

# 单管半套式 RT-PCR 法检测贝类中轮状病毒的研究

寇晓霞<sup>1,2</sup> 吴清平<sup>1\*</sup> 张菊梅<sup>1</sup> 范宏英<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>广东省微生物研究所广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)

(<sup>2</sup>中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

**摘 要** 轮状病毒(Rotavirus)是一种以贝类为载体的重要食源性病毒,目前来说,RT-PCR 是贝类中轮状病毒最有效的检测方法,但通常由于病毒含量较低以及贝类中存在大量的 PCR 抑制物,致使将其运用于实际样本的检测时灵敏度仍较低。在实验室模拟自然环境,以人工播毒的方式使贝类富集轮状病毒,运用单管半套式 RT-PCR 法进行检测,并将单管半套式 RT-PCR 与 ELISA、RT-PCR 的检测灵敏度做了比较,表明单管半套式 RT-PCR 比 ELISA 的灵敏度高 1000 倍,是传统 RT-PCR 的 10 倍,有时甚至 100 倍。另外,单管半套式 RT-PCR 法降低了实验过程中的内源性和外源性污染,使检测所需时间从 6h 缩短至 4.5h,大大改进和完善了食源性病毒检测方法。并同时以整只贝和仅以贝的消化道为样检测表明,以消化道为样时的病毒检出率和检测灵敏度较高。

**关键词** 贝类 轮状病毒 半套式 RT-PCR 食源性 检测

中图分类号:Q939.4 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2005)03-0401-04

轮状病毒(Rotavirus)是食源性病毒胃肠炎的主要病原之一。贝类作为滤过性摄食动物,很容易富集病毒,是病毒性和细菌性病原的重要载体。食用含有病毒的贝类不仅对消费者的健康具有很大的威胁,而且也会给水产产业带来巨大的经济损失。因此,建立有效的病毒检测法对保障食品安全具有重要意义。RT-PCR 是目前贝类中病毒检测最为行之有效的方法,但贝类中的病毒含量通常较低以及存在大量的 PCR 抑制物,因此,从贝类样品中对病毒进行成功的高灵敏度检测即使对核酸扩增法也是一种很大的挑战,特别是对还需反转录的 RNA 病毒检测更是如此。采用半套式 RT-PCR 能显著地提高检测灵敏度,但传统半套式 RT-PCR<sup>[1]</sup>将第一次 PCR 反应和第二次 PCR 反应分开进行,即两管法半套式 RT-PCR,虽然能提高检测灵敏度,但将两次反应分开进行,由第一次扩增产物带来的内源污染及中间操作环节带来的外源污染不仅降低了结果的可靠性,而且既耗时又不经济,降低了检测的效率,限制了此法的广泛运用。本研究运用单管半套式 RT-PCR<sup>[2]</sup>,即将反转录和两次扩增在一个反应管内进行,并运用物理学方法将半套式反应所需的引物和试剂与前面的反应混合物分开,当需要时再以离心的方式使两次反应液混合,再次扩增,整个操作过程无须开盖,

大大降低了实验操作所带来的污染,而且可以缩短检测时间,降低检测成本,并为其它病毒的检测提供借鉴。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 病毒样本的收集和制备**:从广州市儿童医院及南方医院新生儿科收集非细菌性腹泻病人的腹泻样本,用 pH7.4 的 PBS 稀释成 10% 的悬液,4℃、10000r/min 离心,弃去残渣,用 0.22 $\mu$ m 的无菌滤膜过滤除菌后,经兰州生物制品所生产的轮状病毒 ELISA 试剂盒检测,-20℃保存。

**1.1.2 试剂**:TRIzol 试剂盒购自 Gbicol 公司;MLV 反转录酶、Taq DNA 聚合酶购自 Promega 公司;RNasin、dNTP 购自上海 Sangon 公司。

### 1.2 RNA 抽提

用 TRIzol 试剂盒抽提贝类浓缩物中的病毒 RNA,详细操作过程见说明书。在分光光度计上测定所提取的 RNA 浓度和纯度。

### 1.3 单管一步法半套式 RT-PCR 检测

以轮状病毒 VP7 基因的高保守区段设计各血清型通用的引物,碱基序列分别为 P1 5'-GGCTTTA-AAAGAGAGAATTTCCGTCTGG-3';P2 5'-GTATGGTAT-

基金项目 广东省重大科技攻关项目(2002B3100103)

