

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671-9638. 20205960

· 论 著 ·

## 粪便标本中诺如病毒 G II 拷贝数定量检测方法的建立和应用

赵跃丽<sup>1,2,3</sup>, 饶清<sup>2,3</sup>, 孙强明<sup>2,3</sup>, 张兰胜<sup>1</sup>

(1. 大理大学药学与化学学院, 云南 大理 671000; 2. 中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所, 云南 昆明 650118; 3. 云南省重大传染病疫苗研发重点实验室, 云南 昆明 650118)

**[摘要]** **目的** 构建诺如病毒 G II (Norovirus Genogroup II, NoV G II) 拷贝数标准质粒及其检测体系。**方法** 将合成高度保守的 NoV G II 基因序列片段克隆至 pUC57 载体上, 构建 NoV G II 标准质粒, 采用聚合酶链反应 (PCR) 进行验证。通过实时荧光定量 PCR 扩增曲线结果绘制 Ct 值与病毒拷贝数的标准曲线, 求得其相应的标准曲线方程。采用建立的标准质粒及其检测体系对 2018 年 12 月昆明市儿童医院 4 份临床粪便标本进行检测。**结果** 经 PCR 验证, NoV G II 拷贝数的标准质粒构建正确。采用实时荧光定量 PCR 的扩增曲线获得 Ct 值与病毒拷贝数相对应的标准曲线方程为  $Y = -3.972X + 39.03, R^2 = 0.991$ , 4 份粪便标本原液 NoV G II 病毒拷贝数分别为 30 443.45, 9 468.40, 53 176.69, 4 493.12 copies/ $\mu$ L。**结论** 成功建立用于检测粪便标本中 NoV G II 病毒拷贝数的标准质粒及其检测体系, 可为疾病的预防控制和相关试验研究提供有效的定量检测方法。

**[关键词]** 诺如病毒 G II; 病毒拷贝数; 实时荧光定量 PCR; 标准曲线**[中图分类号]** R373

## Construction and application of quantitative detection method for Norovirus G II copy number in fecal specimens

ZHAO Yue-li<sup>1,2,3</sup>, RAO Qing<sup>2,3</sup>, SUN Qiang-ming<sup>2,3</sup>, ZHANG Lan-sheng<sup>1</sup> (1. School of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Dali 671000, China; 2. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Kunming 650118, China; 3. Key Laboratory of Vaccine Research and Development on Severe Infectious Diseases of Yunnan Province, Kunming 650118, China)

**[Abstract]** **Objective** To construct the standard plasmid and detection system for copy number of Norovirus G II (NoV G II). **Methods** The synthesized highly conserved NoV G II gene sequence was cloned into pUC57 vector for constructing NoV G II standard plasmid, then plasmid was verified by polymerase chain reaction (PCR). The standard curve of Ct value and copy number of NoV G II was drawn according to real-time fluorescence quantitative PCR amplification curve, and corresponding standard curve equation was obtained. Four clinical fecal specimens obtained from the Children's Hospital of Kunming in December 2018 were detected by the constructed NoV G II standard plasmid and detection system. **Results** PCR proved that the standard plasmid for detecting copy number of NoV G II was constructed correctly. Standard curve equation of Ct value and viral copy number based on amplification curve of real-time fluorescence quantitative PCR was obtained as follows:  $Y = -3.972X + 39.03, R^2 = 0.991$ . Viral copy numbers in 4 fecal specimens were 30 443.45, 9 468.40, 53 176.69, and 4 493.12 copies/ $\mu$ L respectively. **Conclusion** The standard plasmid and its detection system for detecting the copy number of NoV G II virus in fecal specimens are successfully established, which can provide an effective quantitative detection method for disease prevention and control and related experimental research.

[收稿日期] 2019-11-11

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81171946); 国家十二五重大新药创新科技重大专项(2012ZX09104302)

