

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2332—2009

---

### 国境口岸霍乱弧菌的荧光 PCR 检测方法

Detection of *Vibrio cholerae* with real-time PCR at frontier ports

2009-07-07 发布

2010-01-16 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：中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、中华人民共和国珠海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：朱海、莫秋华、朱玉兰、范放、杨泽、赵芳、黄李华、郑晓燕。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

# 国境口岸霍乱弧菌的荧光 PCR 检测方法

## 1 范围

本标准规定了国境口岸霍乱弧菌荧光 PCR 检验的对象、检测程序及结果报告。  
本标准适用于 O1 群霍乱弧菌菌株和 O139 群霍乱弧菌菌株的筛选检测。

## 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 1022 出口食品中霍乱检测方法  
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

#### 荧光 PCR fluorescence polymerase chain reaction

又称为实时 PCR(real-time PCR)，是在普通 PCR 的基础上利用荧光染料在激发光作用下所释放的荧光光能的变化来直接反映 PCR 扩增产物量变化的新技术。

### 3.2

#### Ct 值 cycle threshold

即循环阈值，指每个反应管内所检测到的荧光信号刚好达到设定的阈值时所经历的循环数。

### 3.3

#### 分子信标探针 molecular beacons probe

分子信标探针在空间结构上呈茎环状结构，其中环序列是与靶核酸互补的探针；茎序列由与靶序列无关的互补序列构成；茎的一端连上一个荧光分子，另一端连上一个淬灭分子。当无靶序列存在时，荧光信标呈茎环结构，茎部的荧光分子与淬灭分子非常接近，荧光分子发出的荧光被淬灭分子吸收并以热能的形式散发，此时检测不到荧光信号；当有靶序列存在时，荧光信标探针的环序列与靶序列特异性结合，形成的双链体比分子信标的茎环结构更稳定，荧光分子与淬灭分子分开，此时荧光分子发出的荧光不能被淬灭分子吸收，可以检测到荧光。因此实现了荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步，从而可以实时监测 PCR 扩增的情况。

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

### 4.1

#### VC *Vibrio Cholerae*

霍乱弧菌。

4.2

**PCR Polymerase Chain Reaction**

聚合酶链反应。

4.3

**dNTP deoxyribonucleoside triphosphate**

脱氧核苷三磷酸。

4.4

**dATP deoxyadenosine triphosphate**

脱氧腺苷三磷酸。

4.5

**dGTP deoxyguanosine triphosphate**

脱氧鸟苷三磷酸。

4.6

**dCTP deoxycytidine triphosphate**

脱氧胞苷三磷酸。

4.7

**dTTP deoxythymidine triphosphate**

脱氧胸苷三磷酸。

4.8

**SDS Sodium dodecyl sulfate**

十二烷基硫酸钠。

4.9

**Tris tris(hydroxymethyl)aminomethane**

三(羟甲基)氨基甲烷。

4.10

**Taq 酶 Taq DNA polymerase**

Taq DNA 聚合酶。

4.11

**PBS phosphate buffered saline**

磷酸盐缓冲液。

4.12

**TE Tris-HCl · EDTA**

缓冲液。

5 对象

5.1 待检霍乱弧菌菌株。

5.2 霍乱感染病例或疑似霍乱感染者的排泄物、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 and 环境样本及其增菌液。

6 检测程序

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

卫生部制定的《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唯一性标识。

## 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、SN/T 1239 和 SN/T 1022 执行。

6.2.2 用于细菌 DNA 提取的样本前处理

6.2.2.1 霍乱弧菌菌株的处理

培养基上霍乱弧菌菌株的处理。

用无菌接种环从平板上挑取  $\frac{1}{4}$  个~1 个菌落,混悬于 100  $\mu\text{L}$  的灭菌或无菌双蒸水或纯水中。模板提取见 6.2.3。

增菌培养液中霍乱弧菌菌株的处理。

取纯培养的 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,弃上清液,用 1 mL 生理盐水或 pH 7.4 的 PBS 洗涤沉淀物,悬浮,8 000 r/min 离心 5 min,弃上清液;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  $\mu\text{L}$  或 200 mg,加入 1 mL pH7.4 PBS 混匀,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,吸去上清液;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可按 1:10 倍比稀释 2 次,10 000 r/min 离心 5 min,弃上清液;沉淀物用于模板提取见 6.2.3。此倍比稀释的 3 个稀释浓度样本的 DNA 模板可分别用于荧光 PCR 检测。

6.2.2.3 水样的直接处理

将 100 mL~500 mL 水样用 0.2  $\mu\text{m}$  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 稀释进行荧光 PCR 检测。取 1 mL 稀释好的样本以 12 000 r/min 离心 2 min 集菌,弃上清液,沉淀物用于模板提取见 6.2.3。

6.2.3 模板 DNA 制备<sup>1)</sup>

6.2.3.1 加热处理法

在沉淀物中加入 50  $\mu\text{L}$ ~100  $\mu\text{L}$  超纯水,振荡混匀,100  $^{\circ}\text{C}$  煮沸 10 min,置冰上数分钟,待冷却后,12 000 r/min 离心 5 min,上清液即可作为扩增模板。上清液转移并保存在 -20  $^{\circ}\text{C}$  备用。-70  $^{\circ}\text{C}$  可长期保存。

