

水中轮状病毒实时定量 PCR 外标准品的构建

胡秀华, 何苗*, 刘丽, 李丹, 施汉昌

(清华大学环境科学与工程系环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100084)

摘要: 采用细胞培养和 T-A 克隆技术, 在轮状病毒主要结构蛋白 VP7 基因序列上设计合成引物, 经 PCR 扩增后将特异性产物连接入 pGEM-T-easy 载体中, 经过酶切鉴定和测序分析获得轮状病毒 cDNA 标准品. 利用常规 PCR 和实时定量 PCR 方法对所获得的 cDNA 标准品进行特异性、稳定性和重复性指标的检验. 结果表明, 利用此标准品制备的标准曲线具有较高的扩增效率和良好的线性关系(斜率为 -3.353 , $R^2 = 0.995$); 实时定量 PCR 熔解曲线分析表明, 温度在 $81^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 的 PCR 产物是轮状病毒 VP7 序列上的特异性产物, 表明此标准品是轮状病毒特异性的; 同时, 所制备的标准品在实时定量 PCR 检测中具有较大的线性范围($9 \times 10^0 \sim 9 \times 10^{11}$ copies/ μL), 每个反应最低可以检测到 9 个拷贝数的轮状病毒 cDNA, 表明利用该标准品进行实时定量 PCR 分析时具有较高的检测灵敏度; 此外, 该标准品具有较高的稳定性和重复性(3 次独立实验 CV 值在 $0.2\% \sim 0.9\%$ 之间), 可长期稳定保存. 构建的标准品可用作检测水环境中轮状病毒的实时荧光定量 PCR 的外标准品.

关键词: 轮状病毒; 克隆; 标准品; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)02-0380-06

Construction of External Standard for Detection of Rotavirus in Water Using the Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction

HU Xiu-hua, HE Miao, LIU Li, LI Dan, SHI Han-chang

(State Key Joint Laboratory of Environment Simulation and Pollution Control, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: To construct external standard for detection of rotavirus in water using the quantitative real-time polymerase chain reaction, rotavirus cDNA standard for real-time PCR assay was prepared by cell culture, PCR and T-A clone methods with primers specific for the viral structure protein VP7 gene, and this cDNA standard was confirmed by enzyme cleavage and DNA sequencing. Specificity, stability and reproducibility of the cDNA standard quantified were detected by common polymerase chain reaction (PCR) and quantitative real-time PCR. The results of standard curve showed a very good linear negative regression between threshold cycle (Ct) and Log starting quantity of copy number. The melting curve analysis of real-time PCR showed melting temperature at $81^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$, indicating PCR products were that of the rotavirus VP7 sequence and thus the standard used in this study was specific for rotavirus. Moreover, the result of real-time PCR also indicated detection range was from 9×10^0 to 9×10^{11} copies per reaction, and the detection limit for this assay was 9 copies of rotavirus cDNA per reaction, and thus real-time PCR assay using the standard had a high sensitivity for detection of rotavirus. Furthermore, the results indicated a high stability and reproducibility of cDNA standard were assessed according to the CVs of three independent experiments in the range of $0.2\% \sim 0.9\%$. Taken together, in this study rotavirus cDNA standard prepared could be used as quantitative detection of rotavirus cDNA from water samples.

Key words: rotavirus; clone; standard; real-time PCR

轮状病毒是全世界范围内人和动物急性腹泻的主要致病微生物之一, 其中 A 组轮状病毒是导致世界范围内严重儿童急性胃肠炎的主要原因, 每年会导致超过 450 000 人的死亡^[1]. 近年的研究资料表明, 我国秋冬季节 $50\% \sim 60\%$ 的婴幼儿腹泻是由轮状病毒引起的, 轮状病毒感染已经成为我国主要的公共卫生问题^[2,3]. 轮状病毒主要是通过粪-口途径传播, 在生活污水和受污染的地表水中广泛存在, 对水环境安全和人类的健康构成了严重的威胁^[4,5]. 轮状病毒是 1 种双链 RNA 病毒, 由 11 个基因组片段组成, 它的核心部分是由 70 nm 直径的双层衣壳组成. 该病毒的内壳具有 4 个结构蛋白(VP1、VP2、VP3 和 VP6), 外壳具有 2 个结构蛋白(VP4 和 VP7). 其中

VP4 和 VP7 是 2 个主要的轮状病毒结构蛋白, 它们决定了轮状病毒的血清型和病毒中和作用(neutralization)^[6].

