SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1872—2007

出入境口岸霍乱弧菌多重聚合酶链反应操作规程

Examination codes of multiplex PCR for *Vibrio cholerae* at entry-exit ports

2007-04-06 发布　　2007-10-16 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

本标准的附录 A 为资料性附录。

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：中华人民共和国珠海出入境检验检疫局、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、中国 CDC 传染病预防控制所、中华人民共和国广西出入境检验检疫局、中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：杨泽、朱海、阚飙、涂承宁、景怀琦、林继灿、刘洪文、杜联峰、谭勇、叶立青、谭华、王岚。

本标准为首次发布的出入境检验检疫行业标准。

出入境口岸霍乱弧菌多重聚合酶链反应操作规程

1 范围

本标准规定了出入境口岸霍乱弧菌多重 PCR 检验的对象、检验程序及结果报告。

本标准适用于霍乱弧菌菌株的霍乱肠毒素基因的检验。直接自标本或其增菌液中进行 O1 群和 O139 群霍乱弧菌的检测筛查也可参照(参考)使用,以提示进行进一步的菌株分离。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 15984 霍乱诊断标准及处理原则

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

SN/T 1239 国境口岸霍乱检验规程

WS/T 230 临床诊断中聚合酶链反应(PCR)技术的应用

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

聚合酶链反应 polymerase chain reaction,PCR

在体外用于扩增位于两段已知序列(引物)之间的 DNA 区段的方法。

3.2

多重 PCR multiplex PCR

在同一试管中加入多对引物、在一个反应过程中扩增同一模板的几个目标基因片段。

4 缩略语

下列缩略语适合于本标准。

4.1

VC *Vibrio Cholerae*

霍乱弧菌。

4.2

ctxA Cholera enterotoxin A

霍乱弧菌肠毒素 A。

4.3

toxR Central regulatory protein ToxR

中心调节蛋白。

4.4

PCR　polymerase chain reaction

聚合酶链反应。

4.5

dNTP　deoxyribonucleoside triphosphate

脱氧核苷三磷酸。

4.6

dATP　deoxyadenosine triphosphate

脱氧腺苷三磷酸。

4.7

dGTP　deoxyguanosine triphosphate

脱氧鸟苷三磷酸。

4.8

dCTP　deoxycytidine triphosphate

脱氧胞苷三磷酸。

4.9

dTTP　deoxythymidine triphosphate

脱氧胸苷三磷酸。

4.10

SDS　sodium dodecyl sulfate

十二烷基硫酸钠。

4.11

Tris　tris (hydroxymethyl) aminomethane

三(羟甲基)氨基甲烷。

4.12

***Taq* 酶　*Taq* DNA polymerase**

Taq DNA 聚合酶。

4.13

PBS　phosphate-buffered saline

磷酸盐缓冲液。

5　对象

5.1　霍乱弧菌菌株。

5.2　霍乱感染病例、霍乱感染嫌疑人的排泄物、呕吐物及其增菌液。

5.3　被霍乱弧菌污染或有霍乱弧菌污染嫌疑的水生动物、食品、饮用水、压舱水和环境样本及其增菌液。

6　检验程序

6.1　准备

6.1.1　实验室准备检验设备和材料，所需设备和材料参见附录 A。实验室生物安全符合 GB 19489 和《人间传染的病原微生物名录》的规定。PCR 防污染措施按 WS/T 230 要求。

6.1.2　对所采集的样本应进行标志，标志应具唯一性。

6.2 实验室检验

6.2.1 样品采集、增菌培养和细菌分离鉴定

按照 GB 15984 和 SN/T 1239 相关标准进行。

6.2.2 用于细菌 DNA 提取的样本的前处理

6.2.2.1 霍乱弧菌菌株的处理

用无菌环从平板上取四分之一个到 1 个纯菌落的菌量，混悬于 100 μL 的纯水中。模板提取见 6.2.3。

取纯菌的 LB 或碱性蛋白胨增菌液 1 mL 加到 1.5 mL 离心管中，以 12 000 r/min 离心 2 min 集菌，去上清液，用 1 mL 生理盐水或 pH 7.4 的 PBS 洗一遍，8 000 r/min 离心 5 min，尽量吸干上清；沉淀物用于模板提取见 6.2.3。

