



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4090—2015

## 食源性病原微生物实时 PCR 检测 通用要求

Real-time polymerase chain reaction(PCR) for the detection of food-borne  
pathogens—General requirements

(ISO 22119:2011, Microbiology of food and animal feeding stuffs—  
Real-time polymerase chain reaction(PCR) for the detection of food-borne  
pathogens—General requirements and definitions, MOD)

2015-02-09 发布

2015-09-01 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。

本标准修改采用 ISO 22119:2011《食品和动物饲料微生物学 实时 PCR 法检测食品致病菌的通用要求和定义》制定,与 ISO 22119 相比,本标准做了如下修改:

- 对前言进行了修改,删去了引言部分;
- 对规范性引用文件的描述按照 GB/T 1.1 的要求进行了修改;
- 将标准中引用的国际标准用相应的国家标准或行业标准代替,如用 SN/T 2102.1 代替 ISO 22174;
- 将标准中的 3.9、3.10 和 3.11 中的注释部分作为资料性附录分别放在了附录 A、附录 B 和附录 C 中。

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:中华人民共和国河南出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:苗丽、李轲、杨娜、钱成、郑皓、张巨洲、张子宏、王艳、王珊。

# 食源性病原微生物实时 PCR 检测 通用要求

## 1 范围

本标准规定了用聚合酶链式反应(PCR)方法从食品中检测或分离食源性病原微生物的通用要求,也阐述了通过实时 PCR 扩增和检测核酸序列(DNA 及 RNA 反转录后得到的 cDNA)的要求。

本标准中的最低要求是同一实验室的样品具有可重复性,不同实验室间的试验结果具有可比较性。

本标准适用于环境样品和动物饲料中食源性病原微生物的检测。

注:由于该领域发展迅速,本标准中所举例子是标准起草阶段使用最频繁的案例。

## 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。

SN/T 2102.1 食源性病原体 PCR 检测技术规范 第 1 部分:通用要求和定义

SN/T 2102.3 食源性病原体 PCR 检测技术规范 第 3 部分:定性检测方法样品制备的要求

SN/T 2102.4 食源性病原体 PCR 检测技术规范 第 4 部分:定性检测方法扩增和检测要求

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**实时聚合酶链式反应,即实时 PCR Real-time PCR**

在酶的参与下,特定的 DNA 序列通过变性、与特定引物的退火和延伸等一系列步骤完成体外扩增并实时监测 PCR 产物的过程。

注 1:通常,扩增反应混合物中包含有一个或多个特异性的 DNA 探针。同时,这些探针结合有一种或多种荧光染料。运用这种技术,探针与靶核酸序列特异性杂交后,激发出具有一定波长的光,从而产生荧光信号。

注 2:对于用 SN/T 2102.4 方法已经确认阳性结果的样品,可用非特异性 DNA 荧光染料进行检测。

### 3.2

**PCR 产物 PCR product**

PCR 扩增出的 DNA。

### 3.3

**荧光共振能量转移(FRET) fluorescence resonance energy transfer**

运用 PCR 检测食源性病原微生物时,在一定波长电磁辐射的激发下,能量从供体分子向受体分子转移,从而使受体分子的荧光强度提高。FRET 程度与供、受体分子的空间距离紧密相关。

