

太平洋牡蛎中诺瓦克样病毒的 RT-PCR 法检测和病毒聚合酶区部分序列的分析

汪俊¹, 薛长湖¹, 李兆杰¹, 蔡跃飘¹, 何闪闪¹, 杨文鸽²

(1. 中国海洋大学 食品安全实验室, 山东 青岛 266003; 2. 宁波大学 食品与科学研究所, 浙江 宁波 315211)

摘要:利用 pH 9.5 的甘氨酸缓冲液处理太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 匀浆液, PEG 沉淀病毒粒子的方法对未知的是否污染有诺瓦克样病毒 (Norwalk-like Virus, NLVs) 的牡蛎样品进行处理, 并提取病毒 RNA, 进行 RT-PCR, 凝胶电泳检测扩增结果。初步建立了牡蛎中 NLVs 的检测方法。纯化所得的特异 PCR 产物, 克隆到 T-载体中, 筛选转化子, 提取质粒, 并进行 PCR 电泳鉴定。重组质粒序列测定结果在 NCBI 上进行 BLASTn 显示所得产物与已发表的诺瓦克样病毒的相应序列具有极高的同源性 (> 95%); 根据 GeneBee 在线分析系统 AliBee-Multiple Alignment 进行对中国的诺瓦克样病毒粪便分离株和牡蛎分离株的扩增序列进行相似性分析, 结果从我国养殖的牡蛎样品中和胃肠炎病人粪便中分离出 2 个的诺瓦克样病毒之间无显著的差异。

关键词:太平洋牡蛎; 诺瓦克样病毒; 反转录 PCR; 核酸序列

中图分类号: Q959.215 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2004)06-0525-06

诺瓦克样病毒 (Norwalk-like viruses, NLVs) 又称小圆状结构病毒 (Small Round-Structured Viruses, SRSVs), 是一组形态和生物学特征类似的无包膜的单链 RNA 病毒的统称。其形态微小, 圆形, 直径为 26~35 nm, 属于杯状病毒科^[1]。美国联邦疾病控制中心 (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) 对 1976~1980 年腹泻流行的调查报告表明约有 42% 的胃肠炎暴发与 NLVs 有血清学联系。NLVs 能耐受不良的外界环境、感染持续时间长, 且仅 10~100 个病毒粒子就能引起感染, 所以说它的危害性不可低估^[2]。我国 1995 年在患儿的粪便标本中发现了第一例 NLVs^[3]。Yu 等^[4]曾应用免疫酶技术从北京市医院门诊非细菌性腹泻病人的血清标本中检测到 NLVs, 这都说明在我国 NLVs 是存在的。美国和日本已报道了大量由于生吃贝类食物而暴发的 NLVs 感染引起的流行性胃肠炎。我国江浙沿海地区, 人民喜欢生食贝类等海产品。因而建立一种快速的检测方法, 一方面可以避免疾病的发生, 保护人们的健康; 另一方面, 也可以监控出口海产品的质量。

NLVs 的研究由来已久, 1972 年在美国的俄亥俄州首次发现该病毒并命名, 有关 NLVs 的研究就一直进行着。然而由于 NLVs 只是引起病毒性胃肠

炎其中的一种病毒, 而且引发的临床和流行病学特征与其他几种病毒相似。所以电镜法、免疫法、重组 EIA^[4]、酶联免疫法^[5]和 SPIEM^[6]等这些病毒特异性检测方法的使用也是有限的。此外 NLVs 尚无法在实验室进行培养, 所以也给其检测带来一定的难度。随着 PCR 技术的不断成熟, 应用 RT-PCR^[7-10]对 NLVs 进行检测的技术已越来越成熟。根据病毒 RNA 聚合酶区核苷酸和氨基酸序列的同源性比较, 把 NLVs 划分为 2 个基因组: 基因 1 组 (G1) 包括 Norwalk Virus、Southampton Virus & Shield Virus; 基因 2 组 (G2) 包括 Snow Mountain Virus、Hawaii Virus & Toronto Virus^[11]。虽然目前根据 NLVs 的聚合酶编码区基因序列已设计出了许多特异引物, 但由于聚合酶编码区核苷酸序列的多变性, 所以还没有一套引物能检测出所有的 NLVs 病毒株。此外由于环境中如水体中存在有 PCR 反应抑制剂主要是有机离子, 牡蛎中的某些成分也是 PCR 的反应抑制剂, 所以运用 RT-PCR 法检测牡蛎中的 NLVs 也存在一些问题。

