

分子实验室设计及RT-qPCR技术 在微生物检测中的应用

良润生物 刘磊

liulei@longrunbio.com



目 录

分子实验室建设

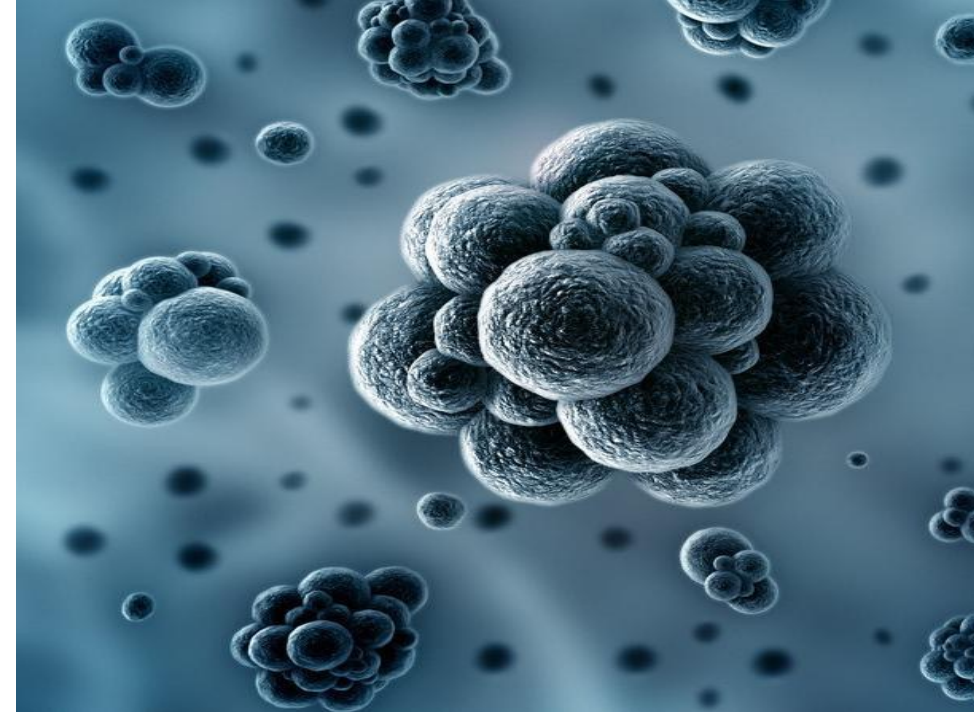
荧光定量PCR技术



分子检测的可以实现的项目



致病菌



病毒



动物疫病

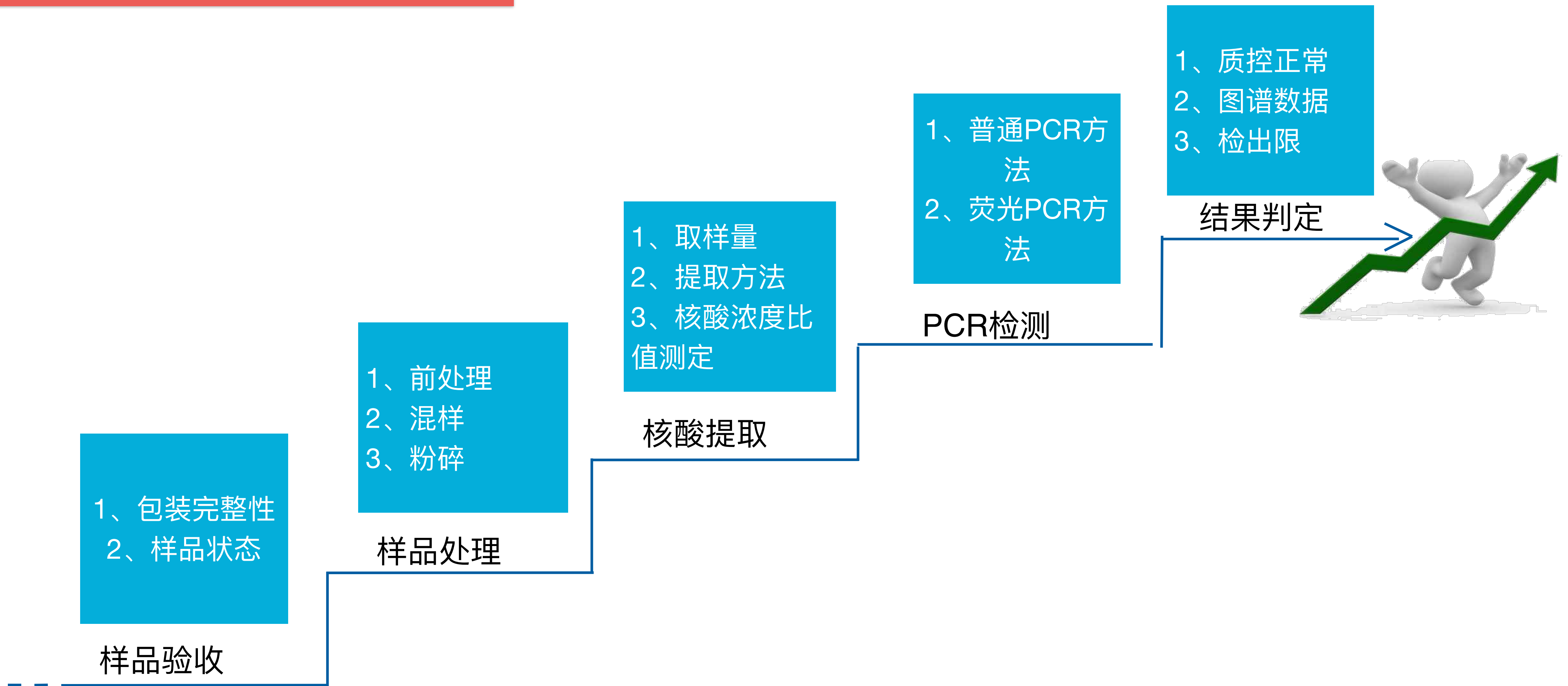


转基因



掺假肉

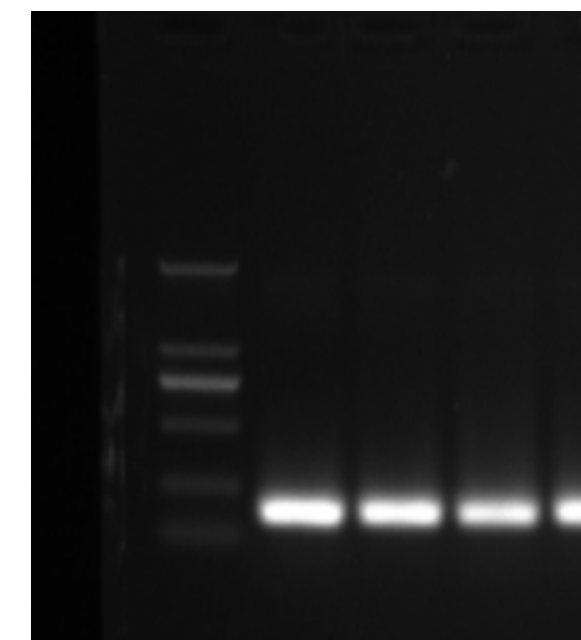
分子检测的流程



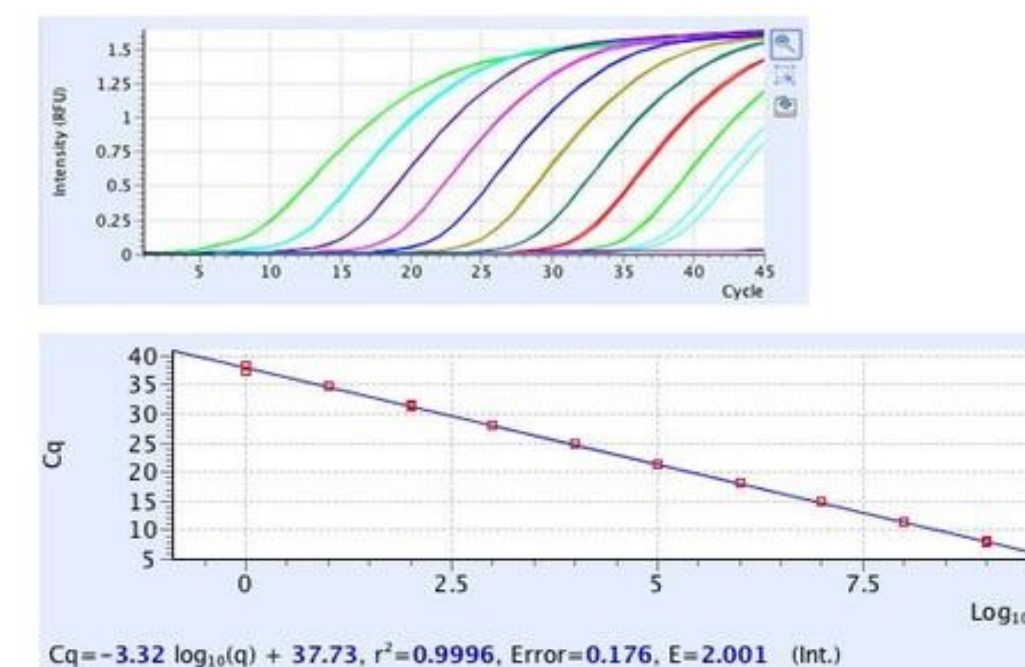
分子检测的流程



普通PCR、电泳、成像、图谱



实时荧光PCR、图谱



分子检测实验室检测参考标准

标准号	标准名称	标准号	标准名称
GB 19489-2008	实验室生物安全通用要求	SN/T 2102.2- 2008	食源性病原体PCR 检测技术规范 第2 部分： PCR 仪性能试验要求
GB/T 27025-2008	检测和校准实验室能力的通用要求	SN/T 2102.3-2008	食源性病原体PCR 检测技术规范 第3 部分：定 性检测方法样品制备要求
GB/T 19495.1-2004	转基因产品检测 通用要求和定义	SN/T 2102.4-2008	食源性病原体PCR 检测技术规范 第4 部分：定 性检测方法扩增和检测要求
GB/T 19495.2-2004	转基因产品检测 实验室技术要求	SN/T 2965-2011	植物病原真菌分子生物学检测规范
GB/T 19495.3-2004	转基因产品检测 核酸提取纯化方法	SN/T 2964-2011	植物病毒检测规范
GB/T 19495.4-2004	转基因产品检测 核酸定性PCR检测 方法	SN/T3767.1-2014	出口食品中转基因成分环介导等温扩增 (LAMP) 检测方法 第 1 部分：通用要求和定义

分子检测实验室检测参考标准

GB/T 19495.5-2004	转基因产品检测 核酸定量PCR检测方法	SN/T 1194-2014	植物及其产品转基因成分检测抽样和制样方法
GB/T 19495.6-2004	转基因产品检测 基因芯片检测方法	NY/T 672-2003	转基因植物及其产品检测 通用要求
GB/T 19495.7-2004	转基因产品检测 抽样和制样方法	农业部 2259 号公告-13-2015	转基因植物试验安全控制措施 第1部分：通用要求
GB/T 19495.8-2004	转基因产品检测 蛋白质检测方法	农业部 2259 号公告-19-2015	转基因生物良好实验室操作规范 第1部分：分子特征检测
GB/T 27403-2008	实验室质量控制规范 食品分子生物学检测	农业部 2259 号公告-5-2015	转基因植物及其产品成分检测 实时荧光定量PCR方法制定指南
SN/T 2102.1-2008	食源性病原体PCR 检测技术规范 第1部分：通用要求和定义	农业部 2259 号公告-4-2015	转基因植物及其产品成分检测 定性PCR方法制定指南
		卫办医政发〔2010〕194号	医疗机构临床基因扩增管理办法

