

水体中诺瓦克病毒 RT-PCR 检测研究*

寇晓霞^{1 2 3} 吴清平^{2* *} 范宏英² 张菊梅²

(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071) (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)

(中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要 :诺瓦克病毒是公认的食物性或水源性非细菌性胃肠炎的主要致病因子之一。建立诺瓦克病毒的 RT-PCR 检测方法,验证其特异性及灵敏度,并在实验室人工污染水样,进行模拟水样的检测,验证 RT-PCR 检测方法的实用性。所用引物为 RNA 多聚酶区的 JV12/JV13,多次反复实验,均可产生 327bp 预期大小的特异条带,并通过杂交进一步证实了其特异性和正确性。在临床粪样中,可达到的最高检测限为 50pg/mL。在共 42 份模拟样品的检测中,经过播毒、富集和浓缩,38 份均可检出诺瓦克病毒。其中 4 份池塘水未检出。在模拟水样中的检测灵敏度为 200pg/mL。实验中所建立的试验条件和体系可用于实际水样中诺瓦克病毒的筛选,对水质控制起到了很好的监控作用。

关键词 :诺瓦克病毒,水,检测,RT-PCR,水源性,食源性

中图分类号:Q939.4 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)04-0650-04

Detection of Norovirus in Water by RT-PCR*

KOU Xiao-Xia^{1 2 3} WU Qing-Ping^{2* *} FAN Hong-Ying² ZHANG Ju-Mei²

(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Science, Wuhan 430071)

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070)

(Graduate University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049)

Abstract :Norovirus is recognized as one of the major cause agents of foodborne or waterborne non-bacterial gastroenteritis. The development of RT-PCR for detection of norovirus in fecal samples, and then the potential usefulness of the assay were confirmed for detection of water samples which were contaminated by norovirus in experiment circumstance. The specificity and sensitivity were also evaluated in the assay. The anticipated band of 327bp were obtained when the primer set of JV12/JV13 were used, which targeting RNA dependent polymerase. The specific amplicons were further confirmed by southern hybridization and the same results obtained after many repeats. The detection limits were 50pg/mL in fecal samples, and 200pg/mL in artificially contaminated water samples. In a total of 42 experimentally contaminated water samples, 38 samples were positive for norovirus and 4 pond water samples were negative. The results may stem from unrecovery of norovirus and the inhibitors in these water samples. The assay developed in this study can be applied to screening norovirus in water, and can attribute to the control of water quality.

Key words :Norovirus, Water, Detection, RT-PCR, Waterborne, Foodborne

诺瓦克病毒(Norovirus, NV),以前称诺瓦克样病毒(Norwalk-Like virus)或小圆结构病毒(small round structured virus),是裸露的单链 RNA 病毒。目前被认为是世界范围内流行性、非细菌胃肠炎暴发的主要原因,也是最广泛通过食源性或水源性引起非细菌胃肠炎的病毒因子^[1,2]。诺瓦克病毒能感染所有年龄段的人,病毒感染者及其携带者的粪便中

含有大量的病毒粒子,每克粪便中含有 $10^8 \sim 10^{10}$ 个病毒粒子。在容易受到粪便污染的河水、娱乐水、海水及其养殖场的水都存在被病毒污染的可能。在大多研究中,由于贝类被公认为该病毒的高危传播载体,对于该病毒都集中于贝类的检测,而对水体及其它环境样本的检测研究很少。病毒是严格的细胞内生物,虽然在环境中不复制,但是由于其

* 广东省重大科技攻关项目(No. 2002B3100103)

** 通讯作者 Tel/Fax 020-87688132, E-mail: dikangzhang@yahoo.com.cn

收稿日期 2006-06-06, 修回日期 2006-08-24

具有很强的理化抗性,感染剂量非常低,在环境中能存活很长时间。研究表明,甲型肝炎病毒在水中一个月后仍然具有活性,因此仍然对人类健康存在很大威胁。但是由于水体样本体积大,而病毒浓度很低,所以给病毒检测带来很大难度。