到目前为止, 国内还没有关于检测养殖牡蛎中诺瓦克样病毒存在情况的相关报道。本实验应用甘氨酸处理牡蛎匀浆液、PEG 沉淀浓缩病毒粒子, 以

收稿日期: 2003-11-15; 修订日期: 2004-03-08.

基金项目: 宁波市博士科学基金.

作者简介: 汪俊 (1981-), 女, 硕士, 主要从事食品安全性检验. E-mail: wwjw117@sohu.com

通讯作者: 薛长湖. E-mail: xuech@mail.ouc.edu.cn

及巢式 PCR 法对 37 份牡蛎样品进行了检测,从而初步建立了一套检测牡蛎中 NLVs 的方法。对于其中的粪便阳性样品和牡蛎分离样品的 PCR 产物进行纯化、连接及转化,获取重组克隆并测序。测序片段与已发表的 NLVs 基因组 RNA 聚合酶编码区部分的基因序列具有很高的相似性,从而对我国诺瓦克样病毒进行了初步定位。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验阳性病毒样品为由北京预防研究所提供的 NLVs 感染的病人的粪样浓缩液。太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 样品分别来自养殖场,于 -20°C 冷冻保存。共有 37 个样品,分别采自 2002 年 11 月至 2003 年 11 月份的某牡蛎养殖场。

1.2 试剂与仪器

自备溶液:甘氨酸缓冲液 (Glycine Buffer 0.05 mol/L Glycine-0.15 mol/L NaCl pH 9.5) (GLY 购自上海生物工程公司)、16% PEG6000 (含 0.3 mol/L NaCl)、0.15 mol/L Na_2HPO_4 、DEPC 水 (DEPC 购自上海生物工程公司)、70% 乙醇、氯仿、异丙醇所用试剂均为国产 AR 级

其他试剂:TRIzol (BBI 分装)、5 u/μL Taq DNA 聚合酶、10 mmol/L dNTPs、40 u/μL Rnasin、200 u/μL M-MLV 反转录酶,琼脂糖均购自上海生物工程公司,100 bp DNA Ladder Marker (TaKaRa)、Promega pGEMR-T Easy Vector Systems、Promega Wizard PCR Preps DNA Purification System、Mastercycler personal PCR 仪 (Eppendorf)

1.3 实验方法

1.3.1 牡蛎的处理及病毒核酸的提取 基本方法参照 Lees 等的方法^[7],并有所改进。牡蛎样品融冻(裹有面包屑的牡蛎预先除去外面的面包屑)后,组织匀浆器快速匀浆,取约 25 g 的匀浆液放入灭菌三角瓶中,加入 7 倍体积的 GLY Buffer (pH 9.5),室温下充分振荡后分装于离心管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 3 000 g 离心 30 min。调上清液 pH 至 7.5,加入等体积的 16% PEG 6 000,4 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀 4 h 后,4 $^{\circ}\text{C}$ 3 000 g 离心 30 min。弃上清,沉淀用 0.15 mol/L 的 Na_2HPO_4 重悬,室温下 100 r/min 振荡 20 min 后,4 $^{\circ}\text{C}$ 10 000 g 离心 30 min。移上清液于新的离心管中,并调其 pH 至 7.4。最后 -20°C 保存待用。

