

## 实验技术与方法

## 从生食鱼肉中提取 GII 型诺如病毒的不同方法的比较

范一灵,杨美成,杨燕

(上海市食品药品检验所,上海 201203)

**摘要:**目的 本研究比较了多种可能适用于生食水产鱼肉中诺如病毒(NoV)的提取方法。方法 人工污染 GII 型 NoV 三文鱼肉样品,通过病毒洗脱、浓缩、核酸提取,以及实时荧光定量反转录-聚合酶链式反应(RT-qPCR)检测等步骤的比较和优化,提高样品中 NoV 的检测成功率和回收率。结果 采用 Tri/Glycine/Beef extract 缓冲溶液洗脱、PEG/NaCl 溶液沉降、增加氯仿-正丁醇(1:1, V/V)溶液萃取等步骤,可以有效富集样品中的 NoV,并有效去除样品中的 PCR 抑制成分。优化后的检测方案可以将人工污染 GII 型 NoV 的鱼肉样品的回收率由不足 3% 提高至 15.15%,检测灵敏度可以达到 17.3 RT-PCR/25 g。结论 优化后的病毒提取方法具有良好的耐用性和重现性,适合于生食水产鱼肉中 NoV 的快速检测。

**关键词:**诺如病毒;提取;鱼肉;生食;水产品;实时荧光定量反转录 PCR;回收率;检测

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2016)06-0753-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2016.06.014

## Comparison of different methods for extracting GII norovirus from raw fish

FAN Yi-ling, YANG Mei-cheng, YANG Yan

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

**Abstract: Objective** This study was aimed to compare several potentially reliable extraction methods for norovirus (NoV) in ready-to-eat raw fish meat. **Methods** Several methods of viral elution, viral concentration, RNA extraction and real-time reverse-transcription quantitative PCR (RT-qPCR) were compared and optimized by artificial contaminated NoV type GII in raw salmon sashimi, in order to improve the NoV detection. **Results** It was shown that viral particles could be well extracted and PCR inhibitors could be eliminated by a combination elution of Tri/Glycine/Beef extract solution, PEG/NaCl precipitation and chloroform-butanol (1:1, V/V) extraction. In addition, the optimized extraction and detection method in this study could increase the average recovery rate of NoV type GII from no more than 3% to 15.15% in ready-to-eat raw fish meat, and the detection sensitivity was 17.3 RT-PCR/25 g. **Conclusion** This optimal method has a better performance in repeatability and reproducibility, and it is suitable for rapid detection of NoV in ready-to-eat raw fish meat.

**Key words:** Norovirus; extraction; fish meat; ready-to-eat raw; seafood; real-time reverse-transcription quantitative PCR; recovery rate; detection

诺如病毒(norovirus, NoV)是杯状病毒科的一员,在世界范围内是引发非细菌性腹泻的最主要原因之一<sup>[1-3]</sup>,有 68%~80% 的肠道疾病暴发是由 NoV 感染造成的<sup>[4-5]</sup>。贝类可以在其部分器官内富集 NoV,食用携带 NoV 的贝类是引起病毒感和暴发的主要途径<sup>[6-8]</sup>。此外,生食水产品 and 半加工水产制品因不当的处理方式和交叉污染,往往也是引发 NoV 感染的途径之一<sup>[9-10]</sup>。生食水产鱼类,尤其是三文鱼(*Salmonidae* spp.)是生食水产品中消费量较大的品种,在亚洲经常作为刺身和寿司的原料<sup>[11]</sup>,在加工过程中有可能会被 NoV 污染,并最终

通过直接食用进入人体引发食源性疾病。

目前,实时荧光定量反转录-聚合酶链式反应(real-time reverse-transcription quantitative PCR, RT-qPCR)是检测 NoV 最有效、最灵敏的检测技术之一,已被广泛用于粪便中 NoV 的检测<sup>[12-16]</sup>。在食品检测领域,由于非贝类食品中污染 NoV 量少,食品基质成分复杂影响后续检测体系,使得病毒检测回收率较低<sup>[17]</sup>。即使经过纯化步骤,PCR 抑制剂的影响仍较为明显。现有检验检疫行业标准中对非贝类食品中 NoV 的收集仅通过高速离心沉降的方式,病毒颗粒的洗脱和分离效率差,这使得采用该方法检测 NoV 的检出率较低,存在大量假阴性结果<sup>[18-21]</sup>。未见有对含有丰富脂类和蛋白质的生食鱼类产品中进行 NoV 检测方法的相关研究。

