

细菌 DNA 特征序列鉴定法（新增）

细菌 DNA 特征序列鉴定法系以特征核酸序列作为目标检测物，用于药用原料、辅料、制药用水、中间产品、终产品、包装材料和环境等药品全生命周期质量控制中细菌的鉴定。

本法通过对细菌 16S rRNA 基因特征序列的测定，实现细菌的生物学鉴定。细菌 16S 核糖体 RNA 基因（16S ribosomal RNA gene, 16S rRNA 基因）全长约 1500 bp，包含 9 个可变区（Variable region, V 区）和 10 个恒定区（Constant region, C 区），在结构与功能上具有高度保守性，是细菌分类和鉴定中得到广泛应用的 DNA 特征序列之一。

实验环境和仪器的一般要求

开展细菌鉴定试验的环境应具备分子生物学实验室的基本条件，并符合相应级别的生物安全要求。

所用仪器有电子天平、离心机、冰箱、恒温仪、紫外分光光度仪，聚合酶链式反应分析仪（Polymerase chain reaction analyzer, PCR 仪）、电泳仪、凝胶成像仪、核酸测序仪等。

试剂及其制备方法

三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸钠缓冲液（TE 缓冲液，pH 8.0） 称取三羟甲基氨基甲烷 12.1 g，加适量纯化水搅拌溶解，并稀释至 100 ml，用盐酸试液调节 pH 值至 8.0，得到 1 mol/L 储备液；称取乙二胺四乙酸二钠 18.6 g，加适量纯化水搅拌溶解，并稀释至 100 ml，用氢氧化钠试液调节 pH 值至 8.0，得到 0.5 mol/L 储备液。取三羟甲基氨基甲烷储备液 10 ml，乙二胺四乙酸二钠储备液 2 ml，加纯化水稀释至 1000 ml，121℃灭菌 15 分钟。

PCR 反应缓冲液（pH 8.3） 称取三羟甲基氨基甲烷 12.1 g，氯化钾 37.3 g，氯化镁 2.4 g，加适量纯化水搅拌溶解，并稀释至 1000 ml，用盐酸试液调节 pH 值至 8.3，121℃灭菌 15 分钟。

电泳缓冲液（TAE 缓冲液，pH 8.0） 称取三羟甲基氨基甲烷 4.84 g，冰乙酸 1.14 ml，乙二胺四乙酸二钠 0.75 g，加适量纯化水搅拌溶解，并稀释至 1000 ml，用氢氧化钠试液调节 pH 值至 8.0。

上样缓冲液 称取溴酚蓝 0.25 g，二甲苯氰 0.25 g，蔗糖 40.0 g，加适量纯化水搅拌溶解，并稀释至 100 ml。

也可以采用适宜的商品化试剂和试剂盒进行核酸提取、扩增、产物检测和纯化等。采用试剂盒时，应按照说明书操作，并符合试剂盒说明书中的质量控制要求及方法适用性要求。

方法适用性试验

细菌 DNA 特征序列鉴定时，应进行方法适用性试验，以确认所采用的方法适合于目标菌的鉴定。若鉴定条件发生变化可能影响鉴定结果时，应重新进行方法适用性试验。

进行方法适用性试验时，选择革兰阳性和阴性标准菌株按“待检菌的测定”步骤进行操作。提取的核酸质量应能满足核酸扩增的要求；核酸扩增产物应能在 500 bp 左右检测到一条目的条带；核酸测序结果应与相应对照菌株的核酸序列一致。

方法适用性试验应设定阴性对照试验，取灭菌的纯化水作为阴性对照，照核酸提取及后续步骤进行操作。核酸扩增产物应无扩增条带。

方法适用性试验可与待检菌的测定同时进行。

待检菌的测定

待检菌的测定应设置阳性对照试验、阴性对照试验。

阳性对照试验

根据待检菌的革兰染色等特性，选择特征序列确定的菌株作为阳性对照，照待检菌的测定步骤进行操作。阳性对照试验提取的核酸质量应能满足核酸扩增的要求；核酸扩增产物应能在 500 bp 左右检测到一条目的条带；核酸测序结果应与相应对照菌株的核酸序列一致。

阴性对照试验

取灭菌的纯化水作为阴性对照，照核酸提取及后续步骤进行操作，用以确证核酸提取、PCR 反应体系和扩增过程无污染。阴性对照试验的核酸扩增产物应无扩增条带。

待检菌测定

(1) 分离纯化

挑取待检菌在适宜的固体培养基上连续划线培养，以获取纯培养物（单个菌落）。

（2）核酸提取

核酸提取常用 CTAB 法（Cetyltriethylammonium bromide method），也可采用十二烷基硫酸钠法、碱裂解法等其他适宜的方法，必要时加入核糖核酸酶（Ribonuclease, RNase）去除 RNA。

