

双重荧光数字 PCR 方法定量检测贝类中诺如病毒

白雪*, 张淑红, 申志新

(河北省疾病预防控制中心, 石家庄 050021)

摘要: 目的 建立双重荧光微滴式数字反转录聚合酶链式反应(microdrop digital reverse transcription polymerase chain reaction, RT-ddPCR)法定量检测贝类样品中诺如病毒。**方法** 确定 RT-ddPCR 方法的最佳退火温度和探针浓度, 建立贝类中诺如病毒双重荧光数字 PCR 检测方法, 并定量检测秦皇岛 2015~2017 年 7 月采集的贝类样品中的诺如病毒。**结果** 贝类中诺如病毒 RT-ddPCR 检测方法线性范围为 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^0$ copy/ μL , 检出限为 1.0 copy/20 μL 的反应体系。用数字 PCR 方法检出秦皇岛贝类样品中诺如病毒总阳性率为 67%, GI 型病毒平均浓度为 8.70×10^2 copy/g 消化腺, GII 型病毒平均浓度为 1.04×10^3 copy/g 消化腺。**结论** 与荧光定量反转录聚合酶链式反应(fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, RT-qPCR)方法相比, 数字 PCR 方法在检测贝类诺如病毒时有明显优势, 能提高病毒检出率, 不依赖标准品进行绝对定量。

关键词: 数字 PCR; 诺如病毒; 定量检测

Quantitative detection of Noroviruses in shellfish by dual fluorescence digital PCR

BAI Xue*, ZHANG Shu-Hong, SHEN Zhi-Xin

(Hebei Province Center for Disease Prevention and Control, Shijiazhuang 050021)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the quantitative determination of Norovirus in shellfish samples by a dual fluorescent digital reverse transcription polymerase chain reaction (RT-ddPCR). **Methods** The annealing temperature and probe concentrations of RT-ddPCR experiment were optimized to establish a dual fluorescence digital PCR method for detection of Norovirus in shellfish, and the Norovirus in shellfish samples collected from Qinhuangdao from July of 2015 to 2017 were quantitatively detected. **Results** The linear range of RT-ddPCR for detection of Norovirus in shellfish was $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^0$ copy/ μL , and the limit of detection was 1.0 copy/20 μL reaction system. The total positive rate of Norovirus in shellfish samples from Qinhuangdao was 67%. The average concentration of GI virus was 8.70×10^2 copy/g digestive gland, and 1.04×10^3 copy/g digestive gland for GII type. **Conclusion** Compared with fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR), digital PCR has obvious advantages in detecting shellfish Norovirus, which can improve the detection rate, and does not rely on standard materials for absolute quantification.

KEY WORDS: digital PCR; Norovirus; quantitative detection

基金项目: 河北省科技支撑计划项目(15277778D)

Fund: Support by the Hebei Science and Technology Support Program (15277778D)

*通讯作者: 白雪, 博士, 主管技师, 主要研究方向为微生物学检验。E-mail: 383657957@qq.com

*Corresponding author: BAI Xue, Ph.D, Technician, Hebei Centers for Disease Control and Prevention, NO.97, Huaiaidong Road, Yuhua District, Shijiazhuang 050021, China. E-mail: 383657957@qq.com

1 引言

诺如病毒是世界范围内引起非细菌性胃肠炎的重要病毒之一, 引起多个国家和地区大规模胃肠炎爆发, 造成严重的经济损失^[1,2]。诺如病毒属于杯状病毒科, 分为 GI-GVII 7 个基因型, 每个基因型再分为数量不等的亚型, 其中 GI 型、GII 型和 GIV 型可以感染人^[3,4]。诺如病毒存活能力强, 致病剂量可低至 18~1000 个病毒粒子^[5,6], 并且目前无法体外培养, 没有合适的动物模型, 也没有有效的疫苗来预防^[3]。诺如病毒可以通过被污染的食品感染人, 其中双壳贝类如牡蛎等污染率较高^[7]。贝类的诺如病毒检测需先进行病毒的富集, 然后提取核酸用 RT-PCR 方法进行检测。核酸中常有食品基质如各种蛋白、脂肪等残留, 在 PCR 反应中起到抑制作用。我国国家标准在检测诺如病毒时要求在 PCR 时检测抑制指数, 当样品 RNA 的 *C_t* 值和扩增对照的 *C_t* 值之差小于 2 时, 阴性结果才有效^[8]。这在样品处理、病毒富集和 PCR 检测时都加大了工作量。因此, 建立不易被食品基质干扰并能快速准确检测贝类诺如病毒的方法对研究和控制贝类诺如病毒导致的食源性疾病非常重要。数字 PCR 技术可以检测极低含量基因片段, 并且不用做标准曲线就可以直接对目的片段定量, 抗抑制剂能力强, 是检测低含量、抑制物多的基因片段的合适方法。目前数字 PCR 技术已在部分食源性致病菌的检测中得到了应用^[9], 弥补了常规检测方法的不足。