6.2.2.2 粪便和呕吐物样本的直接处理

直接从粪便和呕吐物样本中提取模板时，可取水样粪便或呕吐物约 200 μL 或 200 mg，用 1 mL PBS(pH7.4)悬浮，2 000 r/min 离心 5 min，收集上清液于 1.5 mL 离心管，10 000 r/min 离心 5 min，尽量吸干上清液；沉淀物用于模板提取见 6.2.3。同时，可对上述收集的粪便上清液进行 1∶10 倍的连续稀释 2 次，10 000 r/min 离心 5 min，尽量吸干上清液；沉淀物用于模板提取见 6.2.3。并将粪便的 3 种稀释样本的 DNA 模板分别进行 PCR 检测。

6.2.2.3 水样直接的处理

将 100 mL～500 mL 水样用 0.2 μm 滤膜过滤，取滤膜悬浮于 1 mL～5 mL 蒸馏水中，振荡混匀。样本可采用不稀释、1∶20 稀释和 1∶100 稀释的方法进行 PCR 检测。取 1 mL 样品以 12 000 r/min 离心 2 min 集菌，去上清液，沉淀物用于模板提取见 6.2.3。

6.2.2.4 增菌液的处理

所有样本均可按照 GB 15984 和 SN/T 1239 相关标准方法进行增菌，取增菌液 1 mL 加到 1.5 mL 离心管中，以 12 000 r/min 离心 2 min 集菌，去上清液，用 1 mL 生理盐水或 pH 7.4 的 PBS 洗一遍，8 000 r/min离心 5 min，尽量吸干上清液；沉淀物用于模板提取见 6.2.3。

进行霍乱弧菌的监测时宜采用增菌法，用增菌液提取扩增模板。

6.2.3 模板 DNA 制备

6.2.3.1 加热处理法

在沉淀物中加入 50 μL～100 μL 超纯水，振荡混匀，100℃煮沸 10 min，12 000 r/min 离心 5 min，上清液即为扩增模板。上清液转移并保存在－20℃备用，－70℃可长期保存。

6.2.3.2 酚-氯仿 DNA 提取法

在沉淀物中加入 700 μL DNA 提取液，100℃煮沸 10 min，加酚∶三氯甲烷(1∶1，体积比)700 μL，振荡混匀，12 000 r/min 离心 5 min，取上清液至另一离心管中，加入等量无水乙醇沉淀 DNA，12 000 r/min离心 5 min，去上清液，再加入 1 mL 的 70%乙醇冲洗一次，12 000 r/min 离心 5 min，去上清液，室温晾干，加入 50 μL～100 μL TE 液(或核酸溶解液)溶解沉淀，即为扩增模板。保存在－20℃备用，－70℃可长期保存。

6.2.3.3 试剂盒提取纯化 DNA 法

按适用于细菌基因组提取的试剂盒说明书操作。

6.2.4 PCR 检验

6.2.4.1 原理

选择和扩增霍乱弧菌的肠毒素基因(ctxA)、中心调节蛋白基因(toxR)、O1 群和 O139 群特异性基因的靶序列各设计 1 对特异性引物，通过 PCR 技术，扩增出特异性片断，判断相应基因的存在。