水环境中轮状病毒有效地预防控制需要快速准确的检测技术作为支持. 近年来, 实时荧光定量 PCR 技术在病毒检测领域得到了广泛应用, 研究者们利用该技术对环境样品中的肠道腺病毒、脊髓灰质炎病毒、诺瓦克病毒、甲型肝炎病毒和肠道病毒等进行了快速、敏感和定量的检测^[7-12]. 这些研究结果表

收稿日期: 2007-03-13; 修订日期: 2007-04-23

基金项目: 中国博士后科学基金项目(20060400439)

作者简介: 胡秀华(1975~), 女, 博士后, 主要研究方向为环境致病微生物的检测与预防, E-mail: xiuhuahu@mail.tsinghua.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: hemiao@mail.tsinghua.edu.cn

明,实时定量 PCR 技术是快速、敏感、简便的定量检测技术,可以通过绝对定量和相对定量 2 种方式实现其定量检测.目前,在实时定量 PCR 分析中绝对定量是采用最多的 1 种定量方式,但是需要采用外标准品来实现其绝对定量,定量结果的准确性在很大程度上依赖于外标准品性能,因此,外标准品是实时定量 PCR 分析方法中最为关键的要素^[13].基于此,本研究构建了 1 种适合于实时荧光定量 PCR 检测水环境中感染性轮状病毒的 cDNA 标准品.

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

MA-104 细胞和轮状病毒标准株由山东省医学科学院基础研究所孟虹教授惠赠.DMEM 购自科海军舟生物公司,胎牛血清购自杭州四季青生物公司,SuperScript™ III 逆转录酶和 TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司, pGEM-T-easy 试剂盒、Oligo(dT)₁₅ Primer、Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor、dNTP、Taq DNA 聚合酶和 EcoR I 均购自 Promega 公司,DNA 纯化试剂盒和荧光定量 PCR 试剂盒购自天根生物有限公司.大肠杆菌 DH5 α 感受态为本实验室制.iCycler iQ 荧光定量 PCR 仪购于美国 Bio-Rad 公司.

1.2 猴轮状病毒标准株 SA-11 的培养

利用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,在 5% CO₂ 培养箱中 37℃ 静止培养恒河猴细胞系 MA-104 细胞(ATCC).当该细胞系在培养瓶中生长为单层时,利用 1 × PBS 清洗细胞 2 次,以去除死细胞;接种 500 mL 轮状病毒到培养成单层的 MA-104 细胞的培养瓶中,37℃ 孵育 1 ~ 2 h,加入 5 mL 含有 2% 胎牛血清的 DMEM 病毒维持液.37℃ 培养 5 d 后观察细胞状态,当有明显病毒蚀斑单位形成时,收集细胞,并收集细胞上清液获得猴轮状病毒标准株 SA-11.

1.3 病毒 RNA 的提取及 cDNA 的合成

取感染了猴轮状病毒标准株 SA-11 的 MA-104 细胞,用 TRIzol 裂解法提取细胞总 RNA,溶于适当 DEPC 水中.取 4 μ g 的总 RNA 利用逆转录酶 SuperScript™ III 进行 cDNA 的合成(操作过程按照产品说明进行).

1.4 引物的设计

在 GenBank 中下载猴轮状病毒株 SA-11 的所有 VP7 序列,将这些序列输入 Clastal W 软件中进行多序列比较分析其同源性,进行引物设计和合成.引物的 GC 含量在 40% ~ 60% 之间,引物之间距离 > 30

bp. 引物序列如下, SA-11-Sense: 5'-CCTCACTTA TACACTTTGCC-3'; SA-11-Antisense: 5'-TTCGCTT CGTCAGTTTGCT-3'.该引物由北京诺赛公司合成,用无菌双蒸水将引物配制成 200 μ mol/L 的储存液, -20℃ 保存.

