· 检验技术 ·

MS2 噬菌体在贝类食源性病毒检测中过程质控应用*

徐蕾蕊,魏海燕,马丹,汪琦,张西萌,李丹,付溥博,刘莉,魏咏新,曾静

摘　要:目的　研究 MS2 噬菌体作为过程质控品在贝类食源性病毒检测中的应用。**方法**　采用双层琼脂培养法制备 MS2 噬菌体悬液,计算效价;实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(qRT-PCR)检验其稳定性;比较 3 种 RNA 提取方法的提取效率,确定 MS2 噬菌体的最适添加量范围;分析 MS2 噬菌体添加对贝类食源性病毒检测的影响。**结果**　稳定性研究表明 -20 ℃和 -80 ℃ 28 d MS2 噬菌体(悬液的效价浓度为 7.13×10^{11} pfu/mL)时 RNA 含量无明显变化[$t=0.464$, $P=0.653$(-20 ℃); $t=0.602$, $P=0.561$(-80 ℃)]。MS2 噬菌体最适添加量范围为 $7.13\times10^{8}\sim7.13\times10^{7}$ pfu/mL。在最适添加范围内,试剂盒方法和 Trizol 裂解结合磁珠纯化方法回收率均 >1%。2 种阳性样品均被检出,其 Ct 值比较接近,MS2 噬菌体对贝类食源性病毒检测无影响($t=0.170$, $P=0.873$)。**结论**　MS2 噬菌体可作为贝类食源性病毒 qRT-PCR 检测的过程质控品,是监控假阴性结果的一种简便有效的方法。

关键词:MS2 噬菌体;过程质控品;食源性病毒;实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR);贝类
中图分类号:R 155.5　**文献标志码:**A　**文章编号:**1001-0580(2016)11-1584-07　DOI:10.11847/zgggws2016-32-11-37

Application of MS2 phage in process control in detection of food borne virus in shellfishes

XU Lei-rui, WEI Hai-yan, MA Dan, et al (*Inspection and Quarantine Technical Center of Beijing Enter-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Beijing* 100026, China)

Abstract: Objective　To develop a procedure of MS2 phage application in process control in real-time quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) detection of food borne virus in shellfishes. **Methods**　MS2 phage suspension was prepared using double-agar-layer plaque technique. The stability of the phages was tested by applying qRT-PCR. Using the methods referred by International Organization for Standardization (ISO), MS2 phages were added to shellfish matrices, and the RNA was extracted by three methods. RNA was detected with qRT-PCR and a standard curve was established. The adding amount of MS2 phage was optimized after calculating and comparing the recovery rate of three RNA extract methods. Based on the test results of two artificially constructed positive samples, the impact of MS2 phage on food borne virus detection was analyzed. **Results**　When the titer of MS2 phage suspension was 7.13×10^{11} plaque forming unit (pfu)/ml, no significant variation in RNA content of MS2 phage was observed in the suspension kept at the temperature of -20 ℃ ($t=0.464$, $P=0.653$) or -80 ℃ ($t=0.602$, $P=0.561$) for 28 days. The optimal additive amount of MS2 phage ranged between 7.13×10^{8} and 7.13×10^{7} pfu. The RNA recovery rate was greater than 1% when RNA was extracted with commercial kit or method of trizol combined with magnetic beads purification, which meet the requirements of using MS2 phage as a process control. Two artificial samples were both detected with positive results and the cycle threshold (Ct) values of the detections were very close to each other ($t=0.170$, $P=0.873$). Thus, MS2 phage had no influence on detection of virus in shellfishes. **Conclusion**　Employing MS2 phage as a process control in qRT-PCR detection of food-borne virus in shellfish could be a simple and effective way to monitor false negative results.

Key words: MS2 phage; process control material; food borne virus; real-time quantitative reverse transcription-PCR; shellfish

食源性病毒是以食物为载体,导致人类患病的病毒。食源性病毒一直难以得到及时有效的监控,不仅对食品卫生和人民健康构成严重威胁,也对食品工业和国民经济造成很大的影响。目前,以分子生物学技术为基础的 PCR 方法成已为食源性病毒检测的主要方法[1],其灵敏度和精确度不断提高,但是仍存在操作误差、核酸提取效率未知等因素,影响检测结果的可靠性和可比性,不利于检测方法标准化[2]。因此,在实际检测中,需要对每个检测步骤进行严格控制。本研究以贝类为基质,研究 MS2 噬菌体作为食源性病毒实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(real-time quantitative reverse transcription-PCR, qRT-PCR)检测中过程质控的应用,现将结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　*主要试剂与仪器*　MS2 噬菌体(ATCC 15597 - B1)(山东出入境检验检疫局馈赠)、MS2 噬菌体宿主菌

* **基金项目:** 国家质检总局科技计划项目(2014IK109;2016IK017)
作者单位: 北京出入境检验检疫局检验检疫技术中心,北京 100026
作者简介: 徐蕾蕊(1985 -),女,湖南安仁人,博士,研究方向:食品安全与微生物检测、生殖毒理、农药毒理。
通讯作者: 曾静,E-mail:zengj@bjciq.gov.cn
数字出版日期:2016 - 11 - 4 14:34
数字出版网址:http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20161111.1434.002.html

