

36)-372
AC-PCR 法检测连云港海域贝类 HAV

赵文彬 林红玉 李家富 王理兴 龚海萍

(连云港市卫生防疫站, 连云港 222003)

方肇寅 王秋红

(中国预防医学科学院病毒学研究所, 北京 100052)

关键词 贝类, 甲型肝炎病毒, 聚合酶链反应

为了解连云港海域贝类甲型肝炎病毒(HAV)污染状况, 证实其在本地区甲肝传播中的媒介地位, 我们应用抗体捕捉聚合酶链反应(AC/PCR)检测市售贝类的 HAV, 结果报告如下:

材料和方法

- 1 贝类样品** 于1996年春、秋二季采集新浦区、连云区和赣榆县等地水产品市场销售的毛蚶、白蛤和海蛎等贝类计 31 份, 其产地均为连云港海域。
- 2 贝类样品中病毒的浓缩** 浓集病毒采用洗脱沉淀法^[1]。洗净贝壳, 取 30 g 贝肉(包括消化道肌肉和内脏等全部), 剪碎, 用组织磨碎器研磨成匀浆, 加冷蒸馏水至 100 mL, 充分搅拌 5 min, 以洗脱病毒(pH7.5), 冰浴超声(4710 Series ultrasonic homogenizer, USA, 探头直径 2.5 mm, 50 W; 每次 20 s, 共 3 次)室温 2000 × g, 离心 20 min, 上清待用。沉淀用冷蒸馏水重悬至 90 mL, 再次超声, 离心, 合并两次上清, 用 0.1 mol/L HCl 调 pH 至 4, 充分搅拌 10 min, 静置 5 min, 进行第一次沉淀 1000 × g 离心 15 min, 弃上清, 将沉淀用 50 mL 冷甘氨酸缓冲液(0.05 mmol/L glycine-0.14 mol/L NaCl, pH9.0)超声重悬, 用 0.1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.5, 离心 2000 × g 离心 20 min, 弃沉淀; 所得上清再次用 0.1 mol/L HCl 调 pH 进行第二次沉淀, 1000 × g 离心 15 min, 沉淀加入抗生素(含青霉素 100 μg/mL, 链霉素 100 μg/mL), 然后逐滴加入 0.1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.5, 得终体积为 1.5~2.0 mL 匀浆, 于 -20 °C 冻存过夜, 融化后 2000 × g 离心 20 min, 所得上清用于 AC/PCR。
- 3 引物对的选择** HAV 的基因组为单链 RNA, 本方法选择能覆盖病毒壳蛋白 VP1 较易变区的两端保守区合成引物, 其负链引物设计为结合于 VP1 核苷酸 2389~2414, 5'-GGAAATGTCTCAGGTACTTTCTTTG-3', 正链引物的设计为结合于编码 VP3 羧基端核苷酸的 2167~2193, 5'-GTTTTGCTCCTCTTTATCATGCTATG-3'。
- 4 AC/PCR** 抗体捕捉在 0.5 mL 离心管中进行, 用 100 μL 经碳酸盐包被液(pH 9.6)1:200 稀释的抗-HAV 单克隆抗体包被, 37 °C 包被 2 h 或 4 °C 过夜, 经 PBS-0.05% Tween 20 洗管 6 次后, 用 200 μL 1% BSA 封闭, 37 °C 1 h, 洗管 5 次后用 100 μL 样品浓集上清液进行捕捉抗原, 42 °C 1 h 或 4 °C 过夜, 将离心管中样品液倾去, 用 PBS-0.05% Tween 20 洗管 6 次, 加入 37.5 μL H₂O, 5 μL 的 10 倍缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 500 mmol/L KCl, 15 mmol/L MgCl₂, 0.1% Gelatin), 5 μL dNTP(2 mmol/L dATP, 2 mmol/L dCTP, 2 mmol/L dGTP, 2 mmol/L dTTP)和 0.5 μL 负链引物(100 ng/μL)。98 °C 加热 3 min 使病毒释放核酸后立即放入冰浴。继续加入 0.5 μL 核酸酶(RNasin, Boehringer Mannheim)和 0.5 μL 逆转录酶(AMV, Promega, 2.5 U/μL), 于 42 °C 逆转录 30 min, 95 °C

