

文章编号: 1674-5566(2021)02-0239-08

DOI:10.12024/jsou.20200302944

## 牡蛎中 G II 型诺如病毒巢式 RT-PCR 检测方法的优化与评价

贾添慧<sup>1</sup>, 董 蕾<sup>1</sup>, 王永杰<sup>1,2</sup>, 喻勇新<sup>1,2</sup>

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 农业农村部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室, 上海 201306)

**摘 要:** 为了解决目前巢式 PCR 法检测牡蛎样品中 G II 型诺如病毒时存在的非特异性扩增、假阴性等问题, 对 NCBI 数据库中在线获得的所有 G II 型诺如病毒序列进行系统分析, 重新设计出针对 G II 型诺如病毒检测的通用型巢式 PCR 引物(NG2OF/NG2OR), 并从基因型覆盖度、特异性、灵敏度和实际样品检测的稳定性几个方面对新设计的引物进行评估。结果显示: 新引物的特异性好, 只对 G II 型诺如病毒进行有效扩增, 且不受牡蛎样品本底的影响; 新引物灵敏度高, 最低可检测至 26.4 个拷贝; 在对 92 个牡蛎样品进行检测时, 新引物的阳性检出率为 28.3%, 比经典引物高出 7.5%。因此, 新建立的 G II 型诺如病毒巢式 PCR 检测方法在检测牡蛎样品时特异性更强, 灵敏度更高, 为牡蛎中诺如病毒的检测提供了一种新的、可靠的技术手段。

**关键词:** 牡蛎; G II 型诺如病毒; 巢式 RFPCR; 特异性; 阳性率

**中图分类号:** S 917      **文献标志码:** A

诺如病毒(norovirus)属于杯状病毒科(Caliciviridae)诺如病毒属(*Norovirus*), 目前, 诺如病毒可分为 10 个基因群(G I -G X), 其中 G II 型是引起人类急性肠胃炎的主要病因, 包括至少 27 种不同的基因型<sup>[1-2]</sup>。在 2006—2016 年间, 中国地区有超过 132 起(8 133 例)诺如病毒疫情的暴发, 其中 82% 的案例都是由 G II 型诺如病毒引起, 造成了严重的医疗负担和经济损失<sup>[3]</sup>。牡蛎是诺如病毒在环境中流行和传播的重要载体<sup>[4]</sup>。诺如病毒相关的临床疫情通常与消费受污染的牡蛎有关<sup>[5-6]</sup>。大量研究证实, 超过 80% 的人诺如病毒基因型存在于牡蛎中<sup>[7]</sup>。因此, 牡蛎中诺如病毒的快速、准确的检测将有利于相关环境的监测和疾病的防控。

巢式 RT-PCR 又称为嵌套式 RT-PCR, 是在 RT-PCR 基础上发展而来, 使用 2 对引物对目的片段进行扩增, 具有灵敏度高, 特异性强等优点, 在人<sup>[8]</sup>和水产品<sup>[9]</sup>病原生物的检测上已得到广泛的应用。自 2002 年以来, KAGEYAMA 等<sup>[5]</sup>、KOJIMA 等<sup>[10]</sup>和 NISHIDA 等<sup>[11]</sup>针对诺如病毒衣

壳蛋白基因(VP1)设计了 2 对引物(COG2F/G2SKR, G2SKF/G2SKR), 被广泛用于诺如病毒的分型与检测。然而, 近年来越来越多的研究发现在检测牡蛎中的诺如病毒时, 该方法经常出现大小不一的非特异性 PCR 产物, 而后续的测序结果证实这些序列多源于牡蛎本身或其肠道细菌的基因<sup>[12]</sup>, 表明现有的巢式 PCR 方法在应用于牡蛎中诺如病毒的检测时容易受到样品本底的影响, 特异性差, 造成假阳性等结果。诺如病毒基因组极易变异且基因重组频繁发生<sup>[2]</sup>, 因此, 现有的 PCR 引物因基因型覆盖度不够还会出现假阴性等情况<sup>[12-13]</sup>。

针对上述问题, 本研究基于现有公共数据库(NCBI GenBank)中所有的 G II 型诺如病毒的序列, 重新设计了针对 G II 型诺如病毒的通用型巢式 RT-PCR 引物并通过牡蛎样品的实际检测对其特异性、灵敏度和稳定性 3 个方面进行了系统的评估, 并与旧引物进行了对比<sup>[12]</sup>, 为用于牡蛎中 G II 型诺如病毒的检测提供一种可靠的技术手段。

