

T/SDAQI

团 体 标 准

T/SDAQI 007—2021

生产用水中铜绿假单胞菌的快速定性检测 实时荧光 PCR 方法

Rapid qualitative detection of *Pseudomonas aeruginosa* in production water
Real-time PCR method

2021 - 09 - 25 发布

2021 - 10 - 25 实施

山东质量检验协会 发布

版 权 说 明

本文件系由山东质量检验协会（简称“协会”）组织创制的团体标准文本（含制定过程中的草案），协会拥有本文件的著作权，受《中华人民共和国著作权法》保护。除法律所允许的情形或事先得到协会书面许可外，任何组织和个人不得以任何理由进行复制、销售、传播本文件，或抄袭、歪曲本文件等侵权行为，否则，行为人应承担相应的民事、行政责任，构成犯罪的，将依法追究其刑事责任。其他文件引用本文件，不属侵权行为。

凡利用本文件进行或支持贸易、认证等商业活动，应事先购买正式文本或得到协会书面授权。购买本文件或获得授权，请与协会联系。

欢迎社会各界举报侵权盗版行为，协会将依法严格保护举报人信息。

联系人：范红梅

联系电话：0531-89701986 15668365153

联系邮箱：keyanjishuzhongxin@163.com

协会对本版权声明拥有最终解释权。

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

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专利的责任。

本文件由山东质量检验协会提出并归口。

本文件起草单位：山东省产品质量检验研究院、滨州市食品药品检验检测中心、南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

本文件主要起草人：王一村、李娜、李秀超、高静静、赵娟、周莉莉、才美佳、张宇鑫、赵彤彤、田洪根、刘红、朱玉兰。

本文件的所有权和解释权归山东质量检验协会。

如果您在本文件使用中发现错误或技术内容有不当之处，请及时与协会秘书处联系，将意见发送到keyanjishuzhongxin@163.com。

生产用水中铜绿假单胞菌的快速定性检测 实时荧光 PCR 法

1 范围

本文件规定了与人、动物健康相关的诸如食品、饲料、饮用水等行业生产用水中铜绿假单胞菌的快速定性检测方法。

本文件适用于生产用水中铜绿假单胞菌的快速定性检测。

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 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

GB/T 19495.2 转基因产品检测 实验室技术要求

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

样品经抽滤设备过滤后，将过滤后的膜放入选择培养基中培养。收集培养后的菌液进行DNA提取。以DNA为模板，采用细菌16S rDNA基因序列作为内参照，以铜绿假单胞菌中外毒素A (*eta*) 基因中相对保守且高度特异的引物和探针进行目标物的实时荧光PCR扩增，根据Ct值，判断样品中是否含有铜绿假单胞菌。其中，对内参照反应的检测，可以监控反应是否正常进行，防止假阴性结果。

5 仪器设备

- 5.1 电子天平：感量0.01 g。
- 5.2 微量可调移液器。
- 5.3 恒温水浴锅。
- 5.4 磁力搅拌器。
- 5.5 高速冷冻离心机：离心力12 000 g，4℃。
- 5.6 二级生物安全柜。
- 5.7 高压灭菌锅。
- 5.8 普通冰箱：4℃，-20℃。
- 5.9 pH计。
- 5.10 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。

- 5.11 实时荧光定量PCR仪。
- 5.12 抽滤设备。
- 5.13 无菌滤膜：直径47 mm，微孔径为0.45 μm。
- 5.14 恒温培养箱：36℃±1℃。

6 试剂或材料

试剂的配制及试验中的操作规范应按GB/T 27403的规定执行。

除另有规定外，试剂应为分析纯或化学纯级别，实验用水应符合GB/T 6682的要求。所有试剂均用无DNA酶污染的容器分装。

6.1 检测用引物和 Taqman 探针序列（详见表 1）

表 1 检测用引物和 Taqman 探针

名称	序列（5'—3'）	目的基因
内参照5'端引物 内参照3'端引物 内参照探针	F: 5'-TTAAGTCCC GCAACGAGC-3' R: 5'-TTGTAGCACGTGTGTAGCCC-3' P: 5'-VIC-TTGACGTCATCCCCACCTTCCTCC-TRAMA-3'	细菌16S rRNA基因
检测用5'端引物 检测用3'端引物 检测用探针	F: 5'-AAGGTGTTTCATCCACGAACTGA-3' R: 5'-ATGGTGTAGATCGGCGACATG-3' P: 5'-FAM-CCGGTAACCAGCTCAG-MGBNFQ-3'	铜绿假单胞菌 <i>eta</i> 基因

