

ICS 65.120
B 25
备案号: 56305-2017

DB22

吉 林 省 地 方 标 准

DB 22/T 2692—2017

饲料中金黄色葡萄球菌和蜡样芽孢杆菌检测 双重微滴数字 PCR 法

Determination of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in feeds- Duplex droplet digital PCR method

2017 - 09 - 30 发布

2017 - 11 - 30 实施

吉林省质量技术监督局

发布

本标准仅供内部使用 不得翻印

本标准仅供内部使用 不得翻印

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009和GB/T 20001.4-2015给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国吉林出入境检验检疫局提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国吉林出入境检验检疫局检验检疫技术中心。

本标准主要起草人：聂丹丹、王宁宁、王淮、曲辉、彭勃、孙晶莹、王玮琳、刘金华、罗雁非。

本标准仅供内部使用

不得翻印

本标准仅供内部使用 不得翻印

本标准仅供内部使用 不得翻印

饲料中金黄色葡萄球菌和蜡样芽孢杆菌检测 双重微滴数字 PCR 法

警示——使用本标准的人员应有正规实验室工作的实践经验。本标准并未指出所有可能的安全问题。使用者有责任采取适当的安全和健康措施，并保证符合国家有关法规规定的条件。

1 范围

本标准规定了饲料中金黄色葡萄球菌和蜡样芽孢杆菌检测双重微滴数字PCR法的试剂和材料、仪器和设备、样品、试验步骤、试验数据处理及防止污染措施。

本标准适用于饲料中金黄色葡萄球菌和蜡样芽孢杆菌检测的双重微滴数字PCR法。

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，仅所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 4789.10-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 14699.1 饲料 采样

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 26427-2010 饲料中蜡样芽孢杆菌的检测

WS/T 230-2002 临床诊断中聚合酶链式反应（PCR）技术应用

3 原理

微滴式数字 PCR 平台通过产生微小油包水体系实现反应体系的分割，根据金黄色葡萄球菌的 *nuc* 特异性基因序列和蜡样芽孢杆菌的 16s 保守基因序列对饲料中金黄色葡萄球菌和蜡样芽孢杆菌进行鉴定。经 PCR 扩增后，根据泊松分布原理及阳性微滴的个数与比例即可得出靶分子的起始拷贝数或浓度，实现对金黄色葡萄球菌和蜡样芽孢杆菌的快速定性检验。

4 试剂和材料

除另有规定外，所有试剂均为分析纯。实验用水符合GB/T 6682中二级水的要求。

- 4.1 菌株：金黄色葡萄球菌阳性标准菌株和蜡样芽孢杆菌阳性标准菌株。
- 4.2 2× dd PCR 预混液。
- 4.3 7.5% 氯化钠肉汤见 GB 4789.10-2016 中 3.1。
- 4.4 蛋白胨生理盐水见 GB/T 26427-2010 中 5.1。
- 4.5 甘露醇卵黄多粘菌素（MYP）琼脂培养基见 GB/T 26427-2010 中 5.2。

- 4.6 裂解液，成分包括：2% CTAB(cetyltrimethylammonium bromide, 十六烷基三甲基溴化铵)，100 mmol/L Tris(tris hydroxymethyl aminomethane, 三羟甲基氨基甲烷)，1.4 mol/L NaCl，20 mmol/L EDTA(ethylene diaminetetraacetic acid, 乙二胺四乙酸)，用 HCl 调至 pH8.0。
- 4.7 酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1, v/v/v)。
- 4.8 氯仿。
- 4.9 异戊醇。
- 4.10 无水乙醇。
- 4.11 异丙醇。
- 4.12 70%乙醇
- 4.13 金黄色葡萄球菌 *nuc* 基因引物和探针
*nuc*上游引物：5' -GGTTTTTCTTTTCGCTACTAGTTG-3'
*nuc*下游引物：5' -TGGATCTTCAGAACCACCTTCTATTT-3'
*nuc*探针：5' - (FAM) -CAGCAAATGCATCACAAACAGATAACGGC- (BHQ1) -3'
- 4.14 蜡样芽胞杆菌 16s 基因引物和探针
16s上游引物：5' -CCTTATGACCTGGGCTACAC-3'
16s下游引物：5' -AACGGTTTTATGAGATTAGCTCC-3'
16s探针：5' - (HEX) -TGCAGCTCTTTGTACCGTCCATTGT- (ECLIPSE) -3'

