

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 5325.1—2020

出口食品中食源性病毒定量检测
数字 PCR 法
第 1 部分：诺如病毒

Digital PCR method for quantitative detection of foodborne viruses in
export foods
Part 1: Norovirus

2020-12-30 发布

2021-07-01 实施

中华人民共和国海关总署 发布

前 言

SN/T 5235—2020《出口食品中食源性病毒定量检测 数字 PCR 法》为系列标准，分为 7 个部分。

第 1 部分：诺如病毒；

第 2 部分：甲型肝炎病毒；

第 3 部分：轮状病毒；

第 4 部分：札如病毒；

第 5 部分：星状病毒；

第 6 部分：柯萨奇病毒；

第 7 部分：脊髓灰质炎病毒。

本部分为 SN/T 5235—2020 的第 1 部分。

本部分根据 GB/T 1.1—2009 给出的规则编写。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本部分由中华人民共和国海关总署提出并归口。

本部分起草单位：中华人民共和国北京海关、中华人民共和国上海海关。

本部分主要起草人：曾静、徐蕾蕊、魏海燕、马丹、印丽萍、黄新新、何宇平、蒋原。

出口食品中食源性病毒定量检测

数字 PCR 法

第 1 部分：诺如病毒

1 范围

本部分规定了贝类、硬质表面食品、生食蔬菜、软质水果等食品中诺如病毒的数字 PCR 检测方法。

本部分适用于贝类、硬质表面食品、生食蔬菜、软质水果等食品中诺如病毒的定量检测。

本方法所能达到的检测限为 1 800 拷贝 / 2 g (贝类消化腺); 1 800 拷贝 / 100 cm² (硬质表面食品); 3 600 拷贝 / 25 g (生食蔬菜和软质水果)。

本方法所能达到的定量限为 3 600 拷贝 / 2 g (贝类消化腺); 3 600 拷贝 / 100 cm² (硬质表面食品); 7 200 拷贝 / 25 g (生食蔬菜和软质水果)。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析试验用水规格和试验方法。

3 术语、定义和缩略语

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

检测限 limit of determination (LOD)

方法所能检测样品中最低的诺如病毒基因含量。

3.2

定量限 limit of quantification (LOQ)

在相对标准偏差不超过 25% 的条件下，方法所能定量检测的样品中最低诺如病毒基因含量。

3.3

微反应体系 tiny reaction system

将含有模板、引物 / 探针、*Taq* 酶及其缓冲液充分混匀后分配至体积相同且相互物理隔离的油包水液滴或其它微孔、微室中所形成的小体积荧光 PCR 反应体系。

3.4

过程质控物质 process control

通过添加与目的病毒类似的外源质控物质如 MS2 噬菌体，来监测整个检测过程，通过对最终过程质控物质回收率的计算来评估检测过程的有效性和计算样品中病毒的实际含量。

3.5

外部控制 RNA external control RNA (EC RNA)

外源阳性对照 RNA，作为数字 PCR 过程的阳性对照。

3.6

有证标准物质 certified reference material

附有权威机构出具的证书，说明使用程序，获得具有相关不确定度和溯源性的一个或多个特性值的标准物质。

3.7 缩略语

3.7.1 NV (Norovirus)：诺如病毒。

3.7.2 PC (process control)：过程质控。

3.7.3 EC RNA (external control RNA)：外源控制 RNA。

3.7.4 PFU (plaque forming unit)：噬斑形成单位。

4 原理

数字 PCR (digital PCR) 是在荧光 PCR 基础上发展起来的基因拷贝数定量检测技术，用于核酸模板的绝对拷贝数测定。通过将含有模板、引物 / 探针、*Taq* 酶及其缓冲液的荧光 PCR 反应体系充分混匀之后等量均分为相互隔离的大数量 (大于 10 000 个) 微反应体系，使每个模板独立随机地分配至微反应体系中。所有微反应体系同时在相同的规定条件下进行 PCR 扩增反应后，根据设定的荧光阈值判断每个微反应体系的扩增结果。依据微反应体系的阳性率和泊松分布公式计算得到数字 PCR 反应体系中的模板浓度。

