

重 庆 市 地 方 标 准

DB50/T 1298—2022

奇异变形杆菌和普通变形杆菌双重 Real-Time PCR 检测方法

地方标准信息服务平台

2022 - 09 - 30 发布

2022 - 12 - 30 实施

目 次

前言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 缩略语.....	1
5 检测原理.....	1
6 仪器设备.....	1
7 试剂材料.....	2
8 方法步骤.....	2
8.1 样品采集.....	2
8.2 运输与保存	2
8.3 细菌分离	2
8.4 检测	3
9 结果判定.....	3
10 生物安全要求.....	3
附录 A（规范性） 试剂的配制.....	4

地方标准信息服务平台

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。

本文件的某些内容可能涉及专利，本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由重庆市农业农村委员会提出、归口并组织实施。

本文件起草单位：重庆市畜牧科学院。

本文件主要起草人：杨睿、蒋雨、付利芝、王孝友、李成洪、覃志初、许国洋、付文贵、陈朝洪、冯刚。

地方标准信息服务平台

奇异变形杆菌和普通变形杆菌双重 Real-Time PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了奇异变形杆菌和普通变形杆菌的双重 Real-Time PCR 检测方法的检测原理、仪器设备、试剂材料、方法步骤、结果判定和生物安全要求。

本文件适用于奇异变形杆菌和普通变形杆菌的鉴别检测。

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 19489 实验室生物安全通用要求。

GB/T 6682 分析实验用水规格和实验方法。

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

GN 增菌液：革兰阴性菌增菌液（Gram Negative Bacteria Broth）

SS 培养基：沙门志贺菌属琼脂培养基（Salmonella Shigella agar）

Real-Time PCR：实时荧光定量聚合酶链式反应（Real-Time Polymerase Chain Reaction）

5 检测原理

采用 Real-Time PCR 技术对奇异变形杆菌（*Proteus mirabilis*）的 *UreR* 基因和普通变形杆菌（*Proteus vulgaris*）的 *blaB* 基因进行检测，能有效地鉴别检测奇异变形杆菌与普通变形杆菌。

UreR 基因是奇异变形杆菌的尿素酶调节基因，而在普通变形杆菌中没有；*blaB* 基因是普通变形杆菌的β-内酰胺酶调节基因，但在奇异变形杆菌中不存在。针对奇异变形杆菌的 *UreR* 基因和普通变形杆菌的 *blaB* 基因，分别设计了特异性引物和探针，通过 Real-Time PCR 技术在 FAM 通道和 HEX 通道分别检测奇异变形杆菌和普通变形杆菌。

6 仪器设备

6.1 荧光定量 PCR 仪：同时有 FAM 和 HEX 通道。

6.2 分析天平：精度为±0.1g。

6.3 高速冷冻离心机。

6.4 恒温培养箱。

6.5 振荡培养箱。

6.6 超净工作台。

6.7 微量可调移液器（2.5 μL、10 μL、100 μL、1000 μL）及配套带滤芯吸头。

6.8 -80℃低温冰箱和常规医用冰箱。

6.9 超纯水仪。

- 6.10 恒温水浴锅。
6.11 组织研磨仪。
6.12 二级生物安全柜。

7 试剂材料

本文件所使用的水应符合 GB/T 6682 中规定的二级水要求。

- 7.1 GN 增菌液应按附录 A 中 A.1 的要求配制。
7.2 SS 培养基应按附录 A 中 A.2 的要求配制。
7.3 营养肉汤应按附录 A 中 A.3 的要求配制。
7.4 商品化的细菌基因组提取试剂盒。
7.5 商品化的荧光定量 2×Taq PCR MasterMix。
7.6 采样袋、试管、三角瓶、离心管（1.5 mL）、PCR 8 连管或 96 孔板、封口膜。
7.7 引物和探针应按照表 1 合成。
7.8 阳性对照为奇异变形杆菌标准菌株（中国兽医微生物菌种保藏管理中心，CVCC4106）、普通变形杆菌标准菌株（中国医学细菌菌种保藏管理中心，CMCC49027）；阴性对照为去离子水。

8 方法步骤

8.1 样品采集

固体样品（肠道内容物、粪便和环境样本等）等放入无菌的采样袋内，并在采样袋外面标识出时间、地点和具体的样品名称。

液体样品（尿液、饮水和脓液等）用无菌注射器吸取 1 mL ~2 mL 液体样本到 2 mL 离心管中，并标识出时间、地点及具体的样品名称。

8.2 运输与保存

4 °C 冷藏，24 h 内送实验室检测。

8.2 运输与保存

4 °C 冷藏，24 h 内送实验室检测。

表1 检测奇异变形杆菌和普通变形杆菌的引物和探针

检测菌株	核苷酸序列（5' → 3'）
奇异变形杆菌	上游引物： CCATCAGATTATGTCATTCAA
	下游引物： GAGGAAAATGCAATTTATCTTTA
	FAM 探针： FAM-CACACCCTACCCAACATTCATTTCA-BHQ1
普通变形杆菌	上游引物： AAAGAGCCTGAATTAATAAC
	下游引物： ATCACCCTACCGGTTTTATC
	HEX 探针： HEX-ATTCATGGTGATCCTCGTGATACTA-BHQ1

