

SYBR Green I 荧光 RT-PCR 法检测贝类中的诺如病毒

莫雪梅^{1*}, 高东微^{2*}

1 暨南大学药学院基因组药物研究所, 广州 510632
2 广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 广州 510623

摘要: 针对诺如病毒 II 型的保守区域设计引物, 建立了 SYBR Green I 实时荧光 RT-PCR 检测诺如病毒 II 型的反应体系。此方法的病毒检测下限达到 10^2 拷贝, 标准曲线的线性范围为 $10^2\sim 10^6$ 拷贝, 相关系数为 0.9952, 斜率为 -2.982, 截距为 35.84。对诺如病毒 II 型检测特异, 与轮状病毒、腺病毒、甲肝病毒、星状病毒无交叉反应。针对质粒标准品检测的批内试验变异系数 (CV) 为 0.95%~1.69% ($n=5$), 批间试验 CV 为 0.87%~1.24% ($n=3$)。运用此方法随机检测 30 份贝类水产品, 检测出 2 份阳性样品。结果表明, SYBR Green I 荧光 RT-PCR 检测诺如病毒 II 型的方法灵敏、特异、重复性好, 可应用于贝类水产品的快速检测。

关键词: 诺如病毒 II 型, SYBR Green I 荧光 RT-PCR, 检测

SYBR Green I real-time polymerase chain reaction for detection of Norovirus II in the shellfish

Xuemei Mo^{1*}, and Dongwei Gao^{2*}

1 Institute of Genome Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, China
2 Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center, Guangzhou 510623, China

Abstract: We set up an SYBR Green I real-time RT-PCR method for the detection of genogroup II Norovirus, and this method's primers were encompassed the conservative region of Norovirus II. The limit of the detection was 10^2 copies. The standard curve's linear range was $10^2\sim 10^6$ copies, correlation coefficient was 0.9952, the slope was -2.982, and the intercept was 35.84. This method possessed specificity for genogroup II Norovirus, without any cross-reaction with rotavirus, adenovirus, hepatitis A virus or astrovirus. The coefficients of variation (CV) of the C_t values of the standard plasmid were 0.95%~1.69% ($n=5$) in intra-assay and 0.87%~1.24% ($n=3$) in inter-assay. We used this method to detect 30 shellfish samples, and found 3 samples were positive. This method is sensitive, specific and reliable for Norovirus II. It can be used to detect the Norovirus II in the shellfish rapidly.

Keywords: Norovirus II, SYBR Green I real-time RT-PCR, detection

诺如病毒(Norovirus, NVs) 是人类急性非菌性 规模肠胃炎事件在世界范围内频繁爆发^[1-3], 已成为 肠胃炎的最主要病原。近年来, 诺如病毒引发的大 威胁公共卫生安全的重要因素之一。由于水环境的

Received: January 5, 2010; **Accepted:** March 23, 2010

Supported by: Scientific and Technological Project of Guangdong Province (No. 2005B20401017), Scientific and Technological Project of Guangdong Inspection and Quarantine Office (No. 2005AGDK28).

Corresponding author: Dongwei Gao. Tel/Fax: +86-20-33320663; E-mail: mxm200101@163.com

*These authors contributed equally to this study.

广东省科技攻关项目 (No. 2005B20401017), 广东检验检疫局科技项目 (No. 2005AGDK28) 资助。

污染,作为滤食性水生动物的贝类,很容易从污染的水中富集大量食源性病毒。当人们生食含有诺如病毒的贝类时,极有可能因感染病毒而诱发急性肠胃炎。因此,建立贝类水产品中诺如病毒的快速检测方法,对于保障食品安全非常重要。

诺如病毒根据其 RNA 多聚酶区 (RDRP) 和衣壳蛋白编码区核苷酸和氨基酸序列特征,可被分为 5 个遗传组 (GG I~V),其中 GG I、GG II 和 GG IV 型可以感染人类^[4-5]。流行病学调查结果表明,GG II 是世界范围内最常见的基因型。我国病人感染的诺如病毒也以 GG II 为主,GG I 及 GG IV 型较为罕见。