5 设备及材料

5.1 数字 PCR 系统：包括微反应体系发生器或其他具有同样功能的仪器、微反应体系荧光检测仪或其他具有同样功能仪器的系统。

5.2 核酸定量仪：Nanodrop3 000 或 Modulus 检测仪或其他核酸定量检测仪。

5.3 冷冻离心机。

5.4 生物安全柜。

5.5 低温冰箱：-80 ℃冰箱，-20 ℃冰箱。

5.6 天平：感量为 0.1 g。

5.7 均质器。

5.8 涡旋振荡仪。

5.9 高压灭菌锅。

- 5.10 恒温孵育器 / 箱：控温精度 ± 1.0 $^{\circ}\text{C}$ 。
- 5.11 微量移液器：100 μL ~ 1 000 μL 、20 μL ~ 200 μL 、10 μL ~ 100 μL 、0.5 μL ~ 10 μL 、0.1 μL ~ 2.5 μL 。
- 5.12 数字 PCR 微反应体系生成联排管及覆膜或芯片。
- 5.13 网状过滤袋：400 mL。
- 5.14 无菌棉拭子。
- 5.15 无菌剪刀。
- 5.16 无菌钳子。
- 5.17 无菌培养皿。
- 5.18 无 RNase 和 DNase 污染的玻璃容器。
- 5.19 无 RNase 离心管、无 RNase 移液器吸嘴、无 RNase 药匙、无 RNase PCR 薄壁管。

6 试剂

所有实验用试剂均为分析纯，符合 GB/T 6682 的要求；除特别说明外，实验用水为无 RNase 超纯水。

- 6.1 一步法数字 RT-PCR 反应预混液。
- 6.2 果胶酶：来源于黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 或棘孢曲霉 (*Aspergillus aculeatus*)。
- 6.3 PC 物质，制备及定量方法见附录 A。
- 6.4 EC RNA：制备及定量方法见附录 B。
- 6.5 Tris/ 甘氨酸 / 牛肉浸膏 (TGBE) 缓冲液：见 C.2.2。
- 6.6 5 \times PEG/NaCl 溶液：见 C.2.3。
- 6.7 磷酸盐缓冲液 (PBS)：见 C.2.4。
- 6.8 氯仿 / 正丁醇混合液：见 C.2.5。
- 6.9 蛋白酶 K 溶液：见 C.2.6。
- 6.10 75% 乙醇：见 C.2.7。
- 6.11 Trizol 试剂：见 C.2.8。
- 6.12 引物和探针：根据表 1 的序列合成引物和探针，加入无 RNase 超纯水配制成 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度。扩增序列参见附录 D。

表 1 数字 PCR 检测的引物和探针

病毒名称	引物和探针序列 (方向 5'-3')	扩增片段大小 (bp)	参考毒株基因序列号及扩增基因位置
G I 型 NV	COG1-F (正向引物): CGY TGG ATG CGN TTY CAT GA COG1-R (反向引物): CTT AGA CGC CAT CAT CAT TYA C RING1-P (探针): FAM-AGA TYG CGR TCY CCT GTC CA-BHQ1	85	GenBank 登录号: AB621909.1, (657-741)
G II 型 NV	COG2-F (正向引物): CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG COG2-R (反向引物): TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA RING2-P (探针): FAM-TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT-TAMRA	98	GenBank 登录号: KX586330.1, (4 999-5 096)
MS2 噬菌体	MS2-TM3-F (正向引物): GGC TGC TCG CGG ATA CCC MS2-TM3-R (反向引物): TGA GGG AAT GTG GGA ACC G MS2-TM3-P (探针): VIC-ACC TCG GGT TTC CGT CTT GCT CGT-BHQ1	202	GenBank 登录号: JF 719743.1, (3 135-3 336)
<p>注 1: 简并引物: 核苷酸链中除出现正常的 A、T、G、C 四种碱基符号外还出现如 R、Y、N 其他字母, 其中 R=A/G, Y=C/T, N=A/C/G/T, W=A/T。</p> <p>注 2: 荧光标记: FAM、VIC 代表荧光报告基团, BHQ1 代表荧光猝灭基团, 反应过程中应选择相应的荧光通道。</p>			

