检出率明显优于普通 RT-PCR,提示该方法适用于检测低浓度的标本。

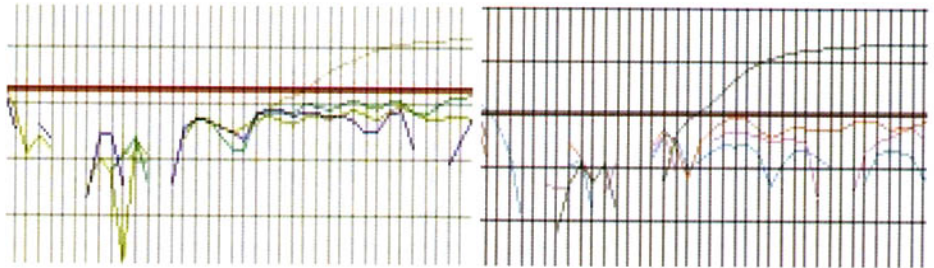
由于 Real-time RT-PCR 的扩增效率是通过 C_t 值来评价的^[5,6],即在假设标准品与样本有相同扩增效率的基础上进行评价,但由于样本中一般都含有明显降低 PCR 扩增效率的物质,使标准品和样品间的扩增效率存在差别,因此实际检测中我们推算出的样本中病毒含量可能低于实际样本中的浓度。如样本中病毒含量较大时,通过样品的稀释可有效冲淡抑制物,对样本中病毒含量的测得值影响较小。而当样本中病毒含量较低时,抑制因素的存在将很大程度上影响被测物质含量的真实拷贝数。因此,由于实际检测标本的复杂性, TaqMan Real-time RT-PCR 也只能是对样本中病毒含量的

相对定量。目前有研究通过人工合成 NV 的质粒作为外标来评价扩增效率,但这明显增加了检测成本^[7,8]。另外,本研究是以牡蛎为食品代表,由于食品成分复杂,不同食品可能存在不同的抑制因子,但该方法对于其他的食品是否有同样的扩增效率,还有待于更多的实验研究证实。

本研究建立的 Real-time RT-PCR 方法大大提高了 NV 定量及分型的检测效率,该方法的建立不仅为日常监测工作节省了大量的人力、试剂和时间,同时为应对经新鲜海产品引起大规模的 NV 胃肠炎暴发提供方便快捷的检测工具。

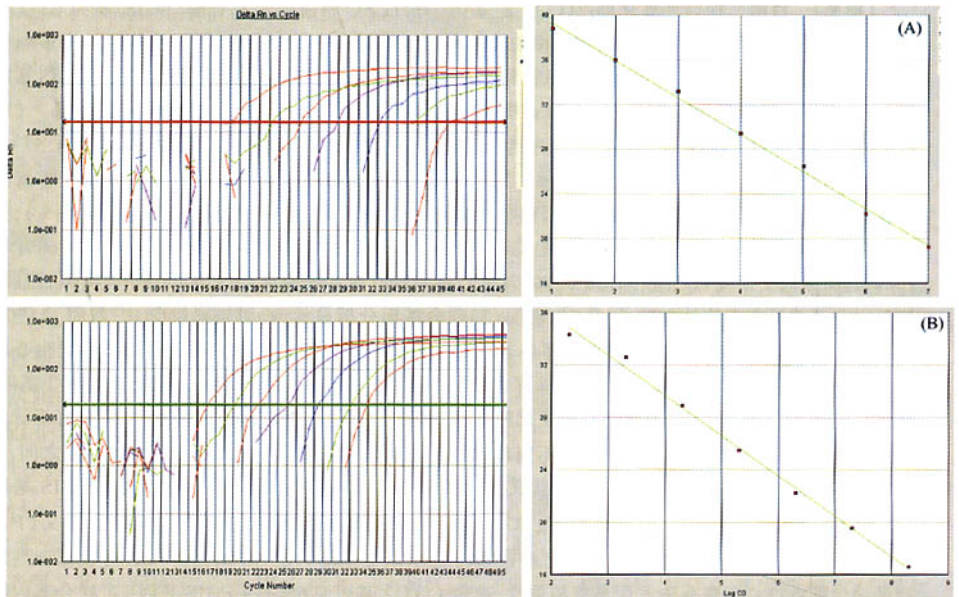
参 考 文 献

[1] Ho MS, Glass RI, Monroe SS, et al. Viral gastroenteritis aboard a cruise ship. *Lancet*, 1989, 2(8669): 961-965.
[2] Marks PJ, Vipond IB, Regan FM, et al. A school outbreak of



注:红色横线上方光滑曲线分别为 NV G I、G II 型阳性标本的扩增曲线,下方为 RV、AV 及阴性对照的荧光信号

图2 G I、G II 型 NV 样本荧光定量 PCR 扩增曲线图



注:左图中从左到右的扩增曲线分别对应的模板稀释浓度为 $10^8 \sim 10^2$,右图从左至右各点依次代表 $10^2 \sim 10^8$ 各浓度所对应的 C_t 值

图3 G I 型(A)、G II 型(B)标准品扩增曲线及定时分析基因拷贝数标准曲线

Norwalk-like virus, evidence for airborne transmission. *Epidemiol Infect*, 2003, 131(1): 727-736.
[3] Mead PS, Slutsker L, Dietz V, et al. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis*, 1999, 5(6): 840-842.
[4] 司红丽,王健伟,徐桦巍,等.检测粪便中 G II 型 NV Real-time RT-PCR 方法建立. *病毒学报*, 2006, 22(3): 166-171.
[5] Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett*, 2003, 339(1): 62-66.
[6] Tichopad A, Dilger M, Schwartz G, et al. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(20): e122.
[7] Schwab KJ, Estes MK, Neill FH, et al. Use of heat release and an internal RNA standard control in reverse transcription-PCR detection of Norwalk virus from stool samples. *J Clin Microbiol*, 1997, 35(2): 511-514.
[8] Schwab KJ, Neill FH, Guyader F, et al. Development of a reverse transcription-PCR-DNA enzyme immunoassay for detection of "Norwalk-like" viruses and hepatitis A virus in stool and shellfish. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(2): 742-749.

(收稿日期:2008-01-07)
(本文编辑:张林东)