

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4784—2017

出口食品中诺如病毒和甲肝病毒 检测方法 实时 RT-PCR 方法

Qualitative detection of Norovirus and Hepatitis A virus
in food for export—Real-time RT-PCR

2017-05-12 发布

2017-12-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国山东出入境检验检疫局、中华人民共和国烟台出入境检验检疫局、中华人民共和国丹东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：赵玉然、尹伟力、薛晓宁、岳志芹、房保海、张瑾、麻丽丹、刘鑫、郑小龙、孙涛、王群。

出口食品中诺如病毒和甲肝病毒 检测方法 实时 RT-PCR 方法

1 范围

本标准规定了软果、硬果、瓶装水和贝类中诺如病毒 G I、G II 型和甲肝病毒的实时荧光 RT-PCR 检测方法。

本标准适用于软果、硬果、瓶装水和贝类中诺如病毒 G I、G II 型和甲肝病毒的定性检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 19495.2 转基因产品检测 实验室技术要求

3 术语和定义及缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

诺如病毒 Norovirus

诺如病毒为单股正链 RNA 病毒,属于人类杯状病毒属,是一种引起非细菌性急性胃肠炎的病毒。诺如病毒感染性强,以肠道传播为主,通过口-粪传播,以污染的水源、食物、贝类、物品、空气作为主要传播载体。诺如病毒可分为 G I~G V 五个基因群,其中引起人类感染的主要是 G I 和 G II 群。

3.1.2

甲肝病毒 Hepatitis A virus

甲肝病毒为单股正链 RNA 病毒,微小 RNA 病毒科中,嗜肝 RNA 病毒属,该属仅有 HAV 一个种。人类感染 HAV 后,大多表现为亚临床或隐性感染,出现呕吐、腹泻、黄疸症状,该病毒主要通过粪-口途径传播,以污染水源、食物、海产品(如毛蚶等)、食具等作为传播载体。

3.1.3

Ct 值 cycle threshold value

荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

3.1.4

过程质控物质 process control material

通过添加与目的病毒类似、已知含量的外源质控物质,来监测整个检测过程,包括病毒收集、核酸提取与实时荧光 RT-PCR 过程,通过对最终过程质控物质回收率的计算,来评价整个检测过程的有效性。

3.1.5

外源质控 RNA external control RNA

在实时荧光 RT-PCR 过程中通过添加与目的检测 RNA 相似或相同的、已知含量的外源对照

RNA,用于检测 RNA 逆转录过程中有无抑制剂成分。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

NV:诺如病毒(Norovirus)

HAV:甲肝病毒(Hepatitis A virus)

RT-PCR:逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction)

PC:过程质控(process control)

EC RNA:外源质控 RNA(external control RNA)

4 试剂

所有实验用试剂均为分析纯;除特别说明外,实验用水为蒸馏水或去离子水。

4.1 果胶酶,来源于黑曲霉(*Aspergillus niger*) (20 U/mg)。

4.2 蛋白酶 K(20 mg/mL)。

4.3 TGBE 缓冲液见 A.1。

4.4 PEG 缓冲液见 A.2。

4.5 PBS 缓冲液见 A.3。

4.6 盐酸溶液见 A.4。

4.7 氢氧化钠溶液见 A.5。

4.8 硫氰酸胍裂解缓冲液见 A.6。

4.9 氯仿。

4.10 正丁醇。

4.11 磁珠法 RNA 提取试剂盒。

4.12 下列物质均购自于 ATCC:

a) Mengo 病毒(MC₀ 突变株,ATCC VR-1597TM);

b) Hela 细胞(ATCC CCL-2TM);

c) MS2 噬菌体(ATCC 15597B1);

d) 宿主细菌 *E.coli* (ATCC 15597)。

4.13 引物和探针:根据表 1 的序列进行引物和探针的合成,加入无 RNase 超纯水配制成 10 μmol/L 浓度。引物扩增区域参见附录 B。

表 1 实时荧光 RT-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
Norovirus G I	正向引物 QNIF 4;CGC TGG ATG CGN TTC CAT 反向引物 NV1LCR;CCT TAG ACG CCA TCA TCA TTT AC 探针 NVGG1P;FAM-TGG ACA GGA GAYCGCRATCT-BHQ	86	M87661 5291-5376
Norovirus G II	正向引物 QNIF2;ATG TTC AGR TGG ATG AGR TTC TCW GA 反向引物 COG2R;TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA 探针 QNIFS;FAM-AGC ACR TGG GAG GGC GAT CG-BHQ	89	X86557 5012-5100

