

第二十四章 T/CALAS 24—2017《实验动物 螺杆菌 PCR 检测方法》实施指南

第一节 工作简况

根据中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会的下发的 2016 年团体标准制（修）订计划，由广东省实验动物监测所和中国食品药品检定研究院共同负责团体标准《实验动物 螺杆菌 PCR 检测方法》起草工作。该项目由全国实验动物标准化技术委员会（SAC/TC281）技术审查，由中国实验动物学会归口管理。

本标准的编制工作是按照《中华人民共和国国家标准 GB/T1.1 2009 标准化工作导则》第 1 部分“标准的结构和编写规则”的要求进行编写的。本标准是在国家科技支撑计划“实验动物质量检测关键技术研究”（项目编号 2013BAK11B01）和广东省科技计划项目“广东省实验动物检测技术平台”（项目编号 2011B040200010）课题基础上制定而成的，在制定过程中参考了国内外相关文献，对方法的敏感性、特异性、重复性等进行了研究，并对所建立的标准方法进行了应用研究，建立了可行、稳定、特异的螺杆菌普通 PCR 和实时荧光 PCR 检测方法。

第二节 工作过程

本标准由中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会提出，广东省实验动物监测所和中国食品药品检定研究院按照团体标准研制要求和编写工作的程序，组成了由双方单位专家和专业技术人员参加的编写小组，制定了编写方案，并就编写工作进行了任务分工。编制小组根据任务分工进行了资料收集和调查研究工作，在国家科技支撑计划“实验动物质量检测关键技术研究”（项目编号 2013BAK11B01）和广东省科技计划项目“广东省实验动物检测技术平台”（项目编号 2011B040200010）课题研究基础上，组织编写实验动物螺杆菌 PCR 检测方法技术资料，于 2016 年 4 月完成了标准草案的起草工作。标准草案首先征求中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会的意见，2016 年 10 月在南宁召开团体标准征求意见会议，参会专家对标准稿提出了系列修订建议和意见。根据提出的意见编制组对《实验动物 螺杆菌 PCR 检测方法》标准草案进行修改。结合调研、试验验证，形成本标准征求意见稿。

2016 年 11 月至 12 月，标准征求意见稿在中国实验动物学会网站公开征求意见，共收集意见或建议 12 个，编制组根据专家提出的修改意见和建议，采纳 10 个，未采纳 2 个。

经对《实验动物 螺杆菌 PCR 检测方法》团体标准整理修改后形成标准送审稿、标准送审稿编制说明和征求意见汇总处理表。

2017 年 2 月 21 日, 全国实验动物标准化技术委员会在北京召开了标准送审稿专家审查会。会议由全国实验动物标准化技术委员会的委员组成审查组, 认真讨论了标准送审稿及其编制说明、意见汇总处理表, 提出了修改意见和建议。与会专家认为本标准填补了螺杆菌检测方法国内无标准的空白, 一致同意通过审查。会后, 编制组根据与会专家提出的修改意见, 经对《实验动物 螺杆菌 PCR 检测方法》团体标准修改完善后形成标准报批稿、标准报批稿编制说明和征求意见处理汇总表。

2017 年 5 月, 本标准经中国实验动物学会第六届理事会常务理事会第八次会议审议通过, 批准发布, 于 2017 年 5 月 19 日起正式实施。

第三节 编写背景

啮齿动物螺杆菌属于螺杆菌属, 是一群革兰氏染色阴性、微需氧条件生长且营养要求较高的螺旋状细菌。该菌的自然宿主是鼠, 具有较高感染率并主要以隐形感染形式存在于啮齿类实验动物的消化道中。免疫缺陷动物感染螺杆菌可引起严重的临床症状, 严重影响实验动物质量及试验结果。啮齿动物螺杆菌包括胆汁螺杆菌 (*H. bilis*)、肝螺杆菌 (*H. hepaticus*)、小家鼠螺杆菌 (*H. muridarum*)、啮齿类动物螺杆菌 (*H. rodentium*) 和盲肠螺杆菌 (*H. typhlonius*) 等, 螺杆菌是国外实验动物健康监测的一个必检项目, 国际实验动物理事会等已将螺杆菌列为实验动物必须排除的病原菌, 我国实验动物国家标准中虽然尚未把螺杆菌列入检测项目, 但是一些实验动物生产或使用单位, 以及一些 CRO 公司都把螺杆菌列为筛查项目。

在螺杆菌检测方法研究方面, 分离培养法因其可靠直接而成为螺杆菌诊断检测的首选方法, 但因螺杆菌的生长条件苛刻, 而阻碍了该检测方法的应用。随着分子生物学技术的发展, PCR 检测技术因高效、快速简便等优点而被广泛应用于检测螺杆菌。实时荧光 PCR (real-time fluorescence PCR) 技术是在 PCR 扩增反应过程中加入荧光基团, 利用荧光信号累积实时检测整个 PCR 进程, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。它具有定量准确、灵敏度高、反应速度快、重复性好及 PCR 反应后不需电泳检测等优点。该技术自发明以来, 被广泛地应用于 DNA 或 RNA 绝对定量分析、基因表达差异分析和肿瘤基因检测等多个学科领域。本研究参照文献报道建立了多种螺杆菌 PCR 检测方法, 具有良好的特异性且敏感性良好。为了使这一先进的病原检测技术能更好地为生产服务, 特制定本检测方法标准。这一标准的制定, 对实验大小鼠的螺杆菌日常监测、流行病学调查及临床诊断都具有重要的实用意义。

第四节 编制原则

本标准的编制主要遵循以下原则: 一是科学性原则。在尊重科学、亲身实践、调查研究的基础上, 制定本标准。二是可操作性原则。本标准无论是从样品采集、处理、DNA

抽提、PCR 反应,均操作简单,仅需 4 小时既可完成。具有可操作性和实用性。三是协调性原则。以切实提高我国实验动物螺杆菌检测技术水平为核心,符合我国现行有关法律、法规和相关的标准要求。

第五节 内容解读

本标准由范围、规范性引用文件、术语、定义及缩略语、检测方法原理、主要设备和材料、试剂、检测方法、结果判定、检测过程中防止交叉污染的措施、附录共十章构成。现将《实验动物 螺杆菌 PCR 检测方法》主要技术内容确定说明如下:

一、本标准范围的确定

本标准规定了实验动物螺杆菌普通 PCR 和实时荧光 PCR 检测方法。本标准规定适用于实验动物及其产品、细菌培养物、实验动物环境和动物源性生物制品中螺杆菌的检测。

二、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。凡是注明日期的引用文件,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 19489 《实验室 生物安全通用要求》

GB/T 19495.2 转基因产品检测 实验室技术要求

三、术语、定义和缩略语

为方便标准的使用,本标准规定了以下术语、定义及缩略语

(一) 术语和定义

下列术语和定义适合于本标准。

1. 聚合酶链式反应 polymerase chain reaction, PCR

体外酶催化合成特异 DNA 片段的方法,模板 DNA 先经高温变性成为单链,在 DNA 聚合酶作用和适宜的反应条件下,根据模板序列设计的两条引物分别与模板 DNA 两条链上相应的一段互补序列发生退火而相互结合,接着在 DNA 聚合酶的作用下以四种 dNTP 为底物,使引物得以延伸,然后不断重复变性、退火和延伸这一循环,使欲扩增的基因片段以几何倍数扩增。

