

实时荧光 RT-PCR 检测冷冻草莓中诺如病毒

周 阳^{1,2}, 栾 军³, 蒋鲁岩³, 唐泰山³, 杨 军⁴, 张常印³, 张 弛⁴,
付瑞燕^{1,2*}, 祝长青^{3*}

(1. 安徽农业大学茶与食品科技学院 合肥 230000; 2. 安徽省食品安全分析与检测省级实验室 合肥 230000;
3. 江苏出入境检验检疫局, 南京 210001; 4. 南京市产品质量监督检验院, 南京 210028)

摘要: 目的 建立冷冻草莓中的 GI、GII 型诺如病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法, 并应用于实际样品的检测。
方法 对草莓样品进行前处理、病毒富集、病毒 RNA 的提取和纯化, 然后采用实时荧光 RT-PCR 进行检测。
结果 核酸提取方法能够有效地去除抑制因子, 同时对 104 份送检样品进行检测, 结果均为阴性。**结论** 所建立的核酸提取与实时荧光 RT-PCR 结合的检测体系适合于草莓样品中诺如病毒 GI、GII 型的检测。
关键词: 冷冻草莓; 诺如病毒; 实时荧光 RT-PCR; 快速检测

Detection of norovirus in frozen strawberry by real-time fluorescent RT-PCR

ZHOU Yang^{1,2}, LUAN Jun³, JIANG Lu-Yan³, TANG Tai-Shan³, YANG Jun⁴, ZHANG Chang-Yin³,
ZHANG Chi⁴, FU Rui-Yan^{1,2*}, ZHU Chang-Qing^{3*}

(1. School of Tea and Food Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230000, China; 2. Anhui Provincial Key Laboratory of Analysis and Detection Technology for Food safety, Hefei 230000, China; 3. Jiangsu Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001, China; 4. Nanjing Insititue of Supervision & Testing on Product Quality, Nanjing 210028, China)

ABSTRACT: Objective To establish the real-time fluorescence RT-PCR detection method of norovirus GI and GII in frozen strawberry, and to apply to actual sample testing. **Methods** After pretreatment of strawberry samples, concentrating of viruses, extracting and purifying of virus RNA, the samples were determined by real-time fluorescence RT-PCR. **Results** The nucleic acid extraction method could effectively remove the inhibitory factors. According to the test of 104 inspection samples, the results were all negative. **Conclusion** The established system of nucleic acid extraction and real-time fluorescence RT-PCR detection method is suitable for the detection of norovirus GI and GII in frozen strawberry samples.

KEY WORDS: norovirus; frozen strawberry; real-time fluorescence RT-PCR; rapid detection

诺如病毒(norovirus, NV), 又称诺瓦(或沃)克病毒, 属于人类杯状病毒属, 可以通过粪口途径、污染的食物、水等多种传播方式而引起腹泻流行, 已成为

引起人类非细菌性胃肠炎的重要病原体, 特别是病毒性腹泻暴发的重要病因^[1-4]。诺如病毒有很强的感染力和致病力, 10个病毒粒子就可感染致病, 在人口

基金项目: 青奥会食品安全保障关键技术应用与示范项目(2011BAK21B05)

Fund: Supported by Applications and Demonstrations of Key Technologies Ensuring the Food Safety during 2014 Youth Olympics in Nanjing (2011-BAK21B05)

*通讯作者: 付瑞燕, 副教授, 主要研究方向为食品生物技术。E-mail: ruiyanfu@189.cn

祝长青, 研究员, 主要研究方向为食品科学与生物安全。E-mail: changqing.zhu@126.com

*Corresponding author: FU Rui-Yan, Associate Professor, School of Tea and Food Science, Anhui Agricultural University, No.130, Changjiang West Road, Hefei 230000, China. E-mail: ruiyanfu@189.cn
ZHU Chang-Qing, Professor, Jiangsu Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, No.99, Zhonghua Road, Nanjing 210001, China. E-mail: changqing.zhu@126.com