\* 通讯作者。Tel/Fax 86-20-87868132 E-mail: wuqp@gdas.ac.cn

作者简介 寇晓霞(1979-),女,甘肃庆阳人,博士研究生,主要从事分析微生物学研究。E-mail: kou-er@163.com

收稿日期 2004-10-25,修回日期 2005-02-26

TGAATATACCAC-3' ; P3 : 5'-GATCCTGTTGGCCATCC-3' ,由上海 Sangon 公司合成。其中 ,P1 和 P2 为半套式 PCR 外引物对 ,P2 和 P3 为半套式 PCR 内引物对 ,所对应的碱基位置分别为 1 ~ 28 ,51 ~ 71 ,376 ~ 392<sup>[3]</sup>。

将反转录和两次扩增反应的所需试剂一次性加入反应管内 ,3 次反应在一个反应管内完成 ,整个实验过程无须开盖。而第二次扩增所需的引物和试剂置于反应管管帽内 ,利用表面张力的作用悬浮在反应管上方 ,RT 和第一次扩增完成后 ,以离心的方法使“悬滴”和下面的反应液混合 ,再次扩增 ,即可完成半套式反应。

具体的过程如下 :第一步 RT-PCR 的反应体系 (25 $\mu$ L) 2.5 $\mu$ L 10 $\times$  PCR buffer ,200 $\mu$ mol/L dNTP ,20U RNasin ,P1、P2 各 0.3 $\mu$ mol/L , MLV 200U , TaqE 1.5U , RNA 模板 2.5 $\mu$ L ,用石蜡油覆盖。第二步 PCR 反应液加在反应管盖内 ,包括 2.5 $\mu$ L 10 $\times$  PCR buffer ,200 $\mu$ mol/L 的 dNTP ,P2、P3 各 0.5 $\mu$ mol/L ,Taq E 1.5U。

第一步 RT-PCR 扩增条件 :50 $^{\circ}$ C 30min 合成第一链 cDNA ;紧接着 94 $^{\circ}$ C 变性 5min ,94 $^{\circ}$ C 40S ,55 $^{\circ}$ C 50S ,72 $^{\circ}$ C 40S ,循环 30 次 ;72 $^{\circ}$ C 7min ,以确保扩增产物充分延伸。以大于 8000g 的转速离心 15S ,使悬浮于反应管盖内的第二次 PCR 反应混合液同前面的扩增反应物混匀 ,再次扩增 ,条件同上。

取两次扩增产物 5 $\mu$ L ,1.4% 的琼脂糖凝胶电泳检测 ,在紫外成像系统中观察结果 ,与 100bp 标准分子量对照 ,两次 PCR 分别出现 392bp 和 342bp 的条带即为阳性结果。PCR 产物测序由上海博亚生物公司完成。

## 1.4 贝类样本的检测

**1.4.1 病毒的生物富集 :**从本地的水产市场购买贝类 ,将其放养于一个盛有海水的容器中 ,然后将 1mL 病毒悬液投放于容器中 ,模拟自然水体的环境 ,使贝

类自然富集。同时 ,以同样的条件(不投毒)设立阴性对照。每隔 8h 换水及重新投毒一次 ,整个生物富集时间为 24h<sup>[4,5]</sup>。

**1.4.2 贝类中病毒的活化和浓缩 :**将上面经过生物富集的贝类 ,5 只贝为一个样 ,剥壳 ,取其胃和消化道 1.5g ,然后转入 50mL 的 Falcon 管中 ,加入 15mL 冷的经灭菌的 0.05mol/L 甘氨酸-0.14mol/L 氯化钠 (pH7.5) ,然后用 Waring blender 在冰上高速匀浆。为了防止交叉污染 ,应用 70% 的酒精对 Waring blender 消毒 ,并在每个样品匀浆后用 Bursen beuner 加热 1min。具体的过程同 Carol Shieh 的处理方法<sup>[6]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 单管法半套式 RT-PCR 和 RT-PCR 检测结果的比较

