

《水质 12 种抗生素抗性基因和 1
种可移动遗传元件的测定 实时荧
光定量 PCR 法》
征求意见稿
编制说明

《水质 12 种抗生素抗性基因和 1 种可移动遗传元件的
测定 实时荧光定量 PCR 法》

标准编制组

二零二五年四月

项目名称：水质 12 种抗生素抗性基因和 1 种可移动遗传元件 实时荧光定量 PCR 法

项目来源：国家重点研发计划项目-水环境抗生素污染防控 NQI 关键技术集成与应用示范（2023YFF0611000）、江苏省畜禽粪便抗生素及抗性基因与重金属复合污染削减 技术创新与科技示范（BE2023672）

参编单位：生态环境部南京环境科学研究所、中国计量科学研究院、南京大学、浙江师范大学、南京市计量监督检测院、河北工程大学、海南热带海洋学院崖州湾创新研究院、合肥元哉生物科技有限公司

编制组主要成员：倪妮、王娜、牛春艳、罗义、袁青彬、金志刚、陈鸿飞、汪庆、那广水、高轩、施玛丽、张晓辉、郭欣妍、朱长青、张腾

目 录

1 工作简况	3
1.1 任务来源	3
1.2 主要工作过程	5
1.3 主要起草人及其所做的工作	6
2 标准制修订原则和技术路线	7
2.1 标准制修订原则	7
2.2 方法研究的技术路线	8
3 标准主要条文或技术内容的依据	9
3.1 检测技术选择依据	9
3.2 目标物的选择依据	10
4 方法研究报告	10
4.1 方法研究的目标	10
4.2 方法原理	11
4.3 试剂和材料	12
4.4 仪器和设备	12
4.5 样品的采集和保存	13
4.6 样品前处理	13
4.7 DNA 提取方法对比	16
4.8 质粒重组与 qPCR 反应体系建立	19
4.9 标准曲线的构建	24
4.10 测定	25
4.11 空白分析	25
4.12 结果计算与表示	25
4.13 方法特性参数	25

4.14 方法验证	51
5 与相关标准的关系分析	54
6 采用国际标准的程度及水平说明	55
7 重大分歧或重难点的处理经过和依据	56
8 标准推广应用措施及预期效果	57
参考文献.....	59
附件一 初稿审查会专家意见汇总处理表	61
附件二 DNA 降解情况示例胶图	73
附件三 目标物的标准曲线图	74

1 工作简况

1.1 任务来源

抗生素抗性基因（ARGs）与抗生素的高使用量及其环境排放量巨大直接关联，广泛残留于环境中的抗生素会通过直接选择作用、促进 ARGs 水平转移等方式在环境中富集耐药菌和 ARGs^[1]，导致耐药性污染日益严重^[2,3]。据统计，2019 年全球有 127 万人直接死于抗生素耐药性感染，495 万人的死亡与抗生素耐药性感染有关，这些感染所带来的医疗负担相当于流感、结核病以及艾滋病所造成的负担之和^[4,5]。更有学者预测，如果情况得不到改善，到 2050 年，全球每年将有 1000 万人因耐药性问题而死、国内生产总值的损失将高达百万亿美元。研究发现，抗生素抗性基因会随着食物链在高营养级生物中富集，从而影响人体健康^[2]。欧美各国也多次报道了蔬菜中耐抗生素的 *Escherichia coli*、*Salmonella* 等人类致病菌导致的食源性疾病暴发^[6]，世界卫生组织也将 ARGs 作为世界上最大的公共卫生问题之一^[7]，联合国环境规划署已将抗生素耐药性列为六大新兴环境污染问题之首。

近年来，由于工农业迅猛发展，抗生素抗性基因在海洋^[8]、河流^[9]、湖泊^[10]、地下水^[11]、废水等水体中普遍存在。研究发现，河流、湖泊等环境 ARGs 的检出做了统计发现，其中检出率的排序为河流（98%）>湖泊（77%）>水库（<1%）^[12]。国外研究发现克卢日（罗马尼亚）的地下水在 ARGs 普遍存在，ARGs 相对丰度为（ $6.61 \times 10^{-7} \sim 2.3 \times 10^{-1}$ copies/ 16S rRNA），其中 β -内酰胺类 ARGs 检出率最高，其次为磺胺类 ARGs，第三为四环素类 ARGs^[13]。有学者对中国 11 个污水处理厂中的 296 个 ARGs 进行检测后发现，7 种 ARGs（包括氨基糖苷类抗性基因 *aadA*、*aadA1* 和 *aadA2*， β 内酰胺类抗性基因 *bla_{TEM}*

