

实验技术与方法

草莓中诺如病毒和甲肝病毒的多重实时荧光逆转录
PCR检测方法的建立

高世光,冯华炜,林天闻,鄂铭,于洋,麻丽丹
(丹东出入境检验检疫局,辽宁 丹东 118000)

摘要:目的 建立草莓中诺如病毒 GI、诺如病毒 GII 和甲肝病毒等 3 种食源性病毒的多重实时荧光 RT-PCR 检测方法,并应用于实际样品检测。方法 对草莓样品进行前处理、病毒富集、病毒 RNA 提取和纯化后,先采用单重实时荧光 RT-PCR 进行检测,随后进行多重实时荧光 RT-PCR 反应条件优化,建立多重实时荧光 RT-PCR 检测方法并分析其特异性和灵敏度。结果 所采用的病毒富集和核酸提取方法可以实现病毒的有效富集和抑制剂的去除,建立的多重实时荧光 RT-PCR 方法特异性强(100%),对草莓样品中诺如病毒 GI、诺如病毒 GII 和甲肝病毒的检测灵敏度分别为 56.2 RT-PCR₅₀/20 g、31.6 RT-PCR₅₀/20 g 和 31.4 CCID₅₀/20 g。同时对 50 份样品进行检测,结果均为阴性。结论 所建立的检测方法快速、灵敏、特异性强,适用于草莓产品中诺如病毒 GI、诺如病毒 GII 和甲肝病毒的同时检测。

关键词:草莓;诺如病毒;甲肝病毒;多重实时荧光 RT-PCR;食品安全

中图分类号:R155.5;S668.4;Q939.4 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2015)05-0512-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2015.05.006

Detection of norovirus and hepatitis A virus in strawberry by multiplex real-time fluorescent RT-PCR

GAO Shi-guang, FENG Hua-wei, LIN Tian-wen, E Ming, YU Yang, MA Li-dan
(Dandong Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Liaoning Dandong 118000, China)

Abstract: Objective To establish a multiplex real-time fluorescence RT-PCR detection method of norovirus GI, GII and hepatitis A virus in strawberry, and apply to actual sample. **Methods** After pretreatment of strawberry samples, viruses were concentrated, extracted and purified for virus RNA. The samples were determined by real-time fluorescence RT-PCR and multiplex real-time fluorescence RT-PCR. The specificity, sensitivity, and practical applications of the methods were also analyzed. **Results** The nucleic acid extraction method could effectively remove the inhibitory factors. The methods showed high specificity with no cross amplifications of other virus. The detection limit of multiplex real-time fluorescence PCR for norovirus GI, GII and hepatitis in strawberry was 56.2 RT-PCR₅₀/20 g, 31.6 RT-PCR₅₀/20 g and 31.4 CCID₅₀/20 g, respectively. According to the test results of 50 inspection samples, the results were all negative. **Conclusion** The established system of nucleic acid extraction and real-time fluorescence RT-PCR detection method is suitable for the simultaneous detection of norovirus GI, GII and hepatitis A virus in strawberry.

Key words: Strawberry; norovirus; hepatitis A virus; multiplex real-time fluorescence RT-PCR; food safety

食物传播性病毒感染是人类疾病的重要因素^[1-2]。诺如病毒(NV)为杯状病毒科诺如病毒属,甲肝病毒(HAV)为小RNA病毒科肝炎病毒属,二者分别是人类非细菌性肠胃炎和肝炎的重要病原

体^[3]。容易发生诺如病毒和甲肝病毒感染的食物多为生的、未煮熟的肉或海鲜(如贝类等),方便食品等缺少热处理的食物。众多传播甲肝病毒和诺如病毒的食物中,水果和蔬菜也是重要的致病因子,特别是树莓^[4-6]、草莓^[7]、西红柿^[8]和做沙拉用的蔬菜^[9]。因此,加强对草莓等浆果类样品中诺如病毒和甲肝病毒的检测尤为重要。

诺如病毒不能在体外繁殖,也无动物模型,而甲肝病毒培养周期较长,所以细胞培养法不适用于二者的检测^[10]。食品中诺如病毒和甲肝病毒的含量较低,而免疫学方法的病毒检测限较低,为 10^5 拷

收稿日期:2014-11-26

基金项目:国家质检总局科研项目(2014IK094);辽宁出入境检验检疫局科研项目(LK2013-18)

