

T/SDAQI

团 体 标 准

T/SDAQI XXX—XXXX

PC 饮用水桶中粪链球菌的快速定性检测 实时荧光 PCR 方法

Rapid qualitative detection of Enterococcus faecalis in Packaging materials for
Drinking water Real-time PCR method

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

山东质量检验协会 发 布

版 权 声 明

本文件系由山东质量检验协会（简称“协会”）组织创制的团体标准文本（含制定过程中的草案），协会拥有本文件的著作权，受《中华人民共和国著作权法》保护。除法律所允许的情形或事先得到协会书面许可外，任何组织和个人不得以任何理由进行复制、销售、传播本文件，或抄袭、歪曲本文件等侵权行为，否则，行为人应承担相应的民事、行政责任，构成犯罪的，将依法追究其刑事责任。其他文件引用本文件，不属侵权行为。

凡利用本文件进行或支持贸易、认证等商业活动，应事先购买正式文本或得到协会书面授权。购买本文件或获得授权，请与协会联系。

欢迎社会各界举报侵权盗版行为，协会将依法严格保护举报人信息。

联系人：范红梅

联系电话：0531-51758070 15668365153

联系邮箱：keyanjishuzhongxin@163.com

协会对本版权声明拥有最终解释权。

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。

请注意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。

本文件由山东质量检验协会提出、归口并组织实施。

本文件起草单位：山东省产品质量检验研究院、青岛海关技术中心。

本文件主要起草人：李娜、张宇鑫、王智、温展、李小丫、孔啸鸣、任莉、周莉莉、王一村、侯广月。

PC 饮水水桶中粪链球菌的快速定性检测 实时荧光 PCR 方法

1 范围

本文件规定了PC饮水水桶中粪链球菌的实时荧光PCR检测方法。

本文件适用于PC饮水水桶中粪链球菌的快速定性检测。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

GB/T 19495.2 转基因产品检测 实验室技术要求

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

PC 饮水水桶 polycarbonate drinking water bucket

聚碳酸酯（简称PC），是分子链中含有碳酸酯基的高分子聚合物，一种无色透明的无定形热塑性材料。PC饮水水桶就是用全新的食品级聚碳酸酯为原料生产的容器，主要用于饮用水的包装。

3.2

实时荧光 PCR Real-time PCR

实时荧光 PCR，是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程。

3.3

CT 值 cycle threshold

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。

4 设备和材料

4.1 电子天平：感量 0.01 g。

4.2 微量可调移液器。

4.3 恒温水浴锅。

4.4 磁力搅拌器。

4.5 高速冷冻离心机：离心力 12 000 g，4℃。

T/SDAQI XXX—XXXX

- 4.6 二级生物安全柜。
- 4.7 高压灭菌锅。
- 4.8 普通冰箱：2℃~8℃，-20℃。
- 4.9 pH 计或精密 pH 试纸。
- 4.10 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。
- 4.11 实时荧光定量 PCR 仪。
- 4.12 恒温培养箱：36℃±1℃。
- 4.13 过滤设备。
- 4.14 无菌亲水性微孔滤膜：直径 47 mm，孔径为 0.45 μm。
- 4.15 无菌滤器。
- 4.16 无菌无齿镊子。

5 培养基和试剂

5.1 检测用引物和 Taqman 探针序列

表 1 检测用引物和 Taqman 探针

名称	序列（5'—3'）	目的基因
内参照5'端引物	5'-TTAAGTCCC GCAACGAGC-3'	细菌16S rRNA基 因
内参照3'端引物	5'-TTGTAGCACGTGTGTAGCCC-3'	
内参照探针	5'-VIC-TTGACGTCATCCCCACCTTCCTCC-TRAMA-3'	
检测用5'端引物	5'-AGAAATTCCAAACGAACCTTG-3'	粪链球菌23S rDNA基因
检测用3'端引物	5'-CAGTGCTCTACCTCCATCATT-3'	
检测用探针	5'-FAM-TGGTTCTCTCCGAAATAGCTTTAGGGCTA-TAMRA-3'	