本研究建立了检测贝类诺如病毒的双重荧光数字 PCR 方法, 优化了检测条件, 并对采集的样品进行检测。该方法提高了诺如病毒的检出率, 并且不依赖标准曲线进行定量, 为检测贝类中诺如病毒提供了方便准确的定量检测方法。

2 材料与方 法

2.1 主要仪器与试剂

CFX96 荧光定量 PCR 仪、QX100 数字 PCR 仪及微滴

生成器、微滴发生卡及卡垫(美国 Bio-Rad 公司); SYG-1210 电热恒温水箱(美国 Crystal 公司); 5417R 普通离心机(德国 Eppendorf 公司); 2-16KL 高速离心机(美国 Sigma 公司); vortex-2 震荡混匀器(美国 Scientific industries); np968 天隆核酸自动提取仪(西安天隆科技公司)。

病毒 RNA/DNA 提取试剂盒(磁珠法)(西安天隆科技公司); 蛋白酶 K(美国 Sigma); 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)(美国康宁公司); RNA 一步法荧光 RT-PCR 检测试剂盒(美国 Life Technologies 公司); One-Step RT ddPCR Advanced Kit(美国 Bio-Rad 公司); MS2 病毒提取对照试剂盒、诺如病毒标准品 GI 型和 GII 型(北京良润公司); 诺如病毒检测引物和探针序列采用国标中序列^[8], 数字 PCR 引物和探针选自文献^[10](见表 1), 均由华大基因公司合成。

2.2 样品采集

采集秦皇岛市 2015~2017 年每年 7 月市售贝类样品共 30 份, 每份采集活、鲜样品 1 kg。冷藏运送至实验室。样品种类包括牡蛎、海虹、血蚶、蛭子、花蛤、文蛤、赤贝。

2.3 实验方法

2.3.1 样品前处理

取 5~10 个贝类消化腺为一份, 置于 50 mL 无菌离心管内, 研磨均质, 取消化腺 2 g, 加入 2 mL 磷酸盐缓冲液、10 μ L 20 mg/mL 蛋白酶 K 和 10 μ L MS2 病毒(过程控制对照), 混匀后置于 37 $^{\circ}$ C 恒温水箱中 200 r/min 震荡 60 min, 取出离心管, 60 $^{\circ}$ C 加热 15 min, 室温 3000 r/min 离心 5 min, 取上清到新 1.5 mL 离心管中, 记录上清液体积。立即提取病毒 RNA。

2.3.2 核酸提取

用天隆自动核酸提取仪提取病毒 RNA。取 200 μ L 粗提液提取 RNA, 洗脱体积 80 μ L。提取步骤参照试剂盒说明书。提取后 RNA 放在 -80 $^{\circ}$ C 保存。

表 1 引物和探针序列
Table 1 Primers and probes sequences

用途	名称	序列	基因
荧光 RT-PCR	GI-f	CGCTGGATGCGNTTCCAT	GI
	GI-r	CCTTAGCCATCATCATTAC	
	探针	FAM-TGGACAGGAGAYCGCRATCT-TAMRA	GII
	GII-f	ATGTTACAGRTGGATGTTCTCWGA	
	GII-r	TCGACGCCATCTTCATTCACA	
	探针	FAM-AGCACGTGGGAGGGCGATCG-TAMRA	
数字 RT-PCR	Cog1F	CGYTGGATGCGITTYCATGA	GI
	Cog1R	CTTAGACGCCATCATCATTYAC	
	Ring1C	FAM-AGATYGCGITCICCTGTCCA-BHQ2	GII
	Cog2F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	
	Cog2R	TCGACGCCATCTTCATTCACA	
	Ring2	HEX-TGGGAGGGCGATCGCAATCT-BHQ1	

