

中华人民共和国海洋行业标准

HY/T XXXXX—XXXX

海水中大肠杆菌、肠球菌和霍乱弧菌的检测
实时荧光 RNA 恒温扩增法

Detection of *Escherichia coli*, Intestinal Enterococci and *Vibrio cholera* in seawater

simultaneous amplification and testing method

(报批稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中华人民共和国自然资源部 发布

目 次

前言.....	II
1 范围.....	3
2 规范性引用文件.....	3
3 术语和定义.....	3
4 方法原理.....	4
5 试剂或材料.....	4
6 仪器和设备.....	5
7 样品的采集和预处理.....	6
8 检测步骤.....	6
9 报告结果.....	9
10 质量控制.....	10
11 废物处理.....	10
附录 A（规范性）引物探针序列.....	11
附录 B（规范性）检测过程用表.....	13
参考文献.....	14

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。

本文件由中华人民共和国自然资源部提出。

本文件由全国海洋标准化技术委员会（SAC/TC 283）归口。

本文件起草单位：自然资源部第一海洋研究所，江阴海关综合技术服务中心。

本文件主要起草人：郑立、李倩、徐希媛、韩阳春、高伟、田雯、张彦超、徐金祥、王帅、沈浩、何昌飞、张毅然、朱磊。

海水中大肠杆菌、肠球菌和霍乱弧菌的检测

实时荧光 RNA 恒温扩增法

1 范围

本文件规定了采用实时荧光RNA恒温扩增法检测海水中大肠杆菌、肠球菌和霍乱弧菌的方法原理、试剂和材料、仪器和设备、样品采集和预处理、检测步骤、剩余样品处理、质量控制等内容。

本文件适用于海水中大肠杆菌、肠球菌和霍乱弧菌（O1 群和 O139 群）的活菌检测。淡水、半咸水及船舶压载水检测可参照使用。

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 6682-2016 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 12763.6—2007 海洋调查规范 第6部分：海洋生物调查

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

实时荧光 RNA 恒温扩增 simultaneous amplification and testing; SAT

核酸恒温扩增技术和实时荧光检测技术相结合，通过对核酸扩增产物的荧光信号进行实时检测，从而快速准确检测靶标微生物的一种新型核酸检测技术。

3.2

靶标 target

用于检测目标微生物的特异性RNA片段序列。

3.3

循环阈值 cycle threshold

每个反应管内的荧光信号到达设定阈值时所经历的循环数。

3.4

内质控 internal control

体外合成的一段 RNA 片段。

注：其序列与靶标 RNA 序列不匹配，用于核酸提取和扩增时的质量控制。

4 方法原理

靶标RNA在反转录酶作用下产生互补DNA，RNA聚合酶以互补DNA为模板产生多个RNA拷贝扩增产物，带有荧光标记的RNA探针和扩增的靶标RNA特异结合产生荧光，由荧光定量PCR仪获得循环阈值（Ct值），Ct值与初始模板量成反比，根据Ct值判断检测结果。

5 试剂或材料

5.1 实验用水

应符合GB/T 6682-2016中一级水的要求。

5.2 样本裂解保存液

50 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷（Tris）（pH7.0），0.1%（V/V）十二烷基硫酸钠（SDS），1%（V/V）聚乙二醇辛基苯基醚（TritonX-100），0.1%（V/V）乙基苯基聚乙二醇，室温保存，有效期 2 年。

5.3 标准菌株

采用编号为ATCC 25922的大肠杆菌和编号为CGMCC 1.2024的粪肠球菌（*Enterococcus faecalis*）作为标准菌株。

5.4 核酸提取液

4-羟乙基哌嗪乙磺酸（50~400） mmol/L， 乙二胺四乙酸（EDTA）（40~200） mmol/L， 氯化锂（400~2000） mmol/L， 0.25 μ M 待测菌株探针和250 mg/mL 磁珠， 4 $^{\circ}$ C 保存， 有效期 1 年。探针序列见附录A.1。

5.5 大肠杆菌或肠球菌上游引物扩增检测液

Tris 25 mmol/L， 氯化镁 10 mmol/L， 脱氧核糖核苷三磷酸（dNTPs） 1 mmol/L， NTPs 5 mmol/L， 5%（V/V） 丙三醇的溶液， 含有 0.25 μ mol/L 靶标上游引物， 0.075 μ mol/L 内质控上游引物。靶标引物为扩增大肠杆菌或肠球菌特异性RNA片段的引物， -20 $^{\circ}$ C 保存， 有效期 1 年。引物序列见附录A.1和附录A.2。