- 5.2 无菌生理盐水：见 A.1。
- 5.3 KF 链球菌琼脂培养基：见 A.2。
- 5.4 三氯甲烷。
- 5.5 异戊醇。
- 5.6 异丙醇。
- 5.7 商品化 2×荧光定量 PCR 预混液。
- 5.8 70%乙醇。
- 5.9 蛋白酶 K：20 mg/μL。
- 5.10 RNA 酶溶液：5 μg/μL。
- 5.11 Tris 饱和酚。
- 5.12 TE 冲液：10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)，1 mmol/L EDTA (pH 8.0)。
- 5.13 CTAB 缓冲液：55 mmol/L CTAB，1.4 mol/L NaCl，20 mmol/L EDTA，100 mmol/L Tris，调 pH 5.0~8.0，121℃高压灭菌 20 min。

6 操作步骤

6.1 取样

根据水桶规格取适量灭菌水注入PC饮用水桶内部，将水桶倾斜充分旋转润洗，使无菌水与水桶内壁充分接触形成样液，将样液收集至无菌容器瓶内。

表 2 取样量

水桶规格	10 L以下	10.1 L~15 L	15.1 L~20 L	20 L以上
加入灭菌水量(mL)	250	500	750	1000

6.2 过滤

首先用无菌镊子夹取灭菌滤膜边缘部分，将粗糙面向上，贴放在已灭菌的滤床上，固定好滤器，将全部样液通过孔径0.45 μm的滤膜过滤。

6.3 培养

将过滤后的滤膜正向贴在已制备好的KF链球菌琼脂培养基平板上，滤膜截留细菌面向上，平铺并避免在滤膜和培养基之间夹有气泡。将平板倒置，36℃±1℃培养48h±2h。

6.4 菌体收集

用灭菌的1 mL 0.9%的生理盐水洗脱滤膜上的菌落，并将菌液收集于灭菌的2 mL离心管中。重复洗脱一次，将两次菌液合并后进行下一步检测。

6.5 DNA 提取

将上述收集于灭菌的2 mL离心管中的菌液6 000 g离心1 min，弃上清。加入1 000 μL CTAB缓冲液和40 μL蛋白酶K，振荡混匀，65℃温浴30 min，每隔10 min振荡混匀。12 000 g离心10 min，吸取1 mL上清液至2 mL离心管中，勿吸取管内杂质。向离心管中加入500 μL体积比为25:24:1的酚-三氯甲烷-异戊醇的混合液（现用现配），剧烈振荡，12 000 g离心12 min。吸取上清液至一新离心管中，加入等体积异丙醇，剧烈振荡，12 000 g离心10 min。弃上清液，用65℃预热的双蒸水溶解DNA。加入5 μL RNA酶，37℃温浴30 min。加入200 μL体积比为24:1的三氯甲烷-异戊醇混合液，剧烈振荡，12 000 g离心12 min。吸取上清液至一新离心管中，加入等体积异丙醇，振荡均匀，12 000 g离心10 min。弃上清，70%乙醇洗涤一次，12 000 g离心1 min。弃上清液，晾干后加入50 μL TE缓冲液溶解DNA，-20℃保存。

DNA提取也可使用等效的DNA提取试剂盒替代。

6.6 DNA 浓度及纯度的测定

取适量的DNA模板溶液加双蒸水稀释一定倍数后，使用紫外分光光度计测定260 nm和280 nm处的吸光值A₂₆₀和A₂₈₀，DNA浓度计算按式（1）计算，

C = A × N × 50..... (1)

