

实验技术与方法

蔬菜及水果中 NLVs 和 HAV 检测的研究

饶红 陈广全 冯 骞 付溥博 汪琦
(北京出入境检验检疫局,北京 100026)

摘 要:目的 建立蔬菜水果中诺沃克样病毒(NLVs)和甲肝病毒(HAV)的 RT-PCR 检测方法。方法 使用具有较强缓冲力的甘氨酸缓冲液将病毒从试样表面洗脱下来,用 PEG6000 将病毒沉降后进行 RNA 提取和 RT-PCR 检测。结果 蔬菜中 NLVs 和 HAV 检测的灵敏度可达 1.0×10^3 RT-PCR₅₀/30 g 试样和 30 TCID₅₀/30 g 试样。而草莓样品的 NLVs 和 HAV 最低检出限为 1.7×10^3 RT-PCR₅₀/100 g 试样和 48 TCID₅₀/100 g 试样。结论 该方法灵敏、可靠。
关键词:聚合酶链反应;诺沃克病毒;嗜肝病毒属;蔬菜;水果

Detection of NLVs and HAV in Vegetables and Fruits by RT-PCR
RAO Hong, CHEN Guang-quan, FENG Qian, FU Pu-bo, WANG Qi
(Beijing Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Beijing 100026, China)

Abstract: **Objective** To detect the NLVs and HAV in vegetables and fruits by RT-PCR. **Methods** Viruses were eluted from the surface of samples by the glycine buffer with strong buffering strength. Then, viruses were precipitated by PEG6000 and their RNA were extracted and detected by RT-PCR. **Results** The detection limits of the method for NLVs and HAV from vegetables were 1.0×10^3 RT-PCR₅₀/30 g and 30 TCID₅₀/30 g, respectively. The detection limits of the method for NLVs and HAV from strawberries were 1.7×10^3 RT-PCR₅₀/100 g and 48 TCID₅₀/100 g, respectively. **Conclusion** The method is sensitive and reliable.
Key word: Polymerase Chain Reaction; Norwalk Virus; Hepatitis A virus; Vegetable; Fruit

世界范围内,每年都会发生因诺沃克样病毒(Norwalk-like virus, NLVs)和甲肝病毒(Hepatitis A virus, HAV)引起的急性胃肠炎和甲肝的爆发流行。其中,食源性感染占很大比例。除贝类外,蔬菜和水果,包括生菜、芹菜、洋葱、土豆沙拉、油菜、草莓、水果沙拉均可能受到 NLVs 和 HAV 污染。加拿大、美国、澳大利亚、芬兰、瑞典都曾发生过因食用草莓或木莓而引起的 NLVs 和 HAV 爆发流行^[1,2]。蔬菜、水果等农产品可能在灌溉过程中被污水和粪便污染。而其他食物可能在加工过程中经感染了 NLVs 和 HAV 的食品加工者的手被污染而造成人类感染。美国等一些国家曾报道过因食用蔬菜沙拉、冷荤等食物而发生感染的事件^[2]。

方兆寅^[3]等人对国内粪便标本的检测结果表明,在我国确实存在经粪口途径传播 NLVs 的可能性。另外,我国也曾多次发生 HAV 中小规模的爆发流行,但多数事件没有得到相关食物的实验室检测证据。这些患者的粪便排泄物很可能造成环境的

HAV 污染。因此,在我国同样存在因食用被污染的蔬菜水果而发生 NLVs 和 HAV 感染的可能性。为在国内外贸易中保护消费者的身体健康,建立 NLVs 和 HAV 的检测方法十分必要,在国家质检总局的资助下,我们开展了蔬菜及水果中 NLVs 和 HAV 的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒株 NLVs 参考毒株由中国疾病与预防控制中心病毒病所提供,为腹泻病患者的粪便上清液,毒株型号为 NLVsCHN4300。

HAV 疫苗购自中国药品生物制品检定所,滴度为 $10^{6.5}$ TCID₅₀/ml。由于 NLVs 不能体外培养,目前,国内外均使用腹泻病患者的粪便上清液作为研究材料。HAV 与 NLVs 同为单链 RNA 病毒,传播和感染特征相似,因此,本研究中采用与国外研究者相同的做法,用 HAV 疫苗进行所有预实验。

1.1.2 引物 考虑到 NLVs 的基因多样性,采用谢华萍报道的组合引物^[3]。此引物为中国 CDC 病毒病所与美国 CDC 合作,在我国进行 NLVs 流行情况