表 1(续)

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
HAV	正向引物 HAV68;TCA CCG CCG TTT GCC TAG 反向引物 HAV240;GGA GAG CCC TGG AAG AAA G 探针 HAV150(-);FAM-CCT GAA CCT GCA GGA ATT AA-MGB	173	M59809 68-240
Mengo	正向引物 Mengo 110(FW);GCG GGT CCT GCC GAA AGT 反向引物 Mengo 209(REV);GAA GTA ACA TAT AGA CAG ACG CAC AC 探针 Mengo 147(PROBE);FAM-ATC ACA TTA CTG GCC GAA GC-MGB	100	L22089 110-209
MS2	正向引物 MS2-TM2-F;GGC TGC TCG CGG ATA CCC 反向引物 MS2-TM2-R;TGA GGG AAT GTG GGA ACC G 探针 MS2-TM2;JOE-ACC TCG GGT TTC CGT CTT GCT CGT-BHQ	202	JF 719743.1 3135-3336

5 仪器与耗材

- 5.1 实时荧光 PCR 仪。
- 5.2 冷冻离心机。
- 5.3 振荡摇床。
- 5.4 恒温振荡水浴摇床。
- 5.5 pH 计。
- 5.6 超滤管。
- 5.7 50 mL 离心管。
- 5.8 0.45 μm 的正离子滤膜。

6 实验室环境与操作要求

实验室检测环境应符合 GB 19489 的要求,操作技术规范应符合 GB/T 19495.2 的要求。

7 检测方法

7.1 质控物质的选取

7.1.1 PC 物质

PC 物质可以选择 Mengo 病毒或者 MS2 噬菌体,检测实验室根据自身条件选择其一,两种 PC 物质制备方法参见附录 C。

7.1.2 EC RNA

EC RNA 为已知核酸浓度且含有 NV G I、NV G II、HAV 目的检测片段的 RNA。

7.2 病毒的收集

7.2.1 硬果表面病毒的收集

7.2.1.1 将浸润 PBS 的无菌棉擦拭硬果表面,记录擦拭面积,本方法适合最大擦拭面积约 100 cm²。

7.2.1.2 在擦拭样品的无菌棉中加入 10 μL PC 物质后放入 500 μL 0.5 mol/L 的硫氰酸胍裂解缓冲液中,按压无菌棉,将液体全部挤出,重复上述操作 3 次,留取裂解液用于提取 RNA。

7.2.2 软果表面病毒的收集

7.2.2.1 取软果 6 颗~12 颗放入 400 mL 体积的带滤网的均质袋中,加入 40 mL TGBE 缓冲液、30 U 的黑曲霉果胶酶及 10 μL 的 PC 物质,室温下 60 r/min 振荡孵育 20 min。对于酸性软果,在孵育过程中,每 10 min 监测洗脱液的 pH 值,当 pH 值低于 9.0,则应用 NaOH 溶液调节至 9.5。每调节一次 pH 值,则需要延长 10 min 的孵育时间。

7.2.2.2 将洗脱液转移到 50 mL 离心管中,4 ℃ 10 000 g 离心 30 min,上清液转入干净的离心管中,用 1 mol/L 盐酸溶液将 pH 调节至 7.0。

7.2.2.3 加入 0.25 体积的 5×PEG/NaCl 溶液,振荡 60 s,5 ℃ 过夜或 60 r/min 振荡孵育 60 min。5 ℃ 10 000 g 离心 30 min,弃上清液,50 ℃ 10 000 g 离心 5 min,弃上清液,加入 500 μL PBS 重悬沉淀。