目前,水质评估标准都是以粪大肠菌群为指示菌,但是很多的研究表明,细菌指示物并不能有效地指示水中病毒污染的情况。因此,建立有效的水中病毒的检测方法,对水源性病毒病的暴发可以有效的预警,保障人类健康。由于没有合适的动物模型和细胞系用于诺瓦克病毒的培养和分离,目前用于诺瓦克病毒的检测方法主要有电镜及 RT-PCR。但是电镜检测的灵敏度比较低,还不能直接应用于环境样本中病毒的检测,并且操作繁琐、成本较高。RT-PCR 由于其高灵敏度和特异性,目前被公认为是用于环境样本中诺瓦克病毒检测的最好方法。本研究的主要目的即是运用 RT-PCR 法建立水中诺瓦克病毒的检测方法,并将其运用于实际水样的检测中,验证该方法的有效性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 粪便样本: 诺瓦克病毒阳性粪便样本由广东省疾病预防控制中心李晖博士提供。用 pH7.4 的 PBS 稀释成 10% 的悬液,4℃、10000r/min 离心取上清,0.22 μ m 的无菌滤膜过滤除菌后,-20℃保存待用。

1.1.2 试剂: TRIzol 试剂盒购自 Gibco 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;引物由北京赛百盛公司合成。

1.2 RNA 抽提

用 Gibco 公司生产的 TRIzol 试剂盒抽提病毒 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 引物和探针

以诺瓦克病毒 RNA 多聚酶高度保守区段为靶序列,用引物 JV12/JV13 扩增诺瓦克病毒^[3,4]。上游引物 JV12 的序列为 5' ATACCACTATGATGCAGATTA 3';下游引物 JV13 的序列为:5' TCATCATCACC-ATAGAAAGAG 3'。杂交中所用探针序列为 5' GAATTCCATCGCCC ACTGGCT 3'。

1.4 一步法 RT-PCR

RT 和 PCR 一步完成。反应体系为 2.5 μ L 10 \times PCR buffer、300 μ mol/L dNTP、20U RNasin、引物各 0.5 μ mol/L、MLV 200U、TaqE 1.5U、MgCl₂ 3.5mmol/L、RNA 模板 2.5 μ L,加水至 25 μ L,42℃ 30min 合成第一链 cDNA;紧接着 94℃ 5min,94℃ 40s,37℃ 50s,72℃ 40s,循环 30 次,72℃ 10min。

1.5 电泳

扩增产物用 1.4% 的琼脂糖凝胶直接进行电泳,在紫外成像系统中观察结果,与 100bp 标准分子量对照,诺瓦克病毒扩增的预期条带为 327bp。

1.6 Southern 杂交验证特异性

为进一步确证 PCR 产物正确,用诺瓦克病毒特异性探针进行 Southern 杂交。紫外成像系统观察后,将胶用水冲洗,上毛细管转移法将 PCR 产物转移至正电荷尼龙膜。在紫外交联仪里交联并在 80℃ 真空炉中干燥固定 2h 后进行预杂交和杂交^[5]。所用探针浓度为 50nmol/L,抗体浓度为 1:10000。杂交用发光法检测,发光底物购于罗氏公司。

1.7 点杂交验证灵敏度

将诺瓦克病毒的 RNA 经过 10 倍梯度系列稀释后作为模板,按照上述经优化的反应体系和扩增条件进行扩增。将各产物进行点杂交,验证其灵敏度。扩增阳性结果所对应的最高稀释度即为检测灵敏度。斑点杂交不用转膜,直接将 10 μ L 扩增产物点在尼龙膜上,其它步骤同 1.6。