和 *bla_{OXA-10}*, 大环内酯类抗性基因 *ereA*, 多药类抗性基因 *qacEdelta1*) 持久存在, 它们分别占进水、污泥和出水中所检测基因总拷贝数的 54.1%、58.6%和 58.5%^[14]。

近年来, 我国高度重视抗生素耐药性问题, 将其上升为国家生物安全和公共卫生领域的重大战略。自 2016 年《遏制细菌耐药国家行动计划(2016-2020 年)》发布以来, 我国通过加强抗菌药物临床应用管理、完善耐药监测体系、推动多部门协同治理等措施, 取得了显著成效。2022 年,《遏制微生物耐药国家行动计划(2022-2025 年)》进一步明确了预防为主、综合施策的原则, 提出加强科技研发、完善监测评价体系等八项任务, 旨在全面提升微生物耐药治理能力。抗生素耐药性不仅威胁人类健康, 还通过水环境传播抗性基因, 加剧生态风险。因此, 建立水环境中抗生素抗性基因分析方法标准是支撑新污染物环境管理的技术基础, 对遏制耐药基因的环境扩散、保障生态安全具有重要意义。

中国是抗生素生产和使用大国, 其环境的排放量非常可观。据估算, 我国常见抗生素向环境的总排放量约为 5.38×10^4 t/a, 其中约 46% 排放进入水环境, 导致水环境中的 ARGs 含量不断上升、ARB 显著增加。例如, 有统计结果显示在过去十年间, 长江口地区水环境中耐药菌显著增加、ARGs 含量水平上升。磺胺类、喹诺酮类、四环素类、氨基糖苷类、大环内酯类、 β -内酰胺类是水环境中频繁检出的 6 大类抗生素 ARGs。

目前我国尚未发布针对水环境中抗生素抗性基因 (ARGs) 的监测方法标准, 这一空白严重制约了水环境抗生素耐药性风险评估与管理策略的有效实施。为应对这一挑战, 本研究基于实时荧光定量 PCR (qPCR) 技术, 构建了《水质 12 种抗生素抗性基因和 1 种可移动遗

传元件的测定 实时荧光定量 PCR 法》标准方法。该标准不仅填补了水环境中 ARGs 定量检测的技术空白，还为科研、检测、监测及管理提供了统一的技术规范，对精准评估抗生素耐药性环境风险、支撑新污染物治理体系建设具有重要的理论价值和实践意义。

1.2 主要工作过程

2024 年 4 月 12 日，中国环境科学学会发起团体标准立项、申报工作的通知，生态环境部南京环境科学研究所为牵头单位申请《水质 12 种抗生素抗性基因和 1 种可移动遗传元件的测定 实时荧光定量 PCR 法》团体标准的起草和编制，联合中国计量科学研究院、南京大学、浙江师范大学、南京市计量监督检测院、河北工程大学、合肥元哉生物科技有限公司报名参与团体标准的制定。

2024 年 6 月 13 日通过线上会议召开该标准第一次启动会，由生态环境部南京环境科学研究所、中国计量科学研究院、南京大学、浙江师范大学、南京市计量监督检测院、河北工程大学、合肥元哉生物科技有限公司共 7 家单位组成《水质 12 种抗生素抗性基因和 1 种可移动遗传元件的测定 实时荧光定量 PCR 法》团体标准起草小组成员单位，生态环境部南京环境科学研究所为牵头单位，负责团体标准立项、申报。由刘庆芬（中国科学院过程工程研究所）、任立人（抗生素菌渣无害化处置与资源化利用工程技术中心）、张霖琳（中国环境监测总站）、张利飞（国家环境分析测试中心）、苏冠勇（南京理工大学）、张秀蓝（国家环境分析测试中心）、杨凤霞（农业农村部环境保护科研监测所）等专家召开了立项评审会议，专家一致通过了《水