将轮状病毒 RNA 模板进行梯度稀释后 ,分别做 RT-PCR 和单管半套式 RT-PCR 扩增(图 1)。如图 1 所示 ,392bp 的条带为传统的 RT-PCR 扩增结果 ,即只进行了 1 次扩增反应 ,RT 和 PCR 所用引物均为 P1、P2 ,可见条带的最高稀释度为  $10^{-5}$  ,通过核酸浓度测定可知 ,可检测到的核酸水平为 100pg ;342bp 的条带为半套式 RT-PCR 扩增结果 ,在 RT 和第一次 PCR 过程中所用引物为 P1、P2 ,半套式扩增引物为 P2、P3 ,可见条带的最高稀释度为  $10^{-7}$  ,即核酸水平为 10pg 左右。从实验结果可知 ,半套式 RT-PCR 的灵敏度是传统 RT-PCR 的 10 倍 ,提高了常规 RT-PCR 的检测灵敏度。另外 ,当模板量较大时 ,在半套式 RT-PCR 扩增后 ,外部和内部两对引物分别扩增的产物均有出现 ,而当稀释度比较高 ,即将近终点稀释度时 ,模板量很少 ,则只看到半套式 ,即第二次扩增的产物。而且为了得到更多的半套式 PCR 产物 ,第二次扩增的引物浓度应高于第一次扩增的引物浓度。

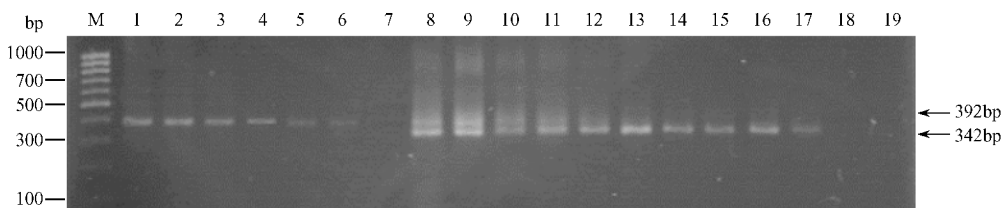


图 1 单管法半套式 RT-PCR 和 RT-PCR 检测灵敏度的比较

Fig. 1 The detection sensitivity of traditional RT-PCR compared with the single-tube seminested RT-PCR

M. 100bp Marker ; 1 ~ 7. Typical amplification patterns for 10-fold serially RNA extract by using RT-PCR , 1. Postive control ; 2 ~ 7. Dilutions from  $10^{-1}$  to  $10^{-5}$  , produce a 392bp product . 8 ~ 19. Single-tube seminested amplification patterns for 10-fold serially RNA extract , 8. Postive control ; 9 ~ 10.

The undiluted template ,11 ~ 19. Dilutions from  $10^{-1}$  to  $10^{-9}$  , produce a 342bp product .

## 2.2 单管法 RT-PCR 和两管法 RT-PCR 检测结果的比较

相比较单管法半套式 RT-PCR,两管法半套式 RT-PCR 虽然具有很高的外源污染风险,但在相同的实验条件下,将 RNA 模板做 10 倍梯度稀释,并经过多次反复对照实验表明,两种方法在灵敏度水平上是相同的。但是单管半套式 RT-PCR 具有更多的优点和实用性。从检测时间的角度,两管法检测需 6h 才能完成,而单管法仅需 4.5h。因此,从传统的 RT-PCR 到灵敏度较高的半套式 RT-PCR,以及在此基础上发展的单管一步法 RT-PCR 病毒检测法,每一步的改进和发展都在很大程度上解决了病毒检测中存在的困难和问题。

## 2.3 样品检测

### 2.3.1 单管半套式 RT-PCR 检测结果

众多研究者对于贝类取样位置的差别对病毒检出率及检测灵敏度的影响做了很多的描述,众说不一。本实验分别设立了以整只贝和其消化道两组为样,对 40 份贝类样本进行检测,在两份样品中检出含有轮状病毒的贝类样品分别为 34 和 38 个,病毒的检出率为 85% 和 95%。以消化道为样时的检测结果及灵敏度如图 2 和图 3 所示(图 2 为部分样品的检测结果)。两组样品的实验条件完全相同,并经多次反复实验表明,以整只贝为样时的检测灵敏度略低于仅以消化道为样时的灵敏度。推测可能由于病毒的污染剂量很低,且大多聚集在腮、胃和肠道等部位,如果以整只贝为样进行病毒的活化和浓缩,可能因含有更多的 PCR 抑制物而影响了检出率和 PCR 灵敏度。