收稿日期:2016-08-11

作者简介:范一灵 男 主管药师 研究方向为食品和药品的微生物检验和方法 E-mail:tcfyl@163.com

因此,本试验以被 GII 型 NoV 人工污染的生食三文鱼肉为研究对象,分析不同的病毒前处理方法、病毒富集方法和 RT-qPCR 检测方法对 NoV 检测和回收率的影响。通过优化检测流程,提高 NoV 在生水产品尤其是鱼肉样品中的检测成功率和回收率。为在国家食品安全风险监测中 NoV 的检测和分析提供有效的技术分析手段。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要仪器与试剂

ABI 7500 荧光定量 PCR 仪(美国 Life Technology)、低温离心机、振荡培养箱。标准化的冻干 GII 型 NoV 质控品(SNoV)由中国食品药品检定研究院制备并提供。每份 SNoV 中约含有 GII 型 NoV 颗粒  $2.7 \times 10^3$  RT-PCR 单位。Tris-甘氨酸牛肉膏缓冲液[TGBE, pH = (9.5 ± 0.2)]、PEG 8000 均购自美国 Sigma-Aadrich, 氯仿、正丁醇均为分析纯试剂。试剂按 ISO/TS 15216-1:2013<sup>[14]</sup> 的要求制备。病毒 RNA 提取采用 High pure viral RNA kit 试剂盒

(美国 Roche)和 QIAamp viral RNA mini kit 试剂盒(德国 Qiagen)。RT-qPCR 采用 LightMix Kit Norovirus GGI-GGII 试剂盒(美国 Roche)和 RNA Ultra sense One Step qRT-PCR System 试剂盒(美国 Life Technology)。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 样品制备

将一份 SNoV 溶解于 200 μl 焦碳酸二乙酯(DEPC)处理过的纯水中,加入已剪碎的 25 g 市售新鲜三文鱼肉块(约 2.5 cm × 2.5 cm × 2.5 cm 大小),混合均匀,制成含有 GII 型 NoV 的人工污染鱼肉样品。

#### 1.2.2 不同的病毒洗脱和富集方法

在检测人工污染样品的基础上,比较 3 种不同的 NoV 洗脱和富集方法(图 1)。以未加入 SNoV 的空白三文鱼肉样品为检测过程的阴性对照。在试验过程中,将 SNoV 溶解于 200 μl DEPC 处理过的纯水中作为检测过程的阳性对照(不含三文鱼肉),用以反映试验步骤和方法是否正常。

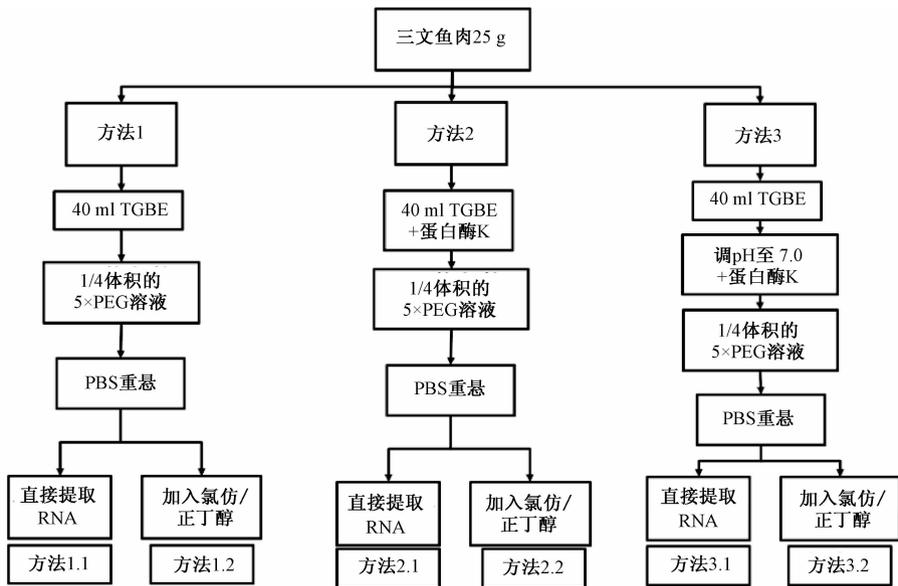


图 1 人工污染三文鱼样品中 GII 型 NoV 富集和提取方法汇总示意图

Figure 1 Overview of concentration and extraction methods of NoV GII tested on artificial contaminated salmon sashimi