作者简介:高世光 男 工程师 研究方向为病原微生物

E-mail:ddciq99@sohu.com

通讯作者:麻丽丹 女 高级工程师 研究方向为病原微生物

E-mail:2212097@163.com

贝数/ml 左右,其检测灵敏度不能满足食品中病毒检测要求^[11]。逆转录-聚合酶链式方法(RT-PCR)被认为是 RNA 病毒检测最有效的方法之一,已广泛应用于临床中诺如病毒和甲肝病毒的检测^[12-20],但是缺乏针对草莓等小浆果产品的研究。

本研究旨在于针对草莓中易污染的诺如病毒 GI、GII 型和甲肝病毒,以单重实时荧光 RT-PCR 为基础,优化反应条件和参数,建立多重实时荧光 RT-PCR 检测方法,实现诺如病毒 GI、诺如病毒 GII 和甲肝病毒等 3 种病毒的联检,为草莓类食品中病毒的检测提供技术支撑。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样品来源

草莓样品来自丹东出入境检验检疫局微生物实验室。

1.1.2 主要仪器与试剂

实时荧光定量 PCR 系统(ABI-7300)、核酸提取仪(ABI MagMax Express)均购自美国应用生物系统公司,台式高速冷冻离心机,SK-1 快速混匀器。

MagMAXTM-96 Viral RNA Isolation Kit(AM1836)、AgPath-IDTM One-step RT-PCR Kit(AM1005)均购自美国 ABI, HAV 减毒疫苗(长春长生生物科技股份有限公司,滴定度为 $10^{6.5}$ CCID₅₀/ml),诺如病毒 GI、GII 阳性质粒由上海英骏生物技术有限公司合成,诺如病毒 GI 和诺如病毒 GII 粪便上清液、轮状病毒 A 群、C 群和星状病毒由中国疾病预防控制中心赠与,牛肉浸出粉(北京路桥科技有限公司),聚乙二醇(PEG,美国 Biosharp),Tris、甘氨酸均购自美国 Sigma,三氯三氟乙烷(天津市科密欧化学试剂有限公司),氯仿,果胶酶,正丁醇。

1.1.3 引物和探针

引物和探针序列见表 1,其中 HAV 的探针标记为 5' NED,3' MGBNFQ,NV GI 的探针标记为 5' FAM、3' MGBNFQ,NV GII 探针标记为 5' VIC,3' TAMRA。所用的引物参照 ISO/PRF TS 15216-2^[21]中的引物,由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.2 方 法

1.2.1 人工污染样品的制备

诺如病毒不能人工培养,本文按照张颖^[22],陈广全等^[23]方法采用 RT-PCR₅₀单位表示病毒滴度,按照 Reed Muench 公式计算得出诺如病毒 GI、GII 型的病毒滴度分别为:562 RT-PCR₅₀/μl 和 316 RT-

表 1 诺如病毒 GI、GII 和 HAV 三重实时荧光 RT-PCR 检测的引物及探针

Table 1 Primers and probes of multiplex real-time fluorescent RT-PCR amplification of hepatitis A virus and norovirus GI、GII

病毒名称	引物和探针	序列
HAV	正向引物	5'-CCTCACCCGCCGTTTGC-3'
	反向引物	5'-GGAAGGGCAGGAAAGGA-3'
	探针	5'-NED-AGGCTATAGGCTAAACC-3'MGBNFQ
NV GI	正向引物	5'-CGCTGGATGCGNTTCCAT-3'
	反相引物	5'-CCTTAGACGCCATCATCATTAC-3'
	探针	5'-FAM-CGGATTGTGACAGGAG-3'MGBNFQ
NV GII	正向引物	5'-ATGTTACAGRTGGATGAGRTTTCWGA-3'
	反相引物	5'-TCGACGCCATCTTCATTACA-3'
	探针	5'-VIC-AGCACCTGGGAGGGCGATCG-3'TAMRA

PCR₅₀/μl。人工污染样品的制备参照 ISO/TS 15216-2 中的方法,剪取 20 g 已知诺如病毒和甲肝病毒阴性的草莓样品表皮放至离心管中,剪碎后大小约 2.5 cm × 2.5 cm × 2.5 cm,分别加入适量的甲肝减毒疫苗和诺如病毒粪便上清液,生物安全柜中室温静置 20 min,使得病毒与草莓样品充分吸附。

