

### 有机肥中活性大肠杆菌快速测定 PMA-qPCR 法

Rapid detection of live Escherichia coli in organic fertilizer by PMA-qPCR method

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

地方标准信息服务平台

2023 - 11 - 07 发布

2023 - 12 - 08 实施



## 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。

本文件由天津市农业农村委员会提出并归口。

本文件起草单位：天津市农业科学院畜牧兽医研究所、农业农村部环境保护科研监测所。

本文件主要起草人：张蕾、田雪力、池晶晶、路超、杨春蕾、韩静、王丽丽、白朋勋。

地方标准信息服务平台



# 有机肥中活性大肠杆菌快速测定 PMA-qPCR 法

## 1 范围

本文件规定了有机肥中活性大肠杆菌PMA-qPCR测定方法的试剂与引物、主要仪器设备、样品采集、检测步骤和检测结果等技术内容。

本文件适用于有机肥中活性大肠杆菌的检测。

## 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 19438.1 禽流感病毒通用荧光RT-PCR检测方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

NY/T 525 有机肥料

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**活性大肠杆菌** live *Escherichia coli*

在一定条件下可以引起人和多种动物发生胃肠道感染或尿道等多种局部组织器官感染的致病菌。

### 3.2

**暗反应** dark reaction

二氧化碳在植物细胞内，经一连串酵素反应，被还原成为葡萄糖的过程。

### 3.3

**光反应** light reaction

光合作用中，光能转变成成为化学能的过程。

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

PMA: 叠氮溴化丙锭 (propidium monoazide)

PCR: 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction)

qPCR: 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR)

SYBR Green I: 核酸凝胶染料 (SYBR green nucleic acid gel stains)

ROX: 参比染料 (ROX reference dye)

## 5 原理

PMA是光敏DNA染料，可与DNA发生不可逆的共价交联反应。PMA无法透过活性细菌完整的细胞膜，但可以进入死亡细菌受损细胞膜，并永久修饰其DNA，阻断DNA的PCR扩增。在强光照射下，游离在溶液中未与核酸交联的剩余PMA可与水分子反应，生成没有活性的羟胺。羟胺不会对后续从活细菌提取的DNA进行修饰，不影响DNA正常扩增。

样品经PMA预处理后再进行DNA提取及PCR扩增，可以克服常规PCR无法区分活性细菌与死亡细菌释放出的游离DNA的缺陷，有效避免PCR检测中的假阳性结果。

## 6 试剂与引物

### 6.1 试剂

6.1.1 除另有规定外，试剂均为分析纯或生化试剂。试验用水应符合 GB/T 6682 中二级水的要求。

6.1.2 PMA 储备液（5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ）：1mg PMA 溶于 200 $\mu\text{L}$  20%的 DMSO 溶液中，-20 $^{\circ}\text{C}$  避光保存。

6.1.3 PMA 工作液：将 PMA 储备液以 20% DMSO 溶液稀释 10 倍。

6.1.4 0.01 mol/L (pH7.2) PBS：配方见 GB/T 19438.1 附录 A。

6.1.5 95%乙醇。

6.1.6 DNA 提取试剂盒。

6.1.7 SYBR Premix Ex Taq 染料法实时荧光定量试剂盒：内含 *TaKaRa Ex Taq* HS, dNTP Mixture,  $\text{Mg}^{2+}$ , Tli RNaseH, SYBR Green I。根据 qPCR 仪型号选用 ROX 或 ROX II 校正。

6.1.8 qPCR 标准品：含有目的基因的克隆质粒，也可采用经纯化后的基因组 DNA。

### 6.2 引物

大肠杆菌 *uidA* 基因 qPCR 扩增所用引物见表 1。

表1 大肠杆菌 *uidA* 基因 qPCR 扩增引物

引物名称	引物序列	引物浓度	扩增产物大小
上游引物UAL1939b	5' - ATGGAATTCGCCGATTTTGC-3'	10 $\mu\text{mol/L}$	167 bp
下游引物UAL2105b	5' - ATTGTTGCCTCCCTGCTGC -3'	10 $\mu\text{mol/L}$	

## 7 主要仪器设备

超净工作台、冰箱（0  $^{\circ}\text{C}$ ~4  $^{\circ}\text{C}$ ）、分析天平（精度0.01g）、恒温震荡培养箱、LED光解仪（波长465 nm~475 nm、温度低于37 $^{\circ}\text{C}$ ）、低温离心机（最大离心力 $\geq 12000\text{g}$ ）、微型孔板离心机、漩涡震荡器、核酸自动提取仪、qPCR仪、超微量分光光度计等。

