



中华人民共和国国家标准

GB/T 27637—2011

副结核分枝杆菌实时荧光 PCR 检测方法

Real-time PCR method for the detection of
Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis*

2011-12-30 发布

2012-04-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:中华人民共和国广东出入境检验检疫局、吉林农业大学、北京盈九思科技发展有限公司。

本标准主要起草人:刘中勇、陈茹、杨国海、高云航、曾碧健、朱道中、吴晓薇、高小博。



副结核分枝杆菌实时荧光 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了副结核分枝杆菌(*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)实时荧光 PCR 检测方法的技术要求和操作规范。

本标准适用于快速检测培养物、血样、奶样、粪便和组织等临床样品中副结核分枝杆菌。

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—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

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

Ct 值:荧光信号量达到设定的阈值时所经历的循环数。

dNTP:deoxyribonucleoside triphosphate,脱氧核苷三磷酸。

DMSO:dimethyl sulfoxide,二甲基亚砷。

EDTA:ethylene diaminetetraacetic acid,乙二胺四乙酸。

PBS:phosphate buffer solution,磷酸盐缓冲液。

PCR:polymerase chain reaction,聚合酶链式反应。

Taq 酶:Taq DNA 聚合酶。

UDG 酶:uracil DNA glycosylase,尿嘧啶 DNA 糖基化酶。

4 原理

本标准方法采用了 TaqMan 探针实时荧光 PCR 技术原理。反应体系中包括一对用于扩增 DNA 的引物,和一条能与 PCR 产物特异杂交的荧光标记探针。探针的 5'端标记了被称为报告基团的荧光素,3'端标记了淬灭基团。在进行 PCR 延伸反应时,Taq 酶的 5'外切酶活性将 5'端荧光基团从探针上切割下来,使其与淬灭基团分离,从而仪器能检测到 5'端荧光基团所发出的荧光信号,一分子 PCR 扩增产物的生成伴随一分子荧光信号的产生。随着扩增循环次数的增加,仪器检测到的荧光信号的累积反应了扩增产物量的变化。本标准方法以副结核分枝杆菌特异的 F57 基因序列为模板,设计特异扩增引物和探针建立荧光 PCR 反应体系。

5 材料与试剂

5.1 仪器与耗材

5.1.1 接种棒。

- 5.1.2 无菌注射器或真空采血管。
- 5.1.3 灭菌容器。
- 5.1.4 橡胶管。
- 5.1.5 刮匙。
- 5.1.6 荧光 PCR 仪。
- 5.1.7 恒温水浴锅(室温至 100 ℃)。
- 5.1.8 离心机(最高离心力达 $15\,000\times g$ 以上)。
- 5.1.9 混匀器。
- 5.1.10 冰箱(2 ℃~8 ℃, -20 ℃, -80 ℃)。
- 5.1.11 天平(精密度达千分之一以上)。
- 5.1.12 微量可调移液器(10 μL , 100 μL , 1 000 μL)。
- 5.1.13 微量带滤芯吸嘴(10 μL , 100 μL , 1 000 μL)。
- 5.1.14 研钵。
- 5.1.15 离心管。
- 5.1.16 PCR 光学反应管。

5.2 试剂

- 5.2.1 试剂级别:除另有规定,本方法试验用水应符合 GB/T 6682—2008 规定的二级水,所用化学试剂均为分析纯。
- 5.2.2 引物与探针:采用无 DNA 酶、无 RNA 酶水将每条引物与探针配制成 100 $\mu\text{mol/L}$ 储存液,置 -20 ℃或更低温度冻存;使用时取适量配制成 10 $\mu\text{mol/L}$ 工作液,避免多次冻融。上游引物:5'-GTCAGCGGCGGTCCAG 3',下游引物:5'-GCAGCTCCAGATCGTCATTC 3',探针:5'-FAM-ACGAGCACGCAGGCATTCCAAGTC 3'-BHQ-1。
- 5.2.3 0.01 mol/L pH7.6 PBS: 配方见 A.1。
- 5.2.4 柠檬酸钠缓冲液:配方见 A.2。
- 5.2.5 0.5 mol/L EDTA:配方见 A.3。
- 5.2.6 柠檬酸钠-磷酸缓冲液:配方见 A.4。
- 5.2.7 4% 氢氧化钠溶液:配方见 A.5。
- 5.2.8 4% 硫酸溶液:配方见 A.6。
- 5.2.9 Triton X-100。
- 5.2.10 DNA 提取液:含 100 mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 0.01% Triton X-100, 200 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 蛋白酶 K。也可采用等效商品化试剂。
- 5.2.11 灭菌双蒸水。
- 5.2.12 三氯甲烷。
- 5.2.13 异丙醇。
- 5.2.14 无水乙醇。
- 5.2.15 70% 乙醇:用新开启的灭菌双蒸水配制, -20 ℃预冷。
- 5.2.16 荧光 PCR 反应缓冲液:含 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl (pH8.3), 2.5 mmol/L MgCl_2 , 5% 二甲基亚砜(DMSO), 5% 甘油。可采用等效商品化试剂。
- 5.2.17 dNTP: dATP、dUTP、dCTP 和 dGTP。
- 5.2.18 Taq 酶。
- 5.2.19 UDG 酶。