CTAB 法提取核酸的一般步骤：取适量经分离纯化后的待测菌纯培养物于离心管中，加入 TE 缓冲液 450 μ l、溶菌酶（10 mg/mL）25 μ l，混匀，置 37℃ 水浴加热 30 分钟；加入 10% 十二烷基硫酸钠溶液 50 μ l，混匀，置 37℃ 水浴加热 15 分钟；加入 1% 氯化钠溶液 80 μ l、10% CTAB 溶液 70 μ l，混匀，置 65℃ 水浴加热 15 分钟；加入饱和苯酚-氯仿-异戊醇（25:24:1, v/v/v）溶液 350 μ l，剧烈震荡，室温静置 5 分钟，离心（转速为每分钟 12000 转）10 分钟，取上清液置于新的离心管中，重复操作 1 次；加入 2 倍体积无水乙醇，于 -20℃ 静置不少于 30 分钟，离心（转速为每分钟 12000 转）10 分钟，弃去上清液；加入适量 75% 乙醇（v/v）溶液洗涤，离心（转速为每分钟 12000 转）10 分钟，弃去上清液，室温风干至乙醇挥发完全；加入适宜体积的 TE 缓冲液溶解，作为核酸提取溶液（模板 DNA），置 4℃ 冰箱中备用。

待检菌提取的核酸质量应能满足核酸扩增的要求。采用紫外分光光度法测定模板 DNA 的浓度和纯度，应能够满足后续试验的要求，核酸浓度宜不低于 10 ng/ μ l， A_{260}/A_{280} 比值宜在 1.8~2.0 之间。

（3）核酸扩增

本法中的核酸扩增是指对 16S rRNA 基因 V1~V3 可变区核酸序列片段进行扩增，其扩增引物、反应体系及扩增程序如下：

扩增引物

正向引物（16SV1F）：5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' ；

反向引物（16SV3R）：5' -GTATTACCGCGGCTGCTGGC-3' 。

反应体系

常用的 PCR 反应体系为 25 μ l。制备时，取 PCR 反应缓冲液 2.5 μ l，脱氧核糖核苷三磷酸（dNTPs, 2.5 mmol/L）2 μ l，正向和反向引物（2.5 μ mol/L）

各 2 μl ，模板 DNA 1 μl ，*Taq* DNA 聚合酶 (1 U/ μl) 1 μl ，加灭菌的纯化水至 25 μl 。

扩增程序

采用的扩增程序为：94℃预变性 3 分钟；94℃变性 30 秒，55~60℃退火 30 秒，72℃延伸 60 秒，30 个循环；72℃继续延伸 5 分钟。

(4) 核酸扩增产物的检测

采用琼脂糖凝胶电泳法检测核酸扩增产物。使用电泳缓冲液配制 1.5%琼脂糖凝胶，其中加入溴化乙锭 (Ethidium bromide, EB) 或吖啶橙 (Acridine orange, AO) 等适宜的核酸凝胶染色剂。取核酸扩增产物 5 μl 、上样缓冲液 1 μl ，混匀后上样，于 100~150 V 电压下电泳，溴酚蓝条带移动至凝胶片的 1/2~2/3 处结束电泳。取凝胶片在紫外凝胶成像仪上检视，核酸扩增产物应在约 500 bp 的位置出现一条目的条带。核酸扩增产物检测时应选择适宜的 DNA 分子量标记 (Marker)，目的条带的大小应包括在 Marker 的范围内。

(5) 核酸扩增产物的纯化

核酸扩增产物应进行纯化，去除扩增引物、模板 DNA、*Taq* DNA 聚合酶等残留。核酸扩增产物纯化的主要步骤包括：将琼脂糖凝胶中的核酸扩增产物切下，置于离心管中，加入适量体积的 TE 缓冲液，65℃水浴至凝胶块完全溶解；分别加入 1/10 体积乙酸钠溶液(3 mol/L, pH 5.2)和乙二胺四乙酸钠溶液(125 mmol/L, pH 8.0)，混匀；加入 2 倍体积无水乙醇，-20℃静置 30 分钟；离心 (转速为每分钟 12000 转) 10 分钟，弃去上清液；加入适量 75%乙醇 (v/v) 溶液洗涤，离心 (转速为每分钟 12000 转) 10 分钟，弃去上清液，室温风干至乙醇挥发完全；加入适宜体积的 TE 缓冲溶液溶解，作为核酸扩增产物的纯化溶液，置 4℃冰箱中备用。

(6) 核酸测序

以扩增引物作为测序引物，使用核酸测序仪对纯化后的核酸扩增产物进行双向测序，获得目标核酸序列。对核酸测序结果进行序列质量核查。双向测序峰图应采用有峰图拼接功能的软件，以正、反向核酸序列叠加的方式进行序列拼接，并去除两端引物区序列。拼接后得到的核酸序列方向应与核酸扩增正向引物方向一致。

(7) 结果判定

将获得的细菌 DNA 特征序列与经验证过的专用数据库进行比对。根据比对结果进行判定。

征求意见稿