分子检测的分区要求

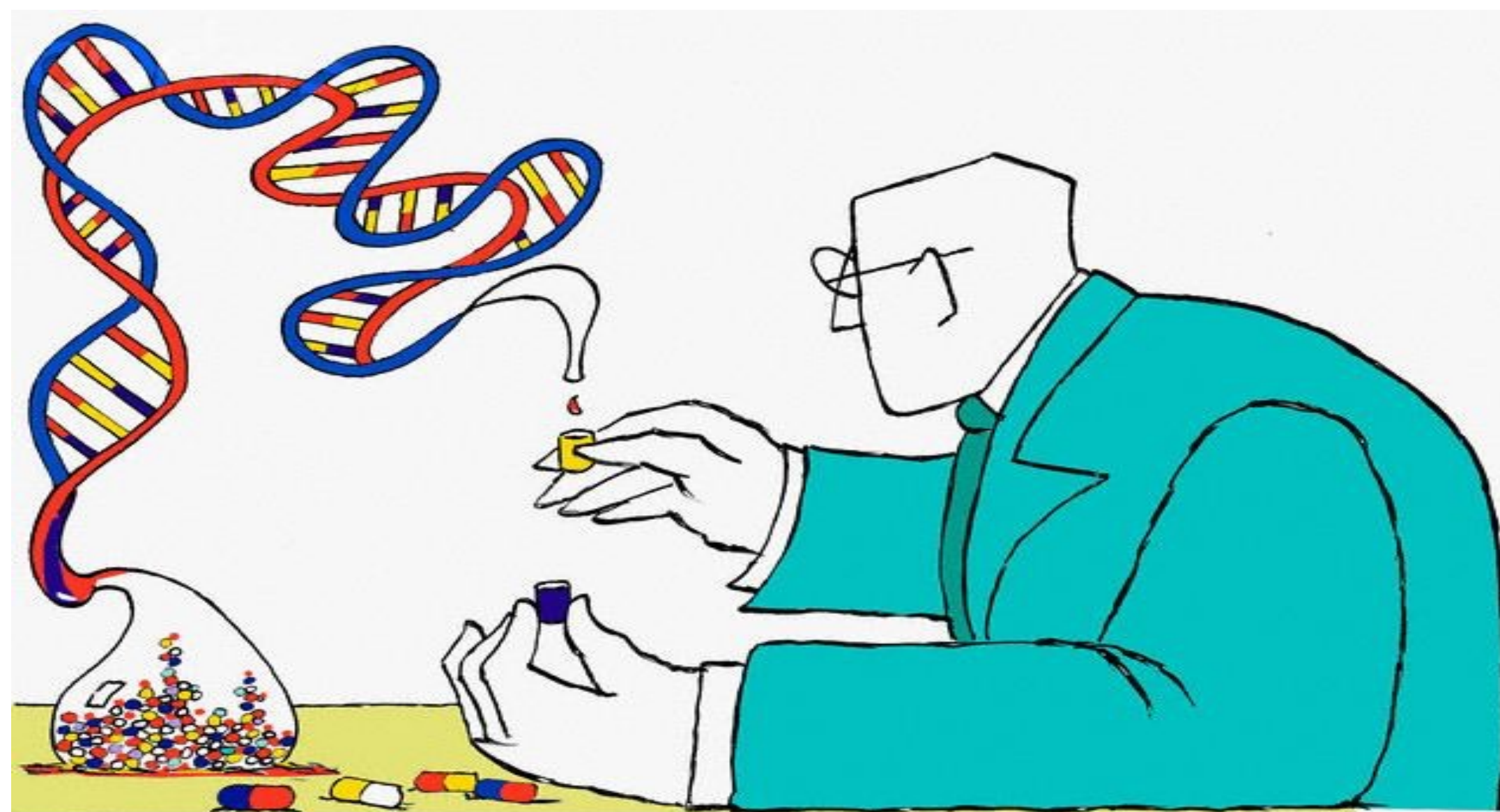
样品制备区

试剂储存和
准备区

核酸制备区

扩增区

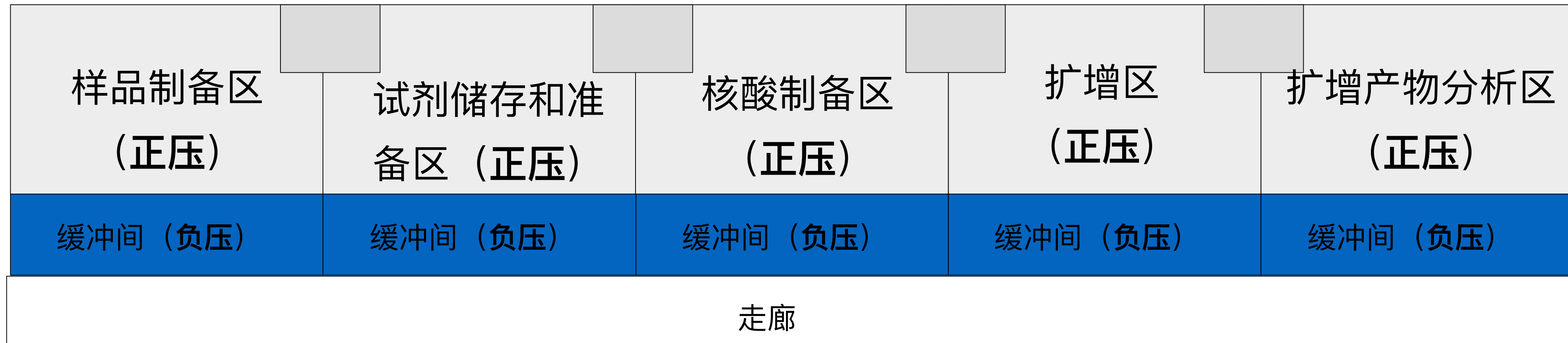
扩增产物分
析区



分子检测的分区要求

有缓冲间

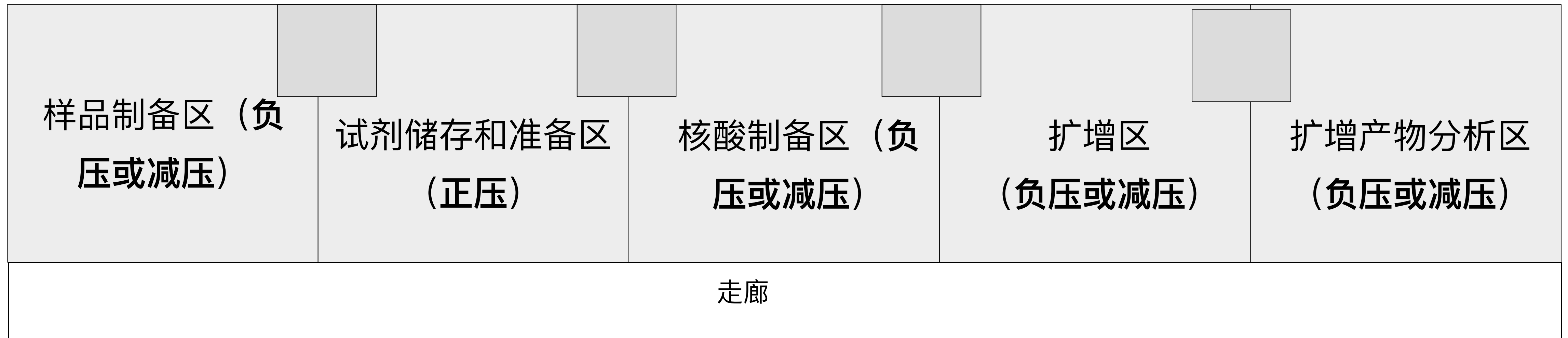
各分隔的工作区域设置缓冲间，缓冲间的压力为负压，与其相连的工作间为正压，工作间与缓冲间之间宜安装磁性连锁装置



分子检测的分区要求



未设置缓冲间的工作区域的压力设计一般遵循试剂配制与贮存区为正压，其它工作区域为负压或减压的原则



样品制备区



样品的混样、粉碎制备



该区应与其他区域严格隔离，该区的人员不得进入其它区域



应有独立的排风系统，及时排除阳性污染



房间内部应有封闭的样品储存间，储存样品



样品接收时应包装完好，无破损，记录样品的性状，最好拍照片



所有的制样工具应彻底清洗灭菌，防止交叉污染



相关设备：冰箱、展示柜、天平、冻干机、粉碎机、均质器、**吸尘器**

试剂存储及和准备区



所有试剂的储存、配制和分装

内部可分3个区域

普通提取试剂的准备区

- 核酸提取所需试剂, 裂解液
- 其它试剂电泳缓冲液

PCR试剂准备区

- PCR反应试剂的溶解、配制、分装, 如引物、探针等

PCR反应液准备区

- 除模版外的反应混合液配制, 并分装到PCR管中

试剂存储及和准备区

- ✓ 不得将其他房间材料或工具带到该区，避免污染
- ✓ 试剂必须进行验收工作，做好登记，并贴好试剂标签
- ✓ 分装工作液，避免交叉污染，例如引物、PCR预混液、反应酶等关键试剂
- ✓ 试剂的储存应分区域、按要求储存
- ✓ 相关设备：冰箱、展示柜、天平、离心机、涡旋仪、移液器

核酸制备区



核酸的提取、纯化、储存；含量的测定；样品DNA的保存



冷冻离心机、恒温金属浴、核酸蛋白仪、生物安全柜、移液器、冰箱、洗眼器



应有独立的排风系统，防止核酸溢出

内部可分3个区域

核酸提取纯化区

- DNA提取与RNA提取区域应分开
- 移液器专区专用