1.2.2 草莓样品中病毒富集

每个样品中分别加入 35 ml TGBE 洗脱缓冲液及 30 U 的果胶酶。室温 100 r/min 孵育 10 min,用 5 mol/L NaOH 溶液 pH 调节至(9.5 ± 0.2),室温 100 r/min 孵育 20 min;4 °C 10 000 × g 离心 30 min,将上清液转入干净的离心管中,并用 5 mol/L 盐酸溶液将 pH 调节至(7.0 ± 0.2);加入 0.25 ml 的 5 × PEG/NaCl 溶液,振荡 60 s 混匀,5 °C 100 r/min 孵育 60 min;5 °C 10 000 × g 离心 30 min,弃去上清液,然后 5 °C 10 000 × g 离心 5 min,以压实沉淀物;弃上清,加入 500 μl PBS 重悬沉淀;加入 1 000 μl 的氯仿-正丁醇,涡旋混合,室温下孵育 5 min;5 °C 10 000 × g 离心 15 min,将上层水相小心地转移到一个新的离心管中,-20 °C 保留用于提取 RNA。

1.2.3 病毒 RNA 提取

采用 ABI MagMax Express 核酸提取仪和 MagMAXTM-96 Viral RNA Isolation Kit 试剂盒提取病毒 RNA。

1.2.4 多重实时荧光 RT-PCR 检测方法建立

1.2.4.1 单重实时荧光 RT-PCR 检测方法的建立

反应体系:总体积 25 μl,包括模板 RNA 溶液 5 μl,25 × RT-PCR 酶预混液 1 μl,2 × RT-PCR 缓冲液 12.5 μl,正向引物 1.25 μl、反向引物各 2.25 μl、荧光探针各 0.625 μl,灭菌超纯水 2.375 μl;其中各引物和探针的浓度均为 10 μmol/L;以上各组分加入至 0.2 ml 实时荧光 PCR 反应管中,混匀,5 000 r/min 离心 10 s。以含诺如病毒、甲肝病毒被检测基因片段的重组质粒作为阳性对照,以水代替模板作

为阴性对照。

反应参数为:45℃逆转录10 min,1个循环;95℃预变性10 min,1个循环;95℃变性15 s,60℃退火、延伸45 s,40个循环;每次循环的退火时收集荧光,检测结束后,根据扩增曲线和循环阈值(*Ct*值)判定结果。

结果判断:*Ct*值 ≥ 40 ,可判断样品中HAV核酸检测阴性;*Ct*值 ≤ 35.0 ,可判断该样品中HAV核酸检测阳性; $35.0 > Ct$ 值 < 40 ,建议重做样品。重做结果*Ct*值 ≥ 40 者为阴性,否则为阳性。

1.2.4.2 多重实时荧光 RT-PCR 检测

反应体系:总体积25 μ l按照表2的加样量进行反应体系的配制,各组分加入至0.2 ml实时荧光PCR反应管中,混匀,5 000 r/min离心10 s。以含诺如病毒、甲肝病毒被检测基因片段的重组质粒作为阳性对照,以水代替模板作为阴性对照。

表2 25 μ l PCR 反应体系

Table 2 25 μ l PCR reaction system

组分	原液浓度	取量/ μ l	终浓度
25 \times RT-PCR 酶预混液	25 \times	1	1 \times
2 \times RT-PCR 缓冲液	2 \times	12.5	1 \times
诺如病毒 GI 正向引物	20 μ mol/L	0.035	28 nmol/L
诺如病毒 GI 反向引物	20 μ mol/L	0.065	52 nmol/L
诺如病毒 GI 荧光探针	20 μ mol/L	0.015	12 nmol/L
诺如病毒 GII 正向引物	20 μ mol/L	0.625	500 nmol/L
诺如病毒 GII 反向引物	20 μ mol/L	1.125	900 nmol/L
诺如病毒 GII 荧光探针	20 μ mol/L	0.325	260 nmol/L
甲肝病毒正向引物	20 μ mol/L	1.275	1 020 nmol/L
甲肝病毒反向引物	20 μ mol/L	2.275	1 820 nmol/L
甲肝病毒荧光探针	20 μ mol/L	0.760	608 nmol/L
模板 RNA 溶液	—	5	—
阴性对照	—	5	—
阳性对照	—	5	—

注:—为无浓度

反应参数为:45℃逆转录10 min,1个循环;95℃预变性10 min,1个循环;95℃变性15 s,60℃退火、延伸45 s,40个循环;每次循环的退火时收集荧光,检测结束后,根据扩增曲线和*Ct*值判定结果。