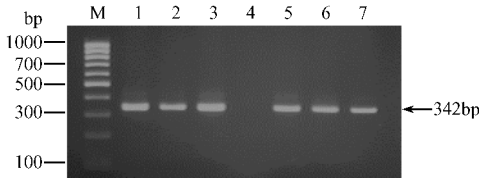


图 2 以消化道为样的检测结果

Fig.2 The detection result of the digestive tissues

### 2.3.2 单管半套式 RT-PCR 与 ELISA 检测结果的比较

以 5 只贝为一个样,共 40 份贝类样本经人工播毒后,取其胃和消化道 1.5g,运用和前面相同的处理方法对样本中的病毒活化浓缩,分别将每份样品梯度稀释至  $10^{-7}$ ,并将各稀释度样本进行 ELISA 检测及抽提病毒 RNA 后进行 RT-PCR 检测。检测结果为:ELISA 和 RT-PCR 的病毒检出个数为 37 和 38 个,检出率为 92.5% 和 95%,最高检测灵敏度为  $10^{-3}$  和  $10^{-6}$ (表 1,图 3),即 RT-PCR 比 ELISA 的灵敏

度高 3 个数量级。用这两种方法对实际样品的检测灵敏度均低于对阳性样本的检测灵敏度,但 RT-PCR 的检测灵敏度总体高于 ELISA 的检测灵敏度。

表 1 ELISA 和 RT-PCR 检测灵敏度的比较

Table 1 The comparison of the detection sensitivity with ELISA and RT-PCR

Serial dilutions of sample	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
ELISA	+	+	+	-	-	-	-
RT-PCR	+	+	+	+	+	+	-

$10^{-1} \sim 10^{-7}$  Serial dilutions of sample; + : Positive; - : Negative.

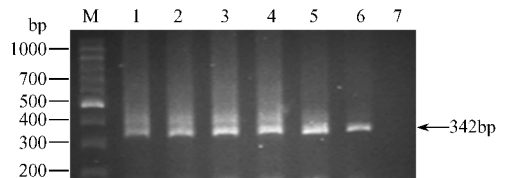


图 3 以消化道为样的检测灵敏度

Fig.3 The detection sensitivity of the digestive tissues

M. 100bp Marker, 1 ~ 7. Dilutions from  $10^{-1}$  to  $10^{-7}$ .

## 3 讨论

由于食用贝类而引起的传染性疾病首次记载于 1894 年美国的伤寒热,此后很长的时期内,由于缺乏合适的检测方法,致使有 15000 起由贝类引起的传染性疾事件,有 50% 的病原不能被确定<sup>[7]</sup>。在 19 世纪 80 年代 PCR 方法建立之前,人们对由贝类引起的病原认识上只局限于鼠伤寒沙门氏菌和甲型肝炎病毒。直至 1990 年 Norwalk 病毒首次被克隆并测序,以及后来建立的 RT-PCR 诊断方法,揭示了轮状病毒、Norwalk 病毒、星状病毒、腺病毒和肠道病毒是污染贝类的重要病原因子,大大减少了不明病因的原发性病例。因此,建立一种灵敏、可靠、快速的贝类中的病毒检测鉴定方法有其必要性。

本研究采用了半套式扩增,且两次扩增之间只需要简单的离心操作,降低了中间操作环节所带来的外源性污染及第一次扩增产物带来的内源性污染,其灵敏度是 RT-PCR 的 10 倍,从核酸水平,即可检测到 10pg 左右的核酸,有时甚至可以达到 1pg。并且缩短了检测所需时间,节约了检测成本。在整个实验过程中,除受到较强的震荡外,没有发现悬浮于管盖内的试剂在开盖、闭盖或整个扩增过程中发生掉落的情况。

目前国内对轮状病毒的检测大多采用 ELISA 检测法,但本实验在对 40 份人工播毒的贝类样本进行检测表明,单管半套式 RT-PCR 的检出率为 95% 及

检测灵敏度为  $10^{-6}$ , 均高于 ELISA 92.5% 的检出率及  $10^{-3}$  的检测灵敏度, 尤其在灵敏度方面, 单管半套式 RT-PCR 检测法明显高于 ELISA 检测法。近年来, 很多不明病因的病毒性疾病连续发生, 不断地建立和发展更为简便的病毒检测、鉴定方法具有重要意义。本实验将单管半套式 RT-PCR 应用于食源性轮状病毒的检测具有很大的实用性和优点, 对食品、临床样本、环境样品中其它病毒的检测具有很好的实用性和应用前景, 也为突发疾病的快速溯源打下了良好的基础。