[作者简介] 赵跃丽(1992-), 女(傣族), 云南省凤庆县人, 硕士研究生, 主要从事分子流行病学研究。

[通信作者] 张兰胜 E-mail: zlsj0888@163.com

**[Key words]** Norovirus G II; viral copy number; real-time fluorescence quantitative PCR; standard curve

诺如病毒(Norovirus, NoV)是一种 RNA 病毒,该病毒无包膜、单链、正向,其基因组长度为 7.5~7.7 kb,病毒颗粒直径长 27~40 nm,属于杯状病毒(Caliciviridae),其基因(小鼠 NoV 除外)包含 3 个编码不同功能蛋白的开放阅读框(ORF1, 2, 3)<sup>[1]</sup>。ORF1 主要编码 6 个非结构蛋白,从 N 端依次到 C 端编码的蛋白质分别为 p48、NTPase、p22、VPg、3CLpro、RdRp<sup>[2]</sup>;该病毒的主要结构蛋白 VP1 和次要结构蛋白 VP2 分别由 ORF2 和 ORF3 编码<sup>[3]</sup>。根据其结构蛋白 VP1 的氨基酸同源性的不同, NoV 主要划分为 7 个基因型(G I ~ V II),其中以 G II 基因型最常见<sup>[4]</sup>。5 岁以下儿童中绝大部分胃肠炎的暴发均与 NoV G II 有关,流行范围和其易感性仅次于轮状病毒,疫情又常在幼托机构和小学低年级中发生<sup>[5]</sup>。由于 NoV G II 传染性强,其新变种每 2~4 年出现一次,且极易引起全球性的暴发流行,给全球公共卫生事业带来了沉重的疾病负担。通过感染患者粪便或呕吐物产生的气溶胶,或间接接触被感染患者排泄物污染的环境均可使 NoV G II 发生二次传播,甚至在不同物种间 NoV G II 也有发生传播的可能<sup>[6-7]</sup>,因此,研究和开发敏感、可靠、标准化的实验室病毒定量检测方法,对有效防治 NoV G II 具有重要意义。

为建立一种快速的 NoV G II 拷贝数标准质粒及其检测体系,本试验通过 BioEdit 对 NCBI 数据库中下载的所有 NoV G II 株全基因序列进行比对,选取同源性好且高度保守的片段构建标准对照质粒,根据构建的 NoV G II 标准品基因序列设计其特异性检测引物,优化反应体系,最终建立一种用于检测 NoV G II 拷贝数的逆转录实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测体系,准确快速地定量检测临床粪便标本的病毒拷贝数,为临床诊断及治疗提供重要参考依据。

## 1 材料与方 法

1.1 主要试剂与材料 病毒 RNA 提取试剂盒购于 Qiagen 公司,逆转录试剂盒和质粒小量提取试剂盒购于天根(TIANGEN)生化科技(北京)有限公司,荧光定量试剂 ALL-in-One™ qPCR Mix 试剂盒购于复能基因有限公司(GeneCopoeia),loading buffer、PCR MIX 购于日本 TaKaRa 公司。4 份儿

童腹泻粪便标本来自于 2018 年 12 月昆明市儿童医院。

1.2 NoV G II 标准质粒与特异性引物 在 NCBI 数据库中下载所有 NoV G II 株全基因序列,用 BioEdit 进行全基因序列比对,选取同源性好、高度保守、大小为 500 bp 的片段为标准品并克隆到载体 pUC57 上,且根据该片段设计特异性引物。普通 PCR 上游引物 CoG2F: 5'-CARGARBCNATGTYAGRTGGATGAG-3',普通 PCR 下游引物 G2-SKR: 5'-CCRCCNGCATRHCCRTTTRTACAT-3'; q-PCR 上游引物 G2F: 5'-GAATGAAGATGGCGTCGAGTG-3', q-PCR 下游引物 G2R: 5'-CCAAATGGGAAAGGTAGGGAT-3',标准品片段与引物由昆明硕擎生物科技公司合成。

1.3 腹泻粪便标本病毒核酸(RNA)提取 依据 QIAamp 公司病毒 RNA 提取试剂盒的说明书,按操作流程处理分装的粪便标本,最后用 50 μL DEPC H<sub>2</sub>O 溶解所提取的 RNA,静置 2 min 后离心收集提取的 RNA。

1.4 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR) 使用天根公司的逆转录试剂盒,参考试剂盒说明书采用 20 μL 体系。反应体系分为两步,首先取 2 μL 5 × gDNA Buffer(5 × gDNA Buffer 含有高效去除基因组 DNA 的 gDNase,可以去除 gDNA,有效避免 Total RNA 中基因组的干扰),加 8 μL RNA 至反应管中,充分混匀,短暂离心 42℃ 孵育 3 min 后置于冰上;其次取 2 μL 10 × King RT Buffer、1 μL FastKing RT Enzyme Mix、2 μL FQ-RT Primer Mix、5 μL RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 加入第一步反应液中,充分混匀,短暂离心后 42℃ 孵育 15 min,95℃ 孵育 3 min,置于 4℃ 终止反应。

