

西生菜中低污染量 G II 型诺如病毒的富集与定量检测研究

管锦绣¹, 许喜林¹, 翁文川^{2*}, 凌莉², 刘静宇², 冼钰茵²

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广州 510640; 2. 广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 广州 510623)

摘要: 目的 优化新鲜西生菜中低污染量的 G II 型诺如病毒富集方法, 比较实时荧光 RT-PCR 与微滴式数字 RT-PCR 检测方法, 研究适用于新鲜西生菜中低污染量的 G II 型诺如病毒的定量检测方法。**方法** 选取洗脱液种类、沉淀剂种类、沉淀剂作用温度及沉淀剂作用时间 4 个因素进行研究, 以确定较优的 G II 型诺如病毒富集条件。结合较优的富集条件, 分别采用实时荧光 RT-PCR 方法和微滴式数字 RT-PCR 方法进行定量检测。**结果** 病毒富集方法研究表明: 洗脱液为牛肉膏-甘氨酸洗脱液、沉淀剂为 PEG6000+PEG8000、沉淀剂作用温度为 4 °C, 沉淀剂作用时间为 4 h 为较优条件, 此时富集后的平均病毒浓度最高, 平均回收率可达 53.43%。实时荧光 RT-PCR 的检测限为 1.44×10^4 copies/g; 而微滴式数字 RT-PCR 的检测限为 7.86×10^2 copies/g。**结论** 通过优化西生菜中低污染量的 G II 诺如病毒富集方法, 比较实时荧光 RT-PCR 方法与微滴式数字 RT-PCR 方法定量检测病毒的效果, 建立了适用于西生菜样品中低污染量 G II 诺如病毒的定量检测方法。

关键词: 西生菜; G II 型诺如病毒; 富集; 实时荧光 RT-PCR; 微滴式数字 RT-PCR

Enrichment and quantitative detection of low artificially contaminated G II type norovirus in fresh romaine lettuce

GUAN Jin-Xiu¹, XU Xi-Lin¹, WENG Wen-Chuan^{2*}, LING Li², LIU Jing-Yu², XIAN Yu-Yin²

(1. School of Food and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China;
2. Guangzhou Inspection and Quarantine Technology Center, Guangzhou 510623, China)

ABSTRACT: Objective To optimize the enrichment method of low artificially contaminated G II type norovirus in fresh romaine lettuce, compare the detection of the real-time fluorescent RT-PCR and the droplet digital RT-PCR, and develop a method for the quantitative detection of low artificially contaminated G II type norovirus in fresh romaine lettuce. **Methods** The optimum conditions were determined by the orthogonal experiment using 4 factors of eluent type, precipitant type, precipitation temperature and time. Under the optimum conditions, the norovirus concentrations were detected by the real-time fluorescent RT-PCR and the droplet digital RT-PCR, respectively. **Results** The optimum conditions were as follows: eluent type was beef-glycine eluent, precipitant type was PEG6000+PEG8000, precipitation temperature was 4 °C and time was 4 h. Under these conditions, the average recovery rate could reach 53.43%. The limit of detection of the real-time fluorescent RT-PCR

基金项目: 广州市科技计划项目 (2014J4500027)

Fund: Supported by Guangzhou science and technology plan item (2014J4500027)

*通讯作者: 翁文川, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品与化妆品质量安全及微生物检测。E-mail: wengvin@iqtc.cn

*Corresponding author: WENG Wen-Chuan, Master, Senior Engineer, Guangzhou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No 66, Huacheng Street, Tianhe District, Guangzhou 510623, China. E-mail: wengvin@iqtc.cn

was 1.44×10^4 copies/g while the limit of detection of the droplet digital RT-PCR was 7.86×10^2 copies/g. **Conclusion** By optimizing the enrichment and comparing the detection effects of the real-time fluorescent RT-PCR and the droplet digital RT-PCR, a method for the quantitative detection of low artificially contaminated G II type norovirus in fresh romaine lettuce was developed

KEY WORDS: romaine lettuce; G II type norovirus; enrichment; real-time fluorescent RT-PCR; droplet digital RT-PCR

