

# DB45

## 广西壮族自治区地方标准

DB45/T 2138—2020

### 水体中诺如病毒的核酸检测方法 实时荧光 RT-PCR 法

Detection of norovirus nucleotide acid in water— Real-time RT-PCR

地方标准信息服务平台

2020 - 07 - 24 发布

2020 - 08 - 20 实施

广西壮族自治区市场监督管理局 发布



## 前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。  
本标准由广西壮族自治区卫生健康委员会提出并宣贯。  
本标准由广西壮族自治区卫生技术标准委员会归口。  
本标准起草单位：广西壮族自治区疾病预防控制中心。  
本标准主要起草人：刘巍、邓丽丽、谭冬梅、马宇燕、钟革、李秀桂。

地方标准信息服务平台



# 水体中诺如病毒的核酸检测方法 实时荧光 RT-PCR 法

## 1 范围

本标准规定了水体中诺如病毒的实时荧光RT-PCR检测方法。

本标准适用于广西区域内地表水、地下水、集中式供水、娱乐用水、污水等水体中基因 I 组和基因 II 组诺如病毒的检测。

## 2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 2.1

**诺如病毒** Norovirus

世界范围内引起急性胃肠炎暴发和散发的重要病原体。大多数诺如病毒引起的水源性暴发疫情是由于饮用水或生活用水被污染所致。诺如病毒属于人类杯状病毒科的诺如病毒属，是一组形态相似、抗原性略有不同的病毒颗粒。诺如病毒直径 26 nm~35 nm，无包膜，表面粗糙，球形，呈二十面体对称。诺如病毒基因组是单股正链 RNA，全长 7.5 kb~7.7 kb，根据基因特征，诺如病毒被分为 6 个基因组（genogroup, G I ~ G IV），G I 和 G II 是引起人类急性胃肠炎的两个主要基因组，G IV 也可感染人，但很少被检出。

### 2.2

**实时荧光逆转录-聚合酶链式反应** Real-time RT-PCR

在 RT-PCR 反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号累积实时监测整个 PCR 进程，最后通过 Ct 值对模板进行定性。

### 2.3

**Ct 值** Cycle threshold value

每个 PCR 反应管内荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数。各模板的 Ct 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系，起始拷贝数越多，Ct 值越小。反之亦然。

## 3 原理

水样在通过带负离子混合纤维素膜时，带正离子的病毒被吸附到膜上，然后再洗脱病毒，并用聚乙二醇沉淀病毒达到富集浓缩的效果。应用实时荧光 RT-PCR 技术，针对诺如病毒衣壳蛋白区 N/S 区设计特异性引物和探针，荧光探针的 5' 端标记报告荧光基团，3' 端标记淬灭荧光基团，当探针完整时，报告荧光基团的发射波长被淬灭荧光基团的激发波长吸收；当 PCR 扩增时，Taq 酶的 5' → 3' 端外切酶活性将探针酶切水解，报告荧光不再受淬灭荧光的影响，使荧光监测系统收集到报告基团的荧光信号，即每扩增一条 DNA 链，可产生一个报告基团的荧光信号，实现荧光信号积累与 PCR 产物形成同步。

## 4 试剂和耗材

### 4.1 试剂

4.1.1 除另有说明外，本文件所使用的试剂均为分析纯，分子生物学试剂所用水为无 RNA 酶的水。

- 4.1.2 2.5 mol/L 氯化镁 (MgCl<sub>2</sub>) 溶液, 配制遵照附录 A 中的 A.1 执行。
- 4.1.3 3% 牛肉浸膏洗脱液, 配制遵照附录 A 中的 A.2 执行。
- 4.1.4 16% PEG8000 溶液, 配制遵照附录 A 中的 A.3 执行。
- 4.1.5 0.2 mol/L 的 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液, 配制遵照附录 A 中的 A.4 执行。
- 4.1.6 1 mol/L 盐酸溶液、1 mol/L 氢氧化钠溶液、RNA 提取试剂盒、实时荧光 RT-PCR 试剂盒。
- 4.1.7 引物和探针。工作浓度均为 10 μmol/L, -20 °C 保存, 引物和探针序列见表 1。