1.5 标准质粒的扩增 合成的标准品片段连接至载体 PUC57 上,连接产物转化感受态 E. coli DH-5α,挑单个独立菌落接种至 5 mL 液体培养基中,加入氨苄西林(100 μg/mL)5 μL,置于摇床震荡 14 h,使用天根生化科技(北京)有限公司的质粒小量提取试剂盒进行质粒提取,采用紫外分光光度计检测提取质粒的浓度(ng/μL),并按下式计算标准质粒的拷贝数。

$$\text{拷贝数}(\text{copies}/\mu\text{L}) = \frac{\text{标准质粒浓度} \times 6.022 \times 10^{23}}{\text{模版 DNA 长度} \times 10^9 \times 650}$$

1.6 标准质粒与粪便标本的验证 将扩增的质粒

稀释 100 倍和粪便标本 cDNA 同时进行普通 PCR 验证,采用 25  $\mu$ L 反应体系,包括上、下游引物各 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 8.5  $\mu$ L, Mix 12.5  $\mu$ L, 稀释的质粒和标本 cDNA 原液 2  $\mu$ L, 充分混匀,短暂离心,放入 PCR 仪中。扩增程序如下:98 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 98 $^{\circ}$ C 10 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 进行 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 PCR 产物 5  $\mu$ L 加入 1% 的琼脂糖凝胶的上样孔中,采用 120 V 的电压进行电泳。将出现目的条带的 PCR 产物送至昆明硕擎生物科技公司进行测序。

1.7 实时荧光定量 PCR 将扩增的 NoV G II 标准质粒用 ddH<sub>2</sub>O 按梯度从 10<sup>-1</sup> 稀释至 10<sup>-7</sup> 浓度,采用实时荧光定量 PCR 检测,反应体系选择 10  $\mu$ L, 包括 qPCR Mix 5  $\mu$ L (qPCR Mix 是含有 SYBR<sup>®</sup> Green 染料的即用型预混液), ddH<sub>2</sub>O 3  $\mu$ L, q-PCR 上、下游引物各 0.5  $\mu$ L, 标准质粒 1  $\mu$ L, 同时设 3 个阴性对照孔,以 ddH<sub>2</sub>O 作为阴性对照。扩增程序为 95 $^{\circ}$ C 5 min, 95 $^{\circ}$ C 10 s, 56 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 进行 40 个循环;65 $^{\circ}$ C 5 s, 95 $^{\circ}$ C 50 s。以获得的 NoV G II 标准质粒的溶解峰与扩增曲线,绘制 NoV G II 标准质粒的标准曲线,标准曲线 Y 轴是 RT-qPCR 检测所获得的标准质粒 Ct 值, X 轴为计算求得的标准质粒拷贝数 log<sub>10</sub>, NoV G II 标准质粒的标准曲线方程根据标准曲线求得。

1.8 病毒拷贝数 对上述 1.6 获得的并且与 BLAST 对比确定为 G II 阳性的粪便标本,随机抽取 4 份粪便标本的 RT-PCR 产物进行定量 PCR,获得 Ct 值,再根据 NoV G II 标准质粒获得的标准曲线和求得的标准曲线方程计算获得粪便上清标本中 NoV G II 的拷贝数。定量 PCR 以标准质粒作为阳性对照组, ddH<sub>2</sub>O 作为阴性对照组。

## 2 结果

2.1 普通 PCR 验证结果 将 4 份粪便标本普通 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图和序列进行比对,结果确定标本中含 G II 组 NoV。粪便标本 NoV G II PCR 产物电泳及序列比对结果见图 1、2。



Maker 为分子量标准;标本 1、2、3、4 为粪便标本。

图 1 粪便标本 NoV G II PCR 产物电泳图

Figure 1 Electrophoresis map of PCR products of NoV G II in fecal specimen

标本 1	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
✓	Norovirus GII isolate AHFD-CZ-NoV17107VP1/CHN nonstructural polyprotein (ORF1) and VP1 (ORF2) genes, partial cds	612	612	97%	4e-171	98.29%	MK213835.1
标本 2	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
✓	Norovirus GII isolate AHFD-HS-NoV16079VP1/CHN nonstructural polyprotein (ORF1) and VP1 (ORF2) genes, partial cds	621	621	98%	6e-174	98.31%	MK213814.1
标本 3	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
✓	Norovirus GII isolate AHFD-CZ-NoV16007VP1/CHN nonstructural polyprotein (ORF1) and VP1 (ORF2) genes, partial cds	608	608	98%	5e-170	97.75%	MK213808.1
标本 4	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
✓	Norovirus GII isolate Norovirus/Hu/GII P16_GII 2/NSW3903/2017/AU nonstructural polyprotein (ORF1) and VP1 (ORF2) genes, partial cds	595	595	98%	4e-166	97.18%	MK280962.1

