

畜禽养殖粪污中典型致病菌检测 三重数字 PCR 法

Detection of typical pathogenic bacteria in livestock waste—Triple digital PCR
method

地方标准信息服务平台

2024 - 07 - 01 发布

2024 - 09 - 01 实施

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。

本文件由天津市农业农村委员会提出并归口。

本文件起草单位：农业农村部环境保护科研监测所、天津市动物疫病预防控制中心、新疆农垦科学院、天津市农业科学院。

本文件主要起草人：杜连柱、程深伟、张克强、梁雨、王健春、尹春博、刘福元、郇兴亮、杨井泉、苏繁。

地方标准信息服务平台

畜禽养殖粪污中典型致病菌检测 三重数字 PCR 法

1 范围

本文件规定了畜禽养殖粪污中典型致病菌的三重数字 PCR 检测方法的原理、试剂和材料、仪器设备、操作步骤、结果分析与表述及生物安全措施。

本文件适用于天津市畜禽养殖粪污中金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌O157:H7、沙门氏菌的快速定量检测。

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—2008 分析实验室用水规格和试验方法
- GB 19489—2008 实验室 生物安全通用要求
- GB/T 25171—2023 畜禽养殖环境与废弃物管理术语
- GB/T 27403—2008 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测
- GB/T 27522—2023 畜禽养殖污水监测技术规范
- SN/T 4853 转基因大米定量检测 数字PCR法
- SN/T 5334.1—2020 转基因植物产品的数字PCR检测方法 第1部分：通用要求与定义

3 术语和定义

GB/T 25171—2023、SN/T 5334.1—2020界定的术语和定义适用于本文件。

4 原理

微滴式数字PCR系统采用毛细通道网格将数万个微滴离散进入2D芯片，从而有效地实现反应体系的精准分割。该系统利用金黄色葡萄球菌的*nuc*、大肠埃希氏菌O157:H7的*rfbE*以及沙门氏菌的*FimI*特异性基因序列对畜禽养殖粪污中典型致病菌进行检测。在PCR扩增后，通过泊松分布校正阳性微滴的数量和比例，可以准确计算靶基因序列的起始拷贝数或浓度，从而同时实现对三种病原体的快速定量检测。

5 仪器和设备

所需仪器和设备如下：

- a) 微滴生成系统；
- b) PCR仪；
- c) 微滴阅读分析系统；
- d) 高速冷冻离心机：控温 4℃~8℃，离心力不小于 12 000 g/min；
- e) 分析天平：精度 0.01 g；

- f) 恒温水浴箱: $95^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- g) 湿热高压蒸汽灭菌器;
- h) 恒温振荡摇床: 控温 $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C} \sim 37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 转速在 125 r/min~250 r/min;
- i) 生物安全柜;
- j) 组织研磨仪;
- k) 冰箱: 控温 $0^{\circ}\text{C} \sim 4^{\circ}\text{C}$;
- l) 超低温冰箱: 控温 $-20^{\circ}\text{C} \sim -80^{\circ}\text{C}$;
- m) 微量移液器: $0.5 \mu\text{L} \sim 10 \mu\text{L}$, $20 \mu\text{L} \sim 200 \mu\text{L}$, $100 \mu\text{L} \sim 1000 \mu\text{L}$;
- n) 超微量紫外分光光度计;
- o) 无菌离心管: 1.5 mL, 15 mL, 50 mL。

6 试剂和材料

6.1 除另有规定外, 所有试剂均为分析纯。实验用水应符合 GB/T 6682—2008 规定的一级水。

6.2 所需试剂和材料如下:

- a) $5 \times$ dPCR 预混液;
- b) 溶菌酶;
- c) 裂解液: 2% CTAB(cetyltrimethylammonium 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pH 8.0;
- d) 无水乙醇;
- e) 异丙醇;
- f) DNA off 防核酸污染用剂;
- g) 荧光素钠盐。

6.3 引物和探针

6.3.1 金黄色葡萄球菌 *nuc* 基因引物和探针

nuc 上游引物: $5' - \text{CCTGAAGCAAGTGCATTTACGA} - 3'$

nuc 下游引物: $5' - \text{CTTTAGCCAAGCCTTGACGAACT} - 3'$

nuc 探针: $5' - (\text{HEX}) - \text{TGGACGTGGCTTAGCGTATATTTATGCTGATG} - (\text{BHQ1}) - 3'$