收稿日期: 2020-03-02      修回日期: 2020-04-16

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项(2017YFC1600703); 国家自然科学基金(31601570)

作者简介: 贾添慧(1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食源性病毒。E-mail: 710242668@qq.com

通信作者: 喻勇新, E-mail: yxyu@shou.edu.cn

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要试剂及仪器

#### 1.1.1 实验试剂

动物组织总 RNA 提取试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司; RNA 稳定和储存溶液 RNAlater、病毒 RNA 提取试剂盒购自上海翊瑞生物科技有限公司; 一步法反转录 PCR 试剂盒、PCR Master Mix 购自宝生物工程(大连)有限公司; 100 bp DNA Ladder 购自天根生化科技(北京)有限公司和上海奈彻生物科技有限公司。

#### 1.1.2 实验样品及预处理

实验所用太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)购自上海市芦潮港海鲜市场(长 10~12 cm、宽 6~8 cm)。解剖牡蛎的消化腺组织后分装成 50~100 mg 每管,保存在 RNA 保护剂中并冻于 -80 °C 冰箱。中国疾病预防控制中心(以下简称中国 CDC)提供的诺如病毒 G II 型阳性粪便样品(G II.3, G II.4, G II.6, G II.12, G II.6[P7], G II.2[P16]和 G II.17),经实验室测序验证后,保存于 -80 °C 冰箱。

#### 1.1.3 实验仪器

AC2-4S1-CN 生物安全柜、ACB-4A1 超净工

作台购自新加坡艺思高科技有限公司(ESCO); FastPre-24 MP 组织均质器购自 MP Biomedicals(美国); 5331 PCR 仪、5382000074 恒温混匀金属浴、5702R 台式低温离心机购自艾本德中国有限公司(Eppendorf); PowerPac HC 电泳仪、ChemiDoc XRS+ 凝胶成像系统和凝胶成像分析仪购自伯乐生命医学产品(上海)有限公司(Bio-Rad)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 引物设计与合成

根据 GUO 等<sup>[12]</sup>的研究经验,首先,建立了 1 个用于引物设计的本地数据库,其中包含了从 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)下载的在线能得到的所有 G II 型诺如病毒的序列,用诺如病毒基因分型工具(<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool>)对其进行基因分型,并按照基因型进行分组。利用生物信息学软件 Geneious Prime 进行序列比对分析,基于保守区域的序列设计出针对 G II 型诺如病毒的通用型引物,并通过 NCBI 上 nr 库的 Primer Blast 工具评估新引物的特异性。所设计 G II 型诺如病毒的巢式 RT-PCR 通用型新引物及旧引物合成于上海生工生物有限公司,序列如表 1 所示。

表 1 巢式 RT-PCR 的引物组合

Tab.1 Primer combination of nested RT-PCR

引物 Primers	引物核酸序列(5'→3') Sequence (5'→3')	位点 <sup>a</sup> Nucleotide	参考 Reference
COG2F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	5 003	[5, 10-11]
G2SKR	CCRCCNGCATRHCCRTRTACAT	5 389	
G2SKF	CNTGGGAGGGCGATCGCAA	5 046	
G2SKR	CCRCCNGCATRHCCRTRTACAT	5 389	
COG2F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	5 003	本研究
NG2OR	CCNGCATRVCCRTRTACAT	5 386	
NG2OF	GGAGGGCGATCGCAATCT	5 050	
NG2OR	CCNGCATRVCCRTRTACAT	5 386	

注:a 为引物 5'端在序列 X86557 的位置。简并引物中的加粗的碱基为混合碱基;R 表示 A 或 G;B 示 C 或 G 或 T;N 表示 A 或 G 或 C 或 T;Y 表示 C 或 T;H 表示 A 或 C 或 T;V 表示 A 或 G 或 C。

Notes: a Nucleotide position for 5' of primers, and numbers refer to sequence X86557. Mixed bases were shown bold in degenerate primers; R for A or G; B for C or G or T; N for A or G or C or T; Y for C or T; H for A or C or T; V for A or G or C.