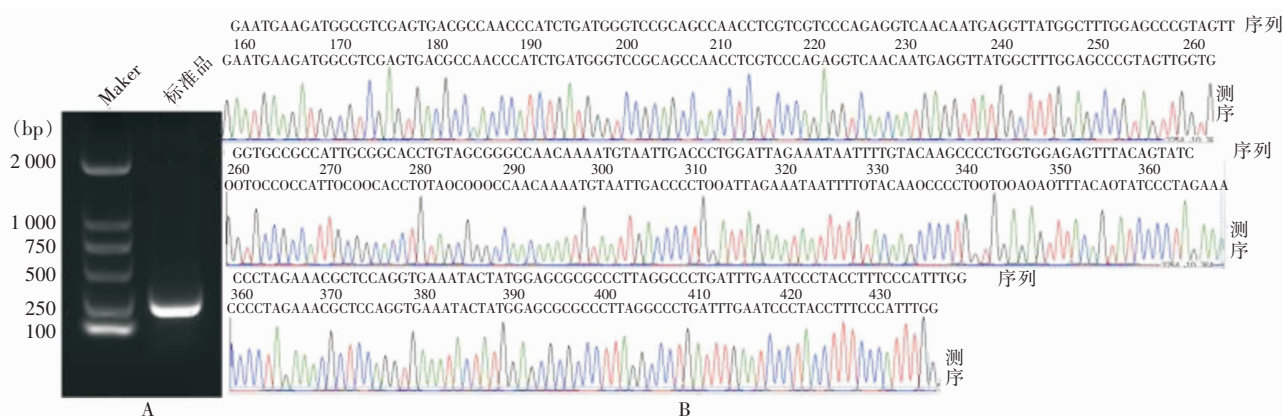
图 2 粪便标本 NoV G II 序列对比图

Figure 2 Sequence alignment of NoV G II sequence of fecal specimens

2.2 标准质粒的扩增与验证结果 采用质粒小量提取试剂盒按说明书操作步骤提取扩增的 NoV G II 标准品质粒,使用紫外分光光度计测其浓度为 321.25 ng/ $\mu$ L,再将 NoV G II 标准质粒稀释 100 倍后进行普通 PCR 取其扩增产物采用 1% 的琼脂糖凝胶电泳。见图 3A。将扩增的 NoV G II 标准品质粒取 4  $\mu$ L 与其普通 PCR 产物送至昆明硕擎生物

科技公司进行测序,测序结果在 BLAST 上进行比对,比对结果表明质粒嵌合序列与设计序列 100% 吻合。见图 3B。

2.3 标准曲线图 根据荧光定量 PCR 的扩增曲线,可直接获得各个标准质粒相应的 Ct 值,并按照公式计算标准质粒的拷贝数。NoV G II 标准质粒的荧光定量 PCR 的扩增曲线与溶解曲线见图 4。



A: 标准质粒的电泳图; B: 标准质粒测序峰。

图 3 NoV G II 标准质粒 PCR 产物电泳及测序结果

Figure 3 Electrophoresis and sequencing results of PCR products of NoV G II standard plasmid

使用紫外分光光度计测得 NoV G II 标准质粒浓度为 321.25 ng/μL, DNA 长度为 3 653 bp, 按照公式计算获得其拷贝数为  $8.15 \times 10^{10}$  copies/μL, NoV G II 标准质粒拷贝数的 log10 值见表 1。以 RT-qPCR 检测所获得的 NoV G II 标准质粒拷贝数 log10 作

为 X 轴, 其 Ct 值作为 Y 轴, 绘制 NoV G II 标准质粒的标准曲线, 其标准曲线方程根据标准曲线可求得为  $Y = -3.972X + 39.03$ ,  $R^2 = 0.991$ , 标准曲线见图 5。