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

7.2.3 瓶装水中病毒的收集

7.2.3.1 测量样品体积(适合 0.3 L~5 L),加入 10 μL PC 物质,混匀。

7.2.3.2 正压或抽滤方法将水体滤过直径 47 mm、孔径 0.45 μm 的正离子滤膜,将滤膜转移至一新的 50 mL 离心管 A 中,加入 4 mL TGBE 缓冲液。

7.2.3.3 在原盛装样品的瓶子中加入 10 mL TGBE 缓冲液,室温下 500 r/min 摇床振荡离心管 A 和瓶子 20 min,收集离心管 A 和容器中的洗脱液至新离心管 B 中。

7.2.3.4 在瓶子中再加入 TGBE 缓冲液 2 mL,颠倒数次冲刷瓶壁,收集洗脱液至 50 mL 离心管 B 中。

7.2.3.5 用 0.1 mol/L 盐酸溶液调节洗脱液至 pH 7.0,收集洗脱液并转移至超滤管,4 000 g 离心 15 min。将超滤管底浓缩液转移至新的离心管,用 PBS 溶液补齐体积至 500 μL,保留用于 RNA 的提取。

7.2.4 贝类中病毒的收集

7.2.4.1 取样数量不得少于 10 只,用无菌刀剥离贝类内脏团中消化腺,匀浆,称取约 2 g 并转移至 50 mL 离心管中,加入 1 mL PBS 混匀,加入 10 μL PC 物质。

7.2.4.2 加入 10 μL 的蛋白酶 K,漩涡混匀,37 ℃ 320 r/min 摇床孵育 1 h,而后 60 ℃ 水浴摇床再次孵育 15 min。

7.2.4.3 室温下 3 000 g 离心 5 min,取上清液转移至一新的 50 mL 离心管中,记录体积数,用于 RNA 的提取。

7.2.5 阴性对照

病毒收集过程中,需以无菌水作为阴性对照,与样品进行同步操作。

7.3 RNA 的提取和纯化

建议采用磁珠吸附核酸的方法提取样品中的 RNA,具体核酸提取步骤参照商业化试剂盒,RNA 提

取后应尽快进行下一步实验操作。

7.4 实时荧光 RT-PCR

7.4.1 实时荧光 RT-PCR 反应体系的设立

实时 RT-PCR 反应体系为一步法 RT-PCR 反应混液 12.5 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各 1 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 探针 0.5 μL , 反应底物 5 μL , 补水至反应终体积为 25 μL , 也可采用商业化试剂盒。

7.4.2 反应底物与对照的设立

每个检测样品 RNA 需分别以原浓度及 10 倍稀释浓度作为模板进行实时 RT-PCR 反应, 同时设立 PC 物质对照、EC RNA 对照、阴性对照。实时 RT-PCR 过程中还应当以水作为模板设立空白对照, 加样位置按照附录 D, 反应底物如下:

- a) 未稀释的样品 RNA 5 μL ;
- b) 10 倍稀释的样品 RNA 5 μL ;
- c) 未稀释样品 RNA 5 μL +EC RNA 1 μL ;
- d) 10 倍稀释的样品 RNA 5 μL +EC RNA 1 μL ;
- e) 5 μL H_2O +EC RNA 1 μL ;
- f) 5 μL H_2O ;
- g) 5 μL 阴性对照。

7.5 标准曲线的绘制

将 PC 物质, 95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min 以释放 RNA, 迅速冷却, 3 000 g 离心 1 min, 转移上清至一新的离心管中, 利用 OD_{260} 计算核酸浓度, 利用阿伏伽德罗常数换算拷贝数(参见附录 C)。将 RNA 用无菌水进行 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 系列稀释后, 以 RNA 原液、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 四个浓度的样品为模板进行实时 RT-PCR 扩增, 选取至少 3 个呈良好线性关系的点绘制标准曲线, 标准曲线 r^2 值应 >0.98 。

7.6 实时荧光 RT-PCR 反应

实时 RT-PCR 反应过程应包括逆转录、逆转录灭活、变性、退火、延伸这 5 个过程, 反应参数为: 55 $^{\circ}\text{C}$ 60 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s; 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; 65 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 反应 45 个循环。观察扩增曲线, 并记录 Ct 值, 分析检测数据, 也可采用其他商业化等效试剂盒。

