

团体标准

T/SATA XXX—XXXX

唐菖蒲伯克霍尔德氏菌及米酵菌酸产毒株 检测方法 实时荧光 PCR 法（报批稿）

Real-time Fluorescent PCR Detection for *Burkholderia gladioli* and *Burkholderia gladioli* pv. *cocoveneran*

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

深圳市分析测试协会 发布

目 次

目 次.....	I
前 言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语、定义和缩略语.....	1
4 方法提要.....	1
5 仪器和设备.....	2
6 试剂和材料.....	2
7 检验程序.....	3
8 检测步骤.....	3
9 结果判定及报告.....	4
10 防污染措施.....	4
11 生物安全措施.....	4

前 言

本标准按照GB/T1.1-2009 给出的规则起草。

本标准由深圳市分析测试协会归口。

本标准主要起草单位：深圳市计量质量检测研究院

本标准主要起草人：杨国武，陈晶

本标准为首次发布。

唐菖蒲伯克霍尔德氏菌及米酵菌酸产毒株检测方法

实时荧光 PCR 法

1 范围

本标准规定了食品中唐菖蒲伯克霍尔德氏菌及米酵菌酸产毒株的实时荧光PCR检验方法。
本标准适用于食品中唐菖蒲伯克霍尔德氏菌及米酵菌酸产毒株的快速检测。

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，仅所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 4789.29-2020 食品安全国家标准 食品微生物学检验 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌（椰毒假单胞菌酵米面亚种）检验

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 27403-2008 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

3 术语、定义和缩略语

下列术语、定义和缩略语适用于本文件。

3.1 术语和定义

3.1.1 实时荧光 PCR real Time PCR

在 PCR 体系中加入荧光基团，利用荧光信号的积累实时监控整个 PCR 扩增过程。

3.1.2 Ct 值 cycle threshold

每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数。

3.2 缩略语

Ct值：每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数（C:Cycle, t:threshold）

DNA：脱氧核糖核酸

FAM：6-羧基荧光素

PCR：聚合酶链式反应，简称PCR。

4 方法提要

本方法采用 TaqMan 探针实时荧光 PCR 技术建立了食品中唐菖蒲伯克霍尔德氏菌及米酵菌酸产毒株的分子快速检测方法。

首先以唐菖蒲伯克霍尔德氏菌（*Burkholderia gladioli*）ITS基因序列保守区为靶序列，设计特异性引物和探针，进行第一轮实时荧光PCR扩增，判定样本为唐菖蒲伯克霍尔德氏菌阳性还是阴性。

对于唐菖蒲伯克霍尔德氏菌阳性的样本，以唐菖蒲伯克霍尔德氏菌米酵菌酸产毒株 (*Burkholderia gladioli* pv. *cocoveneran*) 米酵菌酸合成相关基因序列保守区为靶序列，设计特异性引物和探针，进行第二轮实时荧光PCR扩增，进而判定样本是否为唐菖蒲伯克霍尔德氏菌米酵菌酸产毒株。

5 仪器和设备

5.1 实时荧光 PCR 仪

5.2 离心机:离心转速 ≥ 12000 r/min,

5.3 微量移液器:2.5 μ L、20 μ L、100 μ L、200 μ L、1000 μ L

5.4 恒温培养箱: 36 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C

5.5 高压灭菌锅

5.6 干浴器或者恒温水浴锅

5.7 天平: 感量 0.1 g。

6 试剂和材料

除另有规定外，试剂为分析纯或生化试剂。实验用水应符合GB/T 6682中级水的规格。所有试剂均用无DNA酶污染的容器分装。

6.1 2 \times Premix EX Taq 预混酶。

6.2 引物和探针: 根据表 1 和表 2 序列合成引物和探针。其中探针的 5'端标记 FAM, 3'端标记 BHQ。

注: 探针的荧光标记可根据基因扩增仪功能的不同进行调整。

表1 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌ITS基因序列保守区实时荧光PCR检测的引物和探针

名称	引物和探针序列
上游引物(唐菖蒲-PBAF)	5'-GCTTCCGCTATCCAAATTACTACTTC-3'
下游引物(唐菖蒲-PBAR)	5'-ATGACAAATGTTTCGAGTCAGTTGAC-3'
探针(唐菖蒲-PBA-FAM)	5'-FAM-ATTGTTAAAGAACGACAGCCGATAAGCACAC-BHQ-3'

表2 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌米酵菌酸产毒株米酵菌酸合成相关基因序列保守区实时荧光PCR检测的引物和探针

名称	引物和探针序列
上游引物(BA1F)	5'-CGATGATATAGCCGAGGTT-3'
下游引物(BA1R)	5'-CAGGTTCCAGTGCCATTA-3'
探针(BA1-FAM)	5'-FAM-CGATGGTCCGTATCTCCTGCTTGTGC-BHQ-3'