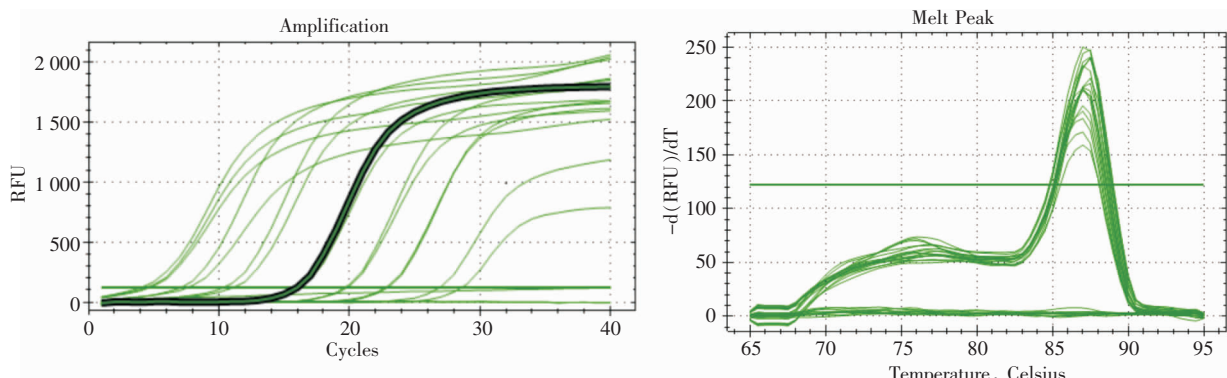


图 4 NoV G II 标准质粒荧光定量 PCR 的扩增曲线与溶解曲线

Figure 4 Amplification curve and dissolution curve of NoV G II standard plasmid by fluorescence quantitative PCR

表 1 NoV G II 标准质粒检测结果

Table 1 Detection results of NoV G II standard plasmid

稀释度	Ct 平均值	拷贝数(copies/μL)	拷贝数对数值
0.1	4.07	8 150 000 000	9.91
0.01	6.98	815 000 000	8.91
0.001	10.58	81 500 000	7.91
0.0001	16.03	8 150 000	6.91
0.00001	19.62	815 000	5.91
0.000001	22.64	81 500	4.91
0.0000001	27.65	8 150	3.91

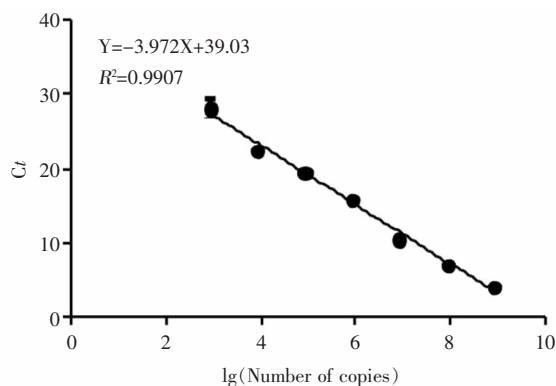


图 5 NoV G II 标准质粒标准曲线

Figure 5 Standard curve of NoV G II standard plasmid

2.4 粪便标本测序分型及其拷贝数 4 份粪便标本进行荧光定量 PCR 检测获得相应的 Ct 值,且各 Ct 分布在标准曲线范围内,将荧光定量 PCR 产物送至昆明硕擎生物科技公司进行测序,测序结果通过 NCBI 网站上的 BLAST 进行比对,比对结果及序列见表 2,与普通 PCR 结果一致。4 份粪便标本 NoV G II 检测结果曲线为,标本 1:  $Y = -3.152X + 23.45, R^2 = 0.95$ ; 标本 2:  $Y = -2.730X + 26.33, R^2 =$

$0.96$ ; 标本 3:  $Y = -3.075X + 23.63, R^2 = 0.96$ ; 标本 4:  $Y = -2.166X + 29.14, R^2 = 0.89$ 。见图 6、7。4 份粪便标本原液病毒拷贝数分别为 30 443.45、9 468.40、53 176.69、4 493.12 copies/ $\mu\text{L}$ ,标本原液及稀释液 NoV G II 拷贝数检测结果见表 3。对标本稀释后进行 NoV G II 拷贝数检测,最低可以检测的拷贝数为 24.66 copies/ $\mu\text{L}$ 。

