

# 渤海湾天津沿岸海水中甲肝病毒的检测和定量

张明露<sup>1</sup> 杨健<sup>1</sup> 赵宏<sup>2</sup> 朱琳<sup>3</sup> 赵化冰<sup>4\*</sup> 蔡宝立<sup>1\*</sup>

(1. 南开大学微生物学系,生物活性材料教育部重点实验室,天津 300071; 2. 天津出入境检验检疫局,天津 300042; 3. 南开大学环境科学与工程学院,天津 300071; 4. 中国人民武装警察部队医学院,天津市职业与环境危害生物标志物重点实验室,天津 300162)

**摘要** 甲肝病毒(hepatitis A virus, HAV)是能引起传染性甲型肝炎的单链 RNA 病毒.用常规 RT-PCR(反转录 PCR)和 SYBR Green 实时定量 RT-PCR 方法,根据甲肝病毒保守的 VP1-VP2 基因序列设计引物,对渤海湾天津沿岸海水中的甲肝病毒进行了检测和定量分析.9 个样品取自渤海湾天津塘沽以南沿岸海水,取样时间分别是 2007 年夏、秋、冬季和 2008 年春季.海水样品先用小型超滤装置(Millipore Pellicon Mini TFF)或超滤离心管(Millipore Centricon Plus-70)浓缩,然后进行 RT-PCR 检测.结果表明,从 9 个海水样品中都能扩增出 192 bp 的 HAV cDNA.这些 cDNA 的核苷酸序列与 GeneBank 中的同源序列相似性为 95%~100%.用 SYBR Green 实时定量 RT-PCR 检测了春季和冬季的 6 个海水样品,结果表明,海水中甲肝病毒的浓度范围为  $5.35 \times 10^6 \sim 4.51 \times 10^7$  virus particles/L.

**关键词** 海水;甲肝病毒;RT-PCR;实时定量 RT-PCR

中图分类号:X55;X834 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2009)06-

## Detection and Quantification of Hepatitis A Virus in Tianjin Coastal Seawater of Bohai Bay

ZHANG Ming-lu<sup>1</sup>, YANG Jian<sup>1</sup>, ZHAO Hong<sup>2</sup>, ZHU Lin<sup>3</sup>, ZHAO Hua-bing<sup>4</sup>, CAI Bao-li<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Bioactive Materials, Ministry of Education, Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071, China; 2. Tianjin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tianjin 300042, China; 3. College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China; 4. Tianjin Key Laboratory for Biomarkers of Occupational and Environmental Hazard, Medical College of Chinese People's Armed Police, Tianjin 300162, China)

**Abstract** Hepatitis A virus (HAV) is single-stranded RNA virus that causes infectious hepatitis A. Detection and quantification of hepatitis A virus in Tianjin coastal seawater of Bohai Bay were carried out by conventional RT-PCR and SYBR Green real-time quantitative RT-PCR using the primers based on the conserved sequence at the VP1-VP2 genes of HAV. The nine samples were taken at Tianjin coastal seawater of Bohai Bay locating in the south of Tanggu, in summer, autumn and winter of 2007 and spring of 2008. For viral detection, seawater samples were concentrated either using a small ultrafiltration system (Millipore Pellicon Mini TFF) or a Centriprep-100 centrifugal ultrafiltration device (Millipore Centricon Plus-70). RT-PCR analysis showed that a 192 bp HAV cDNA was amplified from all nine seawater samples and the sequence identities of these cDNAs to the homologous sequence in the GenBank were between 95% and 100%. SYBR Green real-time quantitative RT-PCR analysis indicated that HAV concentration in these samples ranged from  $5.35 \times 10^6 \sim 4.51 \times 10^7$  virus particles/L.