聚集的场所极易引起暴发,被喻为“肠道流感”。据报道由诺如病毒引起的胃肠炎占各种非细菌性胃肠炎的30%~50%,而由食物造成的病毒性胃肠炎中,90%是由该病毒引起的^[5,6]。目前分子生物学方法是诺如病毒检测的首选方法^[7],但是影响食品中诺如病毒检测结果的因素较多,现有的检测方法在实际检测过程中依然存在很多问题,仍不能达到快速、准确的目的。2012年9月德国发生的冷冻草莓污染诺如病毒的事件,引起大量人员的腹泻,从而进一步突出对冷冻草莓中诺如病毒快速检测方法需求的紧迫性,因此有必要加快相关检验方法研究,建立高风险食品的病毒检测方法以指导实际工作。本研究在贝类中诺如病毒的检测方法基础上进行改进,选取合适的病毒核酸提取试剂盒,优化实验条件,建立了一套将病毒的富集、RNA的提取和纯化与实时荧光RT-PCR方法相结合的快速检测体系,并大量应用于冷冻草莓样品的检测中。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

草莓样品来自江苏省连云港、南通、徐州以及安徽芜湖地区的食品公司。

1.1.2 试剂与材料

甘氨酸缓冲液(0.1 mol/L 甘氨酸(扬州市奥鑫助剂厂); 0.3 mol/L NaCl(广东省精细化学品工程技术研究开发中心); pH 9.5、PEG 8000 溶液(16% (W/V) PEG 8000(辽阳奥克纳米材料有限公司); 0.525 mol/L NaCl(广东省精细化学品工程技术研究开发中心); 病

毒 RNA 核酸提取试剂盒(瑞士罗氏公司, High Pure Vrial RNA Kit, Cat.No.11858882001); 离心管(Eppendorf)、枪头(Eppendorf)及超纯水等均需无 RNA 酶; 阳性对照的核酸为确证感染诺如病毒患者的粪便中所提取的核酸。

1.1.3 仪器

恒温振荡金属浴(博日 MB-102); 台式高速冷冻离心机(Biofuge Stratos Thermo Scientific); 实时荧光定量 PCR 系统 (ABI-7500 ABI); NanoDrop 1000(ND-1000, Thermo Fisher Scientific)。

1.1.4 预混液

Ag Path-ID™ One-step RT-PCR Kit(Ambion®, P/N: AM1005)

1.1.5 引物-探针

表 1 中的引物-探针序列参照检验检疫行业标准(SN/T 1635-2005 贝类中诺如病毒检测方法 普通 RT-PCR 方法和实时荧光 RT-PCR 方法), 由上海辉睿生物科技有限公司合成, 荧光报告基团选用 FAM, 淬灭基团选用 BHQ。

1.2 方法

1.2.1 样品处理及病毒富集

称取 100 g 草莓样品于带滤网的匀质袋中, 加入 40 mL 甘氨酸缓冲液, 振荡器室温振荡 15 min, 4 °C 条件下 5000 g 离心 15 min。将上清均分为两管, 各加入等体积 PEG 8000 溶液振荡混匀, 4 °C 过夜处理; 4 °C 条件下 10000 g 离心 15 min; 弃上清, 用 200 μL 无菌生理盐水重悬浮沉淀。

1.2.2 病毒 RNA 的提取和纯化

取 200 μL 无菌生理盐水缓冲液重悬浮的沉淀至

表 1 实时荧光 RT-PCR 扩增诺如病毒的引物及探针

Table 1 Primer and probe of real-time fluorescent RT-PCR amplification of norovirus

