文章编号: 1001-0580(2008)05-0635-03　中图分类号: R 155.3+1　文献标志码: A　【检验技术】

食源性致病病毒基因芯片方法检测 *

陈广全[1],曾静[1],张惠媛[1],魏海燕[1],臧庆伟[2],汪琦[1],饶红[1],张昕[1],张西萌[1]

摘　要: **目的**　将基因芯片技术用于食源性致病病毒诺如病毒、轮状病毒、甲肝病毒、星状病毒和脊髓灰质炎病毒的检测,达到同时检测 2 种以上病毒的需求。**方法**　采用基因芯片方法检测贝类食品中引起人类腹泻的 5 种食源性致病病毒。**结果**　所研制的检测 5 种病毒的基因芯片具有良好的特异性,在 5 种病毒之间无交叉反应;其灵敏度与荧光 PCR 方法基本一致;芯片在 4 ℃条件下,保存 7.5 个月,性能稳定。**结论**　建立了检测 5 种食源性病毒的基因芯片方法,同时该方法也可用于医疗检验目的。为基因芯片在微生物检测领域的应用提供基础依据。

关键词: 基因芯片;食源性病毒;荧光 PCR

Detecion of food borne vireses by gene - chip assay　*CHEN Guang-quan, ZENG Jing, ZHANG Hui-yuan, et al. Beijing Entry - Exite Inspection and Quarantine (Beijing 100026, China)*

Abstract: **Objective**　To establish the rapid, high - throughput method for food borne viruses detection and inspection. **Methods**　Gene - chip was used to detect the food borne viruses which cause human diarrhea. **Results**　The Gene - chip method was created to detect 5 kinds of viruses from shellfish. The gene - chip method had the advantages of high specificity and the sensitivity the same as real time PCR. The stability of the Gene - chip was not changed in seven months under 4 ℃. **Conclusion**　The method of Gene - chip has the priority of rapidity, high throughput and secsitivity in detecting food borne viruses, and also can be used on clinical purposes. This method provids the basic platform for further research in the field of detection of many kinds of viruses.

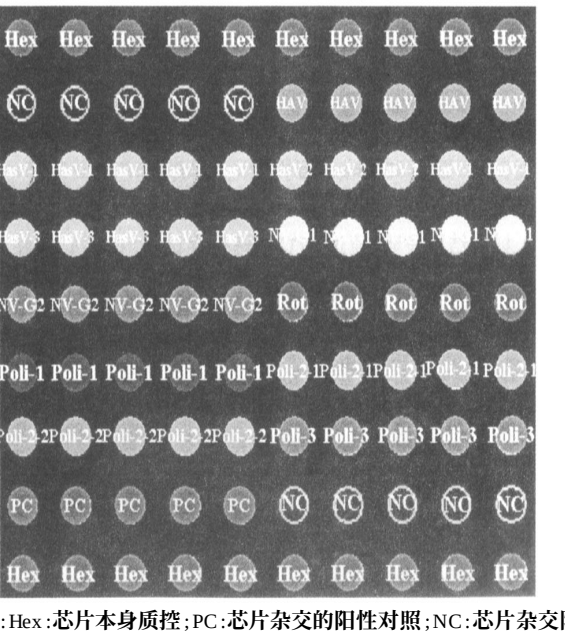
Key words: gene chip;food born virus;real time PCR

食品微生物污染主要由食源性致病微生物引起,而人类腹泻性传染病大多源于食源性病毒感染。与该类病毒有关的食品主要是贝类食品。由于贝类食品中病毒含量较低,其检测方法主要以 RT - PCR 和荧光 PCR 为主[1]。RT - PCR 比荧光 RT - PCR 方法灵敏度低、耗时长;荧光 RT - PCR 方法具有高灵敏度的特点,但检测成本高。无论是人体或贝类均存在同时感染几种病毒的情况[2-4],本研究利用基因芯片高通量、高特异性和高灵敏度的特点,用于检测贝类食品中上述 5 种病毒,缩短检测时间,达到同时检测 2～3 种病毒的目的。

1　材料与方法

1.1　**材料**　粪便标本(2 岁以下婴幼儿粪便标本,于 2005 年 10 月在首都儿童医院收集);贝类样品(北京各农贸市场);甲肝阳性标本为灭活的甲肝疫苗(北京市疾病预防控制中心),脊髓灰质炎病毒 I、II 和 III 型阳性标本为灭活疫苗(北京疾病预防控制中心赠送);甘氨酸(上海生工生物工程公司);氯仿(上海生工生物工程公司);Trizol (Invitrogen);聚乙二醇 8000(BBI);十二烷基磺酸钠(上海生工生物工程公司);三羟甲基氨基甲烷(上海生工生物工程公司);病毒总 RNA 提取试剂盒(High Pure ViralRNA Kit Roche);检测 5 种病毒的病毒芯片(博奥生物有限公司),点样液、洗脱液和杂交液等试剂(博奥生物有限公司);5 种病毒探针和引物由英俊生物有限公司合成,引物的 5 端引入 TAMARA 修饰,探针的 5 端引入氨基,见图 1。

