



中华人民共和国国家标准

GB 4789.42—2025

食品安全国家标准

食品微生物学检验 诺如病毒检验

2025-03-16 发布

2025-09-16 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会
国家市场监督管理总局 发布

前 言

本标准代替 GB 4789.42—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 诺如病毒检验》。

本标准与 GB 4789.42—2016 相比,主要变化如下:

- 修改了标准的适用范围;
- 增加了过程控制病毒和诺如病毒 GI 基因组检测用探针;
- 修改了“软质水果和生食蔬菜”的前处理步骤和检验结果的判定。

食品安全国家标准

食品微生物学检验 诺如病毒检验

1 范围

本标准规定了食品中诺如病毒(Norovirus)的实时荧光 RT-PCR 检验方法。

本标准适用于贝类、生食蔬菜、硬质表面食品、软质水果和包装饮用水中诺如病毒的检测。

2 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外,其他设备和材料如下。

- 2.1 实时荧光 PCR 仪。
- 2.2 低温离心机:离心力 $>12\,000\times g$,温度 $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$,套管容积适合 1.5 mL/50 mL 离心管。
- 2.3 无菌刀片或等效均质器。
- 2.4 涡旋混匀仪。
- 2.5 电子天平:感量为 0.1 g 和 0.1 mg。
- 2.6 全温振荡器或等效装置:温度范围 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 2.7 恒温水浴锅或恒温金属浴:温度范围为室温 $\sim 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 2.8 离心机:离心力 $>5\,000\times g$,套管容积适合 50 mL/15 mL 离心管。
- 2.9 低温冰箱: $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 2.10 微量移液器。
- 2.11 pH 计或精密 pH 试纸。
- 2.12 无菌均质袋:带滤网,容积 400 mL。
- 2.13 无菌棉拭子。
- 2.14 无菌贝类剥刀。
- 2.15 橡胶垫。
- 2.16 无菌剪刀。
- 2.17 无菌镊子。
- 2.18 无菌培养皿。
- 2.19 无 RNase 玻璃容器、无 RNase 离心管、无 RNase 移液器吸头、无 RNase 药匙、无 RNase PCR 薄壁管:见附录 E 中 E.1。
- 2.20 超滤浓缩离心管(截留蛋白分子量 50 kD 或 100 kD)。
- 2.21 无菌混合纤维素膜(孔径 $0.45\text{ }\mu\text{m}$,直径 47 mm)。

3 培养基和试剂

除有特殊说明外,所有实验用试剂均为分析纯;实验用水均为无 RNase 超纯水(见 E.2.1)。

- 3.1 GI 和 GII 基因组诺如病毒引物和探针:见附录 A。
- 3.2 过程控制病毒引物和探针:见附录 C。

- 3.3 过程控制病毒:门哥病毒或大肠埃希氏菌噬菌体 MS2,见附录 C。
- 3.4 外加扩增控制 RNA:见附录 D。
- 3.5 Tris/甘氨酸/牛肉膏(TGBE)缓冲液:见 E.2.2。
- 3.6 5×PEG/NaCl 溶液:见 E.2.3。
- 3.7 磷酸盐缓冲液(PBS):见 E.2.4。
- 3.8 三氯甲烷/正丁醇混合液:见 E.2.5。
- 3.9 蛋白酶 K 溶液:见 E.2.6。
- 3.10 75%乙醇:见 E.2.7。
- 3.11 Trizol 试剂:见 E.2.8。
- 3.12 盐酸(HCl)溶液(6 mol/L):见 E.2.9。
- 3.13 氢氧化钠(NaOH)溶液(1 mol/L):见 E.2.10。
- 3.14 果胶酶:*Aspergillus niger* 果胶酶,活性 ≥ 5 U/mg;或 *Aspergillus aculeatus* 果胶酶,活性 $\geq 3\ 800$ U/mL。
- 3.15 氯化镁。