基因型	引物编号	引物/探针序列 (5'-3')
GI	正义引物 COG1F	CGYTGGATG CGNTTYCATGA
	反义引物 COG1R	CTTAGACG CCATCATCATTYAC
	探针 G1-P(a)	FAM-AGATYGCGATCYCC7GTCCA-BHQ
	探针 G1-P(b)	FAM-AGATCGCGGTCTCC7GTCCA-BHQ
GII	正义引物 COG2F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG
	反义引物 COG2R	TCGACGCCATCTTCATTCACA
	探针 G2-P	FAM-TGGGAGGGCGATCGCAATCT-BHQ

表 2 实时荧光 RT-PCR 的体系配置
Table 2 System configuration of real-time fluorescence RT-PCR

名称	储存液浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	终浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	加样量(μL)	
			GI 型	GII 型
RT-PCR 缓冲液	2×	1×	12.5	12.5
正义引物	10	0.40	1	1
反义引物	10	0.40	1	1
探针	10	0.20	探针 a: 1 探针 b: 0.5	1 —
RT-PCR 酶	50×	1×	1	1
模板	—	—	5	5
无 RNA 酶的水	—	—	3	3.5
总体积	—	—	25	25

1.5 mL 的离心管中, 按照罗氏的病毒 RNA 核酸提取试剂盒进行操作, 滴加 50 μL 洗脱液, 8000 g 离心 1 min 后得到病毒 RNA。

1.2.3 RNA 浓度与纯度测定

吸取 2 μL 病毒核酸, 利用 NanoDrop 1000 微量紫外可见分光光度计测定核酸的 OD 值, 记录并分析测定结果。

1.2.4 实时荧光 RT-PCR 扩增检测

实时荧光 RT-PCR 反应体系如表 2 所述, 具体反应条件: 45 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s; 55 $^{\circ}\text{C}$, 45 s; 共 45 个循环。反应结束后进行分析, 根据检测样品的 Ct 值判定检测结果: Ct 值大于或等于 40 时判定为阴性; Ct 值小于或等于 35 时判定为阳性; Ct 值 35 与 40 之间时应重新进行检测, 如果重新检测结果 Ct 值大于或等于 40 时判定为阴性, 而 Ct 值小于 40 判定为阳性。

1.2.5 病毒喷淋实验

从疾控中心获得患者的腹泻物, 作为阳性, 进行病毒喷淋实验。首先将其进行 10 倍稀释, 然后将各稀释度的病毒粒子喷洒在草莓样品中, 每份冷冻草莓样品 100 g; 接着如 1.2.1 和 1.2.2 所述, 进行样品处理、病毒富集以及核酸的提取与纯化, 随后利用实时荧光 RT-PCR 进行检测, 确定冷冻草莓中诺如病毒检测的最低限。每个稀释度做三个平行实验, Ct 值取三次平行实验的平均值。

1.2.6 评估所提取的核酸对实时荧光 RT-PCR 反应的影响

为验证所提取的核酸对实时荧光 RT-PCR 有无抑制, 进行如下实验: 取冷冻草莓样品 A 和 B, 经过前

处理、病毒富集、病毒 RNA 的提取和纯化后得到待检样品的核酸, 然后配制 PCR 反应体系, 实验组(A₁、B₁)加入 5 μL 待检样品核酸的同时也加入 5 μL 阳性对照的核酸; 对照组(A₂、B₂)仅加入 5 μL 待检样品核酸, 不添加阳性标准核酸。反应结束后观察实验结果, 并进行分析。

1.2.7 冷冻草莓样品的检测

按照上述建立的快速检测体系, 对送检的冷冻草莓样品进行前处理, 提取和纯化病毒核酸并结合实时荧光 RT-PCR 进行诺如病毒 GI 型与 GII 型的检测。

2 结果与分析

2.1 样品核酸的 OD 值测定结果

按照上述方法提取冷冻草莓样品的核酸, 利用 NanoDrop 1000 微量紫外可见分光光度计测定病毒核酸, 根据部分样品的 OD 值可以看到其纯度较好, 但其含量高到达 385.1 ng/ μL , 表明此时提取的核酸中不仅只含有诺如病毒核酸, 也含有大量草莓核酸。因此, 测得的 OD 值没有实际意义, 参考价值较小。