表 2 4 份粪便标本的分型及其序列

Table 2 Typing and sequences of 4 fecal specimens

序号	分型	序列
标本 1	G II. 4	GGTGCTGATAAGTAGGGATTTAGATCCAGGGCCCAAGGGCGCGCTCCATAGTATTTACCTGGAGCGTT TCTAGGGGATACTGTAAACTCTCCACCAGGGGCTGTACAAAATTGTTTCTAATCCAGGGGTCAATTAC ATTTTGTGGCCCGCTACGGGTGCCGCAATGGCGGCACCAACAACGGGCTCCAGAGCCATAACCTCATT GTTGACCTCTGGGACGAGGTTGGCTGCGGACCCATCAGATGGGTTGACGTCCTCGACGCCATCTTCATT CACAAAAGTGGGAGCCAGATTGCGATCGCCCTCCCACGTGCTCAGATCTGAGAATCTCATCCACCTAAAA TTTGGGCTCTCTG
标本 2	G II. Pe - G II. 4	GGTGCTGAATAAGTAGGGATTTAGATCCAGGGCCCAAGGGCGCGCTCCATAGTATTTACCTGGAGCGT TTCTAGGGGATACTGTAAACTCTCCACCAGGGGCTGTACAAAATTATTTCTAATCCAGGGGTCAATTA CATTTTGTGGCCCGCTACAGGTGCCGCAATGGCGGCACCAACAACGGGCTCCAGAGCCATAACCTCATTG TTGACCTCTGGGACGAGGTTGGCTGCGGACCCATCAGATGGGTTGGCGTCACTCGACGCCATCTTCATTCA AAAAGTGGGAGCCAGATTGCGATCGCCCTCCCACGTGCTCAGATCTGAGAATCTCATCCACCTAAAATT GGGCTCTCTGA
标本 3	G II. P12 - G II. 3	GAGATGGCGCAAGATAGGGGTTATCTCTGGGCCATTCCAATTGAGGAGCACTTCACCAGGGGAATTC CTAGGAGACACTGTGAACTCACCACCAGGTGCTGCACAAAATTATTCATAATCCAGGGATCAATTAT ATTTTGTGGCCGGTGAGGGGTGCTGCTATCGTGCACCCGCACTGGATCTAGCGCCATTGCCTCATTG TTGATCTCTGGGACGAGGCCGGCGGCACCATCATTAGATGGGGTGGCGTCACTCGACGCCATCTTCAT TCACAAAAGTGGGAGCCAGATTGCGATCGCCCTCCCACGTGCTCAGATCCGAGAATCTCATCCACCTA AACTTGGGCTCTCCC
标本 4	G II. P16 - G II. 2	TTGTTAGTGCAAGATAGGATTTATTCTGGACCAACTCTAGACTCAGTAGCACTTCACCAGGGGCATTTCC GGGGAGAGACTGTAAATTCACCATTGGGGGCTGGACAAAATTGCTCTAATCCAAGGGTCTATAATAT TTGTTTGACCGGTGACGAGGCTGCCAAGGCGCACCCAGCCACGGTTCAAGAGCCATGACCTCATTGTT ACTTTCTGGCAGAGGCCGGCTGCACCATCAGTAGATGGAGCGGCGTCAATTCGACGCCATCTTCATTAC AAAATTGGGAGCCAGATTGCGATCGCCCTCCCACGTGCTCAAGTCAGAAAACCTCATCCACCTAAAATT GGGCTCTCTGG

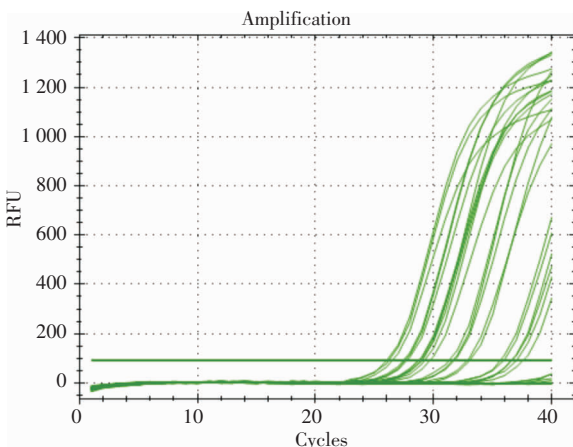


图 6 粪便标本 3 荧光定量 PCR 扩增曲线

Figure 6 Amplification curve of fecal specimens 3 by fluorescence quantitative PCR