分别取 300 μL 上述所得的牡蛎样品处理浓缩

液和 250 μL 粪样浓缩液,用 TRIzol 进行核酸的分离和纯化。所得沉淀干燥后用 DEPC H_2O 溶解,所得 RNA 保存于 -20°C 。

1.3.2 核酸扩增 引物 N1、N2、N3 参考自 Kawamoto Hiro Yoshi^[8]:

N1(+) 5'GCT GAT TAC TCT (C/G)G(C/G) TGG GA 3'

N2(-) 5'ACA CAG AGT GAG (C/G)A(A/G) CCA GTG 3'

N3(-) 5'GT(A/G) (C/G)TC ACA AT(C/T) TCA TCA TC 3'

PCR 反应管中加入 10 μL 提取的 RNA 溶液,再加入引物 N2、N3 各 1 μL,70 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,冰上冷却后加入 8 μL 反应混合液(含 5 × Reaction buffer 5 μL,10 mmol/L dNTPs 2 μL,40 u/μL RNasin 20 μL),37 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,再加入 200 u/μL M-MLVRT 0.5 μL,42 $^{\circ}\text{C}$ 60 min,70 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,所得 cDNA 保存于 -20°C 。

取 5 μL 合成的 cDNA 进行 DNA 扩增。扩增引物分别为 N1、N2、N3。其中 N1、N3 扩增片段的长度为 326 bp,N1、N2 扩增片段的长度为 237 bp。扩增条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,48 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,30 个循环。最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 min。

取 5 μL 扩增产物在 2% 琼脂糖上电泳(5 V/cm) 30 min,并用溴化乙锭进行染色,紫外灯下观察结果并照相。

1.3.3 PCR 产物纯化、克隆及测序 按 Promega 凝胶回收试剂盒 (Wizard PCR Preps DNA Purification System, A7170) 操作说明回收、纯化 200 bp 的 PCR 产物。取 2 μL 纯化 DNA 加入至含 5 μL 2 × 快速连接缓冲液、1 μL pGEMR-T Easy 载体及 1 μL 连接酶的 Eppendorf 管中,再加 ddH₂O 至总体积 10 μL,16 $^{\circ}\text{C}$ 连接 1 h。取 2 μL 连接完成的连接反应液转化大肠杆菌 JM109,并涂布于含氨苄青霉素的 X-Gal、IPTG 平板置 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养过夜,白色菌落为重组子候选克隆。PCR 进行验证。最后由上海生物工程公司完成测序工作。

2 结果

2.1 诺瓦克样病毒 RNA 聚合酶区基因片段的扩增

在进行引物的选择时除了 N1、N2、N3 这一组

外,还尝试过引物组 P1、P2、P3^[1]:

P1(-) 5' ATC TCA TCA TCA CCA TA 3'

P2(+) 5' GAA TTC CAT CGC CCA CTG
GCT 3'

P3(-) 5' CGA TTT CAT CAT CAC A 3'

两组参考引物对粪便阳性样品进行多次试验并调整退火温度,发现仅 N1、N2、N3 这一组能得到与文献[1]相应的扩增结果,且在退火温度为 48 ℃时扩增稳定;第一扩增产物(N1、N3)的大小为 326 bp,第二扩增产物(N1、N2)大小为 237 bp。

所以对于牡蛎样品的 RT-PCR 选用 N1、N2、N3 进行。根据此结果可以看出,2002 年 11 月至 2003 年 4 月的 14 个采集样品中有 5 个得到相应的结果,分别对应电泳图(图 2)中的 1、2、3、5、8 泳道(亮度级高,模板偏大),其中 1、2、5 泳道仅有第二扩增带。