模板加样区

- 样品DNA加入PCR管后应及时盖紧盖子
- 阳性对照与待测样本分开操作
- 加模版时应在超净台（生物安全柜）进行，气流方向垂流式

样品DNA储存区

- 样品DNA与阳性标品DNA分开存放

扩增区域



荧光定量PCR扩增、普通PCR扩增



该区域禁止无关人员进入，并减少人员走动



荧光定量PCR仪、普通PCR仪、离心机、PCR操作台、涡旋仪、移液器、冰箱



应有独立的排风系统，防止核酸溢出

内部可分2个区域

普通PCR区域

•普通PCR

荧光定量PCR区域

•荧光定量PCR

产物分析区



PCR扩增产物电泳、酶切、测序等



尽量分割成小房间，专用于电泳、成像、酶切、测序等工作



该区域禁止无关人员进入，并减少人员走动



应有独立的排风系统，防止核酸溢出



此区域为主要的污染区，禁止任何工具设备带出到其它操作区



电泳槽和电泳仪、凝胶成像系统、金属浴、涡旋仪、移液器、洗板机、冰箱

内部可分3个区域

电泳分析区

酶切分析区

测序分析区

分子实验室的其他要求



实验室二级生物安全实验室标识



实验室应有限制进入的措施，应控制非实验人员进入或使用可能会影响检验质量的区域



各区域应有明确的标识，并且不能直通，各区域间应设置传递窗



分子实验室的其他要求



建筑结构：阴角，均采用圆弧线条密封，窗户也密封



每个区域的顶部应该是平的，并且安装紫外灯，波长为254nm，安装数量为一只40W的每20平方米，等于地面距离不应超过2.0m +_0.1m；也可安装可移动的紫外灯



分子实验室的其他要求



应有妥善处理废弃样品和有害废弃物的设施和制度，如EB



注意实验人员的安全防护，洗眼器、护目镜、淋浴

— 有毒有害及废弃物质的处理

※ 移液器吸头

使用过的移液器吸头应放入含有**10%次氯酸钠**溶液的容器内浸泡，浸泡时间不宜少于**24 h**。

※ PCR产物

含有PCR产物的所有液体及废弃物应放入含有**1 mol/L HCl**的容器中浸泡，浸泡时间不宜少于**6 h**；采用PCR-ELISA方法检测时洗板机洗板所产生的废液应收集至**1 mol/L HCl**溶液中。