#### 1.2.2 实际样品 RNA 的提取

牡蛎中总 RNA 的提取:取 1 管牡蛎消化腺组织用 MP 组织均质器打成匀浆,按照动物组织总 RNA 提取试剂盒说明书提取牡蛎消化腺的总 RNA,直接作为 RT-PCR 的模板使用。

粪便中病毒 RNA 的提取:按照病毒 RNA 提

取试剂盒说明书提取粪便中的病毒 RNA,直接作为 RT-PCR 的模板使用。

#### 1.2.3 旧巢式 RT-PCR 反应

旧巢式 RT-PCR 法(COG2F/G2SKR, G2SKF/G2SKR,以下简称 G2SKF/G2SKR)分为 RT-PCR 和第 2 轮 PCR。将所提取的实际样品的 RNA 作

为模板进行 RT-PCR 反应,RT-PCR 反应体系共 25  $\mu\text{L}$ ,含  $2 \times 1$  Buffer 12.5  $\mu\text{L}$ ,COG2F 1  $\mu\text{L}$ ,G2SKR 1  $\mu\text{L}$ ,Enzyme Mix 1  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 8.5  $\mu\text{L}$ ,模板 1  $\mu\text{L}$ 。

反应程序:50  $^{\circ}\text{C}$  反转录 30 min,94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min,94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,55  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s,30 个循环。

将第 1 轮产物稀释 10 倍作为模板进行第 2 轮 PCR 反应,第 2 轮 PCR 反应体系共 25  $\mu\text{L}$ ,含 PCR Mix 12.5  $\mu\text{L}$ ,G2SKF 1  $\mu\text{L}$ ,G2SKR 1  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu\text{L}$ ,模板 1  $\mu\text{L}$ 。

反应程序:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min,94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,55  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s,35 个循环,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min。两轮 PCR 扩增结束后用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

#### 1.2.4 新巢式 RT-PCR 反应

新巢式 RT-PCR 法 (COG2F/NG2OR,NG2OF/NG2OR,以下简称 NG2OF/NG2OR)分为 RT-PCR 和第 2 轮 PCR。将所提取的实际样品的 RNA 作为模板进行 RT-PCR 反应,RT-PCR 反应体系共 25  $\mu\text{L}$ ,含  $2 \times 1$  Buffer 12.5  $\mu\text{L}$ ,COG2F 1  $\mu\text{L}$ ,NG2OR 1  $\mu\text{L}$ ,Enzyme Mix 1  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 8.5  $\mu\text{L}$ ,模板 1  $\mu\text{L}$ 。

反应程序:50  $^{\circ}\text{C}$  反转录 30 min,94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min,94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,55  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s,30 个循环。

将第 1 轮产物稀释 10 倍作为模板进行第 2 轮 PCR 反应,第 2 轮 PCR 反应体系共 25  $\mu\text{L}$ ,含 PCR Mix 12.5  $\mu\text{L}$ ,NG2OF 1  $\mu\text{L}$ ,NG2OR 1  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu\text{L}$ ,模板 1  $\mu\text{L}$ 。

反应程序:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min,94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,55  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s,35 个循环,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min。两轮 PCR 扩增结束后用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

#### 1.2.5 覆盖度评估

采用由中国 CDC 提供的 G II 型诺如病毒阳性粪便样品(G II.3, G II.4, G II.6, G II.12, G II.6[P7], G II.2[P16]和 G II.17),分别用旧引物(G2SKF/G2SKR)和新引物(NG2OF/NG2OR)按照 1.2.3 节和 1.2.4 节中反应体系及条件进行巢式 RT-PCR 扩增和电泳检测。

#### 1.2.6 特异性评估

采用由实验室前期得到的有非特异性扩增

现象的牡蛎样品(背景对照)和 G I 型诺如病毒阳性的牡蛎样品(背景对照和阴性对照),分别用旧引物(G2SKF/G2SKR)和新引物(NG2OF/NG2OR)按照 1.2.3 节和 1.2.4 节中反应体系及条件进行巢式 RT-PCR 扩增和电泳检测。

#### 1.2.7 灵敏度评估

采用随机选取的 3 个 G II 型诺如病毒阳性且已知浓度的牡蛎 RNA(分别为  $9.32 \times 10^3$ 、 $2.64 \times 10^4$ 、 $5.79 \times 10^4$  拷贝/ $\mu\text{L}$ )和它们的 10 倍梯度稀释液作为模板<sup>[14]</sup>,分别用旧引物(G2SKF/G2SKR)和新引物(NG2OF/NG2OR)按照 1.2.3 节和 1.2.4 节中反应体系及条件进行巢式 RT-PCR 扩增和电泳检测。

#### 1.2.8 实际样品检测

采用 92 只新鲜采集的牡蛎样品,分别用旧引物(G2SKF/G2SKR)和新引物(NG2OF/NG2OR)按照 1.2.3 节和 1.2.4 节中反应体系及条件进行巢式 RT-PCR 扩增和电泳检测。