而 2003 年 7 月至 2004 年 1 月的 23 个采集样品中仅有 1 个阳性结果,结果见图 3。



图 1 两组引物扩增结果比较

1. 引物 P1、P2、P3 的扩增结果;2. 引物 N1、N2、N3 的扩增结果;3. 阴性对照

Fig.1 RT-PCR results of two pairs of primers

1. Products of primers P1, P2 and P3; 2. Products of primers N1, N2 and N3; 3. Negative control.

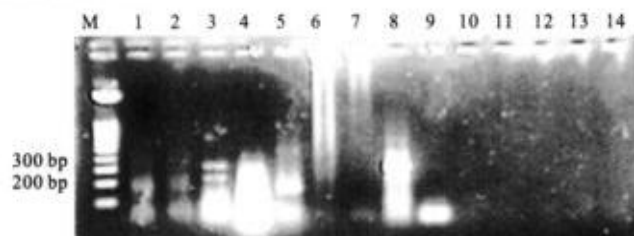


图 2 2002 年 11 月至 2003 年 4 月的 14 个中国的牡蛎采集样的 PCR 扩增结果

Fig.2 PCR results of 14 oyster specimens from Nov. 2002 to Apr. 2003

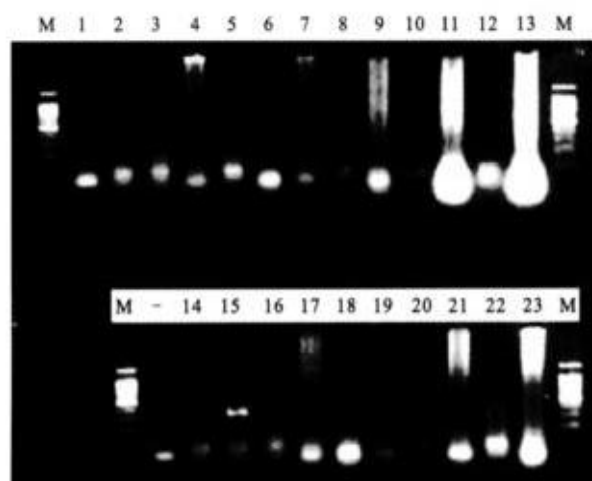


图 3 2003 年 7 月至 2004 年 1 月的 23 个中国的牡蛎采集样的 PCR 扩增结果

Fig.3 PCR results of 23 oyster specimens from Jul. 2003 to Jan. 2004

M: marker; "-" : negative control

对阳性粪便样品以及牡蛎采集样 PCR 扩增产物进行纯化回收后,与 pGEMR-T Easy 载体连接,转化大肠杆菌 JM109。筛选重组子,直接挑菌进行 PCR,结果说明所挑菌的质粒含有目的片段的插入。

2.2 重组质粒的测序结果和序列分析

测序所获得的粪便样克隆片段(201 bp)及牡蛎分离样的克隆片段(237 bp)经 NCBI Blast 发现确实与 NLVs 的编码依赖 RNA 的 RNA 聚合酶的基因相关,且相似度很高。比较粪便分离样与牡蛎的分离样的测序列(Genebee),结果见图 5。

