

# 实时定量 RT-PCR 方法检测太平洋牡蛎中的诺沃克样病毒

岳志芹<sup>1</sup>, 汪俊<sup>2</sup>, 梁成珠<sup>1</sup>, 雷质文<sup>1</sup>, 高宏伟<sup>1</sup>, 徐彪<sup>1</sup>, 朱来华<sup>1</sup>, 薛长湖<sup>2</sup>

(1. 山东出入境检验检疫局技术中心, 山东 青岛 266002; 2. 中国海洋大学 食品安全实验室, 山东 青岛 266003)

**摘要:** 建立了 Taqman 实时定量 RT-PCR 方法检测诺沃克样病毒(Norwalk-like Virus, NLV)的方法,并对中国的牡蛎样品进行了分析。选取 G 型 NLV 的 RNA 聚合酶区域,利用 Primer Express 2.0 软件设计引物和探针,建立了定量 RT-PCR 反应体系。将含有 NLV 扩增片段的质粒 10 倍梯度稀释,作为标准品进行反应以确定检测灵敏度并制备标准曲线。结果表明,质粒密度在  $6 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^5$ ,  $6 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^3$ ,  $6 \times 10^2$ ,  $6 \times 10^1$ , 6 个拷贝之间,共 7 个数量级的范围内,定量 RT-PCR 反应都有“S”型扩增曲线,检测灵敏度为 6 个拷贝。制备的标准曲线中,病毒拷贝数(X)与  $C_t$  值的关系为  $C_t = -3.36 \lg X + 37.11$ ,相关系数  $R^2 = 0.998$ 。对中国 37 批太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas* Thunberg)样品进行了定量检测,有 6 批样品为阳性,并根据标准曲线测定了 NLV 的含量。

**关键词:** 牡蛎;诺沃克样病毒(Norwalk-like virus, NLV);实时定量 RT-PCR;Taqman 探针

中图分类号:Q93-331

文献标识码:A

文章编号:1000-3096(2008)08-0001-04

诺沃克样病毒(Norwalk-like virus, NLV)是非细菌性急性肠胃炎的主要病原体之一,可引起患者恶心、呕吐、腹痛、腹泻,甚至低热、头痛、肌痛、乏力及食欲减退等症状<sup>[1-3]</sup>。该病毒于 1968 年在美国俄亥俄州诺沃克镇首次发现而得名,之后世界各地陆续发现多种形态与之相似但抗原性略异的病毒样颗粒,先是称为小圆结构病毒(Small Round Structural Virus, SRSV),后称为诺沃克样病毒。2002 年 8 月第 8 届国际病毒命名委员会将其命名为诺如病毒(Norovirus, NV),属于杯状病毒科(Caliciviridae),诺如病毒属(*Norovirus*)。根据 NLV 的 RNA 聚合酶区的核苷酸序列,可将其分为两个基因型, G 型和 G 型。不同国家和地区的 NLV 的基因型有较大的差异。NLV 主要通过人体 粪便 水体 食品 人体途径传播,双壳软体动物(如牡蛎、扇贝、蛤蜊、蚶等)是 NLV 的主要食物载体<sup>[4-6]</sup>,因为其生活的水域容易受到人类粪便的污染,在滤食海水微藻的同时,也富集了大量的 NLV,虽然病毒不能在体内繁殖,但能在它们的消化道中存活数周,被生食后人即可感染 NLV。因此,对双壳软体动物进行 NLV 的检测及监控具有重要意义。

由于缺乏细胞培养体系和动物模型, NLV 的检测方法包括电镜技术<sup>[7]</sup>、核酸杂交<sup>[8]</sup>、RT-PCR 等<sup>[9,10]</sup>,这些方法准确性好,但是操作较繁琐,且在特异性、灵敏度方面有一定的局限性。国内对 NLV 的研究多集中于人类粪便样品中该病毒的检测<sup>[11-13]</sup>,而在贝类研究中的报道仅见汪俊等<sup>[14]</sup>利用 RT-PCR

方法检测中国的牡蛎样品,序列分析表明中国的 NLV 为 G 型。采用 RT-PCR 技术检测 NLV,需要经过琼脂糖凝胶电泳、EB 染色观察结果,对人体和环境有害,并且只能进行定性检测,不能定量分析。最近发展的实时定量 PCR 技术,可以进行定量分析,不需电泳,并且特异性高,被广泛应用于检测病毒含量、研究药物作用机理、基因表达等研究领域<sup>[15]</sup>。本研究建立了基于 Taqman 探针的 NLV 的实时定量 RT-PCR 检测方法,对太平洋牡蛎样品进行了定量检测,绘制的标准曲线可以定量检测贝类中的 NLV。实时定量 RT-PCR 检测 NLV 方法的建立,可以用于监控中国的贝类产品,对于促进人类公共卫生、营养健康及疾病预防具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas* Thunberg)样品采自浙江某牡蛎养殖场,于 -20℃ 冷冻保存。共有 37 批样品。