※ 琼脂糖凝胶及电泳液

对含有EB或经EB浸泡过的琼脂糖凝胶、电泳缓冲液的处理参见《分子克隆》。

※ 阳性样品和质粒

阳性质粒宜放入**1 mol/L HCl**溶液中浸泡，浸泡时间不宜少于**6 h**。

分子实验室的其他要求



人员

实验室最好制定相应的良好操作规范，找出实验流程中关键控制点，对员工进行细致培训，培训包括操作培训（移液器的使用、PCR仪的使用等），检测方法的培训。实验室的操作人员应具备良好的分子生物学专业技术操作技能



试剂的要求

所有试剂应为不含DNA和DNA酶的分析纯试剂
实验用水应符合GB/T6682一级水的规格。去离子水的电阻应达到18.2欧姆
对菌株、质粒等的储存，符合相关要求



过程质量控制

空白对照、阴性质控对照、过程控制对照等

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1870—2016
替代 SN/T 1870—2007

出口食品中食源性致病菌检测方法 实时荧光 PCR 法

Method for the detection of pathogens in food for export—
Real-time PCR method

GB

中华人民共和国国家标准

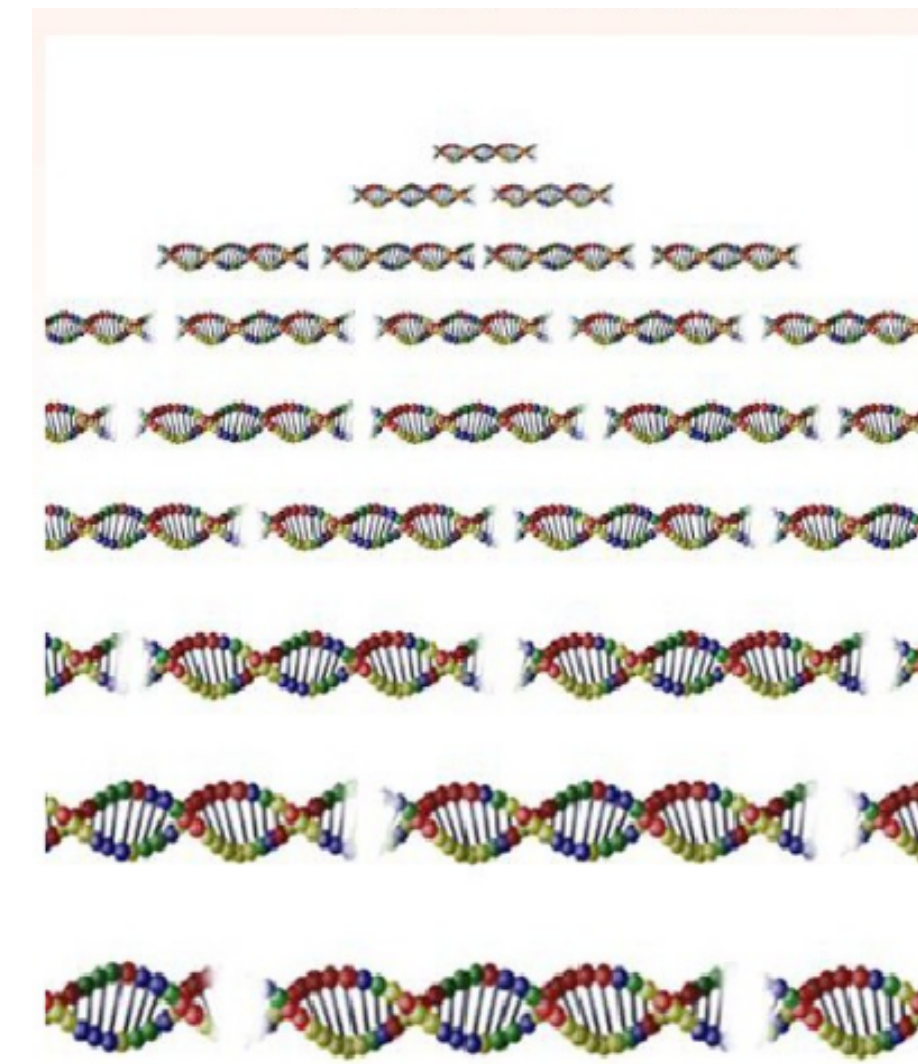
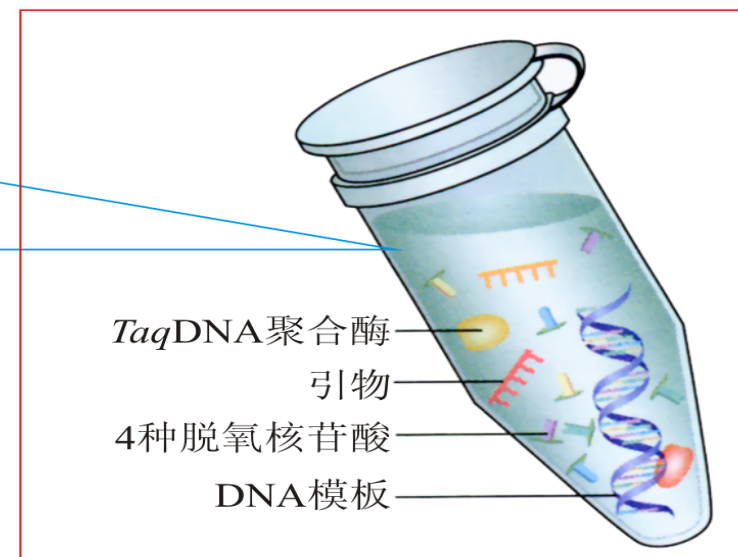
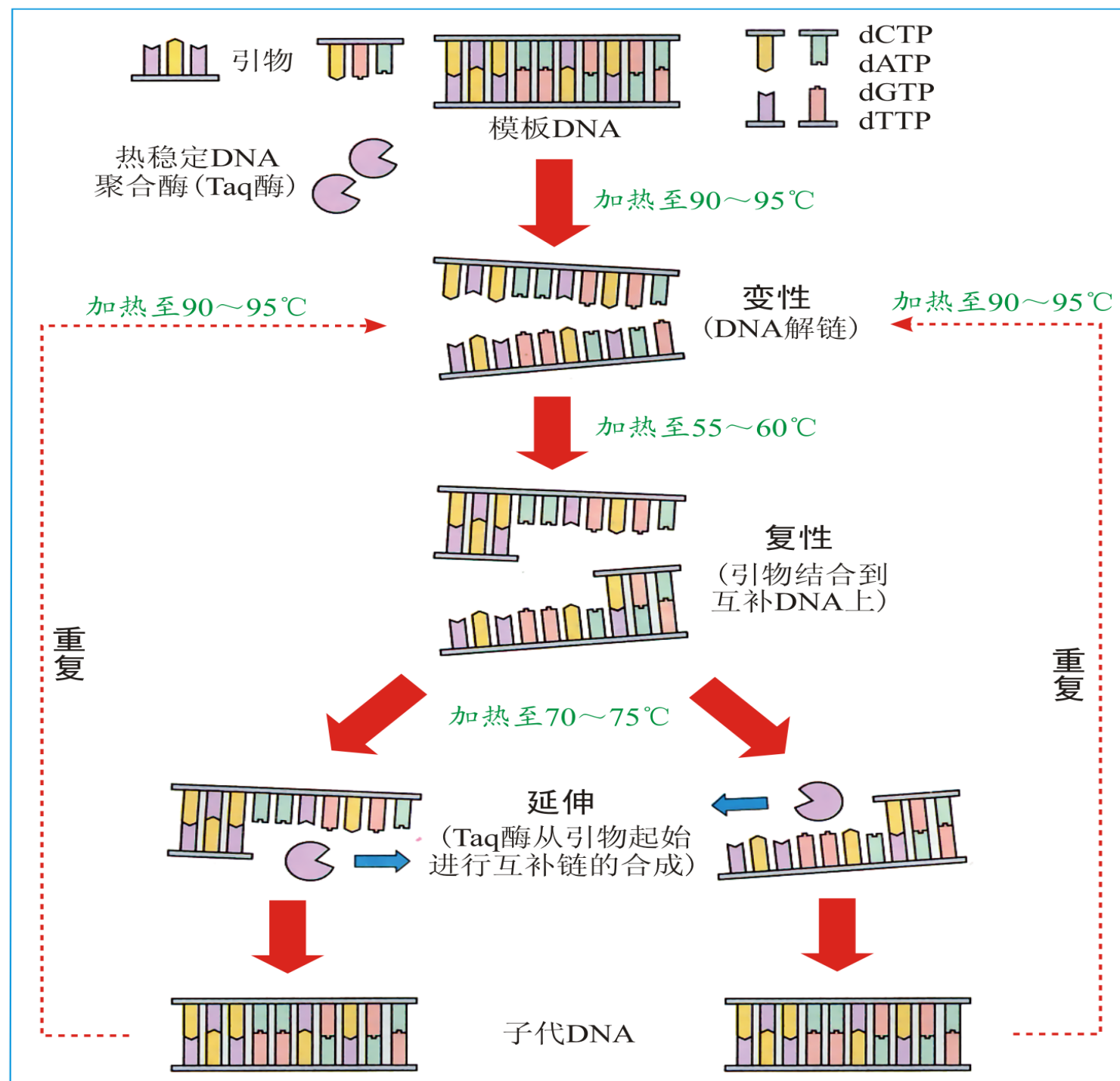
GB 4789.42—2016