4 检验程序

诺如病毒检验程序见图 1。

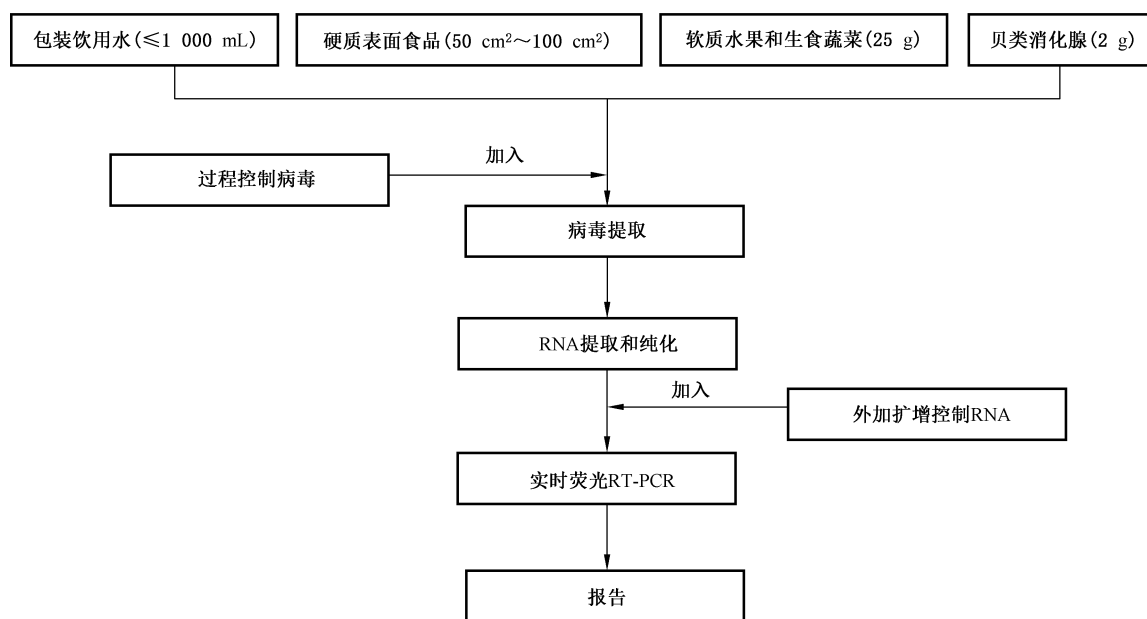


图 1 诺如病毒检验程序

5 操作步骤

5.1 样品处理

待检样品一般应在 4℃ 以下的环境中进行运输。实验室接到样品后应尽快进行检测,如果在 24 h 内不能检测,应将样品保存在 -80℃ 冰箱中,实验前取出,放置室温,至样品完全解冻。样品处理和 PCR 检测应防止交叉污染。每个样品可设置 2 个~3 个平行处理。样品处理过程中,要注意更换剪刀、镊子、移液器吸头等实验耗材,防止样品间的交叉污染。

5.2 病毒提取

5.2.1 软质水果和生食蔬菜

5.2.1.1 将 25 g 软质水果(由子房发育成的柔软多汁的肉质水果的统称,如草莓、葡萄)或生食蔬菜(如生菜)在无菌条件下切成约 2.5 cm×2.5 cm×2.5 cm 的小块(如水果或蔬菜小于该体积,可不切)。

5.2.1.2 将样品小块移至无菌均质袋(带滤网,容积 400 mL)中,加入 10 μL 过程控制病毒,再加入 40 mL TGBE 缓冲液(软质水果样品,需加入 30 U *Aspergillus niger* 果胶酶,或 1 140 U *Aspergillus aculeatus* 果胶酶)。

5.2.1.3 使用全温振荡器,在室温条件下,60 次/min,振荡 20 min。酸性软质水果(软果经焚烧后的灰分溶解在水中后 pH 小于 7.0 的软质水果,例如草莓、杨梅、覆盆子)需在振荡过程中,每隔 10 min 测定 pH,当 pH 低于 9.0 时,使用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 9.5,每调整 1 次 pH,延长振荡时间 10 min。

5.2.1.4 将提取液转移至 50 mL 离心管,如体积较大,使用 2 支离心管。10 000×g,4℃,离心 30 min。取上清至无菌试管或三角瓶,用 6 mol/L HCl 调 pH 至 7.0。

5.2.1.5 向提取液中加入 0.25 倍提取液体积的 5×PEG/NaCl 溶液,使 PEG/NaCl 在提取液中的终含量为 100 g/L PEG,0.3 mol/L NaCl。室温,摇匀 1 min,然后,4℃,60 次/min,振荡 60 min 或 4℃静置过夜。10 000×g,4℃,离心 30 min,弃上清。10 000×g,4℃,离心 5 min 紧实沉淀,弃上清。

5.2.1.6 加入 500 μL PBS 重悬沉淀。如样品为生食蔬菜,直接将重悬液转移至无 RNase 离心管中,测定并记录重悬液体积,用于后续 RNA 提取。如样品为软质水果,将重悬液转移至耐三氯甲烷的无菌离心管中,加入 500 μL 三氯甲烷/正丁醇混合液,涡旋混匀,室温静置 5 min,10 000×g,4℃,离心 15 min,将上清液转移至无 RNase 离心管中,测定并记录上清液体积,用于后续 RNA 提取。

5.2.2 硬质表面食品

5.2.2.1 将无菌棉拭子使用 PBS 湿润后,用力擦拭食品表面(如胡萝卜、瓜、坚果,50 cm²≤擦拭面积≤100 cm²),记录擦拭面积。将 10 μL 过程控制病毒添加至该棉拭子。如果食品表面过于粗糙,可能会损坏棉拭子,可使用多个棉拭子,但只需在其中一个棉拭子上添加过程控制病毒。

5.2.2.2 将棉拭子浸入含 490 μL PBS 试管中,紧贴试管一侧挤压出液体。如此重复浸入和挤压 3 次~4 次,确保挤压出大量的病毒,测定并记录液体体积,用于后续 RNA 提取。

5.2.3 贝类

5.2.3.1 戴上防护手套,使用无菌贝类剥刀打开至少 10 个贝类样本。

5.2.3.2 使用无菌剪刀、无菌镊子或其他等效器具在橡胶垫上解剖贝类样本,取出贝类消化腺,置于无菌培养皿中。收集 2 g 贝类消化腺。

5.2.3.3 使用研钵或等效均质器将贝类消化腺匀浆后,转移至离心管。加入 10 μL 过程控制病毒。加入 2.0 mL 蛋白酶 K 溶液,混匀。

5.2.3.4 使用全温振荡器或等效装置,37℃,320 次/min,振荡 60 min。

5.2.3.5 将离心管放入水浴或等效装置,60℃,15 min。随后,3 000×g,室温,离心 5 min,将上清液转移至无 RNase 离心管中,测定并记录上清液体积,用于后续 RNA 提取。