1 引言

诺如病毒(norovirus, NVs)属人类杯状病毒科诺如病毒属,是引起人类急性非菌性胃肠炎的主要病原,世界上50%以上的胃肠炎暴发都由它引起^[1]。诺如病毒有5个基因型,其中G II型是感染人的最常见的基因型^[2]。诺如病毒的传播途径一般为感染此病毒的患者粪便液污染水体或食物后,再通过水体或食物被人体感染^[3],一般容易在学校、医院、餐馆等人员密集封闭的地方集体暴发^[4]。诺如病毒的致病剂量低,一般为10~100个粒子^[5],最新研究表明,可能感染剂量可低到12个粒子^[6]。许多胃肠炎疫情都与生吃牡蛎^[6]、沙拉和草莓^[7]等有关,在欧洲主要由被诺如病毒污染的覆盆子和生菜导致,在美国主要由诺如病毒污染的生菜导致^[8]。由于国内生鲜蔬菜种植与不良环境之间的交叉污染,新鲜蔬菜污染诺如病毒的风险日趋变高,而西生菜主要用来制作生食沙拉食用,目前国内对其消费也呈上升趋势,因此本研究将西生菜作为研究样品。一般情况下,诺如病毒在食品中污染含量很低,在检测过程中食品中蛋白、脂类等食品基质对PCR反应有抑制作用,比较容易造成假阴性^[9],且富集操作一般会造成本病毒的损失。因此回收率高的富集方法是有效检测食品中诺如病毒的关键因素之一。

本研究对富集病毒的洗脱沉淀法进行优化,通过比较实时荧光RT-PCR检测不同富集条件下的病毒RNA量,得到较优的富集条件;同时比较实时荧光RT-PCR(RT-qPCR)与微滴式数字RT-PCR(RT-ddPCR)定量检测病毒的效果,建立适用于西生菜样品中低污染量G II型诺如病毒的定量检测方法。

2 材料与方法

2.1 材料

西生菜购自广州市某超市;G II型诺如病毒质粒DNA由广东省微生物研究所提供;G II型诺如病毒阳性样品悬液由丹东出入境检验检疫局技术中心提供。

2.2 主要试剂与仪器

配制溶液:甘氨酸缓冲液(含0.1 mol/L甘氨酸,0.3

mol/L氯化钠,pH 9.5);牛肉膏-甘氨酸洗脱液(含3%牛肉膏,0.05 mol/L甘氨酸,pH 9.5);TGBE洗脱液(含0.1 mol/L Tris碱、0.05 mol/L甘氨酸、1%牛肉膏);PEG8000溶液(含40%(m:V)PEG8000,1.5 mol/L氯化钠);PEG6000溶液(含40%(m:V)PEG8000,1.5 mol/L氯化钠);PEG6000+PEG8000溶液(含20%(m:V)PEG6000,20%(m:V)PEG8000,1.5 mol/L氯化钠)。

购置试剂:PBS缓冲液(美国GE Healthcare Life Sciences公司);PEG8000和PEG6000(分析纯,上海生工公司);甘氨酸(分析纯,广州化学试剂厂);牛肉浸膏(广东环凯生物科技有限公司);RNase-Free Water(天根生化科技有限公司);Premix Ex TaqTM(Probe qPCR)(货号:RR039A,宝生物工程(大连)有限公司);QIAamp Viral RNA Mini Kit(德国QIAGEN公司);One Step PrimeScriptTM RT-PCR Kit(Perfect Real Time)(货号:RR064A,宝生物工程(大连)有限公司);One-Step RT-ddPCR Advanced Kit for Probes(No dUTP)(货号:1864021,美国伯乐公司);微滴式数字PCR其他有关试剂(美国伯乐公司)。

pH计(北京普析通用仪器有限责任公司);GFL 1013恒温水浴锅(德国GFL公司);E163302生物安全柜(赛默飞公司);Sigma1-15PK高速冷冻离心机(美国Sigma公司);Sigma1-14小型高速离心机(美国Sigma公司);MDF-382E(N)-70℃冰箱(日本Sanyo公司);ABI 7900HT Fast型实时荧光PCR仪(美国ABI公司);BSA3202S电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);VORTEX GENE-2 G560E涡旋振荡器(美国Scientific Industries公司);HVE-50高压灭菌锅(华粤行仪器有限公司);QX200 Droplet Reader、DG8 cartridge微滴生成卡、QX200 Droplet Generator、PX1TM PCR Plate Sealer和PCR基因扩增循环仪(美国伯乐公司)。

2.3 引物和探针

选取检验检疫行业标准(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)中引物和探针研究G II型诺如病毒,用于RT-qPCR和RT-ddPCR检测。引物和探针均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表1)。

表 1 检测 G II 型诺如病毒所用引物探针序列
Table 1 Primers and probes for the detection of G II type norovirus

病毒基因型	引物和探针	序列(5'-3')	产物长度
G II	COG2F	CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG	98
	COG2R	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	
	Probe Ring2-TP	FAM-TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT-TAMRA	