收稿日期: 1997-11-10, 修回日期: 1998-01-29

5 min 灭活逆转录酶后立即冰浴,最后加入 0.5 μL 正链引物(100 ng/ μL)和 0.5 μL Taq 多聚酶(3 u/ μL , 华美),混匀后用 50 μL 石蜡油封盖,放于基因扩增仪内经 30 个周期扩增(94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火复性 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 引物延伸 1 min),引物延伸在开始一个周期增至 3 min, 最后一个周期增至 7 min。

5 PCR 产物的检测和结果判断 15 μL 一次 PCR 扩增产物,经 1.5% 琼脂糖凝胶(含 0.5 μg 溴化乙锭/ mL)电泳液为 1 \times TBE,电泳后于紫外灯下肉眼观察,可见大小为 248 bp 的特征 DNA 条带者判为阳性,未见特征 DNA 条带的均以 PCR 一次扩增产物 1 μL 为模板,进行 2 次扩增后再判定结果。

结果与讨论

贝类样品经洗脱一次浓集回收病毒,经二次 AC/PCR 扩增,其中 11 份样品检出 HAV,在琼脂糖电泳图谱中,其扩增产物为单一核酸带,分子量大小一致,经与 DNA 分子量标准($\Phi\text{x-174RF}$ DNA-HaeIII 消化产物,Pharmacia)比较,PCR 产物带在 271 和 234 bp 之间,这与设计引物对时计算的产物大小 248 bp 一致。HAV 阳性样品分布见附表,从附表可见所检测的 5 种贝类,其中有 4 种贝类即毛蚶、菲律宾蛤蚧(俗称花蚶)、白蛤和海蛭检出 HAV,从毛蚶的春秋二季样品 HAV 检出情况看,春季 3 份样品均检出 HAV,而秋季 8 份样品中有 4 份检出 HAV,此检出结果,初步表明春季毛蚶携带 HAV 较高。

我们用洗脱-沉淀浓集贝肉(包括消化道)中 HAV,然后用抗-HAV 的单克隆抗体捕捉浓集液中的 HAV,加热释放病毒 RNA 后,经逆转录合成 DNA,再进行 PCR 扩增来检测 HAV,全部反应在一个管内完成,快速简便。经实验,二次沉淀后病毒的回收率为 26%,30 g 贝肉中的病毒浓集回收在 1.0~1.5 mL 上清液中,样品经一次 PCR 扩增仅 HAV 原样品和 10^{-1} 为阳性,经二次扩增结果 10^{-2} ~ 10^{-6} 均为阳性,电泳图(见图)中所示 13 份标本在一次 PCR 扩增仅 e 样为阳性,第二次扩增就增加 g、h、i 和 o 4 份样品阳性。

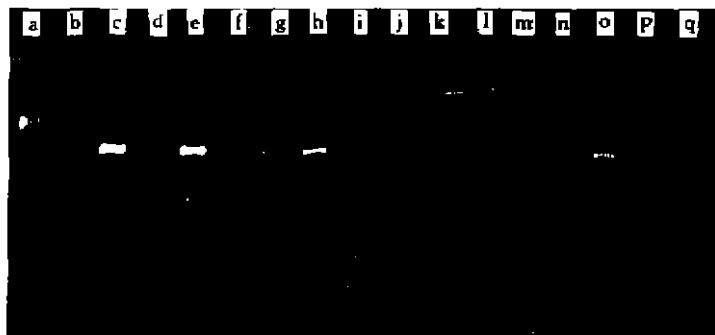


图 AC/PCR(经二次 PCR 扩增)检测连云港海域贝类样品 HAV 污染

a. 分子量标准对照($\Phi\text{x174/HaeIII}$); b. 阴性对照(H_2O); c. 阳性对照(HAV); d-p. 13 份贝类样品检测结果(d-h 毛蚶; i-j 白蛤; k, m, n 菲律宾蛤蚧; o-q 海蛭)