2. 实时荧光聚合酶链式反应 real-time PCR, 实时荧光 PCR

实时荧光 PCR 方法是在常规 PCR 的基础上,在反应体系中加入特异性荧光探针,利用荧光信号积累实时检测整个 PCR 进程,通过检测每次循环中的荧光发射信号,间接反映了 PCR 扩增的目标基因的量,最后通过扩增曲线对未知模板进行定性或定量分析。本标准中将“PCR”称为“普通 PCR”是为了与“实时荧光 PCR”进行区别,避免名称混淆。

3. Ct 值 cycle threshold

实时荧光 PCR 反应中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。

(二) 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

DNA 脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid)

PBS 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline)

四、检测方法原理

简要介绍了标准中采用的技术方法原理。用合适的方法提取样本中的螺杆菌 DNA, 针对螺杆菌 16sRNA 基因设计特异的引物序列, 通过 PCR 对模板 DNA 进行扩增, 根据 PCR 检测结果判定该样品中是否含有螺杆菌属核酸成分, 然后, 根据不同种的螺杆菌基因序列设计特异的种鉴别引物, 判定为哪一个种的螺杆菌。

实时荧光 PCR 方法是在常规 PCR 的基础上, 加入了一条特异性的荧光探针, 探针两端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团。探针完整时, 报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收; PCR 扩增时, *Taq* 酶的 5' → 3' 外切酶活性将探针酶切降解, 使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离, 淬灭作用消失, 荧光信号产生并被检测仪器接受, 随着 PCR 反应的循环进行, PCR 产物与荧光信号的增长呈对应关系。因此, 可以通过检测荧光信号对核酸模板进行检测。

五、主要设备和材料

规定了检测方法所需要的设备和材料。

六、试剂

规定了检测方法所需要的试剂。

1. 灭菌 PBS。配制方法在标准附录中给出。

2. DNA 抽提试剂: 基因组 DNA 提取试剂盒 DNeasy Blood & Tissue Kit (Qia-gen 公司, Cat.No.69504) 或其他等效产品。DNA 抽提试剂给出了具体的信息, 目的是为了更方便标准的使用者, 并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果, 则可以使用这些等效产品。

3. 无水乙醇。

4. PCR 试剂: Premix Taq TM (Version 2.0 plus dye) (Takara 公司, Cat.No.RR901A) 或其他等效产品。PCR 试剂均给出了具体的信息, 目的是为了更方便标准的使用者, 并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果, 则可以使用这些等效产品。

5. 实时荧光 PCR 试剂: TaqMan® Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific 公司, Cat.No. 4304437) 或其他等效产品。实时荧光 PCR 试剂均给出了具体的信息, 目的是为了更方便标准的使用者, 并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果, 则可以使用这些等效产品。

6. DNA 相对分子质量标准: 100~2000bp。

7. 50 × TAE 电泳缓冲液, 配制方法在标准附录中给出。

8. 溴化乙锭: 10mg/mL, 配制方法在标准附录中给出。或其他等效产品。

9. 1.5% 琼脂糖凝胶，配制方法在标准附录中给出。

10. 引物和探针：普通 PCR 引物设计参照参考文献（Feng，2005）。根据表 1 和表 2 的序列合成引物和探针，引物和探针加无灭菌去离子水配制成 10μmol/L 储备液，-20℃保存。

表 1 普通 PCR 检测引物

细菌	引物名称	引物序列（5'→3'）	产物大小（bp）
螺杆菌属 (<i>Helicobacter genus</i>)	H-F	CTATGACGGGTATCCGGC	780
	H-R	CTCACGACACGAGCTGAC	
肝螺杆菌 (<i>H. hepaticus</i>)	Hh-F	ATGGGTAAGAAAATAGCAAAAAGATTGCAA	705
	Hh-R	CTATTTTCATATCCATAAGCTCTTGAGAATC	
胆汁螺杆菌 (<i>H. bilis</i>)	Hb-F	ATGGAACAGATAAAGATTTTAAAGCAAACTTCAG	435
	Hb-R	CTATGCAAGTTGTGCGTTAAGCAT	
啮齿类螺杆菌 (<i>H. rodentium</i>)	Hr-F	TTGTGAAATGGAGCAAATCTTAAAACT	191
	Hr-R	TAGCCAGTTTGGCATTC	
小家鼠螺杆菌 (<i>H. muridarum</i>)	Hm-F	ATGACAAAAAATATCTTTTCACAAAACATTCATTGGT	807
	Hm-R	TTTATTTTAGATTCCATTTAACTGCTAAATCATCAATAGT	
盲肠螺杆菌 (<i>H. typhlonius</i>)	Ht-F	AGGGACTCTTAAATATGCTCCTAGAGT	122
	Ht-R	ATTCATCGTGTTGAATGCGTCAA	

表 2 实时荧光 PCR 检测引物和探针

细菌	引物和探针名称	引物和探针序列（5'→3'）	产物大小（bp）
肝螺杆菌 (<i>H. hepaticus</i>)	正向引物 AI89KFO_F	ACGGGTTGTGAAGCTTTTACTGATA	86
	反向引物 AI89KFO_R	CCTTGAGTGCGGATACAAATCG	
	探针 AI89KFO_M	FAM-AAGGCTACGCACATTCA-MGB-NFQ	

注：探针也可选用具有与 FAM 荧光基团相同检测效果的其他合适的荧光报告基团。

七、检测方法的确定

（一）生物安全措施

实验操作及处理按照 GB 19489 的规定，由具备相关资质的工作人员进行相应操作。

（二）采样及样本的处理

标准规定了动物脏器组织，胃内容物、盲肠内容物或粪便，细菌培养物，实验动物饲料、垫料和饮水，实验动物设施设备样本的采集及处理方法。

（三）样本 DNA 提取

规定了样本 DNA 的提取方法。

（四）普通 PCR

1. PCR 反应体系

PCR 反应体系见表 3。反应液的配制在冰上操作，每次反应同时设计阳性对照、阴性

对照和空白对照,其中阳性对照以含有螺杆菌的组织或培养物提取的 DNA 作为阳性对照模板,其中阴性对照以不含有螺杆菌 DNA 样本(可以是正常动物组织或正常培养物)作为阴性对照模板,空白对照即为不加模板对照(no template control, NTC),即在反应中用水来代替模板。除引物终浓度不变,PCR 反应体系根据选择的试剂进行确定。

表 3 每个样品反应体系配制表

反应组分	用量 (μL)	终浓度
2 × Premix Taq Mix (plus dye)	25	1 ×
Forward Primer (10 μmol/L)	2	400 nmol/L
Reverse Primer (10 μmol/L)	2	400 nmol/L
DNA 模板	10	
灭菌去离子水	11	
总体积	50	

2. PCR 反应参数

PCR 反应参数见表 4。

表 4 PCR 反应参数

步骤	温度	时间	循环数
预变性	94℃	5min	1
变性	94℃	1min	35
退火	55℃	1min	
延伸	72℃	1min	
延伸	72℃	10min	1

注:当使用其他等效的 PCR 检测试剂进行,反应体系和反应参数可做相应调整。

3. PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳检测和拍照

将适量 50 × TAE 稀释成 1 × TAE 溶液,配制含核酸染料溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶。PCR 反应结束后,取 10 μL PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳检测,以 DNA 分子量作参照。电压大小根据电泳槽长度来确定,一般控制在 3~5 V/cm,当上样染料移动到凝胶边缘时关闭电源。电泳完成后在凝胶成像系统拍照记录电泳结果。