## 8 样品采集

### 8.1 采样方法

应按 NY/T 525 中的要求进行采样。

### 8.2 样品缩分

将采集的样品混匀，用四分法将样品缩分至500g。

### 8.3 样品运输及保存

样品在运输过程中宜低温保存,应在6小时内送至实验室进行检测。实验室接样后不能立即检测的,应将样品放入0℃~4℃冰箱保存,放置时间不应超过24h。

## 9 检测步骤

### 9.1 样品制备

将样品进一步缩分后研磨至全部通过Ø1mm尼龙筛,混匀。无菌操作下称取样品10.0g,加入到带玻璃珠的90mL无菌PBS缓冲液中,置于恒温震荡培养箱中,200r/min震荡30min。于4℃,1000×g离心10min收集上清液。

### 9.2 PMA 处理

取1mL上清液至离心管中,加入0.2mLPMA工作液,PMA终浓度约为80µg/mL,避光放置10min。将离心管置于LED光解仪,曝光5min。再将离心管于4℃,12000×g离心5min,弃上清液,无菌PBS缓冲液洗涤2次后重悬。

### 9.3 DNA 提取

可选用等效的商品化核酸提取试剂盒,或选用核酸自动提取仪及配套试剂,参考附录A。

### 9.4 qPCR 反应

9.4.1 qPCR 反应体系(20µL): SYBR Premix Ex Taq 10µL, Rox II 0.4µL,上下游引物各0.4µL, ddH<sub>2</sub>O 6.8µL,标准品或样品DNA 2µL。

9.4.2 qPCR 反应程序: 1个循环: 50℃, 2 min, 95℃, 30 s; 40个循环: 95℃, 5 s, 60℃, 34 s。

9.4.3 检测过程中设空白对照、阳性对照。样品与对照均设3个重复。

### 9.5 标准曲线

提取标准品DNA,根据公式(1)计算出标准品的原始拷贝数。将标准品DNA用ddH<sub>2</sub>O连续10倍梯度稀释4份~6份,进行qPCR扩增。扩增后,以标准品拷贝数的对数值为横坐标,以Ct值为纵坐标绘制标准曲线。

$$C_{copies} = \frac{C_{DNA}}{L \times 660} \times N_A \dots \dots \dots (1)$$

式中:

$C_{copies}$ ——基因拷贝数,单位为copies/mL;

$C_{DNA}$ ——DNA浓度,单位为g/mL;

L——基因组DNA长度,单位为bp;

$N_A$ ——阿伏伽德罗常数,取 $6.02 \times 10^{23}$ 。

## 10 检测结果

### 10.1 阈值(Ct)设定

检测结束后,根据收集的荧光曲线和Ct值直接读取检测结果,Ct值为每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整,以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点为准。

## 10.2 质控标准

10.2.1 空白对照无 Ct 值，且无典型扩增曲线。

10.2.2 阳性对照的 Ct 值应 $<27.0$ ，并出现典型的扩增曲线。

## 10.3 检测结果确定

根据样品Ct值，在绘制出的标准曲线图上得到对应的大肠杆菌的DNA量。

地方标准信息服务平台



## 附录 A

(资料性)

## DNA 自动提取仪操作步骤

## A.1 试剂盒

基于磁珠分离技术，均质的样品细胞被裂解，再通过包覆二氧化硅的磁珠来吸附核酸。然后利用清洗液去除杂质，最终由洗脱液将核酸从磁珠上洗脱下来。试剂盒内包含的试剂规格和数量见表A.1。所有试剂应于室温保存（16~30℃），置于阴凉干燥处。使用之前应检查试剂盒有效期，不得使用任何过期试剂。

表A.1 试剂盒组成

试剂名称	规格	数量	单位
磁珠液 (Magnetic Bead)	18 mL	1	瓶
裂解液 (Lysis Buffer)	180 mL	1	瓶
清洗液A (Washing Buffer A)	135mL	2	瓶
清洗液B (Washing Buffer B)	40 mL	2	瓶
洗脱液 (Eluting Buffer)	64 mL	1	瓶

注1：清洗液A在使用前需加135 mL 95% 的乙醇。加完乙醇后要做上标记；  
注2：清洗液B在使用前需加230 mL 95% 的乙醇。加完乙醇后要做上标记。