#### 1.2.2.1 方法 1

方法 1.1:参考 ISO/TS 15216-1:2013 中针对水果和蔬菜的 NoV 检测方法<sup>[14]</sup>,洗脱并富集病毒颗粒,步骤简述如下:步骤 1:取样品 25 g,剪碎后放入带有滤网的无菌均质袋中,加入 40 ml TGBE 缓冲液,室温 60 r/min 震荡 20 min;步骤 2:取滤液至 50 ml 新的离心管中,于 4 °C 10 000 × g 离心 30 min,取上清液;步骤 3:在上述上清液中加入 1/4 倍体积的 5 × PEG/NaCl 溶液,震荡 60 s,于 4 °C 60 r/min 震荡 60 min,置于 4 °C 10 000 × g 离心 30 min。倒

掉上清,用 700 μl PBS 溶液充分重悬。静置后取液体部分用于提取病毒 RNA。

方法 1.2:另取人工污染三文鱼样品,按方法 1.1 制备后,加入等体积的氯仿-正丁醇(1:1, V/V)溶液萃取,充分振荡,置室温孵育 5 min,于 4 °C 10 000 × g 离心 15 min,取上层水相液体用于提取病毒 RNA。

#### 1.2.2.2 方法 2

方法 2.1:在 40 ml TGBE 缓冲液中加入 10 μl 20 mg/ml 的蛋白酶 K 溶液,再加入 25 g 剪碎后的三文鱼样品,于 37 °C 320 r/min 震荡 60 min,置于

60 ℃ 水浴 15 min, 按方法 1.1 操作至 PBS 溶液重悬。取液体部分用于提取病毒 RNA。

方法 2.2: 另取人工污染的三文鱼样品, 按方法 2.1 制备后, 加入等体积的氯仿-正丁醇 (1:1, V/V) 溶液萃取, 充分振荡, 置室温孵育 5 min, 于 4 ℃ 10 000 × g 离心 15 min, 取上层水相液体用于提取病毒 RNA。

### 1.2.2.3 方法 3

方法 3.1: 按方法 1.1 进行至 PEG/NaCl 沉降前, 用 1.0 mol/L HCl 调整溶液 pH 值至 (7.0 ± 0.5), 加入 10 μl 20 mg/ml 的蛋白酶 K 溶液, 于 37 ℃ 320 r/min 震荡 60 min, 置于 60 ℃ 水浴 15 min, 后续按方法 1.1 操作至 PBS 溶液重悬。取液体部分用于提取病毒 RNA。

方法 3.2: 另取人工污染的三文鱼样品, 按方法 3.1 制备后, 加入等体积的氯仿-正丁醇 (1:1, V/V) 溶液萃取, 充分振荡, 置室温孵育 5 min, 于 4 ℃ 10 000 × g 离心 15 min, 取上层水相液体用于提取病毒 RNA。

### 1.2.3 病毒 RNA 的分离纯化

取上述按方法 1.1 处理的含病毒液体 200 μl, 分别采用 High pure viral RNA kit 试剂盒和 QIAamp viral RNA mini kit 试剂盒提取病毒 RNA, 按厂家提供的试剂盒说明书操作。病毒 RNA 的提取效果通过 RT-qPCR 检测体系进行评价。

### 1.2.4 样品处理步骤对病毒回收的影响

按方法 1.1 分别对纯 SNoV 和人工污染 SNoV 的三文鱼样品进行处理, 并增加步骤 4: 将重悬液置于 4 ℃ 10 000 × g 再离心 15 min, 去除上清液, 用 700 μl PBS 重悬沉淀。从上述步骤 1 至步骤 4 中各取 200 μl 液体用于病毒 RNA 提取和 RT-qPCR 检测, 重复三次试验。回收率的计算公式如下:

$$\text{回收率}/\% = 2^{(Ct_{\text{纯}} - Ct_{\text{样}})} \times 100\%$$

其中,  $Ct_{\text{纯}}$  为 SNoV 质控品经过或未经过样品处理步骤, 采用 RT-qPCR 检测的  $Ct$  值;  $Ct_{\text{样}}$  为人工污染 SNoV 的三文鱼样品经过样品处理, 采用 RT-qPCR 检测的  $Ct$  值。

### 1.2.5 RT-qPCR 检测

分别采用两种 RT-qPCR 检测体系对试验中的病毒 RNA 进行检测。在每次 RT-qPCR 过程中均采用 SNoV 病毒提取的 RNA 以及 Roche RT-qPCR 检测体系中的 GII 型 NoV 病毒 DNA 标准品作为 RT-qPCR 扩增步骤的阳性对照, 以 DEPC 处理过的纯水作为 RT-qPCR 扩增步骤的阴性对照。

