

## 研究报告

## 检测鲜草莓中 G II 型诺如病毒的两种富集方法比较

李楠,王佳慧,李凤琴,徐进,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 建立鲜草莓中 G II 型诺如病毒(NoV G II)的实时荧光 RT-PCR 检测方法,评价磁珠富集法和 PEG(聚乙二醇)沉淀法对检测草莓中 NoV G II 的适用性,对北京地区采集的 18 份草莓样品进行检测。方法 参照 ISO/TS 15216-1《实时荧光 RT-PCR 方法测定食品中甲型肝炎病毒和诺如病毒水平方法》合成检测 NoV G II 的特异性引物和探针,分别采用磁珠富集法和 PEG 沉淀法富集病毒,然后提取 RNA,建立实时荧光 RT-PCR 检测方法,并对提取条件进行优化。结果 磁珠富集法的最高回收率为 1.730%(PBS 缓冲液),PEG 沉淀法的最高回收率为 1.682%(TGBE 缓冲液),18 份草莓样品均未检出 NoV G II。结论 通过磁珠富集法和 PEG 沉淀法建立的病毒检测的富集方法均适用于鲜草莓中 NoV G II 的检测。

**关键词:**实时荧光 RT-PCR; 鲜草莓; G II 型诺如病毒; 磁珠富集法; 聚乙二醇沉淀法

**中图分类号:**R155;Q-33 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-8456(2015)03-0242-05

**DOI:**10.13590/j.cjfh.2015.03.005

### Comparison of two enrichment methods on the detection of norovirus G II in strawberry

LI Nan, WANG Jia-hui, LI Feng-qin, XU Jin, 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 develop a real-time PCR method for detection of norovirus G II in fresh strawberry, evaluate the application of magnetic beads enrichment method and PEG precipitation in detection of norovirus G II and to detect norovirus G II in 18 fresh strawberries from Beijing market. **Methods** Specific primers and probes were synthesized referenced to ISO/TS 15216-1. Magnetic beads and PEG precipitation were used to virus enrichment, and real-time PCR method was developed. **Results** The maximum recovery of magnetic beads enrichment and PEG methods were 1.730% (PBS buffer) and 1.682% (TGBE buffer) respectively. All 18 samples tested were negative. **Conclusion** The two virus enrichment methods developed in this study were suitable for the detection of norovirus G II in fresh strawberry.

**Key words:** Quantitative real-time PCR; fresh strawberry; norovirus G II; magnetic beads enrichment method; polyethylene glycol enrichment method

诺如病毒(NoV)属于杯状病毒,是世界范围内引起人类急性胃肠炎的最常见病原微生物之一,主要通过粪-口途径传播,人感染诺如病毒通常是由于食用了被污染的贝类或新鲜农产品<sup>[1]</sup>。诺如病毒分为 G I ~ G V 共 5 个基因组,包含近 30 种基因型,其中 G I、G II 和 G IV 能够引起人类感染。近期的流行病学调查显示,约 70% 的人类感染诺如暴发是 G II.4 型引起的<sup>[2]</sup>,G II.4 是我国已报道过的流行优

势株<sup>[3]</sup>,曾经在世界上多个国家和地区暴发。2012 年 9 月,德国发生有史以来最大的一起食源性疾病暴发,大约 11 000 人出现腹泻、呕吐的症状,通过流行病学分析,最终确定该起食源性疾病是由冷冻草莓引起的,并怀疑由中国进口的同批次草莓也被病毒污染<sup>[4]</sup>。由于缺乏确实的证据,欧盟仅要求中国对出口食品进行严格检查,并于 2012 年 12 月 19 日正式通过欧盟成员国法案,决定于 2013 年 1 月起对中国出口到欧盟成员国的冷冻草莓,以 5% 的抽检比例检测其中的诺如病毒和甲肝病毒。由此可见,建立草莓中诺如病毒检测方法,以提高我国对食品中诺如病毒的安全防控能力,是适应国内和国际消费需求的当务之急。