基金项目:国家质检总局科研项目(20021K087)
作者简介:饶红 女 副主任技师

调查检测粪便样品时使用的引物。NLVs 的 PCR 产物大小为 319 bp。

NLVs 检测引物:

引物	位置	极性	序列(5'-3')
289 H	4865 - 4886	-	TGACGATTTCATCATCACCATC
289 I	4865 - 4886	-	TGACGATTTCATCATCCCCGTA
290 H	4865 - 4886	+	GATTACTCCAGGTGGGACTCCAC
290 I	4865 - 4886	+	GATTACTCCAGGTGGGACTCAAC
290 J	4865 - 4886	+	GATTACTCCAGGTGGGATTCAAC
290 K	4865 - 4886	+	GATTACTCCAGGTGGGATTCCAC

HAV 基因组保守性较高,检测时可供选择的引物较多。本研究使用的引物位于 HAV 基因组中编码 VP1 - VP3 壳蛋白的区域^[4],目的片段长度为 192 bp。

HAV 检测引物:

5 引物, 5'-CAGCACATCAGAAAGGTGAG-3'

3 引物, 5'-CTCCAGAATCATCTCCAAC-3'

1.1.3 蔬菜和水果样品 冷冻草莓为澳大利亚和美国进口产品。其他蔬菜和水果样品(生菜、小白菜、油菜、芹菜、小萝卜、鲜草莓、进口速冻草莓、速冻苹果粒、女真果、葡萄干)购自北京农贸市场或超市。用于人工污染的蔬菜和水果样品均经实验证实为 NLVs 和 HAV 阴性。

1.1.4 试剂 不同浓度、不同 pH 的甘氨酸缓冲液(甘氨酸 100 mmol/L、Tris - HCl 50 mmol/L、牛肉浸出液 3%、pH 9.5 或 甘氨酸 50 mmol/L、氯化钠 140 mmol/L、pH 9.0)、果胶酶(加拿大 BBI 公司生化级)、PEG6000(加拿大 BBI 公司分析纯)、High Pure Viral RNA Kit (Roche 1858882)、Superscript™ one-step RT-PCR with platinum Taq (Introgen Cat. No. 10928 - 034)。

1.1.5 仪器 PCR 仪(PE2400 美国 PE 公司)、凝胶成像系统(VILBER LOURMAT 法国 VILBER 公司)。

1.2 方法

1.2.1 人工污染试样的制备 称取 30 g 蔬菜样品或 100 g 水果样品,将病毒悬液均匀点种于蔬菜或水果表面,室温放置 20 min,使其吸附并干燥。同时,用未污染病毒的试样作为阴性对照。

1.2.2 从人工污染的蔬菜水果中富集病毒 试样中加入 200 ml 4 °C 的甘氨酸缓冲液(甘氨酸 100 mmol/L;Tris - HCl 50 mmol/L;牛肉浸出液 3%;pH 9.5),若为草莓试样还需加入 180 U 果胶酶和氯化镁(终浓度为 50 mmol/L),于室温振荡 20 min;4 °C 离心 15 min (10 000 ×g);弃沉淀,保留上清;用 5 mol/L 的氯化氢将上清液的 pH 调整到 7.2 ± 0.2;加

入 PEG6000 和氯化钠(终浓度为 PEG 10%,氯化钠 0.3 mol/L),4 °C 过夜;4 °C 离心 2 h (10 000 ×g);加入 5 ml 磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L; pH 7.5)使沉淀重新悬浮,加入等体积氯仿 + 丁醇(1 + 1),涡流混合 1 min,室温放置 5 min,4 °C 离心 2 h (10 000 ×g);小心吸取上清(约 5 ml)用于 RNA 提取。

1.2.3 RNA 提取方法 使用试剂盒,按照厂家说明书进行操作。

1.2.4 RT - PCR 反应 使用 Superscript™ one-step RT-PCR with platinum Taq 试剂盒,RT 与 PCR 在一个反应体系中一次完成,反应体系包含:2 倍浓度反应混合物 25 μl,5 引物(10 μmol/L)1 μl,3 引物(10 μmol/L)1 μl,酶混合物 1 μl,模板 20 μl,水 2 μl。

RT 反应条件 50 °C,30 min。94 °C,2 min。NLVs 的 PCR 反应条件为:变性(94 °C,3 min),40 个循环(94 °C,1 min,49 °C,80 s,72 °C,1 min),延伸(72 °C,10 min)。HAV 的 PCR 反应条件为:变性(95 °C,5 min),40 个循环(95 °C,90 s,55 °C,90 s,72 °C,90 s),延伸(72 °C,10 min)。