表 2 G II 型诺如病毒富集优化因素水平表
Table 2 Factors and levels of the optimization of G II norovirus concentration

水平	因素			
	A 洗脱液种类	B 沉淀剂种类	C 沉淀剂作用温度/℃	D 沉淀剂作用时间/h
1	甘氨酸洗脱液	PEG6000	4	1
2	牛肉膏-甘氨酸洗脱液	PEG8000	26	4
3	TGBE 洗脱液	PEG6000+PEG8000	37	18

2.4 标准曲线的构建

由于感染人类的 G II 型诺如病毒不能在体外繁殖,也无动物模型,不能用组织培养法或动物实验进行分离检测^[10],先以质粒 DNA 为模板建立线性方程,作为后续实验的计算对照。将拷贝数已定量的 G II 型诺如病毒质粒 DNA 进行 10 倍梯度稀释,稀释度分别为 10^{-2} ~ 10^{-7} ,对应浓度为 3.76×10^7 ~ 3.76×10^2 copies/ μ L。以不同稀释度的质粒 DNA 为模板,进行实时荧光 PCR(qPCR)反应,重复 5 次。反应体系(20 μ L): 2 \times Premix Ex Taq 10 μ L, Rox RD 0.4 μ L, ddH₂O 3.2 μ L, 上引物、下引物、探针(均为 10 μ mol/L)0.8 μ L, 质粒 DNA 4 μ L。反应参数如下: 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 56 $^{\circ}$ C 1 min, 共 45 个循环。

2.5 病毒 RNA 提取

取 140 μ L 经 PBS 重悬的病毒悬液于 1.5 mL 离心管中,按照 QIAamp Viral RNA Mini Kit 说明书操作进行病毒 RNA 的提取,直接进行 RT-qPCR 或 RT-ddPCR 反应或者 -80 $^{\circ}$ C 冻存。

2.6 人工污染样品的制备及诺如病毒的富集

2.6.1 实验设计:

选取洗脱液种类、沉淀剂种类、沉淀剂作用温度及沉淀剂作用时间 4 个因素,利用 Orthogonality Experiment Assistant III.0 软件设计 $L_9(3^4)$ 试验,因素水平见表 2,试验方案见表 3。

2.6.2 人工污染样品制备:

将西生菜叶片剪成 1 cm \times 1 cm 片状,称取 5 g 放入 50 mL 离心管中,然后加适量(200 μ L)的 G II 型诺如病毒稀释液,生物安全柜室温静置 20 min。

2.6.3 诺如病毒的富集:

加入 40 mL 不同的洗脱液,37 $^{\circ}$ C 下 100 r/min 孵育 30

min, 4 $^{\circ}$ C、10000 r/min 离心 30 min; 转移上清至另一个 50 mL 离心管中,用 1 mol/L 盐酸溶液调节 pH 至 7.0 ± 0.2 ; 加入等体积同浓度(40%)的不同沉淀剂(PEG6000、PEG8000、PEG6000+PEG8000),使沉淀剂终浓度均为 8%,涡旋振荡 60 s 混匀; 按正交表 2 采取不同的温度(4、26、37 $^{\circ}$ C)孵育不同的时间(1、4、18 h)。5 $^{\circ}$ C、10000 g 离心 30 min,弃去上清液,然后 5 $^{\circ}$ C、10000 g 离心 5 min,以压实沉淀物; 弃上清,保留沉淀; 加入 500 μ L PBS 重悬沉淀,60 $^{\circ}$ C 加热 5 min 充分溶解沉淀。4 $^{\circ}$ C、10000 r/min 离心 3 min,取上清液,得到病毒粗提产物,-20 $^{\circ}$ C 保留用于提取 RNA。各条件下实验重复 3 遍,空白对照组为未污染的西生菜叶片,阳性对照组为用以污染样品的 G II 型诺如病毒稀释液。

2.7 RT-qPCR 和 RT-ddPCR 检测

将 10^{-1} ~ 10^{-5} 稀释度的阳性病毒悬液分为 2 组,一组直接按 2.5 方法提取病毒 RNA,另一组按 2.6.2 方法加入到新鲜西生菜中制备人工污染样品,使用优化后的富集方法回收病毒,按 2.5 方法提取病毒 RNA。以提取的 RNA 为模板,使用的引物和探针序列见表 1,分别进行 RT-qPCR 和 RT-ddPCR 反应。

