

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2425—2010

进出口食品中霍乱弧菌快速及 鉴定检测方法 实时荧光 PCR 方法

Rapid detection of *Vibrio cholerae* in foods for import and export—
Real-time quantitative PCR method

2010-01-10 发布

2010-07-16 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、附录 B 均为规范性附录。

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：中华人民共和国广东出入境检验检疫局、中山大学达安基因有限公司。

本标准主要起草人：焦红、翁文川、刘超、易敏英、许龙岩、胡科锋、程钢、王方金。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

进出口食品中霍乱弧菌快速及 鉴定检测方法 实时荧光 PCR 方法

1 范围

本标准规定了进出口食品中霍乱弧菌的实时荧光 PCR 快速检验及鉴定方法。

本标准适用于进出口食品中霍乱弧菌 O1 群、O139 群、非 O1 非 O139 群的快速检验,以及 O1 群、O139 群的快速鉴定。

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 15984 霍乱诊断标准及处理原则

SN/T 1022 出口食品中霍乱弧菌检验方法

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

3 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

3.1

PCR polymerase chain reaction

聚合酶链式反应,简称 PCR。

3.2

实时荧光 PCR

实时荧光聚合酶链式反应。

3.3

DNA deoxyribonucleic acid

简称脱氧核糖核酸。

3.4

dNTP deoxyribonucleoside triphosphate

脱氧核苷酸三磷酸。

3.5

dATP deoxyadenosine triphosphate

脱氧腺苷三磷酸。

3.6

dCTP deoxycytidine triphosphate

脱氧胞苷三磷酸。

3.7

dGTP deoxyguanosine triphosphate

脱氧鸟苷三磷酸。

3.8

dTTP deoxythymidine triphosphate

脱氧胸苷三磷酸。

3.9

dUTP deoxyuridine triphosphate

脱氧鸟苷三磷酸。

3.10

UNG uracil N-glycosylase

尿嘧啶 N-糖基化酶。

3.11

Tris tris(hydroxymethyl) aminomethane

三(羟甲基)氨基甲烷。

3.12

Ct 值

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。

3.13

Taq 酶

Taq DNA 聚合酶。

4 测定方法

4.1 方法提要

采用 Taq Man 方法,在比对霍乱弧菌溶血素基因、编码 O 抗原的 rfb 基因的基础上,分别设计三对各自仅在霍乱弧菌的溶血素基因、rfb 基因间保守的特异性引物和三条特异性的荧光双标记探针。探针的结合部位均位于目的扩增片段内部。其中 5'端标记了 FAM 荧光素为报告荧光基团(用 R 表示),3'端标记了 TAMRA 荧光素为淬灭荧光基团(用 Q 表示),它在近距离内能吸收 5'端荧光基团发出的荧光信号。反应进入退火阶段时,引物和探针同时与目的基因片段结合,此时探针上 R 基团发出的荧光信号被 Q 基团所吸收,仪器检测不到荧光信号;而反应进行到延伸阶段时,Taq DNA 聚合酶发挥其 5'→3'外切核酸酶功能,将探针降解。这样探针上的 R 基团游离出来,所发出的荧光不再为 Q 所吸收而被检测所接收。随着 PCR 反应的循环往复,PCR 产物呈指数形式增长,荧光信号也相应增长,实现了荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步。

4.2 培养基和试剂

4.2.1 碱性蛋白胨水增菌液(见附录 A)。

4.2.2 灭菌双蒸水。

4.2.3 离心管:2 mL、1.5 mL、0.5 mL。

4.2.4 吸管:1 mL、10 mL,分刻度 0.1 mL。

4.2.5 成套试剂盒配置

4.2.5.1 引物(已配成成品),有三种,分别为:

霍乱弧菌通用型,引物上游:5'-GCCAA AATTG TGCGT ATCAG-3'

下游:5'-ATAAT CTTGG GCAAT CGCA-3'

霍乱弧菌 O1 群,引物上游:5'-GGTGG TATCA AACGT AAACG-3'

下游:5'-GAAGG AATTT CATCC AAAGC-3'

霍乱弧菌 O139 群,引物上游:5'-TTCTT GAAAG CCTTA CGTGA CG-3'

下游:5'-TATTT TCAAA TCAAG CGTCG-3'

4.2.5.2 探针(已配成成品),有三种,分别为:

霍乱弧菌通用型,5'-AACTG GCTCC AACT GACGA TAACC-3'