2.3.3 过程控制

MS2 病毒作为过程控制病毒,按照试剂盒说明书做标准曲线,按照说明书条件对样品中 MS2 病毒进行检测,计算回收率。如果样品检测诺如病毒阴性而 MS2 病毒回收率 $<1\%$,重新处理检测样品。根据国标检测扩增抑制,抑制指数 >2 时,检测 10 倍稀释样品。

2.3.4 优化 RT-ddPCR 反应条件

按照试剂盒说明书配制反应体系为 20 μL 。按照数字 PCR 仪使用说明书进行微滴生成,产生微滴约 40 μL 。随后将生成的微滴转移到 96 孔 PCR 板中,盖上锡纸膜,用封膜仪封膜后进行 PCR。反应条件为: 42 $^{\circ}\text{C}$ 1 h; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 退火温度 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 循环 40 次; 98 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。RT-ddPCR 扩增完成后,将 96 孔 PCR 板放在微滴分析仪中读取荧光信号,通过 QuantaSoftV 1.7.4 软件对结果进行分析。优化退火温度: 不同样品管设定退火温度为 63~50 $^{\circ}\text{C}$ 进行反应。优化探针浓度: 在 ddPCR 反应体系中上下游引物浓度分别为 0.9 $\mu\text{mol/L}$ 时,设置不同的探针浓度为 0.125 $\mu\text{mol/L}$ 、0.25 $\mu\text{mol/L}$ 、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 进行 ddPCR 扩增。

2.3.5 制作标准曲线

将诺如病毒 GI 型和 GII 型 1.0×10^6 copy/ μL 标准品等量混合,用 10 倍梯度稀释法,稀释成两种型别病毒均为 $5.0 \times 10^5 \sim 5.0 \times 10^{-1}$ copy/ μL 的混合标准品,用双重荧光 RT-ddPCR 法和荧光定量 RT-qPCR 法分别检测并做标准曲线,每个标准品重复 3 次。

2.3.6 实时荧光 RT-qPCR

使用 RNA 一步法荧光定量 RT-qPCR 试剂盒对诺如病毒核酸进行双重荧光检测,阳性对照模板为稀释为 5×10^4 copy/ μL 的病毒标准品,阴性对照模板为去离子水。每份反应体系为 25 μL ,其中 5 \times 反应预混液加入 5 μL ,诺如病毒引物分别加入 1 μL ,荧光探针分别加入 0.5 μL ,酶混合液加入 1.25 μL ,无 RNA 酶超纯水加入 8.75 μL ,样品或阴性/阳性对照加入 5 μL 。反应条件为: 42 $^{\circ}\text{C}$ 30 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 检测荧光信号,65 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,45 个循环。要求阳性对照 C_t 值小于 25,阴性对照 C_t 值大于 45。样品 C_t 值小于等于 35 为阳性,样品 C_t 值大于 38 为阴性,样品 C_t 值在 35~38 之间,重复检测,如果 C_t 值小于等于 38 为阳性。

2.3.7 样品检测

用双重荧光 RT-ddPCR 法和荧光定量 RT-qPCR 法分别检测样品,每个样品重复 3 次,结果取平均值。直接得出或根据标准曲线计算病毒含量,根据检测的病毒拷贝数、检测体系体积和每份样品量,计算出每克消化腺所含病毒量。

2.3.8 数据分析

采用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计分析,率或构成

比的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 RT-ddPCR 反应条件优化

最佳退火温度: 退火温度 63~50 $^{\circ}\text{C}$ 时两种类型病毒均检出。如图 1 所示,退火温度为 53 $^{\circ}\text{C}$ 时,阳性微滴荧光值最大,阴性微滴和阳性微滴分离效果最好,因此确定最佳退火温度为 53 $^{\circ}\text{C}$ 。最佳探针浓度: 上下游引物浓度均为 0.9 $\mu\text{mol/L}$ 时,探针浓度为 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 时,阳性微滴占总微滴数的绝大部分,阳性微滴拖尾严重。探针浓度为 0.125、0.25 $\mu\text{mol/L}$ 时,可以检出阳性微滴。探针浓度为 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 时,阴性微滴和阳性微滴分离效果最好,因此确定最佳探针浓度为 0.25 $\mu\text{mol/L}$,如图 2 所示。