## 2 结果

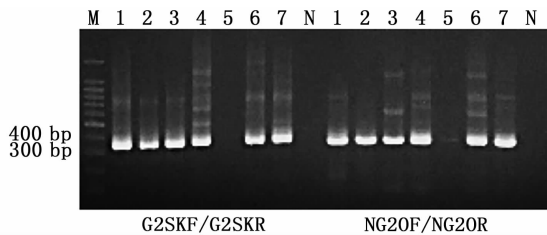
### 2.1 引物设计

本地数据库中包含了在线下载的共 29 784 条(截至 2017 年 12 月 31 日)G II 诺如病毒序列。小于 1 000 nt (nucleotide)的序列通常位于 P 区(protruding domain),保守性差,不适合用于引物设计,因而被筛除。因此,共得到 6 419 条长度为 1 000 ~ 7 627 nt 的序列,将其进行基因分型,得到 44 条 G II.1,241 条 G II.2,359 条 G II.3,3 561 条 G II.4,31 条 G II.5,104 条 G II.6,147 条 G II.7,8 条 G II.8,5 条 G II.9,10 条 G II.10,8 条 G II.11,227 条 G II.12,76 条 G II.13,186 条 G II.14,6 条 G II.15,352 条 G II.16,796 条 G II.17,8 条 G II.18,8 条 G II.19,12 条 G II.20,186 条 G II.21,39 条 G II.22 和 5 条 G II.23 序列。用生物信息学软件 Geneious Prime 对 6 419 条序列进行多重比对(multiple sequences alignment)分析,发现 G II 型诺如病毒的核酸序列变异性过高,无法找到合适的保守区域对 23 种基因型进行全部覆盖。鉴于此,我们再次尝试采用 Geneious Prime 软件对每种基因型的序列进行单独地比对分析,并充分考虑每种基因型序列在全部序列中占有的权重和比例,首先以丰度高达 55.5% (3 561/6 419)的 G II.4 型序列为主进行

新引物的设计,然后,采用序列比对的方式评估新引物与其余22种基因型的保守序列的匹配情况,最终设计出含有大量简并碱基的新引物,并将其命名为NG2OF/NG2OR,序列如表1所示。

## 2.2 基因型覆盖度

为全面分析引物所覆盖的病毒基因型,我们选取近年来在世界范围内广泛传播并且丰度较高的7种代表性G II型诺如病毒阳性粪便样品(G II.3, G II.4, G II.6, G II.12, G II.6[P7], G II.2[P16]和G II.17),分别用旧引物(G2SKF/G2SKR)和新引物(NG2OF/NG2OR)进行巢式RT-PCR扩增和电泳分析。如图1所示,除G II.6[P7]型诺如病毒阳性粪便样品外,旧引物(G2SKF/G2SKR)和新引物(NG2OF/NG2OR)均成功地扩增出其余6种G II型诺如病毒阳性粪便样品,表明新旧引物在基因型覆盖度上基本一致。通过浓度测定发现,G II.6[P7]型诺如病毒阳性粪便样品因降解导致其病毒浓度降低,在采用新引物(NG2OF/NG2OR)时胶图上呈现非常微弱但单一的条带,而采用旧引物(G2SKF/G2SKR)时胶图上并没有条带出现,表明新引物(NG2OF/NG2OR)在灵敏度方面具有一定的优势。



M. 100 bp DNA marker; 1~7. G II.3, G II.4, G II.6, G II.12, G II.6[P7], G II.2[P16]和G II.17型诺如病毒阳性粪便样品; N. 阴性对照; G2SKF/G2SKR. 344 bp; NG2OF/NG2OR. 337 bp。

M. 100 bp DNA marker; 1~7. G II.3, G II.4, G II.6, G II.12, G II.6[P7], G II.2[P16] and G II.17 norovirus contaminated stool samples; N. negative control; G2SKF/G2SKR. 344 bp; NG2OF/NG2OR. 337 bp。