2.2 病毒喷淋实验检测结果

从图 1、图 2 可以看出: 检测结果中阴、阳性对照正常, 曲线典型。其中, 诺如病毒 GI 型检测阳性对照 Ct 值为 31.058, 经 10¹~10⁴ 倍稀释后平均 Ct 值分别为 30.631、34.713、0、0, 此时 Ct 值 34.713 对应该方法的最低检测线; 诺如病毒 GII 型检测阳性对照的 Ct 值为 30.251, 经 10¹~10⁴ 倍稀释后平均 Ct 值分别为 29.344、32.765、0、0, 此时 Ct 值 32.765 对

应该方法的最低检测线。

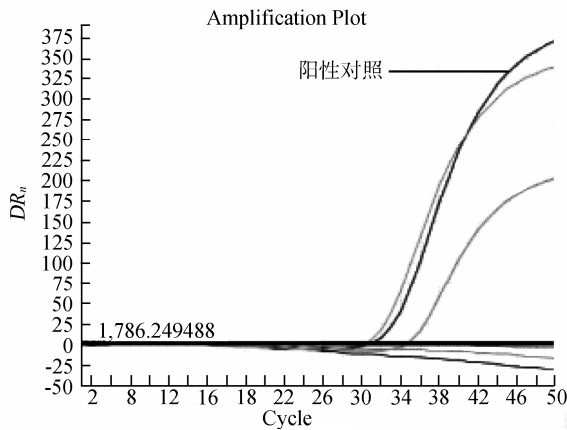


图1 诺如病毒 GI 型喷淋实验检测结果

Fig.1 Spray experiment test results of norovirus GI

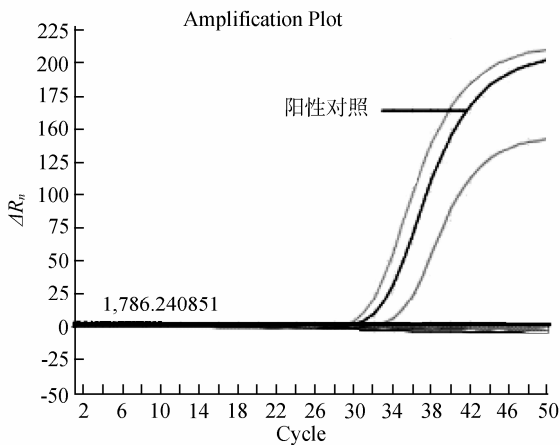


图2 诺如病毒 GII 型喷淋实验检测结果

Fig.2 Spray experiment test results of norovirus GII

2.3 提取核酸对诺如病毒 GI 型与 GII 型实时荧光 RT-PCR 检测体系的影响评估

由图 3 诺如病毒 GI 型的评估检测结果可知, 实验组(A₁、B₁)均为阳性, A₁、B₁对应的 Ct 值分别为 33.99、33.36; 对照组均为阴性; 阳性对照的 Ct 值为 33.81。实验组与阳性对照的 Ct 值差别不大, 仅荧光信号的强度减弱。结果证实冷冻草莓前处理与核酸提取方法对实时荧光 RT-PCR 的检测结果影响极小, 不会导致假阴性结果的出现。由图 4 诺如病毒 GII 型的评估检测结果可知, 实验组(A₁、B₁)均为阳性, A₁、B₁对应的 Ct 值分别为 33.93、32.76; 对照组均为阴性; 阳性对照的 Ct 值为 32.29。从而进一步证明了该处理方法的可行性, 保证了实验结果真实性与可