表1 实时荧光引物和探针序列表

基因组	引物/探针	序列
G I	JJV1F (上游引物)	5' -GCCATGTTCCGTTGGATG-3'
	JJV1R (下游引物)	5' -TCCTTAGACGCCATCATCAT-3'
	JJV1P (探针)	5' -FAM-TGTGGACAGGAGATCGCAATCTC-BHQ-3'
G II	JJV2F (上游引物)	5' -CAAGAGTCAATGTTTAGTGGATGAG-3'
	COG2R (下游引物)	5' -TCGACGCCATCTTCATTCACA-3'
	RING2 (探针)	5' -FAM-TGGGAGGGCGATCGCAATCT-BHQ-3'

## 4.2 耗材

包括以下物品:

- 混合硝酸纤维素膜, 孔径 0.45 μm;
- 快速定性滤纸;
- 离心管, 1.5 mL、50 mL;
- 0.2 mL 透明薄壁 PCR 管。

## 5 仪器设备

包括以下物品:

- 电子天平, 精度 ≥ 0.01 g;
- 高速台式冷冻离心机, 可控温至 4 °C, 离心速度 ≥ 13 000 g;
- 水过滤装置;
- 正压力泵;
- 振荡混匀器;
- 高压灭菌器;
- 实时荧光 PCR 扩增仪;
- 二级生物安全柜。

## 6 检测流程

见图1。

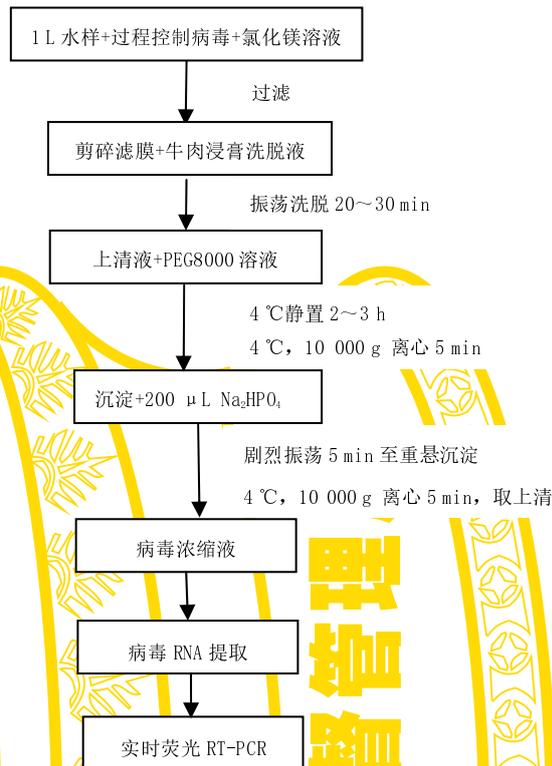


图1 水体中诺如病毒的核酸检测流程

## 7 水样前处理

### 7.1 水样运送与保存

运输过程中保持水样温度在 $0\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。实验室接到水样后应48 h内进行检测。如未及时检测，应将水样置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰柜保存待检。

### 7.2 病毒富集浓缩

7.2.1 水过滤装置、剪刀、镊子等高压灭菌备用。

7.2.2 1 L水样中掺入 $10\text{ }\mu\text{L}$ 商品化的过程控制病毒，加入20 mL的 $2.5\text{ mol/L}$ 氯化镁溶液，再用 $1\text{ mol/L}$ 盐酸调节水样pH至 $3.0\pm 0.5$ 。如为混浊度较大或杂质较多的水样，需预先将水样于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $3\text{ }500\text{ g}$ 离心30 min，取上清。

7.2.3 组装水过滤装置，并与正压力泵连接。启动正压力泵，使水样缓慢通过孔径为 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 的混合硝酸纤维素膜，如为浊度较大或杂质较多的水样，可增加一层快速定性滤纸于混合硝酸纤维素膜上，然后用镊子将硝酸纤维素膜取出，剪碎成边长 $0.5\text{ cm}$ 的小方块，放入预先装有10 mL的3%牛肉膏洗脱液及2颗小玻璃珠的50 mL离心管中。

7.2.4 用振荡混匀器振荡20 min~30 min，取上清液转移至干净的50 mL离心管中。

7.2.5 加入等体积的16% PEG8000溶液，振荡充分混匀，调节pH值至7.0， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置2 h~3 h。