7 检测程序

诺如病毒数字 PCR 定量检测程序见图 1。

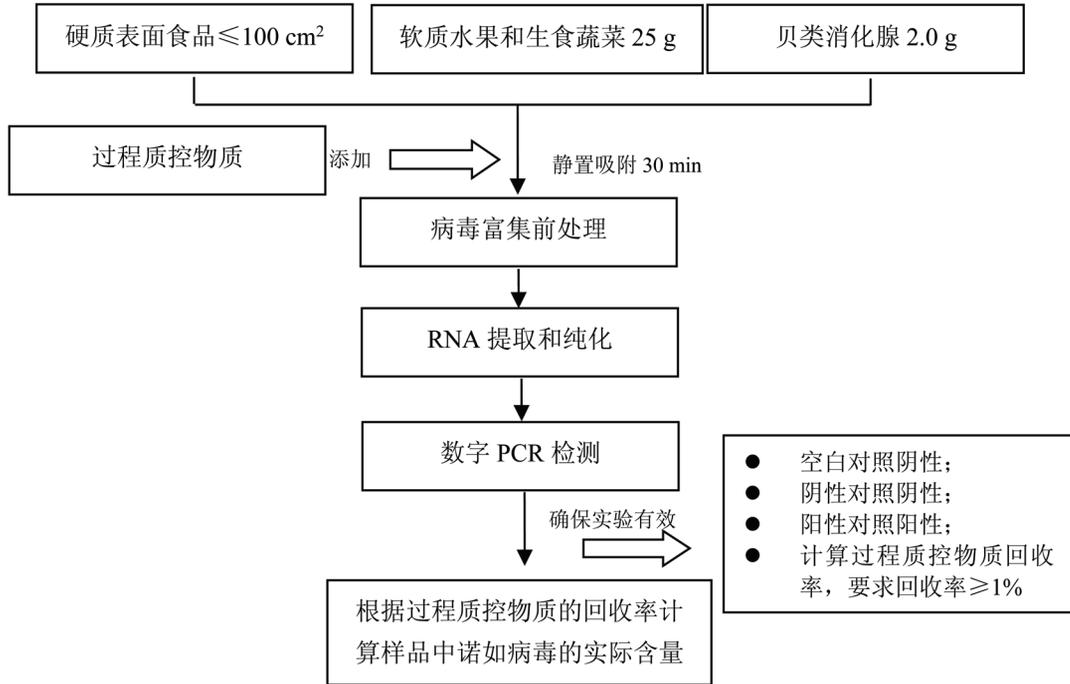


图 1 诺如病毒数字 PCR 定量检测程序

8 操作步骤

8.1 质控物质的选取

8.1.1 PC 物质

选择 MS2 噬菌体或其他等效物质作为 NV 检测的 PC 物质。体外培养获得准确的效价（浓度），达到 10^8 pfu/mL ~ 10^{11} pfu/mL，分装后保存于 -80 °C。使用时稀释至 10^7 pfu/mL ~ 10^9 pfu/mL。

8.1.2 EC RNA

以含有 G I 型 NV 和 G II 型 NV 检测目的片段的 RNA 作为检测的 EC RNA， -80 °C 保存。也可购买含有 NV 检测目的片段 RNA 的有证标准物质。

8.2 不同食品基质中的病毒富集

8.2.1 软质水果

8.2.1.1 将 25 g 软质水果或生食蔬菜切成约 $2.5\text{ cm} \times 2.5\text{ cm} \times 2.5\text{ cm}$ 的小块（如水果或蔬菜小于该体积，可不切）。