6.2.3.2 酚/三氯甲烷 DNA 提取法

在沉淀物中加入 700  $\mu\text{L}$  DNA 提取液(配方参见附录 A),100  $^{\circ}\text{C}$  煮沸 10 min,加酚/三氯甲烷(1+1,体积比)700  $\mu\text{L}$ ,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,弃上清液,室温晾干,加入 50  $\mu\text{L}$ ~100  $\mu\text{L}$  TE 液(或核酸溶解液)溶解沉淀,即为扩增模板。保存在 -20  $^{\circ}\text{C}$  备用,-70  $^{\circ}\text{C}$  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 荧光 PCR 检测

6.2.4.1 探针和引物

用于荧光 PCR 检测的引物和探针序列如下:

a) O1 群霍乱弧菌:

1) 根据实际需要,选用一种方法制备 DNA。

上游引物:5'CCAGATTGTAAAGCAGGATGGA3'

下游引物:5'GGTCATCTGTAAAGTACAAC3

探针:FAM-5'CCCGGAGTTTGTAAAGCCCACTACCGGG3'-DABCYL

b) O139 群霍乱弧菌:

上游引物:5'CATACCAACGCCCTTATCCATT3'

下游引物:5'GCATGACTGGCATCCCAAAT3'

探针:FAM-5'CGGGTGAGAAAAGACAGCAATAACACCCG3'-DABCYL

#### 6.2.4.2 阳性对照和空白对照设置

检测过程中分别设阳性对照和空白对照。阳性对照采用含有检测序列的 DNA(或质粒)作为荧光 PCR 反应的模板。空白对照用无菌水作为荧光 PCR 反应的模板。

#### 6.2.4.3 荧光 PCR 反应体系

O1 群和 O139 群霍乱弧菌的荧光 PCR 反应体系均采用如下参数:1×PCR 缓冲液、氯化镁(MgCl<sub>2</sub>)2 mmol/L、dNTPs 各 0.2 mmol/L、引物各 0.4 μmol/L、探针 0.4 μmol/L、Taq 酶 1 U~2.5 U(注:可参照所购置 Taq 酶的商家说明书适当调整使用浓度),DNA 模板 1 μL,加超纯水补足至 25 μL。

每个样品做两个平行样对照。

#### 6.2.4.4 荧光 PCR 反应程序

O1 群和 O139 群霍乱弧菌的荧光 PCR 反应程序均采用如下参数:

94 °C 3 min;[94 °C 15 s,55 °C 40 s(该步用于检测荧光),72 °C 15 s]×40 个循环。信号采集设为 FAM 荧光素。因不同 PCR 仪的性能差异,可通过条件优化适当调整 PCR 循环的退火温度及时间。

#### 6.2.4.5 荧光域值的设定

PCR 反应完成后应设定荧光阈值以分析样品的 Ct 值。以 PCR 反应的前 3 个~15 个循环的荧光信号作为基线信号(噪音),荧光阈值理论上定义为基线信号的标准偏差的 10 倍。在实际应用中可以根据仪器基线信号进行人工调整,设定原则是以阈值线刚好超过正常阴性对照样品扩增曲线(无规则的噪音线)的最高点,且不出现 Ct 值为准。

#### 6.2.4.6 质控标准

阴性对照:无扩增曲线,Ct≥40.0;

阳性对照:出现典型的扩增曲线,Ct 值应<30.0;

否则,实验视为无效。

以上操作应严格无菌操作。

### 6.3 检验结果判断及报告

检验样品 Ct 值小于或等于 35.0 时,报告 O1 或 O139 群霍乱弧菌 PCR 检测结果阳性;检验样本 Ct 值大于 35.0 且小于 40.0 时,重复检测一次,如果 Ct 值仍小于 40.0,且曲线有明显的对数增长期,可报告 O1 或 O139 群霍乱弧菌 PCR 检测结果阳性,否则报告 O1/O139 群霍乱弧菌 PCR 检测结果阴性;样本检测不到 Ct 值时,报告 O1/O139 群霍乱弧菌 PCR 检测结果阴性。

筛选阳性的样本按 GB 15984 和 SN/T 1239 的方法做进一步的分离鉴定。

## 7 废弃物的处理

检验过程中的废弃物,收集后进行高压蒸汽灭菌处理或其他等效的处理方法。

**附 录 A**  
**(资料性附录)**  
**试剂、材料和仪器设备**

**A.1 试剂和材料**

除另有规定外,所有试剂均采用分析纯。

**A.1.1 水**

应符合 GB/T 6682 中一级水的规格。用于荧光 PCR 的水要使用灭菌的超纯水。

**A.1.2 DNA 提取液**

称取 5 g SDS 溶于 1 000 mL TE 液中,高压灭菌备用。

**A.1.3 10×PCR 缓冲液**

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

**A.1.4 荧光 PCR 引物、探针**

应为色谱纯。

**A.1.5 阳性菌株或质粒**

与相应 PCR 引物、探针匹配。

**A.2 仪器设备**

**A.2.1 实时荧光定量 PCR 仪。**

**A.2.2 超净工作台。**

**A.2.3 消毒灭菌锅。**

**A.2.4 高速台式离心机(最高离心力 12 000g 以上)。**

**A.2.5 台式离心机(最高离心力 2 000g 以上)**

**A.2.6 旋涡振荡器。**

**A.2.7 低温冰箱、冷藏冷冻冰箱。**

**A.2.8 纯水器,双蒸水器。**

**A.2.9 光化学 PCR 反应管。**

**A.2.10 微量可调移液器一套(含以下四种规格:2  $\mu$ L~10  $\mu$ L、10  $\mu$ L~100  $\mu$ L、100  $\mu$ L~200  $\mu$ L、200  $\mu$ L~1 000  $\mu$ L)和相应吸头。**

---