1.8 模拟水样检测

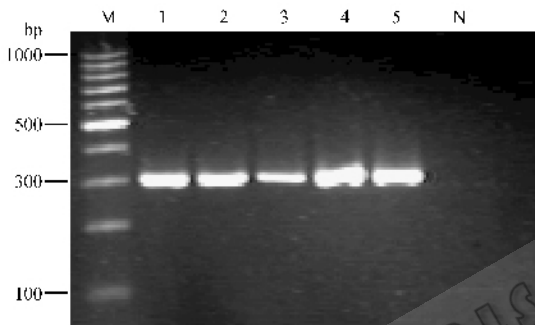
1.8.1 水样的收集: 实验所用水样包括 22 份自来水和 20 份养殖池塘水。每份水样的取样量为 1L。所有的水样用 0.22 μ m 的滤膜过滤,去除水样中的真菌和细菌后,置于 4℃ 保存待用。

1.8.2 人工播毒和浓缩处理^[6,7]: 取 1L 水样,接种 1mL 诺瓦克病毒粪便稀释液。病毒的浓缩活化过程是:用 47mm,0.45 μ m 的正电荷滤膜对水样进行过滤,吸附病毒;用 pH9.0 的 3% 牛肉抽提物-0.05mol/L 甘氨酸洗滤膜,将滤器上的病毒洗下来;然后用 1mol/L 的 HCl 将洗提液的 pH 值调到 7.0~7.4,涡旋振荡 15min。然后在 4℃ 下,7000r/min 离心 30min 后,将沉淀溶于 0.15mol/L Na₂HPO₄ 和等量的 Freon 试剂混合,涡旋振荡 5min,5000r/min 离心 10min,取上清用于 RT-PCR 检测。病毒核酸的提

取同 1.2。同样,将所抽提的 RNA 进行 10 倍梯度稀释,确定检测灵敏度。共设 6 个稀释度,所对应的 RNA 量依次为 $2\mu\text{g}$ $0.2\mu\text{g}$ 20ng 2ng 200pg 20pg 。

1.9 质量控制和对照

所有样品的处理、RNA 抽提都是在单独的操作间进行。移液器专门用于 RNA 的操作,所用枪头无 DNase 和 RNase,所有试剂及玻璃器皿均经过 0.1% DEPC 水处理,以确保实验不受外源性或内源性的 DNase 及 RNase 污染。每个实验都设立了阴性对照,阴性对照是以无菌水做为模板,其它反应体系和条件均和测试样相同。每个实验都同时做 3 个重复,以验证实验的正确性和可重复性。



2 结果

2.1 特异性

经过反复的优化,实验中最终确定的反应体系、条件及其所选用引物的特异性,通过电泳和 Southern 杂交得到了很好的证明(图 1)。在电泳凝胶上,得到了与预期条带大小相同的 327bp 的特异带,没有非特异带生成。在阴性对照中也无任何其它条带产生。其特异性通过 Southern 杂交得到了进一步的证实,所有的阳性扩增产物均出现了很强的杂交信号。

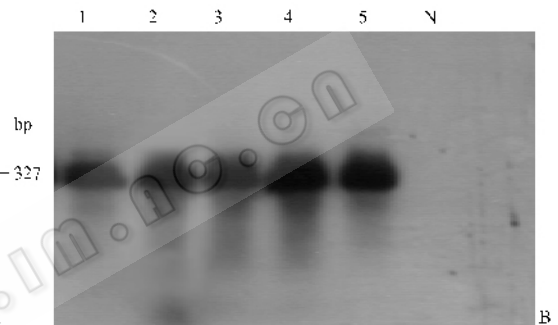


图 1 RT-PCR 电泳结果(A)和 Southern 杂交验证(B)