**Key words** seawater; hepatitis A virus; RT-PCR; real-time quantitative RT-PCR

病毒是海洋中含量最丰富的一类生物,在海洋生态平衡和生物地球化学循环中起重要作用,其密度可达  $10^7 \sim 10^9$  virus particles/mL.此外,海洋病毒对海水养殖业和人类健康也有重要影响<sup>[1-4]</sup>.甲肝病毒(hepatitis A virus, HAV)属于小核糖核酸病毒科甲肝病毒属,是一种无包膜的单股正链 RNA 病毒,是全球急性传染性肝炎的主要病因,能引起甲型肝炎的暴发流行.它主要通过粪-口途径传播,能随生活污水不断进入近岸海洋环境,并且能在海水中存活数周之久<sup>[5]</sup>.渤海湾沿岸分布着许多海水浴场和养殖区,进行海水中甲肝病毒的监测,了解受陆源生活污水污染的程度,不仅有助于近海岸水产养殖业

的可持续发展,而且对于评估海滨浴场水质,防止病原微生物的扩散,确保人的健康和海洋环境的安全具有重要意义.

海水中甲肝病毒的有效监测和控制需要快速准确的检测技术作为支持,通过传统的细胞培养法检测 HAV 不仅灵敏度差、操作复杂,而且病毒的培养周期长,不易获得高滴度病毒.由于 PCR 技术具有灵敏度高和特异性强的优点,近年来已被广泛应用

收稿日期:2008-07-07;修订日期:2008-09-16

基金项目:国家高技术研究发展计划(863)项目(2006AA09Z170)

作者简介:张明露(1982~),女,博士研究生,主要研究方向为环境微生物, E-mail: zhangml1982@yahoo.com.cn

\* 通讯联系人, E-mail: huabingzhao@yahoo.com.cn; caibaoli@nankai.edu.cn

于病毒的检测和定量。

反转录 PCR (RT-PCR) 技术已被成功地用于检测海水、河水和海洋动物中的 RNA 病毒, 如甲肝病毒和引起急性肠胃炎的诺沃病毒 (norovirus) 等<sup>[6-13]</sup>。实时定量反转录 PCR (real-time quantitative RT-PCR) 技术则用于环境样品中 RNA 病毒的检测和定量<sup>[14-22]</sup>。目前, 国内仅有一些应用常规 RT-PCR 技术检测海水和贝类中甲肝病毒的报道<sup>[8-10]</sup>, 尚未见到用实时定量 RT-PCR 方法对海水中的甲肝病毒进行定量的报道。

本研究主要采用超滤离心管对渤海湾天津沿岸不同位点的海水样品进行直接浓缩的方法, 以及用 RT-PCR 技术对浓缩样品进行甲肝病毒检测和用实时定量 RT-PCR 技术对浓缩样品进行甲肝病毒的定量。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器和试剂

海水浓缩使用美国密理博公司的小型超滤系统 (Millipore Pellicon Mini TFF, 截留相对分子质量为  $100 \times 10^3$ ) 和超滤离心管 (Centricon Plus-70, 截留相对分子质量为  $100 \times 10^3$ )。荧光定量 PCR 仪为 Bio-Rad 产品, 凝胶成像分析系统为基因有限公司的 UVP Transilluminator Model M-26, RNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司, 荧光定量 PCR 试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒等购自大连宝生物公司。

反转录酶 MMLV 购自 promega 公司。甲肝病毒标样为冻干甲型肝炎减毒活疫苗, 浙江普康生物技术有限公司生产, 滴度为  $106.5 \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$ 。

### 1.2 海水样品采集

分别于 2007 年 6、9、12 月和 2008 年 4 月, 采集渤海湾天津塘沽以南海域的表层海水, 每个位点采集 10L, 装于新塑料桶中, 2 h 内送回实验室进行超滤浓缩。采样位点见图 1 (BT1、BT2、BT3 和 BT4), 采样时间见表 1。