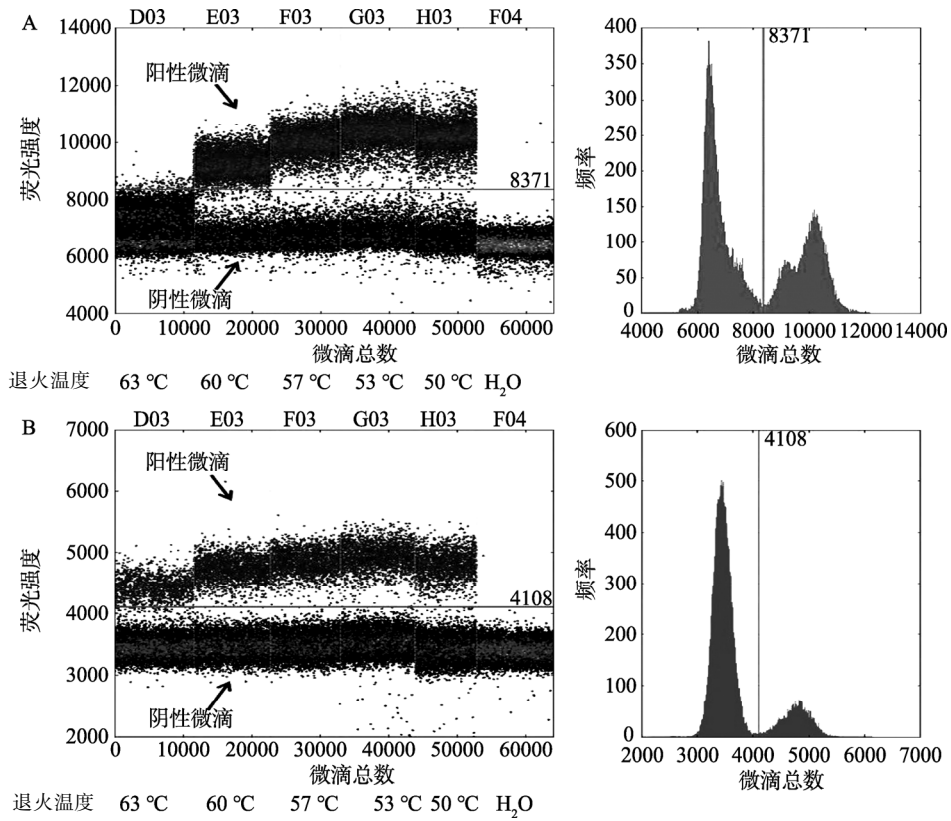
3.2 RT-ddPCR 和 RT-qPCR 线性范围及检出限比较

用梯度稀释法做标准曲线,RT-ddPCR 法 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^{-1}$ copy/ μL 每个浓度均能检出,当浓度为 5×10^5 copy/ μL 时,阳性微滴占全部微滴的 97.7%~100.0%,浓度超过数字 PCR 适用范围,不能用于定量。在 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^0$ copy/ μL 用 RT-ddPCR 法检出的标准品浓度的对数与标准品标称的浓度对数做图,成线性,GI 型斜率为 1.012, r^2 为 0.995, GII 型斜率为 0.946, r^2 为 0.997,线性关系较好。表明 RT-ddPCR 法检测诺如病毒检出限为 0.5 copy/ μL ,即 1.0 copy/20 μL 反应体系。线性范围为 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^0$ copy/ μL ,见图 3。

荧光 RT-qPCR 法能检测 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^0$ copy/ μL 标准品, 5×10^{-1} copy/ μL 未检出,检出限为 5 copy/ μL ,即 25 copy/25 μL 反应体系。数字 PCR 法检出限低于荧光 PCR 法。用 RT-qPCR 法检出的标准品 C_t 值与标准品标称的浓度对数做图,成线性,GI 型斜率为 -3.39, r^2 为 0.999, GII 型斜率为 -3.28, r^2 为 0.999,线性关系较好。RT-qPCR 法线性范围为 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^0$ copy/ μL ,见图 4。