- 6.2 三氯甲烷。
- 6.3 异戊醇。
- 6.4 异丙醇。
- 6.5 商品化2×荧光定量PCR预混液。
- 6.6 70%乙醇。
- 6.7 蛋白酶K：20 mg/μL。
- 6.8 RNA酶溶液：5 μg/μL。
- 6.9 Tris饱和酚。
- 6.10 TE冲液：10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)，1 mmol/L EDTA (pH 8.0)。
- 6.11 CTAB缓冲液：55 mmol/L CTAB，1.4 mol/L NaCl，20 mmol/L EDTA，100 mmol/L Tris，调pH5至8.0。121℃高压灭菌20 min，备用。
- 6.12 假单胞菌琼脂基础培养基/CN琼脂：见附录A。

7 样品

7.1 水样过滤

在百级洁净的工作台进行过滤操作。首先用无菌镊子夹取灭菌滤膜边缘部分，将粗糙面向上，贴放在已灭菌的滤床上，固定好滤器，将250 mL水样或稀释液通过孔径0.45 μm的滤膜过滤，然后将过滤后的滤膜正向贴在已制备好的CN琼脂平板上，平铺并避免在滤膜和培养基之间夹留着气泡，平行做两份实验。

7.2 培养

将平板倒置于 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中培养24 h—48 h，并防止干燥。

7.3 菌体收集

用灭菌的1 mL 0.9%的生理盐水洗脱滤膜上的菌落，并将菌液收集于灭菌的2 mL离心管中。重复洗脱一次，将两次菌液合并后进行下一步检测。

8 试验步骤

8.1 DNA 提取

将上述收集于灭菌的2 mL离心管中的菌液6 000 g离心1 min，弃上清。加入1 000 μL CTAB缓冲液和40 μL 蛋白酶K，震荡混匀， 65°C 温浴30 min，每隔10 min振荡混匀。12 000 g离心10 min，吸取1 mL上清液至2 mL离心管中，勿吸取管内杂质。向离心管中加入500 μL 体积比为25: 24: 1的酚-三氯甲烷-异戊醇的混合液（现用现配），剧烈震荡，12 000 g离心12 min。吸取上清液至一新离心管中，加入等体积异丙醇，剧烈震荡，12 000 g离心10 min。弃上清液，用 65°C 预热的双蒸水溶解DNA。加入5 μL RNA酶， 37°C 温浴30 min。加入200 μL 体积比为24: 1的三氯甲烷-异戊醇混合液，剧烈震荡，12 000 g离心12 min。吸取上清液至一新离心管中，加入等体积异丙醇，震荡均匀，12 000 g离心10 min。弃上清，70%乙醇洗涤一次，12 000 g离心1 min。弃上清液，晾干后加入50 μL TE缓冲液溶解DNA， -20°C 保存。

DNA提取也可使用等效的DNA提取试剂盒替代。

8.2 DNA 浓度及纯度的测定

取适量的DNA模板溶液加双蒸水稀释一定倍数后，使用紫外分光光度计测定260 nm和280 nm处的吸光值 A_{260} 和 A_{280} ，DNA浓度计算按式（1）计算，

$$C=A \times N \times 50 \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中：

