

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4603—2016

出口食品及水体中产毒副溶血性弧菌 常见致病基因检测方法 多重 PCR 及 多重实时荧光 PCR 法

Detection of toxigenic gene of *Vibrio parahaemolyticus* in
food and water for export—Mutiplex PCR method and
mutiplex real-time PCR method

2016-08-23 发布

2017-03-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

将《美国 FDA 细菌学分析手册》第九章 弧菌 2004(Chapter 9:Vibrio 2004 of FDA Bacteriological Analytical Manual)以及 SN/T 2424—2010《进出口食品中副溶血性弧菌快速及鉴定检测方法 实时荧光 PCR 方法》引物序列组合在一起,构成多重 PCR 的体系。

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:中华人民共和国云南出入境检验检疫局、中华人民共和国上海出入境检验检疫局、上海交通大学、上海市临床检验中心、昆明市西山区疾病预防控制中心。

本标准主要起草人:陈丽萍、刘忠民、张继伦、陈芸、张建华、史贤明、王大鹏、王庆忠、王珏。

出口食品及水体中产毒副溶血性弧菌 常见致病基因检测方法 多重 PCR 及 多重实时荧光 PCR 法

1 范围

本标准规定了产毒副溶血性弧菌多重 PCR 及多重实时荧光 PCR 检测方法。

本标准适用于海产品、海产调味品、水体中产毒副溶血性弧菌常见致病基因的检测。

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 4789.7 食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验

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 食品分子生物学检测

《美国 FDA 细菌学分析手册》第九章 弧菌 2004 (Chapter 9: Vibrio 2004 of FDA Bacteriological Analytical Manual)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

多重 PCR **mutiplex PCR**

在同一个反应体系中加入一对以上的引物,同时检测几个目标基因的 PCR 方法。

3.2

多重实时荧光 PCR **mutiplex real-time PCR**

在同一个反应体系中加入一对以上的引物,同时检测几个目标基因的实时荧光 PCR 方法。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

tdh:耐热溶血毒素对应的基因(thermostable direct hemolysin)

tlh:不耐热溶血毒素对应的基因(thermolabile hemolysin)

trh:耐热直接溶血毒素相关溶血毒素对应的基因(thermostable related hemolysin)

第一法 多重 PCR 检测方法

5 方法提要

在同一个 PCR 反应管中,同时检测副溶血性弧菌 *gyrase*、*tdh* 和 *trh* 致病基因,根据扩增条带(*gyrase* 91 bp;*tdh* 269 bp;*trh* 485 bp)的有无,判定样品中是否含有副溶血性弧菌及产毒副溶血性弧菌。

6 试剂和耗材

除另有规定外,试剂为分析纯或化学试剂。实验室用水应符合 GB/T 6682 规定的要求。所有试剂均用无 DNA 酶污染的容器分装。

6.1 PCR 反应预混液,可选用商业试剂盒。

6.2 细菌基因组 DNA 提纯试剂盒。

6.3 琼脂糖:电泳纯。

6.4 溴化乙锭(EB):10 g/L。

6.5 0.5×TBE 缓冲液:Tris 5.4 g,硼酸 27.5 g,0.5 mol/L EDTA(pH 值=8.0)2 mL,加蒸馏水至1 000 mL。

6.6 无 DNA 酶污染的灭菌石蜡油:4 ℃保存。

6.7 引物:引物序列及相关信息见表 1。

表 1 引物序列和产物长度

| 靶基因 | 引物序列 | 产物大小 |
|---------------|---------------------------------|--------|
| <i>gyrase</i> | 5'-CGGTAGTAAACCCACTGTCAG-3' | 91 bp |
| | 5'-GTTTCAGGCTCACCATGACG-3' | |
| <i>tdh</i> | 5'-GTAAAGGTCTCTGACTTTTGGAC-3' | 269 bp |
| | 5'-TGGAATAGAACCCTTCATCTTACC-3' | |
| <i>trh</i> | 5'-TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT-3' | 485 bp |
| | 5'-CATAACAAACATATGCCCATTTCCG-3' | |

7 仪器和设备

7.1 PCR 仪。

7.2 恒温培养箱。

7.3 离心机:离心转速 $\geq 12\ 000$ r/min。

7.4 天平:感量 0.01 g。

7.5 高压灭菌器。

7.6 恒温水浴锅。

7.7 pH 计。

7.8 电泳分析系统。

8 操作步骤

8.1 样品的收集、制备和增菌

样品的制备、增菌培养和分离步骤按照 GB 4789.7 方法执行。

8.2 模板 DNA 提取

在 1.5 mL 无菌离心管中加入 8.1 中培养的增菌液 1 mL, 8 000 r/min, 5 min, 弃上清, 加入 1 mL 无菌 ddH₂O, 混匀清洗 1 次, 8 000 r/min, 5 min, 弃上清。采用细菌 DNA 提纯试剂盒抽提 DNA, 100 μL 无菌 ddH₂O 溶解 DNA, 4 °C 备用, 非即时检验, 放置 -20 °C 保存。