3.3 RT-ddPCR 法和 RT-qPCR 法检测样品比较

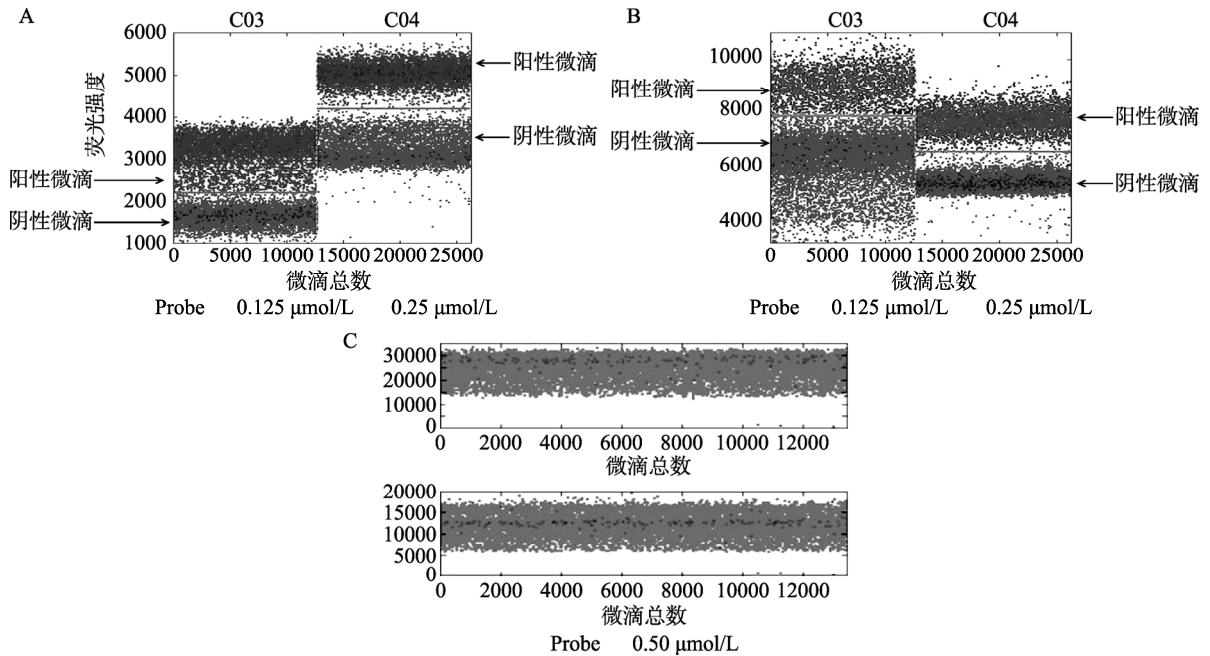
分别用 RT-ddPCR 法和 RT-qPCR 法检测秦皇岛 2015~2017 年 3 年 7 月采集的贝类样品共 30 份,根据数字 PCR 检测结果和荧光 PCR 标准曲线,以及样品 RNA 体积、稀释倍数、对应样品重量计算出每克消化腺病毒含量,见表 2。荧光 PCR 法检出阳性样品 1 份,总阳性率 3.3%,其中 GI 型 1 份,病毒含量为 6.75×10^3 copy/g 消化腺; GII 型 0 份。数字 PCR 法检出阳性样品 20 份,其中 GI 型 14 份,病毒含量为 $4.40 \times 10^2 \sim 2.00 \times 10^3$ copy/g 消化腺,平均病毒含量为 8.70×10^2 copy/g 消化腺; GII 型 19 份,病毒含量为 $4.40 \times 10^2 \sim 2.14 \times 10^3$ copy/g 消化腺,平均病毒含量为 1.04×10^3 copy/g 消化腺; GIGII 型 2 种同时检出 13 份。数字 PCR 法检出率与荧光 PCR 法有统计学差异 ($\chi^2=28.71$, $P < 0.01$)。



注: A 为 GI 型, B 为 GII 型。

图 1 不同退火温度下数字 PCR 微滴荧光分布

Fig.1 Fluorescence distribution of digital PCR microdroplets at different annealing temperatures



注: A 为 GI 型, B 为 GII 型, 探针浓度为 0.125 μmol/L 和 0.25 μmol/L; C 图上边为 GI 型, 下边为 GII 型, 探针浓度为 0.50 μmol/L。

图 2 不同探针浓度 RT-ddPCR 微滴荧光分布

Fig.2 Fluorescence distribution of RT-ddPCR microdroplets with different probe concentrations