截取图 5 中的黑体字部分进行进一步的序列同源性比较(Genebee),结果如图 6 所示。

3 讨论

碱性条件下利用甘氨酸能快速便捷的进行病毒粒子的洗脱, GLY Buffer 是一类能改变吸附特性的

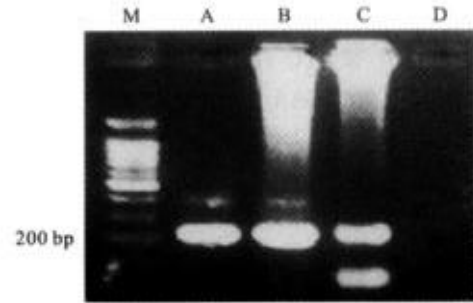


图4 重组子的 PCR 检测

A. 阳性病毒的 N1、N2 扩增产物; B. 粪便样的克隆重组菌的 N1、N2 扩增产物; C. 牡蛎分离样的克隆重组菌 N1、N2 扩增产物; D. 蓝色菌落的 N1、N2 扩增产物

Fig.4 Validation of recombinant by PCR

A. Products of positive control viruses by N1, N2;
B. Products of recombinant of fecal sample by N1, N2;
C. Products of recombinant of oyster sample by N1, N2;
D. Products of blue clones by N1, N2.

```

+++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++
seq1 ( 1 ) ACA-AGAGTGAGCAGCCAGT-GCGAT-----TTGGTG-AAGG-----A
seq2 ( 1 ) ACAcAGAGTGAGGAGCCAGTggGCGATggagttccattggGAGGTGcAGGGcaccagA
+ ++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++
seq1 ( 36 ) AGCTAG-----GATGA-TGAAATTGT-----GACCACATTCACACGCTAGGAGAAAG
seq2 ( 61 ) GGGGAGaccctcATTGAITGATATTTTgaagtcACCCACATCCACCACGCTAGGAGAAAG
+++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++
seq1 ( 83 ) AAGGTCTTCTGCGACCACTGAGCCAAATGTGGTCTGAGGAGAATTAACCATGATTTC
seq2 ( 121 ) AAGGTCTTCTGCGACCACTGAGCCAAATGTGGTCTGAGGAGAATTAACCATGATTTC
+++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++
seq1 ( 143 ) TAGGGCTGCTGCCAACACGGCTCTCTGTGTGTTGAATCCACCGAGAGTAATCAGC
seq2 ( 181 ) TAGGGCTGCTGCCAACACGGCTCTCTGTGTGTTGAATCCACCGAGAGTAATCAGC

```

精通匹配度 20.14 Refined alignment power 20.14

同源性百分比 75.5% Homology percentage 75.5%

图5 感染 NLVs 病人粪便分离样(seq1)与牡蛎分离样(seq2)的序列比较

'-' 相异碱基: 纵列碱基对交换的平均加权值小于平均值;

'+' 相同碱基: 纵列碱基对交换的平均加权值小于矩阵加权平均值与 2 倍标准差之和。

Fig.5 Sequence comparison between extracts of NLVs-infected human feces (seq1) and oyster (seq2)

'-' means different base.

'+' means the same base, less than mean value plus two SD.

```

+++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++
seq1 ( 1 ) CATTACCAACGCTAGGAGAAAGAAGGTCTTCTGCGACCACTGAGCCAAATGTGGTCTG
seq2 ( 1 ) CATCCACCAACGCTAGGAGAAAGAAGGTCTTCTGCGACCACTGAGCCAAATGTGGTCTG
+++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++
seq1 ( 61 ) AGGAGAATTAACCATGATTTCAGGGCTGCTGCCAACACGGCTCTCTGTGTGTTGAAT
seq2 ( 61 ) AGGAGAATTAACCATGATTTCAGGGCTGCTGCCAACACGGCTCTCTGTGTGTTGAAT
+++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++ ++++++
seq1 ( 121 ) CCCACCGAGAG
seq2 ( 121 ) CCCACCGAGAG

```

精通匹配度 19.42 Refined alignment power 19.42

同源性百分比 98.0% Homology percentage 98.0%

图6 图5中黑体部分同源性比较

Fig.6 Homological comparison of the bold section in fig.5

洗脱剂,高 pH(9~10)能减少病毒和吸附剂之间的静电作用^[6,8,12]。当 PEG6000 的浓度为 5% 左右时,牡蛎匀浆液中约有 90% 固体物质能快速沉淀下来,但是对于病毒粒子则需要更高的浓度,一般大于 6%^[12],根据参考文献和本实验的结果,最终选择浓度为 8% 的 PEG6000 作为病毒粒子的沉淀剂。在实验过程中,还选用过 Freon 进行抽提脱毒,结果发现经 Freon 处理后反而检测不出阳性样品。推测是由于二次脱毒中病毒的损失率增大所致。在最后的溶解病毒粒子沉淀的选择中根据资料选择了 0.15 mol/L 的 Na_2HPO_4 (pH 9.0~9.5)。