Fig Detection of HAV contamination in shellfish from Lianyungang sea waters by AC/PCR (after second amplification)

a. DNA marker ($\Phi\text{x174/HaeIII}$); b. Negative control (H_2O); c. Positive control (HAV); d-p. 13 shellfish samples (d-h. *Scapharca subcrenata*; i-j. *Macoma incongrua*; k, m, n. *Buhtapes philippinarum*; o-q. *Sinonovacula constricta*).

表 连云港海域 31 份贝类样品 AC/PCR 检测 HAV 结果

Table Detection of HAV contamination in shellfish from Lianyungang sea waters by AC/RCR

贝类 Shellfish	春季 Spring		秋季 Autumn	
	份数 Number of sample	阳性数 Positive No.	份数 Number of sample	阳性数 Positive No.
毛蚶 <i>Scapharca Subcrenata</i>	3	3	8	4
菲律宾蛤蚶 <i>Buditapes philippinarum</i>	2	0	5	1
白蛤 <i>Macoma incongrua</i>	3	1	7	1
海蚌 <i>Sinonovacula constricta</i>			2	1
扇贝 <i>Chlamys farreri</i>	1	0		
共计 Total	9	4	22	7

由贝类污染 HAV 引起甲肝的暴发流行,已成为全球性一个严重的公共卫生问题。欲控制沿海地区甲肝流行,切断贝类传播途径仍是一项重要防控措施。从我们此次调查结果看,连云港海域的贝类已不同程度污染 HAV,但以毛蚶污染 HAV 严重,此乃由于毛蚶摄入和过滤海水中病毒的速度相当惊人,仅 0.5 h 已达外界水体污染水平,24 h 能将水中 HAV 浓缩 29 倍^[2],且净化困难,成为贝类中传播疾病的主要媒介。我们此次采集的贝类样品,均经过渔民的“净化处理”后,才到市场销售,但仍有较高的 HAV 检出率。

从贝类样品检测结果看,春季采集的毛蚶 100% 受到 HAV 污染,这与本地区甲肝流行峰型相吻合,即春峰高于秋峰。初步证实本地区甲肝发病与海产贝类中 HAV 污染高低有关。贝类是人们喜爱的海鲜食品,贝类污染 HAV 是多方位的,在甲肝的防制中,应加强对海产品 HAV 污染的监测,以切断贝类传播 HAV 途径,同时教育群众,不生食海产品。

参 考 文 献

- 1 王秋红,方肇寅,吕作芝等.应用抗体捕捉聚合酶链反应(AC/PCR)检测贝类甲型肝炎病毒污染.病毒学报,1996,12(2):123
- 2 汪健翔,胡善联,俞顺章等.毛蚶积聚和净化甲肝病毒的研究.中华实验和临床病毒学杂志,1992,6(2):115

Detection of HAV Contamination in Shellfish from Lianyungang Sea Water by Antibody Capture-PCR

Zhao Wenbing Lin Hongyu Li Jiafu Wang Lixing Gong Haipin

(Lianyungang City Sanitary and Anti-epidemic Station, Lianyungang 222003)

Fang Zhaoyin Wang Qihong

(Institute of Virology, CAPM, Beijing 100052)

Abstract A method of antibody capture-polymerase chain reaction (AC-PCR) is developed for the detection of human hepatitis A virus (HAV) in shellfish (*Scapharca subcrenata*, *Buditapes philippinarum*, *Macoma incongrua*, *Sinonovacula constricta*, *Chlamys farrer*). Initial virus extraction is based on a modified elution-precipitation technique. Eleven out of 31 shellfish samples from Lianyungang (in Jiangsu Province) sea water are HAV positive. This experiment proves that the consumption of shellfish growing in contamination waters is associated with the risk of transmission of HAV.

Key words Shellfish, HAV, PCR