

## RT-PCR 法检测贝类中的甲肝病毒的研究\*

饶红 陈广全 曾静 汪琦 付浦博

(北京出入境检验检疫局, 北京, 100026)

**摘要** 在世界范围内, 甲肝病毒是与食用贝类有关的主要传染性疾病之一。由于贝类中含有 PCR 抑制剂以及病毒富集过程中病毒的回收率低, 阻碍了天然污染的贝类中 HAV 的 PCR 检测。研究中建立了一种经甘氨酸缓冲液洗涤, 2 次 PEG 沉降富集病毒, 然后进行 RNA 提取和 RT-PCR 对贝类中的甲肝病毒进行检测的方法。经比较, 采用小体系肠道样品检测比采用全贝检测的富集效果更佳, 并比较了 PEG8000 和 PEG6000 对病毒富集的效果, 回收率分别为 13.5% 和 7.6%, 此方法可有效地降低 PCR 抑制剂的影响, 最低检测限可达 10 个 TCID<sub>50</sub> / 1.5 g。

**关键词** RT-PCR, 检测, 甲肝病毒, 贝类

甲型肝炎病毒是一种正链 RNA 病毒, 它属于小 RNA 病毒肝病组病毒。它所导致的疾病是与贝类相关的最严重的疾病之一。首次记录到的贝源性肝炎爆发是 1956 年在瑞典发生的, 当时发现了与进食生牡蛎相关的 629 例肝炎病例。世界范围内, 大约有 7% 的有报告的传染性肝炎病例归因于进食生的或者未经适当烹制的贝类, 包括牡蛎, 蛤等。这是因为贝类可以通过其体内的滤过性器官将水, 即被粪便污染的水中的病毒富集在体内, 富集浓度可高达 100 倍。而且, 贝类养殖和收获后所使用的净化方法, 只对细菌性污染起作用, 对病毒无效<sup>[4]</sup>。另外, 为保持口感鲜嫩, 人们喜欢食用生的或半熟的贝类。在我国, 因食用贝类引起的甲肝流行屡有发生, 其中最大的一次流行发生在上海。近年来, 我国出口美国的贝类曾多次被检出 HAV 而被列为禁止入境产品, 极大地损害了我国产品的国际形象, 造成了不良的国际影响。建立贝类样品中 HAV 检测方法, 能够有效地防止甲肝传播和监控不合格进出口贝类产品。

贝类样品中病毒含量低, 干扰物质多, 经典的细胞培养法检测周期至少需要 28 d, 而且, 检测灵敏度差, 不能用于贝类样品中 HAV 的检测。目前, 国际上多采用 RT-PCR 方法, 文中对贝类样品中病毒富集方法、RNA 提取方法和不同 RT-PCR 试剂的实验效果进行了研究和比较, 建立了贝类样品中 HAV 检测方法, 此方法的检测灵敏度可达 10 个 TCID<sub>50</sub>/1.5 g(贝)。

第一作者: 学士, 副主任技师。

\* 国家质检总局行业标准制定项目 (No. B121-2003)

收稿日期: 2006-07-26

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

(1) 甲肝病毒: 冻干甲型肝炎减毒活疫苗 (浙江普康生物技术有限责任公司, 滴度为 106.5 TCID<sub>50</sub>/mL), 临用前将冻干的减毒活疫苗用 1 mL 的生理盐水或 PBS 溶解。

(2) Trizol (Invitrogen Cat. No. 15596-026)。

(3) High Pure Viral RNA Kit (Roche 1858882)。

(4) AMV 反转录酶 (promega)。

(5) Taq 酶 (Katara)。

(6) Superscript<sup>TM</sup> one-step RT-PCR with platinum Taq (Introgen Cat. No. 10928-034)。

(7) 引物。使用的引物位于 HAV 基因组中编码 VP1-VP3 壳蛋白的区域<sup>[16]</sup>, 目的片段长度为 192 bp。

5' primer, 5'-CAGCACATCAGAAAGGTGAG-3'

3' primer, 5'-CTCCAGAATCATCTCCAAC-3'