埃希大肠杆菌(ATCC 15597)(美国标准菌种保藏中心)、人星状病毒(human astrovirus, HAstV)检测核酸标准物质样品(北京出入境检验检疫局检验检疫技术中心实验室制备);SuperScript® Ⅲ Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System(美国 Invitrogen 公司)、QIAamp Viral RNA Mini Kit(德国 QIAGEN 公司)、蛋白酶 K[天根生化科技(北京)有限公司]、Dynabeads®mRNA Purification Kit(美国 Life Technology 公司)、Trizol(美国 Invitrogen 公司);营养肉汤、普通营养琼脂/下层营养琼脂(北京陆桥技术股份有限公司);上层营养琼脂:胰蛋白胨 10 g, NaCl 5.0 g,葡萄糖 1.0 g,琼脂粉 6.0 g,2.5 mol/L $CaCl_2$ 储备液 10 mL,蒸馏水 1 000 mL,调节 pH 至 7.2[3];Fr-1iocell 恒温培养箱(德国 MMM 公司)、7900 HT Fast 实时荧光 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

1.2　样品来源　选取有日常生活中有代表性的 3 种贝类样品(蛏子、花蛤和青蛤)进行添加实验。所有样品均购自超市,购入后立即进行添加实验或者保存于 -20 ℃,实验前先检查样品的外壳是否完整。每种样品取 3 份,分别进行 4 个水平的添加。

1.3　方法

1.3.1　MS2 噬菌体培养　参照卫生部《消毒技术规范》(2002 年版)[4]方法,并加以改进。用 5.0 mL 营养肉汤溶解埃希氏大肠杆菌(ATCC 15597)的冻干粉末,37 ℃培养 17 ~ 24 h,划线接种于普通营养琼脂平板,37 ℃培养 17 ~ 24 h,从平板上挑取单个菌落接种于 5.0 mL 营养肉汤,37 ℃、220 r/min 培养 18 ~ 24 h,获得菌悬液。0.3 mL 菌悬液与 0.2 mL MS2 噬菌体溶液混匀,37 ℃孵育 5 min,加入 4 mL 冷却至 50 ℃左右的上层营养琼脂,混匀后倒入已铺好的下层营养琼脂上铺平,上层营养琼脂凝固,37 ℃倒置培养 17 ~ 24 h 后观察噬菌斑。5.0 mL磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗下上层琼脂,转入无菌试管,加数滴氯仿,37 ℃ 220 r/min 孵育 1 h,上层液体 5 000 r/min 离心15 min,上清液即为 MS2 噬菌体悬液。重复以上方法,实现 MS2 噬菌体大量增殖,经 0.22 μm 微孔滤器除菌后,分装为 1 mL/支, -80 ℃保存。

1.3.2　噬菌体效价　10 倍梯度稀释 MS2 噬菌体悬液,各稀释度接种 3 个平板,按 1.2.1 方法培养 17 ~ 24 h,取噬菌斑数在 30 ~ 300 个的平板计算 MS2 噬菌体效价:效价[噬斑形成单位(plaque forming unit, pfu)/mL] = 平均 pfu 数 ÷ 接种体积(mL) × 稀释倍数。

1.3.3　MS2 噬菌体稳定性　将已知效价的 MS2 噬菌体悬液分装到 1.5 mL 的环氧树脂(epoxy resin, EP)管中,每管 100 μL,共 100 管,分别随机抽取 25 支分配到室温(20 ~ 25)、4、-20 和 -80 ℃保存。制备后第 0、1、3、7、14、21 和 28 d 从 4 种保存条件中分别随机取 3 支,提取 RNA,检测循环阈值(cycle threshold, Ct),每支重复 3 次。

1.3.4　比较不同 RNA 提取方法回收率

1.3.4.1　向样品中添加 MS2 噬菌体及样品前处理　10 倍梯度稀释已知效价的 MS2 噬菌体悬液,参考 ISO/TS 品 15216 -2:2013(E)[5]方法,取完整的冷冻或鲜活的蛏子、花蛤和青蛤,用无菌镊子剥离出消化腺,称取(2.0 ± 0.2)g,转移到 50 mL 离心管内,加入 1 mL 无菌 PBS 旋涡振荡混匀,加入 10 μL MS2 噬菌体悬液,每份消化腺添加 1 个梯度,设置 1 个阴性添加对照,添加10 μL无菌 PBS。加入 10 μL 蛋白酶 K,漩涡振荡混匀,37 ℃ 320 r/min 孵育 1 h, 60 ℃水浴 15 min,3 000 r/min离心 5 min,取上清称重,记为 m1。

1.3.4.2　MS2 噬菌体 RNA 的提取和纯化　取 280 μL上清用于提取 RNA,记录质量,记为 m2。用 QIAamp Viral RNA Mini Kit、Trizol 裂解和 Trizol 裂解 + 磁珠纯化 3 种方法提取 RNA。

1.3.4.3　qRT-PCR 检测(表 1)　反应体系包括 10 μmol/L上下游引物各 1 μL, 10 μmol/L 探针 0.5 μL,RNA 模板 5 μL,总体积 25 μL。反应参数为:50 ℃ 15 min;95 ℃ 2 min;95 ℃ 15 s, 60 ℃ 30 s,45 个循环。MS2 噬菌体和人星状病毒(human astrovirus, HAstV)目的基因扩增的引物和探针序列分别来源于山东出入境检验检疫局和 SN/T2519[6]方法。

