

# 牡蛎中 GII 型诺如病毒快速检测方法研究

董晓根<sup>1</sup>,陈倩<sup>2</sup>,陆翌禹<sup>1</sup>,王兆娥<sup>1</sup>,秦萌<sup>1</sup>,尉秀霞<sup>1</sup>,李洁<sup>1</sup>

1.北京市丰台区疾病预防控制中心, 北京 100071; 2.北京市疾病预防控制中心 食物中毒诊断溯源技术北京市重点实验室, 北京 100013

**摘要:目的** 建立牡蛎中 GII 型诺如病毒快速有效的检测方法, 为食源性疾患疫情暴发的溯源提供可靠的实验室依据。**方法** 梯度稀释含有 GII 型诺如病毒的便悬液分别加入牡蛎消化道组织匀浆中, 用蛋白酶 K 消化-PEG6000 沉淀方法富集后, 实时荧光 RT-PCR 进行终端检测, 评估灵敏度及回收率。**结果** 该方法的灵敏度为  $3.91 \times 10^3 \text{copies/g}$ , 病毒平均回收率为 6.64%。**结论** 蛋白酶 K 消化-PEG 沉淀法操作简单、快速, 有望进一步优化后应用于不同贝类中病毒的检测。

关键词:蛋白酶 K; PEG6000 沉淀; GII 型诺如病毒; 牡蛎; 荧光定量 RT-PCR

Development of a Rapid method for norovirus genotype II detection from oysters

DONG Xiao-gen, CHEN Qian, LU Yi-yu, WANG Zhao-e, QIN Meng, WEI Xiu-xia, LI Jie

Fengtai Center For Disease Control and Prevention, Beijing, 100071, China

**Abstract:Objective** To development a Rapid and efficient method of detection GII norovirus in oyster to deal with the outbreak of foodborne acute gastroenteritis .**Methods** The feces which contain the GII norovirus were added to the digestive tissue of oyster. Proteinase K was used to lysis the seeded oysters , followed by PEG6000 concentration . The feces was diluted and added to the oyster samples to evaluate the recovery efficiencies and sensitivity of this method.**Results** The detection limit of this method was  $3.91 \times 10^3 \text{copies/g}$  and the mean recover yields was 6.64%.

**Conclusions** The Proteinase K lysis-PEG6000 concentration was a simple and rapid method to extract viral from oyster. It is possible to be used to detect virus in different shellfish samples.

**Keywords:** Proteinase K; PEG6000 concentration ; Norovirus GII; oysters , real-time PCR

诺如病毒 (Norovirus, NoV) 是世界范围内引起人类非细菌性急性胃肠炎的主要病原之一, 也是重要的食源性和水源性病毒之一<sup>[1, 2]</sup>。诺如病毒属于杯

基金:北京市科技计划项目 (No.Z111107056811042); 食物中毒诊断溯源技术北京市重点实验室开发基金项目

作者简介:董晓根 (1975-), 男, 汉族, 安徽安庆人, 主管技师, 本科。研究方向:微生物检验; 陈倩, 女, 北京市人, 本科, 主任技师

通信作者:李洁, 副主任医师, 本科。Tel: 010-63810249, Email: [lijie7111@sina.com](mailto:lijie7111@sina.com)

状病毒科，诺如病毒属，基因组为单股正链 RNA。根据其编码 RNA 聚合酶和外壳蛋白基因序列的差异，目前可分为 GI-GV 5 个基因组，感染人的基因组有 GI、GII 和 GIV<sup>【3】</sup>。其中 GI 型主要引起大规模病毒性腹泻疫情暴发<sup>【4】</sup>。诺如病毒主要通过粪口途径传播，而食用被污染的食品或水以及生活接触是诺如病毒感染暴发的重要方式。

