

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.00211

贝类中 3 种组织血型抗原 ELISA 检测方法的建立与分型

刘帅帅^{1,2}, 姚琳¹, 马丽萍¹, 周德庆¹, 赵峰¹

1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 中国海洋大学 食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003

摘要: 人类组织血型抗原(histo-blood group antigens, HBGAs)是诺如病毒(NoVs)的结合受体, 本研究假设贝类中也存在类似的 HBGAs 并且特异性地富集 NoVs, 利用 HBGAs 单克隆抗体, 建立贝类中 3 种 HBGAs 的 ELISA 检测方法, 分析牡蛎(*Crassostrea gigas*)、缢蛏(*Sinonovacula constricta*)、菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)、紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)、毛蚶(*Scapharca subcrenata*)、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)等 6 种双壳贝类中 HBGAs 的类型。结果显示, 在上述 6 种贝类中都检测出 A 型抗原, 其中菲律宾蛤仔的检出率为 11.6%(9/77), 紫贻贝的检出率为 28.1%(16/57), 缢蛏样品为 72.3%(47/65), 栉孔扇贝为 84.6%(58/69), 其余贝类检出率为 100%; 只有牡蛎样品检出 H 抗原, 检出率为 30.7%(28/91); 在缢蛏和毛蚶样品中检测出 B 型抗原, 检出率分别为 76.9%(50/65)和 77.8%(56/72)。结果表明贝类中存在不止 1 种类型的 HBGAs。

关键词: 贝类; 组织血型抗原; 诺如病毒; 酶联免疫吸附; 单克隆抗体

中图分类号: S944

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)01-0211-06

诺如病毒(noroviruses, NoVs)属于杯状病毒科(Caliciviridae), 是非细菌性急性肠胃炎的主要病原体, 是一种重要的食源性病毒。NoVs 分为 5 个遗传组(GGI-V), 其中 GGI、GGII 和 GGIV 型可以感染人^[1]。在由食物污染造成的病毒性胃肠炎流行中, 90%的病原是 NoVs^[2]。20 世纪 70 年代有人假设, NoVs 的感染与宿主的某种遗传因素有关^[3]。最近的研究表明, 人类组织血型抗原(histo-blood group antigens, HBGAs)作为病毒受体介导了 NoVs 感染人类的过程^[4-5]。对 NoVs 感染者和志愿者的回顾性调查发现, 病毒的感染和人的 HBGAs 有着很大的相关性, O 型血的人比 A、B 型血的人更容易感染 NoVs^[6-7]。人类 HBGAs 遗传多样性是导致对 NoVs 敏感性存在差异的重要原因之一^[8]。

HBGAs 是一类与糖蛋白结合的碳水化合物, 分布于红细胞表面以及呼吸道、消化道和生殖道

黏膜上皮细胞表面, 同时也以游离低聚糖形式存在于唾液、肠内容物、乳汁及血液等体液中, 具有细胞表面受体、信号传导因子或离子转运通道的功能^[9]。ABO 血型系统(包括 A、B 和 H 抗原)、Lewis 血型系统(包括 Le^a、Le^b、Le^x、Le^y等抗原)和分泌型(secretor)是 3 种主要的人体 HBGAs。

流行病学调查显示, 牡蛎等双壳贝类是 NoVs 食物性传播最主要的载体之一。贝类滤食水中微藻的同时, 消化道可大量富集 NoVs。贝类的这种富集作用导致其内脏团内的病毒浓度可以高出周围环境几十倍甚至上千倍^[10]。Cheng 等^[11]用 RT-PCR 的方法检测了 11 个国家的 507 份牡蛎样品, 结果 53 份检测出 NoVs, 检出率为 10.5%, 牡蛎等贝类受到 NoVs 的污染成为一个全球性的问题。

作为 NoVs 传播重要载体的牡蛎等双壳贝类, 其特异性吸附 NoVs 的分子机理已成为研究的热

收稿日期: 2012-04-10; 修订日期: 2012-05-29.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101883); 国际科技合作项目(2010DFA31720).