用加样器吸头蘸取 8.1 中培养的副溶血性弧菌的可疑菌落, 涂抹在 0.2 mL PCR 反应管壁上, 加入 70 μL 无菌 ddH₂O, 混匀, 采用 PCR 仪或其他电加热 99 °C, 10 min, 4 °C, 5 min, 12 000 r/min, 5 min, 取上清液备用。

对于非菌株的样品至少提取两支模板 DNA: 1. 同一样品的不同增菌液; 2. 同一样品相同增菌液; 同一样品的增菌液和可疑菌落(见附录 A)。

当模板 DNA 浓度在 10 mg/L~100 mg/L 之间; 纯度 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值在 1.7~1.9 之间, OD₂₃₀/OD₂₆₀ 的比值在 0.4~0.5 之间, 适宜于本标准 PCR 的扩增。

8.3 多重 PCR 检验

8.3.1 空白对照、阴性对照和阳性对照的设置

- 空白对照: 以 ddH₂O 代替 DNA 模板;
- 阴性对照: 非目标菌 DNA 作为 PCR 反应的模板;
- 阳性对照: 含有 *trh* 和/或 *tdh* 基因的副溶血性弧菌 DNA。

8.3.2 PCR 反应体系及反应条件详细信息见表 2。

表 2 PCR 反应体系及反应条件

| 起始浓度 | 试剂名称 | 体积 | 终浓度 |
|------------------------------------|-------------------|-----------|------------|
| | PCR 反应预混液 | | 1× |
| 10 mg/L~100 mg/L | 模板 DNA | 2 μL | |
| 10 μmol/L | <i>gyrase</i> 引物对 | 各 0.25 μL | 0.1 μmol/L |
| 10 μmol/L | <i>tdh</i> 引物对 | 各 0.5 μL | 0.2 μmol/L |
| 10 μmol/L | <i>trh</i> 引物对 | 各 0.75 μL | 0.3 μmol/L |
| ddH ₂ O 补齐至反应总体积为 25 μL | | | |

PCR 反应预混液为商业试剂盒, 按其说明书加入。

在盖上 PCR 管盖前, 对每个体系各滴加 1 滴 6.6 规定的石蜡油。反应条件: 95 °C 预变性 5 min, 扩增 40 个循环(94 °C 变性 30 s, 59 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s), 末次延伸 72 °C 10 min。

8.3.3 扩增产物的电泳检测

运用全自动毛细管电泳进行数据分析时, 按照用户指导书操作。

运用琼脂糖凝胶电泳分析时, 在 1.8%~2% 琼脂糖凝胶中, 加入溴化乙锭(终浓度为 0.5 mg/L)。取 8 μL~12 μL PCR 扩增产物进行分析, 并添加 DNA 分子量标记物做参照。9 V/cm~12 V/cm, 45 min~70 min, 凝胶成像分析系统观察和记录。

9 结果判定与表述

9.1 质控标准

阴性对照:无任何扩增条带。
空白对照:无任何扩增条带。
阳性对照:出现预期条带。

9.2 结果判定

见表 3。

表 3 多重 PCR 结果判定依据

| 编号 | 目标条带的种类组合 | | | 结果判定 | |
|----|---------------|------------|------------|--------|----------|
| | <i>gyrase</i> | <i>tdh</i> | <i>trh</i> | 副溶血性弧菌 | 产毒副溶血性弧菌 |
| 1 | — | — | — | 阴性 | 阴性 |
| 2 | + | — | — | 阳性 | 阴性 |
| 3 | + | + | + | 阳性 | 阳性 |

9.3 结果确证

副溶血性弧菌阳性结果,按 GB 4789.7 进行确证;致病因子阳性结果,按照第九章 弧菌 2004 (Chapter 9: *Vibrio* 2004 of FDA Bacteriological Analytical Manual)或 PCR 产物测序鉴定进行确证。

9.4 结果表述

被检样品扩增结果为表 3 编号 1 时,表述为“未检出产毒副溶血性弧菌”。
被检样品扩增结果为表 3 编号 2 时,表述为“检出副溶血性弧菌、未检出产毒副溶血性弧菌”。
被检样品扩增结果为表 3 编号 3 时,表述为“检出产毒副溶血性弧菌”