随着环境水污染的加剧，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微生物和病毒<sup>【5】</sup>。流行病学调查和实验室验证显示许多急性肠胃炎的暴发都和生食或使用未煮熟的牡蛎等贝类相关<sup>【6,7,8】</sup>。目前我国及世界上大多数国家对贝类中病毒的检测均没有有效且同一的技术标准可以执行，因此，研究和建立灵敏、高效的检测贝类中诺如病毒的方法对于食源性疾患的暴发溯源、保障食品安全都具有重要意义。诺如病毒目前还没有合适的细胞体系和动物模型进行体外培养，现在国内外多使用各种 PCR 技术（尤其是荧光定量 PCR）开展检测。由于贝类中病毒含量低，且富含蛋白、脂质等 PCR 反应抑制成分，因此病毒粒子的释放及富集成为成功检测的关键。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 粪便标本 粪便标本由中国疾病预防控制中心病毒病所提供，并经荧光定量 RT-PCR 检测及序列测定分析证实为 GI 诺如病毒阳性。加入适量 PBS(0.1M, PH7.2)振荡混匀，制成 10% 悬液，8000×g 离心 5min，留上清，-80℃ 保存待用。

1.1.2 牡蛎样品 染毒实验组牡蛎购自北京市某农贸批发市场，-20℃ 保存待用。

1.1.3 引物 引用 Kageyama 报道<sup>【9】</sup>，上游引物（COG2F）序列：

CARGARBCN

ATGTTYAGRTGGATGAG；下游引物（COG2R）序列：

TCGACGCCATCTTCA

TTCACA；探针（RING2）序列：（FAM）-TGGGAGGGBGATCGCRATCT -（TAMRA）。引物及探针均由北京天一辉远生物科技有限公司合成。

### 1.2 方法

1.2.1 染毒牡蛎标本的制备 从市场上购买的牡蛎5个一组，去壳取其消化道组织，利用匀浆器制成匀浆。取150ul病毒悬液与牡蛎匀浆混匀后，室温放置30min，另取150ul病毒悬液和未加病毒液的牡蛎匀浆分别作为阳性对照和阴性对照。牡蛎匀浆经普通PCR检测为诺如病毒阴性。设计染毒牡蛎标本的制备考虑欠周到。选购完牡蛎样品后，应该先用传统方法检测是否为诺如病毒阴性标本，选取阴性标本做染毒组，以排除本底值的影响。

1.2.2 染毒牡蛎样品的处理 取~2g牡蛎的消化道组织匀浆，加入等体积含有200ug/ml 蛋白酶K（购自Merck公司）的TE缓冲液（购自Invitrogen公司），37℃以200rpm的转速在水浴摇床中孵育1h，3000×g离心5min，吸取上清，加入等体积12%PEG6000（PH7.0，含0.3mol/L NaCl），4℃、10 000r/min 离心30min，弃上清。加1ml TE缓冲液重悬，-80℃保存待用。

就富集的方法来说，选择K消化和PEG600沉淀两种法的组合依据有不有实验数据支持，有没有比较单独富集与组合富集效率的差别，以及不同浓度组全的差别？（预实验时做过一些，不全）

1.2.3 病毒RNA提取 取500ul重悬液按QIAGEN公司的 QIAamp Viral RNA MiniKit 试剂盒说明书提取。

1.2.4 Realtime RT-PCR检测 使用 Invitrogen公司的SuperScript III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR试剂盒，反应体系为：2X Reaction Mix 12.5ul，COG2F（10 μM/L）、COG2R（10 μM/L）各1ul、RING2（10 μM/L）0.5ul，SuperScript. III RT/PlatinumTaq Mix 0.5ul，ddH<sub>2</sub>O 4.5ul，RNA 5ul。反应参数：45℃ 20 min；95℃ 2min；（95℃ 15 s，52℃ 30 s，72℃ 30 s）×45个循环；反应在ABI 7500Fast上进行。

1.2.5 绝对定量标准曲线的制作 浓度为  $1.0 \times 10^8$  copies/ul 的含有 GII 型诺如病毒扩增片段的质粒标准品由中国疾病预防控制中心病毒病所提供，10 倍倍比稀释为  $10^8$ - $10^1$  共 8 个浓度进行荧光定量 RT-PCR 检测，设置空白对照，重复 5 次。反应结束后根据噪声情况设定和调整基线与阈值，自动绘制标准曲线。

1.2.6 病毒回收率计算 把加入牡蛎中的诺如病毒阳性粪便、染毒牡蛎处理后的重悬液分别提取 RNA，进行 Realtime RT-PCR 检测各样本重复检测 3 次。病毒回收率公式如下:病毒回收率=2×回收病毒总量/ 加入牡蛎的病毒总量×100%。

