

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 5364.2—2021

出口食品中致病菌检测方法 微滴式数字 PCR 法 第 2 部分：霍乱弧菌

Droplet digital PCR method for detection of pathogens in export food—
Part 2: *Vibrio cholerae*

2021-11-22 发布

2022-06-01 实施

中华人民共和国海关总署 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

SN/T 5364—2021《出口食品中致病菌检测方法 微滴式数字 PCR 法》共分为 8 个部分：

第 1 部分：副溶血性弧菌

第 2 部分：霍乱弧菌

第 3 部分：溶藻弧菌

第 4 部分：创伤弧菌

第 5 部分：金黄色葡萄球菌

第 6 部分：单核细胞增生李斯特氏菌

第 7 部分：产志贺毒素大肠埃希氏菌

第 8 部分：克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)

本文件为 SN/T 5364—2021 的第 2 部分。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中华人民共和国海关总署提出并归口。

本文件起草单位：中国海关科学技术研究中心、中华人民共和国天津海关、中国检验检疫科学研究院。

本文件主要起草人：魏海燕、马丹、魏咏新、李丹、张西萌、徐蕾蕊、刘莉、曹佳悦、曾静、董志珍、邢仕歌、赵良娟、高飞。

出口食品中致病菌检测方法

微滴式数字 PCR 法

第 2 部分：霍乱弧菌

1 范围

本文件规定了食品中总霍乱弧菌和含毒力基因霍乱弧菌的微滴式数字 PCR 检测方法。
本文件适用于食品中总霍乱弧菌和含毒力基因霍乱弧菌的快速定性检测。
本文件的检出限为 1 CFU/25 g~5 CFU/25 g(或 1 CFU/25 mL~5 CFU/25 mL)。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;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/T 27403—2008 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测
SN/T 1022 进出口食品中霍乱弧菌检验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。
DNA(deoxyribonucleic acid):脱氧核糖核酸。
ddPCR(droplet digital polymerase chain reaction):微滴式数字 PCR。
gfpA(GlcNAc-binding protein gene):N-乙酰葡萄糖胺结合蛋白 A 的编码基因。
PCR(polymerase chain reaction):聚合酶链式反应。
tcpA(toxin coregulated pilin gene):毒力协同调节菌毛编码基因。

5 方法原理

分别针对霍乱弧菌种属特异性 *gfpA* 基因及毒力基因 *tcpA* 设计引物/探针,将一定浓度的引物、探针与模板 DNA 及数字 PCR 反应预混液混合,配成双重数字 PCR 反应体系。将该双重数字 PCR 体系分布到 10 000~20 000 个微滴中,使大部分微滴中模板 DNA 分子的数量为 1 或 0,然后进行 PCR 扩增。*gfpA* 基因及 *tcpA* 基因探针 5'端分别标记 FAM 和 VIC 荧光基团,利用数字 PCR 系统的双通道检测,可同时对两个基因的荧光信号进行采集分析。根据 *gfpA* 基因及 *tcpA* 基因所对应的阳性微滴

的有无判定样品中是否含有霍乱弧菌和含毒力基因的霍乱弧菌。

6 主要设备及耗材

- 6.1 天平:感量 0.1 g。
- 6.2 均质器。
- 6.3 恒温培养箱:36 °C ± 1 °C。
- 6.4 高速台式冷冻离心机(离心力 12 000*g*)。
- 6.5 涡旋振荡仪。
- 6.6 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。
- 6.7 生物安全柜。
- 6.8 ddPCR 扩增仪及相关配套设备。
- 6.9 不同量程移液器:100 μL~1 000 μL、20 μL~200 μL、10 μL~100 μL、0.5 μL~10 μL。
- 6.10 离心管:2 mL、1.5 mL 和 0.2 mL。

7 材料与试剂

- 7.1 仅使用分析纯试剂和符合 GB/T 6682 规定的一级水。
- 7.2 细菌基因组提取试剂盒。
- 7.3 ddPCR 反应配套试剂。
- 7.4 去游离核酸酶:伯乐¹⁾。
- 7.5 阳性对照:霍乱弧菌参照菌株 DNA,或含目的片段的 DNA 亦可。
- 7.6 霍乱弧菌 N-乙酰葡萄糖胺结合蛋白 A 的编码基因(*gfpA*)序列片段参见附录 A.1,引物探针如下:
gfpA-F:5'-CAAACCAAACCTGGAACCCAAA-3';
gfpA-R:5'-TCAACGACACAGAACGGATTG-3';
gfpA-P:5'-FAM-CCATTGTCGCGTGATGCATTTGACC-BHQ1-3'。
- 7.7 霍乱弧菌毒力协同调节菌毛编码基因(*tcpA*)序列片段参见附录 A.2,引物探针如下:
tcpA-F:5'-GGGATATGTTTCCATTTATCAACGT-3';
tcpA-R:5'-GCGACACTCGTTTTCGAAATCA-3';
tcpA-P:5'-FAM-TGCTTTCGCTGCTGCTGCTGATCTT-BHQ1-3'。

