

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2565—2010

食品中志贺氏菌分群检测 MPCR-DHPLC 法

Grouping detection of *Shigella* in food—
MPCR-DHPLC

2010-05-27 发布

2010-12-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：辽宁出入境检验检疫局、山东出入境检验检疫局、西藏出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：郑秋月、曹际娟、雷质文、王秋艳、徐杨、于珂、于灵、王长文、赵昕、徐君怡、赤列加措。

食品中志贺氏菌分群检测

MPCR-DHPLC 法

1 范围

本标准规定了食品中志贺氏菌,包括福氏志贺氏菌、宋氏志贺氏菌、鲍氏志贺氏菌、痢疾志贺氏菌的MPCR-DHPLC分群检测方法。

本标准适用于食品中志贺氏菌,包括福氏志贺氏菌、宋氏志贺氏菌、鲍氏志贺氏菌、痢疾志贺氏菌的MPCR-DHPLC快速分群检测。

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/T 4789.5 食品卫生微生物检验 志贺氏菌检验

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 食品分子生物学检验

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

3.1

PCR polymerase chain reaction

聚合酶链式反应。

3.2

MPCR multiplex PCR

多重PCR。

3.3

DHPLC denaturing high performance liquid chromatography

变性高效液相色谱。

3.4

TEAA

三乙基铵乙酸盐。

4 生物安全措施

为了保护实验室人员的安全,应由具备资格的工作人员检测致病菌,所有培养物应小心处置。应按照GB 19489的有关规定执行。

5 废弃物处理和防止污染的措施

- 5.1 检测过程中的废弃物需经 121 ℃ 高压灭菌处理至少 30 min 后再弃置。
- 5.2 检测过程中防止交叉污染的措施按 GB/T 27403 规定执行。

6 原理

MPCR, 又称多重引物 PCR 或复合 PCR, 它是在同一 PCR 反应体系里加上两对以上引物, 同时扩增出多个核酸片段的 PCR 反应, 其反应原理, 反应试剂和操作过程与一般 PCR 相同。DHPLC 分析技术是应用离子对反相液相色谱原理对 DNA 片段进行分离。离子对采用三乙基胺乙酸盐缓冲溶液 (TEAA), 核苷酸片段分子中带负电荷的磷酸根基团与 TEAA 分子中带正电荷的氨基发生静电作用相互吸引, 同时 TEAA 分子中的三个乙基与固定相 C₁₈ 表面的烷基发生疏水作用力而相互吸引, 通过流动相中的乙腈的梯度洗脱达到将不同大小的核苷酸片段分离。

7 试剂和材料

除另有规定外, 所有试剂纯度应为色谱纯。水为灭菌超纯水, 符合 GB/T 6682 中一级水的规格。所有试剂均用无 DNA 酶污染的容器分装。

- 7.1 Taq DNA 聚合酶。
- 7.2 dNTP: dATP、dTTP、dCTP、dGTP。
- 7.3 10×PCR 缓冲液: 200 mmol/L Tris-HCl(pH8.4), 200 mmol/L 氯化钾, 15 mmol/L 氯化镁。
- 7.4 引物: 引物序列见附录 A 表 A.1。
- 7.5 TE 溶液。
- 7.6 10% SDS。
- 7.7 蛋白酶 K(20 mg/mL)。
- 7.8 氯化钠溶液 (NaCl): 5 mol/L 和 0.7 mol/L。
- 7.9 10% CTAB。
- 7.10 三氯甲烷。
- 7.11 异戊醇。
- 7.12 酚。
- 7.13 异丙醇。
- 7.14 70% 乙醇。
- 7.15 DHPLC 缓冲液: 缓冲溶液 A 为 50 mL TEAA 和 250 μL 乙腈混合, 加水定容至 1 000 mL; 缓冲溶液 B 为 50 mL TEAA 和 250 mL 乙腈混合, 加水定容至 1 000 mL; 缓冲溶液 D 为 75% 乙腈。