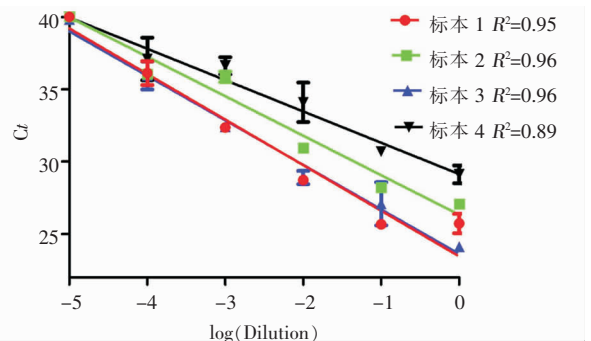


图 7 4 份粪便标本荧光定量 PCR 检测结果曲线图

Figure 7 Curve of fluorescence quantitative PCR detection results of 4 fecal specimens

**表 3** 粪便标本原液及各稀释度中 NoV G II 拷贝数检测结果**Table 3** Detection results of copy number of stock solution and dilution of NoV G II in fecal specimens

标本号	稀释梯度	Ct 平均值	病毒拷贝数(copies/ $\mu$ L)
标本 1	原液	25.06	30 443.45
	$10^{-1}$	25.66	21 522.18
	$10^{-2}$	28.72	3 616.10
	$10^{-3}$	32.36	424.96
	$10^{-4}$	36.13	53.20
	$10^{-5}$	-	-
标本 2	原液	27.06	9 468.40
	$10^{-1}$	28.21	4 824.06
	$10^{-2}$	31.97	964.86
	$10^{-3}$	35.86	57.07
	$10^{-4}$	36.05	48.90
	$10^{-5}$	-	-
标本 3	原液	24.12	53 176.69
	$10^{-1}$	27.08	13 077.27
	$10^{-2}$	28.90	3 459.19
	$10^{-3}$	32.41	410.36
	$10^{-4}$	35.95	66.78
	$10^{-5}$	37.54	38.04
标本 4	原液	28.34	4 493.12
	$10^{-1}$	31.21	1 672.79
	$10^{-2}$	35.36	73.51
	$10^{-3}$	36.03	61.73
	$10^{-4}$	35.20	91.60
	$10^{-5}$	37.38	24.66

### 3 讨论

NoV G II 感染性腹泻在全世界范围内均有流行,可以感染所有人群,甚至威胁 5 岁以下儿童、60 岁以上老人和有潜在疾病患者的生命,因此接种疫苗对这一人群非常有益。目前,还没有获得被批准的可以预防和治疗 NoV 感染的疫苗,其中 NoV 基因型的多样性、抗原漂移突变、不能在体外细胞培养中生长和缺乏合适的动物模型等是阻碍疫苗研究的主要因素<sup>[8-12]</sup>。近年来,我国北京、上海、香港等多地发生多起 NoV 感染暴发,暴发程度仅次于轮状病毒,绝大多数暴发主要是由 NoV G II 基因型引起,并且随着时间的推移 NoV 疫情不断上升、加重,给我国的医疗卫生事业造成了严重的疾病负担<sup>[13-16]</sup>。因此,寻找早期诊断 NoV G II 感染的方法,对于其

感染控制和临床治疗具有十分重要的意义。目前,虽然 RT-PCR 是 NoV G II 主要的诊断方法,但是 RT-PCR 在操作过程中易发生交叉污染,导致假阳性,需要测序才能确定病毒类型,并且对于检测病毒含量低的标本灵敏度低,不能进行定量测定无法获得病毒的拷贝数,不利于对患者感染程度进行判断<sup>[17]</sup>。因此,研究开发敏感、可靠、标准化的实验室 NoV G II 定量检测方法对有效防治 NoV G II 具有重要意义。本试验在扩增曲线中设定了荧光阈值,只有荧光 RFU 值高于阈值才有相应的拷贝数结果,在扩增结束后设定了溶解曲线程序,只有扩增产物是目的片段时,扩增曲线的溶解曲线才单一且与溶解值一致,通过以上方法排除假阳性。本试验方法能在感染早期 NoV 含量低的标本中,快速、准确地检测出 NoV,并通过定量测定获得病毒的拷贝数,从而对患者感染程度作出准确判断,指导用药剂量及其用药疗程,还可以对重病患者的病程发展情况进行实时监控,为患者的临床治疗及预后判断提供了一种有效的检验方法。