结果判断:*Ct*值 ≥ 40 ,可判断样品中HAV核酸检测阴性;*Ct*值 ≤ 35.0 ,可判断该样品中HAV核酸检测阳性; $35.0 > Ct$ 值 < 40 ,建议重做样品。重做结果*Ct*值 ≥ 40 者为阴性,否则为阳性。

1.2.5 多重实时荧光 RT-PCR 特异性检测

采用1.2.4.2的反应体系和参数同时检测甲肝病毒、诺如病毒 GI、诺如病毒 GII、轮状病毒 A 群、轮状病毒 C 群、星状病毒等食源性病毒,对本方法的特异性进行评估。

1.2.6 多重实时荧光 RT-PCR 灵敏度试验

本研究对人工污染的草莓样品进行灵敏度的研究。即将提取后的病毒 RNA 分别进行10个梯度

系列稀释($10^0 \sim 10^{-10}$)后按照1.2.4.2中的反应体系和参数进行多次 RT-PCR 反应,确定其灵敏度。

1.2.7 样品检测

建立的快速检测体系对50份(2 kg/份)送检的草莓样品进行前处理,提取和纯化病毒核酸,设立阳性和阴性对照,对其诺如病毒 GI、诺如病毒 GII 和甲肝病毒进行多重实时荧光 RT-PCR 检测,以检验本方法的试验效果,每份做3个平行。

2 结果与分析

2.1 单重实时荧光 RT-PCR 检测结果

建立的单重实时荧光 RT-PCR 方法对诺如病毒 GI、诺如病毒 GII 和甲肝病毒的扩增结果分别如图1、2、3所示,其中诺如病毒 GI 的阴性对照结果显示,FAM 通道均无荧光信号检出,说明反应结果正常,反应体系无污染;阳性对照结果显示,FAM 通道均有荧光信号检出,具有典型扩增曲线,*Ct*值为24.67(< 35)。诺如病毒 GII 的阴性对照结果显示,VIC 通道均无荧光信号检出,说明反应结果正常,反应体系无污染;阳性对照结果显示,VIC 通道均有荧光信号检出,具有典型扩增曲线,*Ct*值为25.56(< 35)。甲肝病毒的阴性对照结果显示,NED 通道均无荧光信号检出,说明反应结果正常,反应体系无污染;阳性对照结果显示,NED 通道均有荧光信号检出,具有典型扩增曲线,*Ct*值为25.06(< 35)。

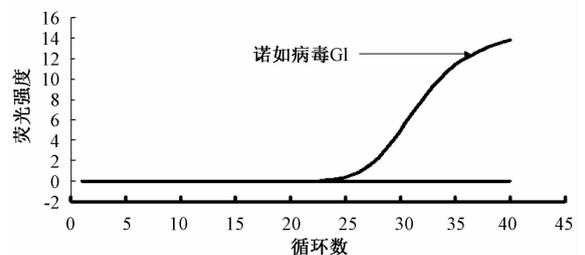


图1 诺如病毒 GI 单重实时荧光 RT-PCR 结果
Figure 1 Amplification curves of norovirus GI using real-time fluorescence RT-PCR method

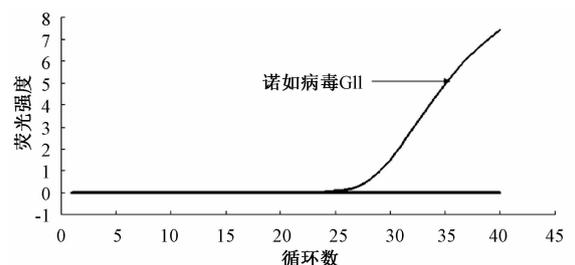


图2 诺如病毒 GII 的单重实时荧光 RT-PCR 结果
Figure 2 Amplification curves of norovirus GII using real-time fluorescence RT-PCR method

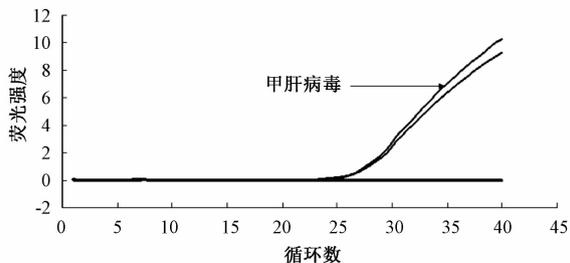


图3 甲肝病毒的单重实时荧光 RT-PCR 结果
Figure 3 Amplification curves of hepatitis A virus using real-time fluorescence RT-PCR method