目前检测诺如病毒的方法有电镜法、免疫学方法、RT-PCR、实时荧光 RT-PCR 等,其中,实时荧光

收稿日期:2015-03-16

基金项目:北京市自然科学基金重点项目“北京市售食品中诺如病毒污染、流行变异及风险评估研究”(5141002)

作者简介:李楠 女 助理研究员 研究方向为食品卫生

E-mail:linan100041@cfsa.net.cn

通讯作者:江涛 男 研究员 研究方向为食品卫生

E-mail:jiangtao001@cfsa.net.cn

RT-PCR 方法被认为是检测临床、食物和环境样品中诺如病毒的金标方法<sup>[5]</sup>。国际标准化组织于 2013 年 3 月 15 日颁布了 ISO/TS 15216-1《实时荧光 RT-PCR 方法测定食品中甲型肝炎病毒和诺如病毒水平方法》的技术规范<sup>[6]</sup>。采用聚乙二醇(PEG)沉淀法富集诺如病毒,适用于浆果、蔬菜沙拉、双壳贝类及水等样品的病毒检测,该规范已被一些国家采用,并且是检测食品中诺如病毒的标准操作程序(SOP)。我国现行有效的诺如病毒标准检测方法<sup>[7-9]</sup>均为为出入境检验检疫标准,主要针对贝类、鱼类、人类样品,尚无草莓中诺如病毒检测的国标方法。近年来随着分子生物学方法的发展,诺如病毒的检测方法还有进一步完善的空间以适应当前形势的需要。本研究分别采用磁珠富集法(利用带正电的超顺磁珠捕获样本中带负电的病毒颗粒)和 PEG 沉淀法,对人工污染 NoV G II 的鲜草莓样品进行病毒的富集纯化,提取 RNA 进行实时荧光 RT-PCR 检测,并探讨 4 种洗脱缓冲液对回收率的影响,评价这两种富集方法对草莓中诺如病毒检测的适用性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

从北京部分超市、菜市场采购新鲜草莓,4℃保存,1周内检测。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

RT-PCR 系统(美国 Invitrogen)、荧光定量 PCR 仪(RESEARCH CFX96,美国 Bio-Rad)、小型高速离

心机、高速冷冻离心机、Pathatrix 微生物富集纯化系统(美国 Life Technologies)。

NoV G II 标准品(-20℃保存备用,中国食品药品检定研究院提供),NoV G II 粪便悬液(病人粪便样品经常规 PCR 分型分离出 NoV G II,-20℃保存备用,丰台区疾病预防控制中心提供),Pathatrix APCAT50 Cationic beads、MagMAX™-96 Viral RNA Isolation Kit 试剂盒均购自美国 Life Technologies, QIAamp Viral RNA Mini Kit 试剂盒(上海凯杰企业管理有限公司),One-Step™ PCR Inhibitor Removal Kit 试剂盒(美国 ZYMO),果胶酶(来源于黑曲霉,美国 Sigma),PEG8000(上海拜力生物公司),TGBE(英国 OXOID),DNase/RNase-Free ddH<sub>2</sub>O(北京天根生化科技有限公司),其他试剂均为分析纯,引物及探针由上海英骏生物技术有限公司合成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 样品的前处理

剪刀洗净后 160℃烘烤 2 h,每份样品用一把灭菌剪刀取样。每份草莓样品称取 25 g,置于滤膜均质袋中。取 1 份 NoV G II 标准品用 100 μl DNase/RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 溶解后加到草莓表面,室温放置 10 min。滤膜均质袋中加入 40 ml 洗脱缓冲液,30 U 果胶酶,调节 pH=9.5。将滤膜均质袋置于摇床上,在室温下 140 r/min 振荡 20 min。每隔 10 min 检测样品液的 pH 值。若 pH<9.0,则用 NaOH 调节使 pH=9.5,每调节一次 pH 值,孵育时间增加 10 min。将样品液吸出转移至锥形瓶,尽可能将样品液全部吸出以减少病毒损失,4 种洗脱缓冲液制备方法见表 1。