ISO RT-qPCR 检测体系: GII 型 NoV 的引物和探针由 Invitrogen 公司按 ISO/TS 15216-1: 2013 (附

录 C) 合成<sup>[14]</sup>。采用一步反转录扩增法 RT-qPCR 的 25 μl 反应体系为: 病毒 RNA 模板 5 μl, 上游引物 0.5 pmol/L, 下游引物 0.9 pmol/L, 探针 0.25 pmol/L, 50 × ROX 染料 0.5 μl, 预混液 (RNA Ultra sense One Step RT-qPCR System) 5 μl, 加无菌纯化水至 25 μl。反应程序为: 55 ℃ 反转录 15 min, 95 ℃ 变性 2 min, 55 个反应循环为 95 ℃ 变性 15 s, 60 ℃ 退火 1 min, 65 ℃ 延伸 1 min。

Roche RT-qPCR 检测体系: 采用一步检测法 LightMix Kit Norovirus GGI-GGII 试剂盒进行检测。反应体系为 25 μl, 其中除病毒 RNA 模板 5 μl 外, 所有 RT-qPCR 反应体系均取自 LightCycler 480 RNA Master Hydrolysis Probes 试剂盒, 并按厂家提供的说明书操作。反应程序为: 61 ℃ 反转录 3 min, 95 ℃ 变性 30 s, 55 个反应循环为 95 ℃ 变性 10 s, 56 ℃ 退火 24 s, 72 ℃ 延伸 5 s。试剂盒方法具有内标探针, 用以控制 RT-qPCR 的扩增过程。

### 1.2.6 方法灵敏度试验

将一份 SNoV 溶解于 200 μl DEPC 处理过的纯水中, 取 40 μl 加入到 160 μl DEPC 处理过的纯水中, 依次采用 5 倍稀释的方法, 再稀释 4 次。按人工污染的方法添加至三文鱼样品中, 每份加入 SNoV 的量为 160 μl。选择上述病毒提取方法中回收率最高的方法进行灵敏度测试, 重复 2 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 病毒 RNA 提取效果的比较

采用 ISO RT-qPCR 检测体系比较两种病毒 RNA 提取试剂盒所得 RNA 的质量见表 1。采用 IBM SPSS Statistics 19 软件的  $T$  检验分析, 两种病毒 RNA 提取试剂盒的 RNA 产物在 RT-qPCR 检测中效果相当, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。本试验选取 High pure viral RNA kit 试剂盒用于人工污染样品的病毒 RNA 纯化。

表 1 采用 ISO RT-qPCR 检测体系比较两种病毒 RNA 提取试剂盒提取 RNA 的效果 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of RNA quality from two RNA extraction kits using ISO RT-qPCR

RNA 提取试剂盒	$Ct$ 值							平均 $Ct$ 值
Roche	27.49	28.10	35.44	34.88	28.76	27.82	30.42	± 3.70
Qiagen	28.68	27.46	33.52	35.28	27.18	30.10	30.37	± 3.33

### 2.2 两种 RT-qPCR 检测体系的比较

采用 LightMix Kit Norovirus GGI-GGII 试剂盒中自带的十倍梯度稀释的 GII 型诺如病毒 DNA 标准品分别绘制 RT-qPCR 反应  $Ct$  值标准曲线, 用于评价 ISO RT-qPCR 和 Roche RT-qPCR 检测体系的差

异(表2)。对相同的DNA浓度进行比较测试,ISO RT-qPCR检测方法的 $C_t$ 值要低于Roche RT-qPCR

检测方法,ISO RT-qPCR反应体系的扩增效率高于Roche RT-qPCR反应体系。

表2 采用GII型诺如病毒DNA标准品评价两种RT-qPCR检测体系( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 2 Comparisons of two RT-qPCR detection systems by standard DNA of NoV GII

RT-qPCR 检测体系	标准病毒DNA拷贝数						$R^2$	扩增效率/%
	$10^6$	$10^5$	$10^4$	$10^3$	$10^2$	$10^1$		
Roche 体系	19.15 ± 0.25	22.55 ± 0.16	25.32 ± 0.11	29.17 ± 0.07	33.42 ± 0.39	37.89 ± 0.19	0.993	85.61
ISO 体系	17.74 ± 0.18	20.98 ± 0.13	24.46 ± 0.78	28.45 ± 0.31	31.47 ± 0.12	34.92 ± 0.27	0.999	94.28
差值	1.42	1.53	0.87	0.73	1.95	2.98	—	—