2.2 多重实时荧光 RT-PCR 检测结果

诺如病毒 GI、诺如病毒 GII、甲肝病毒的多重实时荧光 RT-PCR 检测结果如图 4,其中:阴性对照结果显示,FAM、VIC、NED 通道均无荧光信号检出,说明反应结果正常,反应体系无污染;阳性对照结果显示,FAM、VIC、NED 通道均有荧光信号检出,其 C_t 值分别为 26.53、27.12、28.43。

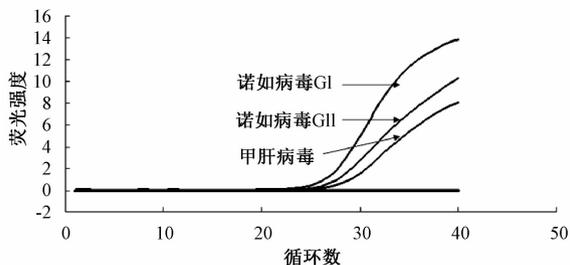


图4 诺如病毒 GI、诺如病毒 GII 和甲肝病毒的多重实时荧光 RT-PCR 结果
Figure 4 Amplification curves of norovirus GI, GII and hepatitis A virus using multiplex real-time fluorescence RT-PCR method

2.3 多重实时荧光 RT-PCR 特异性试验结果

建立的多重实时荧光 RT-PCR 方法对诺如病毒 GI、诺如病毒 GII、甲肝病毒、轮状病毒 A 群、轮状病毒 C 群、星状病毒的扩增结果见图 5,结果显示本检测方法对诺如病毒 GI、诺如病毒 GII、甲肝病毒进行扩增均有典型扩增曲线,而对轮状病毒、星状病毒及阴性对照的检测无典型扩增曲线,表明本方法能够同时特异性扩增诺如病毒 GI、诺如病毒 GII 和甲肝病毒。

2.4 多重实时荧光 RT-PCR 灵敏度试验结果

草莓人工污染样品中病毒 RNA 梯度稀释检测结果表明(见图 6~8),诺如病毒 GI 在稀释度为 10^{-3} 时, C_t 值 < 40(结果为阳性),稀释度分别为 $10^{-4} \sim 10^{-10}$ 时无典型扩增曲线, C_t 值 ≥ 40 (结果为阴性);诺如病毒 GII 在稀释度为 10^{-3} 时, C_t 值 < 40(结果为阳性),稀释度分别为 $10^{-4} \sim 10^{-10}$ 时无典型扩增曲线, C_t 值 ≥ 40 (结果为阴性);甲肝病毒在稀释度为 10^{-3} 时, C_t 值 < 40(结果为阳性)稀释度分

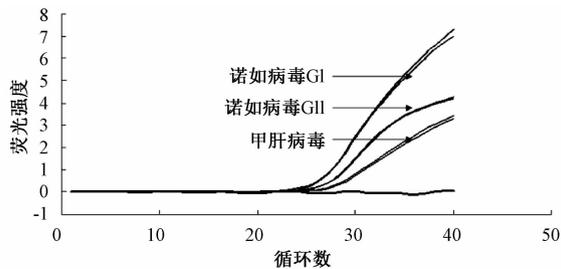


图5 诺如病毒 GI、诺如病毒 GII 和甲肝病毒的多重实时荧光 RT-PCR 的特异性试验结果
Figure 5 Specificity of multiplex real-time fluorescence RT-PCR method in detection of norovirus GI, GII and hepatitis A virus

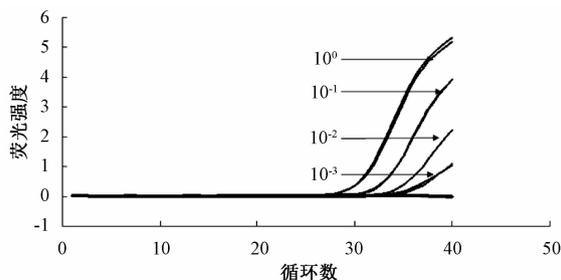


图6 草莓样品中诺如病毒 GI 的多重实时荧光 RT-PCR 灵敏度结果
Figure 6 Sensitivity of multiplex real-time fluorescence RT-PCR in detection of norovirus GI

