

贝类产品中诺沃克病毒的实时荧光 RT-PCR 检测方法研究

潘良文 张舒亚 李晓虹 严罗美 李树清 王巧全
(上海出入境检验检疫局)

摘 要:诺沃克病毒是一种分布很广泛的肠道腹泻病毒,主要存在于牡蛎、文蛤等贝类中。本研究建立了从贝类中提取诺沃克病毒 RNA 的方法以及进行实时荧光 RT-PCR 检测的方法。
关键词:诺沃克病毒;贝类;RT-PCR

1 前言

诺沃克病毒(Norovirus),先前又被称为诺瓦克样病毒(Norwalk-like viruses,简称 NLVs),属杯状病毒科、沃克病毒属,是一种分布很广泛的肠道腹泻病毒。被诺沃克病毒感染后,出现以急性胃肠炎为主的临床症状,即水样腹泻、呕吐和腹痛等症状。若治疗不及时或治疗方法不正确,轻者影响人体的生长发育,严重者可导致脱水死亡。在美国每年 2000 万人次的急性肠胃炎是由诺沃克病毒引起的,它也是美国和欧洲病毒性肠胃炎爆发的主要原因。诺沃克病毒的传播途径类似于甲肝病毒,主要是人-人接触传播和污染的食品和水源,其中污染的食品(主要是贝类产品)传播是造成大规模、全球性传播的主要途径。

目前国外对粪便和贝类进行诺沃克病毒检测的报道较多^[1-6],国内方肇寅等用常规 RT-PCR 方法对粪便中诺沃克病毒的检测做了较系统的研究^[7-9],但未见国内用实时荧光 RT-PCR 方法对贝类样品进行诺沃克病毒检测的报道,本文使用实时荧光 RT-PCR 方法对贝类诺沃克病毒的检测进行了研究。

2 试验材料与方法

2.1 供试病毒

含诺沃克 GI 型病毒 cDNA 的质粒(NV-GI)和含诺沃克 GII 型病毒 cDNA 的质粒(NV-GII)由日本国家传染病研究所 Tsutomu Kageyama 先生惠赠。含 II 型诺沃克病毒的粪便样品,nv1、nv2、nv3、nv4 和含杯状病毒科札幌病毒的粪便样品 Sapporo 购自中国疾病预防控制中心病毒预防控制所。

2.2 牡蛎和文蛤

对购自上海水产品市场的牡蛎和蛤进行诺沃克病毒接种。

2.3 试剂

甘氨酸缓冲液:0.1M 甘氨酸,0.3M NaCl,pH9.5; PEG8000-NaCl 溶液:16%PEG8000(聚乙二醇,Sigma,wt/v),0.525M NaCl;2×RNA Binding Buffer:40mM Tris-HCl(pH7.5),2.0M LiCl,4mM EDTA。Wash buffer:10mMTris-HCl(pH7.5),0.15M LiCl,1mM EDTA;Dynabeads-oligo(dT)25(Cat.No.61005,Dynal Biotech Inc.,Oslo,Norway);TRIzol RNA 抽提试剂盒(Introgen 公司,Cat.No.15596-026);Tri-reagent RNA 提取试剂盒(Sigma 公司,Cat.No.T-9424);Access RT-PCR System(Promega 公司,Cat.A1250)。

2.4 实时荧光 PCR 引物和探针

扩增的引物和探针序列^[3]见表 1。

表 1 实时荧光 RT-PCR 检测的引物和探针	
检测病毒类群	引物和探针序列(5'-3')
GI	COGIF:5'-CGYGGATCCGNTTYCATGA-3'
	COGIR:5'-CTTAGACCCCATCATCATTYAC-3'
	GI(a)-P:5'-FAM-AGATCCGATCYCCTGICCA-TAMRA-3'
	GI(a)-P:5'-FAM-AGATCCCGGCTCTCTGICCA-TAMRA-3'
	COGIF:5'-CARGARBCNATGTTYGRTGGATGAG-3'
GII	COGIR:5'-TCGACCCATCTTCATTCACA-3'
	G2-P:5'-FAM-TGGGAGGCCGATCCCAATCT-TAMRA-3'