5.6 大肠杆菌或肠球菌下游引物扩增检测液

Tris 25 mmol/L， 氯化镁 10 mmol/L， dNTPs 1 mmol/L， 核糖核苷三磷酸（NTPs） 5 mmol/L， 5%（v/v） 丙三醇的溶液， 含有 0.25 μ mol/L 靶标下游引物， 0.19 μ mol/L 内质控下游引物， 0.25 μ mol/L 靶标核酸检测探针和 0.25 μ mol/L 内质控检测探针。靶标引物为扩增大肠杆菌或肠球菌特异性RNA片段的引物， -20 $^{\circ}$ C 保存， 有效期 1 年。引物和探针序列见附录A.1和附录A.2。

5.7 洗涤液

4-羟乙基哌嗪乙磺酸（5~50） mmol/L， 氯化钠 150 mmol/L， 1% SDS， EDTA（1~10） mmol/L。

5.8 SAT 酶液

含有2000U M-MLV反转录酶、2000U T7 RNA 聚合酶， 20 mmol/L Tris， 0.1%（V/V） TritonX-100， 30 mmol/L 氯化钾， 0.01 mmol/L EDTA， 0.1 mmol/L 二硫苏糖醇， 50%（V/V） 丙三醇， -20 $^{\circ}$ C 保存， 有效期 1 年。

5.9 霍乱弧菌扩增检测液

Tris 25 mmol/L， 氯化镁 10 mmol/L， dNTPs 1 mmol/L， NTPs 5 mmol/L， 5%（v/v） 丙三醇的溶液， 含有 0.25 μ mol/L 靶标上游引物， 0.25 μ mol/L 靶标下游引物， 0.075 μ mol/L 内质控上游引物， 0.19 μ mol/L 内质控下游引物， 0.25 μ mol/L 靶标核酸检测探针和 0.25 μ mol/L 内质控检测探针。引物为霍乱弧菌的特异性引物， -20 $^{\circ}$ C 保存， 有效期 1 年。引物探针序列见附录A.1和附录A.2。

6 仪器和设备

- 6.1 无菌玻璃瓶：500 mL，清洗后 121℃ 高压灭菌 15 min。
- 6.2 微孔滤膜过滤器。
- 6.3 无菌醋酸纤维膜：水系，孔径 0.45 μm ，直径 25 mm。
- 6.4 镊子：121℃ 高压灭菌 15 min。
- 6.5 离心管：容量为 1.5 mL 和 2 mL，121℃ 高压灭菌 15 min。
- 6.6 水浴锅：室温至 100 $^{\circ}\text{C}$ 范围内任意调节，最大温度误差不大于 1 $^{\circ}\text{C}$ 。
- 6.7 单道微量移液器：规格为 10 μL 、200 μL 和 1000 μL ，配枪头，枪头 121℃ 高压灭菌 15 min。
- 6.8 超净工作台。
- 6.9 涡旋振荡器：范围 0 r/min~2500 r/min。
- 6.10 磁珠分离核酸提取磁力架。
- 6.11 96 孔板及封板膜：根据不同仪器配套规格为全透明或白色 96 孔板，配高透光封板膜。
- 6.12 金属浴锅：室温至 100 $^{\circ}\text{C}$ 范围内任意调节，最大温度误差不大于 1 $^{\circ}\text{C}$ 。
- 6.13 实时荧光定量聚合酶链式反应仪。
- 6.14 高温压力灭菌锅。

7 样品的采集和预处理

针对每种检测微生物，采用无菌玻璃瓶现场采集 1000 mL 水样，样品的保存按照 GB/T 12763.6-2007 中 6.1.1.3 的规定进行。

大肠杆菌和肠球菌取 100 mL 水样、霍乱弧菌取 250 mL 水样，采用微孔滤膜过滤器过滤至无菌醋酸纤维膜上，用镊子将膜折叠，放入 1.5 mL 离心管中，添加 1 mL 样本裂解保存液作为待测样本，其中肠球菌待测样本应置于水浴锅中 90 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min 以促进细胞裂解。待测样本在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下可保存 1 个月。每份样品做 3 个平行。

8 检测步骤

8.1 大肠杆菌和肠球菌

8.1.1 标准菌株制备

标准菌株的复苏根据说明书中提供的要求进行培养，培养至光密度600nm时的吸光度值（Optical Density, OD_{600} ）为0.4~0.8，通过平板计数法计算菌落数。采用单道微量移液器取100 μ L添加至2 mL的离心管，添加900 μ L的样本裂解保存液。按照表1用样本裂解保存液进行十倍梯度稀释并记录相应编号，作为阳性标准品（-20℃条件下可保存1个月），用于定量检测样品浓度的标定。该步骤需在超净工作台内完成。阳性标准品设置3个平行样，与样本RNA提取同步进行。