6 生物安全要求

采样、样品处理及检测过程所涉及的实验操作,应遵守 GB 19489—2008 的有关规定。

7 采样

7.1 样品采集



7.1.1 培养物

直接取液体培养基培养的菌液;对于在固体培养基上生长的菌落,用接种棒挑取适量(取用量达到肉眼可见,菌团大小不超过接种环)菌样,放到 0.01 mol/L pH7.6 PBS 中,振荡混匀形成悬浮菌液。

7.1.2 血样

用无菌注射器或真空采血管,无菌自动静脉采血,无菌分离血清。

用无菌注射器或真空采血管,无菌自动静脉采血,将血液直接滴入抗凝剂中,并立即连续摇动,充分混合。抗凝剂采用柠檬酸钠缓冲液,或 0.5 mol/L EDTA。每 6 mL 血液加 1 mL 抗凝剂。

条件允许时,建议优先采集全血,以更有利于富集菌体。

7.1.3 奶样

无菌采集奶液于灭菌的容器中。一般以后段奶液含菌量较多,早晨挤出的奶液含菌量较高。

7.1.4 粪便

取新鲜粪便,选取腹泻粪便或混有粘液、血液、粘膜的粪便,或用刮匙从动物直肠深部(约 30 cm)取少量粘液粪便,盛于灭菌容器中。

7.1.5 组织

选取有明显病变的肠段、回盲瓣以及病肠相邻部位的淋巴结。

7.2 样品的保存和运输

待检样品在 2℃~8℃ 保存不应超过 24 h; -20℃ 保存不超过三个月; -80℃ 以下长期保存。样品应置于低温、密封的容器内运输。

8 操作方法

8.1 样品前处理

8.1.1 血样、培养物(菌液)前处理

取 1 mL~2 mL 全血样品, $15\,000 \times g$ 离心 10 min, 弃上清; 加等体积灭菌双蒸水充分振荡, $15\,000 \times g$ 离心 10 min; 弃上清, 若红血球裂解不完全, 需采用灭菌双蒸水重复洗涤; 收集沉淀物, 继续进行核酸提取, 或置 -20℃ 贮存备用。

取 1 mL~2 mL 血清、菌液样品, $15\,000 \times g$ 离心 10 min, 弃上清, 加 1 mL 0.01 mol/L pH7.6 PBS, 充分振荡混匀, $15\,000 \times g$ 离心 10 min; 弃上清, 收集沉淀物, 继续进行核酸提取, 或置 -20℃ 备用。

8.1.2 奶样前处理

取 10 mL 奶液,加 100 μ L Triton X-100,振荡混匀,2 500 $\times g$ 离心 20 min;弃上清,取沉淀,加 1 mL 0.01 mol/L pH7.6 PBS,充分振荡混匀,将沉淀悬浮液移入微量离心管,15 000 $\times g$ 离心 10 min;弃上清,收集沉淀物,继续进行核酸提取,或置-20 $^{\circ}$ C 贮存备用。

8.1.3 粪样前处理

取粪样 1 g~2 g,按 1:5 的比例加入 4%硫酸溶液(例如 1 g 粪样,加 5 mL 液体)充分振荡混匀,室温静置 0.5 h~1 h;取上层约 3 mL 液体(避免吸取粗渣),5 000 $\times g$ 离心 1 min,取上清,15 000 $\times g$ 离心 10 min;弃上清,加等量 0.01 mol/L pH7.6 PBS,振荡混匀,使沉淀充分悬浮,15 000 $\times g$ 离心 10 min;弃上清,重复本步骤 1 次;收集沉淀物,继续进行核酸提取,或置-20 $^{\circ}$ C 贮存备用。

8.1.4 组织样品前处理

取适量组织样品(剔除脂肪、被膜),剪碎,按 1:5 的比例加入柠檬酸钠-磷酸缓冲液(例如,1 g 组织样品,加入 5 mL 缓冲液),充分研磨;加等量 4%氢氧化钠溶液,继续研磨 5 min~10 min,使组织液化;充分振荡,75 $^{\circ}$ C 温浴 0.5 h~1 h;取上清(避免吸取粗渣),15 000 $\times g$ 离心 10 min;弃上清,加等量 0.01 mol/L pH7.6 PBS,振荡混匀,使沉淀充分悬浮,15 000 $\times g$ 离心 10 min,弃上清,重复本步骤 1 次;收集沉淀物,继续进行核酸提取,或置-20 $^{\circ}$ C 贮存备用。