### 1.3 海水浓缩和病毒 RNA 提取

方法一: 10 L 海水经  $0.45 \mu\text{m}$  滤膜过滤后, 用截留相对分子质量为 100 的小型超滤系统进行超滤, 得到约 10 mL 的海水浓缩液, 再用截留相对分子质量为 100 的超滤离心管  $6000 \text{ r}/\text{min}$  离心 10 min, 得到  $200 \sim 300 \mu\text{L}$  海水浓缩液。使用 Qiagen 公司的病毒 RNA 提取试剂盒, 提取病毒 RNA, 操作按照产品说明书进行。

方法二: 取 500 mL 海水, 直接用截留相对分子质量为 100 的超滤离心管  $6000 \text{ r}/\text{min}$  离心 10 min, 得

表 1 实时定量 RT-PCR 检测海水中甲肝病毒的浓度<sup>1)</sup>

Table 1 Level of HAV in seawater determined by real-time quantitative RT-PCR

取样位点	取样日期	RT-PCR 检测 HAV	HAV 浓度 /virus particles · L <sup>-1</sup>
BT1	2007-06	+	ND
BT1	2007-09	+	ND
BT2	2007-09	+	ND
BT2	2007-12	+	$4.51 \times 10^7$
BT3	2007-12	+	$5.35 \times 10^6$
BT4	2007-12	+	$1.51 \times 10^7$
BT2	2008-04	+	$7.65 \times 10^6$
BT3	2008-04	+	$2.60 \times 10^7$
BT4	2008-04	+	$5.84 \times 10^6$

1) + : HAV 阳性; ND: 未检测



图 1 采样位点示意

Fig. 1 Map of sampling locations

到约  $200 \mu\text{L}$  海水浓缩液, 参照文献<sup>[23]</sup>的方法提取病毒 RNA。取  $900 \mu\text{L}$  裂解液 (将  $120 \text{ g}$  异硫氰酸胍溶于  $100 \text{ mL}$   $0.1 \text{ mol}/\text{L}$   $\text{pH}$  6.4 的 Tris 中, 再加  $22 \text{ mL}$   $0.2 \text{ mol}/\text{L}$   $\text{pH}$  8.0 的 EDTA 和  $2.6 \text{ g}$  Triton X-100, 混匀) 和  $40 \mu\text{L}$   $\text{SiO}_2$ , 剧烈混匀, 加入  $50 \mu\text{L}$  海水浓缩液, 混匀后室温静置 10 min, 离心去上清, 将沉淀用洗脱液 (将  $120 \text{ g}$  异硫氰酸胍溶于  $100 \text{ mL}$   $0.1 \text{ mol}/\text{L}$   $\text{pH}$  6.4 的 Tris 中, 混匀) 洗 2 次, 再用 70% 乙醇洗 2 次, 最后用丙酮洗 1 次,  $56^\circ\text{C}$  干燥 10 min, 用  $30 \mu\text{L}$  TE 缓冲液溶解,  $56^\circ\text{C}$  处理 10 min, 离心收集含有病毒 RNA 的上清液。

2007 年 6 月和 9 月的海水样品采用方法一进行病毒浓缩, 2007 年 12 月和 2008 年 4 月的海水样品采用方法二进行病毒浓缩。

### 1.4 RT-PCR 检测海水中的 HAV

PCR 引物位于 HAV 基因组中编码 VP1-VP2 衣壳蛋白的区域, 目的片段长度为  $192 \text{ bp}$ <sup>[6]</sup>。引物序列如下: Hav-1:  $5' \text{-CAGCACATCAGAAAGGTGAG-3}'$ ;

Hav-2 : 5'-CTCCAGAATCATCTCCAAC-3'.

反转录反应为 50  $\mu$ L 体系 : 3.5  $\mu$ g RNA , 0.5  $\mu$ g Random Primer , 70 $^{\circ}$ C 保持 5 min , 立即冰浴 30 s , 再加入 5  $\times$  MMLV buffer 10  $\mu$ L , dNTPs ( 各 2.5 mmol/L ) 10  $\mu$ L , RNA Inhibitor 25 U , MMLV RT 200 U , 用灭菌蒸馏水补足 50  $\mu$ L , 于 37 $^{\circ}$ C 反应 60 min , 合成 HAV cDNA .