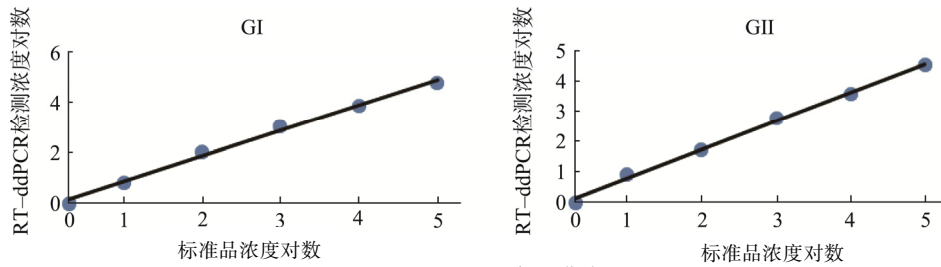


图 3 RT-ddPCR 标准曲线

Fig.3 Standard curves of RT-ddPCR

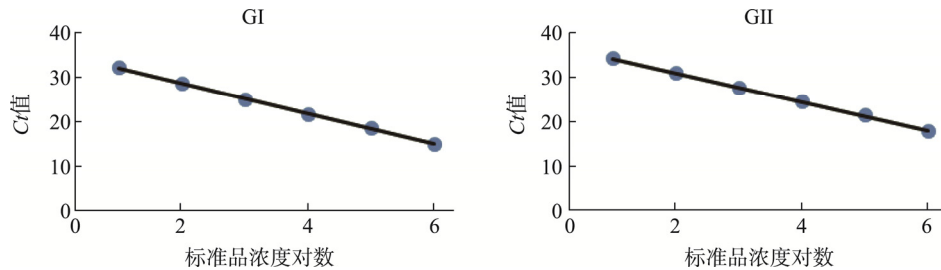


图 4 RT-qPCR 标准曲线

Fig.4 Standard curves of RT-qPCR

表 2 RT-ddPCR 定量检测贝类中诺如病毒结果

Table 2 Quantitative detection of Noroviruses in shellfish by RT-ddPCR

监测时间	样品总数/份	阳性样品数/份	阳性率/%	GI型阳性样品数/份	GI型平均浓度/(c/g 消化腺)	GII型阳性样品数/份	GII型平均浓度/(c/g 消化腺)	GI型阳性样品数/份	GII型阳性样品数/份
2015年7月	10	8	80	6	1.10×10^3	8	1.33×10^3	6	6
2016年7月	10	5	50	4	5.82×10^2	5	6.05×10^2	4	4
2017年7月	10	7	70	4	8.12×10^2	6	1.01×10^3	3	3
总计	30	20	67	14	8.70×10^2	19	1.04×10^3	13	13

4 结论

本研究建立了双重荧光微滴式数字 PCR 检测贝类诺如病毒的方法,提高了病毒检出率。数字 PCR 检测条件中退火温度和荧光探针浓度的影响较大,直接影响阳性微滴数量和阳性微滴与阴性微滴的分离度。引物浓度对结果影响相对较小^[11]。诺如病毒基因型复杂,检测引物和探针中存在简并碱基,因此数字 PCR 中阳性微滴和阴性微滴之间会有拖尾现象,目前对中间过度区的微滴处理已有一些算法^[12],但国内外尚没有统一意见,因此在检测时要根据对照设置阈值线的位置。

微滴式数字 PCR 技术在检测食品中病毒和低含量病毒方面相比荧光 RT-PCR 方法有较大优势。数字 PCR 检测病毒不用做标准曲线就可以进行绝对定量。标准品的浓度准确度在荧光 PCR 定量检测中十分重要。标准品的定量有紫外分光光度法、构建质粒等,目前也有用数字 PCR 法对标准品进行定量^[13,14]。数字 PCR 摆脱了对标准品的依赖,

特别是易降解的标准品如 RNA 等。荧光 PCR 检测诺如病毒检出限一般为 10~100 copy/ μ L,而微滴式数字 PCR 检测诺如病毒检出限可低至数个基因拷贝,大大提高了检出率,减少了假阴性结果。数字 PCR 受食物基质中 PCR 抑制物的影响小,定量准确,重复性好,省去了可能进行的样品稀释检测和复检,也省去了国标中检测扩增抑制指数的步骤,能大大节约检测所需标准品、过程控制病毒、试剂及检测时间。