1.5 目的片断的制备和纯化

取 8 μ L cDNA 作为 PCR 反应的模板,PCR 反应体系为 100 μ L,包括 2 μ L 20 μ mol/L 上游引物,2 μ L 20 μ mol/L 下游引物,2 μ L 10 mmol/L dNTP,1.2 μ L Taq DNA 聚合酶,6.4 μ L 25 mmol/L MgCl₂,10 μ L 10 × PCR 缓冲液,76.4 μ L 双蒸水.PCR 反应程序为 94℃ 4 min,94℃ 1 min,59℃ 40 s,72℃ 1 min 30 s,从第 2 步起进行 35 个循环,72℃ 延伸 10 min,取 10 μ L PCR 产物行 2% 琼脂糖凝胶电泳,显示扩增产物为目的片段.取 90 μ L PCR 产物行 2% 琼脂糖回收胶,利用胶回收试剂盒进行目的片段的回收纯化(操作按照说明书进行),回收纯化后取 2 μ L 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳.

1.6 T-A 克隆技术

将回收纯化的目的片段和 pGEM-T-easy 载体连接,具体过程按照 Promega 公司的产品说明书,调节目的片段的量为 3 μ L,4℃ 连接 12 h.利用 CaCl₂ 法制备大肠杆菌 DH5 α 感受态,将连接产物转化入该感受态细胞中,涂在含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素和 2% 琼脂的 LB 培养皿上,37℃ 孵箱培养 12 h.

1.7 重组质粒 DNA 的提取和阳性重组体的鉴定

利用改进的碱裂解法提取重组质粒 DNA.将转化后涂盘已经出现菌落的培养皿拿出,挑出 12 个单菌于 5 mL 含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养液中,37℃ 培养 12 h;取 1.5 mL 菌液于离心管中,室温,12 000 r/min 离心 5 min;弃去上层液体,加入 120 μ L 含有 RNA 酶的溶液 I 剧烈振荡,室温放置 15 min;加 240 μ L 新配置的溶液 II,轻轻混匀,室温不超过 5 min;加入 180 μ L 溶液 III,颠倒混匀,室温 12 000 r/min 离心 10 min,小心将上清液移到新的 1.5 mL 离心管中;加入等体积的 Tris 饱和酚和氯仿,混匀,室温 12 000 r/min 离心 5 min;吸上层水相于新的离心管中,加 0.8 倍体积的异丙醇,混匀,室温 12 000 r/min 离心 20 min,弃上清;加入 70% 乙醇 1 mL,室温 12 000 r/min 离心 5 min;弃上清,55℃ 干燥,加 30 μ L TE 溶解.

利用 Cutter2.0 软件在线分析目的片段中酶切图谱^[14],确定目的片段中没有 EcoR I 酶切位点,采用 EcoR I 对所提取的重组质粒进行酶切.酶切产物

行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 选用 100 bp 的 Marker, 在凝胶成像仪上观察并记录试验结果. 将酶切结果显示为阳性克隆的菌液送测序, 测序结果进行 BLAST 比对^[15].

1.8 阳性重组质粒拷贝数的计算

利用威格拉斯质粒大提试剂盒(威格拉斯公司)将获得的阳性克隆进行质粒的大量提取, 溶于 pH 8.0 的 1×TE 中, 按照 1:200 的稀释度进行 260 nm 和 280 nm D 值的测定, 确定该阳性重组质粒的浓度为 3.22 μg/μL. 按照公式进行质粒拷贝数的计算, 确定含有轮状病毒 cDNA 的质粒标准品的拷贝数为 9 × 10¹¹ copies/μL.