本研究通过对 NoV G II 基因组序列进行分析,针对 VP1 衣壳蛋白高度保守序列片段设计扩增特异性引物,此引物在试验中显示出较高的敏感性。选取 VP1 衣壳蛋白高度保守序列片段引物区序列 500 bp,构建 NoV G II 标准质粒。得到标准曲线方程: $Y = -3.972X + 39.03, R^2 = 0.991$ 。试验中相应浓度的 Ct 值差异较小,且在误差范围内,证明该方法的稳定性和准确性都较好,可根据标准曲线对试验标本中的 NoV G II 进行绝对定量。对 4 份 2018 年 12 月来自于云南省昆明市儿童医院的 NoV G II 感染患者的粪便标本分别进行荧光定量 PCR 检测,参照标准曲线方程获得相应的粪便标本拷贝数。通过试验验证,该标准质粒具有较高的敏感性,并且可对标本中 NoV G II 进行定量测定,为疾病的预防控制和相关试验研究提供了有效的定量检测方法。

### [参 考 文 献]

- [1] Thorne LG, Goodfellow IG. Norovirus gene expression and replication[J]. J Gen Virol, 2014, 95(Pt 2): 278-291.
- [2] 宋杰, 董少忠. 人诺如病毒最新研究进展[J]. 病毒学报, 2017, 33(5): 785-790.
- [3] Jiang X, Wang M, Graham DY, et al. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein[J]. J Virol, 1992, 66(11): 6527-6532.
- [4] Vinjé J. Advances in laboratory methods for detection and typing

- of norovirus[J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(2): 373 - 381.
- [5] 孙建云, 刘兴荣. 甘肃省儿童主要食源性致病微生物与暴露食品分析[J]. 中国公共卫生, 2016, 32(5): 605 - 608.
- [6] He Z, Liu B, Tao Y, et al. Norovirus G II. 17 natural infections in rhesus monkeys, China[J]. Emerg Infect Dis, 2017, 23(2): 316 - 319.
- [7] Cui C, Pan L, Wang Y, et al. An outbreak of acute G II. 17 norovirus gastroenteritis in a long-term care facility in China: the role of nursing assistants[J]. J Infect Public Health, 2017, 10(6): 725 - 729.
- [8] Desselberger U, Goodfellow I. Noroviruses: a global cause of acute gastroenteritis[J]. Lancet Infect Dis, 2014, 14(8): 664 - 665.
- [9] Kenney AD, Dowdle JA, Bozzacco L, et al. Human genetic determinants of viral diseases[J]. Annu Rev Genet, 2017, 51: 241 - 263.
- [10] Robinson CM, Pfeiffer JK. Virology. Leaping the norovirus hurdle[J]. Science, 2014, 346(6210): 700 - 701.
- [11] Todd KV, Tripp RA. Human norovirus: experimental models of infection[J]. Viruses, 2019, 11(2): 151.
- [12] Duizer E, Schwab KJ, Neill FH, et al. Laboratory efforts to cultivate noroviruses[J]. J Gen Virol, 2004, 85(Pt 1): 79 - 87.
- [13] Gao Z, Liu B, Yan H, et al. Norovirus outbreaks in Beijing, China, from 2014 to 2017[J]. J Infect, 2019, 79(2): 159 - 166.
- [14] Yu J, Ye C, Lai S, et al. Incidence of norovirus-associated diarrhea, Shanghai, China, 2012 - 2013[J]. Emerg Infect Dis, 2017, 23(2): 312 - 315.
- [15] Chan MC, Kwok K, Zhang LY, et al. Bimodal seasonality and alternating predominance of norovirus G II. 4 and Non-G II. 4, Hong Kong, China, 2014 - 2017[J]. Emerg Infect Dis, 2018, 24(4): 767 - 769.
- [16] Ao Y, Wang J, Ling H, et al. Norovirus G II. P16/G II. 2-associated gastroenteritis, China, 2016[J]. Emerg Infect Dis, 2017, 23(7): 1172 - 1175.
- [17] Vinjé J, Vennema H, Maunula L, et al. International collaborative study to compare reverse transcriptase PCR assays for detection and genotyping of noroviruses[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(4): 1423 - 1433.

(本文编辑:文细毛)

**本文引用格式:**赵跃丽, 饶清, 孙强明, 等. 粪便标本中诺如病毒 G II 拷贝数定量检测方法的建立和应用[J]. 中国感染控制杂志, 2020, 19(10): 864 - 870. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20205960.

**Cite this article as:** ZHAO Yue-li, RAO Qing, SUN Qiang-ming, et al. Construction and application of quantitative detection method for Norovirus G II copy number in fecal specimens[J]. Chin J Infect Control, 2020, 19(10): 864 - 870. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20205960.