

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4161—2015

国境口岸副溶血性弧菌实时荧光 PCR 方法

Detection method for vibrio parahaemolyticus by real-time fluorescence
PCR at frontier ports

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：中华人民共和国江西出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：胡婷、杨春华、刘岚、孙思扬、谢玉萍、徐菱菱、周延。

国境口岸副溶血性弧菌实时荧光 PCR 方法

1 范围

本标准规定了国境口岸副溶血性弧菌实时荧光 PCR 检验的对象、标本的采集、运输和保存,操作方法及结果报告。

本标准适用于国境口岸副溶血性弧菌感染的筛选检测。

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 4789.17—2003 食品卫生微生物学检验 肉与肉制品检验

GB/T 4789.20—2003 食品卫生微生物学检验 水产食品检验

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

WS/T 230 临床诊断中聚合酶链反应(PCR)技术的应用

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

副溶血性弧菌 *vibrio parahaemolyticus*

副溶血性弧菌,属弧菌科弧菌属,革兰染色阴性,兼性厌氧菌,为多形态杆菌或稍弯曲弧菌。临床上以急性起病、腹痛、呕吐、发烧、腹泻及水样便(重症者为黏液便或黏血便)为主要症状。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

PCR:聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction)

Taq DNA polymerase:Taq DNA 聚合酶

5 检测对象

5.1 疑似副溶血弧菌感染者的临床标本,如粪便。

5.2 疑似副溶血弧菌污染环境标本,如水样,以及食品。

6 实验室生物安全和 PCR 防污染要求

实验室生物安全应符合 GB 19489 的规定。PCR 防污染措施按 WS/T 230 和 SN/T 1193 的规定执行。

7 仪器与器材

- 7.1 实时荧光定量 PCR 仪及配套 PCR 反应管。
- 7.2 生物安全柜。
- 7.3 高速冷冻离心机:最大转速 13 000 r/min 以上。
- 7.4 台式离心机(离心速度 900g)。
- 7.5 涡旋振荡器。
- 7.6 恒温水浴锅。
- 7.7 高压灭菌锅。
- 7.8 低温冰箱、冷藏、冷冻冰箱。
- 7.9 可调式微量加样器。

8 试剂

- 8.1 生理盐水:蒸馏水和 NaCl 配制浓度为 0.9% 的生理盐水。
- 8.2 阳性对照品:人工制备含副溶血弧菌检测序列的质粒。
- 8.3 阴性对照品:灭菌双蒸水 ddH₂O。
- 8.4 DNA 提取液:含 0.9% NaCl 和 0.1% EDTA-Na₂ 的混合液。

9 检测程序

9.1 样品的采集

9.1.1 粪便样本

采集病人发病早期新鲜粪便于一次性无菌采便管内,成形便采集 5 g~8 g,水样便采集 1 mL~3 mL。亦可用湿润的直肠棉拭插入直肠内 3 cm~5 cm 处并轻轻旋转,有可见粪便的棉拭放入采便管内。采便管外表贴上带有唯一标识号码的标签,直接用于检测,或保存,或送检。

9.1.2 水样标本

水样用无菌容器采集 3 mL~5 mL,密闭后外表贴上带有唯一识别标识号码的标签,直接用于检测,或保存,或送检。

9.1.3 食品标本

9.1.3.1 肉与肉制品的取样方法按 GB/T 4789.17—2003 中的规定。

9.1.3.2 各种水产食品及其制品的取样方法按 GB/T 4789.20—2003 中 5.1 的规定。

9.2 样本的运转与保存

样本运输采用冰壶加冰密封运输。对于不立即检测的样本,应保存于 -20℃ 待检。

9.3 样本的前处理

9.3.1 粪便样本

挑取米粒大小粪便,放置于有 0.5 mL 生理盐水的离心管中,振荡混匀,16 200 g 离心 2 min。去尽上清,沉淀用于核酸提取。

9.3.2 水样样本

取标本 3 mL,16 200 g 离心 2 min。去尽上清,沉淀用于核酸提取。

9.3.3 食品样本

以无菌方法取肉类或水产品组织样品 0.1 g,用 0.2 mL 无菌生理盐水离心管中研磨,然后 100 ℃沸水中加热 5 min;8 000 g 离心 3 min,上清用于以后的荧光 PCR 反应。

9.4 样本的 DNA 提取

在标本的前处理沉淀中,加入 100 μL DNA 提取液充分混匀,沸水浴 10 min。16 200 g 离心 5 min,上清可直接用于荧光 PCR 反应。也可以使用商品化的 DNA 提取试剂盒并按照说明书操作。