2.5 方法

2.5.1 粪便样品中病毒 RNA 的提取

取 140μL 含有病毒的粪便样品,采用 TRIzol RNA 抽提试剂盒或 Tri-reagent RNA 提取试剂盒提取病毒 RNA。

2.5.2 贝类中病毒的富集

取下已接种贝类的胃、肠组织,每 25g 组织加入 175mL 甘氨酸缓冲液,20 匀浆器高速匀浆 3min。取 30mL 匀浆液装入 50mL 离心管,37 温育 30min。4 ,15000g 离心 30min。分别移取上清至新管中,加入等体积的 PEG8000-NaCl 溶液,冰上放置至少 1h。

作者简介:潘良文(1966-),男,毕业于中国科学院上海植物生理生态所,高级工程师。已发表论文 40 余篇。

4 ,10000g 离心 5min ,弃上清 ,保留沉淀。

2.5.3 贝类中病毒 RNA 的提取和纯化

在 2.5.2 的沉淀中加入 5mL Tri - reagent ,剧烈震荡混合 ,放置 5min。加入 1.2mL 氯仿 ,剧烈震荡 30s ,放置 5min。4 ,12000g 离心 5min ,取上清。加入 0.5 倍体积异丙醇 ,放置 5min。4 ,5000g 离心 5min。用冰冷 75 %乙醇洗涤沉淀。沉淀重悬于 300μL 水中 ,震荡助溶。加入 400μL 1 × RNA Binding Buffer ,震荡 30s ,60 放置 3min。加入 100μL Dynabeads - oligo (dT) 25 磁珠溶液 ,混合 30s ,在磁珠吸附架上放置 1min。弃上清 ,加入 500μL 2 ×RNA binding buffer ,摇动 5min。在磁珠吸附架上放置 1min ,弃上清。用 Wash buffer 洗涤 3 次。在沉淀中加入 100μL 水 ,90 放置 2min。在磁珠吸附架上放置 1min ,取上清 ,直接用于实时荧光 RT - PCR 检测。

2.5.4 实时荧光 RT - PCR 检测

使用 Access RT PCR System 试剂盒进行 RT - PCR。反应总体积为 50μL ,按照试剂盒说明加入各溶液 ,50μM 正反引物各 1μL ,荧光探针 5μM GI (a) - P 和 GI (b) - P 加样量分别为 3μL 和 1μL ,探针 5μM G2 - P 加样量为 1μL ,10μL 病毒 RNA 溶液。使用 ABI PRISM 7700 定量 PCR 仪进行实时荧光 RT - PCR 检测 ,循环条件 :48 ,45min ; 95 ,10min ; 95 ,15s ,56 ,1min ,45 个循环。

2.5.5 PCR 产物的测序和克隆

使用引物 COG2F 和 COG2R 对 GII 型诺沃克病毒样品进行 RT - PCR 扩增 ,根据文献^[10]对 PCR 产物进行测序和克隆 ,得到含有 GII 型诺沃克病毒该段 cDNA 序列的质粒。

3 结 果

3.1 实时荧光 RT - PCR 方法的建立

本研究使用引物 COG1F、COG1R 和 TaqMan 探针

表 2 粪便病毒样品的 RT - PCR 检测结果

样品名称	引物和探针	
	COG1F/ COG1R GI (a) - P/ GI (b) - P	COG2F/ COG2R / G2 - P
nv1	-	+
nv2	-	+
nv3	-	+
nv4	-	+
sapporo	-	-

(- :表示阴性 ; + :表示阳性。)

GI (a) - P、GI (b) - P 进行检测 ,质粒 NV - GI 出现荧光信号 ,其它样品均未检测出荧光信号。用引物 COG2F/ COG2R 和 TaqMan 探针 G2 - P 对供试质粒和病毒病毒进行检测 ,从四个诺沃克病毒样品中均检测出荧光信号 ,质粒 NV - GI 和 Sapporo 病毒样品无信号 ,质粒 NV - GII 出现荧光信号 (表 2)。

