

## 论著

## GII.3 型诺如病毒重组衣壳蛋白的表达和纯化鉴定

王佳慧,李凤琴,李楠,韩春卉,江涛

(国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室,北京 100021)

**摘要:**目的 通过杆状病毒表达系统,获取高纯度 GII.3 型诺如病毒重组衣壳蛋白,为制备抗 GII.3 型诺如病毒单克隆和多克隆抗体提供免疫原。方法 将 GII.3 型诺如病毒衣壳蛋白基因片段修饰后插入 pHTA 表达载体中,经测序鉴定,将鉴定正确的重组质粒转化到 MAX Efficiency<sup>®</sup> DH10Bac<sup>™</sup> 感受态细胞中,获取表达杆粒并转染 SF9 细胞,表达 GII.3 型诺如病毒重组衣壳蛋白。重组蛋白用 Ni-NTA His 蛋白亲和柱纯化,十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和蛋白免疫印迹(Western blot)方法鉴定。结果 SDS-PAGE 和 Western blot 结果表达了分子量约为 60 kDa 的重组蛋白,动物试验表明重组蛋白具有较好的免疫原性,为制备抗 GII.3 型诺如病毒单克隆抗体和多克隆抗体、建立相应的免疫学检测方法奠定了基础。结论 构建了 GII.3 型诺如病毒衣壳蛋白表达载体,并获得 GII.3 型诺如病毒重组衣壳蛋白。

**关键词:**重组蛋白; GII.3 型诺如病毒; 杆状病毒表达系统; 表达; 纯化; 鉴定; 食品污染物; 食品安全

**中图分类号:**R155 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2017)01-0009-05

**DOI:**10.13590/j.cjfh.2017.01.003

### The expression, purification and identification of *Norovirus* GII.3 capsid protein

WANG Jia-hui, LI Feng-qin, LI Nan, HAN Chun-hui, JIANG Tao

(Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

**Abstract: Objective** To express the *Norovirus* GII.3 capsid protein by gene recombination. **Methods** The *Norovirus* GII.3 capsid protein gene was modified and inserted into the pHTA plasmid. The recombinant plasmid was transformed into the MAX Efficiency<sup>®</sup> DH10Bac<sup>™</sup> competent cell after sequencing and the expression plasmid was obtained. The plasmid was transformed into SF9 cell, and the recombinant capsid protein was expressed. The recombinant capsid protein was purified by Ni-NTA His affinity chromatography purification column followed by identification with sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot. **Results** The recombinant capsid protein of about 60 kDa was expressed. It had good immunogenicity, which was verified by animal experiments. The recombinant capsid protein made it possible to prepare monoclonal antibody against *Norovirus* GII.3 and to develop the immunology detection method. **Conclusion** The *Norovirus* GII.3 capsid protein expression plasmid was constructed and the recombinant capsid protein was expressed.

**Key words:** Recombinant protein; *Norovirus* GII.3; *Baculovirus* expression system; expression; purification; identification; food contaminants; food safety

诺如病毒(*Norovirus*, NoV)属于杯状病毒科诺如病毒属,是一种单链 RNA 病毒,主要污染牡蛎等贝类产品。NoV 传播途径有多种,进食被 NoV 污染的食物是重要途径之一<sup>[1]</sup>,此外,NoV 也可通过被污染的水、物品、气溶胶等传播,常在社区、学校、餐馆、医院、托儿所、孤老院及军营等封闭或半封闭场

所引起疾病暴发<sup>[2]</sup>。据不完全统计,美国每年由 NoV 引起的感染病例约有 2 300 万<sup>[3]</sup>,这一情况在发展中国家更为严重,该病毒在发展中国家每年可引起约 100 万儿童感染,20 万儿童死亡<sup>[4]</sup>。2012 年以来,NoV 已成为我国除细菌外其他感染性腹泻病暴发的主要病原体,感染率可达 60%~96%,尤其 2014 年冬季以来,该病毒引起的暴发事件大幅度上升,仅 2015 年 1 月 1 日~11 月 15 日通过突发公共卫生事件管理系统上报的由 NoV 引起的食源性疾病就有 88 起,主要发生在中小学校等集体场所,严重危害消费者健康<sup>[5]</sup>。由于 NoV 在食品中含量低,且食品中干扰病毒检测的物质较多,因此,对食品