(8) 样品: ① 贝类样品一部分样品为由挪威进口的生蚝, 其他样品购自水产品市场。用于人工污染的贝类样品均经实验证实为 HAV 阴性。② 贝类样品的人工污染: 取适量贝类样品 (尽量取消化道部分), 匀浆, 加入 HAV 疫苗, 涡流混匀 60 s, 37℃ 孵育 30 min。

## 1.2 病毒回收率的测定

将一定量的病毒加入贝类样品中成为人为模拟的阳性样品, 进行样品中病毒的富集, 将最后一次沉降的 PEG 沉淀 (RNA 提取前) 用 0.1 mol/L PBS 缓冲液重悬浮, 形成 1 mL 病毒混悬液。将此混悬液接

种于细胞进行培养,测得此病毒混悬液的  $TCID_{50}$  值,计算出此混悬液中的病毒量,代入公式计算回收率。

$$\text{回收率} = \frac{\text{RNA 提取前病毒混悬液中病毒量}}{\text{样品中加入的病毒量}}$$

### 1.3 病毒富集方法

#### 1.3.1 大体系 PEG8000 富集法

25 g 贝类样品(整个贝类)中加入 175 mL 甘氨酸缓冲液(pH 9.5, 甘氨酸 0.1 mol/L, NaCl 0.3 mol/L),搅拌器中充分破碎混匀 2 min。37℃ 孵育 30 min。5 000 g, 4℃, 离心 20 min。收集上清液,用 PEG8000 于 4℃ 过夜沉降病毒(PEG 终浓度为 8%, NaCl 终浓度为 0.3 mol/L)。6 700 g, 4℃, 离心 30 min。弃上清液,用 10 mL PBS(pH 7.4)缓冲液重悬浮沉淀,可用涡流混匀或枪头助溶,加入等体积的 3-氯-3-氟-乙烷,涡流混匀 10 s,然后于 4℃, 2 000 g, 离心 30 min。小心吸取上清液,用 PEG8000 于 4℃ 过夜沉降病毒(PEG 终浓度为 8%, NaCl 终浓度为 0.3 mol/L)。14 000 g, 4℃, 离心 15 min。弃上清液,用适量的 PBS 缓冲液重悬浮沉淀。取 1/4 体积的重悬浮液,用等体积的  $CHCl_3$  抽提 1 次,小心收集上清液用于 RNA 的提取。

#### 1.3.2 小体系 PEG6000 富集法

取 1.5 g 样品(贝类肠道组织)加入 15 mL 甘氨酸缓冲液(甘氨酸 0.05 mol/L, NaCl 0.15 mol/L, pH 7.5),冰上匀浆。37℃ 孵育 30 min。5 000 g, 离心 20 min。取上清液于一新的离心管中,向沉淀中加入 15 mL 苏氨酸缓冲液(苏氨酸 0.5 mol/L, NaCl 0.14 mol/L, pH 7.5), 5 000 g, 离心 20 min。合并 2 次上清液,加入 PEG6000, 至终浓度为 PEG6000 12%, NaCl 0.3 mol/L。冰上沉降过夜。6 700 g, 离心 30 min。用 15 mL PBS 重悬浮沉淀,加入 15 mL  $CHCl_3$ , 点震涡流混匀 60 s。2 000 g, 离心 30 min。小心地将上清液取出,注意不要碰到分界面上的物质,向上清中加入 PEG6000, 至终浓度为 PEG6000 12%, NaCl 0.3 mol/L。沉降过夜或冰上沉降 2 h。14 000 g, 离心 15 min。弃上清液,沉淀用于 RNA 提取。

#### 1.3.3 小体系 PEG8000 富集法

与 1.10.2 相同,只是用 PEG8000 代替 PEG6000。

### 1.4 RNA 提取方法

#### 1.4.1 Trizol 法

按 David H Kingsley<sup>[7]</sup>提供的方法进行操作。

#### 1.4.2 试剂盒法

按试剂盒说明书进行操作。

### 1.5 RT-PCR 反应

#### 1.5.1 AMV 反转录酶法(promega)

选用 50  $\mu$ L 反应体系进行反转录反应。反应体系包含 10 $\times$  buffer 5  $\mu$ L, dNTP (10 mmol/L) 2  $\mu$ L,  $MgCl_2$  (25 mmol/L) 8  $\mu$ L, 289 混合引物 (10 pmol/L) 2  $\mu$ L, RNA 酶抑制剂 10u, AMV 反转录酶 5u 及 RNA 模板 25  $\mu$ L。反应条件为 42℃, 60 min。然后立即进行 PCR 反应或于 -20℃ 保存备用。