5.2.4 包装饮用水

5.2.4.1 取包装饮用水样品(≤1 000 mL),加入 10 μL 过程控制病毒,振荡混匀。

5.2.4.2 向样品中加入一定质量的氯化镁(例如每升包装饮用水中加入 4.76 g 氯化镁),充分溶解并混匀,使 Mg²⁺ 终浓度为 0.05 mol/L。

5.2.4.3 用 6 mol/L 盐酸调节水样 pH 至 3.0。

5.2.4.4 用无菌镊子夹取混合纤维素膜(孔径 0.45 μm , 直径 47 mm), 置于过滤瓶上, 进行抽滤, 使所有水样全部通过混合纤维素膜。

5.2.4.5 用无菌镊子取出混合纤维素膜, 用无菌剪刀将滤膜剪碎, 放入 50 mL 离心管中, 加入 15 mL TGBE 缓冲液, 以 400 次/min, 室温振荡 30 min。

5.2.4.6 将离心管中的提取液全部转移至另外一个无菌的 50 mL 离心管中。

5.2.4.7 用 6 mol/L 盐酸调节提取液的 pH 至 7.0, 并将提取液全部转移至超滤浓缩离心管中。

5.2.4.8 $5\,000\times g$, 室温, 离心 15 min。随后, 将浓缩管中的提取液转移至一个无 RNase 离心管中, 测定并记录提取液的体积, 用于后续 RNA 提取。

5.3 病毒 RNA 提取和纯化

注: 病毒 RNA 可手工提取和纯化, 也可使用等效商品化病毒 RNA 提取试剂盒进行提取和纯化。病毒 RNA 提取完成后, 为延长 RNA 保存时间可选择性加入 RNase 抑制剂。操作过程中应佩戴一次性橡胶或乳胶手套, 并经常更换。提取出来的 RNA 可立即进行检测, 或在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存不超过 8 h, 或在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存不超过 30 d。

5.3.1 病毒裂解

将全部病毒提取液加入离心管, 加入等体积的 Trizol 试剂, 混匀, 剧烈涡旋振荡 1 min (大约 1 800 r/min), 室温放置 5 min, 加入 0.2 倍体积三氯甲烷, 涡旋混匀 30 s (不能过于剧烈, 以免产生乳化层, 也可用手颠倒混匀), $12\,000\times g$, 离心 5 min, 上层水相移入新的无 RNase 离心管中, 避免吸出中间层。

5.3.2 病毒 RNA 提取

向离心管中加入等体积异丙醇, 颠倒混匀, 室温放置 5 min, $12\,000\times g$, 室温, 离心 5 min, 弃上清, 倒置于吸水纸上, 沾干液体 (不同样品应用不同独立的吸水纸沾干), 防止交叉污染。

5.3.3 病毒 RNA 纯化

5.3.3.1 加入 1 mL 75% 乙醇, 颠倒洗涤 RNA 沉淀, $12\,000\times g$, 4 $^{\circ}\text{C}$, 离心 10 min, 小心弃上清。

5.3.3.2 重复加入 1 mL 75% 乙醇, 颠倒洗涤 RNA 沉淀, $12\,000\times g$, 4 $^{\circ}\text{C}$, 离心 10 min, 小心弃上清, 然后将离心管倒置于吸水纸上, 沾干液体 (不同样品应用不同独立的吸水纸沾干), 防止交叉污染。或用微量移液器将其吸干, 一份样本换用一个吸头, 吸头不要碰到沉淀物, 室温干燥 3 min, 不能过于干燥, 以免 RNA 不溶于水。

5.3.3.3 加入 50 μL 无 RNase 超纯水, 轻轻混匀, 溶解沉淀至离心管底部的 RNA, $2\,000\times g$, 室温, 离心 5 s, 冰上保存备用。

5.4 质量控制

5.4.1 空白对照

以无 RNase 超纯水作为空白对照(A 反应孔)。

5.4.2 阴性对照

以未检出诸如病毒的同种类食品样本, 提取 RNA, 作为阴性对照(B 反应孔)。

5.4.3 阳性对照

以外加扩增控制 RNA, 作为阳性对照(J 反应孔)。

5.4.4 过程控制病毒

以样品中过程控制病毒的提取效率表示样品中诺如病毒的提取效率,作为病毒提取的过程控制。

5.4.4.1 将 10 μL 过程控制病毒原液(约为 10^{10} PFU/mL)按 5.3 步骤提取病毒 RNA,并纯化。

5.4.4.2 将提取和纯化的过程控制病毒 RNA 进行 10 倍梯度稀释(D~G 反应孔),加入过程控制病毒的引物和探针,采用附录 B 反应体系和参数,确定未稀释和梯度稀释的过程控制病毒 RNA 的 C_t 值。

5.4.4.3 以未稀释和梯度稀释的过程控制病毒 RNA 的浓度的 $\lg$ 值为 X 轴,以对应的 C_t 值为 Y 轴,绘制标准曲线;要求标准曲线 $r^2 \geq 0.98$ 。将未稀释的过程控制病毒 RNA 浓度设置为 1,经过 10 倍梯度稀释的过程控制病毒 RNA 浓度分别为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 等。