表1 大肠杆菌、肠球菌稀释后的浓度

类别	稀释后的浓度梯度
	CFU/mL
大肠杆菌	1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5
肠球菌	1×10 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4

8.1.2 试剂准备

取出核酸提取液平衡至室温；取出大肠杆菌或肠球菌上游引物扩增检测液和下游引物扩增检测液置于水浴锅中60℃加热10 min。

8.1.3 提取和加样

提取和加样步骤如下：

- a) 取出待测样本，涡旋振荡器振荡30 s。使用单道微量移液器取250 μ L的待测样本加入至新的1.5 mL离心管，再加入200 μ L核酸提取液，颠倒混匀，样本裂解保存液作为阴性对照与待测样本同步提取加样，阴性对照设置3个平行样；
- b) 将离心管放入水浴锅中，60℃水浴加热10 min，室温放置冷却10 min；
- c) 将离心管置于磁珠分离核酸提取磁力架上，静置5 min，使用单道微量移液器吸除液体，保留管内的磁珠；
- d) 使用单道微量移液器向离心管中加入700 μ L洗涤液，涡旋振荡器混匀30 s后，重复一次步骤c)；
- e) 重复步骤d)；
- f) 使用单道微量移液器向离心管中加入40 μ L大肠杆菌或肠球菌上游引物扩增检测液，震荡混匀，形成重悬液；
- g) 使用单道微量移液器将重悬液添加到96孔板中，贴好封板膜，放入42℃金属浴锅中保温3 min；

- h) 撕下封板膜，使用单道微量移液器迅速加入25 μ L SAT酶，贴好封板膜，继续在42 $^{\circ}$ C金属浴锅中反应5 min。
- i) 撕下封板膜，使用单道微量移液器迅速加入35 μ L大肠杆菌或肠球菌下游引物扩增检测液，准备检测。

8.1.4 上机检测

上机检测步骤如下：

- a) 开启实时荧光定量聚合酶链式反应仪，选择FAM荧光通道检测靶标RNA，选择HEX或VIC荧光通道检测内质控RNA，恒温扩增温度为42 $^{\circ}$ C，循环数为40，每个循环时间60 s，每个循环结束进行一次荧光采集检测；
- b) 将96孔板放进实时荧光定量聚合酶链式反应仪，开始检测，记录Ct值。

8.1.5 结果判定

结果判定步骤如下：

- a) 将表1中标准菌株的4个浓度梯度lg值作为x值，每个浓度梯度对应的Ct值作为y值，记录在附录B表B.1中，得到线性回归方程及相关系数 R^2 值（ $R^2 \geq 0.95$ ，若 $R^2 < 0.95$ 需重新确定标准曲线）；
- b) 根据表2中的判定标准对结果进行初步的判定，当判定结果为阳性时，将样本的Ct值即y值填写至附录B的表B.2中，并代入线性回归方程，计算得出x值即为菌浓度的lg值；
- c) 水样中的菌浓度计算。计算见公式（1），得出（小数点后保留两位有效数字），并记录至附录表B.2中。

$$N=10^x \div 100 \dots \dots \dots (1)$$

式中：

N为菌浓度，单位为每毫升水样中的菌落数（CFU/mL）。

表2 检测结果判定表

判定标准	判定结果
样本 Ct 值不大于 35，可直接给出判定结果。	阳性
样本 Ct 值大于 40，且内质控 Ct 值不大于 40，可直接给出判定结果。	阴性
样本 Ct 值大于 35 且不大于 40，且内质控 Ct 值不大于 40，需要复检。	灰区

样本 Ct 值大于 40，且内质控 Ct 值大于 40，检测结果无效。	无效
-------------------------------------	----