RT-qPCR 反应体系(20 μ L): Buffer 10 μ L, Taq HS 0.4 μ L, RT Enzyme Mix 0.4 μ L, 上引物 0.8 μ L(10 μ mol/L), 下引物 0.8 μ L(10 μ mol/L), 探针 0.8 μ L(10 μ mol/L), RNA 模板 2 μ L, RNase-free Water 4.8 μ L。反应条件设置为: 42 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 56 $^{\circ}$ C 1 min, 共 45 个循环。

RT-ddPCR 反应体系(20 μ L): Supermix 5 μ L, Reverse transcriptase 2 μ L, 300 mmol DTT 1 μ L, 上引物 1.8 μ L(10 μ mol/L), 下引物 1.8 μ L(10 μ mol/L), 探针 0.5 μ L(10 μ mol/L), RNA 模板 2 μ L, RNase-free Water 5.9 μ L。反应条件设置为: 42 $^{\circ}$ C 60 min; 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 1 min, 共 40 个

表 3 不同稀释度 G II 型诺如病毒的回收率
Table 3 Recovery rates of different dilutions of G II type norovirus

病毒稀释度	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
初始病毒 RNA 浓度(copies/ μ L)	1.84×10^4	4.29×10^3	3.59×10^2	1.96×10^1	7.50
富集后病毒 RNA 浓度(copies/ μ L)	6.25×10^3	6.58×10^2	6.97×10^1	5.05	-
回收率(%)	83.7	38.4	48.5	64.2	-

注:“-”代表检测结果为阴性。

循环; 98 °C 10 min; 4 °C。RT-ddPCR 反应结束后将 96 孔板放入 QX200 Droplet Reader, 依次录入样品信息后运行, 仪器自动采集荧光信号, 完毕后采用软件 Quanta soft 计算出最终结果。

2.8 结果分析及回收率的计算

实验数据以平均值 \pm 标准差($x \pm sd$)表示, 正交表结果分析采用极差分析法。RT-qPCR 测得的 Ct 值参考 2.4 中制备的标准曲线方程, 即可得出病毒拷贝数浓度, RT-ddPCR 可直接测得病毒拷贝数浓度。病毒回收率公式如下: 病毒回收率% = $\frac{\text{富集后所得病毒RNA拷贝数}}{\text{富集前加入病毒RNA拷贝数}}$ 。

3 结果与分析

3.1 标准曲线的构建

荧光信号分析显示, 在 $3.76 \times 10^7 \sim 37.6$ copies/ μ L 时, 梯度稀释后的质粒标准品在扩增后呈现典型的 S 型扩增曲线, 具有良好的线性关系, 斜率为 -3.056, 相关系数 R 值为 0.993, 以样本的拷贝数 10 的对数(lg)为横轴, 检测的循环数 Ct 值为纵轴建立标准曲线(图 1), 得出线性方程为 $Y = -3.056X + 37.383$, 用于西生菜中 G II 型诺如病毒的定量计算。

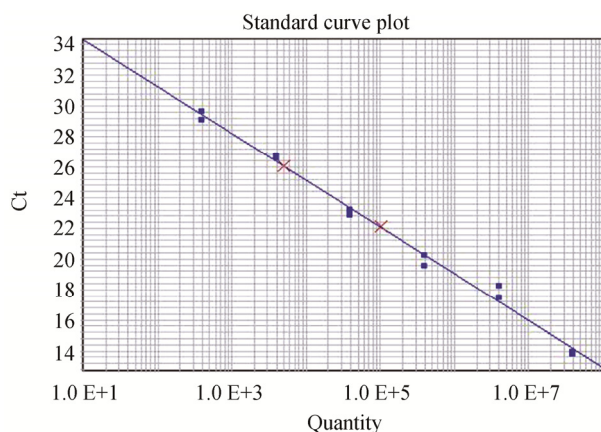


图 1 G II 型诺如病毒标准曲线

Fig. 1 The standard curve of G II type norovirus quantification

3.2 不同稀释度病毒的回收率

在 $10^{-1} \sim 10^{-5}$ 病毒稀释度范围内, 通过 RT-ddPCR 测定富集前和富集后病毒 RNA 的拷贝数浓度, 得到不同稀释

度病毒的回收率见表 3。由表 3 可知, G II 型诺如病毒稀释度为 10^{-1} 时, 病毒回收率最高, 说明病毒浓度较高时经富集步骤的损失较小; 在 $10^{-2} \sim 10^{-4}$ 稀释度范围内, 随着稀释度的增大, 即随着浓度的减小, 回收率增大, 说明优化后的富集方法在低浓度的 G II 型诺如病毒污染时效果不受影响, 仍然表现理想。