10 生物安全防护措施

检测过程中防止交叉污染的措施按照 GB/T 27403 的规定执行。实验室生物安全防护按照 GB 19489 的规定执行。

第二法 多重实时荧光 PCR 检测方法

11 方法提要

运用实时荧光 PCR 技术,在同一个 PCR 反应管中,同时检测副溶血性弧菌 *tlh* 和 *tdh* 基因,根据这两个基因各自荧光通道出现的扩增曲线和相应的 Ct 值,判定样品中是否含有副溶血性弧菌及产毒副溶血性弧菌。

12 试剂和耗材

除另有规定外,试剂为分析纯或化学试剂。实验室用水应符合 GB/T 6682 规定的要求。所有试剂

均用无 DNA 酶污染的容器分装。

12.1 实时荧光 PCR 反应预混液, 可选用 PCR 商业试剂盒。

12.2 细菌基因组 DNA 提纯试剂盒。

12.3 引物和探针: 引物和探针序列及相关信息见表 4。

表 4 引物和探针序列

| 靶基因 | 引物序列 | 探针序列 |
|------------|----------------------------------|--|
| <i>tlh</i> | 5'-CATTAGATTTGGCGAACGAGAAC-3' | 5'-FAM-AGACATTACGTTCT TCGCCGCTGACAATC-BHQ1-3' |
| | 5'-CCAGATCGTGTGGTTGTATGAGA-3' | |
| <i>tdh</i> | 5'-TTTATTTATATCCATGTTGGCTGCAT-3' | 5'-JOE-TGAGCTTCCATCTG TCCCTTTCTGC-BHQ1-3' |
| | 5'-GTATCTCGAACAAACAATATCTCATC-3' | |

13 仪器和设备

13.1 荧光定量 PCR 仪。

13.2 其他仪器设备与 7.2~7.7 相同。

14 操作步骤

14.1 样品的收集、制备和增菌

同 8.1。

14.2 模板 DNA 提取

同 8.2。

14.3 多重实时荧光 PCR 检验

14.3.1 空白对照、阴性对照和阳性对照的设置

同 8.3.1。

14.3.2 PCR 反应体系及反应条件

详细信息见表 5。

表 5 PCR 反应体系及反应条件

| 起始浓度 | 试剂名称 | 体积 | 终浓度 |
|------------------------------------|-------------------|----------|------------|
| | 实时荧光 PCR 反应预混液 | | 1× |
| 10 mg/L~100 mg/L | 模板 DNA | 2 μL | |
| 10 μmol/L | <i>tlh</i> 各引物、探针 | 各 0.5 μL | 0.1 μmol/L |
| 10 μmol/L | <i>tdh</i> 各引物、探针 | 各 0.5 μL | 0.2 μmol/L |
| ddH ₂ O 补齐至反应总体积为 20 μL | | | |
| 注: PCR 反应预混液商业试剂, 参照其说明书加入。 | | | |

扩增条件:95℃预变性 5 min;扩增 40 个循环(95℃变性 10 s;60℃退火 50 s)。荧光收集设置在 60℃退火 50 s 时进行。

荧光采集为双通道:FAM/490 nm(检测 *tlh* 基因),JOE/533 nm(检测 *tdh* 基因)。

15 结果与表述

15.1 质控标准

空白对照:无荧光对数增长,相应的 Ct 值 ≥ 40 ;

阴性对照:无荧光对数增长,相应的 Ct 值 ≥ 40 ;

阳性对照:有荧光对数增长,且荧光通道出现典型的扩增曲线,相应的 Ct 值(*tdh*)应 ≤ 35.0 ,Ct 值(*tlh*)应 ≤ 35.0 。

15.2 结果判定

详细信息见表 6。

表 6 多重荧光 PCR 结果判定依据表

| 编号 | Ct 值大小和扩增曲线种类组合 | | 结果判定 | |
|----|-------------------------------|-------------------------------|--------|----------|
| | Ct 值(<i>tlh</i>) | Ct 值(<i>tdh</i>) | 副溶血性弧菌 | 产毒副溶血性弧菌 |
| 1 | ≥ 40 ,无荧光对数增长 | ≥ 40 ,无荧光对数增长 | 阴性 | 阴性 |
| 2 | ≤ 35.0 ,有荧光对数增长,出现典型扩增曲线 | ≥ 40 ,无荧光对数增长 | 阳性 | 阴性 |
| 3 | ≤ 35.0 ,有荧光对数增长,出现典型扩增曲线 | ≤ 35.0 ,有荧光对数增长,出现典型扩增曲线 | 阳性 | 阳性 |

注:当 $35.0 < \text{Ct 值} < 40$,建议样本重做。重做结果 Ct 值 ≥ 40 者为阴性,否则为阳性。

15.3 结果确证

副溶血性弧菌阳性结果,按 GB 4789.7 进行确证;致病因子阳性结果,按照《美国 FDA 细菌学分析手册》第九章 弧菌 2004(Chapter 9:Vibrio 2004 of FDA Bacteriological Analytical Manual)或本标准的第一法或 PCR 产物测序鉴定进行确证。