(五) 实时荧光 PCR

1. 实时荧光 PCR 反应体系

实时荧光 PCR 反应体系见表 5。反应液的配制在冰上操作,每次反应同时设计阳性对照、阴性对照和空白对照,其中阳性对照以含有螺杆菌的组织或细胞培养物提取的 DNA 作为阳性对照模板,其中阴性对照以不含有螺杆菌 DNA 样品(可以是正常动物组织或正常细胞培养物)作为阴性对照模板,空白对照即为不加模板对照(no template control, NTC),即在反应中用水来代替模板。

表 5 每个样品反应体系配制表

反应组分	用量 (μL)	终浓度
2 × TaqMan universal PCR master mix	25	1 ×
正向引物 (10μmol/L)	2	400nmol/L
反向引物 (10μmol/L)	2	400nmol/L
探针 (10μmol/L)	1	200nmol/L
DNA 模板	2.5	
灭菌去离子水	17.5	
总体积	50	

2. 实时荧光 PCR 反应参数

实时荧光 PCR 反应参数见表 6。

表 6 实时荧光 PCR 反应参数

步骤	温度	时间	采集荧光信号	循环数
UNG 酶防污染	50℃	2min	否	1
预变性	95℃	10min	否	1
变性	95℃	15s		40
退火, 延伸	60℃	1min	是	

试验检测结束后, 根据收集的荧光曲线和 Ct 值判定结果。可使用其他等效的实时荧光 PCR 检测试剂盒进行, 反应体系和反应参数可做相应调整。

八、结果判定

(一) 普通 PCR

1. 质控标准

所有引物中, 阴性对照和空白对照未出现条带, 阳性对照出现相应大小 (各引物的扩增产物大小见表 1) 的目的扩增条带则表明反应体系运行正常, 否则此次试验无效, 需重新进行普通 PCR 扩增。

2. 结果判定

(1) 用螺杆菌属 (*Helicobacter* sp.) 特异引物检测被检样品出现 780bp 条带时, 判定为螺杆菌属核酸阳性, 否则为核酸阴性。

(2) 用肝螺杆菌 (*H. hepaticus*) 特异引物检测被检样品出现 705bp 条带时, 判定为肝螺杆菌核酸阳性, 否则为核酸阴性。

(3) 用胆汁螺杆菌 (*H. bilis*) 特异引物检测被检样品出现 435bp 条带时, 判定为胆汁螺杆菌核酸阳性, 否则为核酸阴性。

(4) 用啮齿类螺杆菌 (*H. rodentium*) 特异引物检测被检样品出现 191bp 条带时, 判定为啮齿类螺杆菌核酸阳性, 否则为核酸阴性。

(5) 用小家鼠螺杆菌 (*H. muridarum*) 特异引物检测被检样品出现 807bp 条带时, 判定为小家鼠螺杆菌核酸阳性, 否则为核酸阴性。

(6) 用盲肠螺杆菌 (*H. typhlonius*) 特异引物检测被检样品出现 122bp 条带时, 判定为盲肠螺杆菌核酸阳性, 否则为核酸阴性。

(二) 实时荧光 PCR

1. 结果分析和条件设定

直接读取检测结果, 基线和阈值设定原则根据仪器的噪声情况进行调整, 以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点为准。

2. 质控标准

(1) 空白对照无 Ct 值, 并且无荧光扩增曲线, 一直为水平线。

(2) 阴性对照无 Ct 值, 并且无荧光扩增曲线, 一直为水平线。

(3) 阳性对照 Ct 值应 ≤ 35 , 并且有明显的荧光扩增曲线, 则表明反应体系运行正常, 否则此次试验无效, 需重新进行实时荧光 PCR 扩增。

3. 结果判定

(1) 若待检测样品无荧光扩增曲线, 则判定样品未检出肝螺杆菌。

(2) 若待检测样品有荧光扩增曲线, 且 Ct 值应 ≤ 35 时, 则判断样品中检出肝螺杆菌。

(3) 若待检测样品 Ct 值介于 35 和 40 之间时, 应重新进行实时荧光 RT-PCR 检测。重新检测后, 若 Ct 值 ≥ 40 时, 则判定样品未检出肝螺杆菌。重新检测后的 Ct 值仍介于 35 和 40 之间, 则判定样品检出肝螺杆菌。

(三) 序列测定

必要时, 可取待检样本扩增出的阳性 PCR 产物进行核酸序列测定, 序列结果与已公开发表的螺杆菌特异性片段序列进行比对, 序列同源性在 90% 以上, 可确诊待检样本螺杆菌核酸阳性, 否则判定螺杆菌核酸阴性。

九、检测过程中防止交叉污染的措施

给出了检测过程中如何防止交叉污染的措施, 具体按照 GB/T 19495.2 中的要求执行。

九、附录 A

本标准附录为规范性附录, 给出了试剂的配制方法。

第六节 分 析 报 告

一、材料与方 法

(一) 菌株和临床样本

胆汁螺杆菌 (*H. bilis*, ATCC 51630)、肝螺杆菌 (*H. hepaticus*, ATCC 51449)、小家鼠螺杆菌 (*H. muridarum*, ATCC 51212)、嗜肺巴斯德杆菌 (ATCC35149) 购自美国典

型微生物菌种保藏中心；金黄色葡萄球菌（ATCC6538）、表皮葡萄球菌（ATCC12228）、铜绿假单胞菌（ATCC27853）、肺炎克雷伯菌（CMCC46117）、小肠结肠炎耶尔森菌（CMCC52207）、假结核耶尔森菌（CMCC53504）、乙型溶血性链球菌（CMCC32210）、甲型副伤寒沙门菌（CMCC50093）、大肠杆菌（ATCC25922）购自广东省微生物研究所；啮齿类动物螺杆菌（*H. rodentium*）、盲肠螺杆菌（*H. typhlonius*）、肺炎链球菌由本实验室分离保存。临床样本包括来源于2010~2014年本实验室收到广东、湖北、北京、四川、云南和上海等省市送检的活体大小鼠或粪便样本，无菌采集活体小鼠的盲肠内容物，-40℃保存，临床样本共161份。2014年本实验室收到广东省送检的SD大鼠，背景调查表明该SD大鼠曾饲养于普通环境，共52只。捕获于广州市某实验动物养殖场附近的野鼠25份，野鼠为褐家鼠，无菌采集活体大小鼠的盲肠内容物，-40℃保存，临床样本共计149份。

（二）引物设计合成

引物设计参照参考文献（Feng, 2005），引物由Invitrogen（广州）公司合成。引物序列见表1。

（三）细菌和样品核酸提取

纯化的细菌的核酸抽提直接按组织基因组提取试剂盒（Qiagen公司）操作说明书进行，在提取革兰氏阳性菌DNA之前，细菌经过溶菌酶37℃处理30min，然后再用组织基因组提取试剂盒进行核酸提取。盲肠内容物和粪便样品采用粪便基因组DNA提取试剂盒DP302-02（天根公司）进行核酸提取。

（四）螺杆菌PCR检测方法的建立

PCR试剂采用Takara公司的rTaq Premix，反应体系为20μL：DNA模板2μL，2×Premix Buffer（含Mg²⁺、dNTP、rTaq酶）10μL，上游引物（10μmol/L）1μL，下游引物（10μmol/L）1μL，补H₂O至20μL。反应条件：94℃ 5min，94℃ 1min、55℃ 1min、72℃ 1min，共35个循环，最后72℃延伸10min。反应完成后取5μL扩增产物，1.5%琼脂糖凝胶电泳，紫外灯下观察结果。