质 12 种抗生素抗性基因和 1 种可移动遗传元件的测定 实时荧光定量 PCR 法》的立项评审。

2025 年 3 月 11 日标准编制组发函邀请了任立人（抗生素菌渣无害化处置与资源化利用工程技术中心）、张霖琳（中国环境监测总站）、王丽媛（南京环境监测中心）、苏冠勇（南京理工大学）、张秀蓝（国家环境分析测试中心）、杨凤霞（农业农村部环境保护科研监测所）、朱冬（中国科学院城市环境研究所）等专家对《水质 12 种抗生素抗性基因和 1 种可移动遗传元件的测定 实时荧光定量 PCR 法》提出了相关修改意见。初稿审查会专家意见汇总处理表见附件一。

会后，收集国内外的同类标准及相关资料起草拟出《水质 12 种抗生素抗性基因和 1 种可移动遗传元件的测定 实时荧光定量 PCR 法》工作组讨论稿，并将讨论稿发各起草单位，向各参与标准起草单位征集意见和建议，在收集分析验证数据基础上，完成标准征求意见稿。

1.3 主要起草人及其所做的工作

主要参加单位、工作组成员及其负责的工作如表 1.3-1（表、图序号统一修改）所示。

表 1.3-1 主要参与成员及工作内容

序号	主要参加单位	成员	主要工作
1	生态环境部南京环境科学研究所	倪妮	负责方案确定，资料查询、标准制定、编制说明编写、组织和协调等工作
2	生态环境部南京环境科学研究所	王娜	负责方案确定，资料查询、标准制定、编制说明编写、组织和协调等工作

3	中国计量科学研究院	牛春艳	负责标准质粒的制备等工作
	南京大学	罗义	负责 DNA 提取方法等工作
4	南京大学	袁青彬	负责 DNA 提取方法等工作
5	浙江师范大学	金志刚	负责 qPCR 检测等工作
6	南京市计量监督检测院	陈鸿飞	负责质控体系构建等工作
7	河北工程大学	汪庆	负责方法验证与推广
8	海南热带海洋学院崖州湾创新研究院	那广水	负责方法验证与推广
9	合肥元哉生物科技有限公司	高轩	负责方法验证与推广
10	生态环境部南京环境科学研究所	施玛丽	负责资料查询等工作
11	生态环境部南京环境科学研究所	张晓辉	负责资料查询等工作
12	生态环境部南京环境科学研究所	郭欣妍	负责资料查询、标准制定等工作
13	生态环境部南京环境科学研究所	朱长青	负责资料查询、标准制定等工作
14	生态环境部南京环境科学研究所	张腾	负责资料查询、标准制定等工作

2 标准制修订原则和技术路线

2.1 标准制修订原则

按照《环境监测分析方法标准制订技术导则》（HJ168-2020）的要求制定本标准。标准制定过程遵循以下原则：

- （1）方法检出限和测定范围应能满足相关生态环境标准和生态环境管理工作的要求；
- （2）标准要与其他生态环境标准相衔接；

(3) 方法稳定可靠，能满足各项方法特性指标的要求，具有科学性、合理性和适用性；

(4) 标准内容完整，表述准确，易于理解，便于实施。

2.2 方法研究的技术路线

通过调研国内外关于抗生素抗性基因的分析方法，本标准选定的提取方法为直接过膜法，仪器检测方法选定为实时荧光定量 PCR 法。本研究对样品前处理，DNA 提取方法以及仪器测定条件逐一进行验证和调整，建立了一套适用于实时荧光定量 PCR 法检测水中 12 种抗生素抗性基因和 1 种可移动遗传元件的分析方法。此外，通过实验室内验证和实验室间比对，论证得到样品前处理方法，确定定量限、检出限、精密度和正确度等技术特性指标，完善质量保证和质量控制内容。保证方法标准的科学性、规范性和可操作性。技术路线见图 2.2-1。

