

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2562—2010

食品中霍乱弧菌分群检测 MPCR-DHPLC 法

Grouping detection of *Vibrio cholerae* 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：中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局、中华人民共和国福建出入境检验检疫局、中华人民共和国西藏出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：郑秋月、曹际娟、邵碧英、赵昕、郑晶、黄晓蓉、刘冉、徐君怡、王秋艳、李建民、耿丽梅、于畅。

食品中霍乱弧菌分群检测

MPCR-DHPLC 法

1 范围

本标准规定了食品中霍乱弧菌,包括 O1 群、O139 群和非 O1/非 O139 群霍乱弧菌的 MPCR-DHPLC 分群检测方法。

本标准适用于食品中霍乱弧菌,包括 O1 群、O139 群和非 O1/非 O139 群霍乱弧菌的 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 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

SN/T 1022 出口食品中霍乱弧菌检验方法

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(KCl), 15 mmol/L 氯化镁(MgCl₂)。
- 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

本方法采用 MPCR 同时扩增霍乱弧菌及其三个血清群(O1 群、O139 群和非 O1/非 O139 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,从而实现对食品中霍乱弧菌进行快速分群检测。

9.2 检测程序

MPCR-DHPLC 分群检测食品中霍乱弧菌的检测流程见图 1。

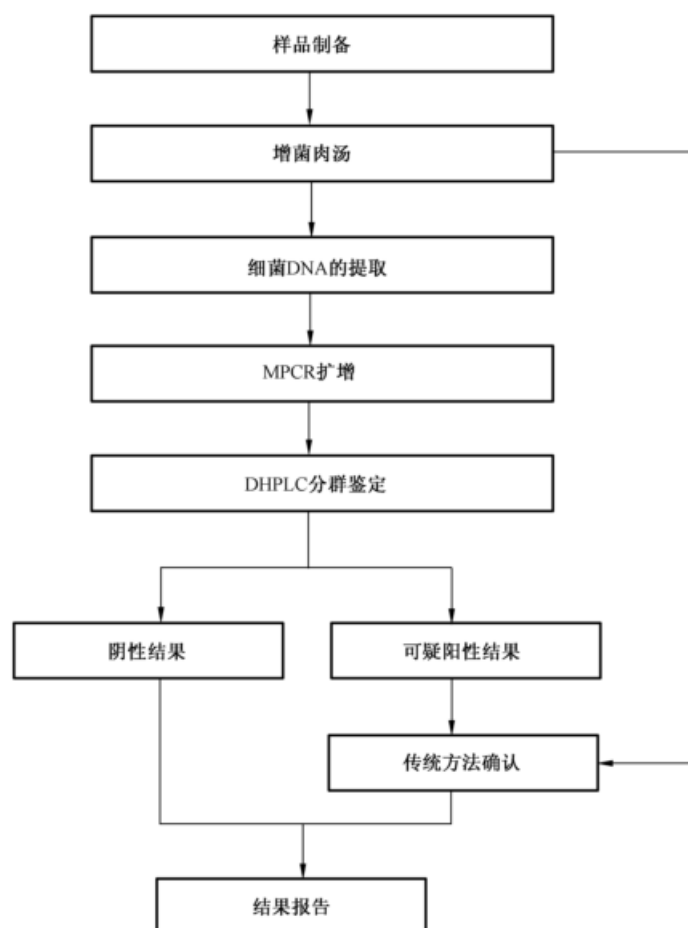


图 1 MPCR-DHPLC 法分群检测食品中霍乱弧菌流程图

10 操作步骤

10.1 样品制备、增菌培养和分离

食品中霍乱弧菌分群检测样品的制备、增菌培养和分离步骤参照 SN/T 1022 方法进行。

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 μ L TE 溶液 (pH8.0), 悬浮, 加 30 μ L 10% SDS 和 3 μ L 蛋白酶 K (20 mg/mL), 混匀, 37 $^{\circ}$ C 温浴 1 h; 加 100 μ L 氯化钠 (5 mol/L), 混匀, 加 80 μ L CTAB/氯化钠溶液 (10% CTAB 和 0.7 mol/L 氯化钠), 混匀, 65 $^{\circ}$ 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 μ L 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 $^{\circ}$ 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 μ L 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:

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

式中:

c ——DNA 浓度, 单位为微克每微升 (μ g/ μ L);

A ——260 nm 处的吸光值;