表 1 4 种洗脱缓冲液的制备方法

Table 1 Elution buffer

洗脱缓冲液	成分及制备方法
TGBE	Tris base 12.1 g, 甘氨酸 3.8 g, 牛肉膏 10 g, 超纯水 1 L, pH=9.5, 高压灭菌。
PBS	NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1.15 g, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.2 g, 超纯水 1 L, pH=7.3, 高压灭菌。
glycine	甘氨酸 3.75 g, NaCl 8.18 g, Tween20 2 ml, 0.5 L 超纯水, pH=9.0, 超纯水定容至 1 L, 高压灭菌。
Tris-glycine-Tween 20	甘氨酸 3.75 g, NaCl 8.18 g, Tris base 121.14 g, Tween20 2.6 ml, 0.7 L 超纯水, pH=9.0, 超纯水定容至 1 L, 高压灭菌。

#### 1.2.2 磁珠法和 PEG 沉淀法富集病毒及 RNA 提取

**磁珠法:**从 Pathatrix APCAT50 Cationic beads 试剂盒中取出样品管和洗脱管,放置于样品支架上。移去盖子,使样品液 pH=7.0 后加入样品管中,洗脱管中加入 35 ml PBS。吸取 50 μl 磁珠直接加入样品管中,盖上盖子震荡悬浮磁珠,静置 10 min 使磁珠和病毒充分结合。取出捕获器与洗脱管和样品管连接,将组装好的装置插入仪器卡座上,按照仪器说明书操作运行程序。待程序结束后取出洗脱管置于样品支架上,小心吸去残留液体,再用 50 μl PBS 重新悬浮磁珠。

按照 MagMAX™-96 Viral RNA Isolation Kit 说明

书提取 RNA。将上一步中 50 μl 磁珠转移至 130 μl 已加入 Carrier RNA 的 Lysis/Binding solution concentrate 中,转移时注意将吸头插入液面下以免产生气溶胶导致交叉污染,振荡 1 min。吸取 10 μl Binding beads 与 10 μl Lysis/Binding Enhancer 混合后,加入到 Lysis/Binding solution concentrate 中,振荡 5 min 使病毒完全裂解,RNA 与 Binding beads 充分结合。依次用试剂盒中洗液 1、洗液 2 清洗、捕获磁珠,室温振荡 3 min 使残余液体挥发。加入 100 μl 洗脱液,室温振荡 3 min,捕获磁珠,将洗脱液转移至新管。

PEG 沉淀法:参考 ISO/TS 15216-1 中浆果和蔬

菜沙拉的检测方法。将样品液转移至离心管中, 4℃ 10 000 × *g* 离心 30 min, 上清液移至新管或瓶, 用 HCl 调至 pH = 7.0。加入 0.25 体积的 5 × PEG/NaCl 缓冲液(500 g/L PEG8000, 1.5 mol/L NaCl), 振荡均质 60 s, 4℃ 140 r/min 振荡孵育 60 min; 4℃, 10 000 × *g* 离心 30 min。弃去上层溶液; 4℃, 10 000 × *g* 离心 5 min 以使颗粒紧凑; 弃去上层溶液, 用 500 μl PBS 重悬沉淀; 将重悬液移至一新 Ep 管中, 加入 500 μl 氯仿-丁醇(1:1, V/V) 溶液, 涡旋混匀, 室温孵育 5 min; 4℃, 10 000 × *g* 离心 15 min, 小心将水相转移至新管待提取 RNA。

按照 QIAamp Viral RNA Mini Kit 说明书提取 RNA。吸取 560 μl 已加入 Carrier RNA 的 Buffer AVL 到 1.5 ml 离心管中, 加入 100 μl 待提取 RNA 液, 涡旋混匀, 室温放置 10 min; 瞬时离心, 向管中加入 560 μl 无水乙醇, 涡旋 15 s 充分混匀; 瞬时离心, 吸取 630 μl 上步中的溶液加入离心柱(已装入到 2 ml 收集管中), 8 000 r/min 离心 1 min; 更换新的收集管, 重复此步骤直至所有的裂解液都上柱; 打开离心柱盖子, 加入 500 μl Buffer AW1, 8 000 r/min 离心 1 min。更换新的收集管, 向离心柱中加入 500 μl Buffer AW2, 13 000 r/min 离心 3 min; 更换新的收集管, 13 000 r/min 离心空柱 1 min; 将离心柱放在 1.5 ml 离心管中, 加入 50 μl Buffer AVE, 盖盖室温放置 5 min; 8 000 r/min 离心 1 min, 加入 50 μl Buffer AVE 重复此步骤, 共得到 100 μl 洗脱液。