目前数字 PCR 已经在基因检测、疾病诊断、转基因食品成分检测等方面获得应用^[15,16],在食源性病毒检测中,数字 PCR 技术比荧光 PCR 技术有明显优势。本研究建立的贝类中诺如病毒双重荧光 RT-ddPCR 检测方法对于提高病毒检出率,更好地防控诺如病毒引起的疾病有较好的应用价值。

参考文献

- [1] Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, *et al.* Foodborne illness acquired in

- the United States major pathogens [J]. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17(1): 7–15.
- [2] Hall AJ, Eisenbart VG, Etingüe AL, *et al.* Epidemiology of foodborne *Norovirus* outbreaks, United States, 2001–2008 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2012, 18(10): 1566–1573.
- [3] 廖巧红, 冉陆, 靳森, 等. 诺如病毒感染暴发调查和预防控制技术指南 (2015 版)[J]. *传染病专报*, 2015, 3(37): 1–44.
Liao QH, Ran L, Jin M, *et al.* Guidelines on outbreak investigation, prevention and control of norovirus infection (2015) [J]. *Infect Dis Report*, 2015, 3(37): 1–44.
- [4] Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, *et al.* Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis [J]. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14(8): 1224–1231.
- [5] Teunis PF, Moe CL, Liu P, *et al.* Norwalk virus: How infectious is it? [J]. *J Med Virol*, 2008, 80(8): 1468–1476.
- [6] 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.
- [7] 寇晓霞, 吴清平, 薛亮, 等. 贝类中诺如病毒的研究进展[J]. *中国食品卫生杂志*, 2014, 26(2): 200–204.
Kou XX, Wu QP, Xue L, *et al.* Research progress of *Norovirus* in shellfish [J]. *Chin J Food Hyg*, 2014, 26(2): 200–204.
- [8] GB 4789.42-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 诺如病毒检验[S].
GB 4789.42-2016 National food safety standard-Food microbiological analysis-Norovirus detection [S].
- [9] 胡重怡, 张威, 郭平, 等. 数字 PCR 在食品快速检测中的应用进展[J]. *江西农业学报*, 2018, 30(10): 90–93.
Hu CY, Zhang W, Guo P, *et al.* Progress in application of digital per in food rapid detection [J]. *Acta Agric Jiangxi*, 2018, 30(10): 90–93.
- [10] Farkasa T, Singha A, Françoise S, *et al.* Multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and quantification of GI, GII and GIV noroviruses [J]. *J Virol Methods*, 2015, 223: 109–114.
- [11] 袁润余, 曾汉日, 苏娟, 等. 一种通用型肠道病毒微滴式数字 PCR 检测方法的建立及应用[J]. *华南预防医学*, 2019, 45(1): 15–20.
Yuan RY, Zeng HR, Su J, *et al.* Establishment and application of universal droplet digital polymerase chain reaction method for quantification of enterovirus [J]. *South China J Prev Med*, 2019, 45(1): 15–20.
- [12] 刘聪, 董文飞, 张涛, 等. 微滴式数字 PCR 中低浓度荧光微滴分类[J]. *光学精密工程*, 2018, 26(3): 647–653.
Liu C, Dong WF, Zhang T, *et al.* Identification of florescent droplets at low concentrations for droplet digital PCR [J]. *Opt Precis Eng*, 2018, 26(3): 647–653.
- [13] Sanders R, Mason DJ, Foy CA, *et al.* Evaluation of digital PCR for absolute RNA quantification [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e75296.
- [14] 董莲华, 隋志伟, 王晶, 等. 数字 PCR 方法准确测量质粒 DNA 拷贝浓度[J]. *计量学报*, 2017, 38(2): 247–251.
Dong LH, Sui ZW, Wang J, *et al.* Accurate plasmid DNA copy concentration quantification by digital PCR [J]. *Acta Metrol Sin*, 2017, 38(2): 247–251.
- [15] Li N, Ma J, Guarnera MA, *et al.* Digital PCR quantification of miRNAs in sputum for diagnosis of lung cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2014, 140(1): 145–150.
- [16] Morisset D, Stebih D, Milavec M, *et al.* Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e62583.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



白雪, 博士, 主管技师, 主要研究方向为微生物学检验。

E-mail: 383657957@qq.com