8 检测程序

食品中霍乱弧菌 ddPCR 检测程序见图 1。

1) 给出这一信息是为了方便本文件使用者,并不表示只认可该产品。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用等效产品。

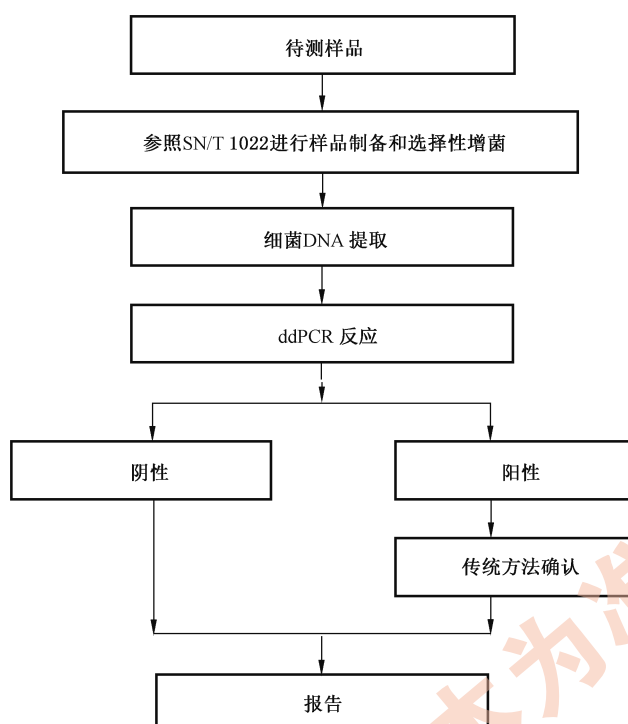


图1 食品中霍乱弧菌 ddPCR 检测程序

9 实验操作步骤

9.1 样品制备

参照 SN/T 1022 中方法进行样品制备和第一次选择性增菌。

9.2 DNA 提取

直接取 9.1 获得的增菌液 2 mL 加到无菌离心管中, 8 000g 离心 2 min, 尽量吸弃上清; 利用 100 μ L 磷酸盐缓冲液重悬沉淀, 加入 20 μ L 去游离核酸酶, 置于 37 $^{\circ}$ C 作用 15 min~30 min, 95 $^{\circ}$ C 加热 10 min 使酶失活。继而利用细菌基因组提取试剂盒提取 DNA, 操作方法按试剂盒说明书进行。

9.3 DNA 浓度和纯度测定

取适量 DNA 原液加双蒸水稀释一定倍数后, 使用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计测定 260 nm 和 280 nm 处的吸收值, 按照式(1)计算 DNA 的浓度。

$$\rho = A_{260} \times N \times 50 \dots\dots\dots (1)$$

式中:

ρ ——DNA 浓度, 单位为微克每毫升(μ g/mL);

A_{260} ——260 nm 处的吸光值;

N ——核酸稀释倍数。

当 DNA 浓度为 0.1 μ g/mL~100 μ g/mL, A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0 之间时, 适用 ddPCR 检测。

9.4 ddPCR 检测

9.4.1 对照和平行

检测过程中分别设置阳性对照、阴性对照和空白对照。以霍乱弧菌标准菌株 DNA 或含目的片段的 DNA 作为阳性对照,利用细菌基因组提取试剂盒按步骤 9.2 提取的大肠埃希氏菌标准菌株 DNA 作为阴性对照,用等体积的双蒸水代替 DNA 模板作为空白对照。每个待检样品提取的 DNA 溶液进行 3 个平行 ddPCR 检测。

9.4.2 反应体系

按照表 1 配制反应体系。

表 1 ddPCR 反应体系

试剂名称	储备液浓度	终浓度	体积
数字 PCR 反应预混液	2×	1×	10 μL
<i>gfpA</i> -F	10 $\mu\text{mol/L}$	0.75 $\mu\text{mol/L}$	1.5 μL
<i>gfpA</i> -R	10 $\mu\text{mol/L}$	0.75 $\mu\text{mol/L}$	1.5 μL
<i>gfpA</i> -P	10 $\mu\text{mol/L}$	0.25 $\mu\text{mol/L}$	0.5 μL
<i>tcpA</i> -F	10 $\mu\text{mol/L}$	0.75 $\mu\text{mol/L}$	1.5 μL
<i>tcpA</i> -R	10 $\mu\text{mol/L}$	0.75 $\mu\text{mol/L}$	1.5 μL
<i>tcpA</i> -P	10 $\mu\text{mol/L}$	0.25 $\mu\text{mol/L}$	0.5 μL
DNA 模板	—	—	3 μL
体系总体积	—	—	20 μL