3.3 不同条件下人工污染样品的病毒回收率

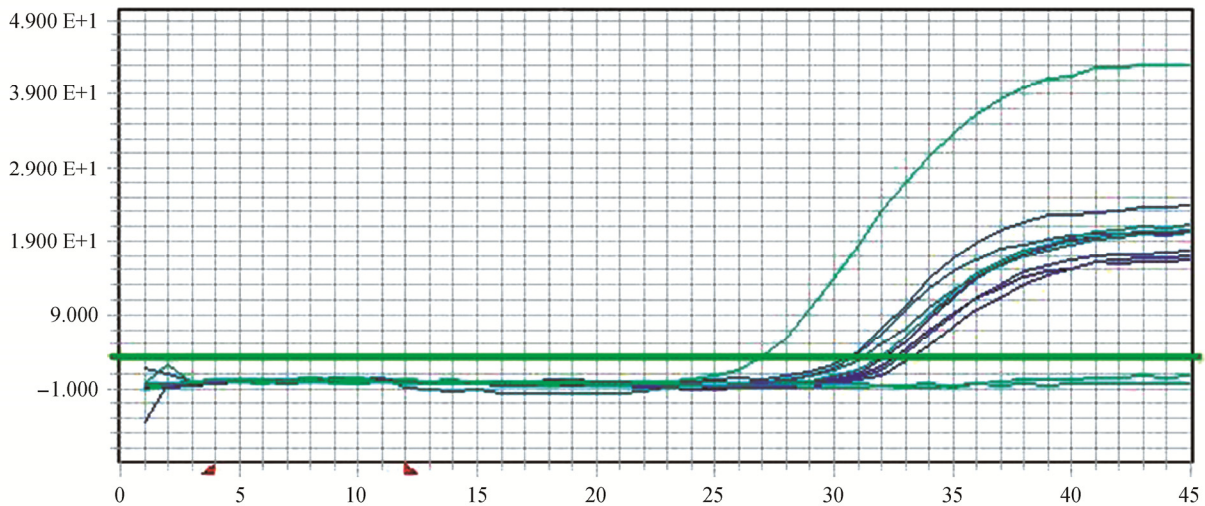
富集后的病毒悬液按 2.5 提取 RNA, 然后进行 RT-qPCR 反应。阳性对照组测得 Ct 值为 30.14, 求得浓度为 234.57 copies/ μ L, 即为加入病毒的浓度; 阴性对照组均无扩增, 表明样品无诺如病毒污染。不同富集条件所提取的 G II 型诺如病毒 RNA 浓度和回收率见表 3, 不同富集条件所提取的诺如病毒的 RNA 扩增见图 2。K₁、K₂、K₃ 分别代表当前因素 1、2、3 水平的平均回收率总和, \bar{K}_1 、 \bar{K}_2 、 \bar{K}_3 分别代表 K₁、K₂、K₃ 的平均值, 极差 $R_j = \max \bar{K}_j - \min \bar{K}_j (j=1 \sim 3)$ 。通过比较极差大小, 看出各个因素对回收率的影响(表 4)顺序如下, 沉淀剂作用时间 \approx 洗脱液种类 $>$ 沉淀剂种类 $>$ 沉淀剂作用温度。比较 \bar{K}_1 、 \bar{K}_2 、 \bar{K}_3 得出, 富集 G II 型诺如病毒的较优条件为 A₂、B₃、D₂, 因素 C 影响不明显, 选择组合 6(A₂B₃C₁D₂)为较优富集条件, 即洗脱液为牛肉膏-甘氨酸洗脱液、沉淀剂为 PEG6000+PEG8000、沉淀剂作用温度为 4 °C, 沉淀剂作用时间为 4 h。此时富集病毒的平均浓度最高, 病毒平均回收率可达 53.43%。

3.4 RT-qPCR、RT-ddPCR 检测人工污染西生菜中 G II 型诺如病毒比较

RT-qPCR、RT-ddPCR 检测人工污染西生菜中 G II 型诺如病毒的结果见表 5。RT-qPCR 检测人工污染西生菜中 G II 型诺如病毒的扩增曲线见图 3, 由图 3 可知, RT-qPCR 在病毒稀释度为 10^{-3} 时可检出, 在病毒稀释度为 10^{-4} 时无法被检测出来, 所以 RT-qPCR 的检测限为 10^{-3} 病毒稀释度, 相当于可检出 1.44×10^4 copies/g; RT-ddPCR 检测人工污染西生菜中 G II 型诺如病毒的一维散点图见图 4, 由图 4 可知, RT-ddPCR 在病毒稀释度为 10^{-4} 时可检出, 在病毒稀释度为 10^{-5} 时无法被检测出来, 所以 RT-ddPCR 的检测限为 10^{-4} 病毒稀释度, 相当于可检出 7.86×10^2 copies/g。RT-ddPCR 具有比 RT-qPCR 更低的检测限, 说明 RT-ddPCR 的灵敏度更高。