8 主要仪器和设备

- 8.1 PCR 仪。
- 8.2 DHPLC 仪。
- 8.3 高速离心机: 离心转速 18 000g。
- 8.4 PCR 超净工作台。
- 8.5 微量可调移液器和灭菌吸头: 2 μL, 10 μL, 100 μL, 200 μL, 1 000 μL。

8.6 灭菌 PCR 反应管。

9 方法提要与检测程序

9.1 方法提要

志贺氏菌属根据生化反应及抗原组成不同,分为 A、B、C、D 四个血清群(种)。A 群为痢疾志贺氏菌,B 群为福氏志贺氏菌,C 群为鲍氏志贺氏菌,D 群为宋氏志贺氏菌。本方法采用 MPCR 同时扩增志贺氏菌及其四个血清群。MPCR 产物再利用 DHPLC 非变性条件下的 DNA 分离技术,根据 DNA 扩增片段长度的不同,按照从小到大顺序依次洗脱核苷酸片段,从而实现对食品中志贺氏菌进行快速分群检测。

9.2 检测程序

MPCR-DHPLC 分群检测食品中志贺氏菌检测流程见图 1。

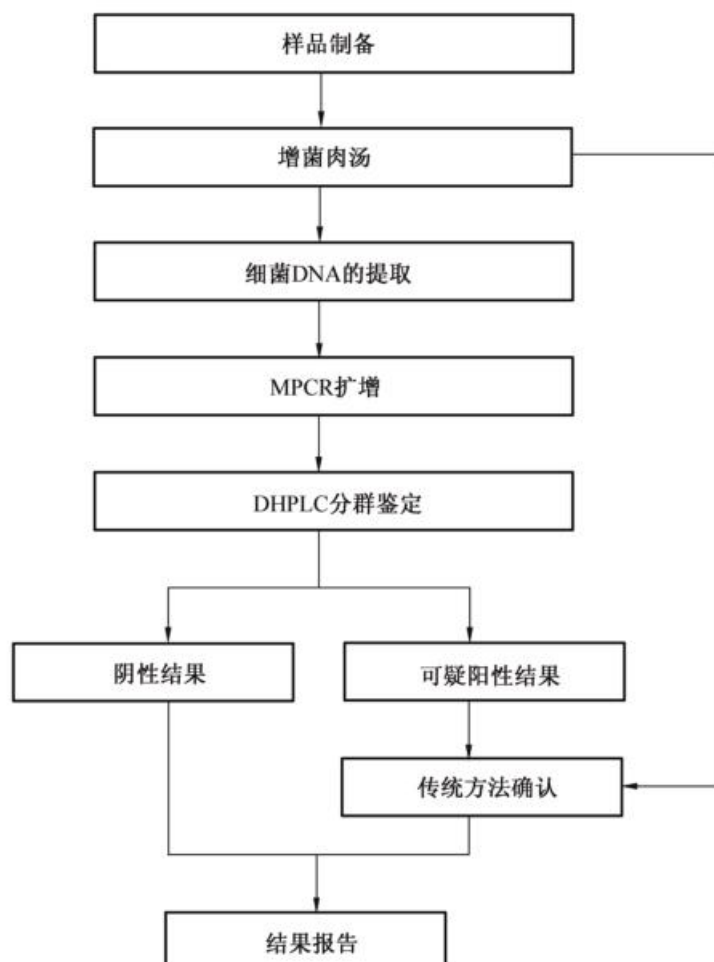


图 1 MPCR-DHPLC 法分群检测食品中志贺氏菌流程图

10 操作步骤

10.1 样品制备、增菌培养和分离

按照 GB/T 4789.5 进行增菌和分离培养。

10.2 增菌液模板 DNA 的制备

取 10.1 中的增菌液 1.5 mL,加到 1.5 mL 无菌离心管中,13 000g 离心 1 min;吸弃上清液,取沉淀,加 567 μL TE 溶液(pH8.0),悬浮,加 30 μL 10% SDS 和 3 μL 蛋白酶 K(20 mg/mL),混匀,37 °C 温浴 1 h;加 100 μL 氯化钠(5 mol/L),混匀,加 80 μL CTAB/氯化钠溶液(10% CTAB 和 0.7 mol/L 氯化钠),混匀,65 °C 温浴 10 min;加等体积三氯甲烷/异戊醇(体积比为 24 : 1),混匀,13 000g 离心 10 min;取上清液,加等体积酚/三氯甲烷/异戊醇(体积比为 25 : 24 : 1),混匀,13 000g 离心 10 min;取上清液,加 0.6 倍体积异丙醇,轻轻混匀,13 000g 离心 10 min;取沉淀,用 70%乙醇清洗 2 次,干燥,加 100 μL TE 溶液(pH8.0)溶解,此即为 DNA 溶液。若不能立即检测,可保存于 -20 °C 备用。按同样方法制备阳性对照菌株和阴性对照菌株的增菌液模板 DNA。也可使用商业化的 DNA 提取试剂盒并按其说明制备模板 DNA。

10.3 DNA 浓度和纯度的测定

取 5 μL DNA 溶液加水梯度稀释至 1 mL,使用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计测 260 nm 和 280 nm 处的光密度值。DNA 的浓度按照式(1)计算:

$$c = A \times N \times 50 / 1\ 000 \dots\dots\dots(1)$$

式中:

c——DNA 浓度,单位为微克每微升(μg/μL);

A——260 nm 处的吸光值;

N——核酸稀释倍数。

1OD_{260 nm} = 50 μg/mL 双链 DNA。

当 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.7~1.9 之间时,适宜于 PCR 扩增。

10.4 PCR 扩增

10.4.1 PCR 反应体系(25 μL):10×PCR 缓冲液 2 μL、dNTPs(10 mmol/L)2 μL、Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)0.2 μL、模板 DNA(50 ng/μL)2 μL、志贺氏菌、福氏志贺氏菌、宋氏志贺氏菌、鲍氏志贺氏菌、痢疾志贺氏菌的上下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL、水补足至 25 μL。

10.4.2 反应条件:94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 60 s,60 °C 退火 60 s,72 °C 延伸 60 s,进行 35 个循环;72 °C 延伸 7 min,4 °C 保存反应产物。

10.4.3 将 PCR 产物进行 DHPLC 分析。

注:PCR 反应参数可根据基因扩增仪型号的不同进行适当的调整。

10.5 DHPLC 检测

10.5.1 DHPLC 分析条件

10.5.1.1 色谱柱:PS-DVB & C₁₈ DNASep 色谱柱(4.6 mm×50 mm,粒度 3 μm)。

10.5.1.2 柱温:50 °C。

10.5.1.3 流动相(体积比):

- 0.0 min, 55.0%缓冲溶液 A, 45.0%缓冲溶液 B;
- 0.5 min, 50.2%缓冲溶液 A, 49.8%缓冲溶液 B;
- 4.3 min, 40.9%缓冲溶液 A, 59.1%缓冲溶液 B;
- 8.0 min, 37.3%缓冲溶液 A, 62.7%缓冲溶液 B;
- 11.8 min, 35.5%缓冲溶液 A, 64.5%缓冲溶液 B;
- 15.5 min, 34.3%缓冲溶液 A, 65.7%缓冲溶液 B。

10.5.1.4 流速:0.9 mL/min。

10.5.1.5 检测器:荧光检测器(光源:150 W Xenon 灯;激发谱带宽:15 nm;发射谱带宽:15.3 nm;检测灵敏度:在波长 350 nm 积分 2 s)。