表 1　qRT-PCR 反应引物和探针序列

病毒	引物名称	序列(5′-3′)	扩增长度(bp)	参考毒株基因序列号及扩增基因位置
MS2 噬菌体	MS2-TM2-F	GGC TGC TCG CGG ATA CCC	202	JF 719743.13135 -3336
	MS2-TM2-R	TGA GGG AAT GTG GGA ACCG		
	MS2-TM2-P	JOE-ACC TCG GGT TTC CGT CTT GCT CGT-BHQ		
HAst	HAst-F	AAG CAG GTA ACT GTT GAG GTC	219	AB290149.1112 -329
	HAst-R	GGT TTT GGT CCT GTG ACA C		
	HAst-P	FAM-TCA ACG TCT CCG TAA CAT TGT CAA TAA-TAMRA		

中国公共卫生 CPH

1.3.4.4　建立标准曲线　取 10 μL MS2 噬菌体悬液，分别用 1.3.4.2 中 QIAamp Viral RNA Mini Kit、Trizol 裂解和 Trizol 裂解 + 磁珠纯化 3 种方法提取 RNA 后，焦碳酸二乙酯（diethyl paracabonate，DEPC）水 10 倍梯度稀释，qRT-PCR 检测 10^0、10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5} 梯度 RNA 的 Ct 值。MS2 噬菌体效价取 $\log_{10}$ 为横坐标，对应的 Ct 值为纵坐标绘制标准曲线，取 > 3 个呈良好线性关系的点，使 $R^2 > 0.98$。3 种提取方法均建立标准曲线。

1.3.4.5　回收率计算确定最适添加量　MS2 噬菌体悬液添加到贝类消化腺后，经前处理、核酸提取、qRT-PCR 检测 Ct 值，带入标准曲线计算回收率，当回收率 > 1% 时，认为 MS2 噬菌体 RNA 得到有效提取。确定最适添加范围，要求按此范围添加 MS2 噬菌体到不同贝类基质时，RNA 均能得到有效提取。

1.3.5　MS2 噬菌体对贝类食源性病毒检测影响

1.3.5.1　组别设置　阳性样品：向贝类消化腺中添加本实验室保存的 HAstV，制备 HAstV 阳性样品。阳性样品分为 2 组，一组添加 MS2 噬菌体，一组不添加；过程质控：按 1.3.4.4 建立标准曲线，向贝类消化腺单独添加已知效价的 MS2 噬菌体，提取 RNA，qRT-PCR 检测 Ct，计算其回收率，当回收率 > 1% 时，认为病毒 RNA 得到了有效提取；阴性对照：向贝类消化腺添加 10 μL 无菌 PBS，作为阴性对照；空白对照：DEPC 水。

1.3.5.2　扩增效率监控（图 1）　外部质控 RNA（external control RNA，EC）采用本实验室制备的 HAst 核酸标准物质样品，比较不同反应孔的 Ct 值，分析 qRT-PCR 中样品的扩增效率。

	1	2	3	4	5	6	7	8
A　人工感染 HAst 组	HAst 样品 RNA 5 μL	HAst 样品 RNA 10 倍稀释液 5 μL	HAst 样品 RNA 5 μL + EC RNA 1 μL	HAst 样品 RNA 10 倍稀释液 5 μL + EC RNA 1 μL	H_2O 5 μL + EC RNA 1 μL	阴性对照 RNA 5 μL	H_2O 5 μL（空白对照）	
B　人工感染 HAst + Ms2 组	（HAst + MS2）样品 RNA 5 μL	（HAst + MS2）样品 RNA 10 倍稀释液5 μL	（HAst + MS2）样品 RNA 10 倍稀释液 5 μL + EC RNA 1 μL	H_2O 5 μL + EC RNA 1 μL	阴性对照 RNA 5 μL	H_2O 5 μL（空白对照）		
C　MS2 过程质控品组	MS2 样品 RNA 5 μL	MS2 样品 RNA 10 倍稀释液5 μL	MS2 噬菌体原液 RNA 5 μL	MS2 噬菌体原液 RNA10 倍稀释液5 μL	MS2 噬菌体原液 RNA10^2 倍稀释液5 μL	MS2 噬菌体原液 RNA 10^3 倍稀释液5 μL	MS2 噬菌体原液 RNA10^4 倍稀释液5 μL	MS2 噬菌体原液 RNA 10^5 倍稀释液5 μL
D	H_2O 5 μL（空白对照）							
E								
F								
G								
H								

图 1　96 孔板点样示意图

1.3.5.3　结果判断　Ct（样品 RNA + EC RNA）− Ct（H_2O + EC RNA）< 2.00，认为荧光 RT-PCR 扩增效率较好；Ct（样品 RNA + EC RNA）− Ct（H_2O + EC RNA）> 2.00，认为样品中有荧光 RT-PCR 反应抑制剂，则进行 10^{-1} 样品检测；Ct（样品 RNA1 × 10 − 1 + EC RNA）− Ct（H_2O + EC RNA）< 2.00，认为荧光 RT-PCR 扩增效率较好；Ct（样品 RNA 1 × 10 − 1 + EC RNA）− Ct（H_2O + EC RNA）> 2.00，认为样品中有荧光 RT-PCR 反应抑制剂，结果不可取。比较添加与未添加 MS2 噬菌体悬液的 2 组样品的扩增效率，观察 MS2 噬菌体添加是否会干扰贝类中食源性病毒检测。