作者简介: 刘帅帅(1985-), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产品质量安全. E-mail: liushuai3036@126.com

通信作者: 周德庆, 研究员. E-mail: zhoudq@ysfri.ac.cn

点。由于推测人类 HBGA 在个体之间的差异与对 NoVs 敏感性的差异存在相关性, 研究人员假设, 贝类中也可能存在类似的受体介导了特异性富集 NoVs 的生物学过程。Tian 等^[12-13]和 Le Guyader 等^[14]用免疫组化的方法证实了太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)、弗吉尼亚牡蛎(*Crassostrea virginica*)的内脏细胞能表达 A 型组织血型抗原, 并且与 NoVs 吸附有关, 这在一定程度上解释了为何牡蛎等贝类可以特异性富集 NoVs。本研究以太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)、缢蛏(*Sinonovacula constricta*)、菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)、紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)、毛蚶(*Scapharca subcrenata*)、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)等 6 种双壳贝类为研究对象, 建立了 A、B、H 型 3 种 HBGA 的 ELISA 检测方法, 并应用该方法对中国不同贝类中的 HBGA 进行检测和分型, 探究 HBGA 在不同贝类中的差异情况, 这对于分析中国不同贝类与 NoVs 富集相关性, 探索贝类吸附 NoVs 的分子机理具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 A、B、H 型 HBGA 的单克隆抗体(一抗)购自 Covance 公司; 四甲基联苯胺(TMB)购自 Sigma 公司; 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG、辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgM 购自北京中杉金桥公司; 脱脂奶粉购自伊利公司; H_2O_2 、吐温-20 购自国药集团; 96 孔酶标板购自 Corning 公司。

1.1.2 贝类样品 2011 年各个月份, 于大连、烟台、威海、青岛、日照、连云港、舟山、厦门、广州等 9 个城市采集样品, 其中, 太平洋牡蛎共计 91 份; 缢蛏共计 65 份; 菲律宾蛤仔共计 77 份; 紫贻贝共计 57 份; 毛蚶共计 72 份; 栉孔扇贝共计 69 份。

1.2 方法

1.2.1 ELISA 检测流程 将 100 μ L 贝类胃消化组织上清液稀释不同倍数后, 加入酶标板, 4℃过夜, 弃去残液, 用 PBS-T 洗涤 3 次并拍干; 用 360 μ L 的 10%的脱脂奶粉封闭, 37℃孵育 2 h, 弃去封闭液, PBS-T 洗板 3 次并拍干; 加入 100 μ L 稀释

适当倍数的 HBGA 的单克隆抗体, 37℃孵育一定时间, PBS-T 洗涤 4 次并拍干; 加入 100 μ L 稀释适当倍数的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗, 37℃孵育一定时间, PBS-T 洗涤 5 次并拍干; 加入 100 μ L 辣根酶的底物 TMB 溶液, 37℃避光反应 20 min; 加入 50 μ L 的 2 mol/L 硫酸终止反应; 酶标仪 450 nm 测 OD₄₅₀ 值。阴性对照的设置是用 PBS(pH7.4)溶液代替贝类胃消化组织上清液包被酶标板, 其余条件相同。计算阳性/阴性值(P/N 值), 以 P/N 值 ≥ 2.1 作为判断阳性的标准。

本实验以牡蛎中的 A 型 HBGA 为代表, 优化确定 ELISA 标准检测方法, 并应用于其他贝类品种的 B 型和 H 型组织血型抗原的检测。

1.2.2 贝类 HBGA 的 ELISA 检测方法的建立

(1)贝类消化组织上清液包被最佳稀释比例的确定 取 5 g 牡蛎胃消化组织(oyster stomach and digestive tissue, OSDT), 加入一定量的 PBS 溶液匀浆 2 min; 匀浆液 3 000 r/min, 4℃离心 15 min, 取上清液备用。用该方法制备 1 g 1 mL、1 g 2 mL、1 g 3 mL、1 g 4 mL、1 g 5 mL 5 种比例的 OSDT 上清液。每个比例 3 个平行, 计算 P/N 值, 以得到 P/N 值最高的稀释比例为最佳。

(2)最佳包被条件的确定 选择包被条件为 4℃过夜、37℃ 1 h、37℃ 2 h、37℃ 3 h、37℃ 4 h。

(3)一抗和二抗最佳工作浓度的确定 应用方阵滴定法确定一抗和二抗的最佳工作浓度, 选择一抗的稀释比例为 1 400、1 800、1 1000、1 1200、1 1400; 二抗的稀释比例为 1 1000、1 2000、1 3000、1 4000。