选用 50  $\mu$ L 反应体系进行 PCR 反应。反应体系包含 10 $\times$  buffer 5  $\mu$ L, 290 混合引物 (10 mmol/L) 2  $\mu$ L, Taq 酶 2.5U 及 cDNA 25  $\mu$ L。PCR 反应条件为: 变性 (94℃, 3 min), 40 个循环 (94℃, 1 min, 49℃, 1' 20", 72℃, 1 min), 延伸 (72℃, 10 min)。

#### 1.5.2 Superscript<sup>TM</sup> one-step RT-PCR with platinum Taq (Introgen) 法

RT 与 PCR 在一个反应体系中一次完成,反应体系包含:

2 $\times$ 反应混合物	25 $\mu$ L
5'引物(10 mmol/L)	1 $\mu$ L
3'引物(10 mmol/L)	1 $\mu$ L
酶混合物	1 $\mu$ L
模板	20 $\mu$ L
水	2 $\mu$ L

RT 反应条件: 50℃, 30 min。94℃, 2 min。然后按 1.12.1 中 PCR 反应条件进行 PCR。

### 1.6 脂糖凝胶电泳检测扩增产物

1.4 g 琼脂糖加入 100 mL 的 1XTAE 中制胶, 9 V/cm 电压电泳后用 RYBR GREEN I 染色 20 min, 观察结果。HAV 阳性样品于 192bp 处出现特异性条带。

### 1.7 阳性产物的确认

将 PCR 产物用快速纯化试剂盒纯化后, 将扩增的基因片段克隆入质粒, 转入大肠杆菌感受态细胞扩增后进行测序。使用序列分析软件与 GenBank 中的参考序列进行比对。

## 2 结果及讨论

### 2.1 富集方法的选择

贝类样品中存在的病毒含量低, 富集病毒是检验必不可少的步骤, 也是食品中甲肝病毒检测能否成功的关键。在本研究的初期使用国际上普遍采用的聚乙二醇 8000 (PEG-8000) 进行病毒的富集<sup>[2,11]</sup>。使用

大体系富集法,经2次聚乙二醇8000沉降,样品体积从175 mL浓缩至1 mL,起到了较好的富集作用。但如果将所有样品液(1 mL)均进行RNA的提取,至少需25 mL的Trizol或5个RNA提取柱。实验成本较高,同时也增加了操作的难度。因此,我们借鉴最新的富集方法<sup>[15]</sup>,只取1/4样品液进行RNA提取,最终溶解RNA的体积控制在50  $\mu$ L,RNA的浓度并未降低,但节省了提取试剂,也简化了操作。这种富集方法的HAV疫苗的最低检出限为 $5 \times 10^3$ 个TCID<sub>50</sub>/25 g。

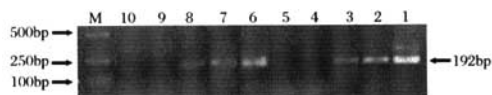
近期的报道中有关采样的方法有所改变,大多数研究者不再取整个贝类进行检测,而是只取贝类的肠道组织作为实验样品<sup>[10]</sup>。他们认为贝类中的病毒主要存在于肠道中,这样可将实验体积控制在50 mL内,节省了试剂,实验操作更加方便。为寻找最佳的病毒富集方法,本文对2种病毒富集方法进行了评价,并对它们的回收率进行了测定。

本文报道的小体系PEG8000法的病毒回收率为13.5%,小体系PEG6000法的病毒回收率为7.6%。目前国际上所报道的贝类中病毒富集方法的回收率大致为12%左右<sup>[14]</sup>,小体系PEG8000法的回收率基本与国外文献所报道的数值相符,因此,从回收效果的角度考虑,小体系PEG8000法可用于实际检测。