10.5.1.6 上样量:PCR 产物 10 μ L。

10.5.2 DHPLC 分析

10.5.2.1 将装有 PCR 产物的反应管放置在 DHPLC 金属板的微孔中。

10.5.2.2 登录 DHPLC 分析系统,按照 10.4.1 设置 DHPLC 分析条件,建立检测程序并运行。

注:DHPLC 分析条件可根据 DHPLC 仪器型号的不同进行适当的调整。

10.6 质控对照设置

检测过程中应分别设阳性对照和阴性对照。阳性对照为福氏志贺氏菌、宋氏志贺氏菌、鲍氏志贺氏菌、痢疾志贺氏菌标准菌株,阴性对照为大肠埃希氏菌等非目标致病菌的标准菌株。

11 结果及判断

11.1 质控标准

11.1.1 阴性对照:无吸收峰出现。

11.1.2 阳性对照:出现典型的 PCR 产物吸收峰,且峰吸收值大于 3 mV。

11.1.3 不符合上述对照质控标准的视为无效。

11.2 结果判定与报告

11.2.1 检测结果判定

11.2.1.1 福氏志贺氏菌经 MPCR 可扩增出 629 bp 和 263 bp 两个片段的产物,DHPLC 检测出该两个 PCR 产物阳性吸收峰。

11.2.1.2 宋氏志贺氏菌经 MPCR 可扩增出 629 bp 和 104 bp 两个片段的产物,DHPLC 检测出该两个 PCR 产物阳性吸收峰。

11.2.1.3 鲍氏志贺氏菌经 MPCR 可扩增出 629 bp 和 237 bp 两个片段的产物,DHPLC 检测出该两个 PCR 产物阳性吸收峰。

11.2.1.4 痢疾志贺氏菌经 MPCR 可扩增出 629 bp 和 173 bp 的两个片段的产物,DHPLC 检测出该两个 PCR 产物阳性吸收峰。

注:鲍氏志贺氏菌引物与部分大肠埃希氏菌有交叉反应,DHPLC 检测大肠埃希氏菌 S88、55989、E24377A、O55:H6、O155、O59、O127:H6 等会出现 237 bp 的 PCR 单一产物吸收峰。

11.2.2 结果报告

11.2.2.1 检测样品无典型 PCR 产物阳性吸收峰出现,可判定样品结果为阴性,直接报告未检出 $\times\times\times$ 志贺氏菌。

11.2.2.2 检测样品出现典型的 PCR 产物阳性吸收峰,出峰时间与阳性对照一致,且吸收峰值大于 3 mV 时,可判定该样品结果为×××志贺氏菌可疑阳性。

11.2.2.3 检测样品出现典型的 PCR 产物阳性吸收峰,但吸收峰值小于 3 mV 时,建议样本重做。重做结果峰吸收值仍小于 3 mV 则为×××志贺氏菌阴性,否则为×××志贺氏菌可疑阳性。

11.2.2.4 对于可疑×××志贺氏菌阳性结果,应参见 GB/T 4789.5 做进一步的生化鉴定和报告。

附 录 A
(规范性附录)
引 物 序 列

表 A.1 食品中志贺氏菌 MPCR-DHPLC 分群检测所用引物序列

致病菌名称	基因名称	引物序列	预期片段/bp
志贺氏菌	ipaH	5'-gtt cct tga ceg cct tte ega tac egt c-3'	629
		5'-gcc ggt cag cca ecc tet gag agt ac-3'	
福氏志贺氏菌	prpB	5'-tat cag tta tta caa tcc egc t-3'	263
		5'-atc tat tgc etc ttg ttg caa t-3'	
宋氏志贺氏菌	prpB	5'-aga gca aca aga ggc aat ag-3'	104
		5'-gtc att acc gtg ega tgg-3'	
鲍氏志贺氏菌	wzzB	5'-cag gtc ttt tcc cag tte ttc-3'	237
		5'-tcc gac att cag gct tea c-3'	
痢疾志贺氏菌	SHT	5'-gcc agt aca cct caa cgt ac-3'	173
		5'-att cct teg caa cca cat taa c-3'	