但仍然存在的问题是样品中存在很多的 PCR 抑制物, 在实际样本的检测中, 单管半套式 RT-PCR 的灵敏度低于以阳性样本的检测灵敏度, 这说明样品中存在 PCR 抑制物。另外, 从实验结果来看, 由于病毒的污染剂量很低, 且大多富集于腮和消化道等部位, 若以整只贝为样进行检测, 可能含有更多的 PCR 抑制物, 使得检出率低于仅以消化道为样时的检出率。本实验虽然在很大程度上提高了 RT-PCR 的检测灵敏度, 但并没有消除抑制物对检测灵敏度的影响, 建立有效的去除 PCR 抑制物的方法可以更进一步提高检测灵敏度。另外, 样品中的杂质对 ELISA 检测的灵敏度是否有影响尚不清楚。因此, 针对存在的问题, 从样品的前处理入手, 建立新的有效的样品前处理方法, 去除样品中的 PCR 抑制物, 可更进一步提高检测灵敏度外, 也可部分解决假阴性的问题。目前, 本研究只做了贝类中轮状病毒的

检测, 而常见的食源性病毒除了轮状病毒外, 还有 Norwalk 病毒、星状病毒、腺病毒、甲肝和肠道病毒等, 因此应在本研究的基础上, 扩大检测范围, 发展多重定量单管半套式 RT-PCR, 实现多种病毒的一次性定量检测。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Kingsley D H, Richard G P. Rapid and efficient extraction method for reverse transcription-PCR detection of hepatitis A and norwalk-like virus in shellfish. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**( 9 ): 4152 - 4157.
- [ 2 ] Rodney M R, James C D, Geodrey D H. Sensitive detection of RNA virus associated with gastroenteritis by a hanging-drop single-tube nested reverse transcription-PCR method. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **40**( 11 ): 4091 - 4099.
- [ 3 ] Le Guyader F, Dubois E, Menard D, et al. Detection of hepatitis A virus, rotavirus and enterovirus in naturally transcription-seminested PCR. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**( 10 ): 3665 - 3671.
- [ 4 ] Pina S, Puig M, Lucena F, et al. Viral pollution in the environmental and in shellfish human Adenovirus detection by PCR as an index of human virus. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**( 9 ): 3376 - 3382.
- [ 5 ] Traore O, Amal C, Mignotte B, et al. Reverse transcriptase PCR detection of Astrovirus, Hepatitis A virus and Poliovirus in experimentally contaminated mussels: comparison of several extraction and concentration methods. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**( 8 ): 3118 - 3122.
- [ 6 ] Carol Shieh Y S, Calci K R, Baric R. A method to detect low levels of enteric virus in contaminated oysters. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**( 11 ): 4709 - 4714.
- [ 7 ] Beuret C, Baumgartner A, Schluep J. Virus-contaminated oyster: a three-month monitoring of oysters imported to Switzerland. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**( 4 ): 2292 - 2297.

## Study on Rotavirus detection with single-tube seminested RT-PCR method in shellfish

KOU Xiao-xia WU Qing-ping\* ZHANG Jv-mei FAN Hong-ying

(<sup>1</sup> Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou 510070, China)

(<sup>2</sup> Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Science, Wuhan 430071, China)

**Abstract**: Being a foodborne virus, Rotavirus was often carried by shellfish. At the present, RT-PCR was the most effective method of Rotavirus detection in shellfish, but its sensitivity was low because of low levels of virus contamination and PCR inhibitors in shellfish. So contaminated shellfish experimentally in laboratory and imitated the natural environment to concentrate Rotavirus, then detected by the developed single-tube seminested RT-PCR. Compared with ELISA and the conventional RT-PCR, the detection sensitivity is improved by 1000 times and 10 times respectively. In addition, the outer and inner contamination is reduced dramatically and the detection time is decreased from 6h to 4.5h. When the whole shellfish and only the digestive tissues of shellfish serve as samples, the detection ratio and sensitivity are more higher when sample is the latter.

**Key words**: Shellfish, Rotavirus, Semi-nested RT-PCR, Foodborne, Detection

Foundation item: Guangdong Provincial Great Science and Technology Item(2002B3100103)

\* Corresponding author. Tel/Fax: 86-20-87688132; E-mail: wuqp@gdas.ac.cn

Received date: 10-25-2004