6.3.2 大肠埃希氏菌 0157:H7 *rfbE* 基因引物和探针

rfbE 上游引物: $5' - \text{TCAAAAAGGAACTATATTCAGAAGTTTGA} - 3'$

rfbE 下游引物: $5' - \text{CGATATACCTAACGCTAACAAAGCTAA} - 3'$

rfbE 探针: $5' - (\text{CY5}) - \text{AATAAATTTGCGGAACAAAACCATGTGCAA} - (\text{BHQ3}) - 3'$

6.3.3 沙门氏菌的 *FimY* 基因引物和探针

FimY 上游引物: $5' - \text{GCGGCGTTGGAGAGTGATA} - 3'$

FimY 下游引物: $5' - \text{AGCAATGGAAAAAGCAGGATG} - 3'$

FimY 探针: $5' - (\text{FAM}) - \text{CATTCTTAAACGGCGGTGTCTTCCCT} - (\text{BHQ1}) - 3'$

7 操作步骤

7.1 采样物品

采样容器应经121℃、20 min高压灭菌或使用一次性无菌器具。其余采用所用工具、文具和安全防护用品等应按照GB/T 27522—2023中第7章规定执行。

7.2 采样方法

参照GB/T 36197进行畜禽养殖粪污样品的采集。

7.3 样品运输与保存

样品在运输过程中应4℃以下保存并及时送达实验室检测。如当日送样不能及时检测，应将样品放入0℃~4℃冰箱保存，放置时间不超过24 h。若长期保存，应放置于-80℃冻存。保存期间避免反复冻融。

7.4 DNA 的制备

按照 7.1-7.3 采集的畜禽养殖粪污，称取 3.0 g，加入到含有 5 mL 裂解液的 15 mL 无菌离心管中，并使用组织研磨仪充分混匀。将离心管移至 95℃ 恒温水浴锅中孵育 15 min，孵育期间振荡 2 次~3 次。12000 g/min，4℃~8℃ 低温离心 10 min，转移上清液至新的离心管中。加入等体积氯仿，混匀后，12 000 g/min，4℃~8℃ 低温离心 5 min。吸取上清至新的无菌离心管中，加入 0.6 倍体积预冷的异丙醇，混匀。12 000 g/min，4℃~8℃ 低温离心 5 min，轻轻倒去上清液，倒置于吸水纸上，吸干液体。加入 500 μL 75%乙醇，颠倒洗涤，12000 g/min，4℃~8℃ 低温离心 5 min 弃去上清，晾干。沉淀溶于 20 μL 一级水中，保存在-20℃ 备用。阳性对照样品也应采取上述 DNA 制备形式。整体操作步骤也可以使用等效商品化 DNA 提取试剂盒并按其说明书制备模板 DNA。

7.5 DNA 浓度的测量

DNA 浓度的测量方法和对 DNA 模板浓度的要求应符合 SN/T 4853 的规定。

7.6 三重数字 PCR 反应体系

在试剂配制区进行 ddPCR 体系配置。畜禽养殖粪污中同时检测金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌 0157:H7、沙门氏菌的三重数字 PCR 检测体系见表 1（25 μL 反应体系）：

表1 数字 PCR 反应体系

试剂成分	体积（μL）
5×dPCR 预混液	5.0
<i>nuc</i> 上游引物（10 μmol/L）	1.0
<i>nuc</i> 下游引物（10 μmol/L）	1.0
<i>nuc</i> 探针（10 μmol/L）	0.5
<i>rfbE</i> 上游引物（10 μmol/L）	1.0
<i>rfbE</i> 下游引物（10 μmol/L）	1.0
<i>rfbE</i> 探针（10 μmol/L）	0.5
<i>FimY</i> 上游引物（10 μmol/L）	1.0

<i>FimY</i> 下游引物 (10 μmol/L)	1.0
<i>FimY</i> 探针 (10 μmol/L)	0.5
DNA 模板 (1~100 ng/μL)	5.0
一级水	5.0
荧光素钠盐 (1 μmol/L)	2.5

7.7 对照和平行

每次检测应设置空白对照和阳性对照。

空白对照（阴性对照）用一级水替代样品 DNA。

阳性对照采用阳性质粒标准品。

每个待检样品提取的 DNA 溶液以及空白和阳性对照都应进行 3 个平行样本的检测。

阳性标准品：含有金黄色葡萄球菌 *nuc* 基因、大肠埃希氏菌 *rfbE* 基因和沙门氏菌 *FimY* 基因的质粒标准品。也可使用自行提取的阳性标准菌株核酸。

7.8 微滴生成和 PCR 反应

在样本制备区进行，利用微滴生成扩增系统完成 25 μL 反应体系分割和 PCR 反应。

反应条件：95 °C，5 min，1 个循环；95 °C，15 s，60 °C，1 min，45 个循环；98 °C，5 min，1 个循环；4 °C 保存反应产物。整体反应期间升降温度速度均为 1 °C/s。