C-----DNA浓度，单位为纳克每微升（ $\text{ng}/\mu\text{L}$ ）；

A-----260 nm处的吸光值；

N-----核酸稀释倍数；

50-----吸光值 A_{260} 为1时，相对应双链DNA的浓度常数；

当 A_{260}/A_{280} 比值在1.8~2.0之间时，DNA模板适宜荧光定量PCR扩增。

若检测DNA模板浓度不在规定范围内，可适当增加样品采样量或增加荧光定量PCR反应过程中模板量或减少溶解DNA的溶剂的量，提高浓度，以保证检测的有效性。

8.3 实时荧光 PCR 检测

8.3.1 实时荧光 PCR 反应体系

表 2 实时荧光 PCR 反应体系

试剂成分	体积（单位： μL ）
2 \times 荧光定量PCR预混液	12.5
引物F（10 μM ）	0.6
引物R（10 μM ）	0.6
探针P（5 μM ）	0.3

试剂成分	体积（单位：μL）
样品DNA（10 ng/μL~100 ng/μL）	1
dd H ₂ O	补至 25

8.3.2 实时荧光 PCR 反应参数

95℃预变性3 min；95℃变性5 s，60℃退火40 s，45个循环。

8.3.3 实验对照

检验过程中分别设内参照、阳性对照、阴性对照、空白对照。以荧光假单胞菌的DNA为内参照、以铜绿假单胞菌标准菌株或构建的标准质粒DNA为阳性对照、以其他细菌的DNA为阴性对照，以灭菌水为空白对照。所有反应均设置两个平行反应体系。

9 质量控制

以下条件有一条不满足时，实验视为无效，需重新进行实验。

- 空白对照：无荧光对数增长，相应的Ct值>40.0；
- 阴性对照：无荧光对数增长，相应的Ct值>40.0；
- 阳性对照：有荧光对数增长且荧光通道出现典型的扩增曲线，相应的Ct值<30.0；
- 内参照：有荧光对数增长且荧光通道出现典型的扩增曲线，相应的Ct值<30.0。

10 结果判定及表述

10.1 结果判定

在符合第9部分的情况下，被检样品进行检测时：

- 如两个平行样品Ct值均≤35.0，则判定为被检样品阳性；
- 如两个平行样品Ct值均≥40.0，则判定为被检成分阴性；
- 如35.0<Ct值<40.0，判为结果可疑，需要重新检测。重新检测需从7.1开始重新检测，由于为定性检测，可从多个方面提高检测率，根据各种具体情况在可选使用量的几个因素中重新调整优化检测过程，如增加样品取样量、减少溶解DNA的TE剂量，增加PCR反应中加入的模版量、适量增加PCR反应循环数等。如再次扩增后Ct值仍为<40.0，则判定相应被检成分阳性；如再次扩增后Ct值≥40.0，则判定相应被检成分阴性。

10.2 结果表述

10.2.1 结果为阳性者，表述为每250 mL水中“检出铜绿假单胞菌”。

10.2.2 结果为阴性者，表述为每250 mL水中“未检出铜绿假单胞菌”。

11 防污染措施

检测过程中防止交叉污染的措施按照GB/T 27403中的规定执行。

附 录 A
(规范性)
假单胞菌琼脂基础培养基/CN琼脂

A.1 成分

表 A.1 成分

成分	用量
明胶胨	16.0 g
胰蛋白胨	10.0 g
K ₂ SO ₄	10.0 g
MgCl ₂	1.4 g
甘油	10 mL
琼脂	15 g~20 g
蒸馏水	1 000 mL
CN补充成分	
溴化十六烷基三甲铵(cetrimide)	0.2 g
萘啶酮酸	0.015 g

A.2 制法

将明胶胨、胰蛋白胨、K₂SO₄、MgCl₂、琼脂溶解于1 000 mL蒸馏水中，加入10 mL甘油，加热煮沸并高压蒸汽灭菌(121℃，15 min)。灭菌后，待培养基冷却至45℃~50℃时，加入溶于2 mL灭菌蒸馏水的CN补充成分，与尚处于融溶状态的基础培养基混合，倾注到灭菌平板上，培养基厚度至少高5 mm，培养基的最终pH应在7.1±0.2范围内（温度为25℃时）。将制备好的平板置于黑暗处，于2℃~8℃保存，同时防止干燥，在1月内使用。不要使培养基保持融溶状态超过4 h。不得再次煮融培养基。