### 1.2.3 PCR 抑制剂的去除

按照 One-Step™ PCR Inhibitor Removal Kit 说明书操作。将 1.2.2 部分的洗脱液加入 Zymo-Spin™ IV-HRC 离心柱, 8 000 × *g* 离心 1 min。收集液体用于实时荧光 RT-PCR 检测。

### 1.2.4 实时荧光 PCR 检测

引物设计: 参照 ISO/TS 15216-1 技术规范合成检测 NoV G II 的引物序列见表 2, 探针序列为 FAM-AGCACGTGGGAGGGCGATCG-TAMRA。

表 2 引物和探针序列  
Table 2 Primers and probes

病毒	引物类型	序列 5'-3'	目标片段 /bp
NoV G II	上游引物	ATGTTACAGTGGATGAGRTTCTCWGA	89
	下游引物	TCGACGCCATCTTCATTCACA	

扩增体系(25 μl): Enzyme Mix 1.25 μl, 5 × Reaction Mix 5 μl, 上、下游引物(12.5 μmol/L)各 0.25 μl, 探针(12.5 μmol/L) 0.5 μl, RNA 模板 10 μl, ddH<sub>2</sub>O 7.75 μl。

扩增条件: 50℃ 反应 15 min; 95℃ 预变性 2 min; 95℃ 变性 15s, 60℃ 退火、延伸 30 s, 45 个循

环, 60℃ 收集荧光。

### 1.2.5 灵敏度试验

绘制标准曲线: 取 1 份 NoV G II 标准品, 按 QIAamp Viral RNA Mini Kit 说明书提取 RNA, 收获 100 μl RNA, 10 倍稀释配制成为 10<sup>0</sup>、10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup> 标准系列, 分别取 10 μl 检测得到标准曲线。

检出限的计算: 使用 QIAamp Viral RNA Mini Kit 提取粪便悬液中病毒 RNA, 逆转录、转化质粒配制标准系列, 标准液浓度为 10<sup>6</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>2</sup>、10<sup>1</sup>、10<sup>0</sup>、10<sup>-1</sup> copies/μl, 则每反应管中加入质粒拷贝数为 10<sup>7</sup>、10<sup>6</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>2</sup>、10<sup>1</sup>、10<sup>0</sup> copies/μl。以 NoV G II 质粒标准系列线性区间的最小拷贝数作为方法的检出限。

回收率的计算: 磁珠法: 添加 1 份 NoV G II 标准品富集、提取, 最终得到 100 μl RNA, 分别取 10 μl 原液或 10 倍稀释液检测, 则原液回收率为软件计算浓度乘以 100, 10 倍稀释液回收率为软件计算结果乘以 1 000; PEG 沉淀法: 添加 1 份 NoV G II 标准品富集得到 500 μl 病毒, 取 100 μl 提取液, 最终得到 100 μl RNA, 分别取 10 μl 原液或 10 倍稀释液检测, 则原液回收率为软件计算浓度乘以 500, 10 倍稀释液回收率为软件计算结果乘以 5 000。

### 1.2.6 鲜草莓样品的检测

样品检测时, 每份样品同时检测原液和 10 倍稀释液。每批样品检测时均包含 1 份阴性对照(提取时不加样品, 只加洗脱缓冲液)、1 份空白对照(实时荧光 RT-PCR 体系中以 ddH<sub>2</sub>O 代替 RNA)。Ct 值 < 40 则判定为检出 NoV G II。

