

诺如病毒检验用大肠杆菌噬菌体 MS2 标准物质的研制

骆海朋, 瞿洪仁, 任秀, 陈怡文, 白继超, 余文, 刘娜, 李景云*, 崔生辉*

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要: 目的 制备均匀性和稳定性符合要求的大肠杆菌噬菌体 MS2 标准物质, 用于诺如病毒检验过程质量控制。**方法** 对大肠杆菌噬菌体 MS2 (CMCCPh001)进行分子生物学确认。采用冷冻干燥技术制成微球状标准物质, 并进行均匀性、长期稳定性、短期稳定性检验。以牡蛎等 5 种样品作为基质, 对使用效果进行确认。**结果** 制备的样品呈球形、白色、大小均一, 其均匀性符合要求, 经-20 °C 12 个月长期储存, 样品稳定, 经 4 °C 28 d 以及 37 °C 5 d 的短期储存, 样品稳定。阈值循环数(threshold cycle, Cq)值与均匀性检平均值差异不大。牡蛎等 5 种样品使用效果确认实验表明, 该标准物质可以作为食品诺如病毒检验过程质量控制使用。**结论** 大肠杆菌噬菌体 MS2 (CMCCPh001)分子水平鉴定结果符合大肠杆菌噬菌体 MS2 特征。均匀性、长期稳定性、短期稳定性及适用性实验结果符合作为诺如病毒检验过程质量控制标准物质的要求。

关键词: 诺如病毒; 微生物标准物质; 大肠杆菌噬菌体 MS2; 冷冻干燥

Preparation of coliphage MS2 reference material for norovirus test

LUO Hai-Peng, QU Hong-Ren, REN Xiu, CHEN Yi-Wen, BAI Ji-Chao, YU Wen, LIU Na, LI Jing-Yun*, CUI Sheng-Hui*

(National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

ABSTRACT: Objective To prepare coliphage MS2 reference material with required uniformity and stability, which can be used for the quality control of norovirus detection process. **Methods** The coliphage MS2 (CMCCPh001) was confirmed by molecular biology method. The microsphere-shaped reference material was prepared by freeze-drying technology, and the homogeneity, long-term stability and short-term stability were tested. Five kinds of samples including oyster were used as the matrixes to confirm the using effects. **Results** The prepared samples were spherical, white and uniform in size, and their uniformity met the requirements. After long-term storage at -20 °C for 12 months, the samples were stable. After short-term storage at 4 °C for 28 d and 37 °C for 5 d, the samples were stable. There was no significant difference between the threshold cycle (Cq) value and the average value of uniformity test. The validation experiment of 5 kinds of samples such as oyster showed that the reference

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1603900)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFC1603900)

*通信作者: 李景云, 主任技师, 主要研究方向为食品药品微生物检验。E-mail: jingyunli50@sohu.com

崔生辉, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: cuishenghui@aliyun.com

*Corresponding authors: LI Jing-Yun, Chief Technician, National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China. E-mail: jingyunli50@sohu.com

CUI Sheng-Hui, Ph.D, Professor, National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China. E-mail: cuishenghui@aliyun.com

material could be used as the quality control of food norovirus detection process. **Conclusion** The molecular level identification result of coliphage MS2 (CMCCPh001) is consistent with the characteristics of coliphage MS2. The uniformity, long-term stability, short-term stability and applicability test results meet the requirements for quality control reference materials in the norovirus inspection process.

KEY WORDS: norovirus; microbial reference material; coliphage MS2; freeze-drying

0 引言

在食品安全中, 常见的引起食源性疾病的病毒有诺如病毒、甲肝病毒等。其中诺如病毒(norovirus, NV)是目前引起食源性疾病爆发最多的食源性病毒^[1], 被认为是引起非细菌性腹泻的主要病原^[2-3]。诺如病毒形状为小圆形, 直径 27 nm, 属于杯状病毒科, 诺瓦克病毒属。其中 GI 和 GII 为感染人类的主要类型。感染的主要症状包括恶心、呕吐、腹泻、腹痛、头痛、发热等, 年老体弱的患者症状可能更严重, 也有无症状感染者^[4-5]。