1.4　统计分析　采用 SPSS 17.0 统计软件分析，组间均数比较采用 t 检验，检验水准为 $\alpha = 0.05$。

2　结　果

2.1　MS2 噬菌体效价　上层营养琼脂出现透亮圆形噬菌斑，则说明 MS2 噬菌体活化增殖。不同稀释梯度的 MS2 噬菌体培养平板中，只有 10^{-9} 和 10^{-10} 2 个梯度出现了适合计数的噬菌斑，其中 10^{-9} 的 3 个平板噬菌斑计数分别为 72、78 和 64 pfu。本研究使用的 MS2 噬菌体悬液效价（pfu/mL）=（72 +

$78+64)/3 \div 0.2\times10^{7}=7.13\times10^{11}$(pfu/mL)。

2.2　MS2 噬菌体悬液稳定性(表 2)　100 μL 已知效价的 MS2 噬菌体悬液在 −20 ℃和 −80 ℃中保存 28 d 后,MS2 噬菌体 RNA 含量无明显变化[P = 0.653(−20 ℃);P = 0.561(−80 ℃)]。

表 2　MS2 噬菌体悬液稳定性检测结果(n = 6)

时间(d)	(15~25)℃			4 ℃			−20 ℃			−80 ℃		
	Ct 值	t 值	P 值	Ct 值	t 值	P 值	Ct 值	t 值	P 值	Ct 值	t 值	P 值
0	17.53±0.41			17.53±0.41			17.53±0.41			17.53±0.41		
1	17.79±0.38	−1.099	0.300	17.71±0.23	−0.947	0.366	17.76±0.12	−1.321	0.216	17.48±0.30	0.200	0.845
3	17.24±0.36	−1.193	0.263	17.62±0.18	−0.522	0.613	17.57±0.37	−0.207	0.841	17.61±0.69	−1.773	0.107
7	17.62±0.23	−0.488	0.636	17.71±0.30	−0.897	0.391	17.29±0.14	1.330	0.213	17.59±0.47	1.335	0.212
14	17.69±0.16	2.387	0.038[a]	17.51±0.12	1.798	0.102	17.33±0.35	0.905	0.387	17.29±0.14	1.357	0.205
21	17.54±0.35	−4.586	0.001[a]	17.68±0.58	−2.987	0.014[a]	17.32±0.12	1.167	0.270	17.51±0.26	0.059	0.954
28	18.49±0.22	5.054	<0.001[a]	18.13±0.17	3.311	0.008[a]	17.44±0.24	0.464	0.653	17.64±0.18	0.602	0.561

注:a 与第 0 d Ct 值比较,P < 0.05,差异有统计学意义。

2.3　不同 RNA 提取方法回收率比较(表 3)　向不同贝类消化腺中添加已知效价的 MS2 噬菌体,计算得出不同添加量和不同 RNA 提取方法对回收率的影响。结果表明,3 种提取方法中,Trizol 裂解提取方法的回收率均 <1%,不符合回收率 >1% 的要求。其他 2 种提取方法中,添加 10^{-1} ~ 10^{-2} 梯度的 MS2 噬菌体在不同贝类中回收率均 >1%。因此,MS2 噬菌体最适添加量可确定为 7.13×10^{8} ~ 7.13×10^{7} pfu/mL。回收率 = (A 计算/A 添加) × (m1/m2) × 100%。其中,A 计算为"标准曲线计算的 MS2 噬菌体含量",即已知效价的 MS2 噬菌体添加到贝类消化腺,qRT-PCR 检测的 Ct 在标准曲线上对应的 MS2 噬菌体效价;A 添加为"MS2 噬菌体添加量",即实际添加到贝类中的 MS2 噬菌体效价;m1 为样品前处理后上清质量,记为 m1;m2 为280 μL上清的质量。