8.2 核酸提取

在上述已完成前处理的样品(沉淀物)中加入 50 μ L~100 μ L DNA 提取液,充分振荡混匀,56 $^{\circ}$ C 温浴 30 min,98 $^{\circ}$ C~100 $^{\circ}$ C 加热 10 min,瞬时离心使液滴聚集管底,加等体积三氯甲烷,振荡混匀,12 000 $\times g$ 离心 5 min,取上清,直接用于 PCR 或贮存于-80 $^{\circ}$ C 备用(适用于除粪样外的其他样品)。粪样样品还需进行以下步骤:加入等体积异丙醇(-20 $^{\circ}$ C 预冷),颠倒混匀,放置 5 min~10 min;4 $^{\circ}$ C、15 000 $\times g$ 离心 10 min,弃上清,加 3 倍体积 70%乙醇(4 $^{\circ}$ C 预冷),振荡洗涤;4 $^{\circ}$ C,15 000 $\times g$ 离心 10 min,弃上清,室温干燥 5 min;加入 50 μ L 无 DNA 酶、无 RNA 酶水,混匀、溶解核酸,直接用于 PCR 或贮存于-80 $^{\circ}$ C 备用。

可采用经验证的商品化核酸提取试剂盒。

8.3 扩增反应

8.3.1 对照设立

从样品处理开始,应设置阳性对照、阴性对照。

阳性对照:取已知阳性的同类样品作为阳性对照,也可将适量灭活的病原菌添加到已知阴性样品中作为阳性对照样品。

阴性对照:取已知阴性的同类样品作为阴性对照。

空白对照:在扩增反应阶段设置。以灭菌双蒸水作为模板设置空白对照。

8.3.2 扩增试剂准备

采用 25 μ L 反应体系,含以下成分:10 mmol/L Tris-HCl (pH8.3),50 mmol/L KCl,2.5 mmol/L $MgCl_2$,0.2 mmol/L dNTP,上、下游引物各 0.2 μ mol/L,探针 0.1 μ mol/L,5% DMSO,5%甘油,0.4 U UDG 酶,1U Taq 酶,5 μ L 核酸模板。

取出荧光 PCR 反应缓冲液等试剂,室温融化(Taq 酶、UDG 酶除外),瞬时离心后置冰上,根据上述

反应体系、按每个反应 20 μL 的用量配制荧光 PCR 预混反应液,不足部分加灭菌双蒸水补足;需配制的荧光 PCR 预混反应液数量=样品个数+对照个数+1。将各试剂按使用量吸取到微量离心管中,充分混匀,然后在每个 PCR 光学管中分装 20 μL 。

8.3.3 加样

在已分装有荧光 PCR 预混反应液的 PCR 光学管中每管分别加入 5 μL 样品或对照的核酸模板,混匀,盖上管盖,放入荧光 PCR 仪,记录样品放置顺序。

8.3.4 荧光 PCR 扩增检测

反应条件设定:第一阶段:50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 4 min,1 个循环;第二阶段:95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,40 个循环,60 $^{\circ}\text{C}$ 时设置采集荧光。

荧光素设定:报告荧光(report dye)设定为 FAM(或按探针实际标记的荧光基团设定),淬灭荧光(quench dye)设定为 None,校准荧光(reference dye)设定为 None。可根据不同品牌仪器说明等效设置参数。

9 分析条件设定和结果判定

9.1 阈值设定

综合分析仪器给出的各项结果,基线(baseline)以仪器给出的默认值作为参考,阈值(threshold)设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照样品扩增曲线的最高点为准,具体还需根据仪器噪声情况进行调整,选择反应所设定的荧光基团对应的通道进行分析。

9.2 质控

阴性对照和空白对照应无 C_t 值,阳性对照的 C_t 值应 ≤ 30 ,且呈现 S 型典型扩增曲线。否则,此次实验视为无效。

9.3 结果分析及判定

在质控有效的条件下进行结果判定。

阴性反应结果判定:检测结果呈现无 C_t 值、无扩增曲线或反应曲线无明显对数增长期,判为荧光 PCR 阴性反应,样品判为副结核分枝杆菌核酸检测阴性。

阳性反应结果判定:检测结果呈现 C_t 值 ≤ 35 、且扩增曲线有明显的对数增长期,判为荧光 PCR 阳性反应,样品判为副结核分枝杆菌核酸检测阳性。

对于 $35 < C_t \text{ 值} < 40$ 的样品,需重新取样进行重复检测。如果重复检测的 C_t 值 < 40 ,且曲线有明显的对数增长期,判为阳性反应。否则判为荧光 PCR 阴性反应。