15.4 结果表述

被检样品扩增结果为表 6 编号 1 时,表述为“未检出副溶血性弧菌”。

被检样品扩增结果为表 6 编号 2 时,表述为“检出副溶血性弧菌、未检出产毒副溶血性弧菌”。

被检样品扩增结果为表 6 编号 3 时,表述为“检出副溶血性弧菌”。

16 生物安全防护措施

同第 10 章。

附录 A
(规范性附录)

多重 PCR 及多重实时荧光 PCR 检测方法程序

多重 PCR 及多重实时荧光 PCR 检测方法程序见图 A.1。

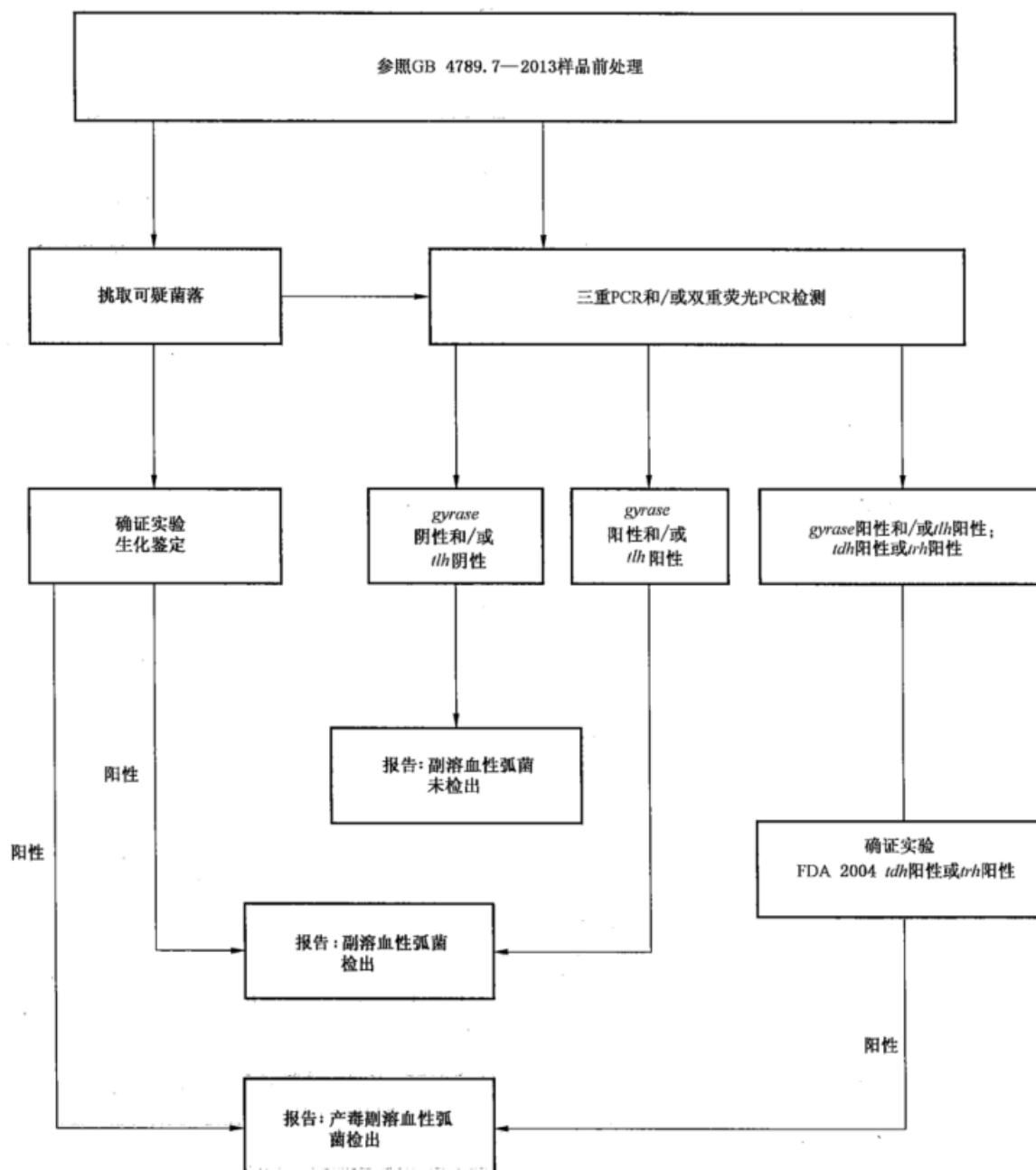


图 A.1 程序图