食品安全国家标准

食品微生物学检验 诺如病毒检验

PCR的定义

PCR: (Polymerase Chain Reaction)即聚合酶链式反应在体外进行DNA复制的过程，配制适当的缓冲体系，加入各种组份：模板DNA、dNTP（四种）、扩增缓冲液、DNA聚合酶、引物，通过高温变性、低温退火和适温延伸阶段为一个循环来扩增模板DNA。



循环次数	DNA数量
1	2
2	4
3	8
20	1,048,576
30	1,073,741,824

荧光PCR的定义及原理

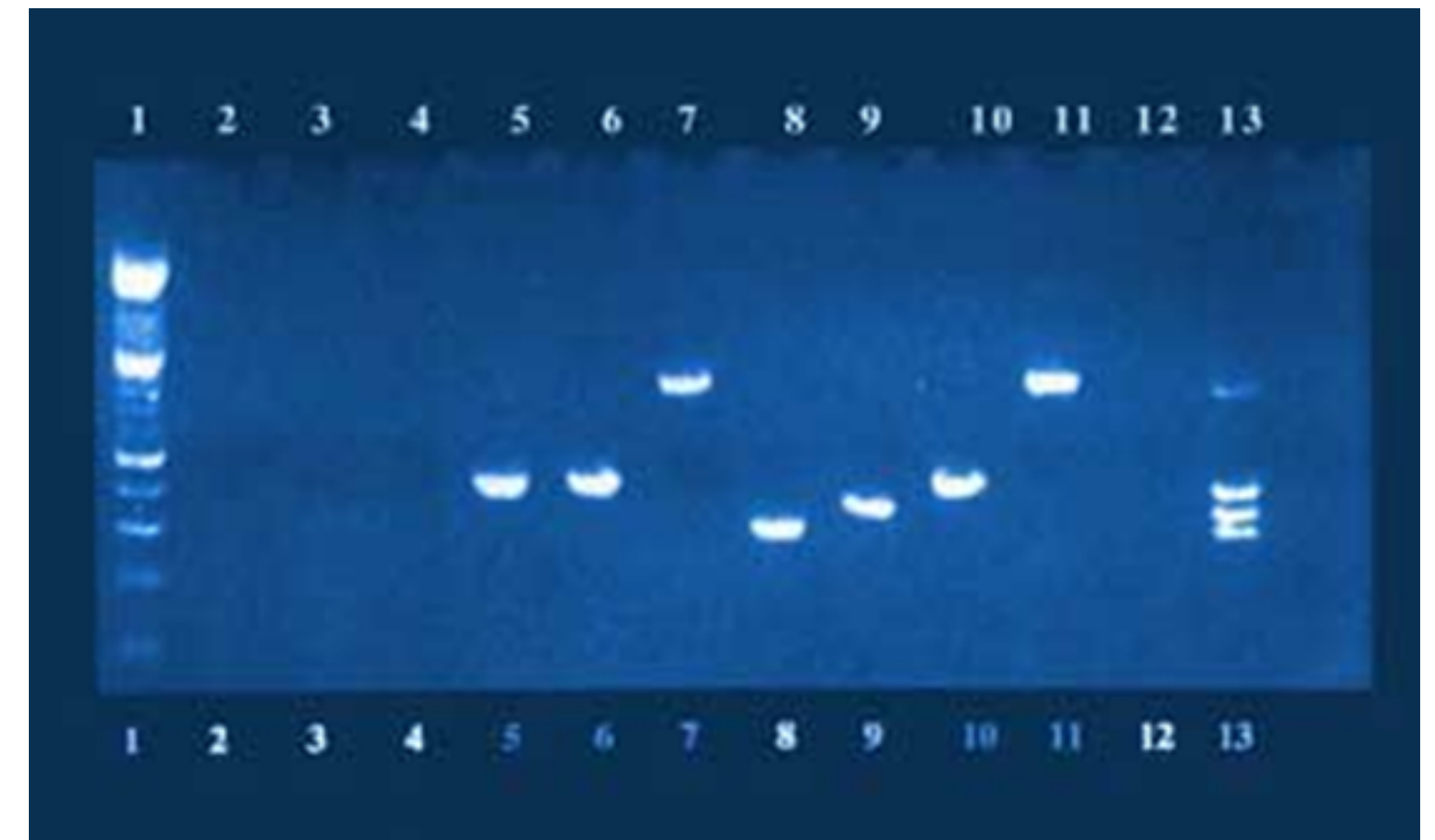
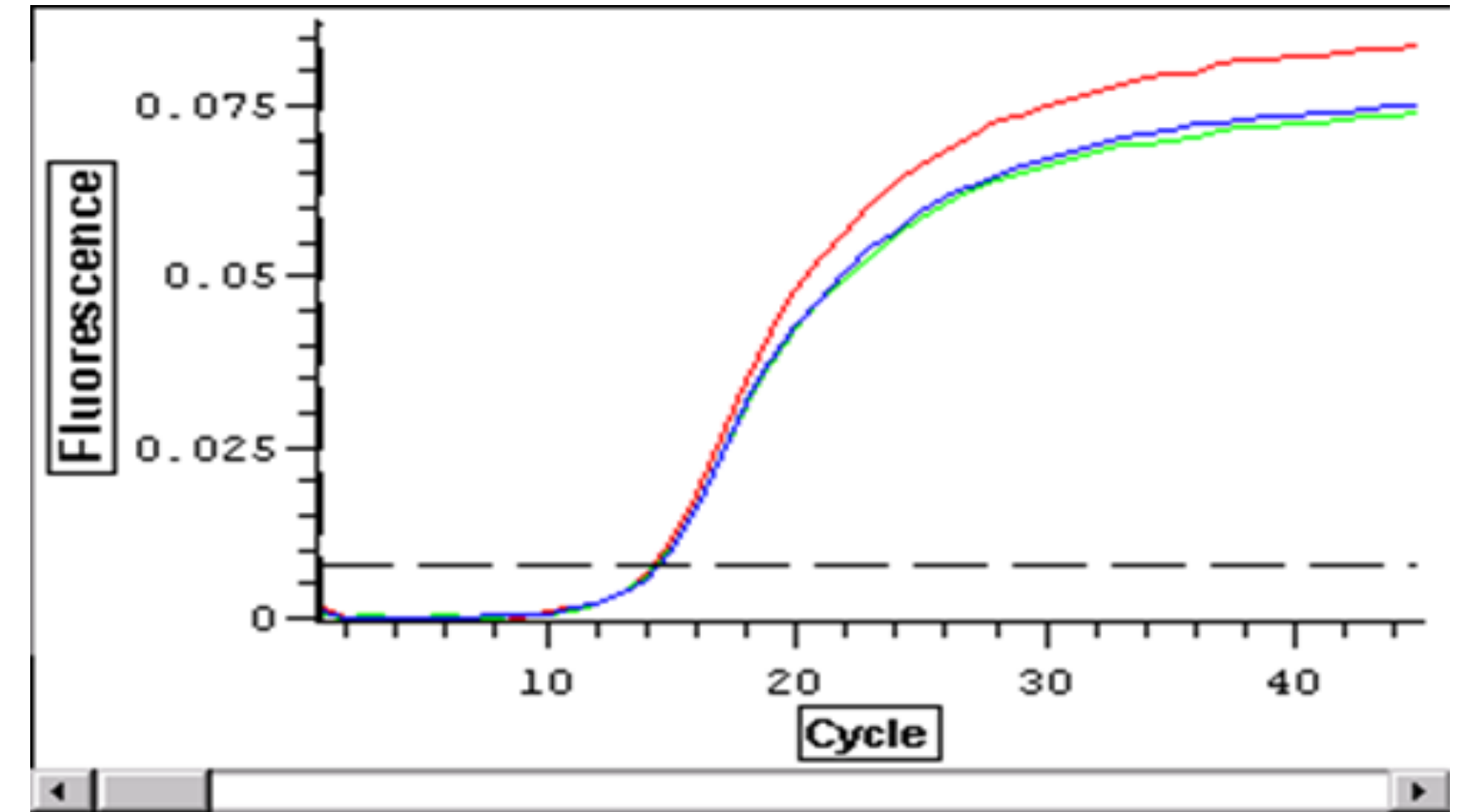
β PCR