1.9 轮状病毒 cDNA 标准品稳定性和重复性实验

取 5 批浓度为 9 × 10⁴ ~ 9 × 10⁸ copies/μL 的轮状病毒 cDNA 标准品, 进行分批冻存于 -20℃, 冻存时间分别为 1、20 和 60 d. 取这 3 个时间点的 5 批浓度进行实时定量 PCR 反应, 实时定量 PCR 反应体系经优化如下: 上游引物、下游引物、10 mmol/L dNTP 分别为 0.5 μL; Taq DNA 聚合酶为 0.3 μL; 10 × PCR 反应缓冲液为 2 μL; 25 mmol/L MgCl₂ 为 1.6 μL; 20 × SYBR Green I 染料为 1.2 μL; 9 × 10⁴ ~ 9 × 10⁸ copies/μL 的 cDNA 标准品 1 μL 为模板, 用 12.4 μL 的双蒸水补足体积到 20 μL. 实时定量 PCR 反应过程经优化为 95℃ 2 min, 95℃ 20 s, 59℃ 30 s, 72℃ 20 s, 从第 2 步起进行 50 个循环, 72℃ 延伸 2 min. 融解曲线的过程为: 95℃ 1 min, 55℃ 1 min, 至 55℃ 30 s 开始进行 81 个循环, 温度变化范围为 0.5℃, 结束温度为 95℃.

1.10 实时定量 PCR 测定轮状病毒 cDNA 标准品的线性关系

取已知的 5 个 10 倍倍比稀释的轮状病毒 cDNA 标准品 9 × 10⁸ copies/μL、9 × 10⁷ copies/μL……9 × 10³ copies/μL, 每个稀释滴度做平行样, 进行实时定量 PCR 反应, 反应参数和过程同 1.9.

1.11 实时定量 PCR 确定轮状病毒 cDNA 标准品的检测范围

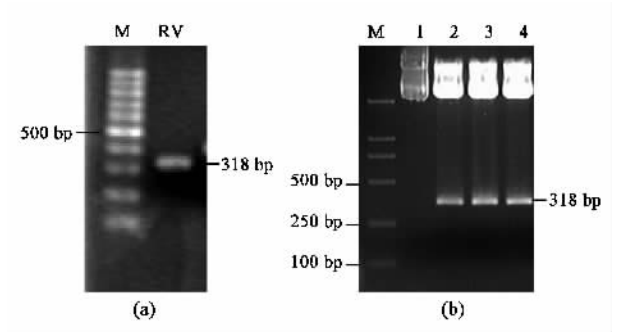
将轮状病毒 cDNA 标准品进行 10 倍的倍比稀释, 稀释滴度分别为 9 × 10⁹ copies/μL, 9 × 10⁸ copies/μL……9 × 10⁰ copies/μL, 进行实时定量 PCR 检测, 共重复 3 次, 反应参数和过程同 1.9.

2 结果与分析

2.1 目的片段的制备、纯化和重组体的鉴定

PCR 产物行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 经 0.5% EB

染色后获得 SA-11 标准株的特异性条带(318 bp). 将该特异性条带切胶回收后行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 结果表明目的片段条带清晰无其他条带, 回收纯化的效果较好, 可用于克隆[见图 1(a)]. 将 T-A 克隆获得的克隆株进行酶切鉴定, 结果如图 1(b)所示, 有 3 株克隆株经过 *EcoR* I 酶切后获得了轮状病毒 SA-11 标准株的目的条带(318 bp).



(a) PCR 产物纯化电泳图, M: DNA Ladder; RV: 轮状病毒 PCR 纯化回收后产物; (b) 重组质粒酶切鉴定结果, M: DNA Ladder; 1: 未经酶切的重组克隆株; 2~4: 酶切后获得轮状病毒目的片段的重组克隆株

图 1 琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis profile

2.2 获得含有轮状病毒 cDNA 的阳性重组质粒

酶切鉴定阳性克隆进一步经测序证实, 测序结果表明目的片段已成功连接入 pGEM-T-easy 载体中; 测序结果经 BLAST^[15] 比对, 重组质粒中的 cDNA 序列和 GenBank 中所提供的猴轮状病毒标准株 SA-11 的所有序列有 99% 以上的同源性, 获得阳性轮状病毒 cDNA 标准品. 部分测序结果见图 2.