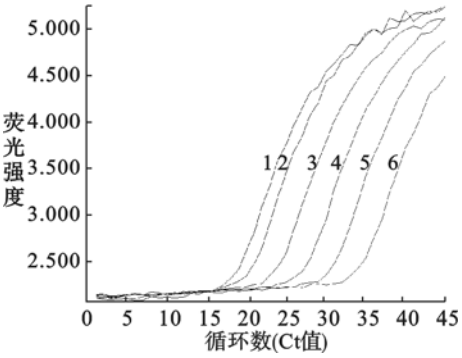
表 3　不同浓度梯度 MS2 噬菌体添加的回收率

贝类	RNA 提取方法	A 添加(pfu/mL) 7.13×10^{9}				A 添加(pfu/mL) 7.13×10^{8}				A 添加(pfu/mL) 7.13×10^{7}				A 添加(pfu/mL) 7.13×10^{6}			
		m1 (g)	m2 (g)	A 计算 (pfu/mL)	回收率 (%)	m1 (g)	m2 (g)	A 计算 (pfu/mL)	回收率 (%)	m1 (g)	m2 (g)	A 计算 (pfu/mL)	回收率 (%)	m1 (g)	m2 (g)	A 计算 (pfu/mL)	回收率 (%)
蛏子	试剂盒	1.811	0.280	1.73×10^{8}	15.7	1.776	0.284	2.45×10^{7}	21.5	1.879	0.285	7.04×10^{6}	65.1	1.884	0.282	8.08×10^{5}	75.7
	Trizol 裂解	1.811	0.283	2.23×10^{6}	0.2	1.776	0.285	5.72×10^{4}	0.05	1.836	0.284	2.21×10^{4}	0.2	1.884	0.286	2.16×10^{3}	0.2
	Trizol 裂解+磁珠纯化	1.811	0.276	1.08×10^{8}	9.8	1.776	0.277	1.60×10^{7}	14.4	1.879	0.281	1.04×10^{6}	9.8	1.884	0.289	6.55×10^{5}	59.9
花蛤	试剂盒	1.493	0.279	1.19×10^{8}	14.3	1.475	0.289	1.43×10^{7}	10.2	1.433	0.282	3.62×10^{6}	2.6	1.499	0.284	1.15×10^{4}	0.9
	Trizol 裂解	1.493	0.274	3.17×10^{6}	0.2	1.475	0.272	2.68×10^{5}	0.2	1.433	0.282	3.05×10^{4}	0.2	1.499	0.283	2.40×10^{3}	0.2
	Trizol 裂解+磁珠纯化	1.493	0.290	7.39×10^{6}	0.5	1.475	0.273	1.78×10^{6}	1.3	1.433	0.287	1.90×10^{5}	1.3	1.499	0.282	6.50×10^{4}	4.8
青蛤	试剂盒	2.144	0.286	2.73×10^{7}	2.8	1.708	0.285	1.13×10^{6}	9.1	1.898	0.285	8.39×10^{5}	8.8	1.750	0.284	1.57×102	0.1
	Trizol 裂解	1.542	0.277	6.63×10^{6}	0.5	1.514	0.268	3.81×10^{3}	<0.01	1.586	0.283	1.27×10^{3}	<0.01	1.616	0.287	1.26×10^{3}	0.1
	Trizol 裂解+磁珠纯化	2.144	0.281	1.16×10^{7}	1.2	1.708	0.286	2.75×10^{6}	2.3	1.898	0.290	1.31×10^{5}	1.2	1.750	0.281	6.53×10^{4}	5.7

2.4　MS2 噬菌体添加对贝类中病毒检测影响(图 2~3、表 4)　未添加 MS2 噬菌体阳性样品组中,Ct(样品 RNA + EC RNA) − Ct(H_2O + EC RNA) = 23.02 − 32.81 = −9.79 < 2.00;添加 MS2 噬菌体阳性样品组中,Ct(样品 RNA + EC RNA) − Ct(H_2O + EC RNA) = 23.53 − 32.87 = −9.34 < 2.00,说明 MS2 噬菌体添加不影响阳性样品 qRT-PCR 反应的扩增效率。过程质控:向贝类消化腺内添加的 MS2 噬菌体效价为 7.13×10^{8} pfu/mL;提取相同含量的 MS2 噬菌体的 RNA,10 倍梯度稀释,分别检测 Ct 值(图 2),以各浓度梯度的噬菌体效价 $\log_{10}$ 为横坐标,相对应的 Ct 值为纵坐标,建立标准曲线,标准曲线方程为:$Y = -3.267X + 46.658$,$R^2 = 0.995$。利用标准曲线方程计算回收率为 4.08% > 1%,表明 RNA 得到了有效提取,检测结果有效可信。空白对照和阴性对照均无扩增曲线,且 MS2 噬菌体和 EC RNA 均呈现良好"S"扩增曲线,2 种阳性样品 RNA 和阳性样 RNA 10^{-1} 稀释检测结果 Ct 值均 <40,且扩增曲线呈现良好的 S 型(图 3)。根据 ISO/TS 15216−2:2013(E)结果判定方法,认为 2 种阳性样

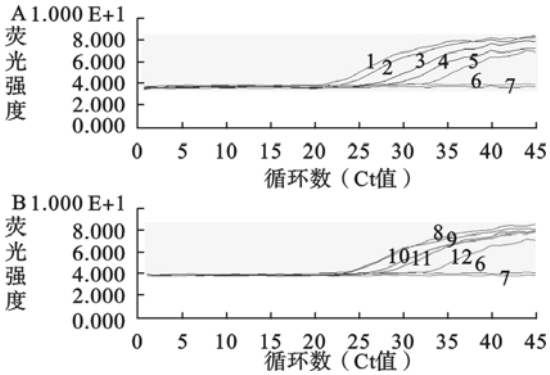
中国公共卫生 CPH

品均被检出,且 Ct 值比较接近(表 4),因此可以认为 MS2 噬菌体对贝类中病毒检测无影响。



注:1:7.13 × 10^8 pfu; 2:7.13 × 10^7 pfu; 3:7.13 × 10^6 pfu; 4:7.13 × 10^5 pfu; 5:7.13 × 10^4 pfu; 6:7.13 × 10^3 pfu。

图 2　MS2 噬菌体过程质控品标准曲线



注:A:人工感染 HAstV 样品;B:人工感染 HAstV + MS2 样品。1:样品 + EC;2:样品 × 10^{-1} + EC;3:样品;4:样品 × 10^{-1};5:H_2O + EC;6:阴性对照;7:H_2O;8:样品 + EC + MS2;9:10^{-1} + EC + MS2;10:样品 + MS2;11:样品 × 10^{-1} + MS2;12:H_2O + EC

图 3　2 种人工感染 HAst 阳性样品扩增曲线

表 4　2 种阳性样品 Ct 值检测结果($n = 3$)

阳性样品类型	样品 RNA 5 μL	样品 RNA1 × 10^{-1} 5 μL	样品 RNA 5 μL + EC RNA 1 μL	样品 RNA 1 × 10^{-1} 5 μL + EC RNA 1 μL	H_2O 5 μL + EC RNA 1 μL	阴性对照 5 μL	H_2O 5 μL (空白)
未添加 MS2 噬菌体	25.85 ± 0.24	28.15 ± 0.56	23.02 ± 0.42	25.95 ± 0.52	32.81 ± 0.57	—	—
添加 MS2 噬菌体	25.81 ± 0.33	27.82 ± 0.74	23.53 ± 0.88	25.78 ± 0.66	32.87 ± 0.35	—	—
t 值	0.170	0.616	0.906	0.350	0.166		
P 值	0.873	0.571	0.416	0.744	0.876		