1.2.5 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物 配制 1.6% 的琼脂糖凝胶,取 10 μl RT - PCR 产物电泳。用 SYBR GREEN I 染色 20 min,凝胶成像系统观察结果。

1.2.6 蔬菜水果样品中 NLVs 及 HAV 检测流程 用甘氨酸缓冲液(甘氨酸 100 mmol/L、Tris - HCl 50 mmol/L、牛肉浸出液 3%;pH 9.5)从蔬菜水果中富集病毒,用 High Pure Viral RNA Kit 试剂盒提取 RNA;用 Superscript™ one-step RT-PCR with platinum Taq 试剂盒进行 RT - PCR;琼脂糖凝胶电泳观察结果。

2 结果

2.1 最佳洗涤缓冲液的选择 对 A (PBS 0.1 mmol/L, pH 9.0)、B (甘氨酸缓冲液 甘氨酸 50 mmol/L;氯化钠 0.14 mol/L;pH 9.0)、C (甘氨酸缓冲液 甘氨酸 100 mmol/L;Tris - HCl 50 mmol/L;牛肉浸出液 3%;pH 9.5)3 种缓冲液洗涤试样后的缓冲能力比较实验表明,缓冲液 C 洗涤试样后,无论蔬菜或水果试样,其 pH 值始终稳定在 8.8 以上(表 1)。根据缓冲能力选择缓冲液 C 用于蔬菜和水果的检测。

2.2 抑制剂去除剂对检测灵敏度的影响 抑制剂去除剂提取步骤,即使用氯仿 + 丁醇提取后,生菜和草莓的检测灵敏度较高。当添加量为 300 TC ID₅₀ 时,5 次生菜和草莓实验中有 4 次实验结果为阳性,阳性率达 80%(表 2)。

表 1 3 种不同的缓冲液洗脱试样表面病毒时
缓冲能力的比较

样品种类	pH 变化范围		
	A	B	C
生菜	9.0 →8.8	9.0 →8.8	9.5 →9.4
白菜	9.0 →8.9	9.0 →8.8	9.5 →9.4
鲜草莓	9.0 →7.2	9.0 →6.8	9.5 →9.3
速冻草莓	9.0 →3.2	9.0 →5.5	9.5 →8.8
速冻苹果粒	9.0 →4.5	9.0 →5.8	9.5 →9.0

注:A: PBS (0.1 mmol/L, pH 9.0)。B: 甘氨酸缓冲液 (甘氨酸 50 mmol/L, 氯化钠 0.14 mol/L, pH 9.0)。C: 甘氨酸缓冲液 (甘氨酸 100 mmol/L, Tris - HCl 50 mmol/L, 牛肉浸出液 3 %, pH 9.5)。

表 2 生菜及草莓试样使用和不使用氯仿 + 丁醇
提取时 HAV 检测灵敏度的比较

试样 病毒添加量 (TCID ₅₀)	生菜			草莓		
	3 000	300	30	3 000	300	30
A	5/5	4/5	0/5	5/5	4/5	0/5
B	4/5	1/5	0/5	3/5	0/5	0/5

注:A:使用氯仿 + 丁醇(1 + 1)提取,B:不使用氯仿 + 丁醇(1 + 1)提取。

2.3 增加取样量,提高检测灵敏度 无论是生菜试样还是草莓试样,取样量为 1 ml 提取 RNA 时,检测的灵敏度最高(表 3,4)。

表 3 不同取样量生菜 HAV 检测结果

取样量	300 TCID ₅₀	60 TCID ₅₀	30 TCID ₅₀
100 μl	+	-	-
500 μl	+	+	-
1.0 ml	+	+	+
1.5 ml	+	-	-

注: + :阳性结果, - :阴性结果。

表 4 不同取样量速冻草莓 HAV 检测结果

取样量	300 TCID ₅₀	60 TCID ₅₀	30 TCID ₅₀
100 μl	+	-	-
500 μl	+	-	-
1.0 ml	+	+	-
1.5 ml	+	-	-

注: + :阳性结果, - :阴性结果。

2.4 基于以上实验结果,最终确定了蔬菜水果中 NLVs 和 HAV 检测方法。检测详细流程见 1.2.6。此法检测生菜中 NLVs 的最低检出限为 1.0 ×10³ RT - PCR_{U50}/30 g 试样,速冻草莓试样 NLVs 最低检出限为 1.7 ×10³ RT - PCR_{U50}/100 g 试样。蔬菜中 HAV 的最低检出限为 30 TCID₅₀/30 g 试样,草莓 HAV 的最低检出限为 48 TCID₅₀/100 g 试样。