5 仪器和设备

- 5.1 微滴生成仪。
- 5.2 PCR 仪。
- 5.3 微滴读数系统。
- 5.4 高速冷冻离心机(12 000 r/min)。
- 5.5 涡旋混合器。
- 5.6 分析天平：感量 0.1 g。
- 5.7 微量移液器：0.1 μ L~2.5 μ L, 1 μ L~10 μ L, 2 μ L~20 μ L, 10 μ L~100 μ L, 20 μ L~200 μ L, 100 μ L~1 000 μ L。
- 5.8 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。
- 5.9 恒温水浴箱。
- 5.10 湿热高压蒸汽灭菌器。

6 样品

按照 GB/T 14699.1 对饲料进行采样(5.6),金黄色葡萄球菌样品的增菌培养(5.9)按照 GB/T 14699.1 进行,蜡样芽胞杆菌的样品增菌培养按照 GB/T 26427 进行。

7 试验步骤

7.1 样品 DNA 提取

按照 6 中培养的金黄色葡萄球菌增菌液各取 1 mL (5.7),同时在 MYP 培养基选取一个疑似菌落到盛有 1 mL 无菌生理盐水的 1.5 mL 无菌离心管中,12 000 r/min 离心 (5.4) 10 min,吸弃上清;加

入 50 μL DNA 提取液（使用前室温解冻并充分混匀，快速吸取），混匀（5.5）后沸水浴（6.9）5 min，12 000 r/min 离心 5 min。取上清保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用以待检测。

也可使用商业化的DNA提取试剂盒并按照其说明制备模板DNA。

7.2 DNA 浓度和纯度的测定

取适量DNA溶液原液加双蒸水稀释一定倍数后，使用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计（5.8）测260 nm和280 nm处的吸收值，从而确定DNA浓度最优浓度范围，以便PCR扩增。

7.3 微滴数字 PCR 反应体系

表1 微滴数字 PCR 反应体系

试剂成分	体积 μL
2 \times ddPCR 预混液	10
上游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) _{nuc}	1.6
上游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) _{16s}	0.4
下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) _{nuc}	1.6
下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) _{16s}	0.4
探针 (10 $\mu\text{mol/L}$) _{nuc}	0.8
探针 (10 $\mu\text{mol/L}$) _{16s}	0.2
DNA 模板 (1 ng/ μL ~100 ng/ μL) _金	4
DNA 模板 (1 ng/ μL ~100 ng/ μL) _蜡	1
注1：空白对照实验时，用双蒸水替代样品DNA。 注2：阴性对照实验时，用非目标源性成分替代样品DNA。 注3：阳性对照实验时，用金黄色葡萄球菌和蜡样芽孢杆菌阳性成分DNA。	

7.4 微滴生成

利用微滴生成仪完成20 μL 反应体系的分割（5.1）。

7.5 PCR 反应

反应条件：95 $^{\circ}\text{C}$ /5 min，1个循环；95 $^{\circ}\text{C}$ /15 s，60 $^{\circ}\text{C}$ /1 min，40个循环；98 $^{\circ}\text{C}$ /10 min（1 $^{\circ}\text{C}$ /s），12 $^{\circ}\text{C}$ 保存反应产物。体系完成后，进行数字PCR反应。荧光分析步骤采用FAM单荧光通道（5.2）。

7.6 微滴读数

数字PCR反应的有效分割体系数不得低于理论分割体系数的50%（5.3）。

8 试验数据处理

8.1 阈值的设定

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

8.2 质控标准

- 8.2.1 阳性对照为金黄色葡萄球菌和蜡样芽胞杆菌阳性基因有明显扩增，扩增终点荧光信号大于或等于阈值。
- 8.2.2 阴性对照为金黄色葡萄球菌和蜡样芽胞杆菌基因均无扩增，扩增终点荧光信号小于阈值。
- 8.2.3 空白对照为金黄色葡萄球菌和蜡样芽胞杆菌基因均无扩增，扩增终点荧光信号小于阈值。
- 8.2.4 与以上实验结果不符，需要重复验证实验步骤。

8.3 结果判定与报告

- 8.3.1 样品金黄色葡萄球菌和蜡样芽胞杆菌基因均未得到扩增，扩增终点荧光信号小于阈值，可判定样品结果为阴性，可报告未检出金黄色葡萄球菌或蜡样芽胞杆菌基因；
- 8.3.2 样品金黄色葡萄球菌和蜡样芽胞杆菌基因仅有一种得到扩增，扩增终点荧光信号大于或等于阈值，可判定该样品结果为阳性，报告检出金黄色葡萄球菌或蜡样芽胞杆菌基因。
- 8.3.3 样品金黄色葡萄球菌和蜡样芽胞杆菌基因得到扩增，扩增终点荧光信号大于或等于阈值，可判定该样品结果为阳性，报告检出金黄色葡萄球菌和蜡样芽胞杆菌基因。

9 防止污染措施

按照GB 19489和WS/T 230-2002中6的规定执行（5.10）。