### 3.4

**报告基团 reporter**

运用 PCR 检测食源性病原微生物时,在适当波长的电磁辐射的激发下,用于测定杂交过程中特异性探针的荧光分子。

3.5

**淬灭基团 quencher**

运用 PCR 检测食源性病原微生物时,充当能量受体,从而淬灭报道基团信号的荧光分子。

3.6

**非荧光淬灭基团 dark quencher**

发出的能量不在光谱范围内,不能通过 PCR 仪的光谱检测系统检测到的受体分子。

3.7

**5'-3'-核酸外切酶活性 5'-3'-exonuclease activity**

有一类酶,如核酸聚合酶,具有将杂交的核酸分子沿 5'-3'方向切开的功能。

注: 5'-3'-核酸外切酶的活性仅针对双链 DNA 结构,它取决于酶的种类,可以出现在 Taq 聚合酶、Tth 聚合酶和 Tfi 聚合酶中。

3.8

**荧光探针 fluorescent probe**

已知序列的寡核苷酸或类寡核苷酸与一个或多个荧光分子结合。

注: 任何能够与靶核酸序列进行特异性杂交,并通过特殊的仪器检测到荧光信号的体系都可以作为荧光探针。

3.9

**水解探针 hydrolysis probe**

结合两个荧光分子的荧光探针在扩增过程中会被具有 5'-3'外切酶活性的酶水解成单体。

注: 水解探针的原理示意图参见附录 A。

3.10

**杂交探针 hybridization probe**

系统中的两个荧光探针分别结合一个荧光分子,其中一个分子作为供体,另一个作为受体。

注: 杂交探针的原理示意图参见附录 B。

3.11

**分子信标 molecular beacon**

荧光探针由三个部分组成:中心部分序列与靶基因序列互补,两端的 5'端和 3'端序列互补、报告荧光基团和淬灭荧光基团分别结合在两端。

3.12

**检测特定病原体 DNA 序列的探针 probe for detection of a specific pathogen DNA sequence**

探针序列与病原体 DNA 序列互补,携带一个报告荧光基团,能发出一定波长的信号,该信号能够被光学检测系统检测到。

3.13

**用于检测内部控制核酸序列的探针 probe for detection of an internal control nucleic acid sequence**

探针携带有一个能够确认扩增情况的报告基团。

注 1: 该探针发出的荧光信号明显不同于检测特定病原体的探针荧光信号。

注 2: 该应用要求所使用的仪器能够检测不同波长的信号。

3.14

**参比荧光 passive reference**

反应混合物中的用于校正信号的荧光分子。

注: 这些分子可以与核酸序列或其他分子结合而不参与反应。

3.15

**荧光检测水平的基线 baseline fluorescence detection level**

反应达到高于背景值的荧光强度。



## 3.16

**背景荧光 background fluorescence**

使用试剂和耗材自身产生的荧光值。

## 3.17

**循环交叉点的临界值 threshold cycle crossing point**

扩增曲线上荧光信号高于基线的点或与预先设定的阈值的交界点。

## 4 原理

## 4.1 综述

实时 PCR 分析通常包括：

- a) 在荧光探针参与下通过 PCR 反应扩增特定的靶序列；
- b) 在每一个扩增循环中结合荧光探针；
- c) 每个循环都激发产生一个荧光信号；
- d) 用光学检测系统监测荧光信号；
- e) 数据分析。

注：如果用于初筛的目的，也可选用结合在双链 DNA 上的染料发出的荧光信号。

## 4.2 实时 PCR 探针

## 4.2.1 水解探针

水解探针是一段特异的寡核苷酸序列，在 PCR 试验中与 PCR 引物一起参与反应。一端连接一个能发射光谱的荧光报告基团，另一端连接一个淬灭基团。报告基团发射的光谱能被淬灭基团淬灭。探针与靶核酸序列杂交。在延伸阶段，利用 DNA 聚合酶的 5'-3' 端外切酶活性将水解探针切开。切开后，报告基团与淬灭基团分离，导致报告基团的荧光强度增加。致使荧光信号与特异的 PCR 产物的生成成正比。

在 PCR 过程中应避免探针 3' 端的延伸。水解探针作用原理示意图参见附录 A。

## 4.2.2 杂交探针

在 PCR 过程中，除了 PCR 引物外，两条特异的寡核苷酸序列作为杂交探针参与反应。每一个探针都包含一个荧光分子，其中一个作为供体，另一个作为受体，与靶核酸序列杂交。杂交后，染料相距很近，因此激发产生荧光共振能量转移，使受体分子产生可检测的信号。致使荧光信号与特异的 PCR 产物的生成成正比。