式中：

C——DNA浓度，单位为纳克每微升（ng/μL）；

A——260 nm处的吸光值；

N——核酸稀释倍数；

50——吸光值A₂₆₀为1时，相对应双链DNA的浓度常数；

当A₂₆₀/A₂₈₀比值在1.8~2.0之间时，DNA模板适宜荧光定量PCR扩增。

若检测DNA模板浓度不在规定范围内，可适当增加样品采样量或增加荧光定量PCR反应过程中模板量或减少溶解DNA的溶剂的量，提高浓度，以保证检测的有效性。

6.7 实时荧光 PCR 检测

6.7.1 实时荧光 PCR 反应体系

表 3 实时荧光 PCR 反应体系

试剂成分	体积（单位：μL）
2×荧光定量PCR预混液	12.5
引物F（10 μM）	0.8
引物R（10 μM）	0.8
探针P（5 μM）	0.4
样品DNA（10 ng/μL~100 ng/μL）	1.0
dd H ₂ O	补至 25.0

6.7.2 实时荧光 PCR 反应参数

95℃预变性2 min；95℃变性5 s，60℃退火45 s，40个循环。

6.7.3 实验对照

检验过程中分别设内参照、阳性对照、阴性对照、空白对照。以大肠埃希氏菌标准菌株[CMCC(B)43201或等效标准菌株]或构建的标准质粒DNA为阴性对照、以粪链球菌标准菌株[CMCC(B)32482或等效标准菌株]作或构建的标准质粒DNA为阳性对照、以其他细菌的DNA为内参照，以灭菌水为空白对照。所有反应均设置两个平行反应体系。

7 质量控制

以下条件有一条不满足时，实验视为无效，需重新进行实验。

- a) 空白对照：无荧光对数增长，相应的 Ct 值>40.0；
- b) 阴性对照：无荧光对数增长，相应的 Ct 值>40.0；
- c) 阳性对照：有荧光对数增长且荧光通道出现典型的扩增曲线，相应的 Ct 值<30.0；
- d) 内参照：有荧光对数增长且荧光通道出现典型的扩增曲线，相应的 Ct 值<30.0。

8 结果判定及表述

8.1 结果判定

在符合第 7 部分的情况下，被检样品进行检测时：

- a) 如两个平行样品 Ct 值均≤35.0，则判定为被检样品阳性；
- b) 如两个平行样品 Ct 值均≥40.0，则判定为被检成分阴性；
- c) 如 35.0<Ct 值<40.0，判为结果可疑，需要重新检测。如再次扩增后 Ct 值仍为<40.0，则判定相应被检成分阳性；如再次扩增后 Ct 值≥40.0，则判定相应被检成分阴性。

8.2 结果表述

8.2.1 结果为阳性者，表述为“检出粪链球菌”。

8.2.2 结果为阴性者，表述为“未检出粪链球菌”。

9 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 附录D的规定执行。

附 录 A

培养基和试剂

A. 1 无菌生理盐水

A. 1. 1 成分

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A. 1. 2 制法

称取8.5 g氯化钠溶于1000 mL蒸馏水中，121℃高压灭菌15 min。

A. 2 KF 链球菌琼脂培养基

A. 2. 1 成分

胨蛋白胨	10.0 g
麦芽糖	20.0 g
乳糖	1.0 g
酵母浸粉	10.0 g
氯化钠	5.0 g
叠氮化钠	0.4 g
甘油磷酸钠	10.0 g
氯化三苯基四氮唑(TTC)水溶液	10 mL
琼脂	20.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A. 2. 2 制法

除氯化三苯基四氮唑(TTC)水溶液外，其他成分溶解于蒸馏水中，置于沸水浴内加热，以溶解其中的琼脂，待完全溶解后再加热5 min，然后冷却，温度降到50℃～60℃时，于1000 mL培养基内再加10 mL的10g/mL的TTC水溶液（用0.22μm滤膜过滤除菌）。培养基于45℃～50℃存放，到倾注平皿之前不可超过4 h，有培养基的平皿应在2℃～8℃保存。超过30天不用，弃去。培养基25℃的pH为7.2±0.2。