靠性。

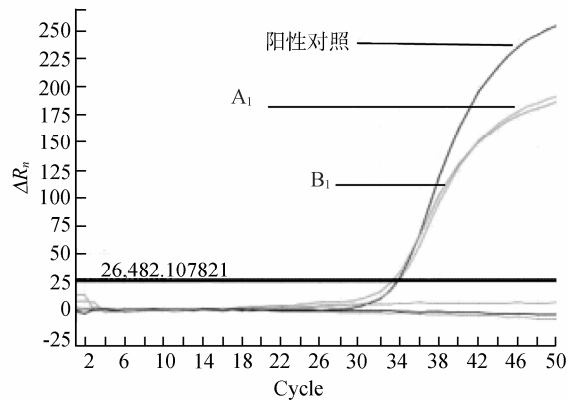


图3 诺如病毒GI型的评估检测结果

Fig. 3 Evaluation test results of norovirus GI

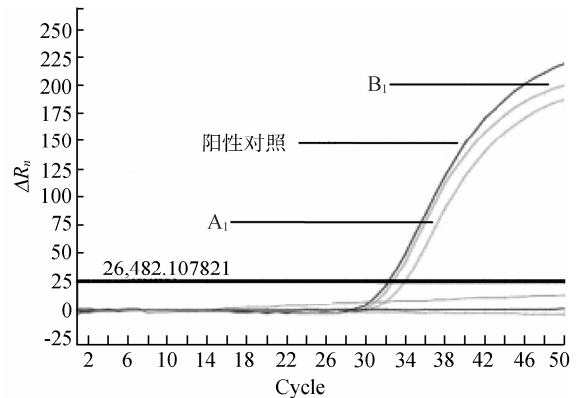


图4 诺如病毒GII型的评估检测结果

Fig. 4 Evaluation test results of norovirus GII

2.4 草莓样品检测结果及分析

按照上述已经建立的病毒的富集、RNA 的提取和纯化与实时荧光 RT-PCR 方法相结合的快速检测体系, 对 104 份冷冻草莓样品进行检测, 检测结果见图 5、图 6, 由结果可知检测样品均为阴性, 阴、阳性对照正常, 阳性对照对应的 Ct 值分别为 31.56、31.85,