7.2.6  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $10\text{ }000\text{ g}$ 离心5 min，弃上清后，将50 mL离心管中的溶液全部倾倒在干净的滤纸上。

7.2.7 加 $100\text{ }\mu\text{L}\sim 200\text{ }\mu\text{L}$ 的 $0.2\text{ mol/L}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ，振荡，直至完全重悬沉淀。

7.2.8  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $10\text{ }000\text{ g}$ 离心5 min，取上清即为病毒浓缩液。

## 8 实时荧光 RT-PCR 检测

### 8.1 病毒 RNA 提取

- 8.1.1 使用病毒 RNA 提取试剂盒进行 RNA 的提取，可根据仪器和试剂盒要求调整操作步骤。以诺如病毒阳性的粪便悬液样本或商品化的诺如病毒样本为核酸提取过程阳性对照，以双蒸水作为核酸提取过程阴性对照。
- 8.1.2 将病毒浓缩液加入预先装有 560  $\mu\text{L}$  裂解液的 1.5 mL 离心管中，混匀，室温放置 10 min，再加入 560  $\mu\text{L}$  无水乙醇，混匀。
- 8.1.3 取 650  $\mu\text{L}$  混合液加入到纯化柱上，8 000 g 离心 1 min 弃收集管中的离心液。
- 8.1.4 将 1.5 mL 离心管中剩余的混合液全部加入到纯化柱的上，8 000 g 离心 1 min，弃离心液。
- 8.1.5 于纯化柱上加入 510  $\mu\text{L}$  洗液 1，8 000 g 离心 1 min，弃离心液。
- 8.1.6 于纯化柱上加入 510  $\mu\text{L}$  洗液 2，13 000 g 离心 1 min，弃离心液。
- 8.1.7 更换新的收集管，13 000 g 离心 1 min。
- 8.1.8 将纯化柱放置到干净的 1.5 mL 离心管上，向柱中心加入 35  $\mu\text{L}$  RNA 洗脱液，室温放置 5 min。
- 8.1.9 8 000 g 离心 1 min，离心管收集到的液体即为 RNA。
- 8.1.10 所用实验用具及溶液应无 RNA 酶，操作过程中应佩戴一次性橡胶或乳胶手套。提取后的 RNA 如无法立即检测，应放在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待检。

### 8.2 提取效率计算

- 8.2.1 以水样中过程控制病毒 RNA 的提取效率表示水样中诺如病毒 RNA 的提取效率，作为病毒富集浓缩及病毒 RNA 提取的过程控制。
- 8.2.2 过程控制病毒按试剂盒说明书提取 RNA 后，进行 10 倍梯度稀释至  $10^{-4}$  或  $10^{-5}$ 。
- 8.2.3 每个稀释度分别取 5  $\mu\text{L}$  加入到含有检测过程控制病毒的引物和探针的反应体系中，采用与检测诺如病毒相同的实时荧光 RT-PCR 反应参数，进行实时荧光 RT-PCR 反应，确定未稀释和梯度稀释过程控制病毒 RNA 的 Ct 值。
- 8.2.4 以未稀释和梯度稀释过程控制病毒 RNA 的浓度 lg 值为 X 轴，以其 Ct 值为 Y 轴，建立标准曲线；标准曲线  $r^2 \geq 0.98$ 。未稀释过程控制病毒 RNA 浓度为 1，梯度稀释过程控制 RNA 浓度分别为  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  等。
- 8.2.5 将掺有过程控制病毒的水样 RNA，加入到含有检测过程控制病毒引物和探针的反应体系中，采用与检测诺如病毒相同的实时荧光 RT-PCR 反应参数，进行实时荧光 RT-PCR 反应，确定 Ct 值，代入标准曲线，计算经过病毒富集浓缩及 RNA 提取步骤后的过程控制病毒 RNA 浓度。
- 8.2.6 提取效率计算见式 (1)：

$$a = (b \div c) \times 100\% \dots \dots \dots (1)$$

式中：

- a——提取效率；
- b——经病毒富集浓缩及 RNA 提取步骤后的过程控制病毒 RNA 浓度；
- c——未稀释过程控制病毒 RNA 浓度。

### 8.3 实时荧光 RT-PCR 反应体系

检测水样中诺如病毒的实时荧光RT-PCR反应体系见表2。反应体系中各试剂的量可根据具体情况或不同的反应总体积进行适当的调整,可采用Real-time RT-PCR一步法或两步法试剂盒。以诺如病毒阳性RNA为实时荧光RT-PCR反应阳性对照,以不加任何RNA作为实时荧光RT-PCR反应空白对照。