1.2.7 特异性试验

选择引起病毒性腹泻常见的病原体包括轮状病毒、腺病毒、星状病毒和诺如病毒 GI、GII 亚型的病毒核酸，进行荧光定量 PCR 检测，验证该方法的特异性。

1.2.8 重复性试验

对已知为诺如病毒 GI 亚型的标本分别检测 3 次，求平均值，标准差和变异系数。

2 结 果

2.1 绝对定量标准曲线的制作

梯度稀释的质粒标准品在 ABI7500 Fast 扩增后呈现典型的 S 型曲线。荧光信号分析显示，在  $10^1$ - $10^8$ copies/ul 范围内，8 个点呈现良好线性关系，斜率为-3.52，相关系数  $R^2$  值为 0.997，Ct 值与拷贝数之间的线性关系良好（图 1）

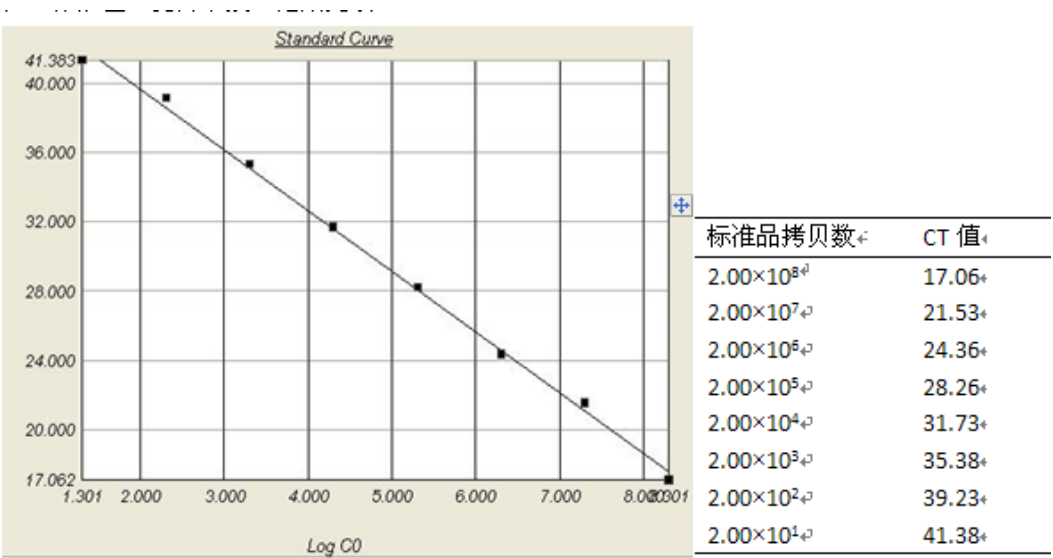


图 1 GI 诺如病毒绝对定量标准曲线

2.2 回收率及灵敏度测定 把含有诺如病毒的粪便悬液原液 10 倍系列度稀释为  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  共 5 个梯度，各浓度均取 150ul 加入 2g 牡蛎匀浆中，进行蛋白酶 K 消化-PEG 富集 核酸提取及 Realtime RT-PCR 检测。参考标准曲线、病毒回收率计算公式，计算病毒回收率并确定灵敏度（表 1 和图 2）。

表 1 蛋白酶 K-PEG 法检测牡蛎中诺如病毒的灵敏度及回收率

稀释度	添加病毒总量 (copies)	富集后 CT 值	回收病毒 总量 (copies)	病毒回收率%	平均回收率%
10 <sup>-1</sup>	9.32×10 <sup>6</sup>	27.11	3.85×10 <sup>5</sup>	8.26	6.64
10 <sup>-2</sup>	8.99×10 <sup>5</sup>	31.36	2.38×10 <sup>4</sup>	5.29	
10 <sup>-3</sup>	8.89×10 <sup>4</sup>	34.31	3.44×10 <sup>3</sup>	7.74	
10 <sup>-4</sup>	7.82×10 <sup>3</sup>	39.03	2.06×10 <sup>2</sup>	5.27	
10 <sup>-5</sup>	6.57×10 <sup>2</sup>	/	/	/	
本底对照	/	/	/	/	