在 PCR 过程中应避免探针 3' 端的延伸。杂交探针作用原理示意图参见附录 B。

## 4.2.3 分子信标

分子信标是一段特异的寡核苷酸序列，在 PCR 试验中与 PCR 引物一起参与反应。在杂交温度下，分子信标与互补的靶序列结合，分子信标的构象发生变化，其茎环结构改变，与靶序列形成了一个比原构象更长更稳定的探针-靶序列杂交复合物。报告基团和淬灭基团分离，产生一个报告信号。致使荧光信号与特异的 PCR 产物的生成成正比。分子信标作用原理示意图参见附录 C。

## 5 实验室通用要求

实验室通用要求应与 SN/T 2102.1 一致。

## SN/T 4090—2015

## 6 试剂和材料

## 6.1 综述

在试验过程中,除非另做说明,实验只用分析纯级别的试剂,无菌蒸馏水或去离子水,或者其他不含核酸及核酸酶,适用于分子生物学分析的水。

避免所用的试剂及耗材对检测系统产生荧光干扰,如营养肉汤中的成分。

有关试剂的特殊要求详见 6.2~6.6。

## 6.2 DNA 聚合酶和反应缓冲液

## 6.2.1 DNA 聚合酶

PCR 用到的热稳定酶(可能有反转录酶活性),应在制造商指导下使用。

注:它可以是经纯化的天然的酶,也可以是经基因方法重组获得并经过纯化的酶。如果用水解探针,DNA 聚合酶应具有 5'-3'端外切酶活性。在 RNA 分析中,应加入反转录酶和 DNA 聚合酶的混合物,或者具有反转录酶活性的 DNA 聚合酶。每一种 DNA 聚合酶需要的实验条件会有所不同。

## 6.2.2 反应缓冲液

反应缓冲液应符合 SN/T 2102.4 的要求。

## 6.3 脱氧核苷三磷酸腺苷(dNTPs)

dNTPs 应符合 SN/T 2102.4 的要求。

## 6.4 引物

引物应符合 SN/T 2102.4 的要求。

## 6.5 用于实时检测的荧光探针

有一定特性的寡核苷酸,目的在于检测特异的 PCR 产物的一段序列。探针序列应与靶 DNA 序列高度互补。

## 6.6 内部扩增质量控制

备检样品的扩增效率可以采用同一反应体系中加入对照 DNA 片段来标定。对照 DNA 片段既可以采用与要扩增的目的 DNA 所用相同的引物对(同源扩增内参),也可以用另外的引物对(异源内参)。测试系统和质控系统的扩增效率应基本一致。为了减少对检测的抑制作用,同时又能得到可重复的阳性结果,加入的 DNA 片段的浓度应尽可能的低。而且,要保证内部扩增质控不影响正常样品的检测水平。

掌握下面几点可以减少内部扩增质控对检测水平的负作用:

——同源内部扩增质控的扩增效率略低于靶 DNA;

——减少异源内部扩增质控的引物浓度。

内部扩增质控体系应在试验早期阶段加入样品中,这样可以同时作为提取过程的质控。

## 6.7 防止使用过期试剂

对试剂的使用要求与 SN/T 2102.4 一致。防止使用过期的试剂。

## 7 设备

### 7.1 综述

设备应符合 SN/T 2102.1 的要求。

实验室应使用适用于本试验方法的设备。

### 7.2 专用的仪器和设备

#### 7.2.1 PCR 热循环仪

PCR 热循环仪应满足以下要求：

——具有适用于荧光分子激发的能量来源；

——具有用于监测 PCR 产生的荧光信号的光学检测系统。

内部质控时，还要求仪器具有检测不同波长荧光信号的能力。

#### 7.2.2 反应管、盖子或塞子

能够反复加热至 100 °C，冷却至 4 °C 而不会损坏，且在扩增过程中不影响荧光信号的产生。

## 8 待测样品

从任何应用领域的基质中提取的包括核酸在内的提取物都可以作为检测样品，并且这些样品应没有明显的 PCR 抑制和荧光干扰。

## 9 步骤

### 9.1 样品制备

检测样品的核酸提取物和(或)纯化物的制备方法参照适当的方法进行，如 SN/T 2102.3。

提取的核酸溶液应该含有足量的且质量好的目标核酸，这样才能确保在定性分析中含量为 1-10 个病原菌或者相当量的病毒可以检测出来。对于目标核酸含量低的样品做定性分析时，通常需要对病原进行富集或浓缩。

