

DB22

吉 林 省 地 方 标 准

DB 22/T 2912—2018

贝类中霍乱弧菌检测 微滴数字 PCR 法

Determination of *Vibrio cholerae* in shellfish-droplet digital PCR method

地方标准信息服务平台

2018 - 11 - 12 发布

2018 - 12 - 30 实施

吉林省市场监督管理厅

发 布

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009和GB/T 20001.4-2015给出的规则起草。

本标准由长春海关（原吉林出入境检验检疫局提出并归口）。

本标准起草单位：长春海关（原吉林出入境检验检疫局检验检疫技术中心）、延边海关综合服务技术中心（原延边出入境检验检疫局技术中心）。

本标准主要起草人：罗雁非、孙佳、杜佳剑、聂丹丹、丁旭、王准、曲辉、彭勃。

地方标准信息服务平台

贝类中霍乱弧菌检测 微滴数字 PCR 法

警示——使用本标准的人员应有正规实验室工作的实践经验。本标准并未指出所有可能的安全问题。使用者有责任采取适当的安全和健康措施，并保证符合国家有关法规规定的条件。

1 范围

本标准规定了贝类中霍乱弧菌检测微滴数字PCR法的试剂和材料、仪器和设备、样品、试验步骤和试验数据处理与防止污染措施。

本标准适用于贝类中霍乱弧菌检测。

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，仅所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 4789.1-2016 食品安全国家标准 食品卫生微生物检验 总则

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 19495.3 转基因产品检测 核酸提取纯化方法

SN/T 1022 进出口食品中霍乱弧菌检验方法

SN/T 2425-2010 进出口食品中霍乱弧菌快速及鉴定监测方法 实时荧光PCR方法

WS/T 230-2002 临床诊断中聚合酶链反应（PCR）技术的应用

3 原理

微滴式数字PCR平台通过产生微小油包水体系实现反应体系的分割，根据霍乱弧菌的溶血性特异性基因序列对贝类中霍乱弧菌进行鉴定。经PCR扩增后，根据泊松分布原理及阳性微滴的个数与比例即可得出靶分子的起始拷贝数或浓度，实现对霍乱弧菌的快速定性检测。

4 试剂和材料

除另有规定外，所有试剂均为分析纯。实验用水符合 GB/T 6682 中二级水的要求。

4.1 裂解液,成分包括：2% CTAB(cetyltriethylammonium bromide, 十六烷基三甲基溴化铵)，100 mmol/L Tris(tris hydroxymethyl aminomethane, 三羟甲基氨基甲烷)，1.4 mol/L NaCl，20 mmol/L EDTA(ethylene diaminetetraacetic acid, 乙二胺四乙酸)，用 HCl 调至 pH8.0。

4.2 酚/氯仿/异戊醇（25:24:1，v/v/v）。

4.3 氯仿。

4.4 异戊醇。

4.5 无水乙醇。

- 4.6 异丙醇。
- 4.7 70%乙醇。
- 4.8 2×dd PCR 预混液。
- 4.9 霍乱弧菌旋转酶 (gyrase) 基因引物和探针
- 4.10 上游引物: 5' - GCCAAAATTGTGCGTATCAG -3'
下游引物: 5' - ATAATCTTGGGCAATCGCA -3'
探针: 5' - (FAM) - AACTGGCTTCCAACTGACGATAACC - (TAMRA) -3'
- 4.11 菌株: 霍乱弧菌阳性标准菌株。

5 仪器和设备

- 5.1 微量移液器: 0.1 μL~2.5 μL, 1 μL~10 μL, 2 μL~20 μL, 10 μL~100 μL, 20 μL~200 μL, 100 μL~1 000 μL。
- 5.2 高速冷冻离心机(12 000 r/min)。
- 5.3 涡旋混合器。
- 5.4 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。
- 5.5 微滴生成仪。
- 5.6 PCR 仪。
- 5.7 微滴读数系统。

6 样品

- 6.1 样品的采集按照 GB 4789.1-2016 中 3.1 的规定实施。
- 6.2 样品前处理按照 SN/T 1022 的规定执行。

7 试验步骤

7.1 增菌培养

按照SN/T 1022的规定执行。

7.2 样品 DNA 提取

- 7.2.1 用移液器(5.1)吸取霍乱弧菌增菌液 1 mL, 加到 1.5 mL 无菌离心管中, 12 000 r/min 离心(5.2) 10 min, 吸弃上清; 加入 50 μL DNA 裂解液(4.1), 混匀(5.3)后沸水浴 5 min, 12 000 r/min 离心 5 min。取上清保存于 -20℃ 备用。
- 7.2.2 按照 GB/T 19495.3 的规定进行 CTAB 提取法制备模板 DNA (4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7), 或使用商业化的 DNA 提取试剂盒时按照其说明书操作。

7.3 DNA 浓度和纯度的测定

按照 GB/T 19495.3 的规定, 用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计(5.4) 260 nm和280 nm的测定核酸含量, 用双蒸水稀释至1 ng/μL~100 ng/μL备用。

7.4 微滴数字 PCR 反应体系

反应体系见表1。

表1 微滴数字 PCR 反应体系

试剂成分	体积 μL
2×dd PCR 预混液(4.8)	10
上游引物 (10 μmol/L) (4.9)	1
下游引物 (10 μmol/L) (4.9)	1
探针(10 μmol/L) (4.9)	1
模板DNA (1 ng/μL ~100 ng/μL)	5
双蒸水	2
注1：空白对照实验时，用双蒸水替代样品DNA。 注2：阴性对照实验时，用非目标源性成分替代样品DNA。 注3：阳性对照实验时(4.10)，用霍乱弧菌阳性成分DNA。	

7.5 微滴生成

利用微滴生成仪完成 20 μL 反应体系的分割（5.5）。

7.6 PCR 反应

反应条件：95 ℃ 5 min，1个循环；95 ℃ 15 s，60 ℃ 1 min，40个循环；98 ℃/10 min（1 ℃ /s），12 ℃保存反应产物。体系完成后，进行数字PCR反应。

7.7 微滴读数

PCR反应完成后，选择FAM单荧光通道利用微滴读数系统（5.7）进行微滴读数。数字PCR反应的有效分割体系系数不得低于理论分割体系系数的 50%。

8 试验数据处理

8.1 阈值限的设定

- 8.1.1 阈值限应对空白和阳性扩增结果进行区分。
- 8.1.2 按照数字 PCR 体系中阴性分割体系的终点荧光值设定。

8.2 质控标准

- 8.2.1 阳性对照为霍乱弧菌阳性基因有明显扩增，扩增终点荧光信号大于或等于阈值。
- 8.2.2 阴性对照为霍乱弧菌基因无扩增，扩增终点荧光信号小于阈值。
- 8.2.3 空白对照为霍乱弧菌基因无扩增，扩增终点荧光信号小于阈值。
- 8.2.4 与以上实验结果不符，需要重复验证实验步骤。

8.3 结果判定与报告

- 8.3.1 样品扩增终点荧光信号小于阈值，判为阴性，报告未检出霍乱弧菌。
- 8.3.2 样品扩增终点荧光信号大于或等于阈值，判为阳性，报告检出霍乱弧菌。

9 防止污染措施

按照 GB 19489 和 WS/T 230-2002 中 6 的规定执行。

地方标准信息服务平台