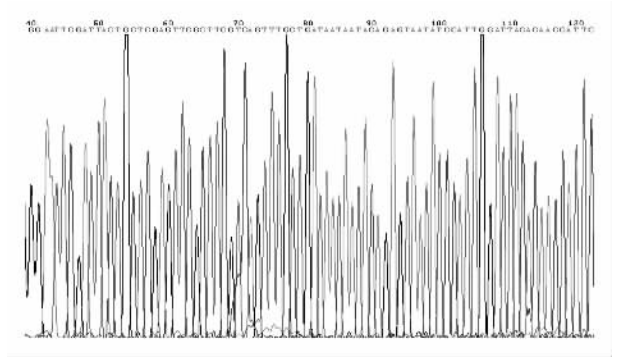


图 2 pGEM-T-easy-VP7 cDNA 标准品的部分测序图谱

Fig.2 Partial sequencing results of pGEM-T-easy-VP7 cDNA standard

2.3 轮状病毒 cDNA 标准品稳定性和重复性结果

利用实时定量 PCR 对不同稀释度的轮状病毒 cDNA 标准品进行平行样的检测, 分析重组质粒的稳定性和重复性. 每个稀释滴度进行 3 次重复实验, 结

果表明不同稀释滴度的轮状病毒 cDNA 标准品在普通冻存条件下(−20℃), 平行样的临界循环数 Ct 值之间的差 < 0.5, 3 次独立实验结果的变异系数 CV 值在 0.2% ~ 0.9%, 表明轮状病毒 cDNA 标准品及该实验体系具有较好的稳定性和重复性. 结果见表 1.

表 1 实时定量 PCR 检测轮状病毒 cDNA 标准品稳定性和重复性

Table 1 Detection of the reproducibility and stability of rotavirus cDNA standard using the real-time PCR				
轮状病毒 cDNA 标准品 /copies·μL ⁻¹	平均 Ct 值			平均值 ± 标准差 (变异系数 CV/%)
	第 1 d	第 20 d	第 60 d	
9 × 10 ⁸	7.67	7.67	7.74	7.69 ± 0.04(0.53)
9 × 10 ⁷	9.75	9.76	9.81	9.77 ± 0.03(0.33)
9 × 10 ⁶	12.47	12.58	12.68	12.6 ± 0.11(0.84)
9 × 10 ⁵	18.93	18.86	19	18.9 ± 0.07(0.37)
9 × 10 ⁴	20.22	20.31	20.23	20.2 ± 0.05(0.24)

2.4 实时定量 PCR 测定轮状病毒 cDNA 标准品倍比稀释后的线性结果

以轮状病毒 cDNA 标准品 10 倍倍比稀释滴度 9 × 10⁸ ~ 9 × 10³ copies/μL 为模板进行实时定量 PCR 分析. 以标准品稀释滴度的对数值为横坐标, 以临界循环数(threshold cycle, Ct)为纵坐标建立实时定量 PCR 的标准曲线, 其线性回归方程为 $y = -3.3534x + 37.278$, 标准曲线斜率为 −3.353, $R^2 = 0.995$, 说明 PCR 扩增该标准品的效率较高, 线性关系良好, 符合制备实时定量 PCR 标准曲线的要求. 经实时定量 PCR 熔解曲线分析表明扩增是特异性的, 结果见图 3.