(4)一抗和二抗最佳反应时间的确定 方阵滴定法确定一抗和二抗的最佳工作时间, 一抗选择 0.5、1.0、1.5、2.0 h 4 个反应时间; 二抗选择 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h 5 个反应时间。

根据以上实验确定最佳反应条件, 建立贝类 A 型、B 型、H 型 HBGA 的 ELISA 检测方法。

1.2.3 方法稳定性检测 用批内和批间实验验证方法的稳定性和重复性, 取相同牡蛎样品, 测定牡蛎样品的 P/N 值, 计算变异系数。

1.2.4 贝类中 HBGA 的检测分型 应用建立的

ELISA 方法对本研究所采集的全国 9 个沿海城市的 6 种贝类进行 HBGA_s 的检测分型, 以 P/N 值 ≥ 2.1 作为判断阳性的标准, 计算每种贝类样品的阳性检出率。

2 结果与分析

2.1 ELISA 检测方法的标准化

2.1.1 牡蛎最佳包被稀释比例的确定 对牡蛎胃消化组织上清液稀释不同的比例, 结果如表 1 所示, 稀释比在 1 g 3 mL 时, P/N 值最大, 稀释比例偏小可能会有其他物质干扰, 稀释比例偏大会降低 HBGA_s 的浓度含量, 所以实验条件选择 1 g 3 mL 作为最佳包被稀释比例。

2.1.2 最佳包被条件的选择 按照不同的包被条件包被牡蛎胃消化组织上清液, 不同包被条件的结果如表 2 所示, 37℃ 2 h 包被的 P/N 值高于其他条件, 本方法采用 37℃ 2 h 的包被条件。

2.1.3 一抗和二抗最佳工作浓度的确定 一抗和二抗不同稀释比例的实验结果如表 3 所示, 在满足实验定性结果的基础上, 选择一抗稀释比例大的范围。二抗浓度不变, 一抗稀释比例越大, P/N 值越低。由定性条件 P/N 值 ≥ 2.1 作为判断阳性的标准, 本实验确定一抗最佳稀释比为 1 1 200, 二抗最佳稀释比为 1 1 000。

2.1.4 一抗和二抗最佳反应时间的优化 一抗和二抗不同反应时间的结果如表 4 所示, 选择得到 P/N 值最高的反应时间为最佳反应时间, 一抗和二抗最佳反应时间分别为 1.5 h 和 2.0 h。在一抗反应时间达到 1.5 h 及以上时, 二抗的反应时间超过 2.0 h, 结果表明虽然其阳性的 OD₄₅₀ 值在增加, 但是阴性 OD₄₅₀ 值增加比例更大, 使得 P/N 值降低。

2.1.5 ELISA 检测方法的确定 由上述的实验结果, 确定 ELISA 检测方法的主要技术参数为: 100 μ L 牡蛎消化组织上清液按照 1 g:3 mL 稀释加入酶标板, 37℃ 孵育 2 h; 用 360 μ L 10% 的脱脂奶粉封闭, 37℃ 孵育 1.5 h; 加入 100 μ L 稀释 1 200 倍的 HBGA_s 的单克隆抗体, 37℃ 孵育 1.5 h; 加入 100 μ L 稀释 1 000 倍的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗, 37℃ 孵育 2 h; 加入 100 μ L 辣根过氧化物酶底物 TMB 溶液, 37℃ 避光反应 20 min; 加入 50 μ L 的 2mol/L 硫酸终止反应, 酶标仪 450 nm 测 OD₄₅₀ 值。

2.1.6 方法的重复性和稳定性 对 2011 年 4 月份采集的青岛牡蛎样品分成 4 份, 制备 OSDT 上清液, 进行批内和批间实验($n=5$), 方法验证实验的结果如表 5 所示, 批内和批间实验的变异系数均小于 5%, 因此建立的 ELISA 测定方法具有较高的稳定性和可重复性。

表 1 不同稀释比的牡蛎胃消化组织上清液的 P/N 值
Tab. 1 P/N ratio of oyster stomach and digestive tissue supernatant of different dilution ratio