7 检验程序

唐菖蒲伯克霍尔德氏菌及米酵菌酸产毒株检验程序见图 1。

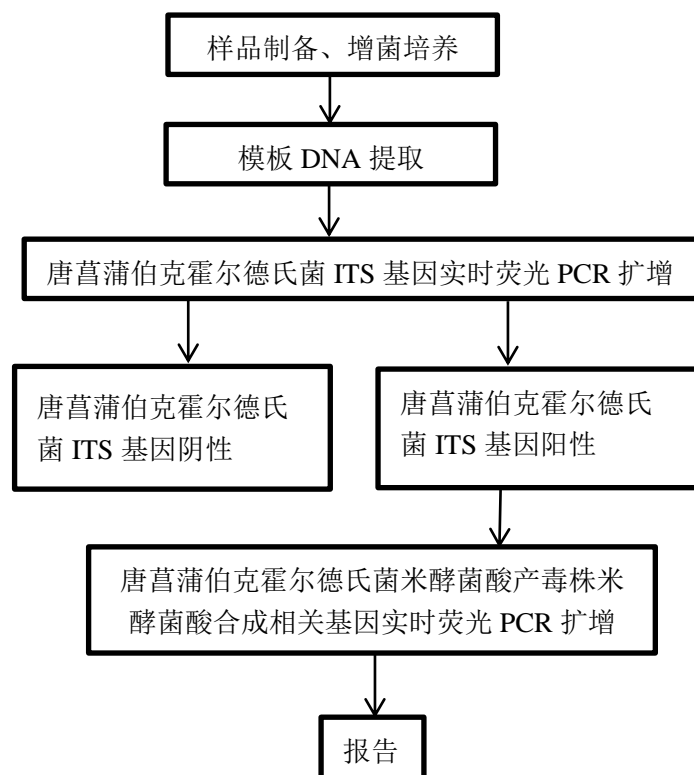


图 1：唐菖蒲伯克霍尔德氏菌及米酵菌酸产毒株的检验程序

8 检测步骤

8.1 样品制备、增菌培养

唐菖蒲伯克霍尔德氏菌的样品制备、增菌培养按照GB4789.29-2020执行。

8.2 模板 DNA 的制备

取7.1中培养的增菌液1mL，加到1.5mL EP管中，12000g离心2min，弃上清；加入500μL无菌水，混匀后12000g离心2min，弃上清；加入100μL无菌水，沸水浴10min，12000g离心2min，取上清保存于-20℃备用以待检测。

注：也可使用商业化的DNA提取试剂盒并按其说明制备模板DNA。

8.3 实时荧光 PCR 检测

唐菖蒲伯克霍尔德氏菌 ITS 基因序列保守区实时荧光 PCR 扩增体系和反应条件为：总反应体系为 20 ul，包括 2×Premix EX Taq 10ul，上、下游引物各(20umol/L) 0.5ul，探针 (20umol/L) 0.3ul，模板 DNA 2ul，用 ddH₂O 补足至 20ul。反应条件为 95℃ 1min，1 个循环；95℃ 5s；60℃ 34s，40 个循环。

唐菖蒲伯克霍尔德氏菌米酵菌酸产毒株米酵菌酸合成相关基因序列保守区实时荧光 PCR 扩增体系和反应条件为：总反应体系为 25ul，包括 2×Premix EX Taq 12.5ul，上、下游引物各(10umol/L) 1ul，探

针 (10 $\mu\text{mol/L}$)1 μl , 模板 DNA 5 μl , 用 ddH₂O 补足至 25 μl 。反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 3min, 1 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5s; 60 $^{\circ}\text{C}$ 40s, 40 个循环。

注1: 可选用其他含有PCR缓冲液、MgCl₂、dNTP和Taq酶等成分的基于Taqman探针的实时荧光PCR预混液进行实时荧光PCR扩增。

注2: 反应体系中各试剂的量可根据具体情况或不同的反应总体积进行适当调整。

8.4 对照

检测过程中分别设阳性对照、空白对照。阳性对照为扩增片段的阳性克隆分子DNA或阳性菌株DNA, 空白对照为无菌水。

9 实时荧光 PCR 扩增结果

9.1 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌 ITS 基因序列实时荧光 PCR 扩增结果

9.1.1 质控标准

阳性对照: 出现典型的扩增曲线, Ct值应 <30.0 ;

空白对照: 无扩增曲线, Ct ≥ 40.0 ;

否则, 实验视为无效。

9.1.2 结果判定和报告

Ct值 ≥ 40.0 , 可判定样品结果为阴性, 报告未检出唐菖蒲伯克霍尔德氏菌;

Ct值 ≤ 35.0 , 可判定该样品结果为阳性;

Ct值 >35.0 而 <40.0 , 建议样本重做。重做结果Ct值 ≥ 40.0 者为阴性, 否则为阳性。

对于阳性结果, 应参见GB 4789.29-2020做进一步的生化鉴定和报告。

9.2 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌米酵菌酸合成相关基因实时荧光 PCR 扩增结果

9.2.1 质控标准

阳性对照: 出现典型的扩增曲线, Ct值应 <30.0 ;

空白对照: 无扩增曲线, Ct ≥ 40.0 ;

否则, 实验视为无效。

9.2.2 结果判定和报告

Ct值 ≥ 40.0 , 可判定样品结果为阴性, 报告未检出唐菖蒲伯克霍尔德氏菌米酵菌酸产毒株;

Ct值 ≤ 35.0 , 可判定该样品结果为阳性;

Ct值 >35.0 而 <40.0 , 建议样本重做。重做结果Ct值 ≥ 40.0 者为阴性, 否则为阳性。

对于阳性结果, 应参见GB 4789.29-2020做进一步的生化鉴定、毒性试验和报告。

10 防污染措施

检测过程中防止交叉污染的措施按照GB/T 27403-2008中附录D的规定执行。

11 生物安全措施

为了保护实验室人员的安全，应由具备资格的工作人员检测，所有培养物应小心处置。并按GB 19489中的有关规定执行。