收稿日期:2017-01-04

基金项目:北京市自然科学基金(No. 5141002)

作者简介:王佳慧 女 助理研究员 研究方向为食品卫生

E-mail:wangjiahui@cfsa.net.cn

通信作者:江涛 男 研究员 研究方向为食品卫生

E-mail:jiangtao001@cfsa.net.cn

中 NoV 颗粒的富集和纯化是病毒检测的关键<sup>[6-8]</sup>。目前对 NoV 的富集和纯化方法主要有聚乙二醇(PEG)沉淀法和利用带正电的超顺磁珠捕获样品中带负电的病毒颗粒的阳离子磁珠富集法<sup>[9]</sup>。后者在富集带负电荷 NoV 的同时,也会使基质中其他一些带负电荷的蛋白同时沉淀下来,从而影响检测结果的灵敏度。近年来,基于抗原抗体特异性结合的免疫磁珠方法可特异性的富集样品中的 NoV,提高检测方法的灵敏度和特异性<sup>[10]</sup>,但其前提是要获得 NoV 衣壳蛋白并进一步制备抗 NoV 衣壳蛋白的单克隆或多克隆抗体。

NoV 主要有 GI~GV 5 个基因组,各基因组内又有不同的基因型<sup>[11-12]</sup>。目前我国流行的基因型主要为 GII.4 型,其次为 GII.3 和 GII.5 型。2003—2012 年间,Zhirakovskaia 等<sup>[13]</sup>收集了 1 098 份儿童急性腹泻病例样本,其中 NoV 的检出率为 13.1%,在 NoV 的检出病例中,GII.3 型占 51%,因此 GII.3 型正逐渐成为主要流行株。鉴于 NoV 目前很难进行体外培养,利用杆状病毒表达系统表达重组的 NoV 样颗粒,具有与天然病毒粒子相同的结构和性质,可以替代天然病毒粒子用于免疫原的制备。本研究旨在通过杆状病毒表达系统,获取高纯度 GII.3 型 NoV 重组衣壳蛋白,为制备抗 GII.3 型 NoV 单克隆和多克隆抗体提供免疫原,并利用制备的抗体建立检测 GII.3 型 NoV 的酶联免疫吸附(ELISA)方法、制备免疫磁珠,对食品中的 NoV 进行提取、分离与富集。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器与试剂

凝胶成像系统(美国 Bio-Rad)、电子天平、微量核酸蛋白测定仪(美国 NanoDrop)、恒温培养箱、恒温水浴锅、水平摇床、离心机、电泳装置、全温摇床。

T<sub>4</sub> DNA 连接酶、限制性内切酶 *EcoRI*、*XhoI* 均购自 NEB(北京)公司,大肠埃希菌[宝生物工程(大连)有限公司],质粒提取试剂盒、杆状病毒表达系统、MAX Efficiency<sup>®</sup> DH10Bac<sup>™</sup> 感受态细胞、SF9 细胞、His 标签蛋白纯化试剂盒、辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗 His 标签抗体均购自英潍捷基(上海)贸易有限公司,胶回收试剂盒、异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)均购自天根生化科技(北京)有限公司,肉汤(LB)培养基、LB 琼脂均购自北京陆桥技术股份有限公司,预染蛋白 Marker、ELC 化学发光底物均购自美国 Fermentas,其他化学试剂均购自北京化工厂。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 重组 ORF2 杆粒的构建