7.9 微滴读数

利用微滴阅读分析系统对数字 PCR 反应进行荧光信息采集和分析。

8 结果分析与表述

8.1 阈值设定

根据数字 PCR 结果中阴性分割体系的终点荧光值设定荧光的阈值限。阈值限需要对阴性和阳性扩增结果进行明显的区分。

8.2 质量控制

同时满足以下条件，实验为有效：

- 数字 PCR 有效分割体系系数不低于理论分割体系系数的 60%；
- 空白对照（阴性对照）：三个通道（分别代表金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌 *O157:H7* 和肠炎沙门氏菌）均无扩增，扩增终点荧光信号小于阈值，且每个通道的阳性微滴数 < 1；
- 阳性对照：三个通道（分别代表金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌 *O157:H7* 和肠炎沙门氏菌）有明显的扩增，扩增终点荧光信号大于阈值，且每个通道的阳性微滴数都 ≥ 1；
- 每份样品的 3 个平行重复检测结果相对标准偏差不超过 25%。

8.3 结果换算

样品典型致病菌浓度换算见公式（1）：

$$C = N_{mean} \times \frac{V_1}{V_2 \times V_3 \times d} \times M \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

C ——畜禽粪污样品中某一典型致病菌含量（拷贝数/mL）；

N_{mean} ——25 μL 反应体系中测得核酸拷贝值的平均值（拷贝数）；

V_1 ——提取DNA的终体积（ μL ）；

V_2 ——ddPCR反应体系中加入的DNA模板体积（ μL ）；

V_3 ——提取DNA时吸取的样品体积（mL）；

d ——用于提取畜禽粪污DNA样品的稀释倍数，如样品稀释10倍则为 10^{-1} ；

M ——DNA模板的稀释倍数

8.4 结果判断

样品 FAM 通道（沙门氏菌）未得到扩增，扩增终点荧光信号小于阈值，判定样品检测结果为阴性，报告未检出沙门氏菌。

样品 FAM 通道得到扩增，扩增终点荧光信号大于阈值，判定样品检测结果为阳性，报告检出沙门氏菌核酸。根据公式（1）计算样品中沙门氏菌含量，报告为 XXX 拷贝数/mL。

样品 HEX 通道（金黄色葡萄球菌）未得到扩增，扩增终点荧光信号小于阈值，判定样品检测结果为阴性，报告未检出金黄色葡萄球菌。

样品 HEX 通道得到扩增，扩增终点荧光信号大于阈值，判定样品检测结果为阳性，报告检出金黄色葡萄球菌。根据公式（1）计算样品中金黄色葡萄球菌含量，报告为 XXX 拷贝数/mL。

样品 CY5 通道（大肠埃希氏菌 O157:H7）未得到扩增，扩增终点荧光信号小于阈值，判定样品检测结果为阴性，报告未检出大肠埃希氏菌 O157:H7。

样品 CY5 通道得到扩增，扩增终点荧光信号大于阈值，判定样品检测结果为阳性，报告检出大肠埃希氏菌 O157:H7 核酸。根据（1）计算样品中大肠埃希氏菌 O157:H7 含量，报告为 XXX 拷贝数/mL。

9 生物安全措施

检测过程中防止交叉污染的措施应按照GB/T 27403—2008中附录D的规定执行。应由具备资格的工作人员进行检测，并按照GB 19489中的相关规定执行。与样品接触过的容器和废弃物经 121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 20 min进行无害化处理。

10 定量限和检出限

三重微滴式数字PCR检测三种致病菌的定量方法检测限分别为：沙门氏菌 6.97 copies/ μL ；金黄色葡萄球菌 7.57 copies/ μL ；大肠埃希氏菌O157:H7 7.66 copies/ μL 。检出限分别为沙门氏菌 0.68 copies/ μL ；金黄色葡萄球菌 1.02 copies/ μL ；大肠埃希氏菌O157:H7 1.02 copies/ μL 。

参 考 文 献

- [1] GB/T 36197 土壤质量 土壤采样技术指南
- [2] SN/T 2206.11—2014 化妆品微生物检验方法 第11部分：金黄色葡萄球菌 多重实时荧光PCR法
- [3] Sharma VK. Real-time reverse transcription-multiplex PCR for simultaneous and specific detection of rfbE and eae genes of Escherichia coli O157 : H7 [J] . Mol Cell Probes, 2006, 20 (5) : 298-306.
- [4] SN/T 1870—2016 出口食品中食源性致病菌检测方法 实时荧光PCR法
-

地方标准信息服务平台