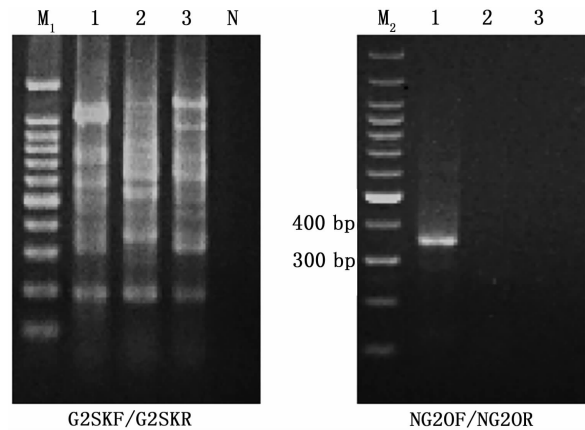
图1 基因型覆盖率的评估

Fig.1 Evaluation of genotype coverage

## 2.3 特异性评估

采用由实验室前期得到的有非特异性扩增现象的牡蛎样品和G I型诺如病毒阳性的牡蛎样品,分别用旧引物(G2SKF/G2SKR)和新引物(NG2OF/NG2OR)进行巢式RT-PCR扩增和电泳

分析。如图2所示,所有3只牡蛎样品在采用旧引物(G2SKF/G2SKR)检测时均出现了不同大小的非特异性条带,经割胶回收后测序验证为牡蛎本身或其肠道微生物群的序列,检测结果全为G II型诺如病毒阴性。1号样品(背景对照)在采用新引物(NG2OF/NG2OR)时成功扩增出亮且单一的目标条带,并经后续测序验证得为G II.12型诺如病毒阳性,体现了新引物(NG2OF/NG2OR)在灵敏度方面具有一定的优势。2号样品(背景对照)在采用新引物(NG2OF/NG2OR)时胶图上没有出现信号,结果为阴性。3号样品(背景对照和阴性对照)在采用新引物(NG2OF/NG2OR)时胶图上背景干净、没有信号,结果为阴性。结果显示新引物(NG2OF/NG2OR)在检测牡蛎样品时特异性更好。特异性实验结果表明,无论是背景对照(牡蛎)还是阴性对照(G I型诺如病毒阳性牡蛎),都没有出现扩增现象,有效地纠正了使用旧引物(G2SKF/G2SKR)时出现的非特异性扩增的问题。



M<sub>1</sub>和M<sub>2</sub>. 100 bp DNA marker; 1~2. 由实验室前期牡蛎中诺如病毒检测得到的有非特异性扩增的牡蛎样品; 3. 由实验室前期牡蛎中诺如病毒检测得到的G I型诺如病毒阳性牡蛎样品; N. 阴性对照(水); G2SKF/G2SKR. 344 bp; NG2OF/NG2OR. 337 bp。

M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>. 100 bp DNA marker; 1~2. Oyster samples with non-specific bands; 3. G I norovirus contaminated oyster sample; N. negative control (ddH<sub>2</sub>O); G2SKF/G2SKR. 344 bp; NG2OF/NG2OR. 337 bp。

图2 特异性的评估

Fig.2 Evaluation of specificity

## 2.4 灵敏度评估

为了评价检测方法的灵敏度(检测限),采用3个随机选取的G II型诺如病毒阳性并已知浓度

的牡蛎消化腺 RNA (编号 1904047、1902263、1902264) 和它们的 10 倍梯度稀释液作为模板,分别用旧引物 (G2SKF/G2SKR) 和新引物 (NG2OF/NG2OR) 进行巢式 RT-PCR 扩增和电泳分析。如表 2 所示,在采用新引物 (NG2OF/

NG2OR) 时最低可以稳定地检测到 26.4 个拷贝,成功检测到 1 次 9.32 个拷贝。采用旧引物 (G2SKF/G2SKR) 时最低稳定地检测到 57.9 个拷贝。从结果可以看出新引物 (NG2OF/NG2OR) 灵敏度更高。

表 2 灵敏度的评估

Tab. 2 Evaluation of sensitivity

样品编号 Number	样品浓度 Concentration/ (拷贝/ $\mu\text{L}$ )	方法 Assay	加样浓度 Concentrations		
			10 倍稀释 10-fold dilution	$10^2$ 倍稀释 $10^2$ -fold dilution	$10^3$ 倍稀释 $10^3$ -fold dilution
1904047	$9.32 \times 10^3$	G2SKF/G2SKR	3/3	3/3	0/3
		NG2OF/NG2OR	3/3	3/3	1/3
1902263	$2.64 \times 10^4$	G2SKF/G2SKR	3/3	3/3	0/3
		NG2OF/NG2OR	3/3	3/3	3/3
1902264	$5.79 \times 10^4$	G2SKF/G2SKR	3/3	3/3	3/3
		NG2OF/NG2OR	3/3	3/3	3/3

