

水产品中副溶血性弧菌检测 实时荧光重组 酶介导链替换核酸扩增法

Detection method for *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic by real-time fluorescence
recombinase-aid amplification

地方标准信息服务平台

2022 - 03 - 18 发布

2022 - 04 - 18 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。

本文件由南京农业大学提出并归口。

本文件起草单位：南京农业大学、江苏省淡水水产研究所、上海海关动植物与食品检测中心、南京市产品质量监督检验研究院、广东省科学院微生物研究所、杭州傲敏生物科技有限公司。

本文件主要起草人：薛峰、朱晓华、申进玲、蒋原、张驰、薛亮、汤芳、戴建君、吴清平、梁莹、任建鸾、赵凯颖、张正荣。

地方标准信息服务平台

水产品中副溶血性弧菌检测 实时荧光重组酶介导链替换核酸扩增法

1 范围

本文件规定了水产品中副溶血性弧菌检测实时荧光重组酶介导链替换核酸扩增（recombinase-aid Amplification, RAA）法的试剂材料、仪器设备、检测程序、操作步骤、结果判定和报告、检出限及防止污染措施。

本文件适用于水产品中副溶血性弧菌检测。

本文件适用于水产品副溶血性弧菌的快检初筛。

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 4789.7 食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

重组酶介导链替换核酸扩增 recombinase-aid Amplification, RAA

一种利用重组酶、单链结合蛋白和DNA聚合酶代替了传统PCR的热循环解链过程，在恒温下（一般为37℃~42℃），进行核酸扩增的技术。

4 原理

RAA法利用重组酶、单链结合蛋白和DNA聚合酶代替了传统PCR的热循环解链过程。根据副溶血性弧菌的特异性基因序列，结合荧光探针检测法对水产养殖及水体中副溶血性弧菌进行判定。经实时荧光RAA扩增后，根据样品在30 min内是否出现扩增曲线，可判定样品结果。

5 试剂材料

除另有规定外，试剂为分析纯或生化试剂，实验用水符合GB/T 6682的要求。所有试剂均用无DNA酶污染的容器分装。试剂材料有：

a) 探针和引物

根据副溶血性弧菌的特异性基因序列设计探针和引物。

表1 副溶血性弧菌探针和引物

致病菌种类	引物探针名称	序列 (5'-3')	目的基因
副溶血性弧菌	上游引物 <i>tlh</i> -F	TTAGATTTGGCGAACGAGAACGCAGACATTACG	<i>tlh</i>
	下游引物 <i>tlh</i> -R	AGATGTTGCCTGTATCAGACAAGCTGTCACCGA	
	exo探针 <i>tlh</i> -P	TTACGTTCTTCGCCGCTGACAATCGCTTC[FAM-dT][THF]]A[BHQ-dT]ACAACCACACGAT-SpacerC3	

b) 试剂

1) RAA 反应缓冲液: 20% PEG, 280 mmol/L 醋酸镁 ($MgAc_2$)。也可采用等效的商品试剂盒。

2) 冻干酶制剂: 1 mmol/L dNTP、90 ng/ μ L 单链结合蛋白、120 ng/ μ L *recA* 重组酶、30 ng/ μ L *Bsu* DNA 聚合酶、30 ng/ μ L *ExoIII*、100 mmol/L Tricine、20% PEG、5 mmol/L 二硫苏糖醇、100 ng/ μ L 肌酸激酶, 保存于 200 μ L 反应管中。也可采用等效的商品试剂盒。

3) 阳性对照: 副溶血性弧菌标准菌株 ATCC17802, 或含目的片段的 DNA; 阴性对照: 非副溶血性弧菌标准菌株, 或不含目的片段的 DNA; 空白对照: 无菌水。

