

实验技术与方法

荧光定量 PCR 与常规 PCR 法检测 G II 型札幌样病毒的比较

曾爱华¹, 金小宝², 朱家勇²

(1. 广东药学院药科学院, 广东 广州 510006; 2. 广东省生物活性药物研究
重点实验室, 广东 广州 510006)

摘要:目的 比较荧光定量 PCR 与常规 RT-PCR 法检测牡蛎中 G II 型札幌样病毒的灵敏度与准确性, 为该病毒检测提供适用的方法。方法 采用荧光定量 PCR 和 RT-PCR 方法, 分别检测牡蛎样品中的 G II 型札幌样病毒。结果 荧光定量 PCR 检测的灵敏度可达 10^2 拷贝/ μl , 札幌样病毒呈阳性的牡蛎有 6 例, 阳性率为 4.72% (6/127); RT-PCR 的灵敏度为 10^3 拷贝/ μl , 札幌样病毒呈阳性的牡蛎有 1 例, 阳性率为 0.79% (1/127)。结论 与 RT-PCR 方法比较, 荧光定量 PCR 是更为敏感准确的方法, 更适用于牡蛎中 G II 型札幌样病毒的检测。

关键词: 牡蛎; G II 型札幌样病毒; 荧光定量 PCR; 常规 RT-PCR

中图分类号: R373.2 文献标识码: B 文章编号: 1004-8456(2012)03-0000-00

Comparison of FQ-PCR and conventional RT-PCR method for the detection of G II SLVs

Zeng Aihua, Jin Xiaobao, Zhu Jiayong

(Pharmacy College of Guangdong Pharmaceutical University, Guangdong Guangzhou 510006, China)

Abstract: Objective To compare the sensitivity and accuracy of FQ-PCR and conventional RT-PCR method for the detection of G II SLVs in oyster. **Methods** G II SLVs in oyster was detected by FQ-PCR and conventional RT-PCR. **Results** The sensitivity for the detection of G II SLVs in oyster samples by FQ-PCR was 10^2 copy/ μl and that by conventional RT-PCR was 10^3 copy/ μl . The positive rate for FQ-PCR was 4.72% (6/127) and that for conventional RT-PCR was 0.79% (1/127) ($P < 0.05$). **Conclusion** FQ-PCR is more suitable for the detection of G II SLV in oyster.

Key words: Oyster; G II SLVs; FQ-PCR; conventional RT-PCR

札幌样病毒(Sapporo-like viruses, SLVs)属于杯状病毒科,能引起人类非菌性急性胃肠炎的暴发流行,主要是通过污染的贝类产品进行传播^[1-2]。札幌样病毒有 G I、G II、G III、G IV、G V 5 个亚型,其中 G II 型 SLVs 危害性较大^[3]。目前,常规 RT-PCR 是检测 SLVs 最常用的方法,但贝类中的札幌样病毒含量较低,难以被检测出来,故国内很少报道^[4]。而荧光定量 PCR 方法具有扩增效率高、结果准确等特点,已被广泛用于病毒和细菌等检测^[5-6]。为此,本研究用荧光定量 PCR、常规 PCR 法同时检测牡蛎中 G II 型札幌样病毒,进行比较分析,得出更适合牡蛎中 G II 型 SLVs 的检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期:2011-12-14

基金项目:广东省科技计划资助项目(2006B36008001)

作者简介:曾爱华 女 副教授 博士 研究方向为生物制药与分子检测 E-mail: zah1025@163.com

通信作者:朱家勇 男 教授 博导

本试验 127 份牡蛎样品采自广州市水产品市场,采样时间为 2007 年 10 月至 2009 年 9 月。GiBCO 公司 Trizol 试剂, TaKaRa 公司的 PrimeScript™ one step RT-PCR 试剂盒,中山大学达安基因公司荧光定量 PCR 反应试剂,美国 ABI Prism7000 荧光定量 PCR 扩增仪。