霍乱弧菌 O1 群,5'-CGAAG TCTAA ACCAA AACCC C-3'

霍乱弧菌 O139 群,5'-CAATC ATGCC AGCGC CGCCA-3'

探针 5'端由 FAM 标记,3'端由 TAMRA 标记。

4.2.5.3 *Taq* DNA 酶。

4.2.5.4 dNTP:dATP、dTTP、dCTP、dGTP。

4.2.5.5 DNA 提取试剂。

4.2.5.6 10×PCR 缓冲液:200 mmol/L Tris-盐酸(pH8.4),200 mmol/L 氯化钾,15 mmol/L 氯化镁。

4.3 仪器和设备

4.3.1 全自动荧光定量 PCR 仪(或者普通 PCR 仪和荧光检测仪)。

4.3.2 离心机:20 000 r/min。

4.3.3 制冰机。

4.3.4 37 °C 恒温培养箱。

4.3.5 低温冰箱;4 °C ~ -20 °C。

4.3.6 恒温水浴箱。

4.3.7 天平:量程 2 kg,感量 0.1 g。

4.3.8 均质器。

4.3.9 样品稀释瓶:250 mL、500 mL。

4.3.10 灭菌样品处理器具:取样勺、剪刀、镊子。

4.3.11 可调移液器:5 μL、10 μL、100 μL、1 000 μL。

5 步骤

5.1 样品的收集和处理

称取检样 25 g,加入装有 225 mL 碱性蛋白胨水增菌液(APW)的广口瓶内。固体样品应以均质器 8 000 r/min~10 000 r/min 打碎,或以剪刀充分剪碎,36 °C ± 1 °C 培养 6 h~8 h 和 16 h~24 h。准备进行模板 DNA 的提取。

若为牡蛎样品,应同样制备另一检样,置于 APW 中,42 °C 培养 6 h~8 h 和 16 h~24 h。

5.2 无需增菌培养,直接检测

样品处理与上述增菌培养过程一致,但无需进行增菌培养,样品与稀释液混合均匀后,即可进行模板 DNA 的提取。

5.3 荧光定量 PCR 测定

5.3.1 模板 DNA 的提取

从样品增菌液的表层(或样品稀释液管中)取 1 mL 培养液加入到 1.5 mL 无菌离心管中,8 000 r/min 离心 5 min,尽量弃去上清液,加入 1 mL 灭菌的双蒸水清洗 1 次后离心,同样尽量弃去上清液。加入 50 μL DNA 提取液充分混匀,室温放置 10 min 后,进行沸水浴 10 min,12 000 r/min 离心 5 min,将上清液转移至新管备用(不能及时检验,则放置于 -20 °C 保存)。6 h~8 h 和 16 h~24 h 的样品增菌液分别提取 DNA 进行检测。

5.3.2 荧光定量 PCR 检验

5.3.2.1 检验准备

根据需要选择使用:霍乱弧菌通用型、霍乱弧菌 O1 群及霍乱弧菌 O139 群鉴定试剂盒。

扩增反应总体积为 50 μL:模板 DNA 5 μL,引物上、下游各 10 pmol,荧光探针 3 pmol,10×PCR 缓冲液 10 μL,10 mmol/L 4×dNTPs 1 μL,*Taq* DNA 聚合酶 1.5 μL(2 U/μL),用纯水补足至 50 μL。检

验过程中分别设置阳性、阴性对照及空白对照。以含有扩增片段的质粒为阳性对照,以灭菌双蒸水为阴性对照(均由试剂盒配套供给)。

5.3.2.2 全自动荧光定量 PCR 仪的使用

在荧光定量 PCR 仪上的设定扩增条件为:93 °C,2 min 预变性;93 °C,30 s 变性;55 °C,1 min 退火及延伸,40 个循环,4 °C 保存。

5.3.2.3 普通 PCR 仪和荧光检测器的使用

使用普通 PCR 仪合并荧光检测器测试分两步进行,第一步:PCR 仪扩增反应条件设为 93 °C,2 min 预变性;93 °C,30 s 变性;55 °C,1 min 退火及延伸,10 个循环,暂停,33 °C,迅速逐个将反应管放入荧光检测仪,读取并记录读数 A_0 。