由于诺如病毒迄今尚未能在细胞内培养,在早期研究中,电镜是其唯一的检测手段,导致食品中相对微量的病毒检测十分困难。近年来,随着分子生物学技术的发展,RT-PCR 技术已广泛应用于食品中诺如病毒的检测^[6-8]。但是,RT-PCR 技术仍存在灵敏度不高以及易发生交叉污染等不足。

实时荧光定量 PCR 是近年新兴的分子生物学技术,具有直观、敏感性高、重复性好、可定量、速度快、操作简便和污染少等优点,已经在病毒、微生物、肿瘤基因检测等方面取得许多成果^[9-11]。Real-time PCR 技术主要有 TagMan 探针法和 SYBR green I 染料法^[12-13]。SYBR Green I 染料法主要是利用 SYBR Green I 荧光染料与双链 DNA 分子结合发光的特性来指示扩增产物增加,其荧光信号的增强与 PCR 产物的增加完全同步。SYBR Green I 染料法的优势是无需另外设计荧光探针,设计的程序通用性好,且价格相对较低。因此,为了提高我国对水产品中诺如病毒的检测水平,加强对诺如病毒疫情的预防和控制,本实验建立了可用于贝类水产品快速检测 GGII 型诺如病毒的 SYBR green I Real-time PCR 方法。

1 材料和方法

1.1 酶和试剂

Viral RNA MiNi Kit 购自美国 QIAamp 公司。逆转录酶 AMV、ddH₂O、RNA 酶抑制剂、DNA 聚合酶、10×PCR 缓冲液购自大连宝生物工程有限公司。

少量质粒抽提试剂盒和 DNA 提取试剂盒均购自北京天根生化科技有限公司。20×SYBR Green I 购自美国 Invitrogen 公司。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。Agarose Gel DNA Purification Kit 和 pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司。其余试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 材料

诺如病毒 II 型的质粒标准品由广州市儿童医院检验科馈赠。甲型肝炎减毒活疫苗由暨南大学社区医疗服务中心提供。轮状病毒、腺病毒、星状病毒阳性粪便标本由广东省妇幼保健院提供。抽查的 30 份贝类水产品样品于广州市多个农贸市场随机采集。

1.3 标准品的制备

将诺如病毒 II 型质粒转化大肠杆菌 *Escherichia coli* Top 10 菌株,扩增后用少量质粒抽提试剂盒提取,用紫外分光光度计测 A_{260} 值定量,用 ddH₂O 调整至 1×10^{10} 拷贝/ μL , -20°C 保存备用。

1.4 SYBR Green I 荧光 RT-PCR 法的建立

1.4.1 引物的设计

根据目前 GenBank 中所有的诺如病毒 cDNA 序列,用 DNASTar 软件进行同源性比对,选择高度保守区域。用 Primer Premier 5.0 软件,选择比较保守的诺如病毒 II 型的 RNA 依赖的 RNA 多聚酶区与衣壳蛋白区的连接区域作为靶向扩增区域,设计出荧光定量 PCR 引物。上游引物: 5'-TCTATGTATGGATCGCACTCG-3'; 下游引物: 5'-GTAGGCAAGTCCATCAAAGTC-3'。

1.4.2 SYBR Green I 荧光 RT-PCR 的反应体系

PCR 反应体系 (20 μL): 10×PCR 缓冲液 2 μL , 25 mmol/L MgCl₂ 2.4 μL , 5 mmol/L dNTPs 1.2 μL , 20×SYBR Green I 1 μL , 上、下游引物 (20 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL , DNA 聚合酶 0.5 μL , 逆转录酶 AMV 0.25 μL , RNase 抑制剂 0.4 μL , 待测模板 8 μL , 超纯水 3.75 μL 。