2.5 实时定量 PCR 确定标准品的检测范围

利用常规 PCR 检测轮状病毒 cDNA 标准品, 标准品的稀释滴度分别为 9 × 10¹¹、9 × 10¹⁰、9 × 10⁹、

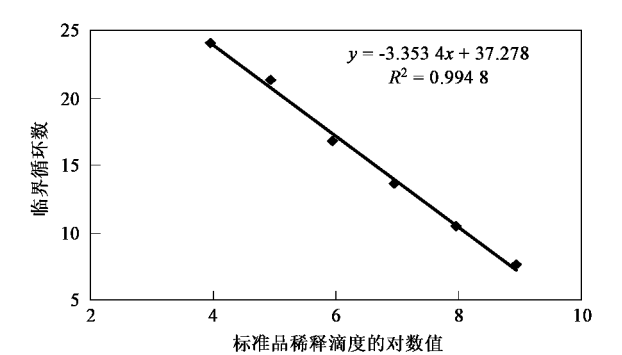
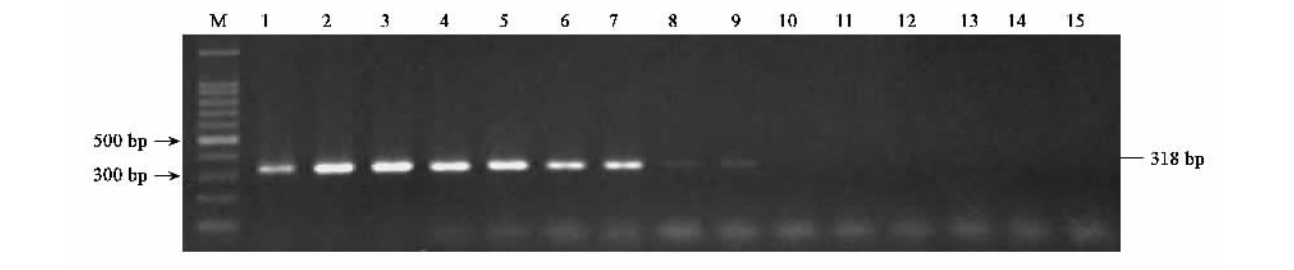


图 3 实时定量 PCR 的标准曲线
Fig.3 Standard curve of real-time PCR

9 × 10⁸……9 × 10⁻² copies/μL, PCR 产物行 2% 琼脂糖电泳. 结果如图 4 所示, 利用常规 PCR 检测轮状病毒标准品的检测范围为 9 × 10¹¹ ~ 9 × 10³ copies/μL.



M: DNA Marker; 1 ~ 15: 依次代表以 9 × 10¹¹、9 × 10¹⁰、9 × 10⁹、9 × 10⁸……9 × 10⁻² copies/μL 和双蒸水为模板进行常规 PCR 检测所扩增出的目的片段行 2% 的琼脂糖电泳检测结果

图 4 常规 PCR 检测不同稀释滴度的轮状病毒 cDNA 标准品

Fig.4 Rotavirus cDNA standard, Serially diluted by factor of 10, detected by commonly PCR reaction

实时定量 PCR 检测 cDNA 标准品, 标准品的稀释滴度分别为 9 × 10⁹、9 × 10⁸……9 × 10⁰ copies/μL, 进行 3 次独立实验. iCycler iQ 软件根据不同稀释滴度的 PCR 反应的循环数(每个反应的模板分别为 9 × 10⁹ ~ 9 × 10⁰ copies/μL)和每个循环得到荧光强度

数据点, 建立实时扩增曲线. 从图 5(a)可知该实时扩增曲线呈典型的“S”形, 具有很好的扩增平台期; 利用本实验优化的实时定量 PCR 反应参数和程序可以检测 cDNA 标准品的线性范围为 9 × 10⁰ ~ 9 × 10¹¹ copies/μL, 其中标准曲线的斜率为 −3.522, $R^2 =$

0.958, 具有很高的扩增效率和良好的线性关系. 同时, 从图 5(a)可知最低每个反应可以检测到 9 个拷贝数的轮状病毒, 具有较高的检测灵敏性. 经过实时定量 PCR 熔解曲线的分析, 如图 5(b)所示, 特异性反应的 T_m 值为 $81^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 表示 real-time PCR 产物是轮状病毒 VP7 的特异性序列, 且表明该对引物用于检测轮状病毒具有很好的特异性.