8.2.1.2 在软质水果或生食蔬菜表面添加 $10\ \mu\text{L}$ PC 物质，室温静置吸附 30 min。

8.2.1.3 将样品小块移至带有 400 mL 网状过滤袋的样品袋，加入 40 mL TGBE 溶液（软质水果样品，需加入 30 U *A.niger* 果胶酶或 1 140 U *A.acuteatus* 果胶酶）。

8.2.1.4 室温下 60 r/min，振荡 20 min。酸性软质水果需在振荡过程中，每隔 10 min 检测 pH，如 pH

值低于 9.0 时, 使用 1 mol/L NaOH 调 pH 值至 9.5, 每调整一次 pH 值, 延长振荡时间 10 min。

8.2.1.5 将振荡液转移至 50 mL 离心管, 4 ℃, 10 000 r/min, 离心 30 min。上清液转移至干净离心管中, 用 1 mol/L HCl 调 pH 至 7.0。

8.2.1.6 加入 0.25 倍体积 5 × PEG/NaCl 溶液, 摇匀, 4 ℃过夜或 60 r/min 振荡 60 min。4 ℃, 10 000 r/min, 离心 10 min 紧实沉淀, 弃上清液, 加入 500 μL PBS 悬浮沉淀。

8.2.1.7 对于浆液过多的部分软果类样品, PBS 重悬后, 加入 500 μL 的氯仿-正丁醇, 涡旋混合, 室温下孵育 5 min, 4 ℃, 10 000 r/min, 离心 15 min, 取上清液用于提取 RNA。

8.2.2 硬质表面食品

8.2.2.1 向硬表面食品表面添加 10 μL PC 物质, 添加面积不大于 100 cm², 室温静置吸附 30 min。

8.2.2.2 将无菌棉拭子使用 PBS 湿润后, 用力擦拭食品表面 (≤ 100 cm²)。记录擦拭面积。

8.2.2.3 将棉拭子浸入 490 μL PBS 缓冲液中, 按压无菌棉, 如此重复浸入和挤压 3 次 ~ 4 次, 确保挤压出最大量的病毒, 测定并记录液体 mL 数, 用于后续 RNA 提取。

8.2.3 贝类

8.2.3.1 戴上防护手套, 使用无菌贝类剥刀打开至少 10 个贝类。

8.2.3.2 使用无菌剪刀、手术钳或其他等效器具在胶垫上解剖出贝类软体组织中的消化腺, 置于干净培养皿中。收集 2.0 g ± 0.2 g 消化腺。

8.2.3.3 向收集的消化腺中添加 10 μL PC 物质, 室温静置吸附 30 min。

8.2.3.4 使用无菌刀片或等效均质器将消化腺匀浆后, 转移至离心管。加入 2.0 mL 蛋白酶 K 溶液, 混匀。

8.2.3.5 使用恒温摇床或等效装置, 37 ℃, 320 次/min, 振荡 60 min。

8.2.3.6 将离心管放入水浴或等效装置, 60 ℃, 15 min。室温, 3 000 r/min, 离心 5 min, 取上清液, 用于后续 RNA 提取。

注: 样品处理一般应在 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, 如果暂时不能检测应将样品保存在 -80 ℃冰箱中, 试验前解冻。样品处理和 PCR 反应应在单独的工作区域或房间进行。每个样品可设置 2 个 ~ 3 个平行处理。

8.3 病毒 RNA 提取和纯化

8.3.1 病毒裂解

将病毒提取液加入离心管, 加入病毒提取液等体积 Trizol 试剂, 混匀, 激烈振荡, 室温放置 5 min, 加入 0.2 倍体积氯仿, 涡旋剧烈混匀 30 s (不能过于强烈, 以免产生乳化层, 也可用手颠倒混匀), 4 ℃, 12 000 r/min, 离心 5 min, 上层水相移入新离心管中, 不能吸出中间层。