表 4 $L_9(3^4)$ 正交实验结果
Table 4 The results of $L_9(3^4)$ orthogonal experiment

实验号	因素				结果		
	A	B	C	D	Ct 值	平均浓度(copies/ μ L)	平均回收率(%)
1	1	1	1	1	34.39 \pm 0.27	24.12 \pm 4.83	10.28 \pm 2.06
2	1	2	2	2	33.61 \pm 0.15	43.11 \pm 4.92	18.38 \pm 2.10
3	1	3	3	3	33.36 \pm 0.30	52.62 \pm 11.64	22.43 \pm 4.96
4	2	1	2	3	33.18 \pm 0.15	59.60 \pm 6.63	25.41 \pm 2.83
5	2	2	3	1	33.25 \pm 0.32	57.10 \pm 13.79	24.34 \pm 5.88
6	2	3	1	2	32.19 \pm 0.13	125.31 \pm 11.93	53.43 \pm 5.09
7	3	1	3	2	32.36 \pm 0.04	110.15 \pm 3.54	46.96 \pm 1.51
8	3	2	1	3	33.19 \pm 0.34	60.62 \pm 15.19	25.61 \pm 6.47
9	3	3	2	1	32.94 \pm 0.02	71.34 \pm 1.00	30.42 \pm 0.43
K_1	51.09	82.65	89.32	65.04	$\Sigma K_1=288.10$		
K_2	103.18	68.33	74.21	118.77	$\Sigma K_2=222.87$		
K_3	102.99	106.28	93.73	73.45	$\Sigma K_3=376.45$	$\Sigma K_j=887.42$	
\bar{K}_1	17.03	27.55	29.77	21.68			
\bar{K}_2	34.39	22.78	24.74	39.59			
\bar{K}_3	34.33	35.43	31.24	24.48			
R_j	17.36	12.65	6.50	17.91			



注: 图中最高的扩增曲线对应阳性对照, 无扩增的曲线对应阴性对照, 中间的扩增曲线对应正交实验不同组合。

图 2 $L_9(3^4)$ 正交实验不同组合扩增图

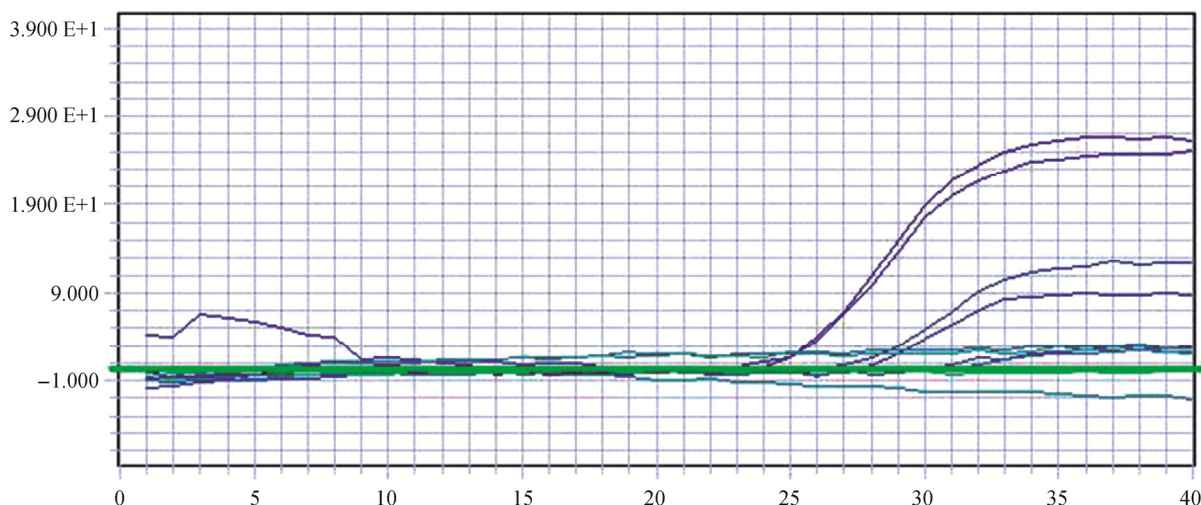
Fig. 2 The amplification plot of different combinations of $L_9(3^4)$ orthogonal experiment