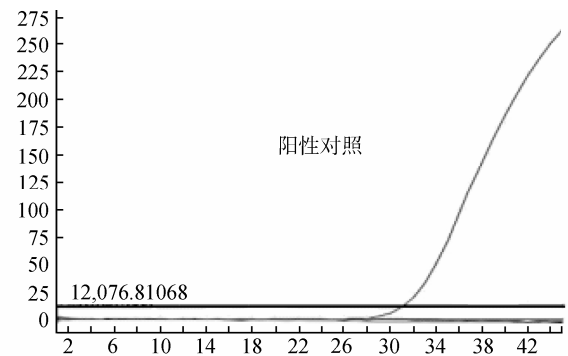


图5 草莓样品的诺如病毒GI型检测结果

Fig. 5 Test results of norovirus GI in strawberry samples

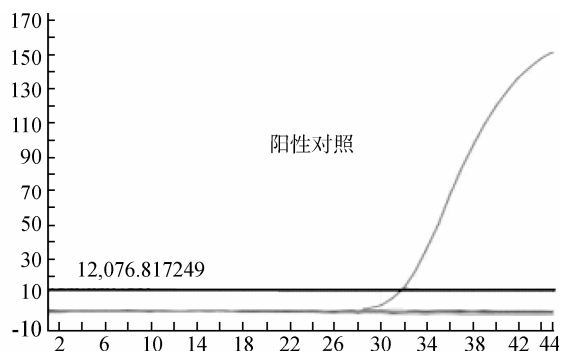


图6 草莓样品的诺如病毒GII型检测结果

Fig.6 Test results of norovirus GII in strawberry samples

检测结果可靠。结果证实所建立的核酸提取与实时荧光 RT-PCR 结合的检测体系适合于草莓样品中诺如病毒 GI、GII 型的检测。

3 讨论

诺如病毒是引起非细菌性急性胃肠炎的主要病原体, 该疾病有时会很严重, 特别是在易感人群——幼儿和老人^[8-10]。由于 NV 的培养和分离还缺乏合适的动物模型和细胞系, 不能人工培养, 限制了对其检测方法的发展, 但随着分子生物学技术的发展, 这类病毒已经能够通过 RT - PCR 方法进行检测^[11,12]。目前常用的实验室检测方法有电镜法、免疫学方法和分子生物学法, 但是电镜法和免疫学方法操作繁琐, 灵敏度不好, 不适合检测浓度含量低的食源性病毒^[13,14]。常规 RT-PCR 方法是检测 NV 最常用的方法, 但它的灵敏性和特异性都不是很高^[15]; 实时荧光 RT-PCR 技术, 尤其是基于 *TaqMan* 探针技术的实时荧光 RT - PCR 技术, 不仅克服了常规 PCR 检测的不足, 而且具有直观、重复性好、特异性强、敏感性高和易操作等优点, 已在病毒诊断中得到广泛应用^[16]。

国外对诺如病毒的检测做了很多研究, 其重点也是集中在病毒富集方法、核酸提取与纯化方法以及病毒核酸检测方法的研究, 欧美日等国在应用 RT-PCR 技术检测贝类中的诺如病毒时就是采用聚乙二醇(PEG)富集病毒核酸, 但是由于存在以上诸多的制约因素使得诺如病毒的检测一直是一个难点, 目前尚无一种标准的检验方法, 因此找到一种实用性强, 灵敏度高的诺如病毒检测方法显得尤为重要。我国也有了相应的行业标准-贝类中诺如病毒检测方法, 为部分食品中诺如病毒的检测提供了很好的参

考。由于不同食品基质对核酸提取以及实时荧光 RT-PCR 检测的干扰程度不同, 其前处理的好坏尤为重要, 直接影响到检测结果。在冷冻草莓的前期处理时一定要尽量减少草莓中所含有的大量糖类成分和果胶对核酸提取过程中的影响, 因此需在冷冻草莓样品还未完全解冻前就进行取样处理, 避免完全解冻后在处理过程中大量糖分和果胶流出而影响病毒 RNA 的提取、纯化; 振荡器室温振荡加有甘氨酸缓冲液的冷冻草莓样品时, 震荡的时间和强度要严格控制在, 不能长时间剧烈震荡, 以达到洗脱目的为宜, 否则会导致大量糖分和果胶的流出; 实验中用到的各种试剂、材料必须进行适当处理, 保证无 RNA 酶存在, 否则提取到的 RNA 会被降解, 导致假阴性结果的出现; 在利用试剂盒提取病毒 RNA 时, 一定要按照标准操作进行, 提高核酸提取效率。本文参考了国外已有的检测方法和国内的行业标准, 对冷冻草莓样品的前处理过程进行了改良, 并选用基于 *TaqMan* 探针技术的实时荧光 RT-PCR 技术, 建立了冷冻草莓样品中诺如病毒核酸检测方法, 大量应用于实际样品的检测中。

参考文献

- [1] 陈宗峰, 王滔, 黄祖新, 等. 逆转录环介导等温扩增技术在诺如病毒基因检测中的应用[J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(4): 340-343.
Chen ZF, Wang T, Huang ZX, *et al.* Application of the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification technique in detection of Norovirus gene [J]. *Chin J Zoonoses*, 2009, 25(4): 340-343.
- [2] 雷永良, 陈秀英, 叶碧峰, 等. 实时荧光定量 PCR 技术在诺如病毒快速检测中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(1): 118-119.
Lei YL, Chen XY, Ye BF, *et al.* Rapid detection of norovirus by real-time fluorescent quantitative PCR [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2009, 19(1): 118-119.
- [3] 金玉姬, 岳丽杰, 李蕾, 等. 深圳地区婴幼儿诺如病毒感染的分子流行病学检测及分析[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(5): 402-403.
Jin YJ, Yue LJ, Li Q, *et al.* Detection and analysis of molecular epidemiology of norovirus infection in infants and young children in Shenzhen City [J]. *Int J Lab Med*, 2008, 29(5): 402-403.
- [4] 陈传德, 周晓红, 莫艳玲, 等. 荧光定量 RT -PCR 定量检测诺如病毒方法的建立及其评价[J]. 中国卫生检验杂志, 2010,