8.3.2 病毒 RNA 提取

离心管中加入等体积异丙醇, 颠倒混匀, 室温放置 5 min, 4 ℃, 12 000 r/min, 离心 5 min, 弃上清液, 倒置于吸水纸上, 沾干液体 (不同样品须在吸水纸不同地方沾干)。

8.3.3 病毒 RNA 纯化

8.3.3.1 每次加入等体积 75% 乙醇, 颠倒洗涤 RNA 沉淀 2 次。

8.3.3.2 于 4 ℃, 12 000 r/min, 离心 10 min, 小心弃上清液, 倒置于吸水纸上, 沾干液体 (不同样品须在吸水纸不同地方沾干), 离心管内残留的上清液用微量加样器吸干, 一份样本换用一个吸头, 吸头不要碰到有沉淀, 室温干燥 3 min, 不能过于干燥, 以免 RNA 不溶。

8.3.3.3 加入 100 μL 无 RNase 超纯水, 轻轻混匀, 溶解管壁上的 RNA, 2 000 r/min, 离心 5 s, 冰上

保存备用。

注：病毒 RNA 可手工提取和纯化，也可使用商品化病毒 RNA 提取和纯化试剂盒。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 立即进行反应，或保存在 4 ℃ 小于 8 h。如果长期储存建议 -80 ℃ 保存。

8.4 质量控制

8.4.1 空白对照，以无 RNase 超纯水作为空白对照。

8.4.2 阴性对照，以不含 NV 的食品样品，提取的 RNA，作为阴性对照。

8.4.3 阳性对照，以已知核酸浓度的 EC RNA，作为阳性对照。

8.4.4 PC 物质，以食品中 MS2 RNA 的回收率表示食品中 NV RNA 的回收率，用于评估检测过程的有效性和计算样品中 NV 的实际含量。

8.5 数字 PCR 扩增

8.5.1 RNA 模板稀释

病毒 RNA 提取后，根据使用的数字 PCR 平台，选择适宜的稀释倍数进行 RNA 模板稀释，稀释液用于后续定量检测。

8.5.2 反应体系的设立

每个样品的数字 PCR 反应设置 3 个平行，反应体系为：一步法数字 RT-PCR 反应预混液 10 μL，10 μmol/L 上下游引物各 1.8 μL，10 μmol/L 探针 0.5 μL，RNA 模板 2 μL，补水至反应总体积为 20 μL。

8.5.3 微反应体系生成、数字 PCR 反应扩增及结果读取

根据仪器要求，将配制好的数字 PCR 反应混合液，加入微反应体系生成装置的加样孔中，按仪器操作说明生成微反应体系。将微反应体系放置于 PCR 扩增仪中，按以下参数进行扩增：60 ℃，30 min (1 ℃ /s)，1 个循环；95 ℃，5 min (1 ℃ /s)，1 个循环；94 ℃，30 s，55 ℃，1 min (1 ℃ /s)，40 个循环；98 ℃ 10 min (1 ℃ /s)，1 个循环；12 ℃ 保存反应产物。对微反应体系进行荧光检测。

9 结果分析与表述

9.1 阈值的设定

根据数字 PCR 结果中阴性分割体系的终点荧光值设定荧光的阈值限。阈值限需要对阴性和阳性扩增结果进行明显的区分。

9.2 对照组设定

阴性对照组和空白对照组内均没有任何扩增现象，阳性对照中对 EC RNA 的检测值应该不超过其理论值的 25%，PC 对照的回收率 > 1%，有一项不符合则实验重新进行。

根据式 (1) 计算回收率：

$$B(\%) = \frac{C_{MS2} \times A \times V_1}{C_0 \times V_2} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中：

B (%) —— 回收率，即 PC 物质的检测回收率；

C_{MS2} —— PC 物质的浓度，即稀释后的 RNA 模板中 PC 物质检测目的片段的拷贝浓度，由 PC 物质的数字 PCR 检测值乘以数字 PCR 反应体系的体积后，除以数字 PCR 反应体系