注:—为无需计算

### 2.3 样品处理步骤对病毒回收的影响

按1.2.4方法对样品处理各步骤进行取样检测,取每步骤的平均 $C_t$ 值绘制曲线(图2)。人工污染的三文鱼样品在加入TGBE缓冲液后,采用ISO RT-qPCR检出的 $C_t$ 值高于仅含纯SNoV质控品的TGBE缓冲液的 $C_t$ 值。可能是鱼肉组织吸附了部分NoV颗粒,同时,样品基质的存在也影响了病毒洗脱的效率。病毒颗粒从40 ml TGBE缓冲液浓缩至700  $\mu$ l PBS缓冲液,病毒浓缩了57倍。但是, $C_t$ 值仅从29.56变为24.74,相当于浓度提高了约32倍。推断PEG/NaCl沉降到病毒重悬是病毒损失的主要环节。

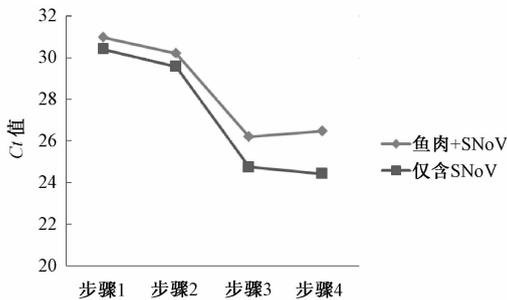


图2 人工污染样品处理步骤与诺如病毒RT-qPCR检测 $C_t$ 值的关系

Figure 2 Relationship of  $C_t$  values of each sample treating process tested in artificial contaminated samples

### 2.4 不同前处理方案对病毒检测的影响

分别采用两种RT-qPCR检测体系测试不同方

法处理的人工污染的三文鱼样品。由试验结果可知(表3),Roche RT-qPCR检测体系检测人工污染样品试验的成功率较低(未检测到方法内质控信号并且未检测到阳性扩增信号)。检测的成功率约为20%~70%,平均病毒回收率低于3%。在计算洗脱和富集方法的回收率所用 $C_{t_{纯}}$ 为SNoV直接提取RNA后用RT-qPCR检测所得 $C_t$ 值。在成功的测试中,方法1.2的病毒平均回收率较高,为2.52%。

采用ISO RT-qPCR检测体系测试不同方法处理的人工污染样品均得到较好的测试结果(表4),检测的成功率均为100.0%,检测过程中采用的阴性和阳性对照结果均正常。与阳性对照相比,采用方法3.1和3.2的病毒平均回收率低于0.2%,采用方法1.1和2.1的病毒平均回收率介于4%~7%之间。采用氯仿-正丁醇(1:1, V/V)溶液萃取病毒RNA的方法1.2和2.2处理后样品的病毒回收率较高,分别为15.15%和11.03%。考虑到病毒检测的成功率,ISO RT-qPCR检测体系具有更好的耐用性、重复性和抗干扰能力。

### 2.5 方法灵敏度结果

采用方法1.2对人工污染的系列梯度稀释SNoV三文鱼样品进行处理,采用ISO RT-qPCR方法检测(表5)。按每份SNoV中含有GII型NoV颗粒约 $2.7 \times 10^3$  RT-PCRU计算,在人工污染样品中添加的诺如病毒的最低检出量折算约为17.3 RT-PCRU/25 g,其对应的PCR循环数约为37。根

表3 采用Roche RT-qPCR对不同方法处理的人工污染三文鱼样品中诺如病毒的检测结果

Table 3 Results of Roche RT-qPCR detection system with different treating methods for NoV GII in artificial contaminated salmon sashimi

检测方法	测试次数	检测到扩增信号的测试次数	$C_t$ 值	平均 $C_t$ 值	测试成功率/%	回收率/%
1.1	5	4	41.10、37.64、35.55、34.02、>55.00	37.08 ± 3.06	34.8	0.20
1.2	5	3	33.52、35.75、31.08、>55.00、>55.00	33.45 ± 2.34	30.0	2.52
2.1	5	1	41.72、>55.00、>55.00、>55.00、>55.00	41.72*	20.0	0.01
2.2	5	1	41.42、>55.00、>55.00、>55.00、>55.00	41.42*	20.0	0.01
3.1	5	1	45.09、>55.00、>55.00、>55.00、>55.00	45.09*	33.3	0.00
3.2	5	2	45.25、36.47、>55.00 >55.00、>55.00	40.86 ± 6.21	66.7	0.01
SNoV质控球	5	5	28.25、28.78、28.22、26.56、28.89	28.14 ± 0.93	100	—