根据杆状病毒表达基因偏好性,修饰 GII.3 型

NoV 的 ORF2 基因,在两端分别引入 *EcoR I* 和 *Xho I* 限制性内切酶位点,由英潍捷基(上海)贸易有限公司进行序列合成。将合成的质粒用 *EcoR I* 和 *Xho I* 进行双酶切,同时将表达载体 pFastBac HTA 进行双酶切。将二者酶切产物用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶连接,转化到大肠埃希菌感受态细胞 JM109 中,命名为 pFB HTA-GII.3 JM109,转化后的菌液涂布于含有 100 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 平板上,37 °C 培养 14 h。挑取单克隆菌落接种于含 100 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中,37 °C 220 r/min 培养过夜后,测序鉴定。将测序正确的菌液提取质粒,所得质粒转化到 MAX Efficiency<sup>®</sup> DH10Bac<sup>™</sup> 感受态细胞中,将转化后的菌液涂布于含有 7 μg/ml 庆大霉素、50 μg/ml 卡那霉素、10 μg/ml 四环素、100 μg/ml X-Gal、40 μg/ml IPTG 的 LB 琼脂上,37 °C 培养 48 h。挑取白色菌落,再次涂布于上述培养基,37 °C 过夜培养,将仍然为白色的单菌落接种于含有 7 μg/ml 庆大霉素、50 μg/ml 卡那霉素、10 μg/ml 四环素的 LB 中,37 °C 220 r/min 过夜培养后,进行 PCR 鉴定。

#### 1.2.2 重组杆状病毒的构建

PCR 验证正确的菌株提取杆粒,根据 Cellfectin II Reagent 转染试剂说明书,将杆粒转染 SF9 细胞,获得病毒储藏液,命名为 GII.3 P1。将 GII.3 P1 病毒储藏液接种新鲜的 SF9 细胞,获得 2 代病毒储藏液,命名为 GII.3 P2,用噬斑法测定病毒滴度。

#### 1.2.3 重组蛋白表达条件的优化

以感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 1,将重组杆状病毒接种新鲜的 SF9 细胞,分别于 24、48、72、96、120 h 取少量细胞悬液,1 500 r/min 离心 10 min 收集细胞,向细胞内加入十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺(SDS)缓冲液,反复冻融 2 次后,1 500 r/min 离心 10 min 取上清进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析。确定重组蛋白的分子量并选择确认表达量最高的时间点,收集细胞。

#### 1.2.4 表达产物的纯化

pFastBac HTA 载体前段有 His 标签,针对这一特性,本试验选用 His 标签蛋白纯化试剂盒,利用试剂盒中提供的 Ni-NTA His 蛋白亲和柱进行重组蛋白。

#### 1.2.5 GII.3 型 NoV 重组衣壳蛋白的鉴定

采用蛋白免疫印迹(Western blot)方法对 GII.3 型 NoV 重组衣壳蛋白进行鉴定。具体为 SDS-PAGE 电泳后,将胶块卸下,按照负极-滤纸-胶-膜-滤纸-正极的顺序将胶块夹好,400 mA 转印 1 h。以鼠抗 His 单抗为一抗,HRP 标记的山羊抗小鼠抗体为二抗进行反应,加入显色液进行显色。

#### 1.2.6 重组衣壳蛋白免疫原性的鉴定

以 100  $\mu\text{g}$ /只的免疫量对 3 只 8 周龄 Balb/c 小鼠进行免疫,免疫间隔为 2 周,3 次免疫后,取小鼠血清。将纯化后的 GII.3 型 NoV 重组衣壳蛋白以 0.5  $\mu\text{g}$ /孔的蛋白包被量包被酶标板,小鼠血清从 1:200 开始进行倍比稀释,加入酶标板中,以 1:5 000 稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠抗体作为二抗,加入底物显色后,在 450 nm 波长下测定吸光度(OD)。

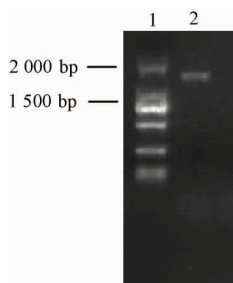
## 2 结果与分析

### 2.1 重组表达载体的构建

将目的片段与表达载体连接后,转化到 JM109 感受态细胞中,经含氨苄青霉素的 LB 培养基筛选后进行测序验证,结果表明插入片段正确。

### 2.2 重组杆粒的构建

将测序正确的重组表达载体转化到 MAX Efficiency<sup>®</sup> DH10Bac<sup>™</sup> 感受态细胞中,经含庆大霉素、卡那霉素、四环素、X-Gal 及 IPTG 培养基筛选,进行 PCR 验证,结果如图 1。由图 1 可见,待测扩增产物在约 1 700 bp 处有一明显条带,扩增条带片段大小符合目的片段大小。



