|  |
| --- |
|  |

DB64

宁夏回族自治区地方标准

DB 64/T

|  |
| --- |
|       |

**包装饮用水中铜绿假单胞菌**

**的快速检测方法**

|  |
| --- |
| **核酸等温扩增荧光检测方法**(征求意见稿) |
|  |

- - 发布

- - 实施

      发布

前  言

本标准是按照GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》给出的规则编写。

本标准由宁夏回族自治区食品检测研究院提出。

本标准由宁夏回族自治区市场监督管理厅归口。

本标准起草单位：宁夏回族自治区食品检测研究院，宁夏回族自治区食品药品审评查验中心。

本标准主要起草人：邓军、高俊峰、夏莉娟、冯秀娟、赵艳、李雯、董川。

包装饮用水中铜绿假单胞菌的快速检测方法

核酸等温扩增荧光检测方法

1. 范围

本标准规定了包装饮用水、饮用天然矿泉水中铜绿假单胞菌的环介导恒温核酸扩增（LAMP）法。

本适用于包装饮用水、饮用天然矿泉水中铜绿假单胞菌的定性检测。

1. 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不住日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 8538 食品安全国家标准 饮用天然矿泉水检验方法

GB 19298 食品安全国家标准 包装饮用水

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

SN/T 1193 基因检测实验室技术要求

1. 生物安全措施

按照GB 19489中的有关规定执行。

1. 防污染措施

防止污染措施应符合GB/T 27403的规定。

1. 缩略语

甜菜碱：甘氨酸三甲胺内盐

B*st* 酶[B*st* DNA polymerase(large fragment)]:B*st* DNA 聚合酶（大片段）

DNA(deoxyribonuclelc add)：脱氧核糖核酸

dNTP（deoxyribonucleoside triphosphate）：脱氧核苷三磷酸

LAMP（loop-mediated isothermal amplification）：环介导恒温扩增

TritonX-100：聚乙二醇辛基苯基醚

1. 原理

根据铜绿假单胞菌特有序列OprL基因序列（参见附录A）设计的两对特殊的内、外引物及一对环状引物，特异性识别靶序列上的六个独立区域，利用Bst酶启动循环链置换反应。Bst聚合酶具有强链置换能力，能在63℃这一恒温条件下实现对目标基因的扩增，其最大的特点就是在扩增过程中能产生多倍数的能自我配对继而引发循环扩增的寡核苷酸结构（即类似花椰菜的茎环结构），在反应体系中添加的染色剂（SYBR GreenⅠ）能结合到扩增出来的DNA的小沟处，当染色剂与DNA结合在一起的时候就能被激发出荧光，从而达到检测目的基因是否得到扩增，根据Ct值，判断待检样品中是否存在铜绿假单胞菌。

1. 试剂与材料

除有特殊说明外，所有实验用试剂均为分析纯；实验用水符合GB/T 6682中水的要求。

7.1 CN琼脂，假单胞菌显色培养基。

7.2 根据铜绿假单胞菌OprL基因序列设计一套特异性引物，包括外引物1，外引物2，内引物1，内引物2，环状上游引物LF和环状下游引物LB。

外引物扩增片段长度：269bp

外引物1（F3，5'-3'）：GCGTTGCCGCCAACAATG

外引物2（B3，5'-3）：CATGCGGGCAACCTCTC

内引物1（FIP，5'-3): GTTGTCACCCCACCTCCGGGCGGCAACGTTCCTCC

内引物2(BIP，5'-3）：CTCCGTGCAGGGCGAACTGCAGGCGAGCCAACTC

环状上游引物(LF，5'-3)：ACCTGCCGTGCCATACC

环状下游引物（LB，5'-3)：GTTCATGCAGCTCCAGCAG

7.3 DNA提取试剂：细菌基因组DNA提取试剂盒。

7.4 BstDNA聚合酶：酶浓度8U/μＬ。

7.5 dNTPs：dATP、dTTP、dCTP、dGTP，每种核苷酸浓度10mmol/L。

7.6 10×ThermoPol缓冲液含：0.2mol/L Tris HCI，0.1mol/L氯化钾，0.1mol/L硫酸铵，20mol/L硫酸镁，1%TritonX-100。