采用引物 COG2F/ COG2R 对上述样品进行常规 RT - PCR 检测 ,四个诺沃克病毒样品均得到 119bp 的 PCR 扩增产物。经对 PCR 产物测序 ,序列与 GenBank 中的诺沃克病毒序列不同株系相一致。本研究所使用的粪便病毒样本均由中国疾病预防控制中心病毒预防控制所提供 ,这些样品均为 II 型诺沃克病毒。以上结果说明引物 COG2F、COG2R 和 TaqMan 探针 G2 - P 能较好地用于检测 II 型诺沃克病毒。

3.2 贝类样品中的诺沃克病毒的检测

在未感染诺沃克病毒的牡蛎肠胃组织中分别加入诺沃克病毒样品 nv3 原液 140μL 和其 10 倍稀释液 140μL ,按照文中提取方法进行病毒 RNA 提取。用引物 COG2F/ COG2R 和探针 G2 - P 对贝类中提取纯化的病毒 RNA 溶液进行实时荧光 RT - PCR 检测 ,出现荧光扩增曲线。结果表明 ,实时荧光 RT - PCR 能够检测出按照 2.5.2 和 2.5.3 的方法从贝类中富集提取和纯化的诺沃克病毒 RNA (图 1)。

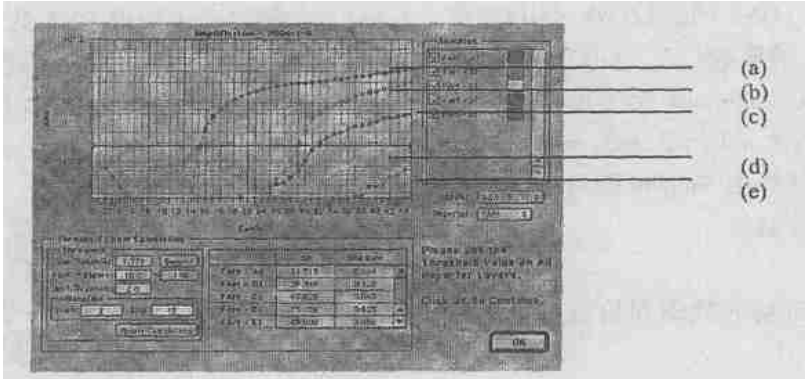


图 1 牡蛎中诺沃克病毒的实时荧光 RT - PCR 检测

(a) 含有诺沃克病毒扩增片段的克隆质粒 ;(b) 加入含有诺沃克病毒样品原液的牡蛎 ;(c) 加入含有诺沃克病毒样品 10 倍稀释液的牡蛎 ;(d) 未加入含有诺沃克病毒粪便的牡蛎 ;(e) 空白对照

3.3 实时荧光 RT-PCR 检测引物和探针的检测灵敏度

使用引物 COG2F/COG2R 对诺沃克病毒进行 RT-PCR 检测,对 PCR 产物进行克隆,对克隆质粒进行 10 倍梯度稀释至 10^{-7} 倍,用引物 COG2F/COG2R 和探针 G2-P 分别测定各稀释质粒的 Ct 值,不同拷贝数的质粒实时荧光 PCR 检测结果见表 3,标准曲线见图 2。可见 Ct 值与模板拷贝数之间的线性关系良好,在质粒拷贝数为 60.67 时仍能检测出。说明使用引物 COG2F/COG2R 和探针 G2-P 进行检测时,检测结果准确,有较高的灵敏度。

表 3 不同克隆质粒稀释液的 Ct 值

Ct	拷贝数
15.345	6.067×10^8
17.118	6.067×10^7
20.614	6.067×10^6
24.084	6.067×10^5
27.272	6.067×10^4
30.337	6.067×10^3
35.027	6.067×10^2
37.772	6.067×10^1
40	0