在实际检测中,判断检验方法优劣的标准是方法的灵敏度。因此,我们使用HAV疫苗对小体系PEG8000法和小体系PEG6000法的检测灵敏度进行了比较。结果显示,2种方法的灵敏度基本相同(图1),均为10个TCID<sub>50</sub>/1.5 g。但小体系PEG8000法检测结果的条带较小体系PEG6000法的清晰,说明在相同的实验条件下,小体系PEG8000法的实验效果较好。

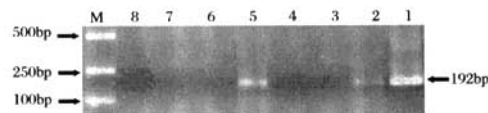
## 2.2 RNA提取方法的选择

本次研究中RNA的提取采用Roche的High Pure Viral RNA Kit及经典Trizol法进行。经典Trizol法是常用的RNA提取试剂。而Roche的High Pure Viral RNA Kit中采用膜技术纯化病毒RNA。使用AMV反转录酶进行比较实验,结果表明(图2),若采用Roche的High Pure Viral RNA Kit提取RNA,HAV添加量为100个TCID<sub>50</sub>时可检测出阳性结果。但使用经典Trizol法,当HAV添加量为100个TCID<sub>50</sub>时不能检出阳性条带,而且试剂盒法操作简便,在费用上与进口Trizol试剂相比略低。



1~5道:1~4为使用小体系PEG8000进行富集,HAV添加量为 $10^3$ 个TCID<sub>50</sub>,10个TCID<sub>50</sub>,1个TCID<sub>50</sub>时的检测结果;5:阴性对照;6~10道:6~9为使用小体系PEG6000进行富集,HAV添加量为 $10^3$ 个TCID<sub>50</sub>, $10^2$ 个TCID<sub>50</sub>,10个TCID<sub>50</sub>,1个TCID<sub>50</sub>时的检测结果;10:阴性对照;M:marker

图1 富集方法2和方法3检测灵敏度的比较

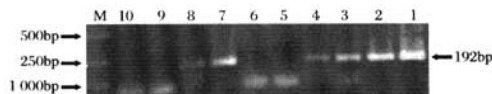


1~4道(Kit法):1~3道为1.5 g贝类中添加 $10^3$ 个TCID<sub>50</sub>, $10^2$ 个TCID<sub>50</sub>,10个TCID<sub>50</sub>HAV疫苗时的检测结果;4:阴性对照;5~8(Trizol法)5~7道为1.5 g贝类中添加 $10^3$ 个TCID<sub>50</sub>, $10^2$ 个TCID<sub>50</sub>,10个TCID<sub>50</sub>HAV疫苗时的检测结果;8:阴性对照;M:marker

图2 不同RNA提取方法检测灵敏度比较

## 2.3 RT-PCR方法的选择

在研究中发现,不同的反转录酶对实验结果有很大影响。我们用甲肝疫苗进行了比较实验。结果表明,Superscript(invitrogen)反转录酶可检测出 $10^{-4}$ 个TCID<sub>50</sub>的HAV疫苗,而AMV反转录酶(promega)只能检测出 $10^{-2}$ 个TCID<sub>50</sub>的HAV疫苗。用Superscript反转录酶所进行的RT-PCR反应的灵敏度要大大高于AMV反转录酶(图3)。



1~6道(Superscript):1~5道为疫苗滴度分别为 $10^{-1}$ 个TCID<sub>50</sub>, $10^{-2}$ 个TCID<sub>50</sub>, $10^{-3}$ 个TCID<sub>50</sub>, $10^{-4}$ 个TCID<sub>50</sub>和 $10^{-5}$ 个TCID<sub>50</sub>时RT-PCR检测结果;6道:阴性对照;7~10道(promega):7~9道为疫苗滴度分别为 $10^{-1}$ 个TCID<sub>50</sub>和 $10^{-2}$ 个TCID<sub>50</sub>时RT-PCR检测结果;10道:阴性对照;M:marker

图3 不同RT-PCR方法检测HAV疫苗灵敏度的比较

以上实验结果表明,使用小体系PEG8000法对贝类中的病毒进行富集,用试剂盒法提取病毒RNA,然后使用Superscript反转录酶对病毒RNA进行扩增,是进行贝类中HAV检测的最佳技术路线,此法的检测灵敏度可达10个TCID<sub>50</sub>/1.5 g(贝)(图2)。