6.2.4.2 引物和扩增产物

各基因的 PCR 检测使用以下引物：

——ctxA:5'-CGG GCA GAT TCT AGA CCT CCT G-3'
5'-CGA TGA TCT TGG AGC ATT CCC AC-3' （扩增片断长度:564bp）
——toxR:5'-CCT TCG ATC CCC TAA GCA ATA C-3'
5'-AGG GTT AGC AAC GAT GCG TAA G-3' （扩增片断长度:779bp）
——*V. cholerae* O1:5'—GTT TCA CTG AAC AGA TGG G-3'
5'-GGT CAT CTG TAA GTA CAA C-3' （扩增片断长度:192bp）
——*V. cholerae* O139:5'-AGC CTC TTT ATT ACG GGT GG-3'
5'-GTC AAA CCC GAT CGT AAA GG-3' （扩增片断长度:449bp）

以上4对引物可根据工作的需要进行组合使用，如只选用1对引物进行扩增，PCR反应体系按照WS/T 230要求进行。

6.2.4.3 阴性对照、阳性对照设置

阴性对照设为PCR反应的空白对照（以超纯水代替DNA模板），阳性对照采用含有检测序列的DNA（或质粒）作为PCR反应的模板。

6.2.4.4 多重PCR反应体系

每个样品做2个平行管，多重PCR反应体系如下：

——10×PCR缓冲液 5 μL；
——25 mmol/L 氯化镁（$MgCl_2$）4 μL；
——dNTPs（每种dNTP终浓度为0.2 mmol/L）1 μL；
——引物（每种引物浓度为20 μmol/L）1 μL；
——*Taq*酶（5 U/μL）0.5 μL；
——模板DNA 3 μL；
——超纯水补足至50 μL。

如果所用扩增仪没有热盖，可在每管中加石蜡油1滴。以上反应体系中氯化镁（$MgCl_2$）、dNTP、*Taq* DNA聚合酶和引物的终浓度可根据各实验室使用试剂的不同做适当调整，以达到最佳反应体系。

6.2.4.5 多重PCR反应程序

循环参数为：94℃ 4 min，变性模板；然后94℃ 1 min，55℃ 1 min，72℃ 1 min，30个循环；72℃延伸10 min。

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。

6.2.4.6 PCR扩增产物的电泳检测

用电泳缓冲液（1×TAE或0.5×TBE）制备2%琼脂糖凝胶（55℃～60℃时加入溴化乙锭至终浓度为0.5 μg/mL，也可在电泳后将凝胶浸在含0.5 μg/mL溴化乙锭的电泳缓冲液或水中，于室温30 min～45 min进行染色）。取9 μL PCR扩增产物与1 μL上样缓冲液混匀后上样，同时以DNA分子量标记物做参照。电泳时，电压大小一般控制在3 V/cm～5 V/cm，电泳缓冲液为1×TAE或0.5×TBE，电泳时间根据PCR扩增片断长度及溴酚蓝的移动位置来确定，电泳检测结果用凝胶成像分析系统记录并保存或用紫外检测仪观察和记录。

6.2.4.7 检验结果判断及意义

阴性对照未出现条带，阳性对照出现所有预期大小的扩增条带，则实验有效，否则应重新做实验，并排除污染因素。待测样品如在某预期片段大小位置上出现扩增条带，则可判定该样品相应的基因为阳性；如果待测样品未出现预期大小的扩增条带，则可报告该样品中未检出预期大小的基因片断。

——ctxA基因片断阳性，报告为"检出ctxA基因片断（564bp）"
——toxR基因片断阳性，报告为"检出toxR基因片断（779bp）"
——O1群霍乱弧菌基因片断阳性，报告为"检出O1群霍乱弧菌基因片断（192bp）"
——O139群霍乱弧菌基因片断阳性，报告为"检出O139群霍乱弧菌基因片断（449bp）"

注 1：按 6.2.2.2 或 6.2.2.3 或 6.2.2.4 进行的检测，待测样品如在某预期片段大小位置上出现扩增条带，只表示所检样品中含某种基因片断，并不表示该样品中检出霍乱弧菌。