5.4.4.4 将含过程控制病毒的食品样品 RNA(C 反应孔),加入过程控制病毒引物和探针,采用附录 B 反应体系和参数,确定 C_t 值,代入标准曲线,计算经过病毒提取等步骤后的过程控制病毒 RNA 浓度。

5.4.4.5 计算提取效率。提取效率=经病毒提取等步骤后的过程控制病毒 RNA 浓度 $\times 100\%$,即(C 反应孔) C_t 值对应浓度 $\times 100\%$ 。

5.4.5 外加扩增控制

通过外加扩增控制 RNA,计算扩增抑制指数,作为扩增控制。

5.4.5.1 将外加扩增控制 RNA(10^5 copies/ μL ~ 10^6 copies/ μL)分别加入含过程控制病毒食品样品 RNA(H 反应孔)、10 倍稀释的含过程控制病毒食品样品 RNA(I 反应孔)、无 RNase 超纯水(J 反应孔)中,同时加入 G I 或 G II 基因组的引物和探针,采用附录 B 反应体系和参数,进行实时荧光 RT-PCR 反应,确定 C_t 值。

5.4.5.2 计算扩增抑制指数。扩增抑制指数= C_t 值(含过程控制病毒食品样品 RNA+外加扩增控制 RNA)- C_t 值(无 RNase 超纯水+外加扩增控制 RNA),即扩增抑制指数= C_t 值(H 反应孔)- C_t 值(J 反应孔)。如抑制指数 ≥ 2.00 ,需比较经过 10 倍稀释的食品样品 RNA 的扩增抑制指数,即扩增抑制指数= C_t 值(I 反应孔)- C_t 值(J 反应孔)。

5.5 实时荧光 RT-PCR

实时荧光 RT-PCR 反应体系和反应参数详见附录 B。反应体系中各试剂的加入量可根据具体情况或不同的反应总体积进行适当调整。可采用商业化试剂盒,按照试剂盒的说明书进行操作。也可增加或调整反应孔,实现 1 次反应完成诺如病毒 G I 和 G II 基因组的独立检测。首先配制荧光 RT-PCR 反应的预混液,按照附录 B 中表 B.1 的顺序及加样量,依次将 RT-PCR 缓冲液、 MgSO_4 、dNTPs、逆转录酶、DNA 聚合酶和无 RNase 超纯水进行混合,制备成荧光 RT-PCR 反应预混液。将反应预混液分别添加至不同反应孔(15.88 μL /孔),再向每个反应孔加入下述物质,分别检测 G I 或 G II 基因组的诺如病毒以及过程控制病毒和计算扩增抑制指数。

A 反应孔:空白对照,加入 5.0 μL 无 RNase 超纯水+4.12 μL G I 或 G II 基因组的诺如病毒引物和探针;

B 反应孔:阴性对照,加入 5.0 μL 阴性对照样品 RNA+4.12 μL G I 或 G II 基因组的诺如病毒引物和探针;

C 反应孔:加入 5.0 μL 含过程控制病毒食品样品 RNA+4.12 μL 过程控制病毒引物和探针;

D 反应孔:加入 5.0 μL 过程控制病毒 RNA+4.12 μL 过程控制病毒引物和探针;

E 反应孔:加入 5.0 μL 10 倍稀释的过程控制病毒 RNA+4.12 μL 过程控制病毒引物和探针;

F 反应孔:加入 5.0 μL 100 倍稀释的过程控制病毒 RNA+4.12 μL 过程控制病毒引物和探针;

G 反应孔:加入 5.0 μL 1 000 倍稀释的过程控制病毒 RNA+4.12 μL 过程控制病毒引物和探针;

H 反应孔:扩增控制 1,加入 5.0 μL 含过程控制病毒食品样品 RNA+1.0 μL 外加扩增控制 RNA+

4.12 μL G I 或 G II 基因组的诺如病毒引物和探针；

I 反应孔：扩增控制 2，加入 5.0 μL 10 倍稀释的含过程控制病毒食品样品 RNA+1.0 μL 外加扩增控制 RNA+4.12 μL G I 或 G II 基因组的诺如病毒引物和探针；

J 反应孔：扩增控制 3/阳性对照，加入 5.0 μL 无 RNase 超纯水+1.0 μL 外加扩增控制 RNA+4.12 μL G I 或 G II 基因组的诺如病毒引物和探针；

K 反应孔：样品 1，加入 5.0 μL 含过程控制病毒食品样品 RNA+4.12 μL G I 或 G II 基因组的诺如病毒引物和探针；

L 反应孔：样品 2，加入 5.0 μL 10 倍稀释的含过程控制病毒食品样品 RNA+4.12 μL G I 或 G II 基因组的诺如病毒引物和探针。

6 结果与报告

6.1 检验有效性判定

6.1.1 需满足以下质量控制要求，检验结果方有效：空白对照阴性(A 反应孔)、阴性对照阴性(B 反应孔)、阳性对照阳性(J 反应孔)。

6.1.2 过程控制(C~G 反应孔)需满足：过程控制病毒提取效率 $\geq 1\%$ ；如果提取效率 $< 1\%$ ，需重新检测；如果提取效率 $< 1\%$ ，诺如病毒检测结果为阳性，判定为检测结果有效。