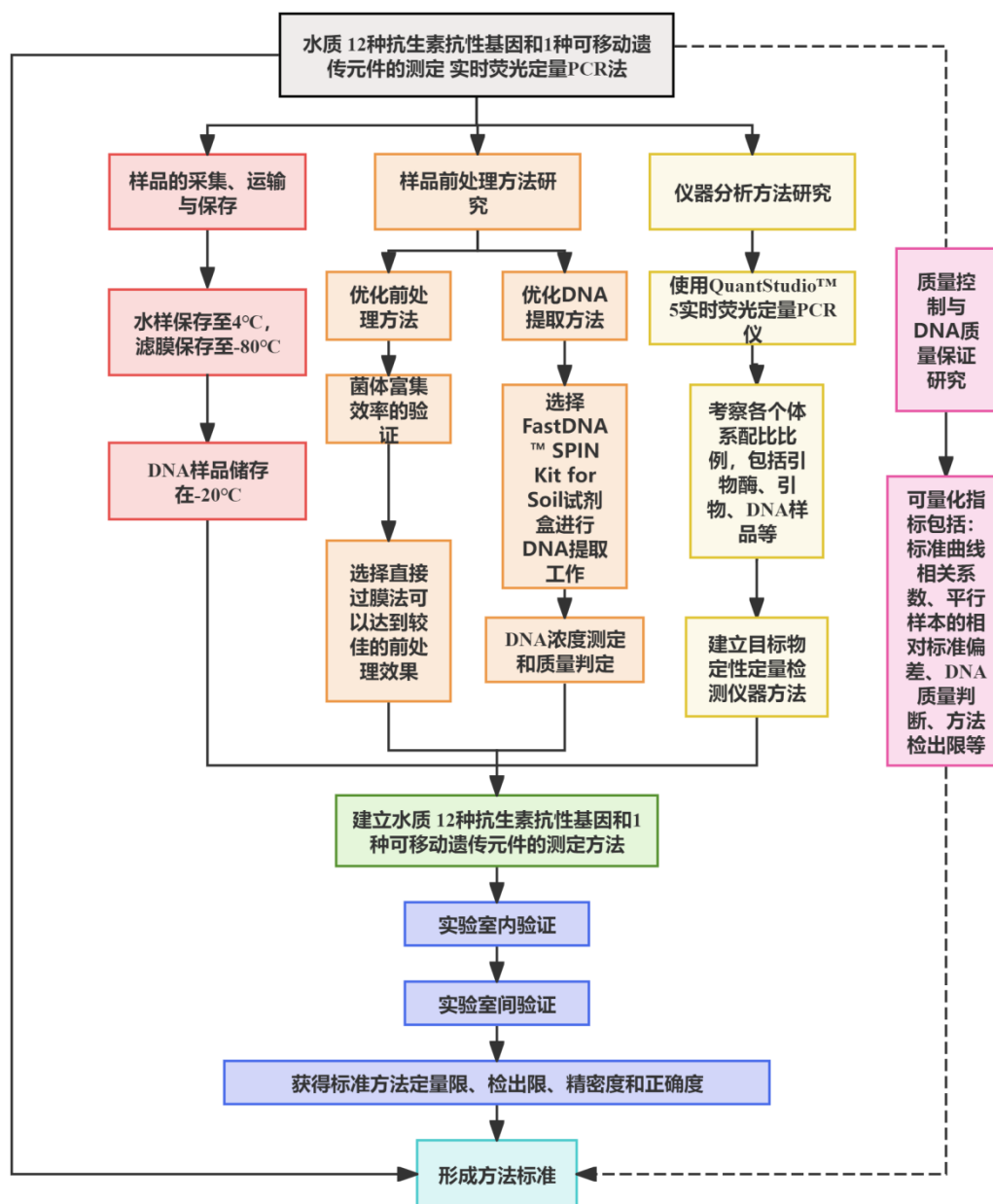


图 2.2-1 技术路线图

3 标准主要条文或技术内容的依据

3.1 检测技术选择依据

目前，水环境中 ARGs 的检测方法包括传统 PCR、数字 PCR、高通量测序（如宏基因组学）和基因芯片等。其中，实时荧光定量 qPCR 因其高灵敏度（可检测 1-10 拷贝基因）、精准定量（误差率

<5%)、强特异性(区分同源序列)、高通量(多靶标并行检测)以及成本效益(设备普及、运行成本低)等优势,成为 ARGs 检测的理想选择。相较于传统 PCR 的半定量局限、高通量测序的高成本复杂性,qPCR 在灵敏度、特异性与可操作性之间实现了最佳平衡,为水环境中 ARGs 的精准监测与风险评估提供了可靠的技术支撑。