（五）特异性试验

采用建立的PCR方法对肝螺杆菌（*H. hepaticus*）、胆汁螺杆菌（*H. bilis*）、小家鼠螺杆菌（*H. muridarum*）、啮齿类动物螺杆菌（*H. rodentium*）、盲肠螺杆菌（*H. typhlonius*）、嗜肺巴斯德杆菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌（ATCC12228）、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、肺炎链球菌、小肠结肠炎耶尔森菌、假结核耶尔森菌、乙型溶血性链球菌、甲型副伤寒沙门菌和大肠杆菌DNA进行检测，验证该方法的特异性。

（六）敏感性试验

提取螺杆菌的DNA，经紫外分光仪定量后，分别稀释100ng/μL、10ng/μL、1ng/μL、100pg/μL、10pg/μL、1pg/μL、0.1pg/μL、0.01pg/μL DNA进行扩增，测定PCR方法的灵敏度。

（七）临床样本的检测

利用螺杆菌PCR方法对149份临床样本进行检测，每次反应同时设置阳性对照和阴性对照。

二、结果

(一) 螺杆菌 PCR 检测方法的建立

以肝螺杆菌、胆汁螺杆菌、小家鼠螺杆菌、啮齿类动物螺杆菌、盲肠螺杆菌基因组 DNA 为模板用各自引物进行 PCR 扩增, PCR 试剂采用 Takara 的 rTaq Premix, 反应体系为 20 μ L: DNA 模板 2 μ L, Premix Buffer 2 $\times$ (含 Mg^{2+} 、dNTP、rTaq 酶) 10 μ L, 上游引物 (10 μ mol/L) 1 μ L, 下游引物 (10 μ mol/L) 1 μ L, 补 H_2O 至 20 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}C$ 5min, 94 $^{\circ}C$ 1min、55 $^{\circ}C$ 1min、72 $^{\circ}C$ 1min, 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}C$ 延伸 10min。反应完成后取 5 μ L 扩增产物, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察结果。结果螺杆菌属、肝螺杆菌、胆汁螺杆菌、啮齿类动物螺杆菌、小家鼠螺杆菌、盲肠螺杆菌阳性样本分别在 780bp、705bp、435bp、191bp、807bp、122bp 位置有目的条带, 与预期结果相符 (图 1~图 6)。

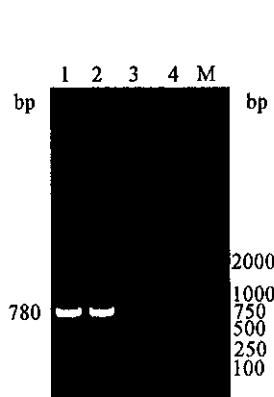


图 1 *Helicobacter* genus PCR 电泳结果

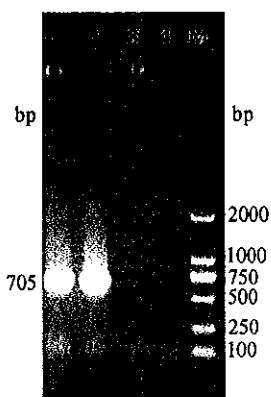


图 2 *H. hepaticus* PCR 电泳结果



图 3 *H. bilis* PCR 电泳结果

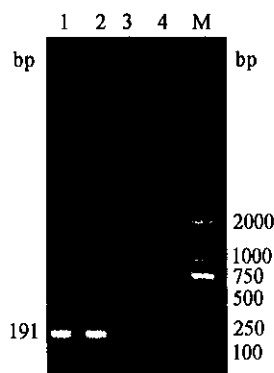


图 4 *H. rodentium* PCR 电泳结果

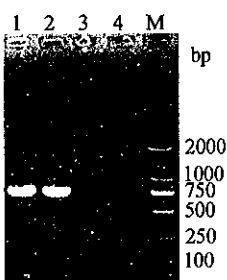


图 5 *H. muridarum* PCR 电泳结果

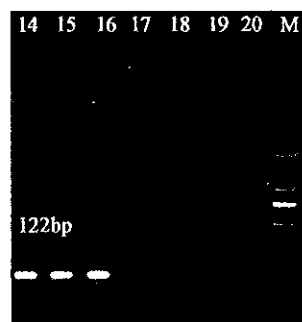


图 6 *H. typhlonius* PCR 电泳结果

(二) 螺杆菌 PCR 检测方法特异性试验

采用建立的 PCR 方法对肝螺杆菌 (*H. hepaticus*)、胆汁螺杆菌 (*H. bilis*)、小家鼠螺杆菌 (*H. muridarum*)、啮齿类动物螺杆菌 (*H. rodentium*)、盲肠螺杆菌 (*H. typhlonius*)、嗜肺巴斯德杆菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌 (ATCC12228)、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、肺炎链球菌、小肠结肠炎耶尔森菌、假结核耶尔森菌、乙型溶血性链球菌、甲型副伤寒沙门菌和大肠杆菌 DNA 进行检测, 验证该方法的特异性, 结果见图 7~ 图 12。



图 7 *Helicobacter* genus PCR 检测方法特异性试验结果图

M: DNA Marker DL2000; 1: *H. muridarum*; 2: *H. bilis*; 3: *H. rodentium*;
4: *H. typhlonius*; 5~18: 其他细菌

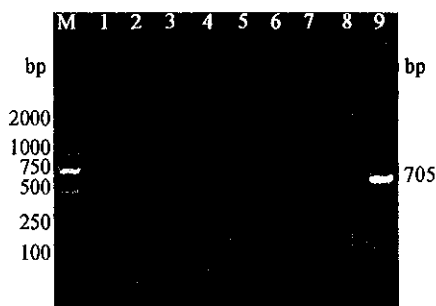


图 8 *H. hepaticus* PCR 检测方法特异性试验结果图

M: DNA Marker DL2000; 1: *H. muridarum*; 2: *H. bilis*; 3: *H. rodentium*;
4: *H. typhlonius*; 5: 大肠杆菌; 6: 金黄色葡萄球菌; 7: 嗜肺巴斯德杆菌;
8: 绿脓杆菌; 9: *H. hepaticus*

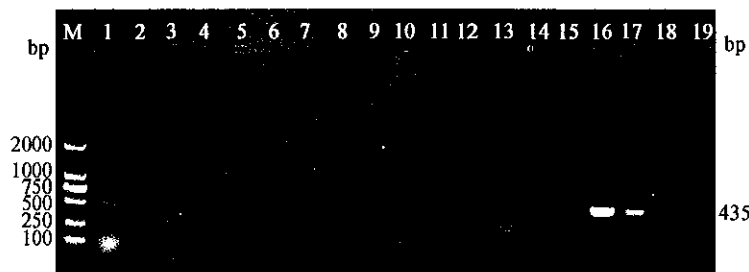


图 9 *H. bilis* PCR 检测方法特异性试验结果图

M: DNA Marker DL2000; 1~15 泳道: 其他细菌, 16 和 17 泳道: *H. bilis*;
18 和 19 泳道: 阴性对照



图 10 *H. muridarum* PCR 检测方法特异性试验结果图

M: DNA Marker DL2000; 1~15 泳道: 其他细菌, 16 和 17 泳道: *H. muridarum*;
18 和 19 泳道: 阴性对照