6.1.3 扩增控制(H~J 反应孔)需满足：扩增抑制指数 < 2.00 ；如果扩增抑制指数 ≥ 2.00 ，需比较 10 倍稀释食品样品 RNA 的扩增抑制指数；如果 10 倍稀释食品样品 RNA 的扩增抑制指数 < 2.00 ，则扩增有效，且需采用 10 倍稀释食品样品 RNA 的 Ct 值作为检测结果；如果 10 倍稀释食品样品 RNA 的扩增抑制指数 ≥ 2.00 ，扩增无效，需要重新检测；如果 10 倍稀释食品样品 RNA 的扩增抑制指数 ≥ 2.00 ，诺如病毒检测结果为阳性，判定为检测结果有效。

6.2 结果判定

待测样品(K 反应孔或 L 反应孔)Ct 值 ≥ 45 时，判定诺如病毒 G I 或 G II 基因组检测结果阴性；待测样品(K 反应孔或 L 反应孔)Ct 值 ≤ 38 时，判定诺如病毒 G I 或 G II 基因组检测结果阳性；待测样品(K 反应孔或 L 反应孔)Ct 值 $38 < \text{Ct} < 45$ 时，应重复检测；重复检测结果 Ct 值 ≥ 45 时，判定诺如病毒 G I 或 G II 基因组检测结果阴性；重复检测结果 Ct 值 < 45 时，判定诺如病毒 G I 或 G II 基因组检测结果阳性。

样品平行处理的检测结果，只要其中一个结果为阳性，则判定该样品诺如病毒 G I 或 G II 基因组检测结果阳性。

6.3 结果报告

根据检测结果，报告“ $\times\times\text{ g}(\times\times\text{ mL}$ 或 $\times\times\text{ cm}^2)$ 样品检出诺如病毒基因”或“ $\times\times\text{ g}(\times\times\text{ mL}$ 或 $\times\times\text{ cm}^2)$ 样品未检出诺如病毒基因”。

7 其他

生物安全措施按 GB 19489 规定的要求严格执行。

附 录 A

实时荧光 RT-PCR 引物和探针

G I 和 G II 基因组诺如病毒实时荧光 RT-PCR 引物和探针见表 A.1。

表 A.1 G I 和 G II 基因组诺如病毒实时荧光 RT-PCR 引物和探针^a

病毒名称	序列	扩增产物长度 bp	序列位置
诺如病毒 G I 基因组	QNIF4(上游引物):5'-CGCTGGATGCGNTTCCAT-3'; NV1LCR(下游引物):5'-CCTTAGACGCCATCATCATTTAC -3'; NVGG1p(探针):5'-FAM-TGGACAGGAGAYCGCRATCT-TAMRA-3'; 或 TM9(探针):5'-FAM-TGGACAGGAGATCGC-MGBNFQ-3' ^{b,c}	86	位于诺如病毒 (GenBank 登录 号 M87661.2)的 5 291~5 376
诺如病毒 G II 基因组	QNIF2(上游引物):5'-ATGTTTCAGRTGGATGAGRTTCTCWGA-3'; COG2R(下游引物):5'-TCGACGCCATCTTCATTACACA-3'; QNIFs(探针):5'-FAM-AGCACGTGGGAGGGCGATCG-TAMRA-3' ^c	89	位于诺如病毒 (GenBank 登录 号 X86557.1)的 5 012~5 100
^a 序列中 N 为(A,G,C,T),Y 为(C,T),R 为(A,G),W 为(A,T)。 ^b 在对诺如病毒 G I 进行单重检测时,可选择 NVGG1p 或 TM9 任何一条探针;在对诺如病毒 G I 和 G II 多重检测时,选择 TM9 探针。 ^c 对诺如病毒进行多重检测时,TM9(探针)和 QNIFs(探针)的 5'端需要标记不同的荧光基团,例如:TM9(探针)的 5'端可以标记 HEX 荧光基团,3'端标记 MGBNFQ 淬灭基团;QNIFs(探针)的 5'端标记 FAM 荧光基团,3'端标记 BHQ1 淬灭基团。			

附 录 B

实时荧光 RT-PCR 的反应体系和参数

B.1 实时荧光 RT-PCR 反应体系见表 B.1。

表 B.1 实时荧光 RT-PCR 反应体系

名称	储存液浓度	终浓度	加样量/ μL		
			G I ^a	G II ^b	过程控制病毒 ^c
RT-PCR 缓冲溶液	5×	1×	5.00	5.00	5.00
MgSO ₄	25 mmol/L	1 mmol/L	1.00	1.00	1.00
dNTPs	10 mmol/L	0.2 mmol/L	0.50	0.50	0.50
上游引物	10 $\mu\text{mol/L}$	0.5 $\mu\text{mol/L}$	1.25	1.25	1.25
下游引物	10 $\mu\text{mol/L}$	0.9 $\mu\text{mol/L}$	2.25	2.25	2.25
逆转录酶	5 U/ μL	0.1 U/ μL	0.50	0.50	0.50
DNA 聚合酶	5 U/ μL	0.1 U/ μL	0.50	0.50	0.50
探针	10 $\mu\text{mol/L}$	0.25 $\mu\text{mol/L}$	0.62	0.62	0.62
RNA 模板	—	—	5.00	5.00	5.00
水(无 RNase)	—	—	8.38	8.38	8.38
总体积	—	—	25.00	25.00	25.00
^a 如果检测 G I, 则上游引物为 QNIF4, 下游引物为 NV1LCR, 探针为 NVGG1p 或 TM9。 ^b 如果检测 G II, 则上游引物为 QNIF2, 下游引物为 COG2R, 探针为 QNIFs。 ^c 如果检测过程控制病毒, 则上游引物为 Mengo110 或者 MS2-TM3F, 下游引物为 Mengo209 或者 MS2-TM3R, 探针为 Mengo147 或者 MS2-TM2P。					