3 讨论

3.1 最佳洗涤缓冲液的选择 Hernandez F.^[5] 和 Bidawid S.^[6]曾报道使用缓冲液 B 和缓冲液 A 洗涤蔬菜和水果表面的病毒。Eric Dubois 则使用缓冲液 C 洗涤试样^[7]。在实验中我们发现前 2 种缓冲液的缓冲能力小于 Eric Dubois 所使用的缓冲液。当试样

是草莓和去皮水果粒,特别是速冻草莓时,用缓冲液洗涤这些试样,试样中大量的果汁会溶出,整个试样的体积明显增加(约从 200 ml 增至 220 ml),果汁中的酸性物质会使得溶液的 pH 值下降(表 1),但 Eric Dubois 所使用的缓冲液 C 能够将 pH 维持在较稳定的水平,pH 值始终保持在 8.8 以上。缓冲液 A 和 B 的缓冲能力较差,pH 值最低可下降至 3.2 和 5.5。如果 pH 值降至 7.5 以下将影响病毒的回收率^[8]。洗涤缓冲液的缓冲能力大有利于检测,特别是针对水果类试样。因此,从缓冲能力上应选择缓冲液 C 用于蔬菜水果的检测。

3.2 抑制剂去除剂对检测灵敏度的影响 在进行贝类试样的检测时,经常使用氯仿或 Frezon 去除贝类试样中的蛋白质和类脂类抑制剂。进行蔬菜水果的检测时是否需要用有机溶剂除去 RT - PCR 反应的抑制剂呢?目前,有文献报道使用氯仿 + 丁醇(1 + 1)提取法除去抑制剂^[7]。但有的方法未使用任何抑制剂去除步骤^[4]。如果抑制剂的去除效果好,可以提高检测的灵敏度。但提取步骤越多,病毒的损失越多,反而会降低检测的灵敏度。我们比较了使用氯仿 + 丁醇(1 + 1)提取(A 法)和不进行任何处理,在聚乙二醇沉降后直接从沉淀重悬液中提取 RNA(B 法)两种实验方法的灵敏度。

将 3 000 TCID₅₀、300 TCID₅₀、30 TCID₅₀ 的 HAV 疫苗接种于生菜试样和速冻草莓试样,分别用 A 法和 B 法处理,其他实验方法完全相同,在连续 5 d 的时间里进行 5 次实验,测定不同方法处理后的灵敏度,实验结果表明:使用氯仿 + 丁醇提取时,生菜和草莓的检测灵敏度较高,当添加量为 300 TCID₅₀ 时,5 次生菜和草莓实验中有 4 次实验结果为阳性,阳性率达 80 %。但不使用任何抑制剂去除步骤时,在相同添加量时,5 次生菜实验中只有 1 次实验结果为阳性,5 次草莓实验结果全为阴性(表 2)。由此可见,增加氯仿 + 丁醇提取步骤后检测灵敏度提高。

3.3 增加取样量,提高检测灵敏度 在国外有关报道中,用于 RNA 提取的试样量只有 100 μl。因为有报道认为取样量过大,试样中残留的抑制剂浓度过高,将降低 RT - PCR 反应的灵敏度^[7]。但我们发现,增大用于 RNA 提取的试样量,检测的灵敏度不但没有降低,反而提高了。在检测中,我们分别取 100 μl,500 μl,1.0 ml 和 1.5 ml 的试样富集液,加入 200、400、800 和 1 200 μl 的 Roche Kit 的裂解液,然后将其分别加入一只提取柱中提取 RNA,按照相同的方法进行 RT - PCR 检测。选择 300 TCID₅₀,60 TCID₅₀ 和 30 TCID₅₀ 的 HAV 添加于生菜和速冻草莓中进行实验。实验结果表明,无论是生菜试样还是

草莓试样,当取样量为 1 ml 时,检测的灵敏度最好(表 3,4)。实际检测结果显示,100 μ l 并不是检测的最佳取样量,增加取样量至 1 ml,并不会发生因抑制作用而降低检测灵敏度的现象。因此,在进行样品的检测时,我们取 1 ml 富集液进行 RNA 提取。