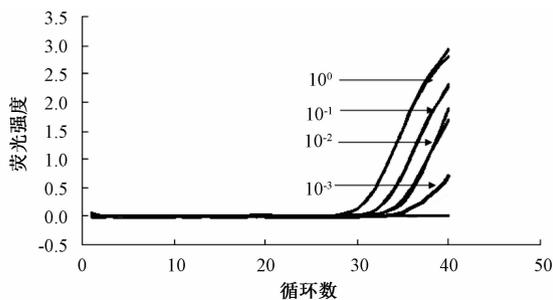


图7 草莓样品中诺如病毒 GII 的多重实时荧光 RT-PCR 灵敏度结果
Figure 7 Sensitivity of multiplex real-time fluorescence RT-PCR in detection of norovirus GII

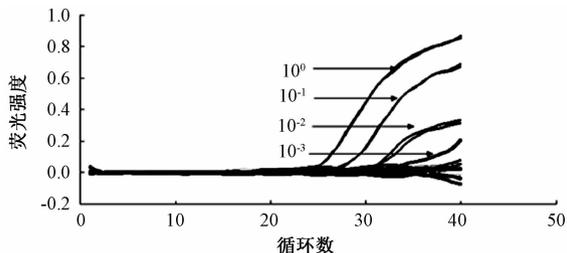


图8 甲肝病毒的多重实时荧光 RT-PCR 灵敏度结果
Figure 8 Sensitivity of multiplex real-time fluorescence RT-PCR in detection of norovirus GII
别为 $10^{-4} \sim 10^{-10}$ 时无典型扩增曲线, C_t 值 ≥ 40 (结

果为阴性)。表明本研究对于草莓样品中诺如病毒 GI、诺如病毒 GII 和甲肝病毒的检测灵敏度分别为 56.2 RT-PCR₅₀/20 g、31.6 RT-PCR₅₀/20 g 和 31.4 CCID₅₀/20 g。

2.5 样品检测结果

按照本研究建立的多重实时荧光 RT-PCR 检测方法,对送检的草莓样品进行 PCR 检测,结果见图 9。由检测结果可以知道,所检样品均为阴性,阳性和阴性对照正常。

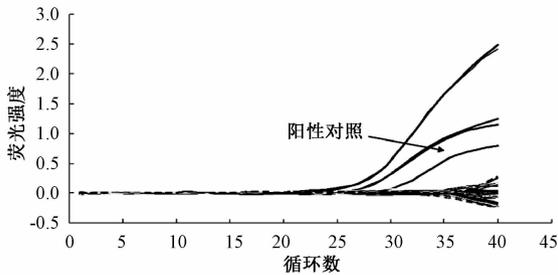


图9 多重实时荧光 RT-PCR 检测 50 份草莓样品结果图
Figure 9 Amplification curves of 50 strawberry samples using multiplex real-time fluorescence RT-PCR method

3 讨论

草莓富含蛋白质、果胶等 PCR 抑制剂成分,且含有大量的有机酸,使得样品在病毒富集时洗脱缓冲液的 pH 明显下降,因此在病毒富集过程中,维持较高的 pH 值可以对草莓中诺如病毒和甲肝病毒进行很好的洗脱,pH 过高则会使得草莓样品中的核酸溶出。洗脱后的病毒在具有吸水性以及凝聚和沉淀蛋白作用的高分子聚合物 PEG 的沉淀作用下将病毒颗粒进行浓缩^[21],以氯仿-正丁醇进一步去除 PCR 抑制剂,使得病毒得到有效富集。

众多诺如病毒和甲肝病毒检测方法中,RT-PCR 法为最常用的检测方法但其检测特异性和灵敏度不是很高^[24],而实时荧光 RT-PCR 克服了常规 PCR 检测的不足,具有重复性好、特异性强、敏感性高和易操作等优点,在病毒诊断中得到广泛应用^[25]。本研究在此基础上建立的多重实时荧光 RT-PCR 法,实现了诺如病毒 GI、诺如病毒 GII 和甲肝病毒在同一反应体系中的同时检测,其特异性为 100%,对于草莓样品中诺如病毒 GI、诺如病毒 GII 和甲肝病毒的检测灵敏度分别为 56.2 RT-PCR₅₀/20 g、31.6 RT-PCR₅₀/20 g 和 31.4 CCID₅₀/20 g,整个操作过程小于 5 h。对 50 份草莓样品检测结果显示,诺如病毒 GI、诺如病毒 GII 和甲肝病毒均未检出阳性,设立的阳性对照和阴性对照正常,表明本研究建立的方法对于草莓样品的检测具有很好的适用性,同时也为小浆果类产品的病毒检测提供基础研究。