## 参 考 文 献

- 1 Kirkland K B, Meriwether R A, Leiss J K, et al. Steamed oysters does not prevent Norwalk-like gastroenteritis[J]. Public Health Reports, 1999, 111(6): 527~530
- 2 Carol Shieh Y S. A method to detect low levels of enteric viruses in contaminated oysters[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 4 709~4 714
- 3 Mead P S, Slutsker L, Dietz V, et al. Food-related illness and death in the United States[J]. Emerg Infect Dis, 1999, 5(5):607~625
- 4 Marion K, Bonsdorff C V, Vinje J, et al. Foodborne viruses [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2002, 26 :187~205
- 5 Jaykus L A. Enteric virus as "emerging" agents of foodborne disease[J]. Irish J Agr Food Res, 2000, 39:245~255
- 6 Jenifer L Mullendore. Improved method for the recovery of hepatitis A virus from oysters[J]. J Virol Methods, 2001, 94:25~35
- 7 David H Kingsley. Detection of both Hepatitis A Virus and Norwalk-Like Virus in Imported Clams Amssociated with Food-Borne Illness[J]. Appl Environ Microbiol, 2002(8): 3 914~3 918
- 8 Kellogg J S, Neill F H, Fankhauser R L, et al. Development of methods to detect "norwalk-like viruses" (NLVSs) and hepatitis a virus in delicatessen foods: application to a food-borne NLVS outbreak[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 66(1):213~218
- 9 Kellogg J S, Frederick H N, Guyader F L, et al. Development of a reverse transcription-PCR-DNA enzyme immunoassay for detection of "norwalk-like" viruses and hepatitis a virus in stool and shellfish[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(2): 742~749
- 10 Arnie I Sair. Improved detection of human enteric viruses in foods by RT-PCR[J]. J Virol Methods, 2002, 100:57~69
- 11 Atmar R L, Neill F H, Romalde J L, F Le Guyader, et al. Detection of norwalk virus and hepatitis a virus in shellfish tissues with the PCR[J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61:3 014~3 018
- 12 金 奇. 医学分子病毒学[M]. 北京:科学出版社,2001
- 13 Boom R, Sol C J, Salimans M M, et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids[J]. J Clin Microbiol, 1990, 28:495~503
- 14 Alissa B, Lee-ann Jaykus. Virion concentration method for the detection of human enteric viruses in extracts of hard-shelled clams[J]. J of Food Protection, 1998, 61 (4): 458~465
- 15 David H Kingsley, Sary P Richards. Rapid and efficient extraction medthod for reverse transcription-PCR detection of hepatitis a and norwalk-like viruses in shellfish[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 67 (9): 4 152~4 157
- 16 Pairs R Leggitt, Lee-ann Jaykus. Detection methods for human enteric viruses in representative food[J]. J of Food Protection, 2000, 63:1 738~1 744

## Study on the Detection of Hepatitis a Virus in Shellfish by RT-PCR

Rao Hong Chen Guangquan Zeng Jing Wang Qi Fu Bubo

(Beijing Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Beijing 100026, China)

**ABSTRACT** Hepatitis A is one of the major infectious diseases epidemiologically associated with worldwide shellfish consumption. The efficacy of method using polymerase chain reaction (PCR) to detect hepatitis A virus (HAV) in contaminated shellfish can be hindered by low recoveries during the concentration process and by natural PCR inhibitors in shellfish. The method for the detection of Hepatitis A virus from shellfish by twice polyethylene glycol(PEG)-precipitation, extraction of virus RNA and RT-PCR was developed in the report. The comparison of two different methods for sampling showed that the small system with the stomachs and digestive diverticula was more effective than the large system with whole shellfish tissue. The effect of virus concentration from shellfish by PEG8000 was compared with that by PEG6000, and the recovery was 13.5% and 7.6% respectively. The method developed can reduce the inhibition of PCR inhibitors and the detection limit was  $10\text{TCID}_{50}/1.5\text{g}$ .

**Key words** RT-PCR, detection, hepatitis a virus, shellfish