在诺如病毒等相关食品病毒检验中, 常用的方法有酶联免疫法、实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time polymerase chain reaction, RT-PCR)的方法等, 其中 RT-PCR 具有特异性高、灵敏的特点, 在食品检测中广泛应用^[6], 被很多国家和组织选用作为检验标准, 如中国食品安全国家标准、美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)、国际标准化组织(International Standard Organization, ISO)等。但是 RT-PCR 方法在食品病毒检测过程中受多种因素影响, 如荧光定量 PCR 仪器质量的差异、病毒富集方法、病毒 RNA 提取试剂盒的效率、RT-PCR 扩增试剂盒的质量、食品样品基质及提取的 RNA 模板中抑制剂等。为保证检验过程的质量, 需要一个稳定、可靠、符合生物安全、又不存在交叉污染的微生物标准物质对检验过程进行质量控制。

大肠杆菌噬菌体 MS2 可以作为 RNA 病毒分子生物学检测过程的质量控制物质, 它有以下 2 个优点^[7]: (1)噬菌体(phage)是侵袭细菌的 RNA 病毒, 其有严格的宿主特异性, 只感染特定的宿主细菌, 这是由噬菌体吸附器官和受体菌表面受体的分子结构互补性决定的, 它对人畜没有危害, 生物安全可以满足微生物标准物质的要求。(2)大肠杆菌噬菌体 MS2 (coliphage MS2)能够以大肠杆菌为宿主高浓度制备, 浓度可达到 $10^{10} \sim 10^{12}$ PFU/mL, 制备起来比较方便。

房保海等^[8]采用液体培养法制备大肠杆菌噬菌体 MS2 标准物质用于贝类样品诺如病毒检测过程质量控制。王国强等^[9]使用大肠杆菌噬菌体 MS2 制备盔甲 RNA (armored RNA) 用于新冠病毒检测过程质量控制。徐蕾蕊等^[10]采用双层琼脂法制备大肠杆菌噬菌体 MS2 标准物质用于贝类食源性病毒检测过程质量控制。但是, 上述制备的大肠杆菌噬菌体 MS2 标准物质的状态都是液体, 在运输和储存上要求比较严格。本研究采用冷冻干燥技术制备大肠杆菌噬菌体 MS2 标准物

质, 以提高样品的稳定性, 方便于运输、储存和使用, 以期为诺如病毒的准确检验提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌毒株

大肠杆菌噬菌体 MS2 (coliphage MS2) CMCCPh001(中国医学菌种保藏中心); 大肠杆菌 K12 CICC29001(中国工业菌种保藏中心)。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器:

LABCONCO FreeZone12L 冷冻干燥机(德国 LABCONCO 公司); PL2002 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司); Thermo SHKE4000-8CE 摇床、Thermo1389 生物安全柜、Thermo205050GC 恒温培养箱、Thermo 贺力氏 21R 离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Bio-rad CF96 荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2.2 培养基及试剂

大肠杆菌噬菌体 MS2 液体培养基(批号: 20170630, 招远拓普生物工程有限公司); 营养琼脂作为底层琼脂(批号: 170502, 北京陆桥生物技术有限公司); N-0 保护剂(批号: 20180825, 中国食品药品检定研究院); 蛋白胨(批号: 1900407, 英国 OXOID 公司); NaCl(批号: F201906002)、CaCl₂(批号: F20100527)(国药集团化学试剂有限公司); 葡萄糖(批号: WXBD0576V, 德国 VETEC 公司); 琼脂粉(批号: 1033190, 美国 BD 公司)。

上层琼脂培养基的配制: 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 1000 mL, pH 7.2。

磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)(批号: 1967438, 美国 Gibco 公司); 蛋白酶 K(批号: 34043200)、高纯度病毒核酸试剂盒(批号: 30607100, 瑞士 Roche 公司); 一步法 RT-PCR 试剂盒(批号: AI11575A, 日本 TAKARA 公司); Tris(批号: 0883c358, 美国 Amresco 公司); 甘氨酸[批号: W0507L050, 生工生物工程(上海)股份有限公司]; 牛肉膏(批号: 20160411, 中国医药集团有限公司)。

大肠杆菌噬菌体 MS2 引物^[11]及探针: MS2-TM3-F Sense TM3 LC/RG 5'-GGCTGCTCGCGGATACCC-3'、MS2-TM3-R Antisense TM3 RG 5'-TGAGGGAAATGTGG