8 结果分析

8.1 实时 RT-PCR 扩增效率的评价

8.1.1 当 $\text{Ct}(\text{样品 RNA 原液} + \text{EC RNA}) - \text{Ct}(\text{H}_2\text{O} + \text{EC RNA}) < 2.00$, 表明实时 RT-PCR 扩增效果良好。

8.1.2 当 $\text{Ct}(\text{样品 RNA 原液} + \text{EC RNA}) - \text{Ct}(\text{H}_2\text{O} + \text{EC RNA}) > 2.00$, 表明样品中有实时 RT-PCR 抑制剂存在, 应进行 10^{-1} 样品的检测, 参照 8.1.3 与 8.1.4。

8.1.3 当 $\text{Ct}(\text{样品 } 10^{-1} \text{ RNA 原液} + \text{EC RNA}) - \text{Ct}(\text{H}_2\text{O} + \text{EC RNA}) < 2.00$, 表明实时 RT-PCR 扩增效果良好。

8.1.4 当 $\text{Ct}(\text{样品 } 10^{-1} \text{ RNA 原液} + \text{EC RNA}) - \text{Ct}(\text{H}_2\text{O} + \text{EC RNA}) > 2.00$, 该结果表明样品中有实时 RT-PCR 抑制剂存在, 结果不可取。

8.1.5 但当 EC RNA 扩增效率不满意,样品 RNA 检测结果却呈现明显的阳性,可根据具体情况另行判定。

8.2 病毒检测效率的评价

PC 物质与样品同时进行检测后,记录 PC 物质 Ct 值,利用标准曲线计算 PC 物质回收含量,推算 PC 物质回收率,回收率=病毒回收含量/添加病毒含量×稀释倍数×100%,当 PC 物质的回收率大于 1%时,表明该次检测有效。在计算 PC 物质回收含量时,应考虑取样的体积及样品孔是否为 10 倍稀释样品,若为 10 倍稀释样品,则 PC 物质含量应乘以 10。

8.3 结果判断及表述

8.3.1 对于每一份样品的检测,其 EC RNA、PC 物质的扩增曲线和 Ct 值都应在其预期的范围内,超出预期范围即视为本次检测无效,应重新进行检测操作,该检测方法原则上最低可检测出 10 个拷贝的核酸。

8.3.2 对于每一份样品的检测,空白对照、阴性对照都应该无扩增曲线,若出现扩增曲线则视为本次检测无效,应重新进行检测操作。

8.3.3 对于每一份样品检测应充分考虑荧光本底对扩增曲线和 Ct 值的影响。

8.3.4 诸如病毒检测结果的判定:

- a) 待检测样品的 NV G I Ct 值小于或等于 40 时,且扩增曲线呈现良好的“S”型,结果判定为 NV G I 型阳性;
- b) 待检测样品的 NV G II Ct 值小于或等于 40 时,且扩增曲线呈现良好的“S”型,结果判定为 NV G II 型阳性;
- c) 待测样品 NV G I 无明显“S”型扩增曲线,结果判定为 NV G I 阴性;
- d) 待测样品 NV G II 无明显“S”型扩增曲线,结果判定为 NV G II 阴性;
- e) 待测样品 NV G I Ct 值大于 40 而小于 45,有但不是明显“S”型扩增曲线,且荧光信号值低,结果判定 NV G I 为阴性;
- f) 待测样品 NV G II Ct 值大于 40 而小于 45,有但不是明显“S”型扩增曲线,且荧光信号值低,结果判定 NV G II 为阴性;
- g) 待测样品 NV G I、G II 中有一个为阳性则可判定为 NV 检测阳性,两者均为阴性时方可判定为 NV 阴性。

8.3.5 甲肝病毒检测结果的判定

- a) 待检测样品的 HAV Ct 值小于或等于 40 时,且扩增曲线呈现良好的“S”型,结果判定为 HAV 阳性。
- b) 待测样品 HAV 无明显“S”型扩增曲线,结果判定为 HAV 阴性。
- c) 待测样品 HAV Ct 值大于 40 而小于 45,有但不是明显“S”型扩增曲线,且荧光信号值低,结果判定为 HAV 阴性。