7.7 硫酸镁：50mmol/L。

7.8 甜菜碱：5mol/L。

7.9 显色液：SYBR GreenⅠ荧光染料，0.01mM。

7.10 阳性对照：铜绿假单胞菌标准菌株（ATCC27853），或含目的片段的DNA亦可。

7.11 1.5mL塑料离心管，PCR八联管。

7.12 铜绿假单胞菌LAMP检测试剂盒，可选，参照试剂盒说明书操作，见附录B。

1. 仪器与设备

8.1 无菌玻璃器皿。

8.2 恒温培养箱：36℃±1℃。

8.3 移液器：量程0.5μＬ～10μＬ；量程10μＬ～100μＬ；量程100μＬ～1000μＬ。

8.4 高速台式冷冻离心机：≥7000转。

8.5 加热模块：100℃±1℃。

8.6 计时器。

8.7 荧光定量PCR仪。

1. 检测程序

水样

取250mL水样过滤

分别将滤膜移放在CN平板和假单胞显色平板上，挑取培养后的可疑菌株

细菌DNA提取

LAMP反应

结果观察

阴性

阳性

报告

1. 操作步骤

10.1 样品制备与增菌培养

按照GB 8538-2016中57进行样品制备和培养。铜绿假单胞菌标准菌株直接接种到BHI培养基，36±1℃过夜培养，做阳性对照。

10.2 模板DNA的制备

10.2.1 标准菌株增菌液模板DNA的制备

直接取增菌液100μＬ加到1.5mLDNA提取管中，涡旋震荡混匀，100℃条件下热浴5-10分钟。

3000转离心3min，上清液即为模板DNA；取上清液置-20℃可保存６个月备用。

10.2.2 可疑菌落DNA的制备

用1 µL接种环刮取CN平板和假单胞显色平板上的可疑菌落，悬浮在200 µL0.85%灭菌生理盐水中，充分打散制成菌悬液，于13000r/min离心3min，弃掉上清液。加入1ml灭菌水充分混匀菌体，于100℃水浴或者金属浴维持10min；冰浴冷却后，13000r/min离心3min，收集上清液，取2 µL作为PCR检测的模板；所有处理后的DNA模板直接用于PCR反应或暂存于4℃并当天进行PCR反应；否则，应在-20℃以下保存备用（1周内）。也可用细菌基因组提取试剂盒提取细菌DNA，按照说明书进行操作。若长期保存须存放于-20℃或-80℃冰箱。

10.3 环介导恒温核酸扩增

10.3.1 扩增试剂准备

在试剂配制区进行，在低温条件下进行体系配制。

每个样品测试反应体系配制如下(25µL反应体系)：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 组份 | 工作液浓度 | 加样量（ µL） | 反应体系终浓度 |
| ThermoPol缓冲液 | 10× | 2.5 | 1× |
| 外引物1（F3） | 20μmmol/L | 0.25 | 0.2μmmol/L |
| 外引物2（B3） | 20μmmol/L | 0.25 | 0.2μmmol/L |
| 内引物1（FIP） | 20μmmol/L | 1.0 | 0.8μmmol/L |
| 内引物2（BIP） | 20μmmol/L | 1.0 | 0.8μmmol/L |
| 环状上游引物（LF） | 20μmmol/L | 0.5 | 0.4μmmol/L |
| 环状下游引物（LB） | 20μmmol/L | 0.5 | 0.4μmmol/L |
| dNTPs | 10μmmol/L | 4.0 | 1.6μmmol/L |
| 硫酸镁 | 50μmmol/L | 1.0 | 2.0μmmol/L |
| 甜菜碱 | 5μmmol/L | 4.0 | 0.8μmmol/L |
| Bst DNA聚合酶 | 8U/μＬ | 0.5 | 0.16U/μＬ |
| 显色液 | 0.01mM | 0.5 | **--** |
| DNA模板 | -- | 1 | -- |
| 去离子水 | -- | 8 | -- |

在各设定的PCR反应管中加入以上反应混合液，转移至样品制备区。

注：阳性对照用铜绿假单胞菌的DNA作为模板，阴性对照用不含相应成分的DNA样品作为模板，空白对照用灭菌水作为模板

10.3.2 加样

在样品制备区进行。

在各设定的PCR反应管中分别加入制备好的模板DNA溶液，盖紧管，离心 5 s～10 s。

10.3.3 反应过程

在扩增区进行。将10.3.2中离心后的PCR反应管放入实时荧光定量PCR检测系统内，记录样本摆放顺序，63℃扩增45min。检测结束后，根据扩增曲线和起峰时间判定结果。

10.3.4 空白对照、阴性对照、阳性对照设置

每次扩增反应应设置阴性对照、空白对照和阳性对照。

空白对照设为以灭菌水替代DNA模板。

阴性对照以提取非目标菌DNA代替模板DNA。

阳性对照制备：将铜绿假单胞菌标准菌株接种于BHI中36℃±１℃培养过夜，按10.2提取模板DNA作为LAMP反应的模板。

10.3.5 质量控制

以下条件有一条不满足时，实验视为无效：

a)空白对照：曲线为直线，无“S”型扩增曲线；

b)阴性对照：曲线为直线或轻微斜线，无“S”型扩增曲线；

c)阳性对照：呈“S”型扩增曲线，且检测样本出峰时间≤45min。

11 结果判定与表述

11.1 结果的判定

11.1.1 有效性原则

阴性对照：曲线为直线或轻微斜线，无“S”型扩增曲线；

阳性对照：呈“S”型扩增曲线。

11.1.2 样品

若有“S”型扩增曲线，则判断为阳性；若无“S”型扩增曲线，则判为阴性。

11.2 结果的表述

结果表述为“检出铜绿假单胞菌。”和“未检出铜绿假单胞菌。”