RT-PCR 反应为 25  $\mu$ L 体系 : 10  $\times$  Ex Taq buffer 2.5  $\mu$ L , dNTPs ( 各 2.5 mmol/L ) 2.5  $\mu$ L , Ex Taq HS 0.625 U , 上下游引物各 0.2  $\mu$ mol/L , cDNA 1  $\mu$ L , 用灭菌蒸馏水补足 25  $\mu$ L . PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 30 s , 55 $^{\circ}$ C 60 s , 72 $^{\circ}$ C 30 s , 45 个循环 , 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min . 每次均设阳性对照( 甲肝病毒 ) 和阴性对照( 灭菌蒸馏水 ) . 取 5  $\mu$ L PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶中电泳 , 在凝胶成像系统中观察结果并照相 .

### 1.5 HAV cDNA 的克隆和测序

切下琼脂糖凝胶中的目的条带 , 用凝胶回收试剂盒回收 192 bp 的 cDNA 片段 , 与 pMD18-T 载体连接 , 用连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞 , 挑选白色菌落进行 LB 液体培养基培养 , 用质粒提取试剂盒提取质粒 , 用 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切鉴定 . 随机挑选 2 个阳性克隆进行测序 , 将所得序列与 GenBank 中的同源序列进行 BLAST 比对 .

### 1.6 SYBR Green 实时定量 RT-PCR 测定 HAV 的标准曲线

将含有目的 cDNA 片段的质粒进行 5 个梯度的 10 $\times$  稀释 , 浓度从 140 pg/ $\mu$ L 到 0.014 pg/ $\mu$ L . 实时定量 RT-PCR 反应为 25  $\mu$ L 体系 : 含 SYBR Green I 的 Primix 12.5  $\mu$ L , 上下游引物各 0.2  $\mu$ mol/L , cDNA 1  $\mu$ L , 用灭菌蒸馏水补足 25  $\mu$ L . 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 s , 然后 94 $^{\circ}$ C 5 s , 55 $^{\circ}$ C 1 min , 72 $^{\circ}$ C 15 s , 45 个循环 , 79 $^{\circ}$ C 收集荧光信号 , DNA 溶解曲线分析的温度区间为 55 ~ 95 $^{\circ}$ C , 温度增长速度为 0.2  $^{\circ}$ C/s . 以起始模板的对数为  $x$  轴 , 以临界循环数( threshold cycle , Ct ) 为  $y$  轴建立定量 PCR 标准曲线 , 每个梯度重复 3 次 .

### 1.7 SYBR Green 实时定量 RT-PCR 检测海水中的 HAV<sup>[15]</sup>

实时定量 RT-PCR 反应的条件同 1.6 , 每个样品重复 3 次 , 所得到的病毒浓度的数值除以病毒的回收率 ( 见 1.8 ) , 得到海水中甲肝病毒的实际浓度 .

### 1.8 HAV 回收率测定

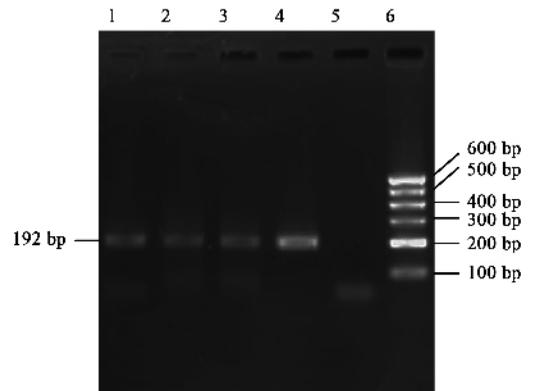
将一定浓度的甲肝病毒加入到 10 mL 海水中 , 取 5 mL 按照 1.3 的方法二进行超滤浓缩 , 然后提取 RNA ( A ) , 另外 5 mL 不经超滤浓缩 , 直接提取 RNA