注:1 为 D2000 marker;2 为目的条带

图 1 PCR 电泳图

Figure 1 Result of PCR

### 2.3 重组蛋白的表达及条件优化

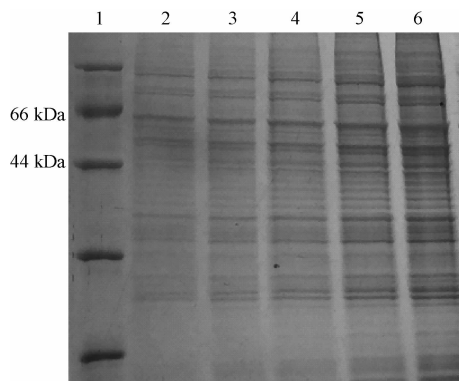
将杆粒转染 SF9 细胞,获得 1 代杆状病毒 GII.3 P1,将该病毒接种新鲜的 SF9 细胞,获得 2 代杆状病毒 GII.3 P2,利用噬斑法测定病毒滴度,结果为  $1.2 \times 10^8$  PFU/ml。以  $\text{MOI} = 1$  接种新鲜的 SF9 细胞,分别于 24、48、72、96 和 120 h 收集细胞并进行 SDS-PAGE 电泳,结果见图 2。由图 2 可见,96 h 时,重组蛋白表达达到高峰,且在 60 kDa 处有明显蛋白条带,因此后续试验中选择 96 h 为最终表达时间。

### 2.4 重组蛋白的鉴定

利用 Western blot 方法对表达的重组蛋白进行鉴定,结果见图 3。由图 3 可见,膜上有一条明显的特异性条带,经比对大小与目的条带相当。

### 2.5 重组蛋白的纯化

利用试剂盒对表达的蛋白进行纯化,纯化后产



注:1 为 protein marker;2~6 分别为 24、48、72、96、120 h 的细胞裂解液

图 2 表达时间对重组蛋白表达量的影响

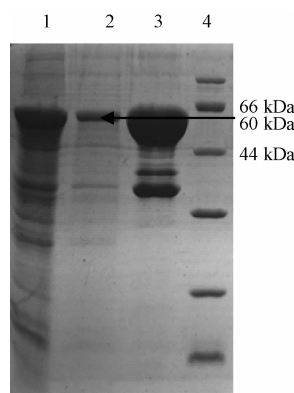
Figure 2 Impact of expression time on the expression level of recombinant capsid protein of GII.3



图 3 Western blot 鉴定结果

Figure 3 Result of Western blot

物进行 SDS-PAGE 电泳,结果见图 4。由图 4 可见,纯化后的重组蛋白在 60 kDa 处有一明显条带。



注:1 为全细胞裂解液;2 为纯化的重组蛋白;  
3 为穿流液;4 为 protein marker

图 4 GII.3 型诺如病毒重组衣壳蛋白纯化结果

Figure 4 Purification of recombinant of GII.3 Norovirus capsid

### 2.6 GII.3 型 NoV 重组衣壳蛋白免疫原性的鉴定

GII.3 型 NoV 重组衣壳蛋白免疫原性鉴定结果如表 1 所示,ELISA 临界值大于 0.18 即为阳性。选择大于 0.18 的最大稀释倍数作为小鼠的血清滴度。结果显示,3 只小鼠的血清抗体滴度分别为

1:102 400、1:409 600 和 1:12 800。

表1 小鼠血清滴度表

Table 1 Titter of the mouse serum

稀释比例	OD <sub>450 nm</sub>		
	1号小鼠	2号小鼠	3号小鼠
1:200	3.271	3.217	3.051
1:400	3.256	3.293	2.789
1:800	3.080	3.233	1.902
1:1 600	2.580	3.160	1.169
1:3 200	1.675	2.924	0.677
1:6 400	1.111	2.502	0.407
1:12 800	0.590	1.649	0.251
1:25 600	0.431	1.030	0.168
1:51 200	0.272	0.626	0.122
1:102 400	0.299	0.419	0.094
1:204 800	0.144	0.260	0.084
1:409 600	0.132	0.209	0.077
1:819 200	0.110	0.164	0.075
1:1 638 400	0.101	0.158	0.082