1.2　**方法**　粪便标本 RNA 的提取方法参照参考文献[1]。反转录使用 Super Scrip II 反转录酶(Invitrogen),操作步骤按说明书;PCR 使用 Tag 酶(Invitrogen),PCR 反应程序见表 1,PCR 产物用 1%琼脂糖电泳(上海 Yito 生物仪器有限公司)。本研究所用引物和探针见表 2;芯片杂交体系见表 3,杂交方法如下:42 ℃恒温水浴杂交 2 h,洗片:洗液 I:2 ×柠檬酸钠缓冲液(SSC),0.2%十二烷基磺酸钠(SDS),42 ℃,4 min;洗液 II:0.2 ×SSC,42 ℃,4 min。贝类样品的处理和贝类 RNA 的提取方法参照文献[1]。荧光 PCR 按下列方法进行,cDNA 模板 1 μl,$MgCl_2$ 1.6 μl,正链引物(RotA_F) 0.8 μl(10 μmol/L),负链引物(RotA_R) 0.8 μgl(10 μmol/L),DNA Master SYBR Green I MIX 2μl(上海生工生物工程公司),用无核苷酸酶的水将体积补足到 20 μl。



注: Hex:芯片本身质控;PC:芯片杂交的阳性对照;NC:芯片杂交阴性对照;HAV:甲肝病毒探针;HasV - 1:星状病毒探针;HasV - 2:星状病毒探针;HasV - 3:星状病毒探针;NV - G1:GI 型诺如病毒探针;Nv - G2:G II型诺如病毒探针;Rot:轮状病毒探针;Poli - 1:I 型脊髓灰质炎病毒探针;Poli - 2 - 1 和 Poli - 2 - 2:II 型脊髓灰质炎病毒探针;Poli - 3:III 型脊髓灰质炎病毒探针。

图 1　5 种病毒探针在芯片上的排列

*基金项目: 国家质量监督检验总局科研项目(2006IK118)
作者单位: 1. 北京出入境检验检疫局技术中心,北京 100026;
2. 博奥生物有限公司
作者简介: 陈广全(1963 -),男,广东人,高级工程师,本科,主要从事食品微生物检测。
通讯作者: 曾静

表 1 5 种病毒粪便标本 PCR 反应程序

步骤	温度(℃)	时间	循环数
1	94	10 min	
2	94	30 s	
3	49	30 s	
4	72	30 s	2,3,4 40 个循环
5	72	5 min	

2 结 果

2.1 基因芯片检测结果和分析 5 种病毒基因芯片杂交扫描检测结果见图 2～6。通过以上杂交扫描结果可以看出,目标探针特异性好,不同病毒之间不存在交叉反应;同时,背景信号的平均值、标志点的信号平均值、特异性信号平均值、非特异性信号的平均值本身都完全符合判定标准。

2.2 基因芯片检测灵敏度评价 以轮状病毒为例,将基因芯片方法、普通 PCR 方法和荧光 PCR 方法在 cDNA 水平进行检测灵敏度比较,将轮状病毒的 cDNA 进行梯度稀释,将未经稀释的 cDNA 原液、10 倍稀释 cDNA、10^2 倍稀释 cDNA、10^3 倍稀释 cDNA、10^4 倍稀释 cDNA、10^5 倍稀释 cDNA,分别进行荧光 PCR、普通 PCR 和芯片杂交分析。结果表明,cDNA 原液、10 倍稀释 cDNA 和 10^2 倍稀释 cDNA 的荧光 PCR 结果有明显的反应信号,信号随稀释度增加呈递减趋势;普通 PCR 方法,只有 cDNA 原液和 10 稀释 cDNA 经 PCR 反应,检测到 PCR 产物外,其他几个稀释度均没有检测到 PCR 产物;芯片杂交结果显示,cDNA 原液、10 倍稀释 cDNA 和 10^2 倍稀释 cDNA,经 PCR 反应,与芯片杂交可判读的杂交信号呈阳性,该结果与荧光 PCR 结果相一致,比普通 PCR 灵敏。