- 20(3): 467–479, 558.
- Chen CD, Zhou XiH, Mo YL. *et al.* Detection of norovirus quantitatively by realtime RT-PCR and its evaluation [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2010, 20(3): 467–479, 558.
- [5] Marshall JA, Dimitriadis A, Wright PJ. Molecular and epidemiological features of norovirus-associated gastroenteritis outbreaks in Victoria, Australia in 2001 [J]. *J Med Virol*, 2005, 75(2): 321–331.
- [6] Gabor R, Katalin K, Harry V, *et al.* Evidence of the etiological predominance of norovirus in gastroenteritis outbreaks-emerging new variant and recombinant norovirus in Hungary [J]. *J Med Virol*, 2005, 76: 598–607.
- [7] 李巧艳, 吴新伟, 刘于飞, 等. 利用荧光 RT-PCR 法检测环境水体中诺如病毒[J]. *中国卫生检验杂志*, 2011, 21(2): 382–384.
- Li QY, Wu XW, Liu YF, *et al.* Detection of norovirus in environmental water by quantitative real-time RT-PCR[J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2011, 21(2): 382–384.
- [8] Estes MK, Prasad BV, Atmar RL. Noroviruses everywhere: has something changed? [J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2006, 19(5): 467–474.
- [9] 徐丹, 陆学东. 诺如病毒感染的研究进展[J]. *热带医学杂志*, 2011, 11(1): 109–112.
- Xu D, Lu XD. The research progress of norovirus infection [J]. *J Trop Med*, 2011, 11(1): 109–112.
- [10] Dolin R. Noroviruses-challenges to control [J]. *N England J Med*, 2007, 357(11): 1072–1073.
- [11] Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, *et al.* Norovirus classification and proposed strain nomenclature [J]. *Virology*, 2006, 346(2): 312–323.
- [12] Kojin AS, K ageyan AT, Fukushi S, *et al.* Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like virus [J]. *J Virol Methods*, 2002, 100: 107–114.
- [13] Veeravigrom M, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Epidemiology and clinical manifestation of rotavirus and norwalk-like viruses in Thai children [J]. *J Med Assoc Thai*, 2004, 87(2): 50–54.
- [14] 曾爱华, 李小波, 朱家勇, 等. 诺瓦克样病毒实时荧光定量 PCR 检测方法研究[J]. *中国热带医学*, 2010, 10(3): 271–272.
- Zeng AH, Li XB, Zhu JY, *et al.* Development of a real-time fluorescence quantitative PCR for detecting GenogroupII Norwalk-like viruses[J]. *China Trop Med*, 2010, 10(3): 271–272.
- [15] Marshall JA, Bruggink LD. Laboratory diagnosis of Norwalk virus[J]. *Clin Lab*, 2006, 52(11): 571–581.
- [16] 卓菲, 赵洁玲, 文凤兰, 等. 实时荧光 PCR 检测诺瓦克病毒的应用研究[J]. *实用预防医学*, 2008, 15(3): 889–890.
- Zhou F, Zhao JL, Wen FL, *et al.* Study on Rapid Detection of Norwalk Virus by Real-time PCR [J]. *Pract Prev Med*, 2008, 15(3): 889–890.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



周阳, 硕士在读, 主要研究方向为食品科学与安全。

E-mail: zy783499174@126.com



付瑞燕, 副教授, 硕士生导师, 主要研究方向为食品生物技术。

E-mail: ruiyanfu@189.cn



祝长青, 研究员, 主要研究方向为食品科学与生物安全。

E-mail: changqing.zhu@126.com