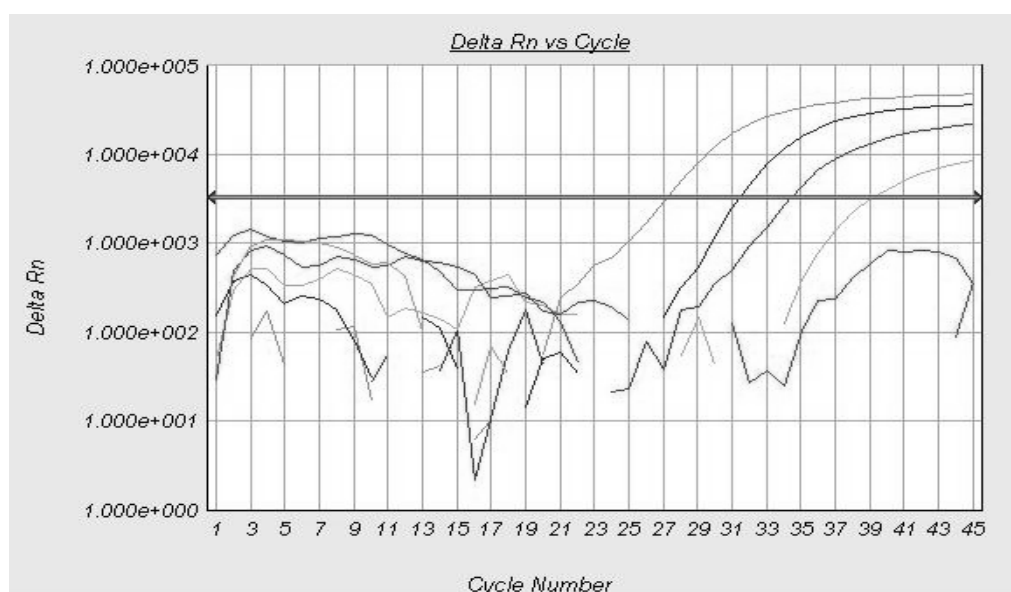


图2 蛋白酶 K-PEG 法检测牡蛎中诺如病毒的灵敏度的扩增曲线  
(注：从左往右扩增曲线代表的稀释度依次是 10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>)

由图2和表1可知，应用蛋白酶K裂解-PEG6000沉淀，realtime RT-PCR检测的平均回收率为6.64%，可检测出10<sup>-4</sup>稀释的诺如病毒便标本，CT值为39.03，相当于可检出3.91×10<sup>3</sup>copies/g。