B.2 实时荧光 RT-PCR 反应参数见表 B.2。

表 B.2 实时荧光 RT-PCR 反应参数

步骤		温度和时间	循环数
逆转录		55 °C ^a , 1 h	1
预变性		95 °C, 5 min	1
扩增	变性	95 °C, 15 s	45
	退火延伸	60 °C, 1 min	
		65 °C, 1 min, 收集荧光信号	
^a 逆转录温度和时间应根据使用的逆转录酶最适反应条件决定。			

附录 C

过程控制病毒培养及引物和探针

C.1 门哥病毒

C.1.1 概要

本标准使用门哥病毒作为过程控制病毒进行过程控制,也可使用大肠埃希氏菌噬菌体 MS2 或其他等效、不与诺如病毒存在交叉反应的病毒。门哥病毒是小核糖核酸病毒科的鼠病毒。门哥病毒株 MC₀ (ATCC® VR-1597™) 是一种重组病毒,与野生型门哥病毒相比缺乏 poly[C],是与野生型门哥病毒具有相似生长特性的无毒表型。门哥病毒株 MC₀ 是一种转基因生物,如果实验室不允许使用转基因生物,可以使用其他的过程控制病毒。也可以使用商业化试剂或试剂盒中的门哥病毒作为过程控制病毒。

C.1.2 试剂与耗材

C.1.2.1 HeLa 细胞培养液

推荐使用含有 2 mmol/L L-谷氨酸的 Eagle 基础培养液 (Eagle's minimum essential medium, MEM) 培养 HeLa 细胞,并将培养液中碳酸氢钠的终含量调整为 1.5 g/L,非必需氨基酸的终浓度调整为 0.1 mmol/L,丙酮酸钠的终浓度调整为 1.0 mmol/L。向培养液中加入胎牛血清,使胎牛血清终含量为 100 mL/L(胎牛血清/培养液)(细胞生长液)或 20 mL/L(胎牛血清/培养液)(细胞维持液)。

C.1.2.2 耗材

细胞培养所需耗材(例如细胞培养瓶)等。

C.1.3 仪器

二氧化碳(CO₂)浓度可调节的恒温培养箱。

倒置显微镜。

C.1.4 培养过程

将门哥病毒加入铺满 80%~90% 的单层 HeLa(ATCC CCL-2™) 细胞的细胞培养瓶中,置于 5% 浓度的二氧化碳恒温培养箱中,37 °C 进行培养,直至细胞培养瓶中有 75% 的 HeLa 细胞出现细胞病变效应。将细胞培养瓶经过一个冻融循环,然后取出培养液,3 000×g 离心 10 min,将上清液冻存于-80 °C 冰箱,用于诺如病毒检验方法的过程控制。

C.1.5 引物和探针

门哥病毒实时荧光 RT-PCR 的引物和探针见表 C.1。采用其他等效的过程控制病毒,需对应调整引物和探针。

表 C.1 门哥病毒实时荧光 RT-PCR 的引物和探针

病毒名称	序列	扩增产物长度 bp	序列位置
门哥病毒	Mengo110(上游引物):5'-GCGGGTCCTGCCGAAAGT-3' Mengo209(下游引物):5'-GAAGTAACATATAGACAGACGCACAC -3' Mengo147(探针):5'-FAM-ATCACATTACTGGCCGAAGC -MGBNFQ-3'	100	位于门哥病毒缺失毒株 MC ₀ 的 110~209,相当于门哥病毒非缺失毒株 M (GenBank 登录号 L22089.1) 的序列 110~270

C.2 大肠埃希氏菌噬菌体 MS2

C.2.1 概要

本标准采用的大肠埃希氏菌噬菌体 MS2 属于单链 RNA 轻小噬菌体科,直径约 26 nm,正二十面体结构,直径与肠道病毒相当。大肠埃希氏菌噬菌体 MS2 对宿主具有高度的特异性,仅感染大肠埃希氏菌,是 RNA 病毒检测理想的质控物质,成为理想的人类致病病毒替代物。如果实验室不能培养大肠埃希氏菌噬菌体 MS2,也可以使用商业化试剂或试剂盒中的大肠埃希氏菌噬菌体 MS2 作为过程控制病毒。

C.2.2 试剂与耗材

C.2.2.1 菌株和大肠埃希氏菌噬菌体 MS2

大肠埃希氏菌噬菌体 MS2(ATCC15597-B1™) 及其宿主细菌 *E. coli* (ATCC 15597),或等效的大肠埃希氏菌噬菌体 MS2 和等效菌株。