8.3 细菌分离

8.3.1 增菌培养

固体样品：无菌取 1 g~ 2 g，剪碎、研磨，加入到装有 50 mLGN 增菌液的三角瓶中，37 °C，120 r/min 振荡培养 18 h~24 h。

液体样品：无菌取 1 mL~2 mL，加入到装有 50 mLGN 增菌液的三角瓶中，37 °C，120 r/min 振荡培养 18 h~24 h。

8.3.2 细菌分离

用接种环取 1 环增菌液，划线接种于 SS 琼脂平板，37 °C 培养 24 h，4 °C 放置 4 h，挑取大小 1 mm ~ 2 mm、边缘无色半透明、中心多呈黑色、表面光滑圆形或椭圆形菌落 1 个 ~ 2 个，接种到装有 4 mL 营养肉汤的试管中，37 °C 振荡培养 12 h，4 °C 保存备用。

8.3.3 DNA 提取

可采用煮沸法提取细菌 DNA：首先取待测菌液 1 mL，5000 g 离心 5 min，弃上清液；然后加入 1 mL 去离子水，涡旋震荡 30 s 混匀，再次 5000 g 离心 5 min，弃上清液；最后加入 100 μL 去离子水，涡旋震荡 30 s 混匀，100 °C 水浴 10 min，冷却后放入 -80 °C 保存，备用。也可以采用商品化的细菌基因组提取试剂盒提取细菌 DNA，提取的 DNA 模板 -80 °C 保存，备用。

8.4 检测

8.4.1 反应体系组成

反应体系见表 2，使用商品化荧光定量 2×Taq PCR MasterMix。

8.4.2 反应参数

95 °C 预变性 30 s；95 °C 变性 5 s，56 °C 退火 10 s，72 °C 延伸 20 s，共 40 个循环。在延伸阶段分别收集 FAM 和 HEX 荧光信号。

表2 TaqMan Real-Time PCR反应体系

组份	用量(μL)
2×Taq PCR Master Mix	10
奇异变形杆菌上游引物 (10 μmol/L)	0.5
奇异变形杆菌下游引物 (10 μmol/L)	0.5
普通变形杆菌上游引物 (10 μmol/L)	0.5
普通变形杆菌下游引物 (10 μmol/L)	0.5
奇异变形杆菌 FAM 探针 (10 μmol/L)	0.5
普通变形杆菌 HEX 探针 (10 μmol/L)	0.5
DNA 模板	2
去离子水	5
总体积	20

9 结果判定

FAM 通道用于检测奇异变形杆菌；HEX 通道用于检测普通变形杆菌；当实验中的阴阳性对照同时成立时可用下列方法判定检测结果。

阳性对照：FAM 通道的 CT 值 ≤ 30 且扩增曲线为典型的“S”型，则结果判定为奇异变形杆菌阳性对照成立；当 HEX 通道的 CT 值 ≤ 30 且扩增曲线为典型的“S”型，则结果判定为普通变形杆菌阳性对照成立；

阴性对照：测定 FAM 和 HEX 通道，无典型的“S”型扩增曲线，则结果判定为阴性。

阳性结果判定：当 FAM 通道的 CT 值 ≤ 30 且扩增曲线为典型的“S”型，则结果判定为奇异变形杆菌阳性；当 HEX 通道的 CT 值 ≤ 30 且扩增曲线为典型的“S”型，则结果判定为普通变形杆菌阳性；

可疑结果判定：测定 FAM 和 HEX 通道，30 < CT 值 ≤ 35，则结果判定为可疑，需要重复检测一次，如果重测结果仍然为可疑则判定为阳性；如果重测结果无典型的“S”型扩增曲线则判断为阴性。

阴性结果判定：测定 FAM 和 HEX 通道，无典型的“S”型扩增曲线，则结果判定为阴性。

10 生物安全要求

人员防护、实验废弃物处置等按照 GB 18489 的规定执行。

地方标准信息服务平台

附录 A

(规范性)

试剂的配制

A.1 GN 增菌液

GN 增菌液配制成分见表 A.1, 配好后, 加蒸馏水 1000 mL 加热搅拌溶解后, 加入 1 mol/LHCl 调节溶液的 pH 值至 7.0 ± 0.1 , 115 °C 高压灭菌 15 min。

表 A.1 GN 增菌液配制成分表

组份	用量 (g)
胰蛋白胨	20
葡萄糖	1
甘露醇	2
柠檬酸钠	5
去氧胆酸钠	0.5
磷酸氢二钾	4
磷酸二氢钾	1.5
氯化钠	5

A.2 SS 培养基

SS 培养基配制成分见表 A.2, 配好后, 加蒸馏水 1000 mL 加热搅拌溶解后, 121 °C 高压灭菌 15 min。

表 A.2 SS 培养基配制成分表

组份	用量 (g)
牛肉膏	5
蛋白胨	5
三号胆盐	3.5
琼脂	17

A.3 营养肉汤

营养肉汤配制成分见表 A.3, 配好后, 加蒸馏水 1000 mL 加热搅拌溶解后, 调节 pH 至 7.3 ± 0.1 , 121 °C 高压灭菌 15 min。

表 A.3 营养肉汤配制成分表

组份	用量 (g)
牛肉膏	5
蛋白胨	10
氯化钠	5