3.2 目标物的选择依据

通过文献、数据库、统计年鉴等手段对我国主要流域抗生素抗性基因和可移动遗传元件的赋存特征、我国抗生素生产使用和环境危害等情况开展了广泛调查。本研究选用的目标基因包括 *tetO*、*tetW*、*sul1*、*sul2*、*ermB*、*lnuB*、*qnrA*、*qnrS*、*bla_{OXA-1}*、*bla_{TEM-1}*、*ant(9)-Ia*、*ant(6)-Ia* 和 *IntI1*,这些基因覆盖了四环素、磺胺、大环内酯、喹诺酮、 β -内酰胺和氨基糖苷类抗生素的主要抗性机制,同时纳入整合子基因 *IntI1* 以评估水平基因转移潜力。结合污染现状与可行性,最终确定 12 种抗生素抗性基因和 1 种可移动遗传元件检测标准目标物。

4 方法研究报告

4.1 方法研究的目标

建立水质中 12 种抗生素抗性基因和 1 种可移动遗传元件的分析方法标准。标准内容包括适用范围、方法原理、干扰和消除、实验材料和试剂、仪器和设备、样品采集和保存、样品制备、定性定量方法、结果表示、质量控制和质量保证等几方面的内容。方法应既适应当前生态环境保护工作需要,又满足当前实验室仪器设备要求。

4.1.1 方法标准适用范围

(1) 本标准适用于地表水、生活污水等水体中 *tetO*、*tetW*、*sul1*、*sul2*、*ermB*、*lnuB*、*qnrA*、*qnrS*、*bla_{OXA-1}*、*bla_{TEM-1}*、*ant(9)-Ia*、*ant(6)-Ia* 和 *IntI1* 等 12 种抗生素抗性基因和 1 种可移动遗传元件的测定。

(2) 本标准适用于水质 12 种抗生素抗性基因和一类整合子的实时荧光定量和高通量 PCR 方法。

4.1.2 本标准拟达到的特性指标

(1) 方法定量限和检出限要求：结合文献调研现有方法普遍实现的定量限范围为 100-1000 拷贝数。提出本方法定量限设定为 10-300 拷贝数的要求，检出限精确定标至 1-100 拷贝数。

(2) 精密度要求：3 种浓度水平的平行样品测试结果（大于等于 6 次）相对标准偏差应小于 15%。

(3) 正确度要求：计算实际检测值（大于等于 6 次）和理论值的绝对误差（E）和相对误差（RE）。本方法提出正确度平均相对误差小于 10%的要求。

4.2 方法原理

对水环境中的 DNA 进行提取和纯化，使用实时定量和高通量实时定量分析方法(qPCR)对水环境中抗生素抗性基因检测，使用染料法进行 qPCR，染料为 SYBR Green I。随着反应的进行，有双链形成之后，染料就会结合在双链形成的小沟上并且有荧光信号产生。每形成一个 DNA 双链，就有一定数量的染料结合上去，完成高温变性，低温复性，适温延伸的热循环，并遵守聚合酶链反应规

律。qPCR 反应产物不断累计，荧光信号强度也等比例增加。每经过一个循环，收集一次荧光强度信号，这样就可以通过荧光强度变化来监测产物量的变化，从而得到一条荧光扩增曲线。在 qPCR 扩增结束后，增加溶解曲线的步骤，监测扩增产物的特异性情况。符合曲线拟合扩增则检出。