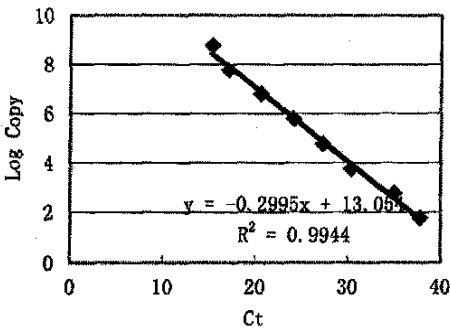


图 2 Ct 值与模板拷贝数之间的线性关系

4 讨论

诺沃克病毒是以诺瓦克病毒为原型的一类病毒总称。根据诺沃克病毒分子生物学特征,分为 GI 型和 GII 型两个遗传组^[2],很多检测工作都是基于这种分型来进行。但最近也有学者认为分成三个和四个遗传组^[6],但没有得到广泛的认同。由于诺沃克病毒不能人工培养,限制了对其检测方法的发展^[12]。

对贝类产品进行诺沃克病毒检测,最重要的一步是要成功提取病毒 RNA,贝类中的腐败物质、大量的粘多糖等物质影响了病毒 RNA 的提取和 PCR 扩增。研究表明,需要先富集贝类中的病毒,然后提取病毒 RNA 后并对 RNA 进行纯化,才能取得满意的 RT-PCR 检测效果。

对诺沃克病毒的检测方法主要有电镜法、ELISA

法和 RT-PCR 方法。电镜技术只适用于早期病人粪便或呕吐物样本的诊断,ELISA 方法由于诺沃克病毒的遗传多样性限制了对所有病毒的检测,而 RT-PCR 方法由于敏感、特异和快速被广泛应用。实时荧光 RT-PCR 方法是在常规 RT-PCR 检测中加入了一条荧光探针,做到了实时检测,并且大大地提高了检测灵敏度,并且该方法不进行电泳,不使用致癌物溴化乙锭,对研究人员和环境更安全。本研究采用 Kageyama 设计的引物和探针进行实时荧光检测,证明方法切实可行。

本项目得到国家标准专项上海地方实施项目(课题编号:02dz05039)和国家质检总局科研项目(课题标号:2004IK072)资助。

参考文献

[1] Jiang X, . Huang P, Zhong W, et al. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk - and Sapporo - like caliciviruses by RT-PCR. Journal of Virological Methods[J] , 1999 ,83 :145 - 154

[2] Kojima S ,Kageyama T, Fukushi S, et al. Genogroup - specific PCR primers for detection of Norwalk - like viruses. Journal of Virological Methods[J] , 2002 ,100 :107 - 114

[3] Kageyama T, Kojima S,Shinohara M, et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk - like viruses based on real - time quantitative reverse transcription - PCR. J. of Clinical Microbiology[J] , 2003 ,41(4) :1548 - 1557

[4] Kingsley D and Richards G, Rapid and efficient extraction method for reverse transcription - PCR detection of hepatitis A and Norwalk - like viruses in shellfish. Applied and Environmental Microbiology[J] . 2001 ,67(9) :4152 - 4157

[5] Kingsley D and Richards G, Detection of both hepatitis A virus and Norwalk - like virus in imported clams associated with food - borne illness. Applied and Environmental Microbiology[J] . 2002 ,68(8) :3914 - 3918

[6] Vinje J ,Vennema H, Maunula L, et al. International collaborative study to compare reverse transcriptase PCR assays for detection and genotyping of noroviruses. J. Clinical Microbio [J] . 2003 ,41 (4) :1423 - 1433

[7] 方肇寅,温乐英,晋圣瑾,等. 在我国腹泻患儿中发现诺瓦克样病毒感染. 病毒学报,11(3) :215 ~ 219

[8] 谢健屏 方肇寅 龚四堂,等. 2001 年广州市婴幼儿杯状病毒腹泻病的基因研究. 中华儿科杂志,2003 ,41(11) :842 ~ 844

[9] 谢华萍,方肇寅,王光,等. 长春市儿童医院 1998 - 2001 年婴幼儿杯状病毒腹泻流行病学研究. 病毒学报,2002 ,18(4) :332 ~ 336

[10] J. 萨姆布鲁克等编,金冬雁等译,分子克隆实验指南(第二版),科学出版社,1999