注:\*为数据量不足;SNoV质控球为标准;—为无需计算

表 4 采用 ISO RT-qPCR 对不同方法处理的人工污染三文鱼样品中诺如病毒的检测结果

Table 4 Results of ISO RT-qPCR detection system with different treating methods for NoV GII in artificial contaminated salmon sashimi

检测方法	测试次数	检测到扩增信号的测试次数	$C_t$ 值	平均 $C_t$ 值	测试成功率 / %	回收率 / %
1. 1	4	4	32. 62, 27. 59, 28. 76, 26. 72	28. 92 ± 2. 60	100. 0	4. 61
1. 2	4	4	27. 82, 26. 77, 27. 07, 27. 16	27. 21 ± 0. 44	100. 0	15. 15
2. 1	4	4	28. 17, 29. 47, 27. 49, 28. 68	28. 45 ± 0. 84	100. 0	6. 38
2. 2	4	4	28. 12, 26. 97, 28. 10, 27. 46	34. 70 ± 0. 85	100. 0	11. 03
3. 1	4	4	35. 17, 34. 68, 35. 44, 33. 52	33. 57 ± 1. 86	100. 0	0. 08
3. 2	4	4	31. 29, 32. 81, 34. 88, 35. 28	23. 48 ± 1. 40	100. 0	0. 18
SNoV 质控球	4	4	25. 34, 22. 14, 23. 71, 22. 74	23. 48 ± 1. 40	100. 0	—

注: SNoV 质控球为标准;—为无需计算

表 5 人工污染样品处理方法 1. 2 的 ISO RT-qPCR 检测灵敏度试验结果

Table 5 Sensitivity results of ISO RT-qPCR detection system with treating methods 1. 2 for NoV GII in artificial contaminated salmon sashimi

稀释级	病毒量 (RT-PCR/25 g)	$C_t$ 值	平均 $C_t$ 值	标准偏差
未稀释	2 160	28. 94, 29. 04	28. 99	0. 07
5 倍	432	31. 13, 31. 36	31. 25	0. 16
25 倍	86. 40	34. 25, 34. 39	34. 32	0. 10
125 倍	17. 28	36. 47, 37. 49	36. 98	0. 72
625 倍	3. 46	UD*, UD*	—	—

注: UD\*  $C_t$  值大于 55, 未检出;—为无需计算

据 PCR 灵敏度和人工污染样品检测的结果, 在阴性对照和阳性对照正常的情况下, 检测样品的  $C_t$  值  $\geq 45$  时, 判断为阴性;  $C_t$  值  $\leq 35$  时, 判断为阳性;  $35 < C_t$  值  $< 45$  时重新测试, 如重测  $C_t$  值  $\geq 45$  时, 判定为阴性, 重测  $C_t$  值  $< 45$ , 判断为阳性。

### 3 讨论

与贝类中 NoV 富集或吸附于组织器官内不同, 鱼肉组织器官内一般情况下不含有 NoV, 多数是通过交叉污染的方式粘附于鱼肉组织表面<sup>[22]</sup>。在鱼肉样品的前处理过程中可以不经细胞破碎和病毒释放的过程, 采用贝类的病毒提取方法不适合于处理三文鱼类样品。因此, 鱼肉中 NoV 主要采用洗涤组织表面的方法将病毒颗粒洗脱。

在食品中污染的病毒数量都少于  $10^4$  genomic copies/10 g<sup>[23]</sup>, 这对检测方法的灵敏度提出了较高的要求。本试验采用了较为成熟的 RT-qPCR 检测方法, 一个是商品化 Roche 检测试剂盒, 一个是 ISO/TS 15216-1: 2013 推荐的方法。因此, 本试验的关键是解决食品样品前处理方法中病毒洗脱、富集和 RNA 提取等多步骤操作对病毒回收的影响<sup>[24]</sup>。在采用洗脱-沉降-萃取法检测食品中 NoV 的最低检测限文献报道差异较大, 方法检测的灵敏度与食品基质和处理步骤等均有较大关联, 文献报道的检测灵敏度约在  $10^1 \sim 10^4$  PCRU 之间<sup>[22-26]</sup>。同样的, 不同食品中病毒回收率变化也较大, 一般介于 0. 1%

~ 32% 之间<sup>[22, 27-28]</sup>。本次优化后的 NoV 检测灵敏度为 17. 28 RT-PCR/25 g, 回收率为 15. 15%。在生食水产品中, 尤其是生食三文鱼类产品中, 含有较为丰富的蛋白质和脂类物质<sup>[29]</sup>, 在尽可能减少处理步骤、节约前处理时间的前提下, 优化样品前处理的方法。