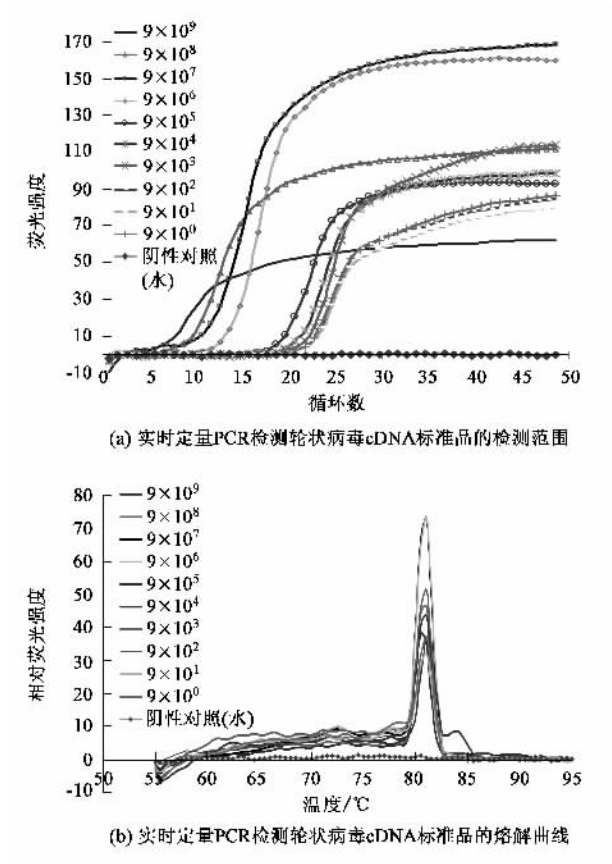


图5 轮状病毒 cDNA 标准品实时定量 PCR 的扩增图谱
Fig.5 Amplification profile of rotavirus cDNA standard

3 讨论

以往检测轮状病毒主要采用电子显微镜(EM)、酶联免疫分析(EIA)和 PAGE 等方法^[16,17],但这些方法检测的敏感性较低且不能满足多种复杂水环境样品的检测. 近年一些研究者开始采用 real-time PCR 技术检测来自腹泻标本中的轮状病毒,但是水环境样品中的轮状病毒及其感染性的检测还在探索过程中^[18~21]. 鉴于 real-time PCR 技术的关键是定量,所以研究者们采用 Taq Man 探针技术或者外标准品的构建来实现绝对定量^[13],其中 Taq Man 探针因其价格昂贵,不易保存等缺点,使得外标准品的构建成为水中病毒实时定量 PCR 检测研究中的关键环节. 本

研究构建了 1 种特异性好、敏感性高、稳定易保存的外标准品,在实时定量 PCR 的检测中具有良好的应用价值.

本研究针对水环境中轮状病毒检测所构建的外标准品具有以下几个特点:轮状病毒 RNA 是从感染的 MA-104 细胞中培养制备的,基于此得到的外标准品属于感染性轮状病毒特异性的;在此基础上建立的水中轮状病毒的 real-time PCR 方法除在检测的精确性、灵敏性方面具有优势外,同时可分析病毒的感染性,这对于水质微生物学安全的评价具有重要的意义;构建标准品时,引物设计包含了轮状病毒的特异性结构蛋白,这保证了实时定量 PCR 检测轮状病毒的特异性.

4 结论

(1)利用该轮状病毒标准品所获得的标准曲线具有较高的扩增效率和良好的线性关系(斜率为 -3.353 , $R^2 = 0.995$). 实时定量 PCR 的熔解曲线分析表明 PCR 产物是轮状病毒 VP7 序列上的特异性产物,证明本研究中构建的标准品是轮状病毒特异性.

(2)利用该轮状病毒标准品进行常规 PCR 的检测限范围为 $9 \times 10^3 \sim 9 \times 10^{11}$ copies/ μL ; 进行实时定量 PCR 的检测限范围为 $9 \times 10^0 \sim 9 \times 10^{11}$ copies/ μL , 实时定量 PCR 检测轮状病毒 cDNA 的标准品可以达到 9 个拷贝数. 所以,利用该标准品进行实时定量 PCR 分析时具有良好的检测灵敏性,这对于水环境中痕量感染性轮状病毒的检测具有重要的意义.

(3)不同拷贝数的轮状病毒 cDNA 标准品在普通冻存条件下(-20°C),具有良好的稳定性(CV 值在 $0.2\% \sim 0.9\%$ 之间).

(4)在本研究过程中获得了优化的实时定量 PCR 反应程序,该反应程序用来定量检测水环境中微量轮状病毒的病毒核酸具有良好的效果.

致谢:感谢山东省医学科学院基础研究所孟虹教授赠予 MA-104 细胞和轮状病毒标准株.