收稿日期:2006-05-29;修回日期:2007-01-10

基金项目:山东出入境检验检疫局科研基金项目(sk38-2004);宁波市博士科学基金;新世纪人才基金资助项目

作者简介:岳志芹(1975-),女,山东烟台人,博士,高级工程师,主要从事出入境水生动物疫病检验检疫,电话:0532-86770618, E-mail: yuezhiqin@126.com

## 1.2 试剂与仪器

试剂: TRIzol (BBI 分装)、ABI one-step RT-PCR reaction kit, 其成分包括 RT-PCR master mix (含金牌 Taq 酶、dNTP 及其他 PCR 反应必须成分)、RNase 抑制剂。定量 PCR 仪器为美国 ABI 7900HT 型。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 牡蛎的处理及病毒核酸的提取

基本方法参照汪俊等<sup>[14]</sup>, 采用甘氨酸缓冲液处理、PEG 沉淀的方法浓缩贝类 NLV, 用 TRIzol 进行 RNA 的分离和纯化, 加入 10  $\mu$ L DEPC H<sub>2</sub>O 溶解, 用核酸分析仪进行定量, 调整 RNA 质量浓度为 100 mg/L, -20 保存。

### 1.3.2 实时定量 RT-PCR 扩增及反应灵敏度的测定

以 G 型 NLV 的 RNA 聚合酶区基因片段<sup>[14]</sup> 作为目的扩增区域, 利用 Primer Express 2.0 设计引物和探针, 序列如下:

正向引物(F): 5'-CACCACGCTAGGAGAAAGAAAGGT-3'

反向引物(R): 5'-CAGCCCTAGAAATCATGTGTTAAATTC-3'

TaqMan 探针(T): 5'-FAM-CGACCACCTGAGCCAAATGTGGTTC-TAMRA-3'

PCR 反应管中加入 1  $\mu$ L 提取的 RNA 溶液, RT-PCR master mix 12.5  $\mu$ L, RNase 抑制剂 0.7  $\mu$ L, 正向及反向引物各 0.2  $\mu$ mol/L, TaqMan 探针 0.1  $\mu$ mol/L, 补充水至 25  $\mu$ L。

反应程序: 48 30 min; 95 10 min; 之后 95 15 s, 58 1min 进行 40 个循环。

将实验室制备的含有 G 型诺沃克样病毒扩增片断的质粒<sup>[14]</sup> 进行稀释, 得到  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  的 10 倍梯度稀释样品, 将其作为标准品, 用引物及荧光探针进行扩增。测定质粒的光密度值  $A_{260}$ , 计算其质量, 并换算出每  $\mu$ L 溶液中 DNA 的拷贝数, 相应的分别为  $6 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^5$ ,  $6 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^3$ ,  $6 \times 10^2$ ,  $6 \times 10^1$ , 6 个拷贝。

### 1.3.3 数据分析

反应过程中, 仪器自动收集荧光信号, 反应结束后, 利用 SDS (Sequence Detection System) 2.1 软件分析扩增曲线以及  $C_t$  值, 并绘制标准曲线。其中,  $C_t$  (threshold cycle) 值的含义是: 每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数。 $C_t$  值与模板的起始拷贝数的对数存在严格的线性关系, 起始拷贝数越多,  $C_t$  值越小。

### 1.3.4 实时定量 RT-PCR 检测 NLV 牡蛎样品

用建立的实时定量 RT-PCR 方法检测牡蛎样品, 并分别以质粒、去离子水为模板进行扩增, 作为

阳性对照、空白对照以监控 PCR 过程。依据样品  $C_t$  值和扩增曲线进行结果判定:  $C_t \leq 35$ , 且扩增曲线呈 S 型判为阳性;  $C_t > 35$  以及无扩增曲线的判为阴性样品。含有病毒的样品利用制备的标准曲线计算病毒量。