第二步:PCR 仪扩增反应条件设为 93 °C,2 min 预变性;93 °C,30 s 变性;55 °C,1 min 退火及延伸,30 个循环,暂停,33 °C,同样迅速逐个将扩增后的反应管放入荧光检测仪,读取并记录读数 A_1 。荧光激发波长为 487 nm,检测波长为 525 nm。

6 结果及判断

6.1 全自动荧光定量 PCR 仪

6.1.1 阈值设定

读取检测结果。阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品扩增曲线的最高点,结果显示阴性为准。或可根据仪器噪音情况进行调整。

6.1.2 质控标准

阴性质控品:增长的曲线不呈 S 型曲线或 C_t 值=30。

阳性质控品:增长曲线呈 S 型曲线,且强阳性质控品定量参考值在 1.774×10^4 基因拷贝/mL ~ 1.409×10^5 基因拷贝/mL 范围,临界阳性质控品定量参考值在 1.774×10^2 基因拷贝/mL ~ 1.409×10^3 基因拷贝/mL 范围。

阳性定量参考品:增长曲线呈 S 型曲线, C_t 值小于 27.0。

以上要求需在同一实验中同时满足,否则,本次实验无效,需重新进行。

6.1.3 结果描述及判定

6.1.3.1 阴性

增长的曲线不呈 S 型曲线或 C_t 值等于 30,表示样品中无霍乱弧菌。

6.1.3.2 阳性

增长曲线呈 S 型曲线且 C_t 值小于 27,表示样本中存在有霍乱弧菌。

6.1.3.3 实验灰度区

若 $27 < C_t \text{ 值} < 30$,实验需要重新进行。若重做结果的 C_t 值小于 30,且增长曲线呈 S 型曲线,则判为阳性;否则增菌后复检。

6.2 普通 PCR 仪和荧光检测器

计算每个样品荧光检测器两步结果的差: $A_x = A_1 - A_0$ 。将阴性质控品管的 A_x 称为 N ,临界阳性标准品的 A_x 值称为 P_1 ,强阳性标准品的 A_x 称为 P_2 。实验要求满足:阴性质控品,全部阴性;阳性标准品,全部阳性;同时, P_2 、 P_1 、 N 应满足 $P_2 > P_1 > N$,则本次实验有效;否则,实验无效,应检查试剂、仪器、反应条件等方面的误差。

在实验有效的前提下,样品 $A_x > N + 0.6 \times (P_1 - N)$ 判为阳性;如果 $N + 0.6 \times (P_1 - N) \geq A_x \geq N + 0.4 \times (P_1 - N)$ 则属于实验灰度区,需重复实验一次,若重复实验结果 A_x 值 $\geq N + 0.4 \times (P_1 - N)$ 判为阳性,否则判为阴性;如果 A_x 值 $< N + 0.4 \times (P_1 - N)$ 判为阴性。

6.3 实时荧光 PCR 方法检验霍乱弧菌的灵敏度

经 24 h 培养增菌,样品的检测低限为:霍乱弧菌 O1 群荧光 PCR 试剂、霍乱弧菌 O139 群荧光 PCR

试剂、霍乱弧菌通用型荧光 PCR 试剂均为 10 CFU/g;若不经增菌,上述三种试剂的检测低限为 10^2 CFU/g。

6.4 确证

检验筛选出阳性的样本,按 SN/T 1022 和 GB 15984 进行确证。

6.5 结果报告

如果霍乱弧菌通用型检测结果阳性,判断可能为 O1、O139 群、非 O1 群、非 O139 群中任一种阳性。继续则进行霍乱弧菌 O1 群、霍乱弧菌 O139 群检测。阳性结果,则可报告霍乱弧菌 O1 群(或 O139 群)筛选结果阳性,如果两个结果均为阴性,则可报告霍乱弧菌非 O1 非 O139 群结果阳性。

本标准的检验程序见附录 B。

7 防止污染和废弃物处理的措施

检验过程中防止交叉污染的措施按照 SN/T 1193 的规定执行。

检验过程中的废弃物,收集后在焚烧炉中焚烧处理。

附 录 A
(规范性附录)
培养基和试剂

碱性蛋白胨水(APW)

蛋白胨 10.0 g

氯化钠 10.0 g

蒸馏水 1 000 mL

混匀后,调节 pH 值至 (8.5 ± 0.2) ,分装 225 mL 于 250 mL 广口瓶中,121 °C 高压灭菌 10 min。

附 录 B
 (规范性附录)
 荧光 PCR 检验方法程序