RT-PCR 反应条件: 42°C 30 min 逆转录。 95°C 预变性 2 min; 95°C 变性 15 s, 52°C 退火 20 s, 72°C 延伸 20 s, 40 个循环。于 52°C 20 s 退火阶段采集荧

光信号。

溶解曲线的分析条件: 在荧光实时 PCR 检测仪 Chromo 4 (美国 MJ 公司) 的系统上, 将 SYBR Green I 荧光实时 PCR 的产物, 设定为从 50℃ 以 0.2℃/s 的速度缓慢上升至 95℃, 连续收集荧光信号, 系统自动绘制溶解曲线。

1.4.3 标准曲线的建立

用 10 倍系列稀释法处理诺如病毒 II 型质粒标准品。取 6 个浓度梯度 (10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 拷贝) 诺如病毒 II 型质粒标准品作为模板, 以 ddH₂O 作为阴性对照, 分别进行 SYBR Green I 荧光 PCR 反应。根据诺如病毒荧光实时 PCR 的动力学曲线, 检测仪系统自动生成标准曲线以及回归方程。

1.4.4 SYBR Green I 荧光 RT-PCR 的特异性研究

为了检验所建立方法的特异性, 我们分别用病毒 RNA 提取试剂盒提取了轮状病毒、星状病毒阳性粪便标本以及甲型肝炎减毒活疫苗的 RNA, 用 DNA 提取试剂盒提取了腺病毒的 DNA, 并运用 SYBR Green I 荧光 RT-PCR 体系进行检测。

1.4.5 SYBR Green I 荧光 RT-PCR 重复性和准确性的验证

为了确定该反应体系的重复性, 分别用 4 个不同浓度 (10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 拷贝) 的质粒标准品进行了批内 (5 孔重复试验) 以及批间 (3 批重复试验) 实验。为了验证此反应体系的准确性, 随机抽取 3 个荧光 PCR 阳性样品的产物, 将纯化后的 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体上, 委托上海英骏生物技术有限公司进行测序。

1.5 SYBR Green I 荧光 RT-PCR 法检测贝类的诺如病毒

1.5.1 贝类样品的处理

随机采集 30 份贝类水产品样品, 种类包括花蛤 (菲律宾帘蛤 *Ruditapes philippinarum*)、生蚝 (牡蛎 *Oyster*)、扇贝 *Placopecta magellanicus*、贻贝 *Mytilus edulis*、河蚬 *Corbicula fluminea*。其中, 花蛤、贻贝的规格约为 20 g/个; 生蚝、扇贝、河蚬的规格约为 100~200 g/个。解剖取下贝类中的肠道组织, 取 1.5 g 样品加入 15 mL Tris-HCl 缓冲液 (0.05 mol/L, pH 7.4), 冰上匀浆。将匀浆液置于 50 mL

离心管中, 37℃ 温育 30 min。4℃、5 000×g 离心 20 min, 收上清液至一新管。按上清液量的 10% 浓度添加 PEG-8000, 添加 NaCl 至终浓度为 0.4 mol/L, 4℃ 过夜。次日, 离心取沉淀 (10 000×g, 5 min, 4℃), 向沉淀中加入 10 mL Tris-HCl 缓冲液, 充分溶解后加等量氯仿, 室温振荡 30 min, 离心 (2 000×g, 30 min, 4℃), 取上层水相, -20℃ 保存待检。

1.5.2 贝类样品病毒 RNA 的提取

将以上处理后的样品液, 用病毒 RNA 提取试剂盒进行常规 RNA 提取, 提取的 RNA 立即进行 SYBR Green I 荧光 RT-PCR 反应。

1.5.3 运用 SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 方法检测样品

以提取的病毒 RNA 作为待测模板, 按照以上建立的方法进行检测。通过样品在荧光实时 PCR 检测仪上生成扩增曲线的 C_t 值, 判断样品阴性或阳性。

2 结果

2.1 SYBR Green I 荧光 RT-PCR 反应体系的建立

不同浓度的诺如病毒 II 型质粒标准品的动力学曲线见图 1。结果显示, 浓度在 10^2 拷贝以上的标准品有明显的荧光增长, 而 10^1 拷贝和阴性对照均无荧光增长, 因此该荧光 RT-PCR 检测体系的病毒检测下限为 10^2 拷贝。