表 5 RT-qPCR、RT-ddPCR 检测人工污染西生菜中 G II 型诺如病毒结果

Table 5 The results of the detection of G II type norovirus in the artificially contaminated romaine lettuce by RT-qPCR and RT-ddPCR

污染病毒稀释度	RT-qPCR 检测结果(Ct 值)	能否检出病毒	RT-ddPCR 检测结果(copies/ μ L)	能否检出病毒
10^{-1}	22.84	+	6045.00	+
10^{-2}	26.84	+	608.00	+
10^{-3}	30.57	+	60.70	+
10^{-4}	Undetermined	-	5.30	+
10^{-5}	Undetermined	-	No Call	-

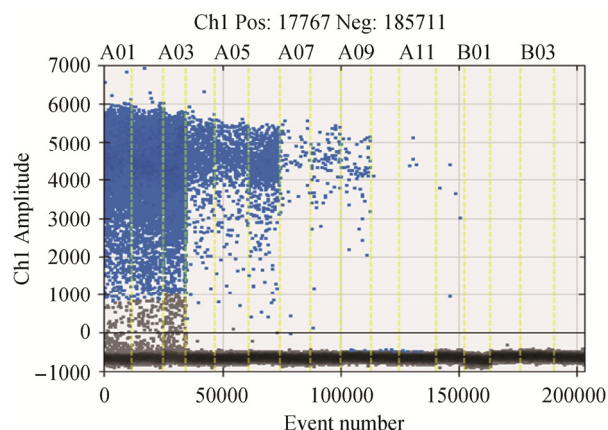
注: “+”代表能检测结果为阳性; “-”代表检测结果为阴性。



注: 从上到下扩增曲线代表的稀释度依次是 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} (两平行)。

图 3 RT-qPCR 检测西生菜中不同稀释度 G II 型诺如病毒富集后 RNA 扩增图

Fig. 3 The amplification plot of the RNA extracted from different dilutions of G II type norovirus in romaine lettuce by RT-qPCR



注: 从左到右代表的稀释度依次是 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} (三平行)。

图 4 RT-ddPCR 检测西生菜中不同稀释度 G II 型诺如病毒一维散点图

Fig. 4 The amplification plot of the RNA extracted from different dilutions of G II type norovirus in romaine lettuce by RT-ddPCR

4 结论与讨论

目前国内诺如病毒的相关研究中以西生菜作为污染样品还未见报道, 国外 Martin-Latil 等^[10,11]已有研究。从样品中有效富集诺如病毒是诺如病毒实际检测的关键, 2013 年 6 月欧盟标准化组织发布了修订标准 CEN ISO/TS15216:2013^[12], 其中蔬菜作为样品时病毒富集采用的方法是洗脱沉淀法, 本研究优化了此方法, 提高了病毒的回收率。微滴式数字 RT-PCR 是根据传统 PCR 原理与泊松统计分布(Poisson distribution)设计的新型 PCR 技术^[13],

它无需依赖外部核酸标准, 可实现核酸绝对定量分析^[14], 且因它极大地分散反应体系, 可以有效消除抑制因子的作用^[15], 这些优势使它很适用于实际样品检测。本研究使用此方法检测人工污染的 G II 型诺如病毒, 降低了检测限。

本试验主要得到以下结论:

(1)通过比较不同稀释度 G II 型诺如病毒的回收率, 可知诺如病毒稀释度为 10^{-1} 时, 病毒回收率最高, 而在 10^{-2} ~ 10^{-4} 稀释度范围内, 富集效果不受影响, 仍然表现理想。

(2)洗脱沉淀法正交实验优化了病毒的富集条件, 富集后的病毒的平均浓度较高, 病毒平均回收率可达 53.43%。

(3)RT-qPCR、RT-ddPCR 检测人工污染西生菜中 G II 型诺如病毒的研究结果表明 RT-qPCR 的检测限为 10^{-3} 病毒稀释度, 相当于可检出 1.44×10^4 copies/g; RT-ddPCR 的检测限为 10^{-4} 病毒稀释度, 相当于可检出 7.86×10^2 copies/g, 说明 RT-ddPCR 具有比 RT-qPCR 更低的检测限, 灵敏度更高。

本研究通过优化病毒富集方法以及微滴式数字 RT-PCR 的应用, 建立了适用于西生菜样品中低污染量 G II 型诺如病毒的定量检测方法, 此方法灵敏度高, 操作简便, 具有实际应用意义。