M 100bp marker, N 阴性对照, 1~5 以粪便样本中诺瓦克病毒 RNA 为模板的 5 个重复

2.2 灵敏度

检测灵敏度通过检测 RNA 的系列稀释度确立。实验中设立 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 共 6 个稀释度,经过换算,所对应的核酸量依次为 $0.5\mu\text{g}$ 、 50ng 、 5ng 、 0.5ng 、 50pg 、 5pg ,对 6 个稀释度同时进行 RT-PCR 检测(图 2)并进行点杂交验证其灵敏度。将可检测到杂交信号的最高核酸稀释浓度作为最高的检测灵敏度,所在的实验环境和方法完全相同,每个稀释度同时做 3 个重复。并在多次实验后,得到可重现的稳定结果是,最高检测限可达到 10^{-5} ,即可检测到的 RNA 为

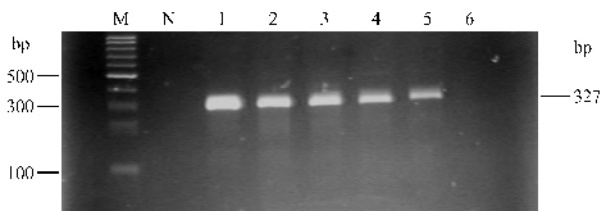


图 2 粪样中诺瓦克病毒 RT-PCR 检测灵敏度电泳结果

M 100bp DNA marker, N 阴性对照, 1~6 依次为 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 的诺瓦克病毒 RNA 为模板

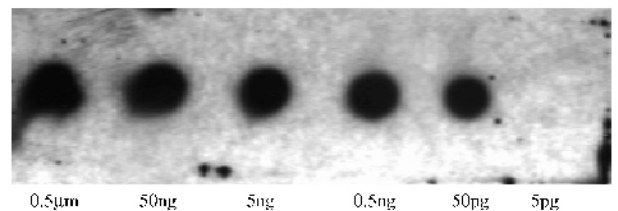


图 3 点杂交验证 RT-PCR 灵敏度

50pg,如图 3 所示。

2.3 水样检测结果

经检测水样共 42 份,所有的水样用相同的方法进行处理和富集,只有其中 4 份养殖池塘水未检出有诺瓦克病毒,其余 38 份水样均检出了诺瓦克病毒。同样按照上述方法对实际样品的检测灵敏度进行了测定。结果(图 4)表明,用 RT-PCR 对经过人工播毒的水样进行检测,最高灵敏度为 200pg 。比粪便样本的检测灵敏度低。

3 讨论

近年来,由于饮用水受污染引起的疾病暴发时

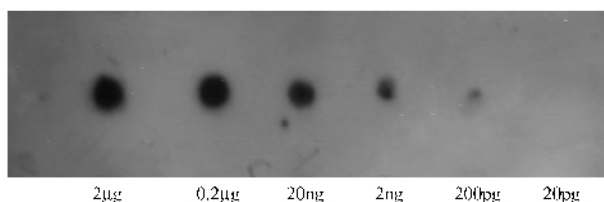


图4 点杂交验证水样中诺瓦克病毒的
RT-PCR 检测灵敏度

有报道。保障生活用水免受致病菌及病毒污染对人类健康至关重要。目前,我国对诺瓦克等一系列食源性病毒的诊断大多只限于临床研究。对环境样本、食品、水产、各种水体中病毒的污染情况了解相对很少,而这些样本都具有一个共同的特征,即含有大量 PCR 抑制物,使 PCR 方法的应用受到很大的限制,这也是 RT-PCR 法应用于临床样本的检测研究较多,而在其它方面应用较少的一个重要原因。国外很多研究表明,即使在卫生条件非常好的国家,因饮用水处理不当引起的诺瓦克病毒、甲型肝炎病毒等水源性疾病的暴发非常多^[8,9]。近年来,全国各地均有较大规模的诺瓦克病毒腹泻发生。而目前对于诺瓦克病毒感染的渠道仍然不是很清楚。北京出入境检验检疫局^[10]和中国海洋大学食品安全实验室^[11]建立了贝类中的诺瓦克病毒的检测方法,这是我国首次除临床样本以外的环境样本进行诺瓦克病毒的监测研究。