在 Chromo 4 荧光实时 PCR 检测仪上结束扩增后, 用系统上 Opticon Monitor (version 3.1) 软件进行分析, 以起始模板的对数为 x 轴, 以 C_t 值为 y 轴作回归曲线, 即得诺如病毒检测的标准曲线 (图 2)。该标准曲线的相关系数为 0.9952, 斜率为 -2.982, 截距为 35.84。标准曲线在 10^2 ~ 10^6 拷贝范围内呈现良好的线形关系。

2.2 SYBR Green I 荧光 RT-PCR 的特异性

从图 3 中质粒标准品的荧光 RT-PCR 溶解曲线分析, 浓度在 10^2 ~ 10^6 拷贝的质粒的 PCR 产物溶解峰特异, T_m 值为 $85^\circ\text{C}\pm 0.1^\circ\text{C}$, 没有其他明显的杂峰出现; 浓度为 10^1 拷贝的质粒以及阴性对照均没有出现溶解峰。说明没有产生由引物二聚体引起的假阳性扩增信号, 反应体系的特异性高。

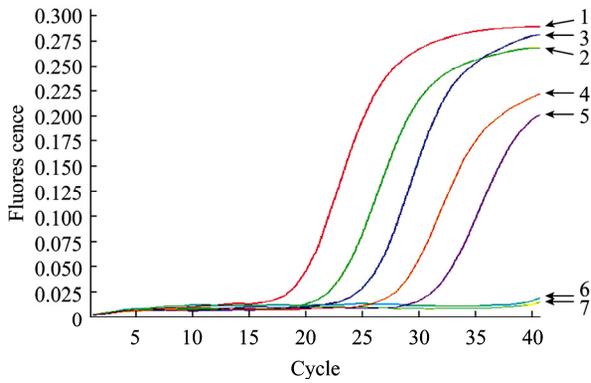


图 1 SYBR Green I 荧光定量 PCR 法的动力学曲线
 Fig. 1 Dynamic curve of the real-time RT-PCR for Norovirus. 1-6: GII Norovirus plasmid standards containing from 10^6 to 10^1 copies per reaction; 7: negative control.

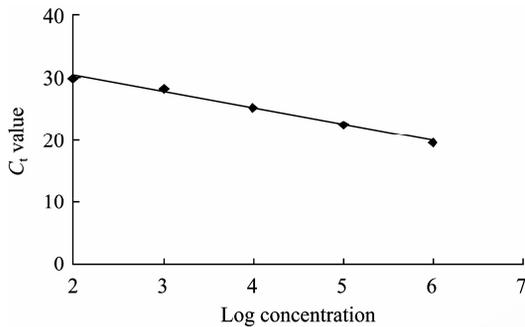


图 2 SYBR Green I 荧光定量 PCR 法的标准曲线
 Fig. 2 Standard curve of the real-time RT-PCR for Norovirus.

从图 4 中不同病毒的扩增曲线可以看到，只有诺如病毒 II 型质粒标准品有明显的荧光增长，其他病毒（包括轮状病毒、腺病毒、星状病毒、甲型肝炎病毒）均无荧光增长，说明该方法能特异扩增 GG II 诺如病毒。

2.3 SYBR Green I 荧光 PCR 检测的重复性和准确性

表 1 中的数据显示，4 个不同浓度的质粒标准品 (10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 拷贝) 所进行的批内试验 ($n=5$) 的