1.2 引物和探针的设计

针对 G II 型札幌样病毒同源基因序列,用 Bioedit 软件设计引物及探针,由 Invitrogen 公司合成。SLVs 基因引物上游是: rcccaactcaagttgagacayc; 下游是: traccgcagcaaaacahtchc; TaqMan 探针为: FAM-tcagcgtgtrgadcttgcaatgsc-TAMRA。引物和探针序列方向为 5'至 3'; r = a or g; y = c or t; h = a, c or t; d = a, g or t; s = c or g。扩增片段长 116 bp。

1.3 污染了不同浓度札幌样病毒的牡蛎

在人工污染病毒前,先将牡蛎放在流动水中处理 8 h,尽量去除贝类可能携带的污染物。然后将 G II 型 SLVs 阳性质粒按 10 的次方梯度稀释 ($10^6 \sim 10^1$),依次人工污染到贝类中,37 °C 孵育 1 h。

1.4 牡蛎样品中 RNA 提取和 cDNA 合成

参考有关文献检测方法^[7-8],取牡蛎消化道组织,先用 pH9.0 甘氨酸缓冲液快速匀浆 3 min,然后 4 °C 6 000 r/min 离心 30 min,再分别用 8% 和 16% PEG6000 沉淀,最后加入 1 ml 的 Trizol 试剂提取 RNA,灭菌 DEPC 双蒸水溶解 RNA, -70 °C 保存。

1.5 常规 RT-PCR 反应

用 TaKaRa 公司的 PrimeScript™ one step RT-PCR kit 进行常规 RT-PCR 反应。PCR 反应总体积为 50 μl,体系组份为:5 μl 10 × one step RT-PCR Buffer,1 μl dNTP mixture,上下游引物各 20 pmol,3U TaKaRa EX Taq tm HS, 30 ng RNA, 0.5 μl PrimeScript™ RTase, 1 μl RNase inhibitor,用灭菌 dH₂O 补足到 50 μl 体积,反应条件为: 93 °C/40 s、53 °C/30 s、72 °C/45 s,共 35 个循环,72 °C 延伸 10 min。反应完毕后取 5 μl PCR 产物在 2% 的琼脂糖凝胶中电泳鉴定。

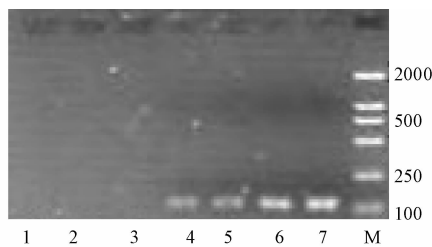
1.6 荧光定量 PCR 反应

在 50 μl 反应体系中,含 5x 定量 PCR buffer 10 μl,上、下游引物分别各 15 pmol/μl,探针 10 pmol/μl,Taq 酶 3U,dNTP 20 pmol/μl 和 100 ng 的 cDNA,将已克隆好的 G II 型 SLVs 质粒模板稀释做荧光定量 PCR 标准曲线,在 ABI Prism7000 型实时检测扩增仪上进行扩增,多次实验优化后确定,G II 型 SLVs 反应条件为: 93 °C 预变性 3 min,93 °C 变性 30 s,53 °C 退火 40 s,共做 40 个循环。检测结果根据扩增曲线由计算机软件自动给出。

2 结果

2.1 常规 RT-PCR 反应的灵敏度

用从人工污染的牡蛎中提取的 G II 型札幌样病毒 RNA 作为模板进行常规 PCR 扩增,重复 3 次。结果显示,10⁴ ~ 10⁶ 拷贝检出率为 3/3,10³ 拷贝检出率为 1/3,10¹ 和 10² 拷贝检出率为 0/3,因此常规 RT-PCR 反应的灵敏度为 10³ 拷贝。产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 1)。



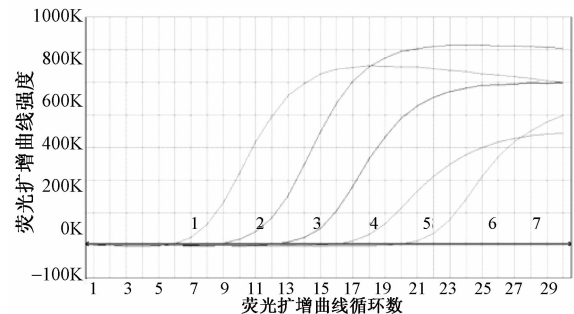
1: 阴性对照; 2-7: 浓度为 10¹ ~ 10⁶ 拷贝/μl 的 G II 型 SLVs; M: DNA 分子量标准 (bp)