( B ) 将 10 mL 没有额外加入甲肝病毒的海水进行超滤浓缩 , 然后提取 RNA ( C ) . 将上述 3 份 RNA 样品按照 1.4 的方法进行反转录反应 , 然后进行实时定量 RT-PCR 检测 , 反应条件同 1.6 , 每个样品重复 3 次 . 根据标准曲线计算 3 个样品中甲肝病毒的拷贝数 ( 分别记为  $a$ 、 $b$ 、 $c$  ) , 由公式  $( a - c ) ( b - c ) \times 100\%$  计算海水样品甲肝病毒的回收率 .

## 2 结果与讨论

### 2.1 海水中 HAV 的 RT-PCR 检测和 HAV cDNA 测序

对 9 个海水样品所进行的甲肝病毒 RT-PCR 检测的阳性率为 100% , 每个样品都能扩增出 192 bp 的甲肝病毒 cDNA , 结果见表 1 . 图 2 是 2008 年 4 月采集的 3 个海水样品( BT2、BT3 和 BT4 ) 的 RT-PCR 检测结果 . 上述海水样品中甲肝病毒的检出率明显高于 Gersberg 等<sup>[18]</sup>用同样方法对美国加利福尼亚州圣迭戈沿岸海水所进行的检测( 检出率为 79% ) , 而与樊景凤等<sup>[10]</sup>对辽东湾海水的检测结果一致( 检出率为 100% ) , 这表明渤海海水的甲肝病毒污染非常普遍 .



1. BT4 ; 2. BT3 ; 3. BT2 ; 4. 阳性对照 ; 5. 阴性对照 ; 6. DNA Marker

图 2 天津沿海水体中甲肝病毒的 RT-PCR 检测

Fig.2 Detection of hepatitis A virus in Tianjin coastal seawater by RT-PCR

对表 1 中的 9 个海水样品进行了 RT-PCR 扩增 , 得到的 192 bp cDNA 进行克隆 , 从每次克隆中随机选取 2 个菌落进行克隆片段的测序 , 18 条序列( TJ1 ~ TJ18 ) 的 GenBank 注册号分别为 EU780085 ~ EU780102 . 这 18 条序列与 GenBank 中已注册的同源序列( DQ646426 ) 的核苷酸序列相似性在 95% ~ 100% 之间 . 目的片段编码 63 个氨基酸 , 在 18 个片段中 , 11 个片段所编码的氨基酸序列与 GenBank 注册号为 DQ646426 的序列所编码的氨基酸完全相同 , 其余 7 个

片段所编码的氨基酸序列出现 1 个氨基酸突变(图 3)。这表明该区域的突变率是比较高的(39%)。

DQ646426	AHQKGFYATGKTVYCYNRITSPSNVASHVRVNVYTSATNFCFAPLYHAMDVTTQVGDSDG	63
TJ1	-----v-----	63
TJ2	-----k-----	63
TJ3	-----	63
TJ4	-----	63
TJ5	-----	63
TJ6	-----	63
TJ7	-----a-----	63
TJ8	-----s-----	63
TJ9	-----	63
TJ10	-----	63
TJ11	-----	63
TJ12	-----	63
TJ13	-----a-----	63
TJ14	-----	63
TJ15	-----	63
TJ16	-----v-----	63
TJ17	-----c-----	63
TJ18	-----	63

图 3 来自不同甲肝病毒的 VP1-VP2 片段的氨基酸序列比对

Fig.3 Multiple alignment of amino acid sequences from different HAV VP1-VP2 fragments

