



中华人民共和国国家标准

GB/T ××××—201×

微生物痕量基因残留测定
微滴数字 PCR 法

Determination for trace gene residues of microorganisms—
Microdroplet digital PCR

20××-××-×× 发布

20××-××-×× 实施

国家市场监督管理总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中国标准化研究院提出并归口。

本标准起草单位：清华大学、中国科学院微生物研究所、河北省食品检验研究院、中国标准化研究院。

本标准主要起草人：张翀、邢新会、杜文斌、周巍、郭永、剪兴金、汪海燕、郑蒙、蔡东洋、马爱进。

微生物痕量基因残留测定

微滴数字 PCR 法

1 范围

本标准规定了用微滴数字 PCR 法测定微生物痕量基因残留的方法。
本标准适用于加工产品中酿酒酵母和植物乳杆菌痕量特征基因残留的测定。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

痕量基因残留 **trace gene residue**
微生物加工产品在后续分离纯化中很难去除的痕量(含量在 100 pg/mL 以下)核酸。

4 原理

利用液滴微流控技术,将待测生物样品所残留的目标核酸 PCR 扩增体系分割成几十份到几万份包含一个拷贝的核酸分子微升级油包水微滴。按照常规 PCR 体系对其进行扩增,通过荧光探针实现信号读出。所产生微滴阳性信号的数目即代表了原始样本中目标核酸分子的拷贝数,从而直接数出目标核酸分子的个数,对起始样品的痕量基因残留进行定量。

5 试剂或材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

5.1 水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.2 DNA 提取试剂盒。

5.3 微滴数字 PCR 反应试剂盒。

5.4 酿酒酵母引物和探针:

SC-F:5'-GGACTCTGGACATGCAAGAT-3';
SC-R:5'-ATACCCTTCTTAACACCTGG-3';
SC-P:5'-FAM-CCCTTCAGAGCGTTTTCTCTAAATTGATAC-BHQ1-3'。

5.5 植物乳杆菌引物和探针:

Lp-F:5'-TTACATTGAGTGAGTGGCGAACT-3';

Lp-R:5'-AGGTGTTATCCCCGCTTCT-3';
Lp-P:5'-FAM-CAGGTTWCCCACGTGTTACTCAC-BHQ1-3'。

5.6 酵母浸出粉胨葡萄糖培养基(YPD 培养基):

称取蛋白胨 20.00 g,酵母提取物 10.00 g,葡萄糖 20.00 g,加水溶解后定容至 1 000 mL。然后在 121 ℃下高压加热灭菌 15 min。

5.7 乳酸细菌培养基(MRS 培养基):

称取蛋白胨 10.00 g,牛肉膏 10.00 g,酵母膏 5.00 g,葡萄糖 20.00 g,柠檬酸氢二铵 2.00 g,乙酸钠 5.00 g,磷酸氢二钾 2.00 g,硫酸镁 0.58 g,硫酸锰 0.25 g,加入吐温-80 1.0 mL,先加入 990 mL 水溶解,并调节 pH 至 6.2 ~ 6.6 的范围内,再定容至 1 000 mL。然后在 121 ℃下高压加热灭菌 15 min。

5.8 酿酒酵母 CGMCC 1.243 7 纯培养物:

挑取活化平板中酿酒酵母 CGMCC 1.243 7 的单菌落接种至 25 mL YPD 液体培养基中,在 30 ℃ ± 1 ℃、180 r/min 的条件下培养过夜得到种子液。取种子液 0.5 mL 转接于 10 mL YPD 液体培养基中,在 30 ℃ ± 1 ℃、180 r/min 的条件下培养至 OD₆₀₀ 为 0.3 ~ 0.4(约 2 h ~ 3 h),得到酿酒酵母 CG-MCC 1.243 7 纯培养物。

5.9 植物乳杆菌 ATCC 204508 纯培养物:

挑取活化平板中植物乳杆菌 ATCC 204508 的单菌落接种至 25 mL MRS 液体培养基中,在 30 ℃ ± 1 ℃、180 r/min 的条件下培养过夜得到种子液。取种子液 0.5 mL 转接于 10 mL MRS 液体培养基中,在 30 ℃ ± 1 ℃、180 r/min 的条件下培养至 OD₆₀₀ 为 0.3 ~ 0.4(约 2 h ~ 3 h),得到植物乳杆菌 ATCC 204508 纯培养物。

6 仪器设备

- 6.1 微滴数字 PCR 仪。
- 6.2 核酸定量仪。
- 6.3 热循环仪。

7 反应体系准备

7.1 酿酒酵母残留基因检测反应体系的准备

7.1.1 受试样品 DNA 模板准备

取 1.00 g 受试样品,按照核酸提取试剂盒说明书进行 DNA 提取操作,最后使用 50 μL 的无菌双蒸水进行 DNA 洗脱。提取得到的 DNA 样品使用核酸定量仪检测核酸的浓度和纯度。

7.1.2 阳性对照 DNA 模板准备

取植物乳杆菌纯培养物(5.9)100 μL,用无菌双蒸水稀释至 OD₆₀₀ 为 0.2(此时菌体浓度约为 2×10⁸ CFU/mL)。采用梯度稀释的方法,继续用无菌双蒸水稀释至菌体浓度为 1×10³ CFU/mL。取 100 μL 稀释后的植物乳杆菌纯培养物,加入 1.00 g 受试样品中作为阳性对照。利用 DNA 提取试剂盒对上述样品进行 DNA 提取操作,最后使用 50 μL 的无菌双蒸水进行 DNA 洗脱。提取得到的 DNA 样品使用核酸定量仪检测核酸的浓度和纯度。