参考文献

- [1] Mullendore J L, Sobsey M D, Shieh Y C. Improved method for the recovery of hepatitis A virus from oysters [J]. J Virol Methods, 2001, 94(1):25-35.
- [2] Myrmel M, Rimstad E, Wasteson Y. Immunomagnetic separation of a Norwalk-like virus (genogroup I) in artificially contaminated environmental water samples [J]. Int J Food Microbiol, 2001, 62(1), 17-26.
- [3] Mead P S, Slutsker L, Diets V, et al. Food-related illness and death in the United States [J]. Emerg Infect Dis, 1999, 5(5): 607-625.
- [4] Cotterelle B, Drougard C, Rolland J, et al. Outbreak of norovirus infection associated with the consumption of frozen raspberries. France, March 2005 [J]. Euro Surveill, 2005, 10(4):E050428. 1.
- [5] Falkenhorst G, Krussell L, Lisby M, et al. Imported frozen raspberries cause a series of norovirus outbreaks in Denmark, 2005 [J]. Euro Surveill, 2005, 10(38):E050922. 2.
- [6] Le Guyader F S, Mittelholzer C, Haugarreau L, et al. Detection of noroviruses in raspberries associated with a gastroenteritis outbreak [J]. Int J Food Microbiol, 2004, 97(2):179-186.
- [7] Hernández F, Monge R, Jiménez C, et al. Rotavirus and hepatitis A virus on market lettuce (*Latuca sativa*) in Costa Rica [J]. Int J Food Microbiol, 1997, 37(2/3):221-223.
- [8] Rutjes S A, Lodder-Verschuur F, van der Poel W H M, et al. Detection of noroviruses in foods: a study on virus extraction procedures in foods implicated in outbreaks of human gastroenteritis [J]. J Food Prot, 2006, 69(8), 1949-1956.
- [9] Lopman B A, Adak G K, Reacher M H, et al. Two epidemiologic patterns of norovirus outbreaks: surveillance in England and Wales, 1992-2000 [J]. Emerg Infect Dis, 2003, 9(1):71-77.
- [10] 陈广全, 饶红, 傅浦博, 等. 食品中诺沃克样病毒和甲肝病毒检测方法研究进展 [J]. 检验检疫科学, 2005, 15(6):51-54.
- [11] 袁巧, 王晨, 李晖, 等. 贝类中诺如病毒检测方法的研究进展 [J]. 华南预防医学, 2012, 38(50):30-33.
- [12] 饶红, 陈广全, 冯骞, 等. 蔬菜及水果中 NLVs 和甲肝病毒的研究 [J]. 中国食品卫生杂志, 2007, 19(2):131-134.
- [13] Hee-Yeon K, In-Shin K, In-Gyun H, et al. Optimization of methods for detecting norovirus on various fruit [J]. Journal of Virological Methods, 2008, 153(2), 104-110.
- [14] Stals A, Baert L, Van Coillie E, et al. Evaluation of a norovirus detection methodology for soft red fruits [J]. Food Microbiology, 2011, 28(1):52-58.
- [15] 张其刚, 潘文良, 李想, 等. 猪胃黏蛋白偶联磁珠和聚乙二醇富集检测青葱和葡萄中诺如病毒的比较研究 [J]. 食品科学, 2012, 33(16):241-245.
- [16] 周阳, 栾军, 蒋鲁岩, 等. 实时荧光 RT-PCR 检测冷冻草莓中诺如病毒 [J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(2):515-520.
- [17] 莫雪梅, 高东微. 运用 SYBR Green I 荧光实时 RT-PCR 法检测草莓中甲肝病毒 [J]. 食品科学, 2010, 31(14):153-157.
- [18] 曾军荣, 李荣娇, 王瑜玲, 等. 常见腹泻病毒的多重荧光 RT-PCR 检测方法的建立及临床应用 [J]. 广东医学, 2011, 32(13):1738-1740.
- [19] Hoehne M, Schreier E. Detection of norovirus genogroup I and II