图 1 常规 RT-PCR 的凝胶电泳图

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of conventional RT-PCR

2.2 荧光定量 PCR 的灵敏度

用从人工污染的牡蛎中提取的札幌样病毒 RNA 作为模板进行荧光定量 PCR 扩增。结果显示,阴性对照和 10¹ 拷贝/μl 浓度无荧光增长,而 10² 拷贝/μl 以上的浓度均有明显的荧光增长,因此该荧光定量 PCR 的检测灵敏度为 10² 拷贝/μl。



1-6 分别为污染了 10⁶ 到 10¹ 拷贝/μl G II 型 SLVs 的牡蛎类样品; 7 为阴性对照

图 2 牡蛎样品 G II 型 SLVs 的荧光定量 PCR 动力学扩增曲线

Figure 2 Kinetic enrichment curve of FQ-PCR for G II SLVs in oyster

2.3 荧光定量 PCR 及常规 RT-PCR 法检测牡蛎中札幌样病毒的比较

分别用常规 RT-PCR 和荧光定量 PCR 检测了 127 例牡蛎标本。结果显示,常规 RT-PCR 检测为阳性的有 1 例(0.79%),荧光定量 PCR 检测为阳性的有 6 例(4.72%),后者检出率显著高于前者(P < 0.05)。为了验证检测的准确性,随机抽取 3 个荧光定量 PCR 阳性样品,进行序列测定,结果显示全部为 G II 型札幌样病毒。

表 1 荧光定量 PCR 与常规 RT-PCR 检测结果比较

Table 1 Comparison of results for G II SLVs in oyster detected by conventional RT-PCR and FQ-PCR

样本	例数	RT-PCR		FQ-PCR	
		阳性例数	阳性率	阳性例数	阳性率
牡蛎	127	1	0.79%	6	4.72%

3 讨论

在札幌样病毒 5 个基因型中,G I 型、G II 型、G IV 型和 G V 型病毒主要感染人,G III 型病毒主要感染猪,G I 型、G II 型是人类札幌样病毒的主要基因型。其中,G II 型札幌样病毒基因序列多变,既不能进行组织培养,电镜检测不易被发现,又未能建立合适的动物模型^[9-10]。因此,很需要寻找适合 G II 型札幌样病毒快速检测的方法。而荧光定量 PCR 技术比常规 RT-PCR 多使用了一条特异性的双标记荧光探针,不但具有高度的基因扩增效率,而且灵敏度高、特异性好,非常适合浓度低的贝类样品检测^[11-12]。

为此,本实验将浓度为 $10^6 \sim 10^1$ 拷贝的 G II 型 SLVs 阳性质粒污染到牡蛎中,分别进行荧光定量 PCR 和常规 RT-PCR 扩增。结果发现,常规 RT-PCR 最低检测限为 10^3 拷贝数;荧光定量 PCR 法最低检测限则为 10^2 拷贝数,灵敏度比常规 RT-PCR 高 10 倍,而检测方法敏感程度对于浓度较低的札幌样病毒监测是很重要的。

本实验分别用荧光定量 PCR 和常规 RT-PCR 对 127 份牡蛎标本进行 G II 型札幌样病毒检测,结果显示,荧光定量 PCR 检测为阳性的有 6 例,常规 RT-PCR 检测为阳性的有 1 例,前者检出率显著高于后者。因此荧光定量 PCR 法是更适合牡蛎中 G II 型札幌样病毒快速检测的方法。