核酸溶液应不包含明显的 PCR 抑制成分和荧光干扰。

注：荧光通常来自于有色反应器和一些浓缩培养液的成分。

定量分析要求样品制备过程应确保靶微生物或病毒的核酸数量以便核酸溶液有较高的可重复性。

### 9.2 扩增

#### 9.2.1 综述

特异性核酸的扩增是在反应管中由 DNA 聚合酶催化完成的，在反应管中同时需要加入寡核苷酸引物、dNTPs、荧光探针和一定量的反应缓冲液。

配制 PCR 反应混合物时，应避免使用有色的枪头和反应管，并注意防止反应管外的粉尘污染。

在扩增过程中能够检测到荧光探针信号。

如果 RNA 序列先被反转录为互补的 DNA 序列，实时 PCR 也可用于检测 RNA。



SN/T 4090—2015

9.2.2 循环参数

9.2.2.1 水解探针

一般地,扩增过程采用两步法进行,包括变性、低温退火结合引物和探针以及延伸。在退火和延伸阶段能够监测到荧光信号。

9.2.2.2 杂交探针

扩增过程采用三步法进行,包括变性、退火和延伸。在退火阶段能够监测到荧光信号。

9.2.2.3 分子信标

一般地,扩增过程采用三步法进行,包括变性、引物和分子信标低温退火和延伸。在退火阶段能够监测到荧光信号。

9.3 质控

质控参照 SN/T 2102.1 进行。

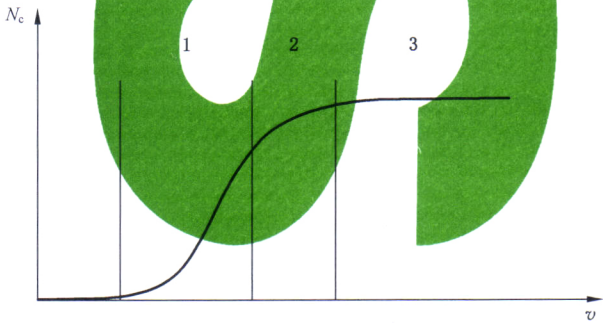
实时 PCR 能够同时检测和区分来自特异病原体和内标扩增对照的信号。因此,建议试验时同时做扩增内标对照。

9.4 荧光数据的分析

9.4.1 扩增曲线图

9.4.1.1 综述

在扩增过程中,可检测到的 PCR 产物的数量是不断增加的。荧光信号的增加与 PCR 产物的增加是相关的。可以用扩增曲线来表示,见图 1。



- 说明:
- $N_c$  —— 扩增分子数;
  - $v$  —— 扩增循环数;
  - 1 —— 对数生长期;
  - 2 —— 指数生长期;
  - 3 —— 平台期。

图 1 一个包括 PCR 进程 3 个特征阶段的典型扩增曲线



#### 9.4.1.2 第一阶段:对数期

对数期是一个高精度的循环过程,具有较高的恒定的扩增效率。在对数期,PCR 产物与初始模板的关系可以用式(1)表示:

$$N_c = N(1 + \eta)^v \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

$N_c$  ——分子扩增量;

$N$  ——靶分子的初始量;

$\eta$  ——系统扩增效率;

$v$  ——扩增循环数。

#### 9.4.1.3 第二阶段:线性阶段

线性阶段是通过拉平效应使扩增曲线的斜率稳步降低体现的。在此阶段,一个或多个成分降到临界浓度以下,扩增效率还是下降。这个阶段被称为线性阶段是因为扩增接近于一个等差数列而不是几何增加。