附 录 A
(规范性附录)
溶液的配制

A.1 TGBE 缓冲液

Tris	12.1 g
甘氨酸	3.8 g
牛肉浸出粉	10 g
双蒸水	800 mL

氢氧化钠溶液(5 mol/L)调 pH 至 9.5 ± 0.2 , 加入双蒸水至 1 000 mL, 121 °C, 15 min 灭菌备用。

A.2 5×PEG/NaCl 缓冲液

PEG 8 000	500 g
NaCl	87 g

加双蒸水至 1 000 mL, 121 °C, 15 min 灭菌备用。

A.3 PBS

磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.2 g
磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	1.15 g
氯化钠(NaCl)	8 g
氯化钾(KCl)	0.2 g

加双蒸水至 1 000 mL, 调节 pH 至 7.3 ± 0.2 。

A.4 盐酸溶液(1 mol/L)

盐酸	34.4 mL
双蒸水	400 mL

A.5 氢氧化钠溶液(1 mol/L/4%)

氢氧化钠	4 g
双蒸水	100 mL

A.6 硫氰酸胍裂解缓冲液(5 mol/L)

硫氰酸胍	59.08 g
加双蒸水定容至	100 mL

附 录 B

(资料性附录)

实时荧光 RT-PCR 扩增区核酸序列

B.1 HAV 实时荧光 RT-PCR 扩增区核酸序列

TCACCGCCGTTTGCCTAGGCTATAGGCTAAATTTCCCTTTCCCTGTCCTTCCCTTATTTCCC
TTTGTTTTGCTTGTAATAATTAATTCCTGCAGGTTTCAGGGTTCTTAAATCATGTTTCCCT
ATAAGAACACTCAATTTTCACGCTTCTGTCTTCTTCTTCCAGGGCTCTCC

B.2 NV 实时荧光 RT-PCR 扩增区核酸序列

G I :CGCTGGATGCGCTTCCATGACCTCGGATTGTGGACAGGAGATCGCGATCTTCTGC
CCGAATTCGTAAATGATGATGGCGTCTAAGG

G II :ATGTTTCAGGTGGATGAGATTCTCTGACCTCAGCACATGGGAGGGCGATCGCAATC
TTGCTCCCGAAGGTGTGAATGAAGATGGCGTCTCA

B.3 Mengo 病毒实时荧光 RT-PCR 扩增区核酸序列

GCGGGTCCTGCCGAAAGTGCCAACCCAAAACCACATAATCACATTACTGGCCGAAGCCGC
TTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTCTGTCTATATGTTACTTC

B.4 MS2 噬菌体实时荧光 RT-PCR 扩增区核酸序列

GGCTGCTCGCGGATACCCGTACCTCGGGTTTCCGTCTTGCTCGTATCGCTCGAGAACGCA
AGTTCTTCAGCGAAAAGCACGACAGTGGTCGCTACATAGCGTGGTTCCATACTGGAGGTG
AAATCACCGACAGCATGAATTCGCCGGCGTGC GCGTTATACGCACTTCGGAGTGGCTAA
CGCCGGTCCCACATTCCCTCA

附录 C
(资料性附录)
PC 物质的培养

C.1 Mengo 病毒的培养

C.1.1 毒株: Mengo 病毒(MC₀ ATCC VR-1597TM)。

C.1.2 细胞: HeLa 细胞(ATCC CCL-2TM)。

C.1.3 培养液: DMEM(高糖)培养基+10%胎牛血清+1%抗生素。

C.1.4 温度: 37℃。

C.1.5 气体: 空气 95%, CO₂ 5%。

C.1.6 培养: 待单层细胞生长至培养面的 80%~90%, 接种毒株, 继续培养直至 75%的细胞出现病变, 细胞冻融一次, 收集于一离心管中, 3 000 g 离心 10 min, 收集上清液, 用 PBS 按照 10~10⁷ 稀释, 测定病毒 T_{CID₅₀}。