## 2.4 实际样品检测

随机挑选新鲜采集的 92 只牡蛎样品,分别用旧引物 (G2SKF/G2SKR) 和新引物 (NG2OF/NG2OR) 进行巢式 PCR 扩增和电泳检测,结果如表 3 所示。从表 4 可以看出,使用旧引物 (G2SKF/G2SKR) 检测牡蛎中的诺如病毒时,阳性检出率为 20.7%, 低于新引物 (NG2OF/NG2OR, 28.3%)。其中,有 7 只牡蛎样品在使用旧引物 (G2SKF/G2SKR) 检测时呈阴性,而使用新引物 (NG2OF/NG2OR) 检测时呈阳性,后经测序并分型得到基因型分别为 G II.17 ( $n = 2$ )、G II.2 ( $n = 2$ )、G II.3 ( $n = 3$ )。结果表明,采用旧引物 (G2SKF/G2SKR) 检测牡蛎样品时,会出现假阴性的情况,这种情况对 G II 型基因型普遍存在。从而低估了牡蛎中的诺如病毒的污染情况和基因型的丰度,而采用新引物 (NG2OF/NG2OR) 可避免这样的情况。新引物 (NG2OF/NG2OR) 的更适用于牡蛎中的诺如病毒检测。

## 3 讨论

目前诺如病毒分子检测手段中,荧光定量 RT-PCR 法技术成熟且灵敏度高,但在检测牡蛎样品时经常出现假阳性的情况<sup>[5, 15]</sup>。此外,荧光定量 RT-PCR 扩增产物过短,无法用于后续的基因型分析。而巢式 RT-PCR 方法较于常规 RT-PCR 方法更为灵敏,更适用于诺如病毒含量较低

的牡蛎样品的检测。但是目前常用的巢式 RT-PCR 方法建立于 20 多年前,期间病毒的序列发生了显著的改变,新产生的序列数量是之前的上百倍。因此,建立一套新的具有更高特异性和灵敏度的巢式 RT-PCR 方法用于牡蛎样品中的诺如病毒检测是非常迫切的,为调查牡蛎消费的人中诺如病毒的感染情况和基因型研究提供重要支撑。

同时,为避免因基因型覆盖度低等原因造成的漏检问题,大量的序列分析对于引物设计是十分必要的<sup>[16-17]</sup>。本研究建立了含 6 419 条(截至 2017 年 12 月 31 日)G II 型诺如病毒序列的本地数据库,基于对所有序列的分析,进行了引物设计。从位置上看,新引物 (NG2OF/NG2OR) 与旧引物 (G2SKF/G2SKR) 只有几个碱基的差别(表 1),却避免了引物 3' 端和 5' 端的错配,从而提高了扩增效率。这可能是新引物 (NG2OF/NG2OR) 灵敏度更高的原因。从简并碱基来看,引物 NG2OR 与引物 G2SKR 不同的是,基于对 6 419 条序列的分析,没有使用简并碱基 H 而是使用了 V,这样能覆盖更多的序列。2019 年,诺如病毒基因群及基因型的分类进行了更新<sup>[1]</sup>,G II 的基因型数量由 23 扩大为 27。尽管基因型的数量增加了,由于数据库中用于引物设计的序列保持不变,因此这并不影响本研究所优化的 G II 型诺如病毒巢式 RT-PCR 法。

表 3 样品信息

Tab. 3 Information of samples

编号 No.	G2SKF/G2SKR	NG20F/NG20R	基因型 Genotype	编号 No.	G2SKF/G2SKR	NG20F/NG20R	基因型 Genotype
1	P	P	G II . 4	47	N	P	G II . 3
2	N	N	-	48	P	P	G II . 12
3	N	P	G II . 17	49	N	N	-
4	N	N	-	50	P	P	G II . 3 & G II . 4
5	P	P	G II . 12	51	N	N	-
6	N	P	G II . 2	52	N	N	-
7	N	N	-	53	N	N	-
8	N	N	-	54	N	N	-
9	P	P	G II . 12	55	N	P	G II . 17
10	N	N	-	56	N	P	G II . 3
11	N	N	-	57	N	N	-
12	N	N	-	58	N	N	-
13	N	N	-	59	N	N	-
14	N	N	-	60	N	N	-
15	P	P	G II . 3	61	N	P	G II . 2
16	N	N	-	62	N	N	-
17	P	P	G II . 3	63	N	N	-
18	N	N	-	64	P	P	G II . 4
19	P	P	G II . 4	65	N	N	-
20	N	N	-	66	N	N	-
21	N	N	-	67	N	N	-
22	N	N	-	68	N	N	-
23	N	N	-	69	N	N	-
24	P	P	G II . 4	70	P	P	G II . 4
25	N	N	-	71	N	N	-
26	P	P	G II . 12	72	N	N	-
27	N	N	-	73	N	N	-
28	N	N	-	74	N	N	-
29	N	N	-	75	P	P	G II . 3
30	N	N	-	76	N	N	-
31	N	N	-	77	N	N	-
32	N	N	-	78	N	N	-
33	N	P	G II . 3	79	P	P	-
34	N	N	-	80	N	N	-
35	N	N	-	81	N	N	-
36	N	N	-	82	P	P	G II . 4
37	N	N	-	83	N	N	-
38	N	N	-	84	N	N	-
39	N	N	-	85	N	N	-
40	P	P	G II . 4	86	N	N	-
41	N	N	-	87	P	P	G II . 4
42	N	N	-	88	N	N	-
43	P	P	G II . 2	89	N	N	-
44	N	N	-	90	N	N	-
45	N	N	-	91	N	N	-
46	N	N	-	92	N	N	-