中 RNA 模板的体积计算得出，单位为拷贝每微升；

A ——RNA 模板的稀释倍数；

V_1 ——提取后的 RNA 模板的体积，单位为微升；

C_0 ——添加到样品中的 PC 物质的原始浓度，单位为拷贝每微升；

V_2 ——添加到样品中的 PC 物质的体积，单位为微升。

9.3 检测结果分析和表达

9.3.1 样品结果分析和表达

每份样品的三个重复检测结果的相对标准偏差 (%) 不超过 25% 时，将三个重复检测结果的平均值作为样品的检测结果，记为 C_{Mean} (拷贝每微升)。

9.3.2 检测结果计算

9.3.2.1 无 NV 特异性荧光信号，阴性对照组和空白对照组内均没有任何扩增现象，阳性对照中对 EC RNA 的检测值应该不超过其理论值的 25%。PC 对照的回收率 > 1%，则认为待测样品中不含有 NV，检测结果表述为“未检出诺如病毒”。

9.3.2.2 待测样品 NV G I 或 G II 有显著荧光信号，且 3 个平行的 RSD ≤ 25%，则根据公式(2)计算：

$$\text{诺如病毒含量} = \frac{C_{Mean} \times A \times V_1}{B} \dots\dots\dots (2)$$

检测结果表述为“检出诺如病毒”，含量为：

XXX 拷贝 /2 g (贝类消化腺)

XXX 拷贝 /25 g (生食蔬菜和软质水果)

XXX 拷贝 /100 cm²(硬质表面食物)

附 录 A
(规范性)
PC 物质的制备

A.1 概要

本标准使用 MS2 噬菌体作为 PC 物质，也可使用其他等效，不与 NV 交叉反应的病毒作为 PC 物质。MS2 噬菌体为正义单链 RNA 病毒，基因组含有 3 569 个核苷酸。MS2 噬菌体能够感染 F⁺ (雄株) 大肠杆菌埃希氏菌属，具有可培养和纯化，抗 Dnase 或 Rnase 消化等特点，并可通过计数噬菌斑的方式，确定其效价水平。也可使用商业化 MS2 噬菌体试剂、MS2 噬菌体有证标准物质或试剂盒中的 PC 物质。

A.2 试剂和仪器

A.2.1 MS2 噬菌体 (ATCC 15597-B1)。

A.2.2 埃希氏大肠杆菌 (ATCC 15597)：埃希氏大肠杆菌 (ATCC 15597) 是 MS2 噬菌体 (ATCC 15597-B1) 的宿主菌，推荐使用营养肉汤和营养琼脂进行复苏、分离纯化和增殖。

A.2.3 培养基：

a) 底层营养琼脂：普通营养琼脂；

b) 上层营养琼脂：胰蛋白胨 10 g，NaCl 5.0 g，葡萄糖 1.0 g，琼脂粉 6.0 g，2.5 mol/L CaCl₂ 储备液 10 mL，蒸馏水 1 000 mL，调节 pH 至 7.2。

A.2.4 试剂及仪器：PBS、氯仿、生物安全柜、恒温培养箱等。

A.3 MS2 噬菌体培养及效价测定

A.3.1 MS2 噬菌体的扩增培养

埃希氏大肠杆菌 (ATCC 15597) 冻干粉接种于 5.0 mL 营养肉汤，37 °C 培养 18 h ~ 24 h，划线接种于普通营养琼脂平板，37 °C 培养 18 h ~ 24 h，挑取单个菌落划线接种于普通营养琼脂平面，37 °C 培养 18 h ~ 24 h，再挑取单个菌落接种于 5.0 mL 营养肉汤，37 °C 培养 18 h ~ 24 h 备用。