因为 NLVs 的 RNA 聚合酶区相对保守,所以本实验中尝试了几对针对聚合酶区的引物,并分别对实验条件进行了优化,结果发现仅 N1、N2、N3 这一组引物能扩增出与预期结果一致的特异性条带。图 2 中的阳性对照样 600 bp 处有一条带,可能是由于非特异性扩增所导致,因为多次实验表明,该条带并不是经常出现。在本实验从中国的 37 个牡蛎样品中检测到 6 个阳性样品,从实验结果可以看到,这 6 个分离株中有 4 个不能被 N1、N3 扩增出,仅能被 N1、N2 扩增出,这是由于在一批牡蛎中常常感染有不止一种类型的诺瓦克样病毒,有时甚至能在一批样品中同时发现 G1 和 G2 型 NLVs^[13-14]。因为 6 个被检出样品均有短的扩增片段,所以选择短的片段(237 bp)进行克隆比较。来自中国的两个样品(阳性粪样和从牡蛎中分离得出的样品)的 PCR 产物进行克隆测序并进行 Blastn 和序列比对。发现粪样中的分离株与已登录的 10 株 NLVs 的 RNA 聚合酶序列的同源性为 68%~74%,而牡蛎中的分离株则为 68%~96%,其中与 AF126951(韩国胃肠炎病患分离株)的同源性为 93%,AB035319(日本分离株)的同源性为 96%,AB089880/AB089878/AB089872(日本胃肠炎病患分离株)的同源性为 95%;而国内的两个分离株之间的同源性只有 74%,这也说明了 NLVs 基因的多变性。由此推测中国的引起胃肠炎的 NLVs 与日本和韩国的有差异,且差异较显著,而牡蛎分离株则与之同源性较高,其原因还有待进一步的研究。

本次实验不仅初步建立了一种检测牡蛎中 NLVs 存在情况的方法,而且还发现中国出现的 NLVs 基本上属于 G2 型。且与日本、韩国的相接近,这表明 NLVs 在地域相邻的地区同源性较高。为以后针对某一地区

的 NLVs 的公共引物设计奠定了基础。

参考文献:

- [1] 金奇.医学分子病毒学[M].北京:科学出版社,2001.565-576.
- [2] European commission health & consumer protection directorate-general. Opinion of the scientific committee in veterinary measures relating to public health on norwalk-like viruses [R]. Wales: European Commission, 2002.
- [3] Fang Z Y, Wen L Y, Jin S J, et al. Detection of Norwalk-like viruses in stool specimens from children with diarrhea in China [J]. Clin J Virol, 1995, 11: 215-219.
- [4] Yu J, Yuan Q, Huo Y, et al. Seroprevalence against norwalk-like human caliciviruses in Beijing, China [J]. J Med Virol, 2000, 60: 97-101.
- [5] 段燕文, 黄英.诺瓦克样病毒胃肠炎的实验室和流行病学诊断方法[J].中国卫生检验杂志, 1995, 5(5): 313-316.
- [6] Norcott J P, Green J, Lewis D, et al. Genomic diversity of small round structured viruses in the United Kingdom [J]. J Med Virol, 1994, 44: 280-286.
- [7] Lees D N, Henshilwood K, Dor W J. Development of a method for detection of enteroviruses in shellfish by PCR with poliovirus as a model [J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60: 2999-3005.
- [8] Kawamoto H, Yamazaki K, Utagawa E, et al. Nucleotide sequence analysis and development of consensus primers of RT-PCR for detection of norwalk-like viruses in Japan [J]. J Med Virol, 2001, 64: 569-576.
- [9] Lees D N, Henshilwood K, Green J, et al. Detection of small round structured viruses in shellfish by reverse transcription-PCR [J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61: 4418-4424.
- [10] Kingsley D H, Richards G P. Rapid and efficient extraction method for reverse transcription-PCR detection of hepatitis A and norwalk-like viruses in shellfish [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 4152-4157.
- [11] Someya Y, Takeda N, Miyamura T. Complete nucleotide sequence of the Chiba virus genome and functional expression of the 3C-like protease in *Escherichia coli* [J]. Virology, 2000, 278: 490-500.
- [12] Lewis G D, Metcalf T G. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples [J]. Appl Environ Microbiol, 1988, 54: 1983-1988.
- [13] Sugieda M, Nakajima K, Nakajima S. Outbreaks of Norwalk-like virus-associated gastroenteritis traced to shellfish-coexistence of two genotypes in one specimen [J]. Epidemiol Infect 1996, 116: 339-346.
- [14] Henshilwood K, Green J, Lees D N. Monitoring the marine environment for small round structured viruses (SRSVS): a new approach to combating the transmission of these viruses by molluscan shellfish [J]. Wat Sci Tech, 1998, 38(12): 51-56.