GAACCG-3', 探针: [JOE]-ACCTCGGGTTTCCGTCTTGC TCGT-[BHQ1](北京天一辉远公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 大肠杆菌噬菌体 MS2 培养方法

挑取 ATCC1597、大肠杆菌 K12 的新鲜二代培养物接种于噬菌体液体培养, 于摇床 36 °C, 180 r/min。培养 4 h 至对数期。取噬菌体的富集培养物 2 mL, 加入到液体培养基, 摇匀, 静置 0.5 h, 然后于摇床 36 °C, 195 r/min 进行培养 24 h。将 100 mL 培养物加入 2 mL 的氯仿, 继续 36 °C 振荡 10 min。将上述培养物于离心机中, 5000 r/min 离心 15 min。将上清液使用 0.45 μm 的滤膜过滤, 于-70 °C 保存, 用于大肠杆菌噬菌体 MS2 标准物质的冷冻干燥。

1.3.2 大肠杆菌 MS2 噬菌体的确认

使用高纯病毒 RNA 试剂盒提取大肠杆菌噬菌体 MS2 的 RNA, 然后使用 1.2.2 中的大肠杆菌噬菌体 MS2 引物进行 RT-PCR, 将产物送公司进行测序然后于美国国家生物信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)网站进行比对分析。

1.3.3 大肠杆菌噬菌体 MS2 培养物的双层平板计数

大肠杆菌噬菌体 MS2 培养物稀释: 使用灭菌后营养肉汤对大肠杆菌噬菌体 MS2 培养物进行 10 倍的系列稀释。从原液到 10⁻¹⁰ 进行稀释, 用于接种培养^[12]。

噬菌体与大肠杆菌 MS2 的结合: 将大肠杆菌 K12 接种于营养肉汤, 36 °C 培养 18 h, 取 300 μL 的大肠杆菌 K12 的增菌肉汤, 分别加入到 1.5 mL 的 EP 管中。然后取 200 μL 的 MS2 系列稀释液加入到上述大肠杆菌 K12 的 300 μL 营养肉汤增菌液, 然后在 36 °C 条件下结合 5 min。

上层琼脂的倾注: 取 4 mL 融化的 50 °C 上层琼脂, 加入到 10 mL 的培养管, 然后加入上述大肠杆菌和 MS2 结合溶液, 轻轻混匀, 然后倾注到底层培养基上。待凝固后, 36 °C 培养 24 h。根据噬菌斑的计数结果, 计算大肠杆菌噬菌体 MS2 培养液中的浓度。

1.3.4 大肠杆菌 MS2 噬菌体标准物质的冻干

将大肠杆菌噬菌体的标准物质与 N-0 保护剂按照 1:1 混合, 然后以 20 μL/球的方式进行冻速冻, 于冷冻干燥机中进行冷冻干燥。

将冻干后的微球放入 2 mL 的西林瓶中, 将胶塞虚掩的盖在西林瓶上, 然后用冷冻干燥机进行真空压盖。

1.3.5 均匀性检验

随机抽取冻干标准物质 15 瓶, 向每瓶标准物质中加入 1 mL PBS, 将大肠杆菌噬菌体 MS2 冻干样品充分溶解并混匀, 取 200 μL, 使用高纯病毒 RNA 试剂盒(Roche 公司)参照说明书, 提取大肠杆菌噬菌体 MS2 的 RNA, 使用 PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit, 1.2.2 中的大肠杆菌噬菌体 MS2 引物及探针, 参照文献^[12]的扩增条件, 使

用荧光定量 PCR 仪进行检测, 根据检测结果的阈值循环数(threshold cycle, Cq)值, 采用 3SD 方差分析, 评价样品的均匀性。大肠杆菌噬菌体 MS2 标准物质的稳定性、适用性、协作标定等检验参照此步骤。

1.3.6 短期稳定性检验

将样品放置于 37 和 4 °C 环境, 进行短期稳定性检验。37 °C 条件下分别于 1、3、5、11 d 测试观察, 每个标准物质做 3 个平行; 4 °C 分别在 1、5、7、14、28 d 测试观察, 每个标准物质做 3 个平行。