## 2 结果

### 2.1 实时定量 RT-PCR 检测 NLV 的灵敏度

将梯度稀释的质粒作为标准品, 每个稀释度做 2 个重复, 进行定量 RT-PCR 反应。不同拷贝数的质粒的扩增曲线如图 1, 其中 X 轴代表 PCR 反应循环数, Y 轴  $R_n$  代表荧光信号强度。可以看出, 质粒在对应的密度为  $6 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^5$ ,  $6 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^3$ ,  $6 \times 10^2$ ,  $6 \times 10^1$ , 6 个拷贝, 共 7 个数量级的范围内有典型的“S”型扩增曲线, 即反映了 PCR 的指数增长期, 线性增长期和平台期三个阶段。表 1 列出了病毒拷贝数及对应的  $C_t$  值, 不同稀释度样品之间的  $C_t$  值相差比较均匀, 符合定量 PCR 反应的动力学及线性关系, 表明 PCR 扩增效率较高, 设计的引物和探针特异性好。

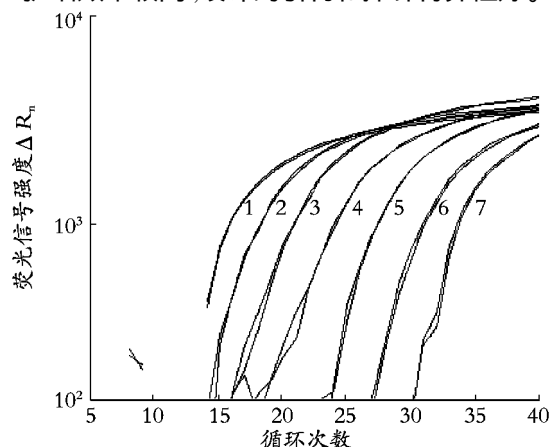


图 1 NLV 梯度稀释质粒的扩增曲线

Fig. 1 Amplification plot of NLV standard plasmids with tenfold serial dilutions

1~7. NLV 质粒密度分别为  $6 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^5$ ,  $6 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^3$ ,  $6 \times 10^2$ ,  $6 \times 10^1$ , 6 个拷贝

1~7. The copy number of NLV plasmids was  $6 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^5$ ,  $6 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^3$ ,  $6 \times 10^2$ ,  $6 \times 10^1$ , 6, respectively

表 1 NLV 质粒拷贝数及对应的  $C_t$  值

Tab. 1 The number of NLV plasmid copies and their  $C_t$  value

扩增曲线编号	质粒密度	$C_t$ (平均值)
1	$6 \times 10^6$	14.21 $\pm$ 0.06
2	$6 \times 10^5$	17.90 $\pm$ 0.15
3	$6 \times 10^4$	20.74 $\pm$ 0.10
4	$6 \times 10^3$	23.82 $\pm$ 0.39
5	$6 \times 10^2$	27.35 $\pm$ 0.15
6	$6 \times 10^1$	31.01 $\pm$ 0.16
7	6	34.29 $\pm$ 0.07

## 2.2 实时定量 RT-PCR 检测 NLV 的标准曲线

根据梯度稀释的 NLV 质粒浓度及其对应的  $C_t$  值(表 1),利用 SDS2.1 软件,以起始模板拷贝数为  $x$  轴,以  $C_t$  值为  $y$  轴作回归曲线,得到标准曲线,即模板拷贝数( $X$ )与  $C_t$  值的关系为:  $C_t = -3.361gX + 37.11$ ,相关系数  $R^2 = 0.998$ ,见图 2。

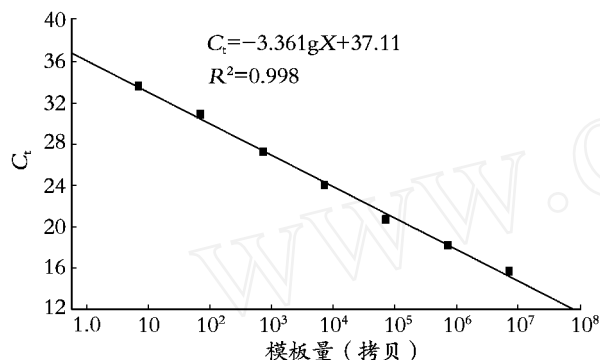


图 2 NLV 定量 RT-PCR 反应的标准曲线

Fig. 2 Standard plot for quantification of NLV using real-time RT-PCR

## 2.3 实时定量 RT-PCR 检测太平洋牡蛎样品中的 NLV

被检测的 37 批太平洋牡蛎样品中,有 6 批样品含有 NLV,扩增曲线见图 3,其中阳性质粒有“S”型扩增曲线,空白对照无扩增曲线,表明试验过程的质量控制符合要求,不存在 PCR 污染和假阴性,结果可靠。6 批样品的  $C_t$  值分别为 25.78,29.70,32.10,32.89,33.56,34.92。根据标准曲线,计算出牡蛎每  $\mu\text{g}$  RNA 中 NLV 的拷贝数约为  $2.4 \times 10^4$ ,  $1.6 \times 10^3$ , 300,180,110,50 个拷贝。