注: P. 阳性; N. 阴性; —. 无基因型。

Notes: P. positive; N. negative; —. no genotype.

表 4 牡蛎样品诺如病毒检测结果

Tab.4 Results of detection of norovirus in oyster samples

巢式 PCR	阳性	阴性	总数	阳性率	漏检基因型
Nested PCR	Positive/只	Negative/只	Total/只	Positive rate/%	Missed genotypes
G2SKF/G2SKR	19	73	92	20.7	G II. 17、G II. 3、G II. 2
NG2OF/NG2OR	26	66	92	28.3	-

本研究从基因型覆盖度、特异性、灵敏度和稳定性 4 个方面对新引物(NG2OF/NG2OR)进行了评估。在基因型覆盖度方面,采用的是 G II 型诺如病毒阳性粪便样品。与牡蛎样品不同,粪便样品中的诺如病毒含量高,通常应用常规 RT-PCR 检测。而采用巢式 RT-PCR 检测时,粪便中富余的病毒 RNA 可能导致 PCR 扩增效率过高,从而出现了非特异性扩增的现象。本研究中采用了 7 种代表性的 G II 型诺如病毒样本对基因型覆盖度进行了评估,这 7 种 G II 基因型均为近年世界范围内的主要流行株,其序列丰度占 NCBI 在线数据库(截至 2017 年 12 月 31 日)中 G II 型诺如病毒序列的 89.1%,代表了绝大多数 G II 型诺如病毒。因此,使用这 7 种 G II 基因型对基因型覆盖度进行评估的结果是具有代表性的。在特异性验证方面,采用了 G I 型诺如病毒阳性的牡蛎样品作为阴性对照。在亲缘关系上,G I 型诺如病毒与 G II 型诺如病毒关系最近。因此,使用 G I 型诺如病毒阳性的牡蛎样品进行交叉实验的结果是非常具有代表性的。在灵敏度方面,新引物(NG2OF/NG2OR)的灵敏度是旧引物(G2SKF/G2SKR)的 2 倍,且结果稳定。采用实际样品对灵敏度进行评估的好处是可排除样品中存在的 PCR 抑制剂对结果的影响,比起采用质粒、标准品、人工阳性样品等,结果更可靠。在进行临床牡蛎样品诺如病毒筛查时发现,有 7 只牡蛎样品在使用旧引物(G2SKF/G2SKR)检测时呈阴性,而使用新引物(NG2OF/NG2OR)检测时呈阳性并经后续测序验证。说明新引物(NG2OF/NG2OR)在检测低含量的牡蛎样品时更加具有优势。

综上所述,本研究所建立的 G II 型诺如病毒巢式 PCR 检测方法在检测牡蛎样品时特异性强,灵敏度高,应用性较好,为牡蛎中诺如病毒的检测提供了一种新的、可靠的技术手段。