图 11 *H. rodentium* PCR 检测方法特异性试验结果图

M: DNA Marker DL5000; 1~5, 7~15 泳道: 其他细菌, 6 泳道: *H. rodentium*

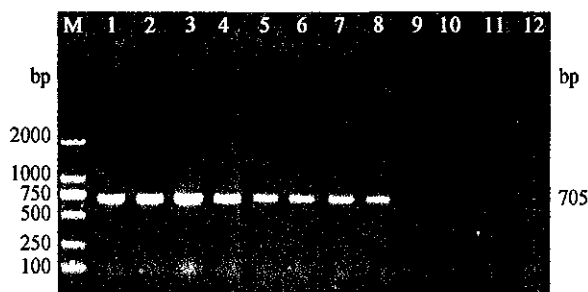


图 12 *H. typhlonius* PCR 检测方法特异性试验结果图

M: DNA Marker DL2000; 1~12 泳道: 其他细菌, 13 泳道: *H. typhlonius*; 14 和 15 泳道: 阴性对照

(三) *H. hepaticus* PCR 检测方法敏感性试验

构建 *H. hepaticus* 重组质粒, 将质粒标准品用 Easy dilution (Takara 公司) 做 10 倍系列稀释, 得到 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^0$ copies/ μ L 系列标准模板。按所建立方法进行检测, 测定模板最低检出量, 结果 *H. hepaticus* 敏感性分别为 1×10^2 copies/ μ L (图 13)。

图 13 *H. hepaticus* PCR 检测方法敏感性试验结果

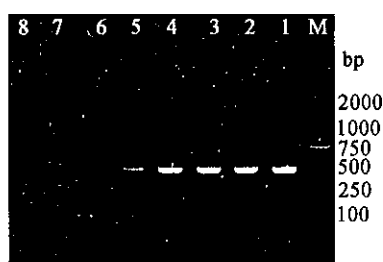
M: DNA Marker DL2000; 1~10: 1×10^9 copies/ μL ~ 1×10^0 copies/ μL 质粒 DNA; 11 和 12: NTC

(四) *H. bilis* PCR 检测方法敏感性试验

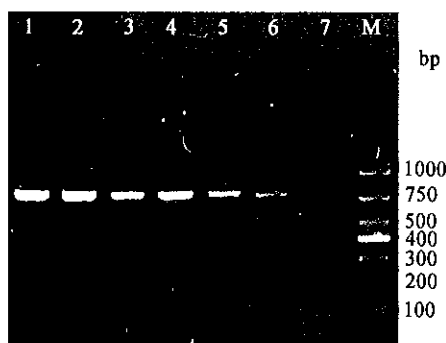
提取 *H. bilis* 的 DNA, 经紫外分光仪定量后, 分别稀释 100ng/ μL 、10ng/ μL 、1ng/ μL 、100pg/ μL 、10pg/ μL 、1pg/ μL 、0.1pg/ μL 、0.01pg/ μL DNA 进行扩增。结果可见 1pg/ μL 的 DNA 依然还有明显的目的条带 (图 14), 因此 *H. bilis* PCR 检测方法的最低检出量为 1pg/ μL 。

(五) *H. muridarum* PCR 检测方法敏感性试验

提取 *H. muridarum* 的 DNA, 经紫外分光仪定量后, 分别稀释 100ng/ μL 、10ng/ μL 、1ng/ μL 、100pg/ μL 、10pg/ μL 、1pg/ μL 、0.1pg/ μL 、0.01pg/ μL DNA 进行扩增。结果可见 1pg/ μL 的 DNA 依然还有明显的目的条带 (图 15), 因此 *H. muridarum* PCR 检测方法的最低检出量为 1pg/ μL 。

图 14 *H. bilis* PCR 检测方法敏感性试验结果

M: DNA Marker DL2000; 1: 100ng/ μL DNA; 2: 10ng/ μL DNA; 3: 1ng/ μL DNA; 4: 100pg/ μL DNA; 5: 10pg/ μL DNA; 6: 1pg/ μL DNA; 7: 0.1pg/ μL DNA; 8: 0.01pg/ μL DNA

图 15 *H. muridarum* PCR 检测方法敏感性试验结果

M: DNA Marker DL1000; 1: 100ng/ μL DNA; 2: 10ng/ μL DNA; 3: 1ng/ μL DNA; 4: 100pg/ μL DNA; 5: 10pg/ μL DNA; 6: 1pg/ μL DNA; 7: 0.1pg/ μL DNA

(六) *H. rodentium* PCR 检测方法敏感性试验

提取 *H. rodentium* 的 DNA, 经紫外分光仪定量后, 分别稀释 100ng/ μL 、10ng/ μL 、1ng/ μL 、100pg/ μL 、10pg/ μL 、1pg/ μL 、0.1pg/ μL 、0.01pg/ μL DNA 进行扩增。结果可见 1pg/ μL 的 DNA 依然还有明显的目的条带 (图 16), 因此 *H. rodentium* PCR 检测方法的最低检出量为 1pg/ μL 。

(七) *H. typhlonius* PCR 检测方法敏感性试验

提取 *H. typhlonius* 的 DNA, 经紫外分光仪定量后, 分别稀释 100ng/μL、10ng/μL、1ng/μL、100pg/μL、10pg/μL、1pg/μL、0.1pg/μL、0.01pg/μL DNA 进行扩增。结果可见 1pg/μL 的 DNA 依然还有明显的目的条带 (图 17), 因此 *H. typhlonius* PCR 检测方法的最低检出量为 1pg/μL。

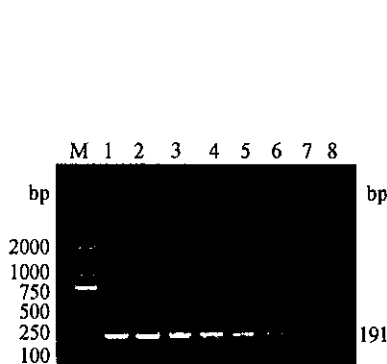


图 16 *H. rodentium* PCR 检测方法敏感性试验结果

M: DNA Marker DL2000; 1: 100ng/μL DNA; 2: 10ng/μL DNA; 3: 1ng/μL DNA; 4: 100pg/μL DNA; 5: 10pg/μL DNA; 6: 1pg/μL DNA; 7: 0.1pg/μL DNA; 8: 0.01pg/μL DNA

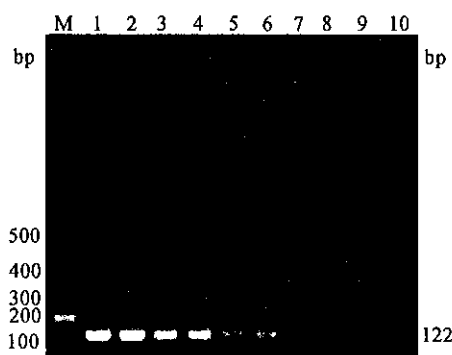


图 17 *H. typhlonius* PCR 检测方法敏感性试验结果

M: DNA Marker DL500; 1: 100ng/μL DNA; 2: 10ng/μL DNA; 3: 1ng/μL DNA; 4: 100pg/μL DNA; 5: 10pg/μL DNA; 6: 1pg/μL DNA; 7: 0.1pg/μL DNA; 8: 0.01pg/μL DNA, 9 和 10. NTC

(八) 螺杆菌 PCR 检测方法的临床应用

临床样本检测结果见表 7, 结果表明 SPF 级大小鼠中螺杆菌感染率很高, 而且多数是多重混合感染, SPF 级大小鼠中未检测到胆汁螺杆菌和小家鼠螺杆菌, 但是在普通环境下饲养的 SD 大鼠和野鼠中有检测到。