β 实时荧光PCR 的定义:

- * 在PCR反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号累积实现实时监测整个PCR进程，并对起始模板进行定量分析的方法

β 普通PCR:

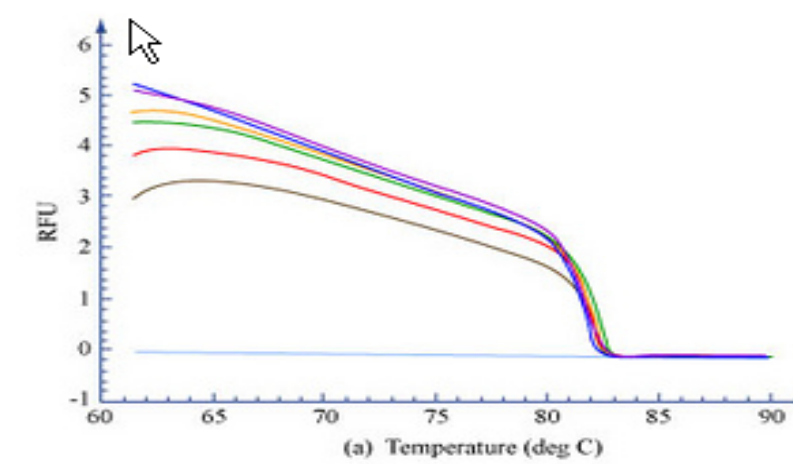
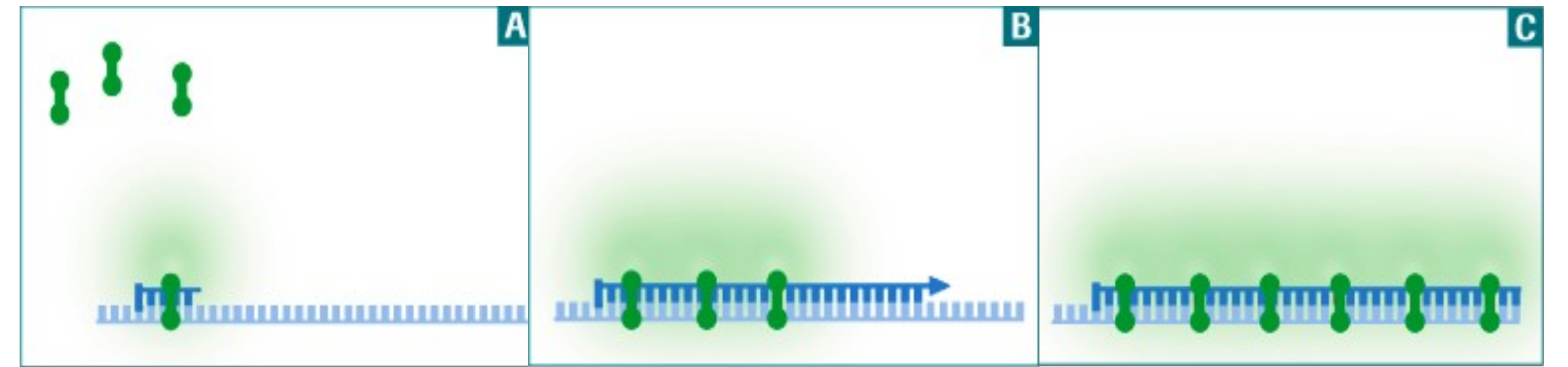
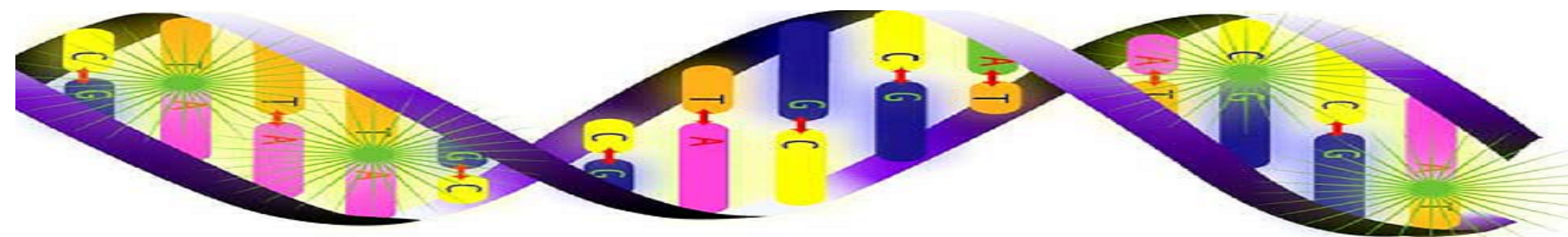
- * 借助DNA电泳对扩增反应的终产物进行半定量及定性分析



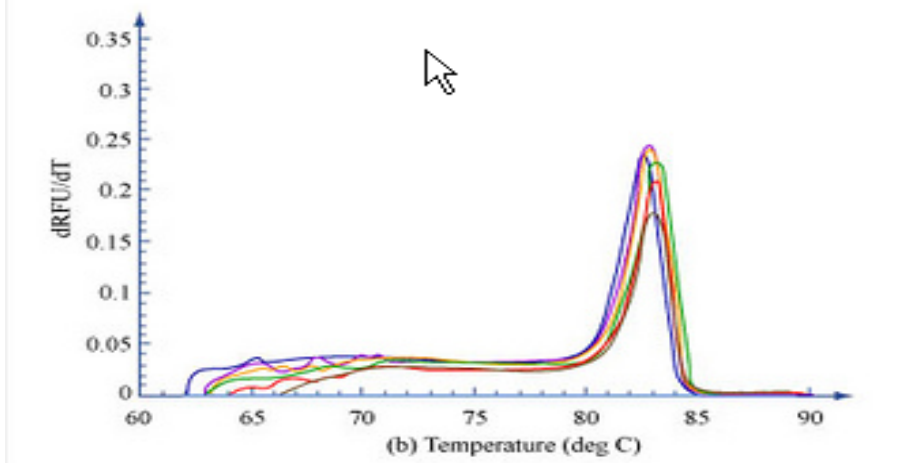
荧光PCR的定义及原理

非特异性荧光标记--SYBR Green I

- β 是一种染料，可特异性的与双链DNA的小沟结合，结合后，其荧光强度大大增强
- β DNA变性时，双链分开，无荧光
- β 在延伸结束阶段采集荧光信号
- β **SYBR Green I也能和非特异的双链DNA结合发光，所以必须在反应结束时做熔解曲线分析**