1.3.7 大肠杆菌噬菌体 MS2 标准物质储藏稳定性检验

将本批次生产的大肠杆菌噬菌体 MS2 标准物质放置于-20 °C 条件下, 采取先密后疏的原则, 于 0、1、3、6、12 个月分别取样, 进行 1 年的储藏稳定性的测试观察, 每个标准物质做 3 个平行。

1.3.8 协同标定

组织 3 家实验室对大肠杆菌噬菌体 MS2 标准物质样品进行协同标定, 每家实验室 10 件样品。标定方法: 将样品溶于 1 mL PBS 溶液, 取 200 μL, 使用高纯度病毒核酸试剂盒提取 RNA, 参照 GB 4789.42—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 诺如病毒检验》, 使用一步法 RT-PCR 试剂盒对样本进行扩增。对 3 家协同标定实验室的检测结果进行分析。

1.3.9 大肠杆菌 MS2 噬菌体标准物质使用效果验证

选取牡蛎、贻贝、胡萝卜、甜瓜、生菜, 进行适用性实验, 检验方法参照 GB 4789.42—2016。在样品前处理阶段加入大肠杆菌噬菌体 MS2 标准物质, 提取病毒 RNA, 并进行扩增, 然后以均匀性检验 Cq 值的平均值作为参照, 计算样品的回收率, 评价标准物质的使用效果。

生菜参照生食蔬菜进行检验: 将生菜剪成 2.5 cm×2.5 cm×2.5 cm 大小, 称量 25 g, 放入带有滤膜均质袋一侧, 加入 40 mL TGBE buffer (Tris 碱 12.1 g, 甘氨酸 3.8 g, 牛肉膏 10 g, 蒸馏水 1000 mL, pH=9.5), 同时加入一个大肠杆菌噬菌体 MS2 微球, 室温摇晃约 20 min。后续检测环节的离心、聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)沉淀、沉淀溶解步骤参照 GB 4789.42—2016。取 200 μL 沉淀溶解液参照均匀性检验的方法进行 RNA 提取及 RT-PCR 扩增。根据处理液体积和质量的变化浓度增加了 1 倍, 在计算回收率应进行调整

牡蛎和贻贝样品检验: 取至少 10 个类样品进行解剖, 取其消化腺和肠道使得每份样品检验的总质量达到 20 g。用刀片将消化腺仔细切碎呈糊状。将均质的消化腺分别称取(2.0±0.1) g, 加入到 15 mL 离心管中, 每管加入 2 mL 的蛋白酶 K 溶液进行消化, 活力为 30 U, 取 1 个大肠杆菌噬菌体 MS2 标准物质微球加入。后续检测步骤的振荡、离心参照 GB 4789.42—2016。取 200 μL 最后离心的上清液, 参照均匀性检验的方法进行 RNA 提取及 RT-PCR 扩增, 根据

处理液体积和质量的变化, 病毒浓度相当于降低了 4 倍。

胡萝卜、甜瓜参照硬质表面食品进行检验: 棉拭子使用 PBS 润湿后, 用力擦拭表面, 面积约 50 cm², 将棉拭子放入 490 μL 试管中, 同时加入一个大肠杆菌 MS2 噬菌体标准物质微球, 将棉拭子充分浸入和挤压 3~4 次, 取 200 μL 参照均匀性检验的方法进行后续的 RNA 提取和 RT-PCR 操作。根据溶液体积的变化, 与均匀性检验比较浓度增加了 1 倍, 在计算回收率应进行调整。

2 结果与分析

2.1 使用菌株的确认结果

使用引物 MS2-TM3-F Sense TM3 LC/RG、MS2-TM3-R Antisense TM3 RG 对大肠杆菌 MS2 噬菌扩增产物的结果为:

5'-GGCTGCTCGCGGATACCCGTACCTCGGGTTTC
CGTCTTGCTCGTATCG CTCGAGAACGCAAGTTCTTCA
GCGAAAAGCACGACAGTGGTCGCTACATAGCGTGGT
TCCATACTGGAGGTGAAATCACCGACAGCATGAAGTC
CGCCGGCGTGC GCGTTATACGCACTTCGGAGTGGCTA
ACGCCGGTTCACATTCCCTCA-3'。