在试验中, 加入 PEG/NaCl 溶液对样品中的病毒进行沉降后, 有大量的鱼肉组织和细胞碎片随病毒颗粒一同沉淀, 经高速离心后形成紧密的沉淀复合物, 对后续采用 PBS 缓冲液进行病毒重悬产生极大的干扰。即使在加入 PEG/NaCl 溶液前对样品进行多次离心取上清液操作, 也无法有效去除的鱼肉杂质。因此, 离心法在去除鱼肉类食品的基质干扰上并非最好的选择。

蛋白酶 K 可以快速的水解食品中的蛋白质成分, 消除其对 PCR 的干扰, 在 ISO/TS 15216-1: 2013 处理贝类产品时已被推荐使用。也有研究采用酸吸收洗脱法 (acid adsorption elution) 洗脱贝类、富含脂肪和碳水化合物类食品中诺如病毒<sup>[24]</sup>, 同时其消化效力在 pH = 7 左右可以达到最大化, 本试验尝试采用调整 pH 与蛋白酶 K 结合的方法提高病毒提取效率。但试验发现在酸性环境下, 蛋白酶 K 无法将大量鱼肉组织消化完全, 病毒在溶液酸性下降的过程中容易吸附于鱼肉组织上, 随离心被去除, 反而不利于病毒的提取。在处理鱼肉类样品时加入适量的蛋白酶 K 可以得到较为澄清的病毒悬液。然而, 在提取过程中加入的蛋白酶 K 消化需要一定的反应时间, 并且蛋白酶 K 自身也是一种 PCR 抑制成分。有机溶剂萃取是一种简便的去除食品中 PCR 抑制剂的方法, 也可以同时起到纯化病毒 RNA 的作用。通过萃取后取水相中含有的病毒颗粒或病毒 RNA 可以有效去除食品基质的干扰<sup>[21-22]</sup>。采用氯仿-丁醇等有机溶剂萃取的方法可以达到快速去除食品基质中 PCR 抑制剂的目的<sup>[9, 21-24, 27]</sup>。

在许多研究中采用多种质控方式对诺如病毒检测过程及结果分析进行控制, 如添加 mengo virus、鼠诺如病毒或 MS2 噬菌体等<sup>[14, 21, 27]</sup> 控制提取过程,

添加双链 DNA 控制定量过程和添加质控 RNA 控制 RT-qPCR 扩增步骤等。这些质控方法已经十分成熟实用,且具有良好的通用性,可以直接应用于本研究所改进的生食水产鱼肉类食品中 NoV 的过程控制中,作为检测方法的完善和补充。

本试验通过对人工污染 GII 型 NoV 的三文鱼肉样品多种处理方法和检测方法的研究,比较了离心法、蛋白酶消化法和有机溶剂萃取法 3 种从食品基质中去除 PCR 抑制剂的方式。分析了病毒洗脱、富集、RNA 提取和 RT-qPCR 检测体系对 NoV 检测和回收的影响。提出了一种简单快速提取和检测生食水产鱼肉类食品中 NoV 的方法,该方法可以有效的消除 PCR 抑制剂,提高 NoV 在生食水产品中的回收率,具有较好的耐用性和重现性。