3　讨　论

美国疾病预防控制中心(center for disease control, CDC)的数据表明,病毒已成为食源性疾病的重要病因[7]。常见的食源性病毒包括:轮状病毒(rotavirus, RV)、诺如病毒(norovirus, NoV)、HAstV、腺病毒、札如病毒等[8]。其中 RV 是引起儿童急性腹泻和儿童重症腹泻最常见的病毒,全球每年约有 1.14 亿儿童发生 RV 腹泻,中国每年约有 27 000 名 <5 岁儿童死于 RV 腹泻;而美国 CDC 监测数据估计 30% ~ 50% 的食源性腹泻与 NoV 有关;且 HAstV 已被确认为引起婴幼儿急性腹泻的重要病原体之一[9-12]。近 20 年来,食品中食源性病毒的检测方法和检测标准有了明显的发展。其中,国际上的检测标准主要为欧洲标准化委员会(European Committee of Standardization, CEN)发布的 ISO 技术标准 ISO/TS 15216 - 1 和 ISO/TS 15216 - 2,检测方法为 qRT-PCR 方法[5,13];中国的检测标准主要有 SN/T 2519 - 2010 等,主要为 RT-PCR、qRT-PCR 和逆转录环介等温核酸扩增技术(reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP)检测方法[6]。由此可见,以分子生物学为基础的 PCR 方法已成为食品中食源性病毒检测的主要手段。PCR 检测方法包括病毒富集、病毒 RNA 核酸提取、RNA 逆转录和 PCR 扩增反应等多个检测步骤,其中病毒富集和病毒 RNA 提取过程为关键步骤,必须对其进行有效的质量控制。ISO/TS 15216 - 1和 ISO/TS 15216 - 2[5,13] 中均指出,使用 qRT-PCR 检测食品中甲肝病毒和 NoV 时,需要应用可体外培养增殖的无包膜正向单链 RNA (+ssRNA)病毒进行过程质控,确保检测结果可靠性。该过程质控病毒应该与被检测的病毒大小相似,但与被检测病毒基因序列有明显的区别,且自然状态中不存在,只能人为添加到被检测样品中[14-16]。

ISO/TS 相关标准中以门哥病毒(Mengo virus) MC0 株进行过程质控品[5,13]。门哥病毒是一种非包膜的单链 RNA 病毒,属于小核糖体家族,其 MC0 株缺乏多聚胞嘧啶束,不具有毒力,与野生型生长特征相同[17]。但 ISO/TS 相关标准也指出,门哥病毒 MC0 株是基因修饰产物,且需要特定的实验条件,在不允许应用基因修饰生物或没有相关实验条件的实验室内,应用 qRT-PCR 食源性病毒检测时,应该使用其他的适合的过程质控[13]。有研究应用鼠诺如病毒 1(murine norovirus 1, MNV-1)对蔬菜中 HAV 和水中 NoV、人戊型肝炎病毒 qRT-PCR 检测进行过程质控[18-20]。Di Pasquale 等[21] 也应用猫嵌环状病毒(feline calicivirus, FCV)对瓶装天然矿泉水中 HAV qRT-PCR 检测进行过程质控;还有研究建议,可将 FCV 作为食品和水中 RNA 病毒检测方法的过程质控品[22]。虽然这些 RNA 病毒具有抗

DNase 和 RNase 消化的特点,能够对 RNA 提取过程进行监控,但是其均有生物传染性,不易培养和纯化,且有些用作过程质控品的 RNA 病毒保守基因位点较少。以 FCV 为例,其不同的病毒株之间表现出较高的遗传多样性,不利于引物、探针的设计,且被检测病毒目的基因的引物和探针易与 FCV 发生交叉时,因此 FCV 不适于用作食源性病毒检测的过程质控[23]。MS2 噬菌体是一种无包膜 + ssRNA 病毒,感染 F + (雄株)大肠埃希氏菌,直径 27 nm,易于培养和纯化,对人体无致病性,其基因组不含常见的食源性病毒的靶基因序列[24],因此可模拟待测病毒颗粒,对病毒浓缩、RNA 提取、RNA 逆转录和 PCR 扩增进行监控。Blaise-Boisseau 等[25]将 MS2 噬菌体用于食品和水体中 HAV qRT-PCR 检测的过程质控,取得了理想结果。Rolfe 等[26]报道采用 MS2 噬菌体为粪便样品中 NoV 检测的过程质控,研究表明是监控 PCR 检测假阴性结果的一种简便可靠的方法。此外,MS2 噬菌体也可用于评价病毒 RNA 提取方法,判断病毒核酸提取是否引入了 PCR 扩增抑制剂[27]。这些研究表明,普通的微生物实验室即可进行 MS2 噬菌体的培养与纯化,可用双层培养法确定其效价,不会对实验室人员带来感染风险,且 MS2 噬菌体基因组序列与常规的食品样品不发生交叉,能够有效监控 RNA 病毒检测的病毒富集和 RNA 提取过程,监控 PCR 扩增假阴性结果。