### 3 讨论

NoV 是世界范围内引起急性病毒性胃肠炎的主要病原体<sup>[14]</sup>,由 NoV 导致的感染性腹泻在全世界范围内均有流行。在美国,NoV 平均每年可以引起 1 900 万人~2 100 万人发病,导致 800 例死亡和 71 000 例住院<sup>[15]</sup>。我国每年由 NoV 引起的聚集性腹泻暴发案例逐年攀升,2014 年仅北京市就发现 NoV 聚集性疫情 39 起,807 例病例,涉及 23 所幼儿园、15 所小学、1 所大学,严重危害消费者健康<sup>[16]</sup>。

本试验采用杆状病毒表达系统,该系统属于真核表达系统,由于野生型 NoV 衣壳蛋白基因的密码子与杆状病毒表达系统真核细胞的密码子使用频率不同,因此需要将野生型 NoV 衣壳蛋白的部分密码子进行替换,以期提高蛋白表达量,本试验根据杆状病毒表达的基因偏好性,对 GII.3 型 NoV 衣壳蛋白 *ORF2* 基因进行修饰并人工合成,修改后的基因片段连接到 HTA 表达载体上,转化到 MAX Efficiency<sup>®</sup> DH10Bac<sup>™</sup> 感受态细胞中,并获得了表达杆粒。利用转染试剂盒将所得杆粒转染到 SF9 细胞上,并进行传代,获得了表达 GII.3 型 NoV 重组衣壳蛋白的杆状病毒。所获蛋白经 Westernblot 鉴定,在 60 kDa 有明显条带,与预期结果相符合。本试验中,由于缺乏针对抗 GII.3 型 NoV 的抗体,因此 Westernblot 鉴定选用抗 His 标签抗体,与 SDS-PAGE 电泳图进行比对后,重组蛋白大小符合预期设想。将所获重组蛋白用 His 标签蛋白 Ni-NTA 亲和柱进行纯化,纯化后最终获得较高纯度的 GII.3 型 NoV 重组衣壳蛋白。

II.3 型 NoV 重组衣壳蛋白的纯化对后续制备抗 GII.3 型 NoV 单克隆抗体和建立 ELISA 检测方

法至关重要。纯化过程中存在重组蛋白的流失,穿流液中可能含有大量目的蛋白,这可能与上样量有一定关系,在试验中,可将穿流液收集后再次上样,以提高重组蛋白的纯化效率。将纯化后的重组蛋白免疫小鼠,3 次免疫后,小鼠血清中可检测到针对重组蛋白的高滴度抗体,说明重组蛋白具有良好的免疫原性,可用于后续单克隆抗体和多克隆抗体的制备,为获得抗 GII.3 型 NoV 单克隆抗体、制备用于分离和富集食品中 GII.3 型 NoV 的免疫磁珠奠定良好的基础。此外,本试验中所获得的 NoV 样颗粒,可作为包被抗原直接包被酶标板,用于检测人血清中抗 GII.3 型 NoV 抗体,调查人群中 GII.3 型 NoV 的感染情况,为 NoV 流行病学调查提供数据支持。

### 参考文献

- [1] Cheng P K, Wong D K, Chung T W, et al. *Norovirus* contamination found in oysters worldwide [J]. *J Med Microbiol*, 2005, 76 (4): 593-597.
- [2] Glatzer M B. Internal reports on shellfish-borne disease outbreaks, 1992-1998 [M]. Atlanta: US Food and Drug Administration, Southeast Regional Office, 1998.
- [3] Mead P S, Slutsker L, Dietz V, et al. Food-related illness and death in the United States [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 1999, 5(5): 607-625.
- [4] Patel M M, Widdowson M A, Glass R I, et al. Systematic literature review of role of *Noroviruses* in sporadic gastroenteritis [J]. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14(8): 1224-1231.
- [5] 廖巧红, 冉陆, 靳森, 等. 诺如病毒感染暴发调查和预防控制技术指南(2015 年版) [J]. *中华预防医学杂志*, 2016, 50(1): 7-16.
- [6] 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.
- [7] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 2730—2010 进出口食品中诺如病毒检测 酶联免疫吸附法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [8] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 1635—2005 贝类中诺如病毒检测方法 普通 RT-PCR 方法和实时荧光 RT-PCR 方法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2005.
- [9] 李楠, 王佳慧, 李凤琴, 等. 检测鲜草莓中 GII 型诺如病毒的两种富集方法比较 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2015, 27(3): 242-245.
- [10] 黄艳梅, 刘道峰, 赖卫华, 等. 集成免疫磁珠富集和免疫层析的黄曲霉毒素 M<sub>1</sub> 快速检测法 [J]. *分析化学*, 2015, 42(5): 654-659.
- [11] Koroneman A, Vega E, Vennema H, et al. Proposal for a unified *Norovirus* nomenclature and genotyping [J]. *Arch Virol*, 2013, 158(10): 2059-2068.
- [12] Donaldson E, Lindesmith L, Lobue A, et al. *Norovirus* pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations [J]. *Immunol Rev*, 2008, 225(1): 190-211.
- [13] Zhirakovskaia E V, Tikunov A Y, Bodnev S A, et al. Molecular