- by multiplex real-time RT-PCR using a 3'-minor groove binder-DNA probe[J]. BMC Infectious Diseases, 2005, 6(9):1-6.
- [20] 纪蕾,韩健康,吴晓芳,等.多重荧光 RT-PCR 同时检测 GI 型和 GII 型诺如病毒方法的建立[J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(4):311-315.
- [21] ISO/TS 15216-2. Microbiology of food and animal feed-Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR-Part 2: method for qualitative detection [S]. 2013.
- [22] 张颖,吴凤亮. RT-PCR 方法检测贝类中诺沃克样病毒的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(5):347-351.
- [23] 陈广全,饶红,张慧媛,等.用 RT-PCR 法检测食品中诺沃克样病毒[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(12):106-111.
- [24] Marshall J A, Bruggink L D. Laboratory diagnosis of Norwalk viruse[J]. Clin Lab, 2006, 52(11):571-581.
- [25] 卓菲,赵洁玲,文凤兰,等.实时荧光 PCR 检测诺沃克病毒的应用研究[J]. 实用预防医学, 2008, 15(3):889-890.

实验技术与方法

异丁醇萃取-高效液相色谱法测定马铃薯中 α -茄碱

邵慧凯¹, 丘汾², 何佳平², 毛闪闪¹, 李康¹, 赵凌国²

(1. 广东药学院药科学院, 广东 广州 510006; 2. 深圳市福田区疾病预防控制中心, 广东 深圳 518040)

摘要:目的 建立异丁醇萃取和高效液相色谱法(HPLC)测定马铃薯中 α -茄碱含量的新方法。方法 马铃薯匀浆样品经 5% 乙酸溶液搅拌提取 30 min, 提取液调节 pH 至 11.0 后加入异丁醇进行萃取, 萃取液加热浓缩, N₂ 吹干。残渣经甲醇复溶, 过 0.45 μ m 滤膜后进样, HPLC 检测 α -茄碱含量。流动相为乙腈-0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液(22:78, V/V), Discovery C₁₈ 柱(150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), 柱温 30 $^{\circ}$ C, 检测波长 210 nm, 进样量 20 μ l。结果 在 0.02 ~ 1.00 mg/ml 范围内, α -茄碱的峰面积和浓度的线性关系良好($r=0.9997$)。检测限和定量限分别为 0.68 和 2.27 μ g/ml, 方法检出限为 1.38 μ g/g。样品在 0.04、0.40 和 2.00 mg/g 3 个添加水平下的加标回收率为 98% ~ 116%。方法精密度 RSD 为 0.16% ~ 1.79%。结论 该方法具有快速、简便、准确度和精密度高等特点, 适用于马铃薯中的 α -茄碱含量的快速检测。

关键词:异丁醇; 萃取; 马铃薯; α -茄碱; 龙葵素; 食品安全; 测定

中图分类号:R155.5; S532 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2015)05-0517-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2015.05.007

A new method for the extraction and determination of alpha solanine in potatoes

SHAO Hui-kai, QIU Fen, HE Jia-ping, MAO Shan-shan, LI Kang, ZHAO Ling-guo

(School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangdong Guangzhou 510006, China)

Abstract: Objective To develop a new method for rapid determination of alpha solanine in potatoes. **Methods** The homogenized potato sample was eluted with 5% acetic acid aqueous solution for 30 min, and it was then extracted by isobutanol. The extraction solution was evaporated by nitrogen. Subsequently the residue was redissolved in methanol and analyzed by HPLC after filtration. Separation was obtained by Discovery C₁₈ column (150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) and mobile phase of acetonitrile-0.02 mol/L potassium dihydrogen phosphate (22:78, V/V) with flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 210 nm and the temperature was 30 $^{\circ}$ C. **Results** Good linearity was obtained for alpha solanine within the range of 0.02-1.00 mg/ml, and the r was 0.9997. The limit of detection ($S/N=3$) and the limit of quantification ($S/N=10$) were 0.68 and 2.27 μ g/ml. The average recoveries of different concentration levels were between 98% and 116%. The relative standard deviations (RSDs) ranged from 0.16% to 1.79%. **Conclusion** This method is fast, simple, precise and it is feasible for the determination of alpha solanine in potatoes.

Key words: Isobutanol; extract; potato; alpha solanine; solanine; food safety; measure

收稿日期:2015-01-25

基金项目:深圳市科技研发基础研究项目(JCYJ20140414100411116);福田区卫生公益性科研项目(FTWS201304,201458)

作者简介:邵慧凯 男 硕士生 研究方向为药物分析 E-mail:752509530@qq.com

通讯作者:赵凌国 男 主管技师 研究方向为卫生检验 E-mail:zhaolingguo2008@163.com