9.4.3 微滴生成

将配制好的数字 PCR 反应混合液,加入微滴生成装置加样孔中,按仪器操作说明生成微滴。

9.4.4 ddPCR 扩增

将生成的微滴缓慢转移至 96 孔板中,封膜后置于 PCR 仪上,按以下参数进行 PCR 扩增:95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min(升降温速度:1 $^{\circ}\text{C/s}$);94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s(升降温速度:1 $^{\circ}\text{C/s}$),60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min(升降温速度:1 $^{\circ}\text{C/s}$),45 个循环;98 $^{\circ}\text{C}$ 10 min(升降温速度:1 $^{\circ}\text{C/s}$),4 $^{\circ}\text{C}$ 保存反应产物。

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。

9.4.5 荧光信号读取

扩增反应结束后,将 96 孔板放入 ddPCR 检测仪中对每个微滴进行荧光检测,采用 FAM 和 VIC 通道分别读取 *gfpA* 基因及 *tcpA* 基因扩增的荧光信号。

10 结果分析与表述

10.1 阈值的设定

根据空白对照的终点荧光值设定阈值限,阈值限应对空白和阳性扩增结果进行明确的区分。

10.2 质量控制

- 10.2.1 体系分隔产生的有效微滴的总数量满足所用 ddPCR 仪器型号要求。
- 10.2.2 阴性对照和空白对照无荧光信号检出。
- 10.2.3 阳性对照有荧光信号检出且阴性微滴簇与阳性微滴簇能够截然分开。
- 10.2.4 以上质控条件有一项不符合者,实验结果视为无效,查找原因后再次进行 ddPCR 检测。

10.3 结果表述

- 10.3.1 待检样品所有微滴 *gfpA* 基因及 *tcpA* 基因对应的荧光信号均低于阈值限,待测样品中不含霍乱弧菌,检测结果表述为“未检出霍乱弧菌”。
- 10.3.2 待检样品 3 个平行中至少 1 个平行 *gfpA* 基因有荧光信号高于阈值限的阳性微滴,且阴性微滴簇与阳性微滴簇能够截然分开,该样品结果为霍乱弧菌初筛阳性,对样品的增菌液进一步按 SN/T 1022 中的操作步骤进行确认后报告结果。
- 10.3.3 满足 8.3.2 的情况下,若 *tcpA* 基因同时出现荧光信号高于阈值限的阳性微滴,则该样品结果为含有毒力基因的霍乱弧菌初筛阳性,对样品的增菌液进一步按 SN/T 1022 中的操作步骤进行确认后报告结果。

11 防污染措施

检测过程中防止交叉污染的措施按照 GB/T 27403—2008 中附录 D 的规定执行。

附录 A

(资料性)

霍乱弧菌特异性基因序列片段

A.1 霍乱弧菌 *gfpA* 基因序列(部分)及引物设计示意图(Accession No. EU072441.1)见图 A.1。

```
301 tgggtaaagc gcccaattca agctggccca caaaccttcg agtggacgtt caccgccaac
361 cacgtcaciaa aggattggaa atactacatt accaaaccaa actggaaccc aaaccagcca
421 ttgtcgcgtg atgcatttga cctcaatccg ttctgtgtcg ttgaaggaaa tatggtgcag
481 ccacaaaac gtgtcagcca cgaatgtatc gtgcctgagc gcgaaggta tcaggtcac
```

图 A.1 霍乱弧菌 *gfpA* 基因序列(部分)及引物设计示意图

注:阴影部分分别为 *gfpA* 上下游引物序列,方框部分为探针序列。

A.2 霍乱弧菌 *tcpA* 基因序列(部分)及引物设计示意图(Accession No. KP187623.1)见图 A.2。

```
421 acccaagcac aatgtaagac ttggttaca agcgtagggg atatgtttcc atttatcaac
481 gtgaaagaag gtgctttcgc tgctgtcgt gatcttggg atttcgaaac gagtgtcga
541 gatgctgcta ctggcgtgg cgtaattaag tcattgcac caggaagtgc caacttaaac
601 ctaactaata tcacgatgt tgagaagctt tgtacaggaa ctgctccatt cacagtagct
```

图 A.2 霍乱弧菌 *tcpA* 基因序列(部分)及引物设计示意图

注:阴影部分分别为 *tcpA* 上下游引物序列,方框部分为探针序列。

行业标准信息服务平台
正式出版文本为准

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准

出口食品中致病菌检测方法

微滴式数字 PCR 法

第 2 部分：霍乱弧菌

SN/T 5364.2—2021

*

中国海关出版社有限公司出版发行
北京市朝阳区东四环南路甲 1 号(100023)

编辑部：(010)65194242-7509

网址 www.customskb.com/book

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 22 千字

2022 年 6 月第一版 2022 年 6 月第一次印刷

印数 1—500

*

书号：155175·732 定价 12.00 元



SN/T 5364.2-2021