OD ₄₅₀	稀释比 dilution ratio				
	1 g 1 mL	1 g 2 mL	1 g 3 mL	1 g 4 mL	1 g 5 mL
阳性 positive	0.13	0.138	0.148	0.115	0.097
阴性 negative	0.033	0.033	0.032	0.032	0.029
P/N 值 P/N ratio	3.94	4.18	4.57	3.57	3.34

表 2 不同包被条件下的 P/N 值
Tab. 2 P/N ratio under different coated conditions

OD ₄₅₀	包被条件 coated condition				
	4℃ 过夜 overnight at 4℃	37℃ 1 h	37℃ 2 h	37℃ 3 h	37℃ 4 h
阳性 positive	0.15	0.135	0.132	0.153	0.135
阴性 negative	0.045	0.042	0.027	0.063	0.039
P/N 值 P/N ratio	3.33	3.32	4.71	3.40	2.44

表 3 一抗和二抗采用不同稀释比得到的 P/N 值
Tab. 3 P/N ratio under different primary antibody and secondary antibody dilution ratio

一抗稀释比例 primary antibody dilution ratio	二抗稀释比例 secondary antibody dilution ratio			
	1:1000	1:2000	1:3000	1:4000
1:400	9.17	6.73	5.56	2.62
1:800	7.53	5.04	4.2	2.02
1:1000	4.24	3.01	2.54	1.56
1:1200	2.94	2.14	1.95	1.29
1:1400	1.91	1.51	1.39	1.19

表 4 一抗和二抗不同反应时间的 P/N 值
Tab. 4 P/N ratio under different primary and secondary antibody reaction time

一抗反应时间/h primary antibody reaction time	二抗反应时间/h secondary antibody reaction time				
	0.5	1	1.5	2	2.5
0.5	2.09	2.84	3.23	3.48	3.81
1	2.48	3.18	3.98	4.55	4.36
1.5	2.75	3.67	4.86	5.36	5.17
2	3.18	3.98	4.19	5.36	5.02

表 5 批内和批间实验结果
Tab. 5 Results of intra-assay and inter-assay

样品编号 sample no	批内实验 intra-assay		批间实验 inter-assay	
	P/N 值	变异系数/%	P/N 值	变异系数/%
	P/N ratio	CV	P/N ratio	CV
1	19.05	2.24	19.21	2.99
2	18.97	3.44	18.93	2.47
3	19.38	4.64	18.89	1.47
4	18.81	3.66	19.63	2.24

2.2 贝类 HBGA 的分型结果

利用建立的贝类中 3 种组织血型抗原的检测方法,对 2011 年各个月份采集的贝类样品进行检测分型,根据 P/N 值作为判断阳性的标准,计算各种贝类中不同组织血型抗原的阳性率,结果如表 6 所示。

6 种贝类样品中 3 种抗原的阳性检出率如表 6 所示。表 6 结果显示了 6 种双壳经济贝类中的 3 种 HBGA 类型,其中所有的太平洋牡蛎都检测出了 A 型抗原,这与 Tian 等^[12, 15]和 Le Guyader 等^[14]对国外牡蛎品种的检测结果相符;同时,本研究发现,所有地方采集的毛蚶样品都检测出 A 型抗原,缢蛏和栉孔扇贝样品大部分都检测出了 A 型抗

原,检测率分别为 72.3%和 84.6%,77 份菲律宾蛤仔和 57 份紫贻贝中分别有 9 份和 16 份检出 A 型抗原;6 种贝类中有 28 份牡蛎样品检出 H 抗原,其他贝类均未检出 H 抗原;大部分缢蛏和毛蚶样品都检测出 B 型抗原,检测率分别为 76.9%和 77.8%。

表 6 6 种贝类的 HBGA 的检出率
Tab. 6 Detection rate of HBGA from six kinds of shellfish %

贝类品种 shellfish species	A 抗原 type-A	B 抗原 type-B	H 抗原 type-H
太平洋牡蛎 <i>Crassostrea gigas</i>	100	0	30.7
缢蛏 <i>Sinonovacula constricta</i>	72.3	76.9	0
菲律宾蛤仔 <i>Ruditapes philippinarum</i>	11.6	0	0
紫贻贝 <i>Mytilus galloprovincialis</i>	28.1	0	0
毛蚶 <i>Scapharca subcrenata</i>	100	77.8	0
栉孔扇贝 <i>Chlamys farreri</i>	84.6	0	0