参考文献

- [1] US CDC. Hepatitis A associated with consumption of frozen strawberries-michigan, mrrch [J]. J Am Med Assoc, 1997, 277: 1271.
- [2] MARION K, ERWIN D. Foodborne viruses[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 90:23-41.
- [3] 谢华萍,方肇寅,王光,等.长春市儿童医院 1998-2001 年婴幼儿杯状病毒腹泻流行病学研究[J]. 病毒学报,2002,18(4):332-336.
- [4] PAIRS R LEGGITT, LEE-ANN JAYKUS. Detection methods for

- human enteric viruses in representative food [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 63:1738-1744.
- [5] HERNANDEZ F, MONGE R, JIMENEZ C, et al. Rotavirus and Hepatitis A virus in market lettuce (*Lactuca sativa*) in Costa Rica [J]. Int J Food Microbiol, 1997, 37:221-223.
 - [6] BIDAWID S, FARBER J M, SATTAR S A. Rapid concentration and detection of Hepatitis A virus from lettuce and strawberries[J]. J Virol Methods, 2000, 88:175-185.
 - [7] ERIC DUBOIS, CECILIA AGIER, CATHERINE CRUCIERE, et al. Modified concentration method for the detection of enteric viruses on fruits and vegetables by reverse transcriptase-polymerase chain reaction or cell culture[J]. J Food Protection, 2002, 65:1962-1969.
 - [8] BISWENDU B COSWAML, THOMAS A CEBMLA. A polymerase chain reaction-based method for the detection of Hepatitis A virus in produce and shellfish[J]. J Food Protection, 2002, 65:393-402.

[收稿日期:2006-10-20]

中图分类号:R15;Q939.4 文献标识码:B 文章编号:1004-8456(2007)02-0131-04

[上接本期导读]

2006 年 9 月 29 号签署了亚洲甜点保护法,允许包括中国月饼在内的亚洲甜点厂家保持现有的生产方式。对于我国来说,目前食品安全管理的重要工作之一是在公共卫生和经济发展之间找平衡点,在公共卫生和不同经济发展水平之间找平衡点。

某些生产厂家为既能蒙混国家的管理、满足消费者心理需要,又降低成本,形成了一些自己行业的潜规则,其中重要的方法是针对国家的要求作假。如你检查什么指标我就在什么指标上做手脚。无抗牛奶是国家的要求,消费者健康的需要,为占领消费市场,众多厂家都打“无抗菌素”牌。但要达到“无抗”成本就会提高。为此分解抗菌素的产品便应运而生。其实如果既能分解抗生素,又能不浪费牛奶资源,还能保证消费者健康,是一件利国利民的好事。关键是要按我国食品添加剂的管理办法对该物质进行管理,做到保证人民健康。““生鲜牛乳抗生素分解剂”的鉴定与检测”一文提示有关部门一方面应追究有关厂家违反食品添加剂卫生管理办法的行为,一方面应加快对该类物质的安全性研究,决定是否使用该类物质,或寻找有这种作用的安全的替代品。化学品和生物制品在食品中的使用使食品生产存在越来越多这样的问题,历史的经验告诉我们,出于降低成本的需要,非法食品添加剂的使用很有市场,堵不易管好,提供安全可靠的替代品才是出路。

我们经常说一些食品法律法规滞后,滞后到什么程度、对经济的不适应和对人民身体的影响究竟怎样却说得很少。“《肉品卫生检验试行规程》存在的问题及其修订建议”一文结合我国目前的政治体制和经济体制形势,对《肉品卫生检验试行规程》从经济体制、品种覆盖到检验技术等方面的滞后进行了全面分析,从理论上和实践上指出了修改《肉品卫生检验试行规程》的迫切性。对我国的肉品食用安全管理非常有意义。希望这篇文章能成为一个榜样,大家都来分析一下目前哪些食品方面的法律法规与现实不适应,怎么不适应,应怎样修正,这样的稿件一经通过优先利用。

戴瑞彤的“食品安全新概念”一文向我们介绍了新的食品安全管理理念。在食品的安全管理中,有许多新的方法、新的理念,有的是比原来的方法和理念有较大的发展,如针对某食品生产单位食品生产的 HACCP,有的是在食品生产、加工、流通整个领域进行管理,如“食品安全目标管理”(Food Safety Objective, FSO)。实行 HACCP 需要政府的帮助和引导及厂家的认可和自身需求,而进行“食品安全目标管理”则需要跨部门的协调。按理说在我国这样一个有统一制度、统一领导的社会主义国家,跨部门协调是有优势的,但由于一些部门或地区的本位主义,实行起来可能比较困难。然而只要管理者认识到问题的重要性,确实从代表人民的根本利益出发,解决这个问题是有前途的,我国有这方面的实践和经验。