8.2 霍乱弧菌

8.2.1 阳性对照的制备

制备霍乱弧菌ToxR基因的RNA体外转录产物，作为阳性对照，设置2个平行。

8.2.2 试剂准备

同8.1.2。

8.2.3 提取和加样

提取和加样步骤如下：

- a) 取出待测样本，涡旋振荡器振荡30 s，使用单道微量移液器取400 μ L的待测样本加入新的1.5 mL无菌离心管，再加入100 μ L核酸提取液，颠倒离心管混匀，样本裂解保存液作为阴性对照；
- b) 同8.1.3 b) ~ e)；
- f) 使用单道微量移液器向离心管中加入30 μ L霍乱弧菌扩增检测液，震荡混匀，重悬磁珠；
- g) 使用单道微量移液器将重悬液添加到96孔板中，贴好封板膜，放金属浴锅先60 $^{\circ}$ C温浴10 min，再42 $^{\circ}$ C温浴5 min；
- h) 撕下封板膜，使用单道微量移液器快速加入10 μ L SAT酶，贴好封板膜，准备检测。

8.2.4 上机检测

上机检测步骤如下：

- a) 开启实时荧光定量聚合酶链式反应仪，选择FAM荧光通道检测靶标RNA，选择HEX或VIC荧光通道检测内质控RNA，恒温扩增温度为42 $^{\circ}$ C，循环数为40，每个循环时间60 s，每个循环结束进行一次荧光采集检测；
- b) 将96孔板放进实时荧光定量聚合酶链式反应仪，开始检测，记录Ct值。

8.2.5 结果判定

根据表2中的“阳性”或“阴性”结果进行“检出”或“未检出”的定性判定。

9 报告结果

大肠杆菌或肠球菌的定量检测报告表述为：水样中的菌浓度为每毫升水样中的菌落数；霍乱弧菌的定性报告为：每100毫升样品中检出或未检出。

检出01群或0139群霍乱弧菌的，应在24 h内呈报到上一级实验室做进一步鉴定或复查，并报告相关部门。

10 质量控制

将内质控RNA加入到核酸提取液中，参与待测样本、阳性对照和阴性对照的核酸提取及检测过程，用于控制样本在处理、扩增和检测期间的变化差异。

11 废物处理

剩余的水样或待测样本应用高温压力灭菌锅灭菌121 °C、15 min后丢弃。

附 录 A
(规范性)
引物探针序列

A.1 靶标引物扩增区域与核酸探针序列

表A.1给出了大肠杆菌、肠球菌和霍乱弧菌检测的引物探针序列。

表A.1 三种菌的核酸探针序列与靶标基因扩增区域

类别	核酸探针序列	靶标基因扩增区域
大肠杆菌	上游引物：5'-GGTTGTTAAGTCAGATGTG-3'	GAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGT GCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTT TGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATC TGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGTAGAATCCAGGT GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGG CGGCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAG CAAACAGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGTGCA CTTGGAGG
	下游引物： 5'-AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGATCCTAGGTGTTGTCAGCAT-3'	
	探针：5'-GCAGUGUUAGGCCUUUAGUCCACUGC-3'	
肠球菌	上游引物：5'-GGAGGCAGCAGTAGGAATCTTCGG-3'	CGTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGTGCATTAGCTAGT TGTTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAG AGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACG GGAGGCAGCAGTAGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGA GCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAAGTCTGTT GTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAAGTGTTCATCCCTGACGGTA TCTAACGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTA
	下游引物： 5'-AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAGATGATGTAGTTCTGACCTTGC-3'	
	探针：5'-GCCUCGGGACGAAAGUCUGACCGAGACGAGGC-3'	
霍乱弧菌	上游引物：5'-TCCCCTAAGCAATACTCTGA-3'	ATGAGTCATATTGGTACTAAATTCATTCTTGCTGAAAAATTTACCTT TGATCCCCTAAGCAATACTCTGATTGACAAAGAAGATAGTGAAGAGA TCATTCGATTAGGCAGCAACGAAAGCCGAATCTTTGGCTGCTGGCC CAACGTCCAAACGAGGTGATTTCTCGCAATGATTTGCATGACTTTGT TTGGCGAGAGCAAGGTTTTGAAGTCGATGATTCAGCTTAACCAAG CAATTCGACTCTGCGCAAAATGCTCAAAGATTGACAAAAGTCCCA CAATACGTCAAACGGTCCGAAACGTGGTTACCAATTGATCGCCCG AGTGAAACGGTTGAAGAAGAGATGGCTCGCGAAAGCGAAGCTGCTC ATGACATCTCTCAACCGGAATCTGTCAATGAATACGCAGAGTCAAGC AGTGTGCCTTCATCAGCCACTGTAGTGAACACACCCGACGCGCCAA TGTCGTGGCGAATAAATCGGCTCCAAACTTGGGAATCGACTGCTTA TTCTGATAGCGCTTACTTCCCCTCGCAGTATTACTGCTCACTAAC CCGAGCCAAT
	下游引物： 5'-AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAATCACCTCGTTTGGACGTTGGGCCA GCA-3'	
	探针：5'-CGCAUAGUGAAGAGAUCAUUCGAGUGCG-3'	