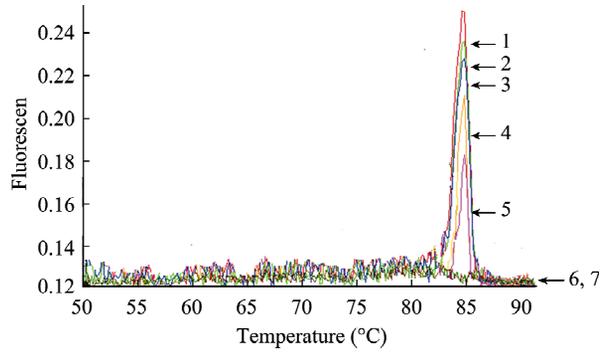


图 3 SYBR Green I 荧光定量 PCR 法的熔解曲线
 Fig. 3 Melting curve of the real-time RT-PCR for Norovirus. 1-6: GII Norovirus plasmid standards containing from 10^6 to 10^1 copies per reaction; 7: negative control.

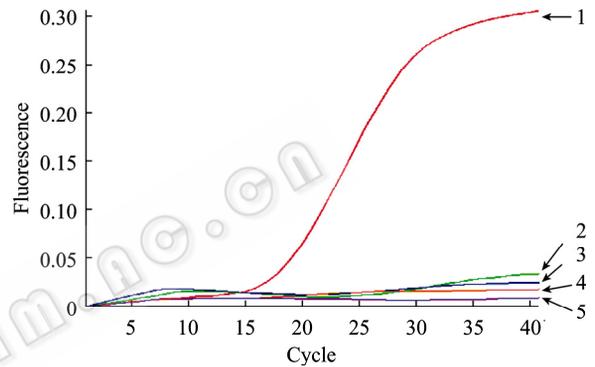


图 4 SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 体系对不同病毒的扩增曲线

1: GII Norovirus plasmid standard; 2: rotavirus; 3: hepatitis A virus; 4: adenovirus; 5: astrovirus.

C_t 值变异系数 (CV) 分别为 1.02%、1.69%、0.95%、1.13%，批间试验 ($n=3$) 的 C_t 值变异系数 (CV) 分别为 0.90%、1.18%、1.24%、0.87%。上述结果表明，在相同实验条件下，SYBR Green I 荧光 PCR 检测体系的重复性好。随机抽取 3 个阳性 PCR 产物进行委托测序，测序结果显示全部为 GG II 型诺如病毒，说明所建立的荧光 PCR 检测体系准确可靠。

表 1 Real-time PCR 检测的批内和批间试验的 C_t 值及其变异系数

Table 1 C_t values and coefficients of variation (CV) of intra-assay and inter-assay of the real-time PCR

	Intra-assay (C_t value)					CV (%)	Inter-assay (C_t value)				CV (%)	
	1	2	3	4	5		Avg C_t	1	2	3		Avg C_t
a	19.91	19.85	19.42	19.51	19.66	19.67	1.02	19.74	19.48	19.98	19.73	0.90
b	22.34	22.51	22.80	22.74	22.49	22.58	1.69	22.95	22.86	22.51	22.78	1.18
c	25.08	25.43	25.16	25.37	25.24	25.26	0.95	25.63	25.49	25.87	25.67	1.24
d	28.16	28.31	28.46	28.21	28.35	28.30	1.13	28.49	28.56	28.35	28.47	0.87

a-d: GII Norovirus plasmid standards containing from 10^6 to 10^3 copies per reaction; Avg C_t : average C_t value; CV: coefficient of variation.

2.4 SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 法检测贝类抽样样品

为了评价所建立的荧光 RT-PCR 法的实用性, 我们运用此方法检测了 30 份于广州市多个农贸市场随机采集的贝类水产品。检测结果显示, 30 份样品中有 2 份呈阳性 (7%), 均为牡蛎, 其 C_t 值分别为 26.95、27.32; 其余 28 份抽样样品呈阴性 (图 5)。