参考文献

[1] ISO/TS 15216-1 Microbiology of food and animal feed-horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR, Part 1: method for quantification [S].
 [2] 李志凯, 苏国成, 苏文金, 等. 诺如病毒检测方法研究进展[J]. 微生物学通报, 2014, 41(7): 1417-1424.
 Li ZK, Su GC, Su WJ, et al. Progress of detection methods for norovirus

- [J]. Bull Microbiol, 2014, 41(7): 1417–1424.
- [3] Hennechart-Collette C, Martin-Latil S, Guillier, *et al.* Determination of which virus to use as a process control when testing for the presence of hepatitis A virus and norovirus in food and water [J]. Int J Food Microbiol, 2015, 202: 57–65.
- [4] 姚秀林. 应用实时荧光定量 RT-PCR 技术快速检测基因 II 型诺如病毒的价值探讨[J]. 中国医药指南, 2016, 14(3): 179.
Yao XL. Application of real-time fluorescent quantitative rt-pcr technology rapid detection of genotype II value to explore such as viruses [J]. Guide China Med, 2016, 14(3): 179.
- [5] Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, *et al.* Determination of the 50% human infectious dose for Norwalk virus [J]. J Infect Dis, 2014, 209(7): 1016–1022.
- [6] Woods JW, Calci KR, Marchanttambone JG, *et al.* Detection and molecular characterization of norovirus from oysters implicated in outbreaks in the US [J]. Food Microbiol, 2016, 59: 76–84.
- [7] Sarvikivi E, Roivainen M, Maunula L, *et al.* Multiple norovirus outbreaks linked to imported frozen raspberries [J]. Epidemiol, Infect, 2012, 140(2): 260–267.
- [8] 谢雅晶, 刘贤金. 食源性诺如病毒在果蔬农产品中的污染及检测研究 [J]. 病毒学报, 2015, 31(6): 685–697.
Xie YJ, Liu XJ. The advances in the contamination and detection of foodborne pathogen noroviruses in fresh produce [J]. Chin J Virol, 2015, 31(6): 685–697.
- [9] 纪衍瑾, 孙雯雯, 祝喆, 等. 应用实时荧光 RT-PCR 法检测水产品中诺如病毒 [J]. 中国现代医生, 2015, 53(19): 130–132.
Ji YJ, Sun WW, Zhu Z, *et al.* The application of real-time florescent RT-PCR in testing norovirus in aquatic products [J]. China Mod Doctor, 2015, 53(19): 130–132.
- [10] Martin-Latil S, Hennechart-Collette C, Guillier L, *et al.* Comparison of two extraction methods for the detection of hepatitis A virus in semi-dried tomatoes and murine norovirus as a process control by duplex RT-PCR [J]. Food Microbiol, 2012, 31(2): 246–253.
- [11] Summa M, Bonsdorff CHV, Maunula L. Evaluation of four virus recovery methods for detecting noroviruses on fresh lettuce, slicedham, and frozen raspberries [J]. J Virol Method, 2012, 183(2): 154–160.
- [12] ISO/TS 15216-2. Microbiology of food and animal feed-Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR—Part 2: Method for qualitative detection. Geneva, Switzerland: The Organization [S].
- [13] 李春勇. 数字 PCR 技术原理及应用[J]. 生物技术世界, 2014(3): 10–13.
Li CY. Principle and application of digital PCR [J]. BioTechnol World, 2014(3): 10–13.
- [14] 董莲华, 张玲, 姜君, 等. 大肠杆菌 O₁₅₇:H₇ 微滴数字 PCR 定量方法的建立[J]. 分析化学, 2015, 43(3): 319–324.
Dong LH, Zhang L, Jing J, *et al.* Development of droplet digital polymerase chain reaction for quantifying *Escherichia Coli* O₁₅₇:H₇ [J]. Chin J Anal Chem, 2015, 43(3): 319–324.
- [15] 禹思宇, 唐连飞, 陈雪琴, 等. 检测阴沟肠杆菌的数字 PCR 定量方法建立[J]. 畜牧与兽医, 2016, 48(3): 1–4.
Yu SY, Tang LF, Chen XQ, *et al.* Establishment of the digital PCR assay for detection of *Enterobacter cloacae* [J]. Anim Husb Vet Med, 2016, 48(3): 1–4.

(责任编辑: 武英华)

作者简介



管锦绣, 硕士研究生, 主要研究方向为食品微生物。
E-mail: 13424027640@163.com



翁文川, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品与化妆品质量安全及微生物检测。
E-mail: wengvin@iqtc.cn