### 2.3 特异性试验

本研究建立的方法与容易引起病毒性腹泻的轮状病毒、腺病毒、星状病毒和诺如病毒GI亚型无交叉反应，如图3所示。

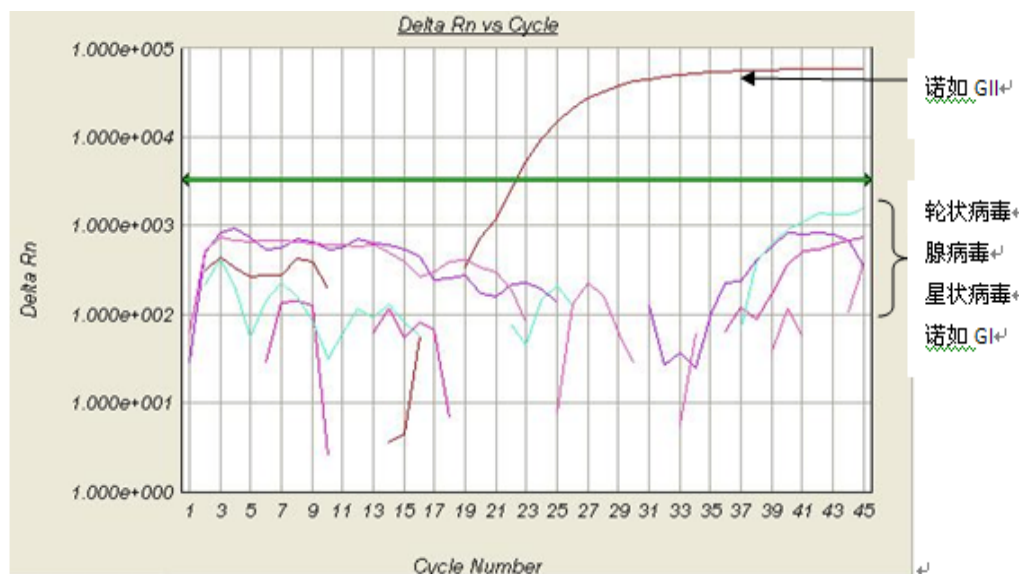


图3 特异性试验

## 2.4 重复性试验

对诺如病毒 GII 亚型标本核酸稀释 10 倍，进行重复性试验，求平均值，标准差和变异系数，结果见表 2。

表 2 重复性试验

稀释度	CT 值			$\bar{x}$	s	CV (%)
$10^{-1}$	27.11	27.89	28.23	27.74	0.57	2.05
$10^{-2}$	31.36	30.96	32.57	31.63	0.61	1.94
$10^{-3}$	34.31	34.89	33.87	34.36	0.51	1.48

从表 2 可知，对于不同浓度的诺如 GII 核酸，标准差在 0.51-0.61 之间，变异系数在 1.48-2.05%之间，具有良好的重复性。

## 3. 讨论

诺如病毒是通过食品和水污染引起非细菌性腹泻的主要病原之一。贝类由于能从污染的水体中富集病毒以及人们生食贝类的饮食习惯，常成为肠道病毒污染的首要高危食品【10】。关于贝类样本处理，尽管国际上已开展了许多研究，但目前还没有形成有效且统一的方案。研究热点集中在两类方法上，一种是酸吸附-洗脱-PEG沉淀，另外一种是通过蛋白酶K消化释放病毒粒子。酸吸附-洗脱-PEG沉淀法的主要优点是廉价且应用范围广（蔬菜、水果、贝类等）；缺点

是步骤繁琐，耗时长，需要数小时<sup>【11】</sup>。欧洲CEN/TC275/WG6/TAG4工作组将这一方法做为从熟食及软质水果中检测诺如病毒及甲肝病毒的首要选择<sup>【12】</sup>。

2005年Jothikumar等<sup>【13】</sup>报道了利用蛋白酶K消化牡蛎消化道组织从而达到释放病毒粒子的目的，成功从38份牡蛎中检出19份GII型诺如病毒。蛋白酶K法简单易操作，样本处理仅需1h，其缺点是目前仅限于贝类的处理。

CEN/TC275/WG6/TAG4工作组将此做为从贝类标本中检测肠道病毒的首选方法<sup>【14】</sup>。但蛋白酶K法仅是将病毒粒子从贝类中有效释放，没有起到富集的作用，对于体积较大的贝类，使用的蛋白酶K溶液体积较大，离心后得到的上清中病毒浓度较低。因此本研究制定出蛋白酶K消化后再经过PEG的富集提高病毒浓度。

病毒回收率是衡量食品中病毒检测效果的重要指标之一。本研究牡蛎中病毒平均回收率为6.64%。由于缺乏统一的检测方案，目前各研究的贝类中诺如病毒的回收率相差各异。Comelli等<sup>【15】</sup>的研究表明蛋白酶K法对于GI.3b和GII.4型诺如病毒的回收率分别为3.0%、3.5%，PEG沉淀法对GII.4型诺如病毒的回收率为8%，但没有检测到GI.3b型诺如病毒。国内学者利用甘氨酸洗脱-PEG沉淀富集方法从染毒贝类中检测诺如病毒的回收率为2.08%<sup>【16】</sup>。本研究病毒回收率与这些报道基本一致。整体回收率不高，下一步如何提高回收率仍然是研究的热点和难点。

本研究牡蛎中诺如病毒检测方法的最低灵敏度为 $10^{-4}$ 稀释的诺如病毒便标本，相当于 $3.91 \times 10^3$  copies/g。2001年Kingsley 和 Richards<sup>【17】</sup>研究利用甘氨酸洗脱-PEG沉淀的方法在牡蛎中检测NoV的灵敏度为22.4 RT-PCRU；2007年Baert等<sup>【18】</sup>的数据为20–100 RT-PCRU；国内学者研究报道的灵敏度为 $6.11 \times 10^5$  RNA copies/g<sup>【16】</sup>；2009年Le Guyader等利用蛋白酶K法得到的数据为 $3.9 \times 10^2$  RNA copies/g<sup>【19】</sup>。由于衡量单位以及研究对象等不一致，无法比较各自灵敏度的差异。