## A.2 耗材

根据实际工作需要，可选择96孔或48孔萃取样品盘。所有耗材为一次性使用，不得重复使用。

## A.3 仪器及设备

自动核酸萃取仪、微量移液器及枪头（100 $\mu$ L；200 $\mu$ L；1000 $\mu$ L）

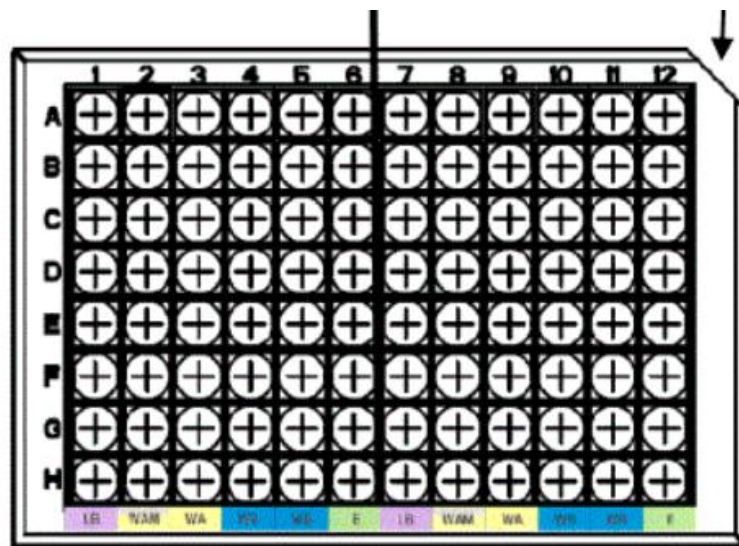
## A.4 操作步骤

## A.4.1 试剂添加

- A.4.1.1 室温条件下，在萃取样品盘 1#列/7#列，添加 500 $\mu$ L 裂解液。
- A.4.1.2 在萃取样品盘 2#列和 3#列/8#列和 9#列，添加 750 $\mu$ L 清洗液 A。
- A.4.1.3 在萃取样品盘 4#列和 5#列/10#列和 11#列，添加 750 $\mu$ L 清洗液 B。
- A.4.1.4 在萃取样品盘 6#列/12#列添加 50-200 $\mu$ L 洗脱液。
- A.4.1.5 摇晃重悬磁珠，在萃取样品盘 2#/8#列添加 50 $\mu$ L 磁珠。
- A.4.1.6 在萃取样品盘 1#列/7#列，添加 200 $\mu$ L 95%乙醇。

## A.4.2 加样

取200 $\mu$ L样品上清液，加入到萃取样品盘的1#列/7#列，见图A.1。



图A.1 萃取样品盘

#### A.4.3 启动

开启自动核酸萃取仪进样门，安装已加好试剂的96孔萃取样品盘和搅拌套管，确保萃取样品盘完全推入底部。关闭自动核酸萃取仪进样门，按下“开始”按钮。萃取反应将在1小时内完成。

#### A.4.4 关闭

萃取完成后，取出萃取样品盘，将核酸从6#列/12#列转移到新的离心管保存。最终洗脱下来的核酸可能存在磁珠残留，但并不影响后续操作，若是需最小化磁珠残留所带来的风险，可将洗脱液转移到离心管，全速离心1min，然后将上清液转移到新的离心管中。建议使用新鲜制备的核酸用于后续操作，若要长期保存核酸，建议存于-80℃超低温冰箱。

地方标准信息服务平台

## 参 考 文 献

- [1] GB/T 20000.1—2014 标准化工作指南 第1部分：标准化和相关活动的通用术语
- [2] GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- [3] GB 19489 实验室 生物安全通用要求
- [4] GB/T 19438.1 禽流感病毒通用荧光RT-PCR检测方法
- [5] NY525 有机肥料
- [6] GB/T 18877-2020 有机无机复混肥料
- [7] 马文丽. 分子生物学实验手册[M]. 北京：人民军医出版社，2011.
- [8] DNA/RNA萃取试剂盒使用手册
- [9] 田雪力. 牛粪制卧床垫料过程中物料特征及病原活菌检测方法研究[D]. 东北农业大学, 2019.
- [10] 於颖. PMA-qPCR定量检测畜禽肉类中食源性致病菌活菌的研究[D]. 东华大学, 2015.
- [11] 盖冬雪, 任洪林, 卢士英, 等. 乳品中大肠杆菌PMA-qPCR活菌检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(2):493-498.
- [12] 于小龙, 徐进, 张昊, 等. PMA-qPCR方法快速检测VBNC状态青枯菌[J]. 植物保护, 2016, 42(1):144-149.
- [13] 刘光富, 马磊, 付贤树, 等. PMA-qPCR快速检测畜禽肉类中沙门氏菌活菌方法的建立[J]. 中国计量大学学报, 2018, 29(4):362-366.
- [14] 罗剑飞, 林炜铁, 郭勇. PMA与PCR结合的细菌活细胞检测方法[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2010, 38(9):142-146.

---

地方标准信息服务平台