参考文献

- [1] VINJÉ J, DEIJL H, van der HEIDE R, et al. Molecular detection and epidemiology of Sapporo-like viruses[J]. J Clin Microbiol, 2000,38(2):530-536.
- [2] NAKAGAWA-OKAMOTO R, ARITA-NISHIDA T, TODA S, et al. Detection of multiple sapovirus genotypes and genogroups in oyster-associated outbreaks[J]. Jpn J Infect Dis, 2009, 62(1): 63-66.
- [3] 方肇寅,谢华萍,吕红霞,等. 1999~2005 年我国婴幼儿人杯状病毒腹泻研究[J]. 病毒学报,2007,23(1):9-15.
- [4] ATMAR R L, NEILL F H, LE GUYADER F S. Detection of human caliciviruses in fecal samples by RT-PCR[J]. Methods Mol Biol,2011,665:39-50.
- [5] 唐振柱,孙贵娟,黄彦,等. 实时荧光 PCR 在食源性致病菌监测中的应用研究[J]. 中国食品卫生杂志,2011,22(4): 332-335.
- [6] PÉREZ-SAUTU U, GUIX S, PINTÓ R M, et al. Quantification and genotyping of human sapoviruses in the Llobregat river catchment, Spain[J]. Appl Environ Microbiol, 2011,77(3): 1111-1114.
- [7] UEKI Y, SHOJI M, OKIMURA Y, et al. Detection of Sapovirus in oysters[J]. Microbiol Immunol,2010,54(8):483-486.
- [8] KINGSLEY D H. An RNA extraction protocol for shellfish-borne viruses[J]. J Virol Methods,2007,141(1): 58-62.
- [9] JIANG X, HUANG P W, ZHONG W M, et al. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR [J]. J Virol Methods, 1999,83(1-2): 145-154.
- [10] KITAJIMA M, HARAMOTO E, PHANUWAN C, et al. Genotype distribution of human sapoviruses in waste water in Japan[J]. Appl Environ Microbiol, 2011,77(12): 4226-4229.
- [11] SUFFREDINI E, PEPE T, VENTRONE I, et al. Norovirus detection in shellfish using two Real-Time RT-PCR methods[J]. New Microbiol,2011,34(1):9-16.
- [12] SHIGEMOTO N, FUKUDA S, TANIZAWA Y, et al. Detection of norovirus, sapovirus, and human astrovirus in fecal specimens using a multiplex reverse transcription-PCR with fluorescent dye-labeled primers[J]. Microbiol Immunol,2011,55(5):369-372.

实验技术与方法

固相萃取-高效液相色谱法同时测定食品中 12 种合成色素

奚星林,邵仕萍,徐娟,邹志飞,吴宏中

(广东检验检疫技术中心,广东 广州 510623)

摘要:目的 建立一种固相萃取-高效液相色谱法同时测定食品中 12 种合成色素(柠檬黄、亮黑、日落黄、诱惑红、坚牢绿、丽春红 2R、荧光素钠、丽春红 3R、专利蓝、金黄粉、荧光桃红、孟加拉玫瑰红)。方法 改进 GB/T 5009.35—2003《食品中人工合成着色剂的测定方法》试样处理方法,使用 100~200 目聚酰胺固相萃取柱对样品进行净化、浓缩,以甲醇-0.02 mol/L 乙酸铵溶液为流动相,梯度洗脱,多波长检测定量。结果 线性范围分别为:柠檬黄、亮黑、日落黄、诱惑红、坚牢绿、丽春红 3R、专利蓝、金黄粉、荧光桃红 0.1~30.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$,丽春红 2R 1.0~30.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$,荧光素钠 0.5~30.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$,孟加拉玫瑰红 2.0~30.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。12 种合成色素的线性关系良好,相关系数 0.999 3~0.999 9,回收率 89.1%~100.4%,RSD 1.6%~8.2%,检出限为 0.58~3.0 mg/kg。结论 该方法简便、快捷、灵敏度高、准确性强、重现性好,适用于食品中 12 种合成色素的定量分析。

关键词:合成色素;高效液相色谱法;固相萃取;食品

中图分类号:TS202;O657.72 **文献标识码:**B **文章编号:**1004-8456(2012)03-0000-00

收稿日期:2012-01-18

基金项目:中国检验检疫科学院基本科研业务费专项基金资助项目(2009JK011);广东省科技基础条件建设项目(粤科财字[2008]658, [2010]185)

作者简介:奚星林 男 高级工程师 研究方向为食品添加剂检测和放射性检测 E-mail:ciqxxl@163.com