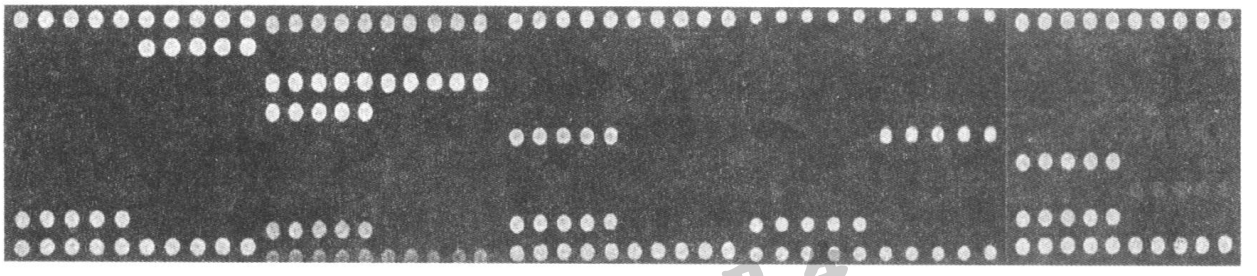


图2 甲肝病毒 图3 星状病毒 图4 诺如病毒 图5 轮状病毒 图6 脊灰病毒Ⅰ型

2.3 基因芯片稳定性评价 以甲肝病毒检测芯片为例,在 37 ℃加速保存 24 h,相当于 4 ℃保存 45 d。本研究在 37 ℃保存 5 d,相当于 4 ℃保存 7.5 个月,见图 7～10。

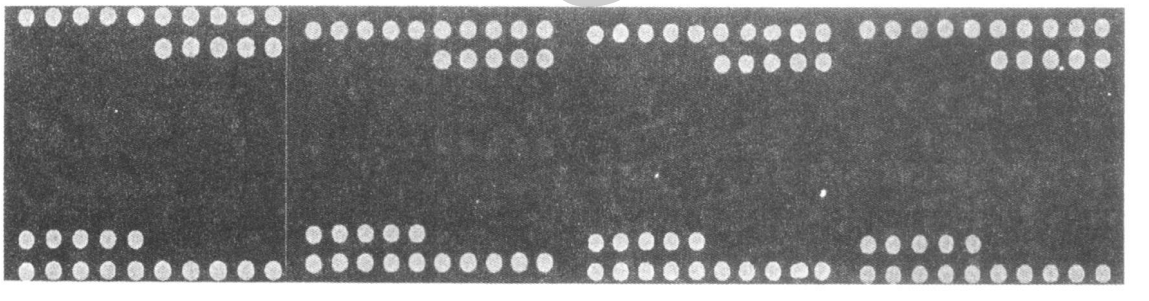


图7 37℃未经保存的芯片 图8 37℃加速保存24 h 图9 37℃加速保存48 h 图10 37℃加速保存5 d

以上结果表明:通过 37 ℃加速保存试验,在 37 ℃条件下保存 5 d 相当于 4 ℃条件下保存 7.5 个月,芯片的杂交信号保持不变。

2.4 基因芯片高通量试验 将 2 种以上病毒的 RT-PCR 产物混合后进行芯片杂交,见图 11～14。

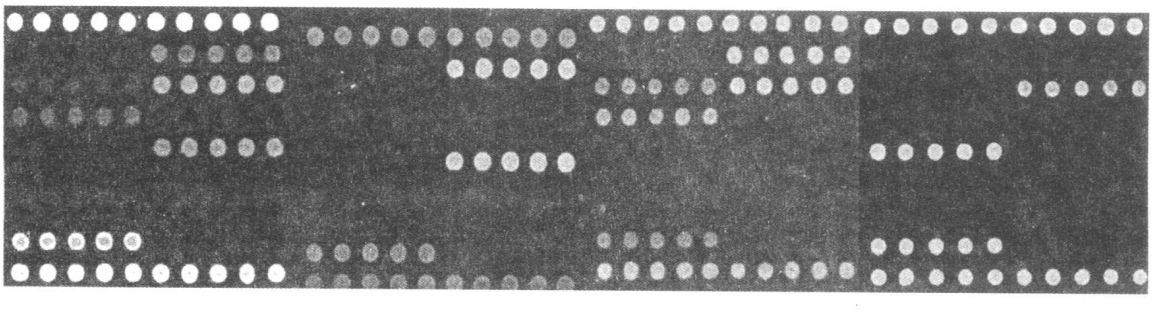


图11 甲肝、星状和轮状病毒 图12 甲肝和轮状病毒 图13 甲肝和星状病毒 图14 星状和诺如病毒GⅡ型

以上高通量试验结果可以看出,将 2 种以上不同病毒的 RT-PCR 产物混合,与芯片进行杂交,不同病毒之间没有发生交叉反应,说明该芯片具有良好的特异性。

2.5 基因芯片用于贝类食品中致病病毒的检测 从水产品市场购买了 46 份水产品,种类包括毛蚶、海虹、扇贝、文蛤、螺丝和鲍鱼,46 份均为鲜活的水产品,只从 1 份毛蚶中检出了诺