### 2.2 海水中 HAV 的回收率

用实时定量 RT-PCR 方法检测了海水中甲肝病毒的回收率。接种的病毒数量为  $2.56 \times 10^9$  virus particles/L。经过样品浓缩和 RNA 提取后(方法二)用实时定量 RT-PCR 测得的病毒浓度为  $1.46 \times 10^9$  virus particles/L。经计算得出海水中甲肝病毒的回收率为 57.03%。与 Gersberg 等<sup>[18]</sup>和 Rose 等<sup>[19]</sup>报道的海水中甲肝病毒的回收率分别为 11% 和 12% 相比,本研究的回收率高出许多,表明方法二是一种简单、快速和回收率高的海水病毒浓缩和病毒 RNA 提取方法。

### 2.3 SYBR Green 实时定量 RT-PCR 检测 HAV 的标准曲线

用 5 个梯度浓度的含有目的片段的质粒进行实时定量 RT-PCR 检测,以起始模板数的对数为 x 轴,以临界循环数为 y 轴建立实时定量 PCR 的标准曲线。扩增曲线和标准曲线如图 4 所示,线性回归方程为  $y = -3.885x + 49.985$ ,标准曲线斜率为  $-3.885$ ,  $R^2 = 0.9924$ ,说明 RT-PCR 扩增该标准品的线性关系良好,符合制备实时 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,熔解温度  $T_m$  为  $80.5^\circ\text{C}$ 。

### 2.4 SYBR Green 实时定量 RT-PCR 检测海水中的 HAV

用实时定量 RT-PCR 方法对渤海湾天津沿海岸

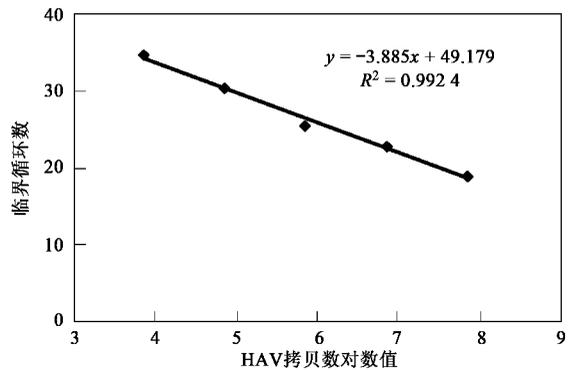
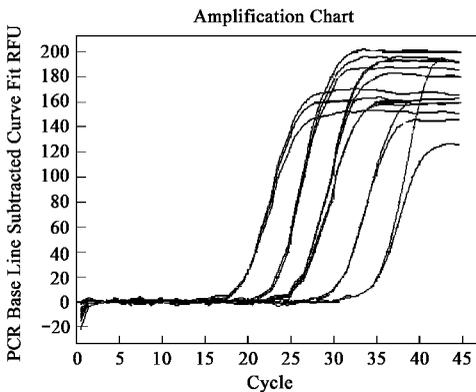


图 4 HAV 实时定量 RT-PCR 标准曲线

Fig.4 Standard curve of HAV real-time quantitative RT-PCR

水样品中的甲肝病毒进行了定量分析。在不同时间和地点采集的 6 个海水样品中,均检测到甲肝病毒,病毒浓度见表 1。从中可知,天津沿岸海水中的甲肝病毒浓度大约为  $5.35 \times 10^6 \sim 4.51 \times 10^7$  virus

particles/L。用 SYBR Green 实时定量 RT-PCR 技术定量海水中甲肝病毒的方法,具有简便、快速和实用性强的优点,整个检测过程可在 12 h 内完成。