经 NCBI 网站使用 BLAST 软件对 MS2 噬菌体标准物质的特异性扩增产物进行序列比对分析, 与 Sequence ID: lnkA5375HM5016Escheriachia phage MS2 的对应区域序列一致性达到 100%。

2.2 大肠杆菌 MS2 噬菌体培养物的计数结果

大肠杆菌 MS2 噬菌体培养物的计数结果见表 1。根据噬菌体添加量为 200 μL, 折合计算估计噬菌体的浓度约为

2.3×10¹¹ PFU/mL, 培养物浓度可以达到噬菌体标准物质制备的浓度。

2.3 样品均匀性的检验结果

对 15 瓶大肠杆菌噬菌体 MS2 标准物质进行检测结果如表 2, 大肠杆菌噬菌体 MS2 标准样品的 C_q 值变化范围 24.33~25.71, 检测结果均为阳性, 且 C_q 值差异不大。

经计算, 均匀性检验样品 C_q 值的标准偏差 SD 值为 0.23, 样品 3 倍 SD 标准偏差的范围应该在 24.26~25.64 之间, 15 件样品的均匀性检验结果中最大值为 25.31, 最小值 24.44, 均在±3SD 范围内, 均匀性符合要求。

在 GB 4789.42—2016 中, 检测结果 C_q<38 可以判断为阳性; 对过程控制病毒对检测过程中 RNA 的提取效率应>1%。结合这 2 点, 可以计算出对过程控制病毒要求的最低浓度, C_q 值应大于 31.26, 而本次制备的 MS2 病毒微生物标准样品的最高 C_q 值为 25.71 远小于 31.26, 从含量上完全可以满足过程病毒质量控制使用的要求, 可以作为定性检验的阳性质控样品使用。

2.4 大肠杆菌 MS2 噬菌体标准物质短期稳定性结果

于 37 °C 环境下保存 5 d 内, 大肠杆菌噬菌体 MS2 标准物质的 C_q 值与样品均匀性检验的平均值, 差异不大, 可以满足定性样品的要求。非高温季节, 可以常温运输, 而在高温季节可以采用泡沫箱加冰袋的方式低温进行运输。结果见表 3。

于 4 °C 条件下, 对本批次生产的大肠杆菌噬菌体 MS2 标准物质进行 28 d 的短期稳定性监测, 数据表明大肠杆菌噬菌体 MS2 标准物质在 4 °C 条件下保藏 28 d 内稳定, 可以作为短期储存条件。结果见表 4。

表 1 大肠杆菌噬菌体 MS2 培养物的计数结果(PFU/mL)
Table 1 Results of the count in the coliphage MS2 culture (PFU/mL)

稀释倍数	原液	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰
平行 1	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	369	50	2
平行 2	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	多不可计	400	41	4

表 2 15 瓶大肠杆菌噬菌体 MS2 标准物质均匀性检测结果
Table 2 Results of the uniformity test of 15 bottles of coliphage MS2 reference materials

标准物质	C _q 值	标准物质	C _q 值
MS2-1	25.18	MS2-9	25.24
MS2-2	24.55	MS2-10	24.92
MS2-3	24.98	MS2-11	24.95
MS2-4	25.45	MS2-12	24.92
MS2-5	24.96	MS2-13	24.89
MS2-6	24.72	MS2-14	24.96
MS2-7	24.91	MS2-15	25.71
MS2-8	25.61	平均值	24.95

表 3 大肠杆菌 MS2 标准物质短期稳定性检测结果(37 °C)
Table 3 Results of short-term stability test of coliphage MS2 reference materials (37 °C)

时间/d	Cq1	Cq2	Cq3	Cq 平均值
1	24.39	24.39	25.2	24.66
3	26.40	25.18	24.89	25.49
5	24.38	26.13	23.80	24.77
11	/	/	28.25	28.25

表 4 大肠杆菌 MS2 标准物质短期稳定性检测结果(4 °C)
Table 4 Results of short-term stability test of coliphage MS2 reference materials (4 °C)

时间/d	Cq1	Cq2	Cq3	Cq 平均值
1	25.07	24.33	31.31	26.90
3	24.73	26.54	25.85	25.71
5	25.21	24.41	24.3	24.64
7	/	24.33	24.4	24.37
14	24.55	24.84	23.55	24.31
28	24.13	25.39	30.10	26.54