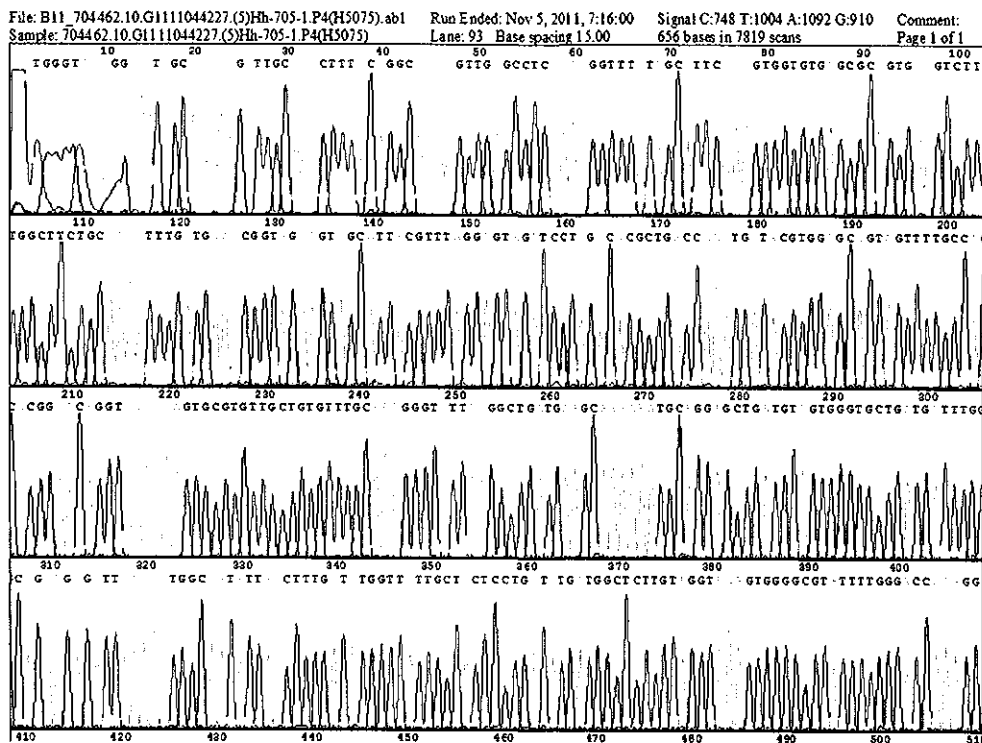
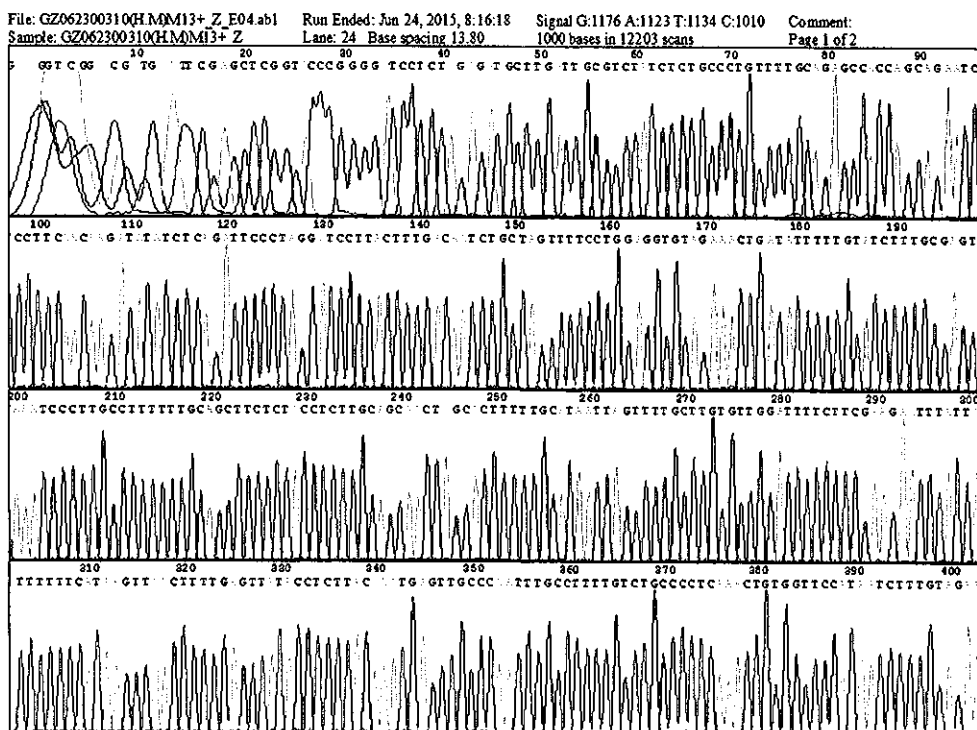
表 7 PCR 临床样本检测结果

项目	阳性数 / 样本数 (检出率)			
	SPF 级大小鼠	普通环境下饲养的 SD 大鼠	野鼠	合计
<i>Helicobacter genus</i>	103/161	nd	nd	103/161
<i>H. hepaticus</i>	81/161	nd	nd	81/161
<i>H. bilis</i>	0/72	5/52	1/25	6/149
<i>H. muridarum</i>	0/72	0/52	2/25	2/149
<i>H. rodentium</i>	83/161	nd	nd	83/161
<i>H. typhlonius</i>	43/161	nd	nd	43/161

注: nd 表示未做

(九) 测序验证

采用测序方法对临床阳性样本进行测序验证, 进一步验证检测方法有效性结果见图 18~ 图 22。

图 18 *H. hepaticus* 测序验证图谱图 19 *H. muridarum* 测序验证图谱

File: D02_704462.18.G1111044235.(9)Hr-191-1.P6(H5077).ab1 Run Ended: Nov 5, 2011, 15:58:14
 Signal C:1368 T:2658 A:1808 G:1652 Comment:
 Sample: 704462.18.G1111044235.(9)Hr-191-1.P6(H5077) Lane: 10 Base spacing 15.23
 140 bases in 1727 scans Page 1 of 1

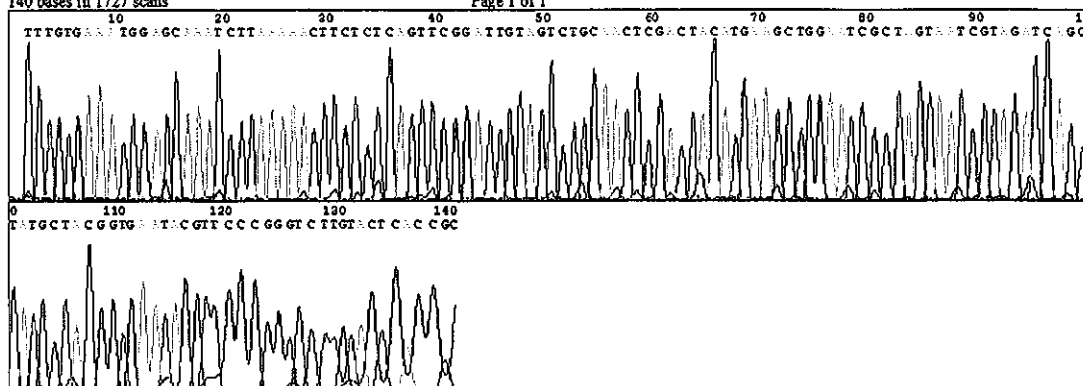
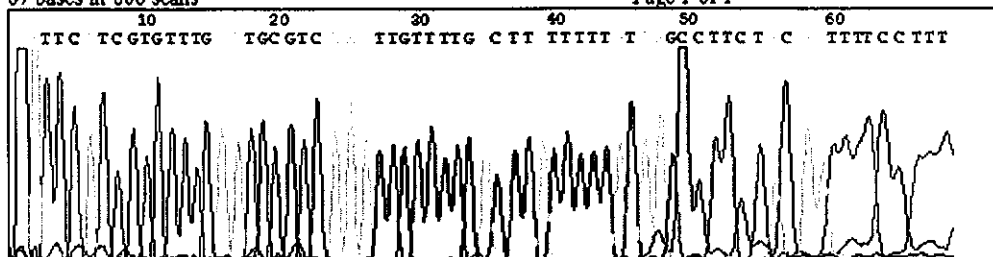