诺瓦克病毒还可通过电镜观察进行检测。但是电镜检测的灵敏度相对较低,而且诺瓦克病毒在电镜下缺乏显著的形态特征,因此,电镜法不能应用于常规检测中环境样本病毒的筛选和检测,而且由于诺瓦克病毒至今没有敏感的细胞系或小动物模型用于培养。因此,自从其基因组的全序列被成功克隆、测序后,PCR 由于其高特异性和灵敏度,日益成为研究、检测诺瓦克病毒的主要方法。

对于任何一种检测方法的应用,特异性和灵敏度是最需要考察的重要参数。本实验中,扩增产物的特异性通过杂交,很好的证明了所建立的实验方法、体系、条件及其所选用的引物特异性。在杂交膜上,对应于预期扩增条带的位置有很强的杂交信号产生。另外,由于水体及各种环境样本中的病毒含量都很低,在粪便样本和人工污染的水样中,RT-PCR 的检测灵敏度通过点杂交得到了进一步验

证。实验中,粪便样本的检测灵敏度可达 50pg/mL。但当其应用于水样时,灵敏度降低至 200pg/mL。并在 42 份水样的检测中,20 份自来水样经人工播毒、浓缩富集、提取核酸的过程后,全部检测到诺瓦克病毒阳性,但在 22 份养殖池塘水的检测中,有 4 份水样未能检出诺瓦克病毒,造成灵敏度的降低。4 份样品未能检出目标病毒的原因可能有两方面,一是在人工播毒后,病毒未能全部有效的浓缩富集,使本来含量很低的病毒变得更低,不能有效提取病毒的 RNA,致使模板低于方法的检测限;二是由于水体中本身含有其它的 PCR 抑制物,对 PCR 灵敏度有影响。因此,进一步的优化病毒的富集方法,提高检测灵敏度,以确保最大范围的检测病毒样本是必须的。

总体来说,本研究建立的方法对食源性及水源性诺瓦克病毒的检测和诊断有很大帮助。在进一步提高灵敏度的基础上,调查各种实际水体中,尤其是浅海区、贝类养殖水体、娱乐场用水等易于受粪便污染的水体中诺瓦克病毒的污染情况,对于防止水源性诺瓦克病毒的暴发有重要的预警作用。

参考文献

- [1] Koopmans M, Von Bonsdorff, C H, Vinje J, *et al.* FEMS Microbiol Rev, 2002, **26**(2): 187 ~ 205.
- [2] 吴清平,寇晓霞,张菊梅.微生物学通报,2004, **31**(3): 101 ~ 105.
- [3] Vinje J, and Koopmans M. J Infect Dis, 1996, **174**(3): 610 ~ 615.
- [4] Koopmans M, De Bruin E, Vennema H. J Clin Virol, 2002, **25**(2): 233 ~ 236.
- [5] Hot D, Legeay O, Jacques J, *et al.* Water Res, 2003, **37**(19): 4703 ~ 4710.
- [6] Brassard J, Seyer K, Houde A, *et al.* J Virol Methods, **123**(2): 163 ~ 169.
- [7] Abbaszadegan M, Stewart P, Lechevallier M. Appl Environ Microbiol, 1999, **65**(2): 444 ~ 449.
- [8] Berg H, Lodder W, Poel W, *et al.* Res Microbiol, 2005, **156**(4): 532 ~ 540.
- [9] Wyn-Jones A P, Pallin R, Dedoussis C, *et al.* J Virol Methods, 2000, **87**(1): 99 ~ 107.
- [10] 陈广全,饶红,张惠媛,等.食品与发酵工业,2004, **30**(12): 106 ~ 111.
- [11] 汪俊,薛长湖,李兆杰,等.中国水产科学,2004, **11**(6): 525 ~ 530.