采用双层琼脂培养方法，将 0.4 mL 埃希氏大肠杆菌 (ATCC 15597) 悬液与 0.1 mL MS2 噬菌体溶液混匀，37 °C 孵育 5 min，加入 4 mL 冷却至 50 °C 左右的上层营养琼脂，混匀后倒入已铺好的下层营养琼脂上铺平，上层营养琼脂凝固，37 °C 倒置培养 17 h ~ 24 h 后观察噬菌斑。刮下上层琼脂，捣碎，加入 5.0 mL PBS 转入无菌离心管，加数滴氯仿，37 °C，220 r/min 孵育 1 h，5 000 r/min，离心 15 min，上清液即为 MS2 噬菌体悬液。重复以上方法，实现 MS2 噬菌体大量增殖，经 0.22 μm 微孔滤器除菌后，分装为 1 mL/支，-80 °C 保存。

A.3.2 噬菌体效价测定

10 倍梯度稀释 MS2 噬菌体悬液，各稀释度接种 3 个平板，按 A.3.1 双层琼脂培养方法培养 17 h ~ 24 h，取噬菌斑数在 30 个 ~ 300 个之间的平板计算 MS2 噬菌体效价：效价 = 平均 pfu 数 ÷ 接种体积 (mL) × 稀释倍数。

附 录 B
(规范性)
EC RNA 的制备¹⁾

B.1 概要

通过将目标 DNA 序列连接至合适的质粒载体上,目标序列位于 RNA 聚合酶启动子序列的下游序列,从而表达出 EC RNA。G I 型 NV EC RNA 序列位于 G I 型 NV (GenBank 登录号: AB621909.1) 的 657 bp ~ 741 bp。G II 型 NV EC RNA 序列位于 G II 型 NV (GenBank 登录号: KX586330.1) 的 4 999 bp ~ 5 096 bp。

B.2 试剂和设备

- B.2.1 限制性酶:用于连接及相关的缓冲液。
- B.2.2 DNA 纯化试剂。
- B.2.3 体外 RNA 转录试剂 (RNA 聚合酶、NTPs、缓冲液等)。
- B.2.4 RNase-free DNase。
- B.2.5 RNA 纯化试剂。
- B.2.6 DNA 凝胶电泳试剂和设备。
- B.2.7 培养箱: 37 ℃。

B.3 质粒 DNA 连接

添加 100 ng ~ 500 ng 纯化的目标 DNA 和质粒载体加入含有合适的限制酶和缓冲液的反应体系中,限制酶和缓冲液的使用按照酶厂家推荐,并确保目标序列位于质粒中 RNA 聚合酶启动子序列的下游。37 ℃培养 120 min。DNA 纯化使用 DNA 纯化试剂纯化。使用凝胶电泳检查连接情况,比较连接前与连接后目标 DNA 和质粒情况。

B.4 EC RNA 的表达

添加连接后的质粒至转化体系。该体系按照转化体系提供厂家建议配置。使用 RNA 纯化试剂纯化 RNA 后,分装, -80 ℃储存,每次检测前取出备用。

1) 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,或者含 NV 数字 PCR 检测目的片段 RNA 的有证标准物质。

附录 C

(规范性)

RNase 的去除和无 RNase 溶液的配制

C.1 RNase 的去除

C.1.1 配制溶液用的酒精、异丙醇等应采用未开封的新品。配制溶液所用的超纯水、玻璃容器、移液器吸嘴、药匙等用具应无 RNase。操作过程中应自始至终佩戴抛弃式橡胶或乳胶手套，并经常更换，以避免将皮肤上的细菌、真菌及人体自身分泌的 RNase 染用具或带入溶液。

C.1.2 玻璃容器应在 240 °C 烘烤 4 h 以去除 RNase。

C.1.3 离心管、移液器吸嘴、药匙等塑料用具应用无 RNase 超纯水室温浸泡过夜，然后灭菌，烘干；或直接购买无 RNase 的相应用具。

C.2 无 RNase 溶液的配制

C.2.1 无 RNase 超纯水

C.2.1.1 成分

超纯水	100 mL
焦碳酸二乙酯 (DEPC)	50 μ L

C.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。

C.2.2 Tris/ 甘氨酸 / 牛肉膏 (TGBE) 缓冲液

C.2.2.1 成分

Tris	12 g
甘氨酸	3.8 g
牛肉膏	10 g
无 RNase 超纯水	总体积 1 000 mL

C.2.2.2 制法

将固体物质溶解于水，将总体积调整至 1 000 mL，如果有必要，25 °C 调节 pH 至 7.3。高压灭菌。

C.2.3 5× PEG/ 氯化钠溶液 (500 g/L PEG 8000, 1.5 mol/L 氯化钠)