综上所述，蛋白酶K-PEG 富集法操作简单、快速，样本的处理不到2小时即可完成；从实验结果上看，该方法的回收率与灵敏度与有关报道较为一致，可望进一步优化后广泛应用于不同贝类中病毒检测，从而食源性疾患疫情暴发的溯源提供有效的实验室依据。

## 参考文献

- [1] Le Guyader, , Haugarreau, L, Miossec, L, et al. Three year study to assess human enteric viruses in shellfish[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66(7): 3241–3248.
- [2] Koopmans M, Duizer E. Foodborne viruses: an emerging problem [ J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 90(1): 23–41.
- [3] Zheng D P, Ando T, Fankhauser R L, et al. Norovirus classification and proposed strain nomenclature[J]. *Virology*, 2006, 346( 2) : 312-323.
- [4] Karst SM, Wobus CE, Lay M, et al. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like Virus[J]. *Science*, 2003, 299(5612): 1575–1578.
- [5] Renault T, Novoa B. Viruses infecting bivalve mollusk[J]. *Aquatic Living Resources*, 2004, 17(4): 397-409.
- [6] Kou XX, Wu QP, Wang DP, et al. Simultaneous detection of norovirus and rotavirus in oysters by multiplex RT-PCR[J]. *Food Control*, 2008, 19(7): 722—726.
- [7] Lowther, J. A., Avant, J. M., Gizynski, K., et al. Comparison between quantitative real-time reverse transcription PCR results for norovirus in oysters and self-reported gastroenteric illness in restaurant customers[J]. *Journal of Food Protection*, 2010, 73(6), 305–311.
- [8] Westrell, T., Dusch, V., Ethelberg, S. et al. Norovirus outbreaks linked to oyster consumption in the United Kingdom, Norway, France, Sweden and Denmark, 2010. *Euro Surveill*, 15, pii: 19524.
- [9] Kageyama T, Shigeyuki K, Shinohara M. Broadly reactive and highly sensitive assay for norwalk-like viruses Based on realtime quantitative reverse transcription-PCR[J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(4): 1548-1557.
- [10] Koopmans M, Duizer E. Foodborne viruses: an emerging problem[J]. *Int J Food Microbiol*, 2004, 90(1): 23-41.
- [11] Ambroos S, Leen B. Extraction of food-borne viruses from food samples: A review. *International Journal of Food Microbiology*[J]. *Int J Food Microbiol*, 2012, 153(1-2): 1-9.
- [12] Croci, L., Dubois, E., Cook, N. et al. Current methods for extraction and concentration of enteric viruses from fresh fruit and vegetables: towards international standards[J]. *Food Analytical Methods*, 2008, 1(2): 73–84.
- [13] Jothikumar, N., Lowther, J.A., Henshilwood, K., et al. Rapid and sensitive detection of noroviruses by using TaqMan-based one-step reverse transcription-PCR assays and application to naturally contaminated shellfish samples[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(4): 1870-1875.
- [14] Lees, D. International standardisation of a method for detection of human pathogenic viruses in molluscan shellfish[J]. *Food and Environmental Virology*, 2010, 2(3): 146–155.
- [15] Comelli HL, Rimstad E, Larsen S, et al. Detection of norovirus genotype I.3b and 11.4 in bioaccumulated blue mussels using different virus recovery methods[J]. *Int J Food Microbiol*, 2008, 127(1-2): 53-59.
- [16] 周晓红. 食品和水中诺如病毒检测方法的建立及其在暴发疫情中的初步应用[D]. 广州: 暨南大学, 2010.
- [17] Kingsley, D.H., Richards, G.P.. Rapid and efficient extraction method for reverse Transcription-PCR detection of hepatitis A and Norwalk-like viruses in shellfish[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(9): 4152–4157.
- [18] Baert, L., Uyttendaele, M., Debevere, J.. Evaluation of two viral extraction methods for the



detection of human noroviruses in shellfish with conventional and real-time reverse transcriptase PCR[J]. [Lett Appl Microbiol](#), 2007,44(1): 106–111.

[19] Guyader, F.S., Parnaudeau, S., Schaeffer, J., et al. Detection and quantification of noroviruses in shellfish[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009,75(3) : 618–624.