6 仪器和设备

包括以下几种:

a) 荧光检测仪: 带有恒温 ($39\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) 扩增功能的荧光检测仪。

b) 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, 并配备与移液器匹配的吸头。

c) 高速台式离心机: 离心力 $\geq 12000\text{ g}$ 。

d) 恒温水浴锅或金属浴: $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

e) 天平: 感量 0.01 g。

7 检测程序

副溶血性弧菌实时荧光RAA检测程序见图 1。

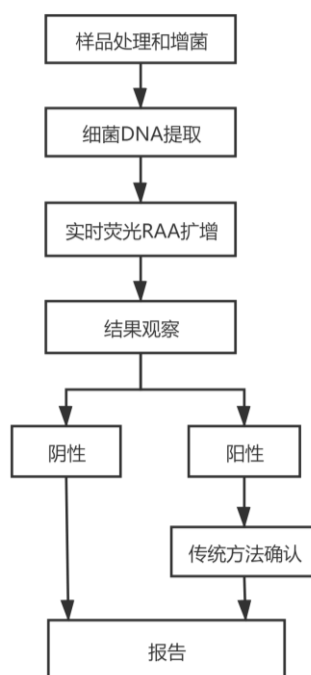


图1 副溶血性弧菌实时荧光 RAA 检测程序

8 操作步骤

8.1 样品处理和增菌

水产品参照GB 4789.7 执行。

8.2 细菌模板 DNA 的制备

8.2.1 试剂盒法

使用商品化DNA提取试剂盒，吸取适量获得的增菌液，按其说明提取制备模板DNA。

8.2.2 煮沸法

8.2.2.1 吸取 10.1 获得的增菌液 1 mL 菌液加入 1.5 mL 离心管中，10000 g 离心 1 min，弃上清。

8.2.2.2 加入 1 mL 无菌水，充分悬浮沉淀，10000 g 离心 1 min，弃上清；

8.2.2.3 加入 100 μ L 无菌水混匀后沸水浴（或 95 $^{\circ}$ C 金属浴）10 min，置冰上冷却；

8.2.2.4 10000 g 离心 1 min，上清液即为模板 DNA。

8.3 实时荧光 RAA 扩增

8.3.1 实时荧光 RAA 反应体系

副溶血性弧菌 RAA 检测，50 μ L 反应体系见表 2。

表2 副溶血性弧菌荧光 RAA 反应体系

组分名称	体积 (μL)
20% PEG	12.5 μL
<i>tlh</i> -F(10 μmol/L)	2.1 μL
<i>tlh</i> -R(10 μmol/L)	2.1 μL
<i>tlh</i> -P(10 μmol/L)	0.6 μL
DNA 模板 (20 ng/μL)	4.0 μL
ddH ₂ O	26.2 μL
MgAc ₂ (280 mmol/L)	2.5 μL
总量	50 μL

注：（1）DNA模板量可根据不同样品，具体情况进行调整。
（2）将除MgAc₂和模板DNA以外的所有成分涡旋混匀，分装混合液至含有冻干酶制剂的200 μL反应管中，轻柔手弹使冻干粉充分重溶均匀，短暂离心，打开反应单元，向每个反应单元的管盖中加入2.5 μL MgAc₂，然后向各反应单元加入适量模板DNA (≤100 ng)，充分混匀并离心。
（3）可使用等效的商品化荧光RAA试剂盒按照其说明书进行检测。

8.4 反应条件

将反应管置于荧光检测仪中，39℃恒温，30 min。在反应过程中实时监测荧光信号。

8.5 实验对照

检测过程中分别设阴性对照、空白对照和阳性对照。空白对照以无菌水替代模板DNA；阴性对照以非副溶血性弧菌标准菌株DNA作为模板DNA；阳性对照以副溶血性弧菌标准菌株ATCC 17802 DNA作为模板DNA。

9 结果判定和报告

9.1 质控标准

空白对照在30 min内无扩增曲线；阴性对照在30 min内无扩增曲线；阳性对照在10 min内出现典型的扩增曲线。

以上要求需在同一次实验中同时满足，否则，本次实验无效，需重新进行。

9.2 结果判定

样品在30 min内无扩增曲线，可判定样品结果为阴性，可直接报告未检出副溶血性弧菌；样品在30 min内出现扩增曲线，则样品结果为副溶血性弧菌初筛阳性。对于初筛阳性结果，应参见GB 4789.7进行确证后报告结果。

10 检出限

本部分所规定方法的最低检出限（LOD）为 10^2 CFU/mL。

11 生物安全措施

按照GB 19489 规定执行。

12 防污染措施

防止污染措施应按照GB/T 27403的规定执行。

地方标准信息服务平台