Detection of Norwalk-like viruses in oysters by RT-PCR and gene sequence analysis of RNA polymerase fragments

WANG Jun¹, XUE Chang-hu¹, LI Zhao-jie¹, CAI Yue-piao¹, HE Shan-shan¹, YANG Wen-ge²

(1. Food Safety Laboratory of Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Food and Science Institute of Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Thirty-seven experimental oyster came from three farms of China. Beijing Precautionary Institute provided the positive virus (Norwalk-like viruses, NLVs) separated from gastroenteritis patients. The oysters were shucked and homogenized at high speed. About 25 g homogenization with 7 volume Glycine buffer (pH 9.5) shook at 250 r/min at room temperature, and centrifuged at 3 000 g for 30 min at 4 °C; the pellet was discarded and the supernatant was adjusted to pH 7.5 then 16% PEG-6000 was added to a final concentration of 8%. Precipitation at 4 °C for 4 h, then centrifuged at 3 000 g for 30 min. Discarded the supernatant and suspended the pellet in 0.15 mol/L Na₂HPO₄. Stirred at 100 r/min for 20 min at room temperature and then centrifuged at 10 000 g for 30 min at 4 °C. The supernatant was adjusted to pH 7.4 and stored at -20 °C for use.

300 µL solution taken from the upper steps was used for RNA extraction with TRIzol (Sangon, Shanghai). The pellet was dissolved with DEPC H₂O after died and stored at -20 °C. 250 µL stool solution was dealt with the same method as above.

A set of nested primers N1, N2, N3 was used for PCR. cDNA was synthesized from primer N1 by the M-MLVRT system (Sangon, Shanghai). The PCR product amplified by N1 and N2 was about 237 bp; the PCR product amplified by N1 and N3 was about 326 bp. Among 37 samples six samples were detected positive and most were collected in winter. Four of the six samples could not be amplified by primers N1 and N3. This is due to the fact that many shellfish samples contained a mixture of strains with a few samples containing up to two different strains with both genogroups represented. The amplified 237 bp fragments were electrophoresed on 2.0% agarose gel, purified with the Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega, A7170), and ligated with pGEM-T Easy vector by T4 DNA ligase for 1 h at 16 °C. JM109 was transformed with the ligation products. Luria-Bertani (LB) agar plates containing 100 µg/mL ampicillin, 100 µg/mL IPTG and 200 µg/mL X-Gal was used to screen the recombinant colonies. Insertion of the PCR product was verified by PCR and agarose gel electrophoresis.

Blastning the sequenced results online (NCBI) showed that these cloned fragments were related to NLVs RNA-dependent RNA polymerase gene. Compared the two cloned sequences with online alignment software of GeneBec, it showed that the homology of the two sequences is 98.0%.

According to the results, winter is the primary season in which oysters are easily contaminated with NLVs. The genotype of strains in China was close to that found in Japan and Korea according to Blastn (NCBI). Their homology percentage was higher than 95%, which indicates that NLVs in close geographical locations commonly are homologous.

Key words: *Crassostrea gigas*; Norwalk-like virus; RT-PCR; sequence