图 20 *H. rodentium* 测序验证图谱

File: D05_704462.23.G1111044240.(12)Ht-122-1.P7(H5078).ab1 Run Ended: Nov 5, 2011, 15:58:14
 Signal C:981 T:2322 A:1483 G:878 Comment:
 Sample: 704462.23.G1111044240.(12)Ht-122-1.P7(H5078) Lane: 41 Base spacing -16.16
 67 bases in 806 scans Page 1 of 1



File: D06_704462.24.G1111044241.(12)Ht-122-1.P8(H5079).ab1 Run Ended: Nov 5, 2011, 15:58:14
 Signal G:395 A:1110 T:890 C:586 Comment:
 Sample: 704462.24.G1111044241.(12)Ht-122-1.P8(H5079) Lane: 42 Base spacing 16.16
 74 bases in 902 scans Page 1 of 1

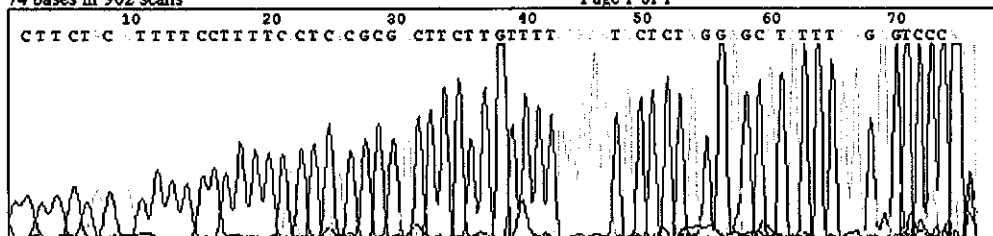


图 21 *H. typhlonius* 测序验证图谱

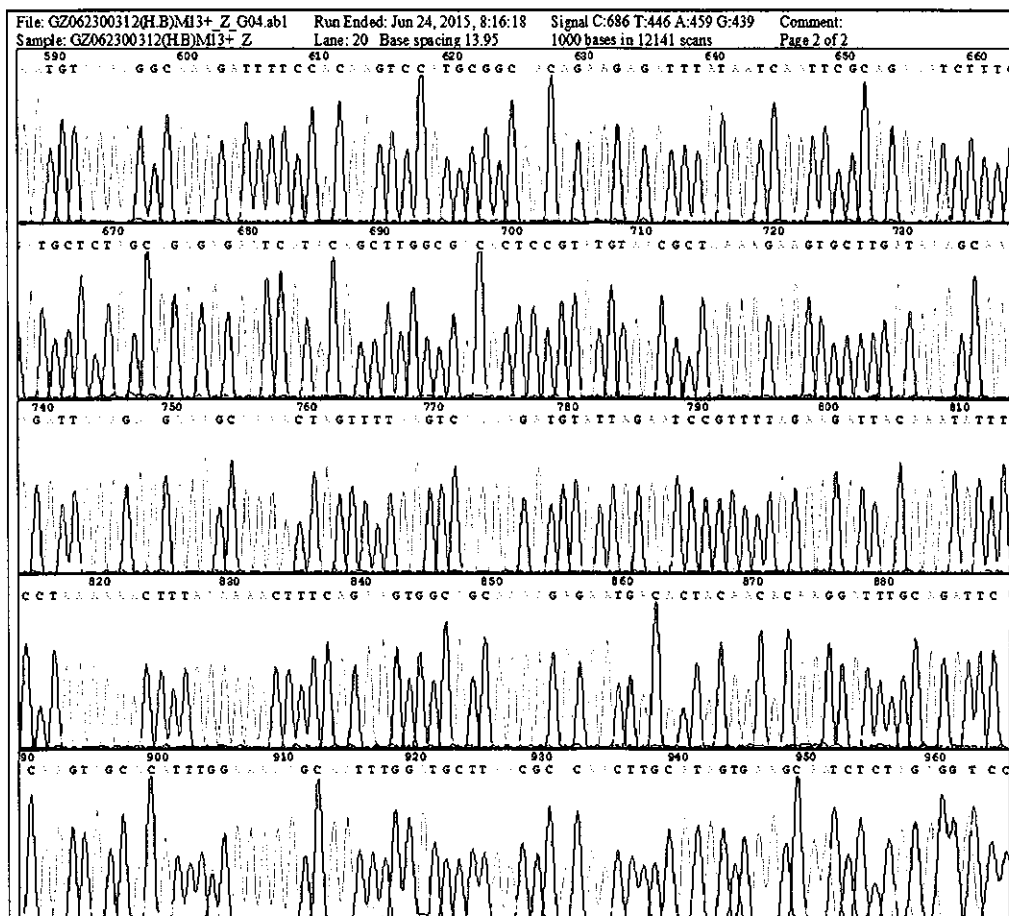


图 22 *H. bilis* 测序验证图谱

第七节 国内外同类标准分析

本标准为国内原创标准，国际上无类似标准。

第八节 与法律法规、标准关系

本标准按 GB/T 1.1—2009 规则和实验动物标准的基本结构编写，与实验动物标准体系协调统一；本标准与《实验动物管理条例》、《实验动物质量管理办法》等国家相关法规和实验动物强制性标准的规定和要求协调一致。目前实验动物国家标准没有螺杆菌普通 PCR 和实时荧光 PCR 检测方法标准，本标准作为团体标准是对现有标准的有利补充。

第九节 重大分歧的处理和依据

从标准结构框架和制定原则的确定、标准的引用、有关技术指标和参数的试验验证、主要条款的确定直到标准草稿征求专家意见（通过函寄和会议形式多次咨询和研讨），均未出现重大意见分歧的情况。

第十节 作为推荐性标准的建议

本标准发布实施后作为推荐性标准使用。

第十一节 标准实施要求和措施

本标准发布实施后，建议通过培训班、会议宣传和网络宣传等形式积极开展宣贯培训活动。面向各行业开展动物实验的机构和个人，宣传贯彻标准内容。

第十二节 本标准常见知识问答

一、普通 PCR 和实时荧光 PCR 检测结果不一致时如何判定？

本标准中普通 PCR 和实时荧光 PCR 检测方法都是病原学检测方法，可以适用于实验动物及产品、实验动物接种物和环境等样本的检测。可根据实验室的条件，选择其中一种或两种方法进行检测，实时荧光 PCR 检测方法采用闭管检测分析，可以减少检测过程的污染风险。在实际应用中，当普通 PCR 检测为阳性时，可以采用实时荧光 PCR 方法进行确证。如果两种方法检测结果不一致时，可通过测序方法进行最终验证，即取待检样本扩增出的阳性 PCR 产物进行核酸序列测定，序列结果与已公开发表的螺杆菌特异性片段序列进行比对，序列同源性在 90% 以上，可确诊待检样本螺杆菌阳性，否则判定螺杆菌阴性。