## 参考文献

- [ 1 ] Scallan E, Hoekstra R M, Angulo F J, et al. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens [ J ]. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17(1) : 7-15.
- [ 2 ] Glass R I, Parashar U D, Estes M K. Norovirus gastroenteritis [ J ]. *N Engl J Med*, 2009, 361(18) : 1776-1785.
- [ 3 ] 于意. 诺如病毒胃肠炎的研究进展 [ J ]. *上海交通大学学报 (医学版)*, 2015, 35(11) : 1738-1742.
- [ 4 ] Maguire A J, Green J, Brown D W, et al. Molecular epidemiology of outbreaks of gastroenteritis associated with small round-structured viruses in East Anglia, United Kingdom, during the 1996-1997 season [ J ]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(1) : 81-89.
- [ 5 ] Fankhauser R L, Monroe S S, Noel J S, et al. Epidemiologic and molecular trends of " Norwalk-like viruses " associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States [ J ]. *J Infect Dis*, 2002, 186(1) : 1-7.
- [ 6 ] Lees D. Viruses and bivalve shellfish [ J ]. *Int J Food Microbiol*, 2000, 59(1/2) : 81-116.
- [ 7 ] Rippey S R. Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption [ J ]. *Clin Microbiol Rev*, 1994, 7(4) : 419-425.
- [ 8 ] 周德庆, 苏来金, 赵峰, 等. 诺如病毒在贝类中的富集特性与机制研究进展 [ J ]. *病毒学报*, 2015, 31(3) : 313-317.
- [ 9 ] LI D, Stals A, TANG Q J, et al. Detection of noroviruses in shellfish and semiprocessed fishery products from a Belgian seafood company [ J ]. *J Food Prot*, 2014, 77(8) : 1342-1347.
- [ 10 ] Pavoni E, Consoli M, Suffredini E, et al. Noroviruses in seafood: a 9-year monitoring in Italy [ J ]. *Foodborne Pathog Dis*, 2013, 10(6) : 533-539.
- [ 11 ] Kim Y W, Lee S H, Hwang I G, et al. Effect of temperature on growth of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in flounder, salmon sashimi and oyster meat [ J ]. *Int J Environ Res Public Health*, 2012, 9(12) : 4662-4675.
- [ 12 ] Miller I, Gunson R, Carman W F. Norwalk like virus by light cyclor PCR [ J ]. *J Clin Virol*, 2002, 25(2) : 231-232.
- [ 13 ] Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR [ J ]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(4) : 1548-1557.
- [ 14 ] ISO/TS 15216-1 Microbiology of food and animal feed-horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR [ S ]. International Organization of Standardization, 2013.
- [ 15 ] PANG X L, Lee B, CHUI L D, et al. Evaluation and validation of real-time reverse transcription-PCR assay using the LightCycler system for detection and quantitation of norovirus [ J ]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(10) : 4679-4685.
- [ 16 ] 李志凯, 苏国成, 苏文金, 等. 诺如病毒检测方法研究进展 [ J ]. *微生物学通报*, 2014, 41(7) : 1417-1424.
- [ 17 ] Rutjes S A, Lodder-Verschoor F, van der Poel W H, et al. Detection of noroviruses in foods: a study on virus extraction procedures in foods implicated in outbreaks of human gastroenteritis [ J ]. *J Food Prot*, 2006, 69(8) : 1949-1956.
- [ 18 ] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 2626—2010 国境口岸诺如病毒检测方法 [ S ]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [ 19 ] Boxman I L, Tilburg J J, te Loeke N A, et al. An efficient and rapid method for recovery of norovirus from food associated with outbreaks of gastroenteritis [ J ]. *J Food Prot*, 2007, 70(2) : 504-508.
- [ 20 ] Kobayashi S, Natori K, Takeda N, et al. Immunomagnetic capture RT-PCR for detection of norovirus from foods implicated in a foodborne outbreak [ J ]. *Microbiol Immunol*, 2004, 48(3) : 201-204.
- [ 21 ] Scherer K, Johne R, Schrader C, et al. Comparison of two extraction methods for viruses in food and application in a norovirus gastroenteritis outbreak [ J ]. *J Virol Methods*, 2010, 169(1) : 22-27.
- [ 22 ] 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.
- [ 23 ] Baert L, Uyttendaele M, Debevere J. Evaluation of viral extraction methods on a broad range of ready-to-eat foods with conventional and real-time RT-PCR for norovirus GII detection [ J ]. *Int J Food Microbiol*, 2008, 123(1/2) : 101-108.
- [ 24 ] Stals A, Baert L, Van Coillie E, et al. Extraction of food-borne viruses from food samples: a review [ J ]. *Int J Food Microbiol*, 2012, 153(1/2) : 1-9.
- [ 25 ] Dubois E, Agier C, Traore O, 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 Prot*, 2002, 65(12) : 1962-1969.
- [ 26 ] Butot S, Putallaz T, Sanchez G. Procedure for rapid concentration and detection of enteric viruses from berries and vegetables [ J ]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(1) : 186-192.
- [ 27 ] Stals A, Baert L, De Keuckelaere A, et al. Evaluation of a norovirus detection methodology for ready-to-eat foods [ J ]. *Int J Food Microbiol*, 2011, 145(2/3) : 420-425.
- [ 28 ] 田胜男, 苏静芬, 向志光, 等. 两种核酸提取方法对小鼠诺如病毒 RNA 提取效能的比较 [ J ]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(9) : 57-60.
- [ 29 ] Carstairs S A, Marais D, Craig L C A, et al. Seafood inclusion in commercial main meal early years' food products [ J ]. *Matern Child Nutr*, 2016, 12(4) : 860-868.