如 II型病毒,其结果与 RT - PCR 结果相对应。轮状病毒、星　　状病毒、甲肝病毒和脊髓灰质炎病毒在所有样品中均未检出。

表 2　本研究所用引物和探针

病毒名称	引物(5′- 3′)		探针(5′- 3′)	
甲肝病毒	HAV - F	TGTGCTATGGTTCCTGGTGA	HAV	ATTGGAACAGGAACTTCAGCG
	HAV - R	CCCAATCGAATCTGAAGCAT		
	HAsV - F	CATTGTTTGTTGTCATACTAAC	HAsV - 1	GAGATCCGTGATGTTAATGG
星状病毒	HAsV - R	ACATGTGCTGCTGTTACTAT	HAsV - 2	GAGATCCGTGATGCTAATGG
			HAsV - 3	GAGATACGTGATGCTAATGG
	G1 SKF	CTGCCCGAATTYGTAAATGA		
诺如病毒 I型	G2 - SKR	CCAACCCARCCATTRTACA	NV - G1	GTAAATGATGATGGCGTCTAA
	COG2F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG		
诺如病毒 II型	GII - SKR	CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT	NV - G2	AGGGCGATCGCAATCTGGCT
脊灰 I型			Poli - 1	CCGCGCGAAGAAAGACTCT
脊灰 II型	Poli _ F	TTTGTGTCAGCGTGTAATGA	Poli - 2 - 1	TAGTAATCCCTTCAACGGCC
			Poli - 2 - 2	TCTGCTGGCGCGCTTTGT
脊灰 III型	Poli _ R	GAATTCCATGTCAAATCTAGA	Poli - 3	
				GTTGCTTCGGGAGTGACAAAG
	RotA _ F	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG		
轮状病毒(A 组)			RotA	
	RotA _ R	GATCCTGTTGGCCATCC		GTGGTATATTCAATACCATAC

表 3　芯片杂交体系

成分	加样量(μl)	终浓度
20 ×SSC	1.8	3 ×SSC
10 %SDS	0.24	0.2 %
甲酰胺	3	25 %
50 ×Denhardt's	1.2	5 ×
杂交阳性对照	0.76	
PCR 产物	5	

3　讨　论

本研究以贝类食品中常见污染病毒如诺如病毒、星状病毒、轮状病毒、甲肝病毒和脊髓灰质炎病毒为实验对象,通过将发表在 Gene Bank 中的这 5 种病毒的全序列和部分序列进行比较,找到高度保守的核苷酸序列,以此为依据用相关软件设计引物和探针。分别设计了检测诺如病毒 I 型和 II 型的引物和探针、检测甲肝病毒的引物和探针、检测轮状病毒的引物和探针、检测星状病毒的 1 对引物和 3 条探针和检测脊髓灰质炎病毒 I、II、III型的探针和引物,通过对探针和引物的特异性验证,结果表明引物和探针具有良好的特异性,在 5 种病毒之间无交叉反应,与其他遗传关系相近的病毒之间无交叉反应,达到了病毒检测高通量的目的。轮状病毒芯片的实验结果提示,基因芯片的检测灵敏度与荧光 PCR 方法的检测灵敏度基本相同,但是,芯片检测灵敏度尚需通过其他方法进一步验证。今后通过建立多重 RT - PCR 技术,使得芯片检测更加快速和经济建立贝类食品中上述 5 种病毒检测的标准方法。

(感谢首都儿童医院感染科化验室的全体工作人员为我们收集粪便标本提供了条件;感谢北京疾病预防控制中心为我们提供了脊髓灰质炎病毒 I、II和 III型灭活疫苗。)

参考文献

[1] 饶红,陈广全,曾静,等. RT - PCR 法检测贝类中的甲肝病毒的研究[J]. 食品与发酵工业,2006,32(9):122 - 125.

[2] 邓海斌,陈友士,胡含. ELISA 法检测粪便中轮状病毒抗原及其临床意义[J]. 浙江实用医学,2006,11(5):345 - 346.

[3] 刘春艳,申昆玲,王树欣,等. 北京儿童医院住院的腹泻患儿星状病毒感染分析[J]. 中华儿科杂志,2002,40(7):402 - 404.

[4] LE GUYADER F, HAUGARREAUL, et al. Theree - year study to assess human entieic viruses in shellfish[J]. Appl Eneiron Microbiol, 2000, 66(8): 3241 - 3248.

收稿日期: 2007-09-01　　(任旭红编辑　宋艳萍校对)

中国公共卫生 CPH