二、什么是 PCR 假阳性，产生假阳性的原因是什么？

假阳性是指对实验材料中阴性目的物检测反而得到阳性结果的现象。如果一次实验中的几个阴性对照中出现一个或几个阳性结果，提示本次实验中其他标本的检测结果可能有假阳性。假阳性主要来源于样本采集、处理、PCR 过程中的污染，造成假阳性的原因主要如下。

（1）样品间交叉污染：非一次性采样器具由于之前采样的痕量残留物含有本次检测的目的核酸而污染本次样品，造成假阳性。盛放样品器具密封不严造成样品间的污染样本污染。样本核酸模板在提取过程中，由于吸样枪污染导致标本间污染。有些微生物标本尤其是病毒可随气溶胶或形成气溶胶而扩散，导致彼此间的污染。

(2) PCR 试剂的污染：主要是由于在 PCR 试剂配制过程中，由于加样枪、容器、双蒸水及其他溶液被 PCR 核酸模板污染。

(3) PCR 扩增产物污染：由于 PCR 产物拷贝量大，远远高于 PCR 检测数个拷贝的极限，所以极微量的 PCR 产物污染，就可形成假阳性，这是 PCR 反应中最常见的污染问题。

还有一种容易忽视，最可能造成 PCR 产物污染的形式是气溶胶污染，空气与液体面摩擦时可形成气溶胶，在操作时比较剧烈地摇动反应管，开盖时、吸样时及污染进样枪的反复吸样都可形成气溶胶而污染。气溶胶造成的污染是造成假阳性的主要原因。

(4) 克隆质粒的污染：常见于用克隆质粒做阳性对照的实验室。由于克隆质粒在单位容积内含量相当高，另外在纯化过程中需用较多的用具及试剂，而且在活细胞内的质粒，由于活细胞的生长繁殖的简便性及具有很强的生命力，其污染可能性也很大。

三、如何控制 PCR 假阳性？

(1) 在 PCR 检测时，每次都要设立阴性对照样品和阳性对照样品对检测参数进行参比对照。只有在阴性对照样品和阳性对照样品检测结果成立的前提下，才能对检测样品进行结果判定。

(2) 合理分隔实验室：将样品的处理、配制 PCR 反应液、PCR 扩增及 PCR 产物鉴定等步骤分区或分室进行，特别注意样本处理及 PCR 产物的鉴定应与其他步骤严格分开，最好能划分。合理的 PCR 实验室应分为标本处理及核酸抽提区、PCR 反应液制备区、PCR 扩增区和 PCR 产物鉴定区。各区使用的仪器、设备、耗材和工作服应独立专用，实验前应将实验室用紫外线消毒以破坏残留的 DNA 或 RNA。

(3) 规范试剂耗材管理：新购买的试剂需进行实验前验证。PCR 试剂可选择小量分装储存，避免污染。试验过程中所用的一次性塑料耗材，如吸头、离心管、八连管等均应采购无核酸酶的并且使用前进行高温高压处理。塑料器皿用 0.1% DEPC 水浸泡 4h 后高温高压处理分解 DEPC。玻璃仪器或金属器具使用前须 180℃ 高温干烤 6h 以上。

(4) 采用 UNG 酶防止污染：由于 PCR 产物是最常见的污染源，为避免以前检测中所产生的扩增产物的污染，可在 PCR 试剂中以 dUTP 取代 dTTP，因此 PCR 产物都是含有 dU 的 DNA 链。在 PCR 开始前增加 50℃ 的保温步骤，UNG 酶即可将反应体系中已有的 U-DNA 污染物中的尿嘧啶碱基降解，并在随后变性这步的条件下 DNA 链断裂，消除由于污染 DNA 产生的扩增，从而保证扩增结果的特异性，准确性。同时 UNG 酶被灭活，不会再降解新扩增的产物 U-DNA。

(5) 操作人员应经过专业培训，具有一定经验和操作技能，必须严格按照质量体系规定的检测标准和检测方法操作。

四、什么是 PCR 假阴性，产生假阴性的原因是什么？

假阴性是指实验中设置的阳性对照未能扩增呈阳性结果现象，但这里应注意，阳性对照应该包含样品核酸提取和 PCR 扩增步骤。因此，如果未在样品的核酸提取步骤设置了阳性对照，而恰好在该步骤存在问题，即使阳性对照均呈阳性，样品检测中还可能假阴性。造成 PCR 假阴性问题的原因较为复杂，概括起来有：

- (1) 仪器因素: PCR 仪孔间差异或控温不准, 引起扩增失败或扩增效率降低。
- (2) 试剂因素: 核酸抽提试剂、引物和 PCR 扩增试剂质量问题导致扩增失败。
- (3) 采样因素: 不合理的样本采集、转运及处理、样本中微生物滴度过低均有可能导致假阴性结果。
- (4) 核酸模板因素: 模板中存在 PCR 抑制剂, 如杂蛋白质、多糖、酚等抑制物; 容器中存在 RNA 酶导致 RNA 降解。
- (5) 靶序列变异因素: 待测靶序列的变异或其他原因导致的序列改变, 影响引物与模板特异性结合, 可能会导致假阴性结果。
- (6) 操作人员因素: PCR 实验的环节很多, 而且对每一环节的质量要求都很高, 例如少加、漏加试剂、离心不充分、反应参数设计错误等都能造成结果的假阴性。

五、如何控制 PCR 假阴性?

- (1) 在 PCR 检测时, 每次都要设立阴性对照样品和阳性对照样品对检测参数进行参比对照。只有在阴性对照样品和阳性对照样品检测结果成立的前提下, 才能对检测样品进行结果判定。此外设置合理的内对照(内标)是判断假阳性的有效手段, 内对照必须覆盖样品处理、核酸抽提、PCR 扩增和产物检测全过程。
- (2) 定期监测 PCR 仪, 出现问题应及时进行维护并校准。
- (3) 新购买的试剂和引物需进行实验前验证, 试剂应合理保存并分装使用, 防止酶失活, 避免反复冻融。
- (4) 严格处理样品程序, 核酸提取过程中尽量去除可能干扰或抑制 PCR 反应的物质。可采用稀释或再纯化模板 DNA 方法, 进行扩增分析, 减少假阳性发生。
- (5) 操作人员应经过专业培训, 具有一定经验和操作技能, 必须严格按照质量体系规定的检测标准和检测方法操作。

参 考 文 献

- Feng S, Kendall LV, Hodzic E, et al. 2004. Recombinant *Helicobacter bilis* protein P167 for mouse serodiagnosis in a multiplex microbead assay. *Clin Diagn Lab Immunol*, 11: 1094-1099.
- Feng S, Ku K, Hodzic E, et al. 2005. Differential detection of five mouse-infecting *helicobacter* species by multiplex PCR. *Clin Diagn Lab Immunol*, 12: 531-536.
- Fox JG, Dewhirst FE, Tully JG, et al. 1994. *Helicobacter hepaticus* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice. *J Clin Microbiol*, 32: 1238-1245.
- Fox JG, Yan L, Shames B, et al. 1996. Persistent hepatitis and enterocolitis in germfree mice infected with *Helicobacter hepaticus*. *Infect Immun*, 64: 3673-3681.
- Livingston RS, Riley LK, Hook RR Jr, et al. 1999. Cloning and expression of an immunogenic membrane-associated protein of *Helicobacter hepaticus* for use in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol*, 6: 745-750.
- Ward JM, Fox JG, Anver MR, et al. 1994b. Chronic active hepatitis and associated liver tumors in mice caused by a persistent bacterial infection with a novel *Helicobacter* species. *J Natl Cancer Inst*, 86: 1222-1227.