C.2.2.2 试剂

细菌培养所需试剂(例如 LB 增菌液、TSA-YE 培养基等)

C.2.2.3 耗材

细菌培养所需耗材(例如无菌培养皿)等。

C.2.3 仪器

恒温培养箱、全温振荡器。

C.2.4 培养过程

C.2.4.1 宿主菌的制备

用接种环挑取一环宿主菌 *E. coli* (ATCC 15597 或等效菌株)接种在 TSA-YE 平板上,36℃±1℃过夜培养;随后,挑取单个菌落至 10 mL LB 增菌液中,36℃±1℃,培养过夜。

C.2.4.2 大肠埃希氏菌噬菌体 MS2 制备

C.2.4.2.1 将 C.2.4.1 制备的含宿主菌的 LB 增菌液按照 0.5% (体积分数) 接种到新的 LB 增菌液中, 36℃±1℃, 150 次/min 振荡培养 4 h~5 h, 然后, 按 0.5%~1% (体积分数) 将噬菌体 (10⁸ PFU/mL~10⁹ PFU/mL) 接种到上述含有宿主菌的增菌液中。

C.2.4.2.2 将接种噬菌体的宿主菌增菌液在 36℃±1℃, 150 次/min 振荡培养 5 h 或静置过夜。按照增菌液体积的 2% 加入三氯甲烷, 200 次/min 振荡 10 min, 随后, 将增菌液 10 000×g 离心 10 min, 收集上清液, 用孔径为 0.45 μm 的滤膜过滤, 即得纯化的大肠埃希氏菌噬菌体 MS2, 分装于 5 mL 冻存管, -80℃ 保存。

C.2.5 引物和探针

大肠埃希氏菌噬菌体 MS2 实时荧光 RT-PCR 的引物和探针见表 C.2。采用其他等效的过程控制病毒, 需对应调整引物和探针。

表 C.2 大肠埃希氏菌噬菌体 MS2 实时荧光 RT-PCR 引物和探针

病毒名称	序列	扩增产物长度 bp	序列位置
大肠埃希氏菌噬菌体 MS2	MS2-TM3F(上游引物): 5'-GGCTGCTCGCGGATACCC-3' MS2-TM3R(下游引物): 5'-TGAGGGAATGTGGGAACCG-3' MS2-TM2P(探针): 5'-FAM-ACCTCGGGTTTCCGTCTTGCTCGT-BHQ1-3'	202	位于大肠埃希氏菌噬菌体 MS2 病毒株 (GenBank 登录号 JF719743.1) 的序列 3 135-3 336

附录 D

外加扩增控制 RNA 制备

D.1 概要

将目标 DNA 序列连接至合适的质粒载体上,确保目标序列位于质粒载体 RNA 聚合酶启动子序列的下游。然后将含有目标序列的质粒线性化,再将线性化质粒加入体外 RNA 转录反应试剂中,从而制备外加扩增控制 RNA。G I 基因组外加扩增控制 RNA 的目标序列位于诺如病毒(GenBank 登录号 M87661.2)的 5 291 bp~5 376 bp 之间。G II 基因组外加扩增控制 RNA 的目标序列位于诺如病毒(GenBank 登录号 X86557.1)的 5 012 bp~5 100 bp 之间。

D.2 试剂与耗材

D.2.1 DNA 连接酶及缓冲液:用于 DNA 连接及相关的缓冲液。

D.2.2 限制性内切酶及缓冲液:用于制备线性化质粒。

D.2.3 DNA 纯化试剂。

D.2.4 体外 RNA 转录试剂(RNA 聚合酶、dNTPs、缓冲液等)。

D.2.5 无 RNase 的 DNase。

D.2.6 RNA 纯化试剂。

D.2.7 DNA 凝胶电泳相关试剂。

D.3 仪器

D.3.1 DNA 凝胶电泳仪。

D.3.2 培养箱:37℃。

D.4 质粒 DNA 连接

合成诺如病毒 G I 或者 G II 的目标序列并进行纯化。将 100 ng~500 ng 经过纯化的目标 DNA 和质粒载体加入含有合适的 DNA 连接酶及缓冲液的反应体系中,连接质粒和目标序列,并确保目标序列位于质粒载体 RNA 聚合酶启动子序列的下游。37℃孵育 120 min。使用凝胶电泳检查 DNA 与质粒的连接情况。

D.5 外加扩增控制 RNA 的制备

使用合适的限制性内切酶将质粒切开(酶切位点位于目标序列的下游),获得携带诺如病毒 G I 或者 G II 目标序列的线性化质粒。将 1 μg 经过纯化的线性化质粒 DNA 加入体外 RNA 转录反应试剂中。37℃孵育 120 min。然后,向反应液中添加无 RNase 的 DNase,并在 37℃下孵育 15 min。使用 RNA 纯化试剂盒纯化 RNA,然后分装,-80℃储存,实验前取出备用。

注:逆转录温度应根据使用的逆转录酶的最适使用温度决定。可使用等效的商业化检测试剂盒中的外加扩增控制 RNA 储备液,或请符合要求的合格供应商代为制备。

附录 E

RNase 的去除和无 RNase 溶液的配制

配制溶液用的酒精、异丙醇等应采用未开封的新品。配制溶液用的超纯水、玻璃容器、移液器吸头、药匙等用具应无 RNase。操作过程应始终佩戴一次性乳胶手套,并经常更换,以避免 RNase 污染用具或带入溶液。