#### 参考文献:

- [1] CHHABRA P, DE GRAAF M, PARRA G I, et al. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes [J]. *Journal of General Virology*, 2019, 100(10): 1393-1406.
- [2] AO Y Y, WANG J J, LING H, et al. Norovirus G II. P16/G II. 2-associated gastroenteritis, China, 2016[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2017, 23(7): 1172-1175.
- [3] QIN S W, CHAN T C, CAI J, et al. Genotypic and epidemiological trends of acute gastroenteritis associated with Noroviruses in China from 2006 to 2016 [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2017, 14(11): 1341.
- [4] CAMPOS C J A, LEES D N. Environmental transmission of human noroviruses in shellfish waters [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(12): 3552-3561.
- [5] KAGEYAMA T, KOJIMA S, SHINOHARA M, et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41(4): 1548-1557.
- [6] IMAMURA S, KANEZASHI H, GOSHIMA T, et al. Next-generation sequencing analysis of the diversity of human Noroviruses in Japanese oysters [J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2017, 14(8): 465-471.
- [7] YU Y X, CAI H, HU L H, et al. Molecular epidemiology of oyster-related human Noroviruses and their global genetic diversity and temporal-geographical distribution from 1983 to 2014 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(21): 7615-7624.
- [8] 刘爱玲, 刘爱胜, 罗小芳, 等. 肠道轮状病毒巢式 PCR 检测方法的建立及初步应用 [J]. *临床输血与检验*, 2019, 21(6): 604-608.  
LIU A L, LIU A S, LUO X F, et al. Establishment and preliminary application of intestinal rotavirus (RV) nested PCR detection method [J]. *Journal of Clinical Transfusion and Laboratory Medicine*, 2019, 21(6): 604-608.
- [9] 柴下, 陆宏达, 刘俊杰, 等. 武汉单极虫巢式聚合酶链反应检测方法的建立与优化 [J]. *上海海洋大学学报*, 2014, 23(4): 556-563.  
CHAI X, LU H D, LIU J J, et al. Establishment of nested PCR assay for detection of *Thelohanellus wuhanensis* in allo-

- gynogenetic crucian carp [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2014, 23(4): 556-563.
- [10] KOJIMA S, KAGEYAMA T, FUKUSHI S, et al. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses [J]. *Journal of Virological Methods*, 2002, 100(1/2): 107-114.
- [11] NISHIDA T, KIMURA H, SAITOH M, et al. Detection, quantitation, and phylogenetic analysis of noroviruses in Japanese oysters [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(10): 5782-5786.
- [12] GUO P, YU Y X, PAN Y J, et al. Design and evaluation of nested PCR primers for specific detection of genogroup I noroviruses in oysters [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2018, 40: 40-43.
- [13] 李志凯, 苏国成, 苏文金, 等. 诺如病毒检测方法研究进展 [J]. *微生物学通报*, 2014, 41(7): 1417-1424.  
LI Z K, SU G C, SU W J, et al. Progress of detection methods for norovirus [J]. *Microbiology China*, 2014, 41(7): 1417-1424.
- [14] MOORE M D, JAYKUS L A. Development of a Recombinase polymerase amplification assay for detection of epidemic human Noroviruses [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 40244.
- [15] PU J, KAZAMA S, MIURA T, et al. Pyrosequencing analysis of norovirus genogroup II distribution in sewage and oysters: first detection of G II. 17 Kawasaki 2014 in oysters [J]. *Food and Environmental Virology*, 2016, 8(4): 310-312.
- [16] ANDO T, NOEL J S, FANKHAUSER R L. Genetic classification of "Norwalk-like viruses" [J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2000, 181 Suppl 2: S336-S348.
- [17] VINJÉ J, HAMIDJAJA R A, SOBSEY M D. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses [J]. *Journal of Virological Methods*, 2004, 116(2): 109-117.

## Updating and evaluation of nested RT-PCR for specific detection of genogroup II norovirus in oysters

JIA Tianhui<sup>1</sup>, DONG Lei<sup>1</sup>, WANG Yongjie<sup>1,2</sup>, YU Yongxin<sup>1,2</sup>

(1. *College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China*; 2. *Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Aquatic Products on Storage and Preservation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306, China*)

**Abstract:** New primers (NG20F/NG20R) were designed based on analysis of all G II norovirus sequences available online to solve the problem of non-specific amplification and false negative in detecting G II norovirus in oysters by performing the present nested PCR method. The primers are evaluated for their coverage, specificity, sensitivity and stability. The results show that: New primers were specifically targeted for G II norovirus and not affected by the original background of the oyster samples. The assay successfully detects G II norovirus from norovirus contaminated oysters with the sensitivity of 26.4 noroviruses. The assay has a 28.3% positive rate as 92 oyster samples are detected, which is 7.5% higher than the typical method. Thus, the new nested PCR method, with a higher sensitivity, is more efficient in the detection of oyster samples. It provided a new and reliable assay for the detection of G II norovirus in oysters.

**Key words:** oysters; genogroup II norovirus; nested RT-PCR; specificity; positive rate