12 废弃物处理

检测过程中的废弃物，收集后高压灭菌，121℃，30min。

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

附 录 A

（资料性附录）

铜绿假单胞菌OprL特异基因序列（Accession no. GU198148）

1 atggaaatgc tgaarttygg taaatttgct gcgctggctc tggccatggc tgtagctgta

61 ggttgctcgt ccaaaggcgg cgacaacgcc ggtgaaggtg ctgttgatcc aaacgctggt

121 tacggcgcaa acactggtgc agttgacggc tccctgagcg aagaagctgc tctgcgcgca

181 atcaccacct tctacttcga atacgacagc tcggacctga agccagaagc catgcgcgct

241 ctggacgttc acgccaagga cctgaaagcc aacggcaacc gcgttaccct ggaaggcaac

301 accgacgaac gtggtactcg tgagtacaac atggctctgg gcgagcgtcg tgcgaaagcc

361 gttcagcgct acctggtact gcaaggtgtt tccccagctc agctggaact ggtttcctac

421 ggcgaagagc gtccagttgc taccggcaac gacgancagt cntgggctca

附 录 B

（资料性附录）

铜绿假单胞菌LAMP检测试剂盒

B.1 试剂盒组成

每个试剂盒可做24个反应（25μL/反应），包括表B.1的成分:

**表 B.1**

|  |  |
| --- | --- |
| **组分名称** | **规格×数量** |
| 反应液 | 550μL×1支 |
| Bst DNA聚合酶 | 30μL×1支 |
| 密封液 | 500μL×1支 |
| 阳性对照 | 20μL**×1支** |
| 阴性对照 | 20μL**×1支** |

B.2 说明

B. 2. 1 试剂盒需于-20℃保存。

B.2.2 反应液液中含有反应所需dNTP混合液、引物、缓冲液、核酸染料等。反应液应避光保存。

B.3 功能

本试剂盒可用于铜绿假单胞菌的鉴定。

B.4 使用时的注意事项

B.4.1 请严格按照操作步骤操作，试剂配制和加样等步骤请严格按照说明书要求在冰上操作。

B.4.2 反应液中的成分对光敏感，应避光保存。反复冻融可能降低试剂盒灵敏度，请按检测频次将反应液以适当体积分管保存。

**包装饮用水中铜绿假单胞菌的快速检测方法核酸等**

**温扩增荧光检测方法地方标准编制说明**

1. **工作简况**
2. **任务来源**

[铜绿假单胞菌](http://www.baidu.com/baidu.php?url=a000000pGFTBfqUxhsv_WuI2ooQI2wArSD4XViSycWTS6Dl5GI-kK1ogq-2RtlNtiyexQZmWpYuWS3nnxFOwn7Bg_U8Ooz8zDSKZiHdcqBESssgIO8u7l2a_dR7skS3tvv2UeusJZVRGK5IJ_W1HjQUiw1tJ413Bj0-afs9mDaBIJC7K_0.7b_aO93rZ6wKVq35dEWCfUmnRA1F1yFWIYvIP-Mu_4ILQWdQjPakkotXzVf.U1Yz0ZDq1pLa1Q1uVpysSeel0Zfq1pLa1Q1uVpysSeel0A-V5HcsP0KM5gKzm6KdpHdBmy-bIykV0ZKGujYznsKWpyfqnHTY0AdY5Hckn1KxnH0kPdtknjD4g1nvnjD0pvbqn0KzIjYYrjf0uy-b5HDYPWuxnWDknjuxnWD4n100mhbqnW0Yg1DdPfKVm1YzPHbsPjTzP1Tkg1nkPHTsP1fzrNt1nHRznW6zPH9xn0KkTA-b5H00TyPGujYs0ZFMIA7M5H00ULu_5HcLP1fVuZGxrjRdQHKxrjR4QHc0mycqn7ts0ANzu1Ys0ZKs5HcYPWnLn1T1n100UMus5H08nj0snj0snj00Ugws5H00uAwETjYs0ZFJ5H00uANv5gKW0AuY5H00TA6qn0KET1Ys0AFL5HDs0A4Y5H00TLCq0ZwdT1YznjbsnjmsnjTdrjTvrHbznHcs0ZF-TgfqnHf3n1bdnHmsrjRvnsK1pyfqrj6sPvNWrHbsnj01rANWrfKWTvYqP1fYPRD3wDf1rRNjPj6kP6K9m1Yk0ZK85H00TydY5H00Tyd15H00XMfqn0KVmdqhThqV5HKxn7tsg100uA78IyF-gLK_my4GuZnqn7tsg1Kxn0KbIA-b5H00ugwGujYVnfK9TLKWm1Ys0ZNspy4Wm1Ys0Z7VuWYs0AuWIgfqn0KhXh6qn0KlTAkdT1Ys0A7buhk9u1Yk0APzm1YknWcYPs&us=0.0.0.0.0.0.8&us=0.0.0.0.0.0.32&ck=0.0.0.0.0.0.0.0&shh=www.baidu.com&sht=56060048_5_pg" \t "https://www.baidu.com/_blank)（Pseudomonas aeruginosa，PA）又称绿脓杆菌，是一种重要的食源性和水源性致病菌。在机体免疫力低下时，可引起急性肠道炎、皮肤炎症等多种疾病。近年来，国内外包装水中铜绿假单胞菌污染问题逐渐严峻，污染的相关报道日渐增多，铜绿假单胞菌污染引起的食物中毒也频频发生，成为公共卫生的重大隐患。