E.1 RNase 的去除

E.1.1 玻璃容器应在 240 °C 烘烤 4 h,去除 RNase。

E.1.2 离心管、移液器吸头、药匙等耗材使用 DEPC 水(0.1%,体积分数)室温浸泡过夜,然后灭菌,烘干;或直接购买无 RNase 的相应耗材。

E.2 无 RNase 溶液的配制

E.2.1 无 RNase 超纯水

E.2.1.1 成分

超纯水	100 mL
焦碳酸二乙酯(DEPC)	100 μ L

E.2.1.2 制法

室温过夜,121 °C,15 min 灭菌,或直接购买无 RNase 超纯水。

E.2.2 Tris/甘氨酸/牛肉膏(TGBE)缓冲液

E.2.2.1 成分

三(羟基甲基)氨基甲烷($C_4H_{11}NO_3$)	12.1 g
甘氨酸($C_2H_5NO_2$)	3.8 g
牛肉膏	10.0 g
无 RNase 超纯水	定容至 1 000.0 mL

E.2.2.2 制法

将固体物质溶解于 900.0 mL 无 RNase 超纯水中,室温,调节 pH 至 9.5。然后,用无 RNase 超纯水定容至 1 000.0 mL,高压灭菌。

E.2.3 5×PEG/NaCl 溶液

E.2.3.1 成分

聚乙二醇(PEG)8 000	500.0 g
氯化钠(NaCl)	87.0 g
无 RNase 超纯水	定容至 1 000.0 mL

E.2.3.2 制法

将固体物质溶解于 450.0 mL 无 RNase 超纯水中,可缓慢加热,待固体物质完全溶解后,用无

RNase 超纯水定容至 1 000.0 mL,充分混匀,高压灭菌后备用。

E.2.4 磷酸盐缓冲液(PBS)

E.2.4.1 成分

氯化钠(NaCl)	8.00 g
氯化钾(KCl)	0.20 g
磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	1.15 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.20 g
无 RNase 超纯水	定容至 1 000.0 mL

E.2.4.2 制法

将固体物质溶解于 900.0 mL 无 RNase 超纯水中,室温,调节 pH 至 7.3,然后用无 RNase 超纯水定容至 1 000.0 mL,高压灭菌后备用。

E.2.5 三氯甲烷/正丁醇混合液

E.2.5.1 成分

三氯甲烷(CHCl_3)	10.0 mL
正丁醇[$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{OH}$]	10.0 mL

E.2.5.2 制法

将上述组分充分混匀。

E.2.6 蛋白酶 K 溶液

E.2.6.1 成分

蛋白酶 K(30 U/mg)	20.0 mg
无 RNase 超纯水	定容至 200.0 mL

E.2.6.2 制法

将蛋白酶 K 充分溶于 150.0 mL 无 RNase 超纯水中,然后用无 RNase 超纯水定容至 200.0 mL。分装,−20 ℃ 保存,最多可存放 6 个月。一旦解冻使用,4 ℃ 保存,可在 1 周内使用。

E.2.7 75%乙醇

E.2.7.1 成分

无水乙醇($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$)	7.5 mL
无 RNase 超纯水	2.5 mL

E.2.7.2 制法

7.5 mL 无水乙醇中加入 2.5 mL 无 RNase 超纯水,充分混匀,现配现用。

E.2.8 Trizol 试剂

E.2.8.1 成分

异硫氰酸胍($\text{C}_2\text{H}_6\text{N}_4\text{S}$)	250.0 g
---	---------

0.75 mol/L 柠檬酸钠($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$)溶液($\text{pH} \geq 7$)	17.6 mL
10% 十二烷基肌氨酸钠($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{NO}_4\text{Na}$)溶液	26.4 mL
2 mol/L 醋酸钠(CH_3COONa)溶液($\text{pH} \geq 4$)	50.0 mL
无 RNase 超纯水	293.0 mL
重蒸苯酚($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$)	500.0 mL

E.2.8.2 制法

在 2 000 mL 的烧杯中加入无 RNase 超纯水,然后依次加入异硫氰酸胍、0.75 mol/L 柠檬酸钠溶液、10% 十二烷基肌氨酸钠溶液、2 mol/L 醋酸钠溶液,混合均匀;然后加入重蒸苯酚,充分混匀。Trizol 试剂需 4 ℃ 低温保存,保质期约 1 年。也可使用商业化的试剂。

E.2.9 6 mol/L 盐酸溶液

E.2.9.1 成分

浓盐酸(HCl)	10.0 mL
无 RNase 超纯水	10.0 mL

E.2.9.2 制法

将 10 mL 浓盐酸缓慢加入 10 mL 无 RNase 超纯水中,充分混匀。

E.2.10 1 mol/L 氢氧化钠溶液

E.2.10.1 成分

氢氧化钠(NaOH)	40.0 g
无 RNase 超纯水	定容至 1 000.0 mL

E.2.10.2 制法

将 40.0 g 氢氧化钠固体粉末溶于 900.0 mL 无 RNase 超纯水中,充分混匀,然后用无 RNase 超纯水定容至 1 000.0 mL。