2.5 大肠杆菌 MS2 噬菌体标准物质长期稳定性结果

对本批次生产的大肠杆菌噬菌体 MS2 标准物质进行 -20 °C 的保藏稳定性监测, 数据表明门哥病毒标准物质在 -20 °C 条件下保藏 1 年内稳定, 可以作为长期储存条件。结果见表 5。

表 5 大肠杆菌噬菌体 MS2 标准物质长期稳定性检测结果 (-20 °C)
Table 5 Results of long-term stability test of coliphage MS2 reference materials (-20 °C)

时间/月	Cq1	Cq2	Cq3	Cq 平均值
0	24.26	24.25	24.36	24.29
1	26.20	26.30	26.66	26.39
3	26.66	24.96	26.00	25.87
6	26.30	26.68	26.03	26.34
12	26.53	26.61	25.63	26.26

2.6 协同标定结果

本次制备的大肠杆菌噬菌体 MS2 标准物质, 经由 A、B、C 3 家协作标定单位测定, 结果显示样品检测结果均为

阳性, 且与样品均匀性检验的平均值比较差异不大, 可以作为过程质量控制使用。结果见表 6。

2.7 大肠杆菌噬菌体 MS2 标准物质适用性验证结果

牡蛎(M)、青蛤(Q)、甜瓜(G)、胡萝卜(H)和生菜(C)5 种样品基质的适用性验证中, 大肠杆菌噬菌体 MS2 的检测结果均为阳性。使用协作标定的平均值 24.89, 结合大肠杆菌噬菌体 MS2 标准物质添加时不同样品体积的变化, 计算样品的回收率。结果见表 7 和表 8。除 M-20 样品外, 其它结果均 >1%, 表明除 M-20 外其它样品的 RNA 提取及 RT-PCR 检测过程正常, 而 M-20 在 RNA 提取或 RT-PCR 过程中存在问题, 可能是因为 RNA 提取效率低或者在 RT-PCR 过程中存在抑制因子, 如果是在实际样品的检验中出现该问题, 需要对样品进行重复的检测。综上, 表明该标准物质可以用来监测诸如病毒检测的过程质量控制。

3 结论与讨论

在食品的诺如病毒的检测方法中, 影响检测结果的因素非常多。为了保证检测结果的质量, 要求在检测过程中使用过程质量控制的标准物质。在 GB 4789.42—2016 中, 推荐使用的是门哥病毒或者等效的病毒。很多实验室已经在食品诺如病毒监测或者诺如病毒相关方法研究中使用门哥病毒或者 MS2 噬菌体进行质量控制^[13-18]。

表 6 大肠杆菌噬菌体 MS2 协作标定结果
Table 6 Results of the coordinated calibration

样品序号	协作标定 单位代码		
	A	B	C
	Cq 值	Cq 值	Cq 值
1	24.1	24.47	27.56
2	23.9	24.06	26.38
3	23.6	24.54	26.69
4	23.4	24.7	26.8
5	23.7	24.17	26.54
6	23.4	24.03	27.06
7	23.7	23.87	27.53
8	22.6	23.95	26.64
9	24.5	24.01	27.07
10	22.7	23.93	27.09
平均值	23.56	24.17	26.94
总平均值		24.89	

表 7 牡蛎(M)、青蛤(Q)、甜瓜(G)、胡萝卜(H)生菜(C)样品基质的适用性验证结果

Table 7 Results of suitability verification of the sample matrixes of oyster (M), green clams (Q), melons (G), carrots (H) and lettuce (C)

样品编号	测定值	回收率/%	样品编号	测定值	回收率/%
M-1	29.92	3.10	M-19	31.24	1.20
M-2	29.08	5.50	M-20	32.84	0.40
M-3	29.03	5.70	Q1	25.68	57.80
M-4	28.38	8.90	Q2	27.81	13.20
M-5	29.93	3.00	Q3	26.9	24.80
M-6	29.79	3.30	Q4	27.69	14.40
M-7	29.07	5.50	H1	26.18	40.90
M-8	29.55	4.00	H2	26.9	24.80
M-9	29.23	4.90	H3	25.46	67.40
M-10	29.15	5.20	H4	23.64	237.80
M-11	30.27	2.40	G1	25.84	51.80
M-12	30.51	2.00	G2	25.85	51.40
M-13	28.94	6.00	G3	25.76	54.70
M-14	30.44	2.10	G4	26.42	34.60
M-15	30.67	1.80	C1	30.17	2.60
M-16	30.66	1.80	C2	30.5	2.00
M-17	29.2	5.00	C3	29.69	3.60
M-18	29.76	3.40	C4	31.11	1.30