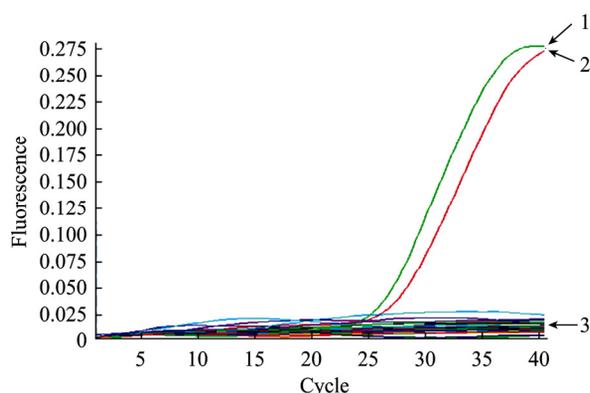


图 5 SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 法检测 30 份抽样水产品的扩增曲线

Fig. 5 Amplification curves of the real-time RT-PCR system for 30 shellfish samples. 1: positive sample (*Oyster*); 2: positive sample (*Oyster*); 3: negative samples.

3 讨论

近年来, 诺如病毒感染日益成为一个全球范围内重要的公共卫生问题。受污染的贝类是诺如病毒一个重要传染源。因此, 建立贝类中诺如病毒灵敏的检测方法, 对于保障人们的健康和预防疫情的爆发具有重要意义。本实验采用 SYBR green I 染料法建立了诺如病毒的荧光 RT-PCR 检测体系。

SYBR Green I 浓度是影响实验的关键因素之一, 如果浓度过低会导致荧光信号强度不够; 而过高浓度则会抑制 PCR 反应^[14]。本实验所用的 SYBR Green I 染料为美国 Invitrogen 公司产品, 生产商建议 SYBR Green I 终浓度为 $1\times$ 。此外, 本文所建立的反应体系中, Mg^{2+} 浓度达到 3 mmol/L, 高于常规 RT-PCR 体系中 Mg^{2+} 浓度 (0.5~2.0 mmol/L), 适当提高 Mg^{2+} 浓度可以有效降低 SYBR Green I 对 PCR 反应的抑制作用。

引物二聚体引起的荧光信号会对结果产生较大影响, 必须尽量消除引物二聚体的干扰。提高退火

温度可消减二聚体产生, 但同时也会导致扩增效率下降^[15]。本实验在查阅文献^[16]以及预实验的基础上, 最终将退火温度设定为 $52^{\circ}C$ 。SYBR green I 荧光定量 PCR 理想扩增产物应在 100 bp 以下^[17], 本实验所设计的引物选择了诺如病毒 II 型保守区域, 扩增片段长度为 95 bp, 符合此要求。

本实验所建立的 SYBR green I 荧光定量 RT-PCR 法, GG II NVs 病毒检测下限达到 10^2 拷贝, 比常规 RT-PCR 的灵敏度 (检测下限约 10^3 拷贝)^[18-19] 提高 10 倍左右。为了实现病毒的富集, 水产品需要经过预处理的过程, 预处理过程需在 $4^{\circ}C$ 过夜的条件下进行。在完成水产品的预处理后, 如果采用常规 RT-PCR 法, 从病毒核酸提取到 RT-PCR 及电泳检测约需要 6 h, 而采用该方法从病毒核酸提取到完成检测仅需要约 3 h。该方法实行闭管式操作, PCR 产物不会污染环境。熔解曲线分析表明, 反应体系的 PCR 产物熔解峰特异, 没有明显的杂峰出现, 基本消除引物二聚体的干扰。特异性实验表明, 该方法对诺如病毒 II 型检测特异, 与轮状病毒、腺病毒、甲肝病毒、星状病毒无交叉反应。针对质粒标准品检测的批内试验和批间试验表明, 所建立的检测体系重复性好。运用此 SYBR green I 荧光定量 RT-PCR 检测每份样品的成本约为 25 元 (人民币), 比 TagMan 探针法价格更适宜。因此, 本实验所建立的 SYBR green I 荧光定量 RT-PCR 法具有灵敏、快速、特异、稳定、经济的优点, 可适用于大规模水产品中诺如病毒 II 型的检测。