## 2 结果

### 2.1 方法的灵敏度

NoV G II 质粒、NoV G II 标准品标准曲线的扩增效率 E 在 91.3% ~ 99.3%, 满足荧光 RT-PCR 要求; NoV G II 质粒的扩增的线性范围 10<sup>0</sup> ~ 10<sup>6</sup> copies/反应管。检出限为 NoV G II 质粒标准系列线性区间的最小拷贝数, 即 1 copies/反应管, 见表 3 和图 1、2。

### 2.2 不同缓冲液条件下两种富集方法的回收率

磁珠法、PEG 沉淀法分别采用 4 种洗脱缓冲液进行鲜草莓样品中 NoV G II 加标回收率试验。磁珠法对 RNA 原液回收率范围 0.014% ~ 0.056%, 其中 glycine 缓冲液未检出 NoV G II, 1:10 稀释液的回收率范围 0.09% ~ 1.73%; PEG 沉淀法对 RNA 原液回收率在 0.306% ~ 1.090%, 1:10 稀释液的回收率在 0.512% ~ 1.682%, 其中 TGBE 的原液、1:10 稀释液回收率均最高, 所以本研究检测鲜草莓样品

表3 灵敏度试验结果

Table 3 Amplification curve

扩增曲线	线性方程	扩增效率 E/%	拷贝数/ (copies/ 反应管)	Ct 值	r <sup>2</sup>
NoV G II 质粒	$Ct = 41.313 - 3.551\text{Log}C$	91.3	10 <sup>6</sup>	13.14	0.999
			10 <sup>5</sup>	16.46	
			10 <sup>4</sup>	19.62	
			10 <sup>3</sup>	23.58	
			10 <sup>2</sup>	27.33	
			10 <sup>1</sup>	30.39	
			10 <sup>0</sup>	34.41	
NoV G II 标准品	$Ct = 22.543 - 3.340\text{Log}C$	99.3	10 <sup>0</sup>	22.20	0.992
			10 <sup>-1</sup>	26.44	
			10 <sup>-2</sup>	29.13	
			10 <sup>-3</sup>	32.44	

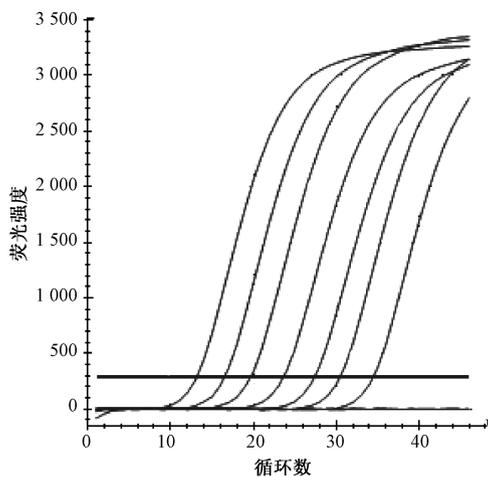


图1 NoV G II 质粒扩增曲线

Figure 1 Amplification plot of the NoV G II plasmid

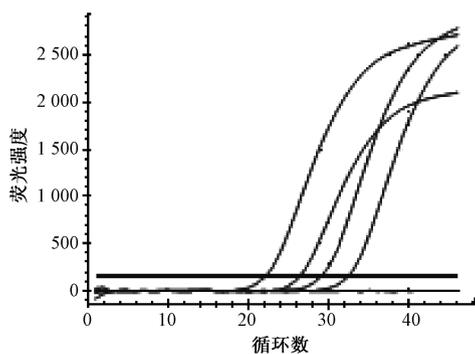


图2 NoV G II RNA 扩增曲线

Figure 2 Amplification plot of the NoV G II RNA

中 NoV G II 的条件为:磁珠富集法采用 PBS 缓冲液,PEG 沉淀法采用 TGBE 缓冲液,见表 4。

### 2.3 样品检测结果

用磁珠富集法(PBS 缓冲液)和 PEG 沉淀法(TGBE 缓冲液)对 18 份北京市场上采购的鲜草莓样品进行检测,结果显示所有样品未检出 NoV G II。

表4 不同缓冲液和富集条件下 NoV G II 的加标回收率(%)