2017-2018年宁夏自治区食品药品监督管理局安排对全区98家包装饮用水、天然饮用矿泉水生产企业生产的水进行监督抽检，共安排监督抽检421批次，其中国抽135批次，自治区级抽检286批次，其中铜绿假单胞菌的检出率为12.3%。目前包装饮用水、天然饮用矿泉水中铜绿假单胞菌检测技术主要依据国家标准GB 8538-2016规定的检验方法。该方法包括培养、生化鉴定等，由于培养周期长，生化鉴定步骤多，特别是某些污染严重的水样经培养后呈现大量非蓝绿产荧光的菌落无法分离鉴定，易出现假阴性，不能实现大批量水样的快速检测。现有标准繁复、不易掌握，致使企业没有能力开展此项检测工作。本研究拟采用环介导等温扩增方法(LAMP)检测包装饮用水、天然饮用矿泉水中铜绿假单胞菌，根据OprL基因序列(Genbank GU198148)设计特异性引物通过实时荧光PCR仪实时监测产物扩增情况，根据有无“S”型扩增曲线判定结果，相对传统的培养方法可大大缩短检测时间、增加检测灵敏度、提高检测效率。因此申请制订《包装饮用水中铜绿假单胞菌的快速检测方法》检验方法的地方标准，其一为了提高宁夏包装饮用水中铜绿假单胞菌的检测技术水平，建立铜绿假单胞菌的分子快速检测方法，实现高通量检测，力争填补国标方法在分子检测水平的空白；其二为宁夏食品安全风险检测、应急处置等提供技术保障；其三为生产企业提供准确、快速、可靠、简便的检测方法。

我研究院经试验验证后，经宁夏回族自治区市场监督管理厅批准立项，制定《包装饮用

水中铜绿假单胞菌的快速检测方法——核酸等温扩增荧光检测方法》检验方法的地方标准。

**（二）标准起草单位和人员**

起草单位：宁夏回族自治区食品检测研究院。

主要起草人员：

邓军 宁夏食品检测研究院微生物检验科；

高俊峰 宁夏食品检测研究院微生物检验科；

夏莉娟 宁夏食品药品审评查验中心；

冯秀娟 宁夏食品检测研究院微生物检验科；

赵艳 宁夏食品检测研究院质量管理科；

李雯 宁夏食品检测研究院质量管理科；

董川 宁夏食品检测研究院办公室。

**（三）主要工作过程**

1、成立标准起草小组。

2、查阅包装饮用水、天然饮用矿泉水中铜绿假单胞菌的检测技术相关的文献资料。

3、对包装饮用水、天然饮用矿泉水中铜绿假单胞菌检验方法引物特异性、准确度、灵敏度等项目进行实验，汇总实验数据，确定实验方案。

4、编写标准编制说明和起草标准文本，召集起草小组全体成员讨论通过该地方标准初稿。

5、请自治区内的相关专家对标准的初稿进行审定，根据专家提出的意见修改后形成送审稿。

**二、标准编制原则和标准主要内容的确定**

本标准的编制遵循有利于食品产业的健康发展，有利于规范我区包装饮用水、天然饮用矿泉水中铜绿假单胞菌的检测，符合国家的法律、法规和强制性标准规定的原则。

本标准编写格式按照GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》给出的规定编写。方法是经过试验条件摸索，方法验证、引物特异性、准确度和灵敏度试验后形成检验方法标准。方法验证过程具体内容详见附件1。

**三、采用国际标准或国外先进标准程度有关情况的说明**

本标准无采用。

**四、标准性质的建议**

作为检验方法标准，建议本标准作为推荐性地方标准发布和实施。

宁夏回族自治区食品检测研究院标准起草小组

2019年08月28日