N ——核酸稀释倍数。

注: 1 OD_{260 nm} = 50 μ g/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 (30 μ L): 5 \times PCR 缓冲液 6 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 1.2 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.7 μ L、模板 DNA 终浓度 50 ng、引物 VCC-F 和 VCC-R (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L、引物 CTXA-F 和 CTXA-R (10 μ mol/L) 各 0.6 μ L、引物 TCPA-F 和 TCPA-R (10 μ mol/L) 各 0.8 μ L、引物 LPSgt-F 和 LPSgt-R (10 μ mol/L) 各 1.2 μ L、水补足至 30 μ L。

10.4.2 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 53 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 进行 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 4 $^{\circ}$ 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 \times 50 mm, 粒度 3 μ m)。

10.5.1.2 柱温: 50 $^{\circ}$ 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;

——3.0 min, 42.9% 缓冲溶液 A, 57.1% 缓冲溶液 B;

——5.5 min, 39.4% 缓冲溶液 A, 60.6% 缓冲溶液 B;

——8.0 min, 37.3% 缓冲溶液 A, 62.7% 缓冲溶液 B;

——10.5 min, 36.0% 缓冲溶液 A, 64.0% 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 10.5.1 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。阳性对照为霍乱弧菌 O1 群、O139 群、非 O1/非 O139 群的标准菌株,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 检测结果的判定

11.2.1.1 O139 群霍乱弧菌经 MPCR 扩增出 155 bp、240 bp、304 bp 和 340 bp 四个片段的产物,DHPLC 可检测出该四个 PCR 产物阳性吸收峰。

11.2.1.2 O1 群霍乱弧菌经 MPCR 可扩增出 155 bp、240 bp 和 304 bp 三个片段的产物,DHPLC 可检测出该三个 PCR 产物阳性吸收峰。

11.2.1.3 非 O1/非 O139 群霍乱弧菌经 MPCR 可扩增出 155 bp 一个片段的产物,DHPLC 可检测出该一个 PCR 产物阳性吸收峰。

11.2.2 结果报告

11.2.2.1 检测样品无 MPCR-DHPLC 阳性吸收峰出现,可判定样品结果为阴性,直接报告未检出霍乱弧菌。

11.2.2.2 检测样品出现典型的 O139 群霍乱弧菌的 MPCR-DHPLC 产物四个阳性吸收峰,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 O139 群霍乱弧菌可疑阳性。

11.2.2.3 检测样品出现典型的 O1 群霍乱弧菌的 MPCR-DHPLC 产物三个阳性吸收峰,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 O1 群霍乱弧菌可疑阳性。

11.2.2.4 检测样品出现典型的非 O1/非 O139 群霍乱弧菌的 MPCR-DHPLC 产物一个阳性吸收峰,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非 O1/非 O139 群霍乱弧菌可疑阳性。

11.2.2.5 检测样品吸收峰值小于 3 mV 时,建议样本重做。重做结果峰吸收值仍小于 3 mV 则为霍乱弧菌阴性,否则为霍乱弧菌可疑阳性。

11.2.2.6 对于霍乱弧菌可疑阳性结果,应参见 SN/T 1022 做进一步的生化鉴定和报告。

附 录 A
(规范性附录)

食品中霍乱弧菌 MPCR-DHPLC 分群检测所用引物序列

表 A.1 食品中霍乱弧菌 MPCR-DHPLC 分群检测所用引物序列

致病菌名称	基因名称	引物名称	引物序列	预期片段/bp
霍乱弧菌	胶原酶基因	VCC-F	5'-CCT AAT GAG CAA CCG ACT ATC AAA GA-3'	155
		VCC-R	5'-TGT TCT GAA GCG GTG AGC CAT AC-3'	
	CTXA	CTXA-F	5'-ACT CAG ACG GGA TTT GTT AGG C-3'	304
		CTXA-R	5'-ATC TAT CTC TGT AGC CCC TAT TAC-3'	
	TCPA	TCPA-F	5'-TTG ACC CAA GCA CAA TGT AAG AC-3'	240
		TCPA-R	5'-CTA CTG TGA ATG GAG CAG TTC C-3'	
	LPSgt	LPSgt-F	5'-ACA TCT GTA GGG ATT GTA TTG AC-3'	340
		LPSgt-R	5'-ATA ACA ACT GAG ATA TCA AGC GTC-3'	