#### 9.4.1.4 第三阶段:平台期

在平台期,PCR 扩增停止,而信号仍保持不变。

### 9.4.2 荧光数据的评价

阳性样品至少在典型的扩增曲线的第一阶段开始产生扩增曲线。在一定的循环数后,样品的扩增曲线与设定的临界值相交。样品的荧光信号在临界值以上为阳性。

### 9.4.3 定量分析

#### 9.4.3.1 综述

定量分析能够确定在 PCR 扩增阶段荧光强度与产生的核酸靶序列相一致。这样能够检测样品靶核酸的初始含量。

靶核酸可以通过标准曲线定量,也可以应用其他经过确证的方法进行定量。

#### 9.4.3.2 利用标准曲线定量的方法

任何已知浓度的、稳定的、纯的靶 RNA 或 DNA,都可以通过连续稀释制作标准曲线,标准曲线的扩增效率和靶核酸的扩增效率应接近一致。通常将质粒 DNA 和在体外反转录的 RNA 作为标准品使用。

靶 DNA 浓度应处于标准曲线的范围内。

应该使用适当数量的校准点和重复数,这些校准点和重复数应覆盖定量范围。例如,重复 2 次,每次至少 4 个校准点(一共  $4 \times 2$  个值),或者一次测量 6 个校准点(一共 6 个值)。