本研究通过 SYBR Green 实时定量 RT-PCR 检测

的天津沿岸海水中甲肝病毒的浓度明显高于国外报道。Brooks 等<sup>[15]</sup>检测墨西哥某入海口处的甲肝病毒浓度为  $90 \sim 3\,523$  virus particles/L, Gersberg 等<sup>[18]</sup>检测美国和墨西哥边界的海水中甲肝病毒的浓度为  $105 \sim 30\,771$  virus particles/L, 而天津沿岸海水中甲肝病毒的浓度为  $5.35 \times 10^6 \sim 4.51 \times 10^7$  virus particles/L. 天津沿岸海水中甲肝病毒浓度过高的原因, 可能是大量没有达到排放标准的污水流入海中, 再加上渤海为内海, 与外海的海水交换速度较慢. 此外, 用实时定量 RT-PCR 检测的海水甲肝病毒浓度, 无法区分病毒是否具有感染性, 而用常规的细胞培养法检测和定量海水中的甲肝病毒是一件很困难的事情, 目前尚没有可以参考的数据, 所以笔者还不清楚感染性病毒和非感染性病毒之间的比例关系. 但是, Shieh 等<sup>[24]</sup>通过实时定量 RT-PCR 方法和常规的细胞培养方法测定了水中肠道病毒的浓度, 前者是后者的 91 倍, 这一数据可以作为估计海水中感染性和非感染性甲肝病毒比例的参考.

由于陆源生活污水的排放, 造成大量人类肠道病毒进入近岸海水中, 国内外已报道多起近岸贝类养殖区和海水浴场引发甲肝流行的事件. 目前我国海水卫生质量均采用粪大肠菌群作为指示菌, 研究发现, 粪大肠菌群在海水中的死亡速率比病毒快得多, 很多符合粪大肠菌群卫生标准的海水中仍可检测到大量的甲肝病毒<sup>[25]</sup>, 而且有研究表明, 粪大肠菌群的数量与人类病毒的数量并不具有明确的相关性, 仅检测粪大肠菌群并不能反应海水中病毒的情况, 因此, 对海洋中病毒的直接检测和定量具有重要意义<sup>[11]</sup>.

### 3 结论

(1) 用常规 RT-PCR 方法对 9 个取自渤海湾天津沿岸的海水样品进行了甲肝病毒检测, 阳性率为 100%.

(2) 用 SYBR Green 实时定量 RT-PCR 方法对渤海湾天津沿岸的 6 个海水样品中的甲肝病毒进行了检测和定量, 其浓度范围为  $5.35 \times 10^6 \sim 4.51 \times 10^7$  virus particles/L.

(3) 本研究建立的用超滤离心管直接浓缩海水病毒和抽提病毒 RNA, 用常规 RT-PCR 技术检测海水中甲肝病毒, 以及用 SYBR Green 实时定量 RT-PCR 技术定量海水中甲肝病毒的方法, 具有简便、快速和实用性强的优点, 整个检测过程可在 12 h 内完成.