- epidemiology of *Noroviruses* associated with sporadic gastroenteritis in children in Novosibirsk, Russia, 2003-2012 [J]. *J Med Virol*, 2015, 87(5): 740-753.
- [14] Kapikian A, Wyatt R, Dolin R, et al. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis [J]. *J Virol*, 1972, 10(5): 1075-1081.
- [15] Hall A J, Lopman B A, Payne D C, et al. *Norovirus* disease in the United States [J]. *Emerg Infect Dis*, 2013, 19(8): 1198-1205.
- [16] 北京疾控中心:今年共发现诺如病毒聚集性病例 39 起 [EB/OL]. (2014-12-23) [2016-09-02] <http://www.cnfood.cn/n/2014/1223/42150.html>.

## · 公告 ·

# 总局办公厅关于开展婴幼儿配方乳粉标签标识规范和监督检查工作的通知

食药监办食监一〔2016〕168 号

各省、自治区、直辖市食品药品监督管理局,新疆生产建设兵团食品药品监督管理局:

《中华人民共和国食品安全法》(以下简称《食品安全法》)、《乳品质量安全监督管理条例》《食品标识管理规定》等法律法规及今年 10 月 1 日施行的《婴幼儿配方乳粉产品配方注册管理办法》均对婴幼儿配方乳粉标签标识使用作出明确规定。近期,各地食品药品监管部门在食品安全日常监管中发现婴幼儿配方乳粉标签标识在产品名称、标示内容、含量和功能声称等方面违反法律法规及不规范现象仍十分突出。为进一步规范婴幼儿配方乳粉标签标识,为婴幼儿配方乳粉产品配方注册工作奠定良好基础,更好地维护广大消费者的合法权益,总局决定近期开展婴幼儿配方乳粉标签标识规范和监督检查工作。现就有关要求通知如下:

一、各地要按照《食品安全法》《乳品质量安全监督管理条例》《食品标识管理规定》《婴幼儿配方乳粉产品配方注册管理办法》等法律法规和《食品安全国家标准 预包装食品标签通则》(GB 7718—2011)、《食品安全国家标准 预包装食品营养标签通则》(GB 28050—2011)、《食品安全国家标准 预包装食品特殊膳食用食品标签》(GB 13432—2013)、《食品安全国家标准 婴儿配方食品》(GB 10765—2010)、《食品安全国家标准 较大婴儿和幼儿配方食品》(GB 10767—2010)等食品安全国家标准,并参照《婴幼儿配方乳粉产品配方注册管理办法》申请材料项目与要求对婴幼儿配方乳粉的标签标识开展规范和监督检查工作。

二、婴幼儿配方乳粉生产企业要对照法律法规及食品安全国家标准,对本企业的婴幼儿配方乳粉标签标识开展自查。主要检查以下几个方面,一是产品名称方面,婴幼儿配方乳粉的标签标识应真实、准确,不得利用字号大小或色差误导消费者;二是原辅料来源方面,不得使用“进口奶源”“源自国外牧场”“生态牧场”等模糊信息;三是配料表和营养成分表方面,其标注方式应严格按照 GB 13432—2013 及其他有关要求标示;四是标示内容方面,婴幼儿配方乳粉的标签标识应当标注食品生产许可证编号等应当载明的事项;五是含量声称方面,对按照食品安全标准不应在产品配方中含有的物质,不得以“零添加”“不含有”等字样强调;六是功能声称方面,不得明示或者暗示具有益智、增加抵抗力或者免疫力、保护肠道等功能性表述;七是标签中存在的夸大、误导或未经证实的其他方面问题,以及标签上不得使用“人乳化”“母乳化”或近似术语表述。