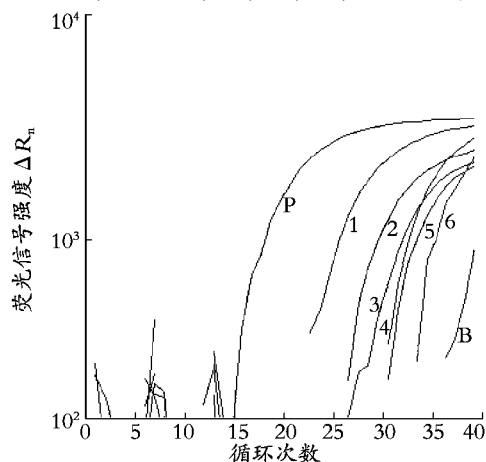


图 3 牡蛎样品 NLV 的扩增曲线

Fig. 3 Amplification plot of tested oysters

P. 阳性对照;B. 空白对照;1~6. 含有 NLV 的牡蛎样品  
P. positive control; B. blank control; 1~6. tested samples of oysters with NLV

## 3 讨论

本试验建立了 Taqman 实时定量 RT-PCR 检测 NLV 的方法,不仅可以定性检测 NLV,也可定量检测 NLV。在传统的 PCR 中,常用凝胶电泳分离荧光染色来检测 PCR 反应的最终扩增产物,由于 PCR 的终产物量与起始模板量之间没有线性关系,因此终点定量法存在不可靠之处。实时定量 PCR 是利用荧光染料在激发光的作用下所释放的荧光信号的变化,来动态反映 PCR 扩增产物量的变化,从而达到实时定量监测的目的。利用已知拷贝数的标准品作出标准曲线,根据未知样品的  $C_t$  值,即可计算出该样品的起始拷贝数,达到定量检测的目的。

NLV 的核酸序列变异很大,不同国家和地区的 NLV 有较大差异<sup>[16]</sup>,因此文献发表的引物和探针的通用性较差,应用范围有限。本实验在汪俊等<sup>[14]</sup>用 RT-PCR 分析中国牡蛎样品的基础上,根据其携带的 NLV 的 RNA 聚合酶区的序列,设计了引物和探针,针对性强,得到了较好的检测效果。本试验尝试使用日本学者<sup>[16]</sup>发表的引物和探针进行反应,结果荧光信号值很低,反映了引物和探针与模板的匹配程度低,表明引物和探针不适用于中国牡蛎样品 NLV 的检测。在定量反应中,由于设计的 PCR 产物长度较短(为 86 bp),仅占 NLV 基因组的一小部分,因此,对于变异程度较大的 NLV 而言,可以提高检出率,尽可能避免假阴性结果的出现。在中国牡蛎样品中发现 NLV,由于中国江浙一带有生食牡蛎的习惯,因此,应该加强对牡蛎及生活水域中的 NLV 的检测及监控,防止大规模肠胃炎流行病的爆发。

本研究建立的方法在模板浓度为  $6 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^5$ ,  $6 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^3$ ,  $6 \times 10^2$ ,  $6 \times 10^1$ , 6 个拷贝,共 7 个数量级的范围内有扩增曲线,表明检测方法对于模板浓度要求较宽,检测灵敏度较高,可以达到 6 个拷贝。定量 PCR 仅需要 2 h 操作,一次可以进行 96 个样品的检测,PCR 反应结束后可立即观察结果,不需要电泳、染色,因此更方便、快速。与以往的检测方法相比,灵敏度高,操作简单,特异性好,无交叉污染,在贝类的 NLV 诊断中具有很大的应用价值。实时定量 RT-PCR 检测 NLV 的方法的建立,对于研究疾病的爆发流行与病毒量的关系具有重要意义,同时,可以用于监测水体及贝类中的 NLV,保障公共食品安全卫生。

### 参考文献:

- [1] Metcalf T G, Melnick J L, Estes M K, *et al.* Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology—a trip of over 50