Table 4 Recovery of NoV G II use different buffers and methods

缓冲液	磁珠法		PEG 沉淀法	
	原液	1:10 稀释液	原液	1:10 稀释液
TGBE	0.014	0.210	1.090	1.682
PBS	0.026	1.730	0.344	0.721
glycine	—	0.650	0.306	0.512
Tris-glycine-Tween 20	0.056	0.090	0.394	0.519

注:—为未检出

### 3 讨论

微生物食品安全防范通常专注于预防和检测致病菌,但食源性病毒不同于常见食源性致病菌,其仅在宿主上复制且多数(包括人诺如病毒)不能体外培养,导致检测难度加大;此外,多数食源性病毒在较宽 pH 范围下稳定且耐干燥、抗辐射,从感官上很难判断食物是否被病毒污染<sup>[2]</sup>。诺如病毒耐受 pH 范围为 2~9 的环境,在 60℃ 的条件下保持 30 min 仍具有活性,在低温下能够存活数年,在煮沸条件下迅速被破坏,因此食源性诺如病毒感染的最大风险来源于可生食的食品,诺如病毒的污染国外报道较多,我国主要集中在贝类等水产品,有关草莓中诺如病毒的检测鲜有报告,但新进研究表明,水果、蔬菜也是诺如病毒的重要载体<sup>[10]</sup>。

与临床样品比较,草莓中由于病毒含量低,基质中糖类、果胶、色素等成分对检测的干扰等因素导致检测难度增大,其前处理的好坏直接影响检测结果。食品基质中诺如病毒的富集方法有膜过滤、超滤离心、PEG 沉淀等,其中 PEG 沉淀法应用最为广泛<sup>[10]</sup>。Stals 等<sup>[5]</sup>采用 PEG 沉淀法富集病毒,对深冻混合水果、草莓果泥、新鲜树莓进行了 G I、G II 型诺如病毒和鼠诺如病毒(MNV-1)的回收率试验,结果显示不同基质对 G I、MNV-1 的回收率影响明显,G II 则无明显差异。周阳等<sup>[11]</sup>在贝类的诺如病毒检测方法基础上进行改进,采用 PEG 法富集病毒,建立了适合于草莓中诺如病毒 G I、G II 型的检测方法。近几年出现了一种基于免疫磁珠吸附诺如病毒的方法,张其刚<sup>[12]</sup>采用 PGM-MB 法(猪胃粘蛋白偶联的磁珠)对不同食品基质(如小番茄、蓝莓、色拉、青葱、葡萄等)中诺如病毒的检测技术进行了研究,认为与 PEG 沉淀法相比,PGM-MB 富集法具有更好的回收率和检测下限,且富集检测时间明显缩短。

本研究参考 ISO/TS 15216-1 中检测浆果的 PEG 沉淀法,同时采用磁珠富集法,对人工污染 NoV G II 的鲜草莓样品进行病毒的富集纯化及检测。通过比较不同缓冲液条件下 NoV G II 回收率,得到如下结果:

① 磁珠富集法对样品原液的回收率较低,最高为 0.056%,PEG 沉淀法相对较高为 0.306%~1.090%;10 倍稀释液的回收率有明显提高,两种方法的回收率分别为 0.09%~1.73%和 0.512%~1.682%;

② 4 种缓冲液中,PBS(磁珠富集法)和 TGBE(PEG 沉淀法)检测 10 倍稀释液均得到了较高回收率,分别为 1.730%和 1.682%,且两种富集方法对 10 倍稀释液的回收率均 >1%,满足 ISO/TS 15216-1 对回收率的要求;

③ 两种富集方法的 10 倍稀释液回收率均高于原液回收率;

④ 抑制剂的去除对回收率有影响。研究过程中曾经对 RNA 提取液进行 PCR 抑制剂去除处理前后回收率进行比较,结果显示该处理能在一定程度上提高回收率,磁珠富集法(PBS 缓冲液)回收率从 0.540%提高到 1.730%,PGE 法(TGBE 缓冲液)回收率从 1%提高到 1.682%。

对上述结果进行如下讨论:

① 草莓中某些成分会对 PCR 反应产生抑制,10 倍稀释后抑制剂的浓度随之降低,从而回收率有所提高。抑制剂的去除试验也表明,能够在一定程度上降低抑制剂对 PCR 检测的影响。

② 两种富集方法中 PBS 和 TGBE 缓冲液分别得到相对较高回收率。pH=9.5 时病毒的洗脱效果较好,因此病毒从样品上洗脱的过程应尽量保持 pH>9.0。但是在操作中发现,由于草莓为酸性水果,处理过程中释放出酸性物质导致 pH 降低,PBS 缓冲能力最弱,pH 降低迅速且最低能够降至 4.0 左右,需要调节 pH 至少 5 次,大大延长检测时间。由于其 pH 不能保持在稳定的水平,对天然污染的草莓样品洗脱效果有待进一步研究。

③ 目前报道的 PEG 沉淀法中多用 TGBE 缓冲液洗脱病毒,该缓冲液缓冲能力强,适用于酸性食品基质,能使 pH 稳定保持在 8.5~9.5,本研究中 PEG 沉淀法(TGBE 缓冲液)也得到了较高的回收率。而磁珠富集法(TGBE 缓冲液)回收率较低,可能是由于 TGBE 中含有带负电的蛋白,与病毒竞争结合到磁珠,从而降低 NoV G II 的回收率。此外,食品基质中未去除的杂质可能包裹磁珠,从而影响磁珠对病毒的捕获,导致回收率降低。

磁珠富集法具有富集过程封闭、自动化程度高的优点,能够有效避免交叉污染并大大缩短检

测时间。但其检测成本高,配套试剂盒价格较贵且供货期长,普及上具有一定难度。PEG 沉淀法与磁珠富集法回收率相当,其优点是方法相对成熟、应用最为广泛、易于普及,缺点是操作复杂、检测时间长、操作过程不封闭易产生交叉污染。本研究参考了国际上现有的诺如病毒检测方法,根据现有条件进行了一些改动,采用实时荧光 RT-PCR 技术测定,建立了新鲜草莓中 NoV G II 基于磁珠法和 PEG 沉淀两种富集法的检测方法,并将其应用于少量样品的检测中。

## 参考文献

- [1] DAN L, Baert L, MING X, et al. Effects of a variety of food extracts and juices on the specific binding ability of norovirus GII.4 particles[J]. J Food Prot, 2012, 75(7): 1350-1354.
- [2] Sofia P. Molecular characterization of a murine Norovirus isolate from Sweden and detection of noroviruses in artificially contaminated raspberries [EB/OL]. (2013) [2015-03-12]. <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:slu:epsilon-s-2102>.
- [3] 林健东,杨北兵,陈静浓.诺如病毒感染国内外研究进展[J].预防医学论坛,2010,16(8):732-747.
- [4] Bernard H, Faber M, Wilking H, et al. Large multistate outbreak of norovirus gastroenteritis associated with frozen strawberries, Germany, 2012[J]. Euro Surveill, 2014, 19(8): 20719.
- [5] Stals A, Baert L, Van C E, et al. Evaluation of a norovirus detection methodology for soft red fruits [J]. Food Microbiol, 2011, 28(1): 52-58.
- [6] 国际标准化组织. ISO/TS 15216-1 实时荧光 RT-PCR 方法测定食品中甲型肝炎病毒和诺如病毒水平方法[S]. 2013.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 1635—2005 贝类中诺沃克病毒检测方法 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.
- [10] Summa M, Bonsdorff C H, Maunula L. Evaluation of four virus recovery methods for detecting noroviruses on fresh lettuce, sliced ham, and frozen raspberries[J]. J Virol Methods, 2012, 183(2): 154-160.
- [11] 周阳, 梁军, 蒋鲁岩, 等. 实时荧光 RT-PCR 检测冷冻草莓中诺如病毒[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(2): 515-520.
- [12] 张其刚. 基于 PGM-MB 检测不同食品基质中诺如病毒的技术研究[D]. 上海:华东理工大学, 2011.