表2 实时荧光 RT-PCR 反应体系

试剂	贮液浓度	终浓度	容积	
			G I	G II
RT-PCR 反应液	2×	1×	12.5 μL	12.5 μL
上游引物	10 μmol/L	0.2 μmol/L	0.5 μL	0.5 μL
下游引物	10 μmol/L	0.2 μmol/L	0.5 μL	0.5 μL
探针	10 μmol/L	0.2 μmol/L	0.5 μL	0.5 μL
逆转录酶-Taq 酶混合液	-	-	0.5 μL	0.5 μL
RNA 模板	-	-	5 μL	5 μL
无 RNA 酶水	-	-	补足至 25 μL	补足至 25 μL

注:上述反应体系为参考体系,可根据选用的试剂盒说明书作适当的调整。

### 8.4 实时荧光 RT-PCR 反应参数

逆转录50℃、30min;预变性95℃、2min;变性95℃、15s,退火、延伸及采集荧光60℃、30s,45个循环。荧光检测通道为FAM。

注:根据不同仪器和试剂要求可将反应参数作适当的调整。

## 9 结果判定与表述

### 9.1 质量控制

9.1.1 核酸提取过程阳性对照和 Real-time RT-PCR 反应阳性对照, Ct 值 $\leq$ 38;核酸提取过程阴性对照和 Real-time RT-PCR 反应空白对照, Ct 值 $>$ 38 或未检测到荧光信号;上述指标均成立时,说明实验成立,有一项或以上不符合者,应重新实验。

9.1.2 同时提取效率需满足 $\geq$ 1%,诺如病毒检测结果成立。如提取效率 $<$ 1%,诺如病毒检测结果为阴性时,应重新实验;如提取效率 $<$ 1%,但诺如病毒检测结果为阳性时,仍可判定为阳性。

### 9.2 结果判定

待测标本的 Ct 值 $\leq$ 38 时,则判定该待测标本为诺如病毒核酸检测阳性。待测标本的 Ct 值 $\geq$ 45 或未检测到荧光信号时,则判定该待测标本为诺如病毒核酸检测阴性。待测标本 38 $<$ Ct 值 $<$ 45 时,应重新检测,若重新检测的 Ct 值 $<$ 38 时,则判定该待测标本为诺如病毒核酸检测阳性;若重新检测的 Ct 值 $>$ 38 或未检测到荧光信号时,则判定该待测标本为诺如病毒核酸检测阴性。

### 9.3 结果表述

该待测样本经检测为 G I 或 G II 诺如病毒核酸阳性;该待测样本经检测为 G I 或 G II 诺如病毒核酸阴性。

附录 A  
(规范性附录)  
试剂配制

A.1 2.5 mol/L氯化镁 ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 溶液

取508.3 g氯化镁 ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )，搅拌溶解于超纯水中，用超纯水定容至1 000 mL，分装，121 °C 高压灭菌15 min，备用。

A.2 3%牛肉浸膏洗脱液 (pH 9.0)

取30.0 g牛肉浸膏，搅拌溶解于超纯水中，调节pH至9.0，用超纯水定容至1 000 mL，分装，121 °C 高压灭菌15 min，备用。

A.3 16%PEG8000 溶液 (含 0.3 mol/L NaCl)

取160.0 g PEG8000和17.5 g NaCl，搅拌溶解于超纯水中，用超纯水定容至1 000 mL，分装，121 °C 高压灭菌15 min，备用。

A.4 0.2 mol/L的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液 (pH 9.0)

取71.6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ，搅拌溶解于超纯水中，调节pH至9.0，用超纯水定容至1 000 mL，分装，121 °C 高压灭菌15 min，备用。

地方标准信息平台



地方标准信息服务平台

中华人民共和国广西地方标准  
水体中诺如病毒的核酸检测方法  
实时荧光 RT-PCR 法

DB 45/T 2138—2020

广西壮族自治区市场监督管理局统一印刷

版权专有 侵权必究