### 

GB/T XXXXX—201X

中华人民共和国国家标准

ICS 07.080

A 21

微生物痕量基因残留测定 微滴数字PCR法

Determination of microbial constant gene residues—Microdroplet digital PCR

（征求意见稿）



国家市场监督管理总局

中国国家标准化管理委员会

发布

发布

201X-XX-XX 发布

201X-XX-XX实施

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由中国标准化研究院提出并归口。

本标准起草单位：

本标准主要起草人：

微生物痕量基因残留测定 微滴数字PCR法

1. 范围

本标准适用于微生物痕量基因残留测定微滴数字PCR法的原理、试剂或材料、仪器设备、测定步骤、结果分析。

本标准适用于微生物加工产品中所残留的痕量基因测定。

1. 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/T6682分析实验室用水规格和试验方法

1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件

**3.1**

**微生物加工 microbial processing**

利用微生物的代谢能力对原料进行发酵、催化、转化等进行加工，以改变原料性质的过程。

**3.2**

**痕量基因残留 trace residual DNA**

微生物加工产品在后续分离纯化中无法去除的微量核酸。

**3.3**

**微滴数字PCR**

微滴式数字PCR系统在传统的[PCR](https://baike.baidu.com/item/PCR)扩增前对样品进行微滴化处理，即将含有核酸分子的反应体系分成成千上万个纳升级的微滴，其中每个微滴或不含待检核酸靶分子，或者含有一个至数个待检核酸靶分子。经PCR扩增后，逐个对每个微滴进行检测，有荧光信号的微滴判读为1，没有荧光信号的微滴判读为0，根据[泊松分布](https://baike.baidu.com/item/%E6%B3%8A%E6%9D%BE%E5%88%86%E5%B8%83/1442110)原理及阳性微滴的个数与比例即可得出靶分子的起始拷贝数或浓度。

1. 原理

利用液滴微流控技术，基于泊松分布，将待测生物样品所残留的目标核酸PCR扩增体系分割成几十到几万份包含一个或多个拷贝的核酸分子微升级油包水液滴。由于液滴体积小，目标核酸分子的相对浓度较高，可以按照常规PCR体系对其进行扩增，通过荧光探针实现信号读出。所产生液滴阳性信号的数目即代表了原始样本中目标核酸分子的拷贝数，从而直接数出目标核酸分子的个数，对起始样品的进行绝对定量。

1. 试剂和材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.1 水：GB/T6682一级。

5.2 数字PCR反应试剂盒

5.3 待检测微生物基因引物和探针。

1. 仪器和设备

6.1分析天平 0.1mg

6.2数字PCR仪

6.3离心机

6.4核酸测定仪

6.5涡旋振荡仪

6.6其它相关仪器和设备

6.7不同量程的移液枪及相应配套的吸头

1. 测定步骤

7.1 样品准备

将样品溶于不同体积的去离子水，获得目标核酸浓度不同待测试样。

7.2数字PCR检测

7.3.1试样数字PCR方法

每个试样的数字PCR反应都设置3个平行，并按照表1设置数字PCR的体系。

表1 数字PCR反应体系

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 试剂 | 终浓度 | 体系 |
| 2×Supermix | 1× | 10μL |
| Primer-F | 10μmol/L | 1.2μL |
| Primer-R | 10μmol/L | 1.2μL |
| Primer-P | 10μmol/L | 0.4μL |
| 待测试样 |  | 4μL |
| DdH2O |  | 补足20μL |
| **注：**此为一般反应体系，可根据不同市售数字PCR试剂盒进行调整 | | |

体系配置完成后按照数字PCR仪器的说明书进行操作，对上述20μL扩增进行完全进行分割获得油包水液滴。

将液滴转移96孔板，利用热封机进行封膜。封膜之后应该在 30 min内进行PCR反应，或者放于 4℃冰箱4h之内进行PCR扩增。可在任意一台96孔PCR仪上完成，注意升降温速度≤2.5℃/s，扩增程序见表2。

表2数字PCR扩增程序

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 步骤 | 温度 | 时间 | 循环数 |
| 预变性 | 95 | 10min | 1 |
| 变性 | 94 | 30s | 40 |
| 退火/延伸 | 60 | 1min |
| 保持 | 4 | ∞ |  |
| **注：**一般扩增程序不变，但可根据实际试验情况调整退火温度 | | | |

扩增结束后读取所有液滴的荧光信号，用于后续数据分析。

7.3.2数字PCR的对照实验

在试样进行检测时，分别设置阳性和空白对照。

合成目标核酸作为实验的阳性对照，无菌双蒸水作为空白对照。

各对照PCR反应体系，均按照7.3.1中的数字PCR体系进行配置。

1. 结果分析

8.1阈值的设定

根据扩增体系终点荧光值设置荧光的阈限值，阈限值需明确区分扩增体系中的阴性液滴和阳性液滴。

8.2对照组检测结果分析

阳性对照的结果中有目标基因扩增现象，空白对照中没有任何扩增现象，表明此次数字PCR检测正常，无需重复检测，具有可信性。

8.3 试样检测结果分析

按公式（1）计算：：

……………………………………………………………（1）

式中：

目标基因拷贝数；

——阳性液滴数目占总有效液滴数目的比例；

总有效液滴数目。

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_