必要时,对初次检测呈荧光 PCR 阳性反应的样品进行重复检测。

10 注意事项

检测过程防止交叉污染应注意的事项见附录 B。

附 录 A

(规范性附录)

试剂的配制

A.1 0.01 mol/L pH7.6 PBS

先配制 A 液、B 液。

A 液(0.2 mol/L NaH_2PO_4 溶液):称取一水合磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)27.6 g,或二水合磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)31.2 g,溶于蒸馏水中,定容至 1 L。

B 液(0.2 mol/L Na_2HPO_4 溶液):称取十二水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)71.6 g,或二水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)35.6 g,溶于蒸馏水中,定容至 1 L。

称取 17 g 氯化钠,用适量蒸馏水溶解,量取 13 mL A 液和 87 mL B 液,混合,用蒸馏水定容至 2 L。采用 $(121 \pm 2)^\circ\text{C}/0.1 \text{ MPa}$,15 min 高压灭菌后贮存于 4°C 。

A.2 柠檬酸钠缓冲液

柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 5.3 g

柠檬酸钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 15 g

葡萄糖($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 16.2 g

称取上述试剂,溶解于蒸馏水,定容至 1 L,混匀。采用 $121^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}/0.1 \text{ MPa}$,15 min 高压灭菌后贮存于 4°C 。

A.3 0.5 mol/L EDTA(pH8.0)

称取 186.1 g EDTA,加入 800 mL 蒸馏水中,磁力搅拌器上剧烈搅拌,用氢氧化钠(NaOH)调 pH 至 8.0,定容至 1 L,分装,采用 $(121 \pm 2)^\circ\text{C}/0.1 \text{ MPa}$,15 min 高压灭菌后贮存于室温。

A.4 柠檬酸钠-磷酸缓冲液

先配制 pH6.8 磷酸缓冲液。

A 液(0.2 mol/L 磷酸二氢钠溶液):称取磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)15.61 g,加双蒸水溶解,定容至 500 mL。

B 液(0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液):称取磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)35.82 g,加双蒸水溶解,定容至 500 mL。

分别量取 51 mL A 液、49 mL B 液,混合即成 100 mL pH6.8 磷酸缓冲液。

称取 2.84 g 柠檬酸钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),加入 100 mL pH6.8 磷酸缓冲液中,充分溶解。采用 $(121 \pm 2)^\circ\text{C}/0.1 \text{ MPa}$,15 min 高压灭菌后贮存于 4°C 。

A.5 4%氢氧化钠溶液



称取 8 g 氢氧化钠,加入 200 mL 双蒸水中,充分溶解。室温贮存。

A.6 4%硫酸溶液

量取 20 mL 浓硫酸,加入 500 mL 双蒸水中,混匀。室温贮存。



附录 B
(规范性附录)
检测过程防止交叉污染的措施

- B.1** 采样及样品处理过程,应防止不同样品之间通过器具、手套等的交叉污染。采样及样品处理工具应经过高压灭菌或高温烘烤处理,一套工具仅限一个样品使用。存放样品的容器应清洗、高压灭菌或高温烘烤处理,或使用一次性灭菌容器。
- B.2** 实验过程,应穿工作服和戴一次性手套,勤换手套,工作服应经常清洗。
- B.3** 使用带滤芯吸嘴。吸嘴、离心管、PCR 管等应一次性使用,不得回收清洗后重复使用。
- B.4** 样品处理与 PCR 加样应在不同的区域进行,不同区域配备独立的加样工具和用具。该区域可以是独立的空间间隔、有紫外消毒设施的独立的设备如核酸提取工作站、PCR 加样工作站、可密闭进行紫外消毒的超净工作台、生物安全柜等。若在敞开的空间进行核酸提取或 PCR 加样,该空间应安装紫外灯或配备具有等同降解核酸功能的设备如移动紫外灯、带紫外消毒功能的空气消毒净化器等。上述区域在每次使用后应及时清洁处理,并在使用前后照射紫外 30 min 以上。每个区域应有专门的废弃物容器,该容器应能耐受煮沸、10%次氯酸钠溶液消毒处理。每次实验结束,应在紫外消毒前,及时清理废弃物及消毒容器,并将该废弃物容器放回工作区进行紫外消毒。
- B.5** PCR 反应试剂应按检测需求分装贮存,避免同一管试剂多次开启使用。
- B.6** 装有核酸模板、样品或试剂的离心管在打开之前,应短暂离心,避免离心管崩开,所有操作尽量避免产生气溶胶。
- B.7** 上机运行前,应检查并盖紧各 PCR 管,以防荧光物质或模板泄漏而污染机器。
- B.8** 应遵循基因检测实验室其他技术要求。
-