注 2：最小弧菌（也称拟态弧菌，*vibrio mimicus*）也可出现上述某些扩增基因片断。

检测结果意义如下：

——在霍乱弧菌菌株中检测到 ctxA 基因片断，表明该待测霍乱弧菌菌株含 ctxA 基因，该菌株是一产毒菌株。

——在非霍乱弧菌菌株的样品中检测到预期大小的扩增条带，只能说明从该待测样品中检测到某种预期大小基因片断，提示可能有相对应的霍乱弧菌存在（见表 1），应对该样品做进一步的分离鉴定，霍乱弧菌分离鉴定按 GB 15984 和 SN/T 1239 相关标准的方法进行。

表 1　霍乱弧菌 PCR 检测结果分析表

检测基因	可能出现的 PCR 带型					
ctxA	+	−	+	−	+	−
O1 群	−	−	+	+	−	
O139	−	−	−	−	+	+
toxR	+	+	+	+	+	+
参考结果	产毒非 O1 非 O139 群 VC	不产毒非 O1 非 O139 群 VC	产毒 O1 群 VC	不产毒 O1 群 VC	产毒 O139 群 VC	不产毒 O139 群 VC

附 录 A
（资料性附录）
试剂、材料和仪器设备

A.1 试剂和材料

A.1.1 除另有规定外，所有试剂均采用分析纯。

A.1.2 水

应符合 GB/T 6682 中一级水的规格。用于 PCR 的水要使用超纯水。

A.1.3 DNA 提取液

称取 5 g SDS 溶于 1 000 mL TE 液中，高压灭菌备用。

A.1.4 10×PCR 缓冲液

包括：氯化钾(KCl)：500 mmol/L；Tris-HCl(pH8.3)：100 mmol/L；明胶：0.1%。

A.1.5 PCR 反应液

含氯化镁($MgCl_2$)的 PCR 缓冲液、dATP、dTTP、dCTP、dGTP、*Taq* 酶。

A.1.6 琼脂糖

A.1.7 10X 上样缓冲液

含 0.25%溴酚蓝，0.25%二甲苯青 FF，30%甘油水溶液。

A.1.8 50XTAE 缓冲液

称取 484 g Tris，量取 114.2 mL 冰乙酸，200 mL 0.5 mol/L EDTA(pH8.0)，溶于超纯水中，定容至 2 L。分装后高压灭菌备用。

A.1.9 5XTBE 电泳缓冲液

称取 54 g Tris，27.5 g 硼酸，20 mL 0.5 mol/L EDTA(pH8.0)，定容至 1 L。

A.1.10 溴化乙锭(10 mg/mL)

在 100 mL 超纯水中加入 1 g 溴化乙锭，至完全溶解，转移至棕色瓶中，保存于室温。

A.1.11 0.5 mol/L EDTA(pH8.0)

在 800 mL 超纯水中加入 186.1 g 二水乙二胺四乙酸二钠，在磁力搅拌器上剧烈搅拌，用氢氧化钠(NaOH)调节溶液 pH 值至 8.0，然后定容至 1 L，分装后高压灭菌备用。

A.1.12 TE 缓冲液(pH7.4)

0.1 mol/L Tris-HCl(pH7.2)20 mL 加入 0.5 mol/L EDTA(pH8.0)40 mL，用超纯水定容至 200 mL，高压灭菌后 4℃保存。

A.1.13 DNA 分子标记物(100 bp～1 000 bp)

A.1.14 PCR 引物

应为色谱纯。

A.1.15 阳性菌株或质粒

与相应 PCR 引物匹配。

A.2 仪器设备

A.2.1 PCR 仪。

A.2.2 电泳装置。

A.2.3 紫外检测仪或凝胶分析成像系统。

A.2.4 生物安全柜。

A.2.5 高速台式离心机(最高离心力 12 000 g 以上)。

A.2.6 台式离心机(最高离心力 2 000 g 以上)。

A.2.7 微量可调移液器(2 μL、10 μL、100 μL、1 000 μL)三套和相应吸头。