### 参考文献:

- [1] Danovaro R, Dell'Anno A, Corinaldesi C, *et al.* Major viral impact on the functioning of benthic deep-sea ecosystems [J]. *Nature*, 2008, **454**(7208):1084-1088.
- [2] Suttle C A. Marine viruses-major players in the global ecosystem [J]. *Nature Rev Microbiol*, 2007, **5**(10):801-812.
- [3] Breitbart M, Rohwer F. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? [J]. *Trends Microbiol*, 2005, **13**(6):278-284.
- [4] 李娟, 黄唐学玺. 病毒: 海洋生态动力学和疾病学研究的创新点 [J]. *海洋湖沼通报*, 2005 (2):79-87.
- [5] 伯格 C 著, 方肇寅, 吴联熙, 等, 译. 环境中的病毒污染 [M]. 北京: 科学出版社, 1991.
- [6] Tsai Y L, Sobsey M D, Sangermano L R, *et al.* Simple method of concentrating enteroviruses and hepatitis A virus from sewage and ocean water for rapid detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(10):3488-3491.
- [7] Jothikumar N, Lowther J A, Henshilwood 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.
- [8] 樊景凤, 宋立超, 张喜昌, 等. 辽东湾沿岸水域甲肝病毒和粪大肠菌群分布 [J]. *海洋环境科学*, 2004, **23**(4):35-37.
- [9] 饶红, 陈广全, 曾静, 等. RT-PCR 法检测贝类中的甲肝病毒的研究 [J]. *食品与发酵工业*, 2006, **32**(9):122-125.
- [10] 樊景凤, 宋立超, 张喜昌, 等. 辽东湾沿岸海水及贝类中甲肝病毒分布的研究 [J]. *海洋科学*, 2007, **31**(2):51-54.
- [11] Jiang S C, Chu W. PCR detection of pathogenic viruses in southern California urban rivers [J]. *J Appl Microbiol*, 2004, **97**(1):17-28.
- [12] Boxman I L A, Tilburg J J H C, te Loeke N A J M, *et al.* Detection of noroviruses in shellfish in the Netherlands [J]. *Int J Food Microbiol*, 2006, **108**(3):391-396.
- [13] Villar L M, de Paula V S, Diniz-Mendes L, *et al.* Molecular detection of hepatitis A virus in urban sewage in Rio de Janeiro, Brazil [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2007, **45**(2):168-173.
- [14] 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.
- [15] Brooks H A, Gersberg R M, Dhar A K. Detection and quantification of hepatitis A virus in seawater via real-time RT-PCR [J]. *J Virol Methods*, 2005, **127**(2):109-118.
- [16] Choi S, Jiang S C. Real-time PCR quantification of human adenoviruses in urban rivers indicates genome prevalence but low infectivity [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(11):7426-7433.
- [17] Fong T T, Griffin D W, Lipp E K. Molecular assays for targeting human and bovine enteric viruses in coastal waters and their application for library-independent source tracking [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(4):2070-2078.
- [18] Gersberg R M, Rose M A, Robles-Sikisaka R, *et al.* Quantitative detection of hepatitis A virus and enteroviruses near the United States-

- Mexico border and correlation with levels of fecal indicator bacteria [ J ]. *Appl Environ Microbiol* , 2006 , **72** ( 12 ) : 7438-7444.
- [ 19 ] Rose M A , Dhar A K , Brooks H A , *et al.* Quantification of hepatitis A virus and enterovirus levels in the lagoon canals and Lido beach of Venice , Italy , using real-time RT-PCR [ J ]. *Water Res* , 2006 , **40** ( 12 ) : 2387-2396.
- [ 20 ] Gregory J B , Litaker R W , Noble R T. Rapid one-step quantitative reverse transcriptase PCR assay with competitive internal positive control for detection of enteroviruses in environmental samples [ J ]. *Appl Environ Microbiol* , 2006 , **72** ( 6 ) : 3960-3967.
- [ 21 ] Dubois E , Hennechart C , Merle G , *et al.* Detection and quantification by real-time RT-PCR of hepatitis A virus from inoculated tap waters , salad vegetables , and soft fruits : characterization of the method performances [ J ]. *Int J Food Microbiol* , 2007 , **117** ( 2 ) : 141-149.
- [ 22 ] Lowther J A , Henshilwood K , Lees D N. Determination of norovirus contamination in oysters from two commercial harvesting areas over an extended period , using semi-quantitative real-time reverse transcription PCR [ J ]. *J Food Protect* , 2008 , **71** ( 7 ) : 1427-1433.
- [ 23 ] 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** ( 3 ) : 495-503.
- [ 24 ] Shieh Y C , Wong C I , Krantz J A , *et al.* Detection of naturally occurring enteroviruses in waters using direct RT-PCR and integrated cell culture-RT-PCR [ J ]. *J Virol Methods* , 2008 , **149** ( 1 ) : 184-189.
- [ 25 ] Fattal B , Vasl R J , Katzenelson E , *et al.* Survival of bacteria indicator organisms and enteric viruses in the Mediterranean coastal waters off Tel-Aviv [ J ]. *Water Res* , 1983 , **17** ( 4 ) : 397-402.