本研究采用 MS2 噬菌体作为食源性病毒 qRT-PCR 检测方法中的过程质控品,通过双层琼脂法计算 MS2 噬菌体悬液的效价,再向 3 种贝类消化腺添加不同稀释梯度的已知效价的 MS2 噬菌体悬液,计算分析回收率,比较 3 种病毒 RNA 提取方法,结果表明 Trizol 提取法不是有效的病毒 RNA 提取方法,需要结合其他核酸纯化浓缩方法完成提取工作,或者直接使用可靠的商品化试剂盒;进一步确定 MS2 噬菌体作为病毒核酸检测的过程质控品,最适添加量可为 $7.13 \times 10^8 \sim 7.13 \times 10^7$ pfu/mL。根据 ISO/TS 1526 - 2,2013 (E)[5]方法评价 MS2 噬菌体添加对阳性样品检测结果的影响,表明病毒扩增效率未受到 MS2 噬菌体添加的影响,添加和未添加 MS2 噬菌体的阳性样品均被荧光 RT-PCR 检出。因此 MS2 噬菌体可作为贝类中食源性病毒 qRT-PCR 检测的过程质控品,是监控假阴性结果的一种简便有效的方法。

参考文献

[1] Vermehren J, Kau A, Gärtner BC, et al. Differences between two real-time PCR-based hepatitis C virus (HCV) assays (RealTime HCV and Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan) and one signal amplification assay (Versant HCV RNA 3.0) for RNA detection and quantification[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(12): 3880 - 3891.

[2] Mikel P, Vasickova P, Kralik P. Methods for preparation of MS2 phage-like particles and their utilization as process control viruses in RT-PCR and qRT-PCR detection of RNA viruses from food matrices and clinical specimens[J]. Food Environ Virol, 2015, 7(2): 96 - 111.

[3] 凌振静,张朝武. MS2 噬菌体宿主范围及其相关特性的初步研究[J]. 现代预防医学, 2009, 36(14): 2725 - 2727, 2730.

[4] 中华人民共和国卫生部. 消毒技术规范(2002 年版)[S]. 北京:中华人民共和国卫生部, 2002.

[5] International Organization for Standardization. ISO/TS 1526-2, 2013. Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR part 2: Method for quanlitative detection. First edtion, corrected version[S]. Geneva: International Organization for Standardization, 2013.

[6] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 2519 - 2010 贝类中星状病毒检测方法 普通 PCR 和实时荧光 PCR 方法[S]. 北京:中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 2010.

[7] Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, et al. Foodborne illness acquired in the United States - major pathogens[J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(1): 7 - 15.

[8] 龚智翔. 上海地区儿童病毒性腹泻分子流行病学研究[D]. 上海:第二军医大学博士学位论文, 2010.

[9] Parashar UD, Burton A, Lanata C, et al. Global mortality associated with rotavirus disease among children in 2004[J]. J Infect Dis, 2009, 200(Suppl 1): S9 - 15.

[10] Naghipour M, Nakagomi T, Nakagomi O. Issues with reducing the rotavirus-associated mortality by vaccination in developing countries[J]. Vaccine, 2008, 26(26): 3236 - 3241.

[11] Blanton LH, Adams SM, Beard RS, et al. Molecular and epidemiologic trends of caliciviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the United States, 2000 - 2004[J]. J Infect Dis, 2006, 193(3): 413 - 421.

[12] Pativada M, Nataraju SM, Ganesh B, et al. Emerging trends in the epidemiology of human astrovirus infection among infants, children and adults hospitalized with acute watery diarrhea in Kolkata, India[J]. Infect Genet Evol, 2012, 12(8): 1685 - 1693.

[13] International Organization for Standardization. ISO/TS 1526 - 1, 2013. Micorobiology of food and animal feed-horizontal method for determination of hepatitis A cirus and norovirus in food using real-time RT-PCR part 1: Method for quantification. First edition, corrected version[S]. Geneva: International Organization for Standardization, 2013.

[14] Costafreda MI, Bosch A, Pintó RM. Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples[J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(6): 3846 - 3855.

[15] Le Guyader FS, Parnaudeau S, Schaeffer J, et al. Detection and quantification of noroviruses in shellfish[J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(3): 618 - 624.

[16] Butot S, Zuber S, Baert L. Sample preparation prior to molecular amplification: complexities and opportunities[J]. Curr Opin Virol, 2014, 4: 66 - 70.

[17] Martin LR, Duke GM, Osorio JE. Mutational analysis of the mengovirus poly(C) tract and surrounding heteropolymeric sequences[J]. J Virol, 1996, 70(3): 2027 - 2031.

[18] Coudray C, Merle G, Martin-Latil S, et al. Comparison of two extraction methods for the detection of hepatitis A virus in lettuces using the murine norovirus as a process control[J]. J Virol Methods, 2013, 193(1): 96 - 102.

[19] Hennechart-Collette C, Martin-Latil S, Guillier L, et al. Multiplex real-time RT-qPCR for the detection of norovirus in bottled and tap water using murine norovirus as a process control[J]. J Appl Microbiol, 2014, 116(1): 179 - 190.