退火

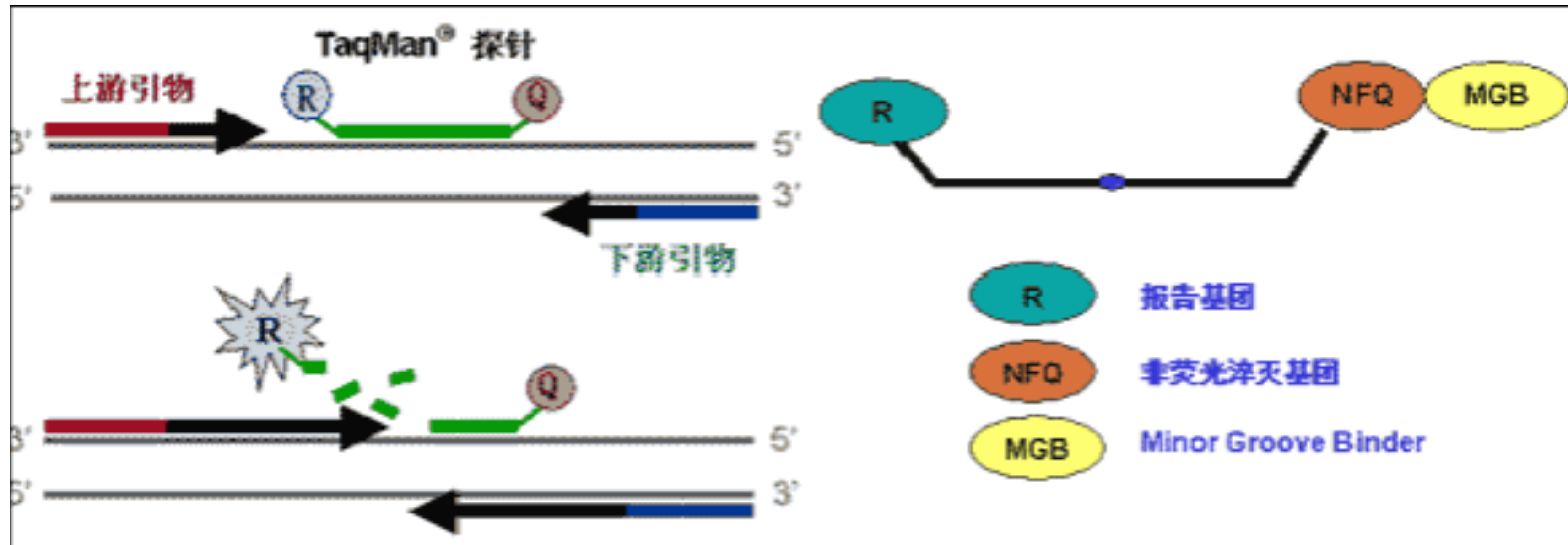


延伸

延伸结束

荧光PCR的定义及原理

特异性荧光标记—TaqMan探针



1. 探针与模板特异性地结合，其结合位点在两条引物之间。
2. 探针的5'端标记有荧光报告基团(Reporter, R)，如FAM、VIC，
3. 3'端标记有荧光淬灭基团(Quencher, Q)，如TAMRA。

荧光PCR的定义及原理

非特异性荧光标记--SYBR Green I

β 优点:

- * 对DNA模板没有选择性，适用于任何DNA
- * 使用方便、灵敏、便宜
- * 不必设计复杂探针

β 缺点:

- * 容易与非特异性双链DNA结合，产生假阳性
- * 对引物特异性要求较高
- * 灵敏度低，试验方法较难优化

特异性荧光标记—TaqMan探针

优点:

- 对目标序列的高特异性
- 设计不同标记的探针，多重检测
- 结果的重复性较好

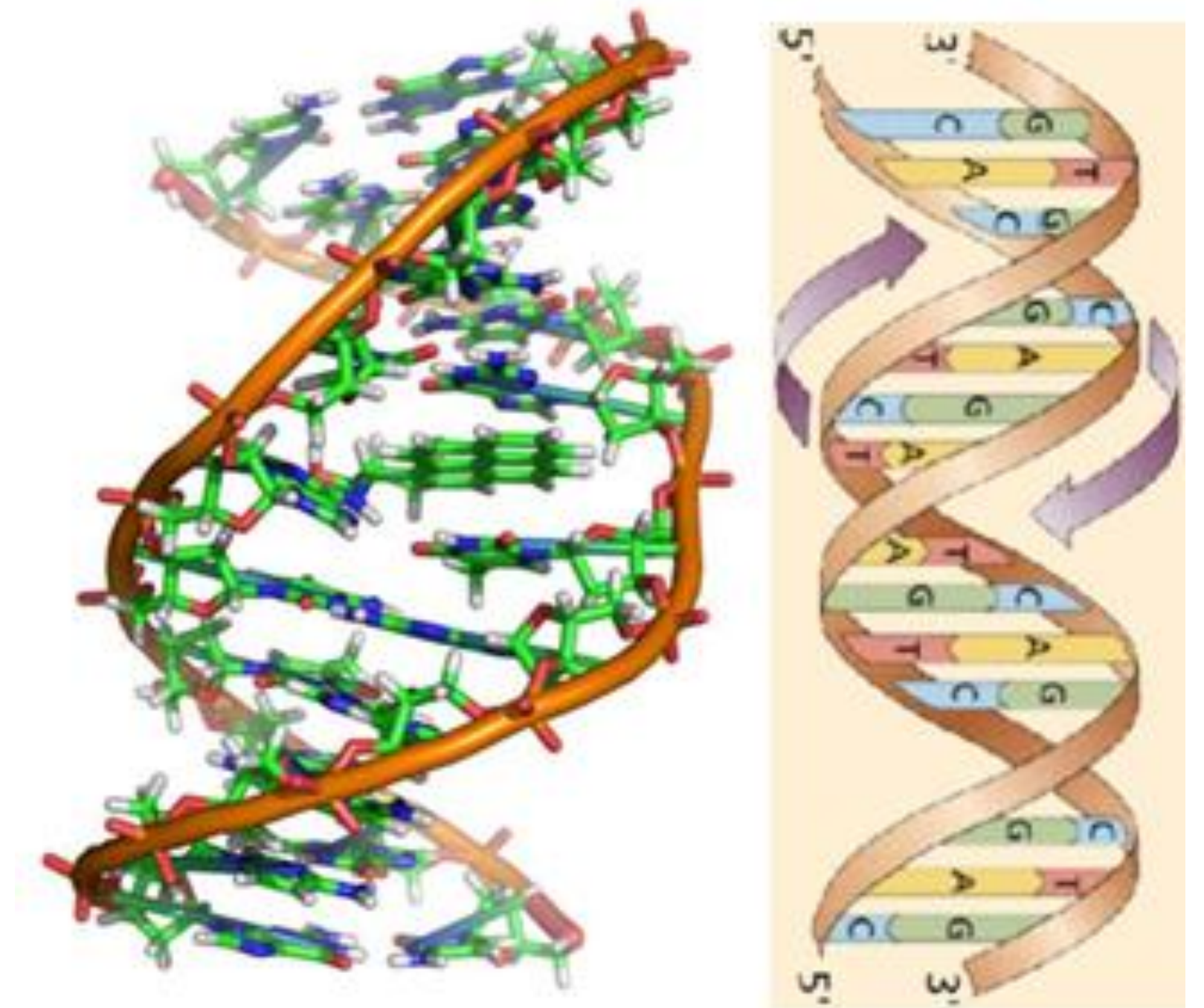
缺点:

- 只适合一个特定的目标
- 委托公司标记，价格较高
- 探针的设计较为繁琐

常见的几种PCR技术比较

β 实时荧光PCR与普通PCR的区别

- * 实时检测（在对数扩增期）而不是终点检测
- * 灵敏度高
- * 需要样品少
- * 特异性高
- * 精确定量
- * 无需接触EB等有害物质
- * 在密闭的反应管中进行，减少对环境中气溶胶的污染，提高检测结果的准确性