C.2.3.1 成分

PEG 8000	500 g
氯化钠	87 g
无 RNase 超纯水	总体积 1 000 mL

C.2.3.2 制法

将固体物质溶解在 450 mL 的水中，如必要可缓慢加热。用水将体积调整至 1 000 mL，混匀。高压灭菌后备用。

C.2.4 磷酸盐缓冲液 (PBS)

C.2.4.1 成分

氯化钠	8 g
氯化钾	0.2 g
磷酸氢二钠	1.15 g
磷酸二氢钾	0.2 g
无 RNase 超纯水	总体积 1 000 mL

C.2.4.2 制法

将固体物质溶解于水，如果有必要，25 ℃时调节 pH 至 7.3。高压灭菌。

C.2.5 氯仿 / 正丁醇混合物

C.2.5.1 成分

氯仿	10 mL
丁醇	10 mL

C.2.5.2 制法

将上述组分混匀。

C.2.6 蛋白酶 K 溶液

C.2.6.1 成分

蛋白酶 K (30 U/mg)	20 mg
无 RNase 超纯水	200 mL

C.2.6.2 制法

将蛋白酶 K 溶于水中。彻底混合。储备液 -20 ℃保存，最多可储存 6 个月。一旦解冻使用，4 ℃保存，1 周内使用。

C.2.7 75% 乙醇

C.2.7.1 成分

无水乙醇	7.5 mL
无 RNase 超纯水	2.5 mL

C.2.7.2 制法

加无 RNase 超纯水 2.5 mL，现配现用。

C.2.8 Trizol 试剂

C.2.8.1 成分

异硫氰酸胍	250 g
0.75 mol/L 柠檬酸钠溶液 (pH ≥ 7)	17.6 mL
10% 十二烷基肌氨酸钠 (Sarcosyl) 溶液	26.4 mL
2 mol/L NaAc 溶液 (pH ≥ 4)	50 mL
无 RNase 超纯水	293 mL
重蒸苯酚	500 mL

C.2.8.2 制法

在 2 L 的烧杯中加入无 RNase 超纯水，然后依次异硫氰酸胍、柠檬酸钠溶液、十二烷基肌氨酸钠溶液、NaAc 液溶，混合均匀；加入重蒸苯酚，混合均匀。Trizol 试剂需 4 °C 低温保存，保质期约一年。也可使用商业化的试剂。

附 录 D
(资料性)
数字 PCR 扩增序列

D.1 G I 型 NV 数字 PCR 扩增区域

CGCTGGATGC GCTTCCATGA TCTGAGCATG TGGACAGGGG ATCGCGATCT CCTGCCCGAT
TATGTAAATG ATGATGGCGT CTAAG

D.2 G II 型 NV 数字 PCR 扩增区域

CAAGAGCCG ATGTTTCAGAT GGATGAGATT CTCGGATCTG AGCACGTGGG AGGGCGATCG
CAATCTGGCT CCCAGTTTTG TGAATGAAGA TGGCGTCGA

D.3 MS2 噬菌体数字 PCR 扩增区域

GGCTGCTCGC GGATACCCGT ACCTCGGGTT TCCGTCTTGC TCGTATCGCT CGAGAACGCA
AGTTCTTCAG CGAAAAGCAC GACAGTGGTC GCTACATAGC GTGGTTCCAT ACTGGAGGTG
AAATCACCGA CAGCATGAAT TCCGCCGGCG TGC GCGTTAT ACGCACTTCG GAGTGGCTAA
CGCCGGTTCC CACATTCCT CA