[20] Martin-Latil S, Hennechart-Collette C, Guillier L, et al. Duplex RT-qPCR for the detection of hepatitis E virus in water, using a process control[J]. Int J Food Microbiol, 2012, 157(2): 167 – 173.
[21] Di Pasquale S, Paniconi M, Auricchio B, et al. Comparison of different concentration methods for the detection of hepatitis A virus and calicivirus from bottled natural mineral waters[J]. J Virol Methods, 2010, 165(1): 57 – 63.
[22] Mattison K, Brassard J, Gagné MJ, et al. The feline calicivirus as a sample process control for the detection of food and waterborne RNA viruses[J]. Int J Food Microbiol, 2009, 132(1): 73 – 77.
[23] Coyne KP, Christley RM, Pybus OG, et al. Large-scale spatial and temporal genetic diversity of feline calicivirus[J]. J Virol, 2012, 86(20): 11356 – 11367.
[24] 孙士鹏, 刘贵建. MS2 噬菌体衣壳蛋白与包装位点结合特异性及其生物学应用进展[J]. 生物技术通讯, 2014, 25(2): 259 – 262.
[25] Blaise-Boisseau S, Hennechart-Collette C, Guillier L, et al. Duplex real-time qRT-PCR for the detection of hepatitis A virus in water and raspberries using the MS2 bacteriophage as a process control[J]. J Virol Methods, 2010, 166(1 – 2): 48 – 53.
[26] Rolfe KJ, Parmar S, Mururi D, et al. An internally controlled, one-step, real-time RT-PCR assay for norovirus detection and genogrouping[J]. J Clin Virol, 2007, 39(4): 318 – 321.
[27] Shulman LM, Hindiyeh M, Muhsen K, et al. Evaluation of four different systems for extraction of RNA from stool suspensions using MS-2 coliphage as an exogenous control for RT-PCR inhibition[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e39455.

收稿日期: 2016 – 07 – 06　　(吴少慧编辑　郭薇校对)

· 检验技术 ·

鼠源抗烟曲霉单链抗体库制备及鉴定*

李新鸣[1,2], 孙冶[1,2], 海晓欧[1,2], 黄天龙[1], 杜歌[1], 王凤杰[1], 齐金萍[1], 肖纯凌[2]

摘　要: 目的　构建鼠源抗曲霉菌单链抗体(scFv)噬菌体展示文库并进行初步鉴定, 为制备用于侵袭性曲霉感染实验室诊断的特异性抗体提供新的方法。**方法**　利用噬菌体展示技术构建鼠源抗烟曲霉半乳甘露聚糖(GM) ScFv 库, 经过 4 轮"吸附 – 洗脱 – 扩增"淘选富集, 随机挑选克隆进行可变区基因测序确定文库多样性, 并用 phage-ELISA 筛选烟曲霉特异性结合的克隆。**结果**　构建的 scFv 噬菌体表达文库, 库容量约为 1.8×10^7; 经 4 轮富集筛选, 洗脱的表达 scFv 噬菌体滴度渐增; 随机挑选出 4 轮筛选后的 20 个克隆, 其可变区基因序列不同; 随机挑选出 4 轮筛选后的 90 个克隆, 其中 6 个克隆与烟曲霉 GM 特异性结合, 而与对照的白假丝酵母菌无结合。**结论**　构建并初步鉴定了抗曲霉菌单链抗体库, 库容量大, VH 和 VL 区具备多样性; 筛选的 scFv 与曲霉菌 GM 特异性结合, 提供了快速制备、筛选 GM 高特异性抗体分子的新方法。

关键词: 单链抗体(scFv); 噬菌体表达文库; 烟曲霉; 半乳甘露聚糖(GM)
中图分类号: R 33　**文献标志码:** A　**文章编号:** 1001-0580(2016)11-1590-04　DOI: 10.11847/zgggws2016-32-11-38

Preparation and characterization of a murine single chain antibody library against *Aspergillus fumigatus*

LI Xin-ming*, SUN Ye, HAI Xiao-ou, et al (* *Institute of Basic Medicine, Shenyang Medical College, Shenyang, Liaoning Province* 110034, China)

Abstract: Objective　To construct a murine single chain antibody (scFv) library against galactomannan (GM) of *Aspergillus fumigatus* with phage display technique and to enrich and select specific anti-GM single chain antibodies and to identify the antibody library. **Methods**　The total RNA was extracted from the spleen of mice immunized with *Aspergillus fumigatus* GM. The antibody VH and VL genes were amplified with real-time reverse transcription PCR (RT-PCR), and the VH and VL fragments were linked by overlapping PCR. The linked scFv fragments were transformed into pCANTAB5E phage display system, and the phage display library of scFv was constructed with the assistance of the helper phage. Immunotubes coated with gradient GM antigens were used for the screening of the murine natural source scFv phage antibody library. After four rounds of "absorption-elution-amplification" panning, positive clones obtained were sequenced and binding activity of scFv clones were detected with phage-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results**　The phage display library of scFv against *Aspergillus* GM was constructed, which was about 1.8×10^7 clones in capacity. Using *Aspergillus* GM coated immune test tubes, the phage titers were increased after 4 rounds of panning.

* **基金项目:** 辽宁省科学事业公益研究基金(GY2014 – A – 007); 沈阳市科学技术项目计划 (F14 – 181 – 1 – 00); 沈阳医学院科研立项项目 (20141022)
作者单位: 1. 沈阳医学院基础医学院, 辽宁 沈阳 110034; 2. 辽宁省环境污染与微生态重点实验室
作者简介: 李新鸣(1973 –), 女, 辽宁沈阳人, 副教授, 博士, 研究方向: 呼吸道微生态及抗感染免疫。
通讯作者: 肖纯凌, E-mail: xiaochunling@symc.edu.cn
数字出版日期: 2016 – 11 – 4 14:40
数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20161111.1440.004.html