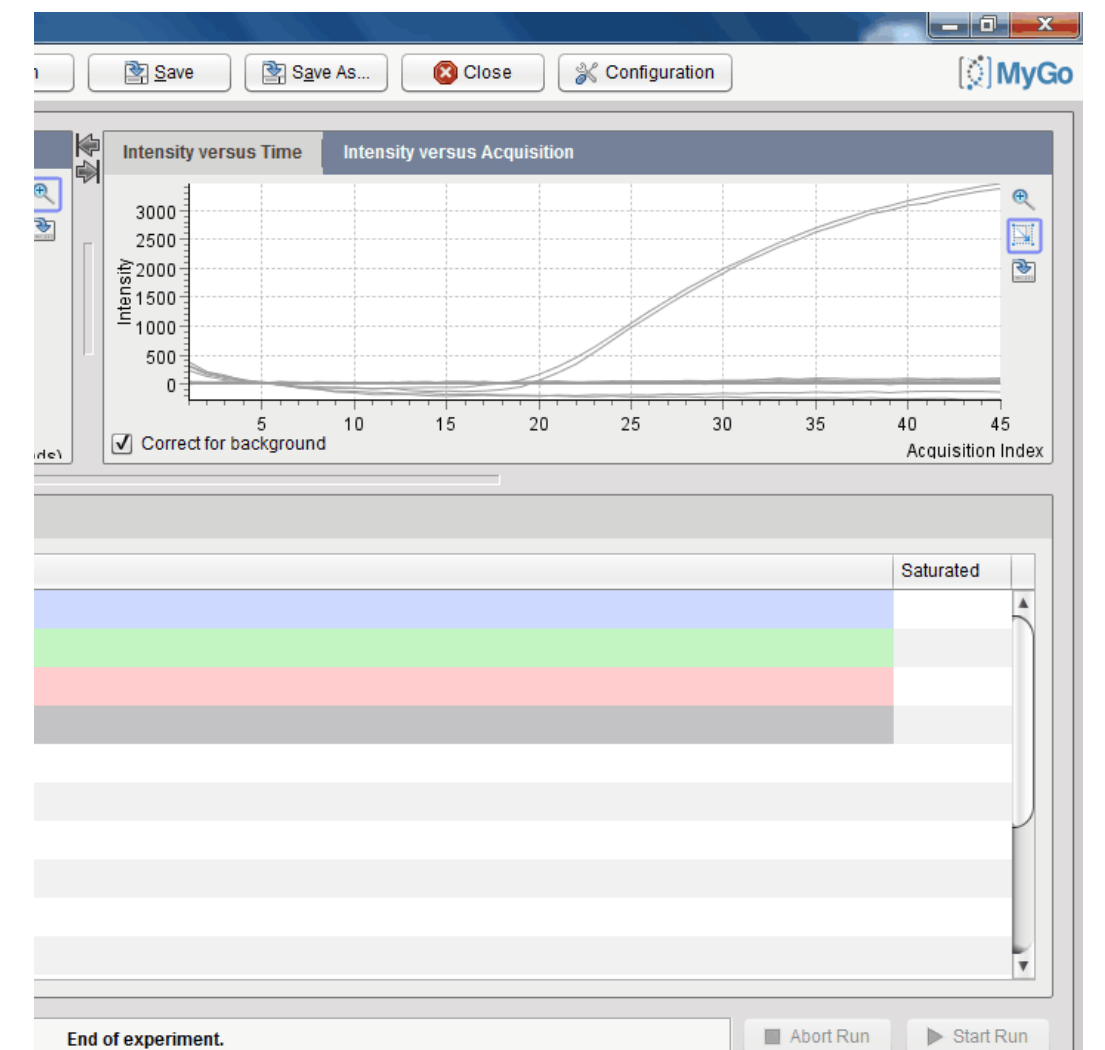
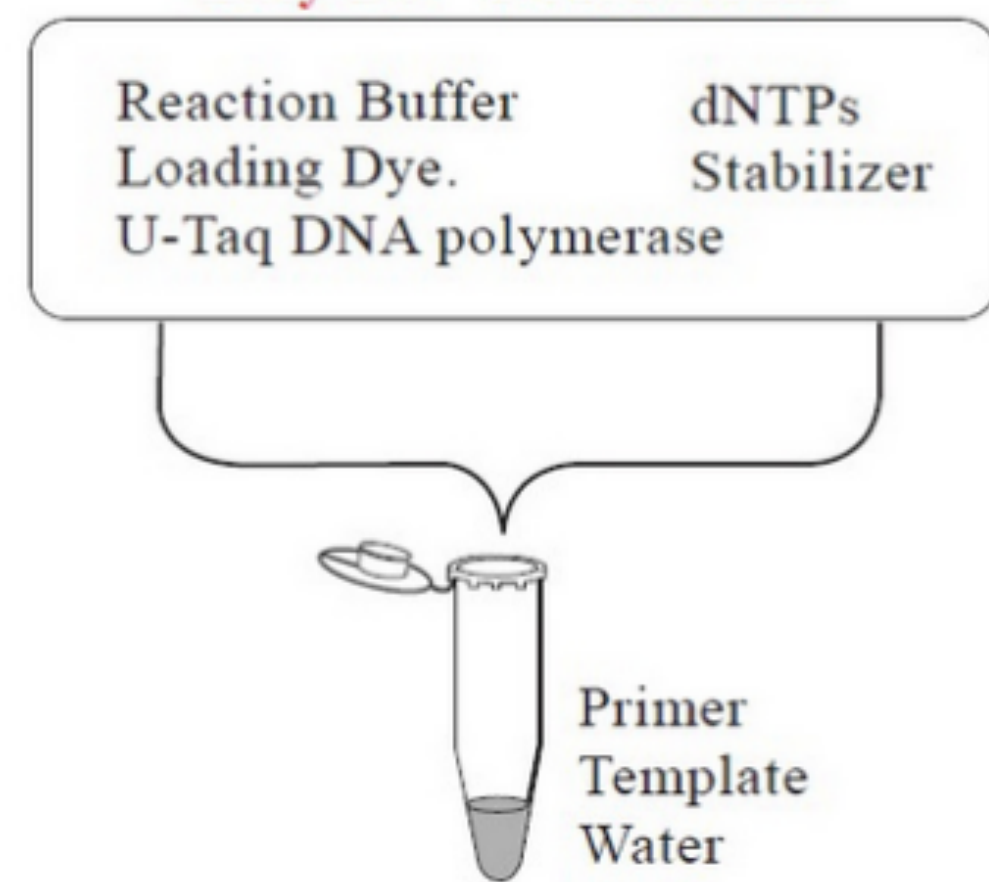
实时荧光定量PCR操作流程

样品前处理

DNA裂解提取

扩增+检测

结果分析



实时荧光定量PCR—致病菌

以保鲜乳中沙门氏菌为列，整个检测过程如下

前增菌

25mL样本 + 225mLBPW

37度增菌18-24h

DNA裂解及提取

取1mL增菌液到2mL离心管中

12000r离心2min

去上清

向沉淀中加100ul裂解液

95度金属浴5min

12000r 2min, 留上清

PCR仪器设置

荧光通道FAM

第一步95度 5min

第二步:

95度15s, 60度30s, 72度30s

45个循环

加样运行

5ul待检液 + 20ul反应液

上机检测

阴性样本

阳性样本

待测样本



结果分析

Ct≤35, 沙门氏菌阳性;

35 < Ct < 40, 建议样本重做, 重做结果Ct≥40, 沙门氏菌阴性, 否则为沙门氏菌阳性;

Ct≥40, 沙门氏菌阴性

实时荧光定量PCR—致病菌

检测方法	精准性	成本	人工	时间
国标培养方法				
测试片				
免疫方法				
荧光定量PCR				

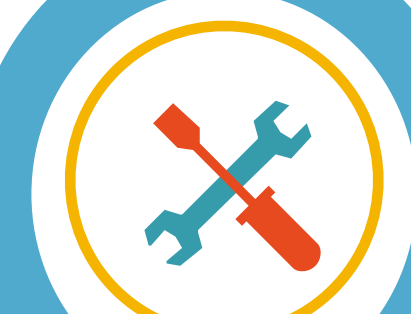
食源性致病菌检测的瓶颈



食品基质成分复



病原含量低而不



高浓度杂菌干扰

Thank you !