

## 附件：1021 细菌 DNA 特征序列鉴定法草案公示稿（第一次）

## 1021 细菌 DNA 特征序列鉴定法

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 核糖体 RNA（16S ribosomal RNA gene, 16S rRNA）基因特征核酸序列的测定及比对分析，实现细菌的分子生物学鉴定。细菌 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。对于利用 16S rRNA 基因特征核酸序列无法准确区分鉴定的一些近源菌种，也可结合其他经过验证的基因特征序列或全基因组序列进行分子生物学鉴定。

### 实验环境和仪器的一般要求

开展细菌分子生物学鉴定试验的环境应具备分子生物学实验室的基本条件，可参考聚合酶链式反应法（通则 1001）相关要求，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、DNA 定量仪器（如紫外或荧光分光光度仪），聚合酶链式反应（Polymerase chain reaction, PCR）分析仪、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-乙二胺四乙酸二钠缓冲液（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，灭菌。

**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

27 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  
28 调节 pH 值至 8.3, 灭菌。

29 **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  
30 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  
31 1000 ml, 用氢氧化钠试液调节 pH 值至 8.0。

32 **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  
33 化水搅拌溶解, 并稀释至 100 ml。

34 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  
35 和纯化等。

## 36 方法适用性试验

37 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  
38 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  
39 进行方法适用性试验。

40 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  
41 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  
42 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  
43 核酸序列一致。

44 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,  
45 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。

46 方法适用性试验可与待检菌的测定同时进行。

## 47 待检菌的测定

48 待检菌的测定应设置阳性对照试验、阴性对照试验。

### 49 阳性对照试验

50 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,  
51 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  
52 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  
53 序结果应与相应对照菌株的核酸序列一致。

### 54 阴性对照试验

55 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

56 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  
57 产物应无扩增条带。

## 58 待检菌测定

### 59 (1) 分离纯化

60 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  
61 个菌落）。

### 62 (2) 核酸提取

63 核酸提取常用十六烷基三甲基溴化铵（Cetyltriethylammonium bromide  
64 method, CTAB）法，也可采用十二烷基硫酸钠法、碱裂解法等其他适宜的方  
65 法，必要时加入核糖核酸酶（Ribonuclease, RNase）去除 RNA。

66 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  
67 于离心管中，加入 TE 缓冲液 450  $\mu$ l、溶菌酶（10 mg/ml）25  $\mu$ l，混匀，置  
68 37℃水浴加热 30 分钟；加入 10% 十二烷基硫酸钠溶液 50  $\mu$ l，混匀，置 37℃  
69 水浴加热 15 分钟；加入 1% 氯化钠溶液 80  $\mu$ l、10% CTAB 溶液 70  $\mu$ l，混  
70 匀，置 65℃水浴加热 15 分钟；加入饱和苯酚-三氯甲烷-异戊醇（25:24:1, v/v/v）  
71 溶液 350  $\mu$ l，剧烈震荡，室温静置 5 分钟，离心（转速为每分钟 12000 转）  
72 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  
73 醇，于 -20℃静置不少于 30 分钟，离心（转速为每分钟 12000 转）10 分钟，  
74 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  
75 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  
76 冲液溶解，作为核酸提取溶液（模板 DNA），置 2~8℃冰箱中备用。

77 待检菌提取的核酸质量应能满足核酸扩增的要求，核酸浓度宜不低于 10  
78 ng/ $\mu$ l。模板 DNA 浓度和纯度测定常用紫外分光光度法， $A_{260}/A_{280}$  比值宜在  
79 1.8~2.0 之间。

### 80 (3) 核酸扩增

81 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  
82 进行扩增，其扩增引物、反应体系及扩增程序如下：

83 扩增引物 正向引物（16SV1F）：5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-  
84 3'；

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

86 反应体系 常用的 PCR 反应体系为 25  $\mu$ l。制备时, 取 PCR 反应缓冲  
87 液 2.5  $\mu$ l, 脱氧核糖核苷三磷酸(2.5 mmol/l)2  $\mu$ l, 正向和反向引物(2.5  $\mu$ mol/l)  
88 各 2  $\mu$ l, 模板 DNA 1 $\mu$ l, *Taq* DNA 聚合酶 (1 U/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l, 加灭菌的纯化水至  
89 25  $\mu$ l。

90 扩增程序 采用的扩增程序为: 94 $\square$ 预变性 3 分钟; 94 $\square$ 变性 30 秒, 55~  
91 60 $\square$ 退火 30 秒, 72 $\square$ 延伸 60 秒, 30 个循环; 72 $\square$ 继续延伸 5 分钟。

#### 92 (4) 核酸扩增产物的检测

93 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  
94 脂糖凝胶, 其中加入溴化乙锭或吖啶橙等适宜的核酸凝胶染色剂。取核酸扩  
95 增产物 5  $\mu$ l、上样缓冲液 1  $\mu$ l, 混匀后上样, 于 100~150 V 电压下电泳,  
96 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  
97 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  
98 产物检测时应选择适宜的 DNA 分子量标记, 目的条带的大小应包括在 DNA  
99 分子量标记的范围内。

#### 100 (5) 核酸扩增产物的纯化

101 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  
102 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  
103 物切下, 置于离心管中, 加入适量体积的 TE 缓冲液, 65~95 $\square$ 水浴至凝胶  
104 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  
105 酸钠溶液 (125 mmol/l, pH 8.0), 混匀; 加入 2 倍体积无水乙醇, -20 $\square$ 静置  
106 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%  
107 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,  
108 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  
109 产物的纯化溶液, 置 2~8 $\square$ 冰箱中备用。

#### 110 (6) 核酸测序

111 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  
112 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  
113 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

114 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  
115 增正向引物方向一致。

### 116 (7) 结果判定

117 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  
118 据比对结果进行判定。

---

起草单位：上海市食品药品检验研究院 联系电话：18001677839

复核单位：北京市药品检验研究院

## 1021 细菌 DNA 特征序列鉴定法修订说明

经过国内外现行标准比对分析，结合标准实施和企业实践中遇到的问题反馈，对《中国药典》四部通则 1021 细菌 DNA 特征序列鉴定法 进一步修订完善。本次修订的主要内容如下：

在通则 1021 实验环境与仪器的一般要求部分，关于分子实验室的基本条件和生物安全要求，增加与通则 1001 中相关规定一致的描述。