- years[J]. *Annu Rev Microbiol*, 1995, 49: 461-487.
- [2] Kaplan J E, Gary G W R, Baron C, *et al.* Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and the role of Norwalk virus in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis [J]. *Ann Intern Med*, 1982, 96: 756-761.
- [3] Robert L A, Mary K E. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2001, 14(1): 15-37.
- [4] Richards G P. Shellfish-associated enteric virus illness in the United States, 1934-1984[J]. *Estuaries*, 1987, 10: 84-85.
- [5] Pontefract R D, Bishaf F R, Hockin J, *et al.* Norwalk-like viruses associated with a gastroenteritis outbreak following oyster consumption[J]. *J Food Prot*, 1993, 56: 604-607.
- [6] Rippey S R. Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption [J]. *Clin Microbiol Rev*, 1994, 7: 419-425.
- [7] Kapikian A Z, Wyatt R H. Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis[J]. *J Virol*, 1972, 10: 1 075-1 081.
- [8] Tamie A, Stephan S M. Detection and differentiation of antigenically distinct small round-structured viruses (Norwalk-like viruses) by RT-PCR and southern hybridization[J]. *J Clin Microbiol*, 1995, 33: 64-71.
- [9] Lilly K W Y, Michael G C. Heminested multiplex RT-PCR for detection and differentiation of Norwalk-like virus genogroups 1 and 2 in fecal samples[J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39: 2 690-2 694.
- [10] Hugh J O'Neill, Conall M, Dorothy E W, *et al.* Gastroenteritis outbreaks associated with Norwalk-like viruses and their investigation by nested RT-PCR[J]. *BMC Microbiology*, 2001, 1: 1-14.
- [11] 方肇寅, 温乐英, 晋圣谨, 等. 在中国腹泻儿童中发现诺瓦克样病毒感染[J]. *病毒学报*, 1995, 11(3): 215-219.
- [12] 靖宇, 钱渊, 王洛平. 北京地区人群诺瓦克病毒血清抗体水平调查[J]. *病毒学报*, 1998, 14(4): 322-327.
- [13] 靖宇, 钱渊, 吴立平, 等. 太原部分人群诺瓦克样病毒血清抗体水平的调查[J]. *中华儿科杂志*, 1999, 37(9): 559-561.
- [14] 汪俊, 薛长湖, 李兆杰, 等. 太平洋牡蛎中诺瓦克样病毒的 RT-PCR 法检测和病毒聚合酶区部分序列的分析[J]. *中国水产科学*, 2004, 11(6): 525-530.
- [15] Heid C A, Stevens J, Livak K J, *et al.* Real time quantitative PCR[J]. *Genome Res*, 1996, 6: 986-994.
- [16] Tsutomu K, Shigeyuki K, Michiyo S, *et al.* Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-Like Viruses based on real-time quantitative reverse Transcription-PCR [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(4): 1 548-1 557.

## Detection of Norwalk-like virus in oysters (*Crassostrea gigas*) by real-time quantitative RT-PCR

YUE Zhi-qin<sup>1</sup>, WANG Jun<sup>2</sup>, LIANG Cheng-zhu<sup>1</sup>, LEI Zhi-wen<sup>1</sup>, GAO Hong-wei<sup>1</sup>, XU Biao<sup>1</sup>, ZHU Lai-hua<sup>1</sup>, XUE Chang-hu<sup>2</sup>

(1. Technical Center of Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China;  
2. Food Safety Lab of Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received : May 29, 2006

**Key words** : *Crassostrea gigas*; Norwalk-like virus; real-time quantitative RT-PCR; Taqman probe

**Abstract** : A real-time quantitative RT-PCR assay was developed for detection of Norwalk-like Virus (NLV) from oysters. Primers and probes were designed based on the RNA polymerase region of the virus. The Taqman probe was labeled with fluorescent dye FAM on the 5' end and TAMRA on the 3' end. The real-time RT-PCR assay had a detection limit of 6 virus copies, with a dynamic range of detection between  $6 \times 10^6$  to 6 virus copies. The standard curve was prepared based on the linear relationship between the amount of plasmid DNA ( $X$ ) and cycle threshold ( $C_t$ ). For NLV virus,  $C_t = -3.36 \lg X + 37.11$ , with the correlation coefficient  $R^2 = 0.998$ . Thirty-seven oysters were tested and six were NLV positive and the virus was quantified. The results demonstrate that real-time RT-PCR method can be used as a rapid and highly sensitive detection and quantification method for NLV and it is amenable to high-throughout assay.

(本文编辑:张培新)