C.1.7 核酸浓度: 病毒合理稀释浓度还应指其核酸浓度范围应在 10⁶~10⁸ 拷贝/mL。

C.1.8 核酸拷贝数与浓度的换算: 核酸浓度与拷贝数通过阿伏伽德罗常数进行换算, RNA 的量是 ng/ μ L, 那么拷贝数(copies/ μ L)=[(ng 数 \times 10⁻⁹) \times (6.02 \times 10²³)] \div (碱基数 \times 340)。

C.2 MS2 噬菌体的培养**C.2.1 试剂和材料**

C.2.1.1 噬菌体和菌株: 大肠杆菌噬菌体 MS2(ATCC 15597B1)。

C.2.1.2 宿主细菌: *E. coli* ATCC 15597。

C.2.1.3 培养基: 悬浮培养基(SM)、LB 固体培养基、LB 半固体培养基(顶部培养基)、TSA-YE。

C.2.2 培养方法**C.2.2.1 宿主菌的制备**

先用接种环挑出一点菌种接种在 TSA-YE 平板上过夜培养, 而后挑取 1 移菌环细菌至 10 mL LB 液体培养基中, 培养过夜。

C.2.2.2 MS2 噬菌体的制备

C.2.2.2.1 将培养的宿主菌 *E. coli* 培养液按照 5:1 的比例加入 MS2 噬菌体原液(大约 10⁸ PFU/mL~10⁹ PFU/mL), 充分均匀混合, 静置 15 min 使其感染。

C.2.2.2.2 将混合液按照 1:10 的比例加入到冷却至 45℃的 0.7%琼脂 LB 半固体培养基中, 立即均匀混合并平铺在已倒好的 LB 固体琼脂培养基平板上, 待平板凝固后移至 37℃培养箱中倒置培养 12 h~18 h, 同时设立空白对照组。

C.2.2.2.3 将培养好的平板与对照组比较其澄清度, 一般含噬菌体的平板呈澄清状或存在大量噬菌斑, 而仅含寄主细菌之对照组则呈混浊状。

C.2.2.2.4 将含有噬菌体的平板置于-20℃下 4 h~5 h 后, 取出置于室温下解冻。将解冻后产生的液

体移入离心管中,以 10 000 r/min 离心 10 min 以沉淀宿主菌。将上清液移至新管中,以 0.22 μm 孔径之过滤器去除残余菌体,即得不含寄主细菌之噬菌体原液。

C.2.2.2.5 噬菌体效价的确定:双层琼脂法测定噬菌体效价,并利用 PBS 进行稀释,适用于本实验合理的效价范围应大约 10^8 PFU/mL \sim 10^9 PFU/mL,效价(PFU/mL)=平均噬斑数 \times 稀释倍数 \times 10。

附录 D
(规范性附录)
点样矩阵

PC 物质、EC RNA、阳性对照、阴性对照 96 孔板点样示意图, 见图 D.1。

	1	2	3	4	5	6	7	8
A(HAV 检测组)	样品原液	样品 $\times 10^{-1}$	样品原液 + HAV EC RNA	样品 $\times 10^{-1}$ + HAV EC RNA	H ₂ O + HAV EC RNA	H ₂ O (空白)	阴性对照	
B(NV G I 检测组)	样品原液	样品 $\times 10^{-1}$	样品原液 + NV G I EC RNA	样品 $\times 10^{-1}$ + NV G I EC RNA	H ₂ O + NV G I EC RNA	H ₂ O (空白)	阴性对照	
C(NV G II 检测组)	样品原液	样品 $\times 10^{-1}$	样品原液 + NV G II EC RNA	样品 $\times 10^{-1}$ + NV G II EC RNA	H ₂ O + NV G II EC RNA	H ₂ O (空白)	阴性对照	
D(PC 物质组)	样品原液	样品 $\times 10^{-1}$	PC 物质原液	PC 物质 $\times 10^{-1}$	PC 物质 $\times 10^{-2}$	PC 物质 $\times 10^{-3}$	H ₂ O (空白)	阴性对照
E								
F								
G								
H								

图 D.1