三、婴幼儿配方乳粉经营者要建立进货查验记录制度,查验婴幼儿配方乳粉的标签标识,保证包装完好,并按照保证食品安全的要求贮存。销售的进口婴幼儿配方乳粉,应当有中文标签;有说明书的,还应当有中文说明书。标签、说明书应当符合我国有关法律法规的规定和食品安全国家标准的要求,并载明食品的原产地以及境内代理商的名称、地址、联系方式。

四、自本通知下发之日起 3 个月内,婴幼儿配方乳粉生产经营者要严格按照有关要求开展自查自纠,自查过程中发现生产经营的婴幼儿配方乳粉标签标识明显不符合《食品安全法》《乳品质量安全监督管理条例》《食品标识管理规定》等法律法规和食品安全国家标准规定的,要立即停止生产经营,做好相关记录,并及时向生产经营所在地食品药品监管部门报告;对于婴幼儿配方乳粉标签标识不符合《婴幼儿配方乳粉产品配方注册管理办法》等有关规定和要求的,食品生产经营者应当提出整改计划和方案。婴幼儿配方乳粉生产经营者要在自查整改结束后 15 日内将相关情况向所在地食品药品监管部门报告。向中国出口婴幼儿配方乳粉的境外生产企业亦应遵照上述有关规定,通过在中国的销售代理商将自查整改情况报代理商所在地食品药品监管部门。

五、各级食品药品监管部门要以婴幼儿配方乳粉生产企业、主要从事婴幼儿配方乳粉经营业务企业等为重点检查对象,以生产婴幼儿配方乳粉的包装车间、成品仓库,经营婴幼儿配方乳粉的商场超市、批发市场、母婴店等为重点检查场所,对婴幼儿配方乳粉标签标识进行监督检查。重点检查婴幼儿配方乳粉标签标识的产品名称、标示内容、含量和功能声称等问题,严厉打击虚假标注婴幼儿配方乳粉生产日期、保质期等欺诈行为,生产经营营养成分不符合食品安全国家标准及利用食品标签标识分装、伪造冒用他人品牌生产销售婴幼儿配方乳粉等违法行为。

六、对于生产经营的婴幼儿配方乳粉标签标识不符合《食品安全法》《乳品质量安全监督管理条例》《食品标识管理规定》等法律法规和食品安全国家标准规定的,由县级以上食品药品监管部门责令改正,拒不改正的,根据违法情况,作出行政处罚;对于利用食品标签标识制假售假等严重违法行为,涉嫌犯罪的,移送司法机关追究刑事责任。在检查过程中发现的不正当竞争、虚假广告等问题,要移交相关主管部门查处。中国乳制品工业协会要发挥行业协会作用,组织开展“清洁标签”行动,加强有关婴幼儿配方乳粉标签标识的法律法规、食品安全国家标准及规范性文件的宣传贯彻培训,督促婴幼儿配方乳粉生产经营企业对照法律法规、食品安全国家标准及规范性文件的要求开展自查整改。

七、各省级食品药品监管部门要制定严格周密的工作方案,确定工作要求、实施步骤、治理重点、检查措施,积极开展监督检查工作。要畅通举报投诉渠道,认真处理消费者的投诉、举报,督促生产企业改进标签标识,形成合理有效的社会监督机制。各级食品药品监管部门要主动公开查处的案件信息,及时通报工作中发现的风险信息和隐患问题,并及时向本级政府和上级食品药品监管部门报送相关信息。请各省级食品药品监管部门于 2017 年 6 月 30 日前将监督检查工作情况报送总局食监一司。

食品药品监管总局办公厅

二〇一六年十二月七日

(相关链接:[http://www.moa.gov.cn/zwl/m/nybz/201612/t20161226\\_5417394.htm](http://www.moa.gov.cn/zwl/m/nybz/201612/t20161226_5417394.htm))