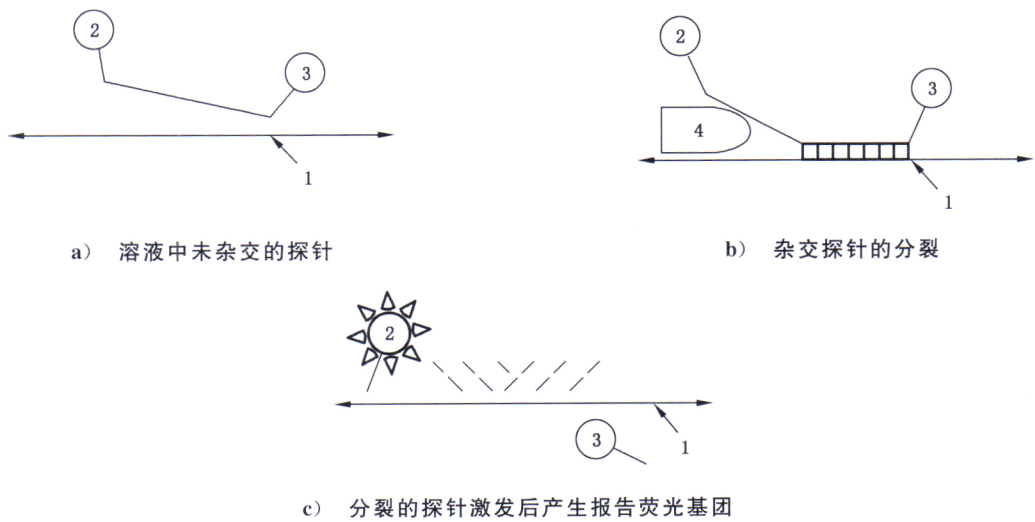
## 10 评价

根据质控结果进行评价,在 9.3 中已详细说明。

PCR 的结果判定参考 SN/T 2102.1 中表 2 的说明。

附 录 A  
(资料性附录)  
水解探针原理

水解探针的原理见图 A.1。



说明：

- 1——DNA 模板；
- 2——荧光分子(报告基团)；
- 3——淬灭分子；
- 4——酶。

图 A.1 水解探针的原理

附录 B  
(资料性附录)  
杂交探针原理

该原理见图 B.1。

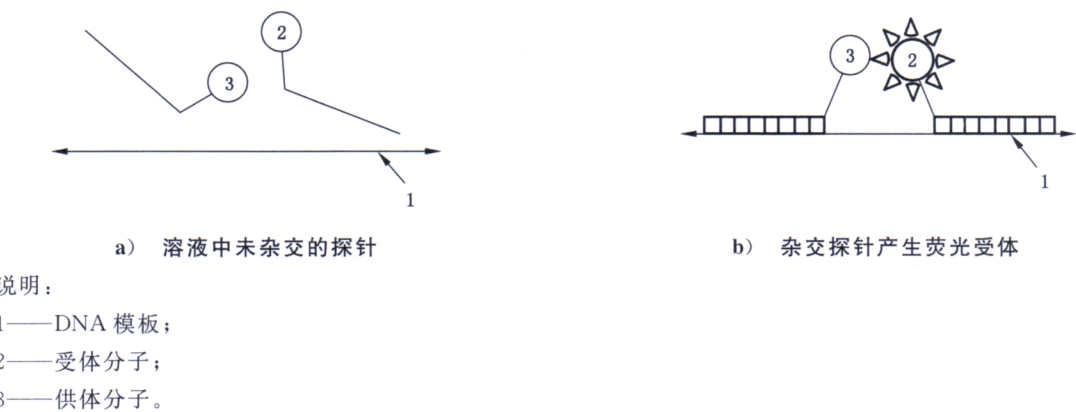


图 B.1 杂交探针的原理

附录 C  
(资料性附录)  
分子信标原理

该原理见图 C.1。

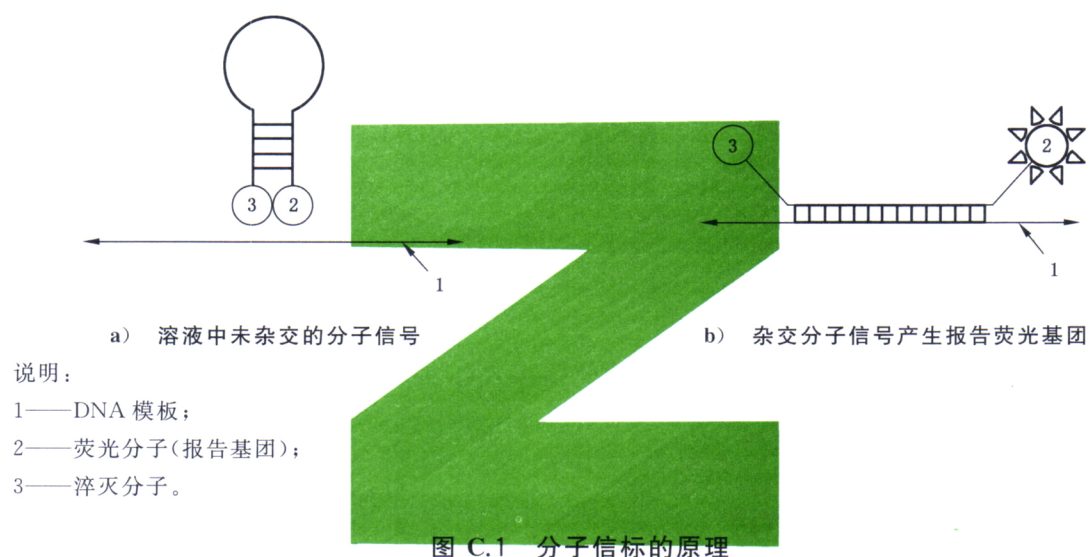


图 C.1 分子信标的原理



参 考 文 献

- [1] ISO 20837 Microbiology of food and animal feeding stuffs—Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens—Requirements for sample preparation for qualitative detection.
- [2] FÖRSTER, T. Intermolecular energy migration and fluorescence. *Ann. Phys.* 1948, 2, p. 55-75.
- [3] BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR: Trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* 2002, 29, p. 23-39.
- [4] APPLIED BIOSYSTEMS. ABI Prism 7900HT Sequence Detection System user's manual. Applied Biosystems, Foster City, CA, 2001.
-