7.1.3 阴性对照 DNA 模板准备

采用植物乳杆菌纯培养物(5.9)为阴性对照。利用 DNA 提取试剂盒对植物乳杆菌纯培养物进行

DNA 提取操作,最后使用 50 μL 的无菌双蒸水进行 DNA 洗脱。提取得到的 DNA 样品使用核酸定量仪检测核酸的浓度和纯度。

7.1.4 微滴数字 PCR 反应体系

每个试样的微滴数字 PCR 反应都设置 3 个平行,并按照表 1 设置 PCR 反应体系。用无菌双蒸水作为空白对照。

表 1 酿酒酵母残留基因检测微滴数字 PCR 反应体系

试剂	终浓度	体系
2×反应 mix	1×	10 μL
20 μmol/L Primer-F	10 μmol/L	1.2 μL
20 μmol/L Primer-R	10 μmol/L	1.2 μL
20 μmol/L Primer-P	10 μmol/L	0.4 μL
20 ng/μL DNA 模板	12.5 ng/μL	4 μL
无菌双蒸水		补足 20 μL
总体系		20 μL
注：此为一般反应体系,可根据不同市售微滴数字 PCR 试剂盒进行调整。对于实验组、阴性对照组和空白对照组选用引物和探针(5.4),对于阳性对照组选用引物和探针(5.5)。		

7.2 植物乳杆菌残留基因检测反应体系的准备

7.2.1 受试样品 DNA 模板准备

取 1.00 g 受试样品,按照核酸提取试剂盒说明书进行 DNA 提取操作,最后使用 50 μL 的无菌双蒸水进行 DNA 洗脱。提取得到的 DNA 样品使用核酸定量仪检测核酸的浓度和纯度。

7.2.2 阳性对照 DNA 模板准备

取酿酒酵母纯培养物(5.8)100 μL,用无菌双蒸水稀释至 OD₆₀₀ 为 0.2(此时菌体浓度约为 2×10⁷ CFU/mL)。采用梯度稀释的方法,继续用无菌双蒸水稀释至菌体浓度为 1×10³ CFU/mL。取 100 μL 稀释后的酿酒酵母纯培养物,加入 1.00 g 受试样品中作为阳性对照。利用 DNA 提取试剂盒对上述样品进行 DNA 提取操作,最后使用 50 μL 的无菌双蒸水进行 DNA 洗脱。提取得到的 DNA 样品使用核酸定量仪检测核酸的浓度和纯度。

7.2.3 阴性对照 DNA 模板准备

采用酿酒酵母纯培养物(5.8)为阴性对照。利用 DNA 提取试剂盒对酿酒酵母纯培养物进行 DNA 提取操作,最后使用 50 μL 的无菌双蒸水进行 DNA 洗脱。提取得到的 DNA 样品使用核酸定量仪检测核酸的浓度和纯度。

7.2.4 微滴数字 PCR 反应体系

每个试样的微滴数字 PCR 反应都设置 3 个平行,并按照表 2 设置 PCR 反应体系。用无菌双蒸水作为空白对照。

表 2 植物乳杆菌残留基因检测微滴数字 PCR 反应体系

试剂	终浓度	体系
2×反应 mix	1×	10 μL
20 μmol/L Primer-F	10 μmol/L	1.2 μL
20 μmol/L Primer-R	10 μmol/L	1.2 μL
20 μmol/L Primer-P	10 μmol/L	0.4 μL
20 ng/μL DNA 模板	12.5 ng/μL	4 μL
无菌双蒸水		补足 20 μL
总体系		20 μL
注：此为一般反应体系,可根据不同市售微滴数字 PCR 试剂盒进行调整。对于实验组、阴性对照组和空白对照组选用引物和探针(5.5),对于阳性对照组选用引物和探针(5.4)。		

8 微滴数字 PCR 反应

体系配置完成后按照数字 PCR 仪器的说明书进行操作,对反应体系进行分割获得油包水微滴。有效微滴数不得低于微滴数字 PCR 设备规定的微滴数量,否则需重复实验检测样本。

按照微滴数字 PCR 仪的操作说明,在 30 min 内进行 PCR 扩增,或者放于 4 ℃冰箱 4 h 之内进行 PCR 扩增。扩增可在数字 PCR 或热循环仪上完成,升降温速度 ≤ 2.5 ℃/s,扩增程序见表 3。扩增结束后读取所有微滴的荧光信号,用于后续数据分析。

表 3 微滴数字 PCR 扩增程序

步骤	温度/℃	时间	循环数
预变性	95	10 min	1
变性	94	30 s	40
退火/延伸	60	1 min	
酶灭活	98	10 min	1
保持	4	∞	
注：一般扩增程序不变,但可根据实际试验情况调整退火温度。			

9 结果分析与表述

9.1 阈值设定

根据体系中阴性扩增体系终点荧光值设定荧光的阈限值。阈限值需明确区分扩增体系中的阴性微滴和阳性微滴。

9.2 对照组检测结果分析

阴性对照组和空白对照中没有任何扩增现象,阳性对照组出现明显的扩增现象,表明此次数字

PCR 检测正常,无需重复检测,具有可信性。

9.3 试样检测结果分析

试样检测的结果根据以下原则分析：

- a) 阳性对照和受试样本均出现明显的扩增现象,其扩增终点荧光信号值超过荧光阈限值,这表明试样中检测出目的微生物残留基因,表述为“试样中检测出目的微生物残留基因,检测结果为阳性”。
 - b) 阳性对照得到了明显的扩增,其终点荧光信号值超过荧光阈限值,受试样本未出现明显的扩增现象,其扩增终点荧光信号值位于阈限值之下,这表明试样中未检测出目的微生物残留基因,表述为“试样中未检测出目的微生物残留基因,检测结果为阴性”。
-