3 讨论

贝类富集 NoVs 的机理目前还不十分清楚,最初认为富集过程涉及到机械性的包埋,包括直接化学键、范德华力和氢键等^[16]。而目前病毒粒子与宿主受体的结合已成为研究的新方向。有研究证明, NoVs 在牡蛎中的吸附过程与碳水化合物而不是蛋白质有关^[17]。Le Guyader 等^[14]对牡蛎的进一步研究表明, NoVs 与半乳糖胺 N 末端结合。Tian 等^[12]对弗吉尼亚牡蛎(*Crassostrea virginica*)中的抗原类型进行了检测,结果发现,21 份牡蛎样品中都检测出了 A 型抗原、6 份检测出 H 抗原,其他类型抗原未检出。用重组诸如病毒粒子(rNLVP)对 A 型 HBGA 进行了吸附和抑制实验, rNLVP 可以吸附在包被了牡蛎胃肠细胞组织上清液的酶标孔中, rNLVP 与 A 型 HBGA 的单克隆抗体或者 A 型血人的唾液预先孵育后,吸附会受到抑制。本研究结果发现,6 种贝类都能表达 A 型 HBGA,这为进一步证明贝类中 A 型 HBGA 是结合 NoVs 的受体提供了证据。

Tian 等^[13]从一种蛤蜊(*Venerupis japonica*)和一种贻贝(*Mytilus edulis*)中检测出 A 型抗原的存在,同时发现,它们的消化组织上清液可以吸附 GGI

和 GGII 的 rNVLP。抑制实验发现, A 型 HBGA 单克隆抗体可以抑制 rNLVP 与贝类消化组织上清液的吸附, 而 H 型 HBGA 单克隆抗体对吸附无影响, 说明 A 型 HBGA 比 H 型 HBGA 对于贝类富集 NoVs 更关键。本结果进一步发现, 缢蛏、毛蚶和栉孔扇贝表达 A 型抗原, 是否所有的贝类都存在 A 型抗原, 贝类不同品种之间是否存在表达抗原类型的差异, 这有待于今后更加深入地研究。笔者分析了不同城市贝类样品表达 A 型、H 型和 B 型 HBGA 的差异, 发现并无地区差异。

本研究同时发现, 缢蛏和毛蚶中也存在 B 型 HBGA。B 型 HBGA 是否与贝类富集 NoVs 有关, 现在还没有确切证据。对人体而言, HBGA 的多态性及 NoVs 的基因多样性决定了二者之间结合方式的多样性, 在人体中 A 型抗原可以结合多种类型的 NoVs 株^[18]。在人体中目前共发现 8 种 HBGA-NoVs 作用方式^[19-20]。由此推测, 牡蛎等贝类中的 HBGA 与 NoVs 的作用方式可能不止 A 型 HBGA 1 种, 其他结合方式需要进一步研究。

参考文献:

- [1] Zheng D P, Ando T, Fankhauser R L, et al. Norovirus classification and proposed strain nomenclature[J]. *Virology*, 2006, 346(2): 312-323.
- [2] Parashar U, Quiroz E, Mounts A, et al. Norwalk-like viruses. Public health consequences and outbreak management[J]. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2001, 50(RR09): 1-17.
- [3] 吴清平, 姚琳, 张菊梅, 等. 诺如病毒结构蛋白的研究进展[J]. *病毒学报*, 2008, 24(4): 322-325.
- [4] Cartron J P, Colin Y. Structural and functional diversity of blood group antigens[J]. *Transf Clin Biol*, 2001, 8(3): 163-199.
- [5] 靳淼, 何雅青, 李慧莹, 等. 我国诺如病毒 SZ9711 株 P 粒子制备及唾液 HBGA 受体亲和性分析[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2010, 24(1): 5-7.
- [6] Hutson A M, Atmar R L, Graham D Y, et al. Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group Type[J]. *J Infect Dis*, 2002, 185: 1335-1337.
- [7] Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, et al. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection[J]. *Nat Med*, 2003, 9(5): 548-553.
- [8] 宋维, 彭会珍, 赵凌侠. Norovirus 分子生物学特征及其亚基疫苗研究进展[J]. *中国农业科技导报*, 2010, 12(6): 43-48.
- [9] Ravn V, Dabelsteen E. Tissue distribution of histo-blood group antigens[J]. *Apmis*, 2000, 108(1): 1-28.
- [10] Burkhardt W, Calci K. Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66: 1375-1378.
- [11] Cheng P K, Wong D K, Chung T W, et al. Norovirus contamination found in oysters worldwide[J]. *J Med Virol*, 2005, 76: 593-597.
- [12] Tian P, Bates A H, Jensen H M, et al. Norovirus binds to blood group A-like antigens in oyster gastrointestinal cells[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2006, 43(6): 645-651.
- [13] Tian P, Engelbrektson A L, Jiang X, et al. Norovirus recognizes histo-blood group antigens on gastrointestinal cells of clams, mussels, and oysters: a possible mechanism of bioaccumulation[J]. *J Food Prot*, 2007, 70(9): 2140-2147.
- [14] Le Guyader F, Loisy F, Atmar R L, et al. Norwalk virus-specific binding to oyster digestive tissues[J]. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12(6): 931-936.
- [15] Tian P, Jiang X, Zhong W, et al. Binding of recombinant norovirus like particle to histo-blood group antigen on cells in the lumen of pig duodenum[J]. *Res Vet Sci*, 2007, 83(3): 410-418.
- [16] Di Girolamo R, Liston J, Matches J. Ionic bonding, the mechanism of viral uptake by shellfish mucus[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1977, 33(1): 19-25.
- [17] Hutson A M, Atmar R L, Estes M K. Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors[J]. *Trends Microbiol*, 2004, 12(6): 279-287.
- [18] Huang P, Farkas T, Marionneau S, et al. Noroviruses bind to human ABO, Lewis, and secretor histo-blood group antigens: identification of 4 distinct strain-specific patterns[J]. *J Infect Dis*, 2003, 188(1): 19-31.
- [19] Harrington P R, Lindesmith L, Yount B, et al. Binding of Norwalk virus-like particles to ABH histo-blood group antigens is blocked by antisera from infected human volunteers or experimentally vaccinated mice[J]. *J Virol*, 2002, 76(23): 12335-12343.
- [20] Huang P, Farkas T, Zhong W, et al. Norovirus and histo-blood group antigens-demonstration of a wide spectrum of strain specificities and classification of two major binding groups among multiple binding patterns[J]. *J Virol*, 2005, 79(11): 6714-6722.

Use of ELISA for the detection and typing of three HBGAs in shellfish

LIU Shuaishuai^{1,2}, YAO Lin¹, MA Liping¹, ZHOU Deqing¹, ZHAO Feng¹

1. Yellow Sea Fisheries Research Institute Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. College of Food Science and Engineering Ocean University of China, Qingdao 266003, China

Abstract: The histo-blood group antigens (HBGAs) located on cells of the human gastrointestinal tract function as receptors for NoVs. It is hypothesized that HBGA-like receptors are present in shellfish and are responsible for the specific accumulation of NoVs. We used human HBGA-specific monoclonal antibodies (MAbs) to develop an ELISA method for detection of three forms of HBGA in six bivalve shellfish species (oysters, razor clam, clam, blue mussel, blood clam, and scallop). All six species expressed type-A HBGAs. The detection rate of type-A HBGAs was 11.6%, 28.1%, 72.3%, and 84.6% in *Ruditapes philippinarum*, *Mytilus galloprovincialis*, *Sinonovacula constricta*, and *Chlamys farreri* tissue, respectively. All samples of oyster and blood clam contained type-A HBGAs. Type-H HBGAs were found only in oysters with a detection rate of 30.7%. Type-B HBGAs were present in the razor clam and blood clam (detection rate of 76.9% and 77.8%, respectively). Our results suggest that multiple HBGAs are expressed in bivalve shellfish and provide insight into the mechanism of accumulation of NoVs by bivalve shellfish.

Key words: shellfish; HBGAs; NoVs; ELISA; monoclonal antibody

Corresponding author: ZHOU Deqing. E-mail: zhoudq@ysfri.ac.cn