大肠杆菌噬菌体 MS2 是比较常用的质量控制病毒, 相对门哥病毒制备比较容易, 同时也符合 GB 4789.42—2016 中的要求, 与诺如病毒检测的目的基因片段没有交叉, 不会造成检测结果的假阳性。目前作为过程质量控制的噬菌体 MS2, 大部分为液体培养物的状态^[19-20], 相对于保藏和运输要求均比较严格。采用冷冻干燥技术制备的 MS2 标准物质, 稳定性良好, 便于该标准物质的运输和储藏。

本研究制备的大肠杆菌 MS2 标准物质均匀性良好, 经 3 倍方差分析符合标准物质的要求, 经 4 和 37 °C 运输稳定性测试, 4 °C 28 d、37 °C 5 d 仍能保持样品稳定; 可以保证样品在非极端的高温天气下运输不受影响, -20 °C 条件下样品可以长期储存, 样品的储藏温度建议保持在 -20 °C 以下。本研究制备的大肠杆菌噬菌体标准物质菌均匀性和

稳定性良好, 使用方便, 可以帮助检验人员在检验过程中进行质量控制, 提高检验的可靠性。

参考文献

- [1] 张吉, 张鹏, 黄振. 食源性病毒及其防控[J]. 农业工程, 2017, 5(7): 79-82
ZHANG J, ZHANG P, HUANG Z. Prevention and control of foodborne virus [J]. Agric Eng, 2017, 5(7): 79-82
- [2] BURKE RM, SHAH MP, WIKSWO ME, *et al.* The norovirus epidemiologic triad: Predictors of severe outcomes in US norovirus outbreaks, 2009-2016 [J]. J Infect Dis, 2019, 219: 1364-1372.
- [3] DESSELBERGER U, GOODFELLOW I. Noroviruses: A global cause of acute gastroenteritis [J]. Lancet Infect Dis, 2014, 14: 664-665.
- [4] MURRAY PR, BARON EJ, JORGENSEN JH, *et al.* Manual of clinical microbiology, 8th Ed [M]. Washington DC: American Society for Microbiology, 2003.
- [5] VINE J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus [J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(2): 373-381.
- [6] 胡琼之. 噬菌体 MS2 生物学特性研究[J]. 安全与环境工程, 2011, 18(3): 55-58.
HU QZ. Study on the biological characteristics of bacteriophage MS2 [J]. Saf Environ Eng, 2011, 18(3): 55-58.
- [7] 房保海, 岳志芹, 梁成珠, 等. RNA 病毒检测质控物质-大肠杆菌噬菌体 MS2 标准样品的研制和应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(8): 3338-3341.
FANG BH, YUE ZQ, LIANG CZ, *et al.* Development and application of coliphage MS2 standard material as quality control in RNA virus detection [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(8): 3338-3341.
- [8] 王国强, 于茵茵, 曾华辉, 等. 基于 MS2 噬菌体病毒样颗粒的 RT-PCR 检测新型冠状病毒(SARS-CoV-2)质控品制备[J]. 中国生物工程杂志, 2020, 40(12): 31-40.
WANG GQ, YU YY, ZENG HH, *et al.* Preparation of quality control materials for RT-PCR detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) based on MS2 phage virus-like particles [J]. China Biotechnol, 2020, 40(12): 31-40.
- [9] 徐蕾蕊, 魏海燕, 马丹, 等. MS2 噬菌体在贝类食源性病毒检测中过程质控应用[J]. 中国公共卫生, 2016, 32(11): 1583-1590.
XU LR, WEI HY, MA D, *et al.* Application of MS2 phage in process control in detection of food borne virus in shellfishes [J]. Chin J Public Health, 2016, 32(11): 1583-1590.
- [10] JENS D, MELANIE S, KNUT K. Use of bacteriophage MS2 as an internal control in viral reverse transcription-PCR assays [J]. J Clin Microbiol, 2005, 9(43): 4551-4557.
- [11] 王秋英, 赵炳梓, 张佳宝, 等. 噬菌体 MS2 和 φX174 的双层琼脂平板和液体培养基扩增方法的建立[J]. 土壤, 2007, 39(2): 297-300.
WANG QY, ZHAO BZ, ZHANG JB, *et al.* Propagation of bacteriophages MS2 and φX174 using double layer agar plate and liquid medium culture [J]. Soils, 2007, 9(2): 297-300.
- [12] 白海娜. 食品传播病毒性疾病的分析[J]. 现代食品, 2020, (23): 23-25.