REFERENCES

- [1] Tan M, Jiang X. Norwalk virus gastroenteritis, increased understanding and future antiviral options. *Curr Opin Investig Drugs*, 2008, **9**(2): 146-151.
- [2] Esteve GA, Navarro RG, Sala MR, et al. Outbreak of gastroenteritis by Norwalk virus in nursing home. *Med Clin*, 2008, **130**(3): 117-125.
- [3] Esteve GA, Navarro RG, Sala MR, et al. Recombinant norwalk virus implicated in gastroenteritis outbreaks in Hiroshima Prefecture. *J Med Virol*, 2008, **80**(5): 921-928.
- [4] Ando T, Noel JS, Fankhauser RL. Genetic classification of

- “Norwalk-like viruses”. *J Infect Dis*, 2000, **181**(12): 336–348.
- [5] Goodgame R. Norwalk virus gastroenteritis. *Curr Gastroenterol Rep*, 2006, **8**(5): 401–408.
- [6] Marshall JA, Bruggink LD. Laboratory diagnosis of Norwalk virus. *Clin Lab*, 2006, **52**(11): 571–581.
- [7] Igor VK, Irina AA, Alan M, *et al.* 3'-Minor groove binder-DNA probe increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28**(2): 655–661.
- [8] Jiang X, Huang PW, Zhong WM, *et al.* Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J Virol Methods*, 1999, **83**(1/2): 145–154.
- [9] Hua R, Tanaka Y, Fukai K, *et al.* Rapid detection of the hepatitis B virus YMDD mutant using TagMan-minor groove binder probes. *Clin Chim Acta*, 2008, **395**(1/2): 151–154.
- [10] Schmidtke G, Groettrup M. Identification of homozygous transgenic mice by genomic real-time PCR. *Methods Mol Biol*, 2008, **429**: 45–58.
- [11] Vinje J, Vennema H, Maunula L, *et al.* International collaborative study to compare reverse transcriptase PCR assays for detection and genotyping of noroviruses. *J Clin Microbiol*, 2003, **41**(4): 1423–1433.
- [12] Jothikumar N, Kang G, Hill VR. Broadly reactive TagMan assay for real-time RT-PCR detection of rotavirus in clinical and environmental samples. *J Virol Methods*, 2009, **155**(2): 126–131.
- [13] Catriona L, John J, Niamh S, *et al.* Real-time reverse transcription PCR detection of norovirus, sapovirus and astrovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis. *J Virol Methods*, 2007, **146**(2): 36–44.
- [14] Shou L, Guangyu H, Qingye Z, *et al.* A SYBR Green I real-time RT-PCR assay for detection and differentiation of influenza A (H1N1) virus in swine populations. *J Virol Methods*, 2009, **162**(2): 184–187.
- [15] Santhosh SR, Parida MM, Dash PK, *et al.* Development and evaluation of SYBR Green I-based one-step real-time RT-PCR assay for detection and quantization of Japanese encephalitis virus. *J Virol Methods*, 2007, **143**(1): 73–80.
- [16] Kong LL, Omar AR, Bejo MH, *et al.* Development of SYBR Green I-based one-step real-time RT-PCR assay for the detection and differentiation of very virulent and classical strains of infectious bursal disease virus. *J Virol Methods*, 2009, **161**(2): 271–279.
- [17] Marino JH, Cook P, Miller KS. Accurate and statistically verified quantification of relative mRNA abundances using SYBR Green I and real-time RT-PCR. *J Immunol Methods*, 2003, **283**(2): 291–306.
- [18] Hewitt J, Bell D, Simmons GC, *et al.* Investigation of a waterborne norovirus outbreak in a New Zealand ski resort. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **154**(3): 718–723.
- [19] Scott TM, Rose JB, Jenkins TM, *et al.* Microbial source tracking: current methodology and future directions. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(12): 5796–5803.