9.5 实时荧光 PCR 检测

9.5.1 待检测所需各种试剂充分融化后,请先将各试剂进行离心 30 s 然后开始实验。应用其他等效试剂盒进行实时荧光 PCR 检测时,应根据实际情况进行适当的体系优化后再进行检测。

9.5.2 实时荧光 PCR 引物、探针序列,见表 1。

表 1 副溶血性弧菌核酸实时荧光 PCR 引物、探针序列

| 基因 | 引物名称 | 核酸序列(5'-3') | 长度(bp) | 类别 |
|------|------|-------------------------------------|--------|--------|
| toxR | 上游引物 | CAAGGTTTTGAGGTGGAT | 18 | 种特异性基因 |
| | 下游引物 | AATCCTTCAACATCTTACG | 19 | |
| | 探针 | FAM-CAAGCCTGACTCAAGCGATT-BHQ1 | 20 | |
| gyrB | 上游引物 | TGAAGGTTTGACTGCCGTTGT | 21 | |
| | 下游引物 | TGGGTTTTTCGACCAAGAACTCA | 22 | |
| | 探针 | FAM-TTCTCACCCATCGCCGATTCAACCGC-BHQ1 | 26 | |
| trh | 上游引物 | TACAACAATCAAACTGAATC | 21 | 毒力基因 |
| | 下游引物 | CATCTTTGTWAGGTTTCTTTT | 22 | |
| | 探针 | FAM-CGGTTTGTCCAATAGTCCTCCAC-BHQ1 | 23 | |
| tdh | 上游引物 | GCTGAGAAGTTTGTGTTC | 18 | |
| | 下游引物 | CGAAGATAAGGTTTCAACTC | 20 | |
| | 探针 | FAM-CAACAACAGCAACTCACCGC-BHQ1 | 20 | |

SN/T 4161—2015

9.5.3 荧光 PCR 反应体系配置按表 2 中的顺序,依次加入。

表 2 副溶血性弧菌核酸实时荧光 PCR 检测反应体系

| 名 称 | 体 积 |
|--|---------|
| 2×PCR Buffer* | 12.5 μL |
| 上游引物(12.5 μmol/L) | 1.0 μL |
| 下游引物(12.5 μmol/L) | 1.0 μL |
| 探针(5 μmol/L) | 0.5 μL |
| 模板 | 3.0 μL |
| Nuclease-Free Water | 7.0 μL |
| 总体系 | 25 μL |
| * TaKaRa Premix Ex Taq™试剂盒中组分。给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的唯一认可,如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效产品。 | |

9.5.4 设立阴性对照和阳性对照。

9.5.5 荧光 PCR 反应:将加好样的 PCR 反应管分别转移到荧光定量 PCR 检测仪上进行扩增反应。荧光通道检测选择:FAM 通道。荧光 PCR 扩增程序按照表 3 中的程序进行设置,反应总体积为 25 μL。

9.5.6 首先进行种特异性基因检测,若检测为阳性,则继续进行毒力基因检测;若种特异性基因检测为阴性,则无需进行毒力基因检测。

表 3 副溶血性弧菌核酸实时荧光 PCR 的反应程序

| 步骤 | 反应温度 | 时间 | 是否采集荧光信号 | 循环数 |
|---------|------|-------|----------|-----|
| 变性 | 95 ℃ | 5 min | 否 | 1 |
| 扩增及荧光收集 | 95 ℃ | 5 s | 否 | 40 |
| | 60 ℃ | 30 s | 是 | |

9.6 结果判定及报告

9.6.1 阴性对照 Ct 值应显示 0,阳性对照 Ct 值≤36 并有典型的扩增曲线,否则此次检测结果无效,需重做。

9.6.2 当同时进行的阳性对照以及阴性实验结果正常,本方法检验结果判定如下:

- 检测样品有明显的荧光增幅曲线,且 Ct 值≤36 时,判为阳性;
- 检测样品荧光增幅曲线的 Ct 值介于 36 和 40 之间时,建议采用浓缩方式处理核酸样本,再重新进行实时荧光 RT-PCR 检测。若重新检测的 Ct 值有明显减少趋势,且曲线有明显的对数增长期,判为阳性。此类样本建议用其他方法进一步验证;否则判为阴性;
- 检测样品无荧光增幅现象,判为阴性。

本方法报告模式如下:

- 若种特异性基因 *toxR*/*gyrB* 两者之一结果为阳性,且毒力基因 *trh*/*tdh* 两者之一结果为阳性即报告副溶血性弧菌核酸阳性且含毒力基因;
 - 若种特异性基因 *toxR*/*gyrB* 两者之一结果为阳性,且毒力基因检测为阴性则报告为副溶血性弧菌核酸阳性,但不含毒力基因;
 - 若种特异性基因 *toxR*/*gyrB* 检测均为阴性,则报告为副溶血性弧菌阴性。
-