- BAI HN. The analysis of the food spread viral diseases [J]. *Mod Food*, 2020, (23): 23–25.
- [13] 朱晓露, 刘彦凯, 朱鸿儒, 等. 2019 年连云港市农贸市场双壳贝类中诺如病毒污染状况调查[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(4): 1632–1635.
- ZHU XL, LIU YK, ZHU HR, *et al.* Survey of norovirus contamination of *Bivalves mollusks* in farmer's market in Lianyungang city in 2019 [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(4): 1632–1635.
- [14] 王悦, 闫鑫, 时晨, 等. 秦皇岛市售生菜、草莓中诺如病毒监测分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(22): 6059–6063.
- WANG Y, YAN X, SHI C, *et al.* Monitoring and analysis of norovirus in lettuce and strawberry from markets in Qinhuangdao [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(22): 6059–6063.
- [15] 白雪, 张淑红, 时晨, 等. 2015—2016 年河北省贝类水产品中诺如病毒污染状况研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(15): 4152–4157.
- BAI X, ZHANG SH, SHI C, *et al.* Investigation on norovirus contamination of shellfish in Hebei province in 2015—2016 [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(15): 4152–4157.
- [16] 李楠, 王佳慧, 李凤琴, 等. 不同水源中 GII 型诺如病毒实时荧光逆转录聚合酶链式反应检测方法建立及应用[J]. *中国食品卫生杂志*, 2018, 30(6): 597–602.
- LI N, WANG JH, LI FQ, *et al.* Development and application of real-time reverse transcription polymerase chain reaction for detection of norovirus GII in water [J]. *Chin J Food Hyg*, 2018, 30(6): 597–602.
- [17] CANNON JL, BAKER M, BARCLAY L, *et al.* Impact of long-term storage of clinical samples collected from 1996 to 2017 on RT-PCR detection of norovirus [J]. *J Virol Methods*, 2019, 267(5): 35–41.
- [18] 王晶, 孙金红, 芦云, 等. 贝类中诺如病毒定性检测能力验证结果与分析[J]. *质量安全与检验检测*, 2020, (4): 16–18.
- WANG J, SUN JH, LU Y, *et al.* Proficiency testing result and analysis of norovirus in shellfish [J]. *J Inspect Quarant*, 2020, (4): 16–18.
- [19] 韦德源, 陆泽宁, 张聪, 等. 产志贺毒素多重耐药大肠杆菌噬菌体的生物学特性及全基因组分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2020, 47(2): 352–362.
- WEI DY, LU ZN, ZHANG C, *et al.* Biological characteristics and genome analysis of Shiga toxin-producing and multidrug-resistant *Escherichia coli* phages [J]. *China Anim Husb Vet Med*, 2020, 47(2): 352–362.
- [20] 陈义宝, 孙二超, 杨澜, 等. 产志贺毒素大肠杆菌噬菌体 vB_EcoM_PHB05 的生物学特性及全基因组分析[J]. *中国兽医科学*, 2018, 48(4): 428–437.
- CHEN YB, SUN EC, YANG L, *et al.* Characterization and complete genome sequence analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia* bacteriophage vB_EcoM_PHB05 [J]. *Chin Vet Sci*, 2018, 48(4): 428–437.

(责任编辑: 李磅礴 郑 丽)

作者简介



骆海朋, 硕士, 副主任检验技师, 主要研究方向为食品微生物检验。

E-mail: luohaipeng@nifdc.org.cn



李景云, 主任技师, 主要研究方向为食品药品微生物检验。

E-mail: jingyunli50@sohu.com



崔生辉, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: cuishenghui@aliyun.com