注：探针的5'端标记荧光报告基团FAM，3'端标记荧光淬灭基团DABCYL。大肠杆菌和肠球菌引物扩增区域为细菌16s rRNA 的特异性区域，霍乱弧菌的引物扩增区域是ToxR基因。

A.2 内质控探针序列、全序列及引物

A.2.1 内质控探针序列

探针的5'端标记荧光报告基团HEX，3'端标记荧光淬灭基团DABCYL，识别内质控上的特定序列。

内质控探针序列：5'-CGCUGGAGCGUGGUGAGCAGCG-3'。

A.2.2 内质控全序列

内质控全序列为：5'-UCAGGUAACACGAAAUCGUACCCCAAACCGACACAGGUGGUCAGGUAGAGAAUACCAAGGCGCUUG
AGAGAACUCGGGUGAAGGAACUAGGCAAAAUGGUGCCGUAACUUCGGGAGAAGGCACGCUGACACGUAGGUUGGAGCGUGGUGAGCUGG
AGCUGAAGUCAGUCGAAGAUACCAGCUGGCUGCAACUGUUUUAUAAAAACACAGCACUGUGCAAACACGAAAGUGGACGUUACGGUGU
GACGCCUGCCCGGUGCCGGAAGGUAAUUGAUGGGGUCAGCGUAAGCGAAGCUCCUGAUCGAAGCCCCGGUAAACGGCGGCCGUAACUA
UAACGGUCCUAAGGU-3'。

A.2.3 内质控引物

A.2.3.1 上游引物：5'-GGAGCGTGGTGAGCTGGAGCTGAAGTC-3'。

A.2.3.2 下游引物：5'-AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGACCGTATACGTCCACTTTCGTGTTT-3'。

附录 B (规范性) 检测过程用表

表B.1和表B.2分别给出了大肠杆菌、肠球菌和霍乱弧菌检测过程的标准曲线绘制和结果报告格式。

表B.1 _____标准曲线的绘制

x值 (菌浓度的lg值)	y值 (Ct值)	线性回归方程 $y=ax+b$	R ² 值

注：x值指菌浓度的lg值；y值为Ct值。

表B.2 检测结果报告表

样品编号	大肠杆菌			肠球菌			霍乱弧菌	
	y 值	x 值	菌浓度 CFU/mL	y 值	x 值	菌浓度 CFU/mL	Ct 值	检出/未检出

检测人： 记录人： 审核人： 年 月 日

参 考 文 献

- [1] GB 17378.2-2007 海洋监测规范 第2部分：数据处理与分析质量控制
- [2] GB 17378.7-2007 海洋监测规范 第7部分：近海污染生态调查和生物监测
- [3] RB/T 033-2020 微生物检测方法确认与验证指南
- [4] ISO 9308-1:2014 Water quality — Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria — Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora
- [5] ISO 7899-2:2000 Water quality - Detection and enumeration of intestinal enterococci -Part 2: Membrane filtration method
- [6] SANS 6315-2003 Water quality- Detection and enumeration of *Vibrio cholerae*
- [7] SN/T 1933.1-2007 食品和水中的肠球菌检验方法 第1部分：平板计数法和最近似值测定法
- [8] SN/T 2332-2009 国境口岸霍乱弧菌的荧光PCR检测方法
- [9] SN/T 1875-2007 入出境船舶压舱水微生物学检测规程
- [10] Li, R., Tun, H. M., Jahan, M., Zhang, Z. X., Kumar, A., Fernando, D., Farenhorst, A., Khafipour, E.. Comparison of DNA-, PMA-, and RNA-based 16S rRNA Illumina sequencing for detection of live bacteria in water. *Scientific Reports*[J], 2017, 7: 5752.
DOI:10.1038/s41598-017-02516-3.
- [11] Kitto R. Z., Christiansen, K. E., Hammond, M. C.. RNA-based fluorescent biosensors for live cell detection of bacterial sRNA[J]. *Biopolymers*, 2020, e23394.
DOI:10.1002/bip.23394.
- [12] MIAO, Y. J., XIONG, G. T., BAI, M. Y., Ge, Y., Wu Z. F.. Detection of live *Salmonella enterica* in fresh-cut vegetables by a TaqMan-based one-step reverse transcription real-time PCR[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2018, 66 (5) :447-454.
DOI:10.1111/lam.12871.
-