参考文献:

[1] Parashar U D, Gibson C J, Bresee J S, et al. Rotavirus and severe childhood diarrhea[J]. Emerg Infect Dis, 2006, 12(2):304-306.
[2] 常汝需,何翠娟. 腹泻患儿粪便标本中轮状病毒检测方法比较[J]. 中华儿科杂志,2000, 38(11):703-704.
[3] Orenstein E W, Fang Z Y, Xu J, et al. The epidemiology and burden of rotavirus in China: A review of the literature from 1983 to 2005[J]. Vaccine, 2007, 25(3):406-413.

- [4] Parashar U D, Holman R C, Clarke M J, *et al.* Hospitalizations associated with rotavirus diarrhea in the United States, 1993 through 1995: surveillance based on the new ICD-9-CM rotavirus-specific diagnostic code [J]. *J Infect Dis*, 1998, **177**(1):13-17.
- [5] Le Guyader F, Haugarrean L, Miossec L, *et al.* Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(8):3241-3248.
- [6] Estes M K, Palmer E L, Obijeski J F. Rotaviruses: a review [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1983, **105**:123-184.
- [7] He J W, Jiang S. Quantification of Enterococci and Human Adenoviruses in Environmental Samples by Real-Time PCR [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(5):2250-2255.
- [8] Ko G, Jothikumar N, Hill V, *et al.* Rapid detection of infectious adenoviruses by mRNA real-time RT-PCR [J]. *J Virol Methods*, 2005, **127**(2):148-153.
- [9] Jothikumar N, Lowther J A, Hershilwood K, *et al.* Rapid and sensitive detection of noroviruses by using TaqMan-based one-step reverse transcription-PCR assays and application to naturally contaminated shellfish samples[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(4):1870-1875.
- [10] Fuhrman J A, Liang X, Noble R T. Rapid detection of enteroviruses in small volumes of natural waters by real-time quantitative reverse transcriptase PCR [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(8):4523-4530.
- [11] Haramoto E, Katayama H, Oguma K, *et al.* Application of cation-coated filter method to detection of noroviruses, enteroviruses, adenoviruses, and Torque Teno viruses in the Tamagawa River in Japan [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(5):2403-2411.
- [12] Brooks H A, Gersberg R M, Dhar R K. Detection and quantification of hepatitis A virus in seawater via real-time RT-PCR [J]. *J Virol Methods*, 2005, **127**(2):109-118.
- [13] Mackay I M, Arden K E, Nitsche A. Real-time PCR in Virology [J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, **30**(6):1292-1305.
- [14] [http://ma.lundberg.gu.se/cutter2/\[EB/OL\]](http://ma.lundberg.gu.se/cutter2/[EB/OL]).
- [15] [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/\[EB/OL\]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/[EB/OL]).
- [16] Gouvea V, Glass R I, Woods P, *et al.* Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens [J]. *J Clin Microbiol*, 1990, **28**(2):276-282.
- [17] Lipson S M, Svenssen L, Goodwom L, *et al.* Evaluation of two current generation enzyme immunoassays and an improved isolation-based assay for the rapid detection and isolation of rotavirus from stool [J]. *J Clin Virol*, 2001, **21**(1):17-27.
- [18] Pang X L, Lee B, Boroumand N, *et al.* Increased Detection of Rotavirus Using a Real Time Reverse transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Assay in Stool Specimens From Children With Diarrhea [J]. *J Med Virol*, 2004, **72**(3):496-501.
- [19] Kang G, Iturriza-Gomara M, Wheeler J G, *et al.* Quantitation of Group A Rotavirus by Real-Time Reverse-Transcription-Polymerase Chain Reaction: Correlation with Clinical Severity in Children in South India [J]. *J Med Virol*, 2004, **73**(1):118-122.
- [20] Schwarz B A, Bange R, Vahlenkamp T W, *et al.* Detection and quantitation of group A rotaviruses by competitive and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction [J]. *J Virol Methods*, 2002, **105**(1):277-285.
- [21] Ranheim T, Mathis P K, Joelsson D B. Development and application of a quantitative RT-PCR potency assay for a pentavalent rotavirus vaccine (RotaTeq) [J]. *J Virol Methods*, 2006, **131**(2):193-201.