4.3 试剂和材料

除非另有说明，分析时均使用符合国家标准的分析纯试剂和无目标物检出的纯水/新鲜制备的蒸馏水。

亲水聚四氟乙烯滤膜，孔径：0.22 μm 。

10×PBS 缓冲液。

FastDNA™ SPIN Kit DNA 提取试剂盒。

DP712 磁珠法 DNA 提取试剂盒。

qPCR 引物：13 种 ARGs 引物。

q PCR SYBR Green Master Mix。

4.4 仪器和设备

本实验所用仪器设备如下：

采样瓶：具塞玻璃瓶，玻璃材质，10 L。

抽滤装置（含真空泵）：配 0.22 μm 孔径亲水聚四氟乙烯滤膜，推荐水样处理体积 1-5 L。

恒温水浴锅：数控加热水浴锅，最高至 99 摄氏度。

涡旋振荡仪：用于振荡试剂。

低温离心机：转速范围：0~10000 r/min，可调节温度的离心机，一般将温度控制在 4 摄氏度。

水平电泳槽：放置凝胶并进行电泳。

电泳仪：提供稳定电压（通常设置 80-120 V）。

核酸浓度测定仪：DNA 浓度测定仪（微量）。

实时荧光定量 PCR 仪：适用于进样数量为 96 的 qPCR 测定仪器。

4.5 样品的采集和保存

4.5.1 样品采集

按照 GB/T 40226—2021 的相关规定进行水体样品的采集。

采样时应记录样品的名称、来源、采样量、保存状况、采样点位、采样日期、采样人员等信息。采样人员应及时填写采样记录或采样报告。

4.5.2 样品保存

水样的保存方法：1-5℃避光冷藏保存，参考标准 HJ 493—2009。

采集的水样也可现场进行过滤。根据水样的不同浊度，选择不同孔径的滤膜过滤，浊度较大的水样先使用大孔径滤膜过滤悬浮颗粒以及泥沙，然后再使用 0.22 μm 孔径的亲水聚四氟乙烯滤膜过滤；浊度较小的水样可直接选择 0.22 μm 的亲水聚四氟乙烯滤膜过滤。滤膜保存在 -80 °C 保存 1 个月内完成 DNA 提取工作。提取的 DNA 保存至 -20 °C，一个月内完成 DNA 浓度测定工作。提取的 DNA，应尽早上机检测，减少保存带来的损耗。

4.6 样品前处理

4.6.1 前处理方法

针对采集回来的水样，采用直接过膜法和低温高速离心法进行前处理方法比对，具体方法如下：

- (1) 直接过膜法：使 100 mL 水样直接通过 0.22 μm 孔径的滤膜，再将滤膜剪碎并置于离心管中，加入一定量的 PBS 缓冲液没过滤膜，涡旋振荡使滤膜表面物质分散至 PBS 缓冲液中，取出滤膜并用 PBS 缓冲液冲洗，冲洗液收集至离心管中，低温离心机 10000 r/m 离心 10 min。收集沉淀转移至裂解质管中，加入磷酸缓冲液和裂解液，涡旋振荡 10 min，然后 14000 r/min 下离心 10 min，离心结束后收集转移上清液准备进行后续 DNA 的提取。
- (2) 低温高速离心法：将 100 mL 样品于 10000 r/min 离心 10 min，弃去上清液，用灭菌后的 10 $\times$ PBS 溶液进行复溶，复溶液用于后续提取。

针对现场过滤获得的滤膜，将滤膜剪碎并置于离心管中，加入一定量的 PBS 缓冲液没过滤膜，涡旋振荡使滤膜表面物质分散至 PBS 缓冲液中，取出滤膜并用 PBS 缓冲液冲洗，冲洗液收集至离心管中，弃去滤膜即可。

4.6.2 前处理效果对比

从 DNA 提取浓度的角度进行对比：利用 FastDNA™ SPIN Kit DNA 提取试剂盒提取了上述两种方法获得的溶液，使用核酸浓度测定仪测定了 DNA 浓度，结果见表 4.6.1-1。发现相比于低温高速离心法，直接过膜法从地表水和生活污水中提取到更高浓度的 DNA。

表 4.6.1-1 两种水样前处理方法比较

组别	水样类型	水样体积	方法参数	平均值 (ng/ μL)	相对标准偏差
1			50 mm 直径 0.22 μm		
2		100 mL	孔径亲水聚四氟乙	21.67	0.04
3			烯滤膜		

L1	地表水		4 °C 10000 r/min 离		
L2			心 10 min	8.41	0.09
L3					
1			50 mm 直径 0.22 μm		
2			孔径亲水聚四氟乙	19.46	0.07
3		100	烯滤膜		
L1	生活污水	mL	4 °C 10000 r/min 离		
L2			心 10 min	5.03	0.11
L3					

表 4.6.1-1 组别：1、2、3 为直接过膜法；组别：L1、L2、L3 为低温高速离心法。

从菌体富集效率的角度进行对比：通过在新鲜的 LB 液体培养基中加入一定量（细胞数/mL）用以携带抗性基因的 *E.coli DH5 α* 的菌株进行前处理，过膜富集法，将大肠杆菌从水样中富集到膜上。确保按照富集方法的要求和操作步骤进行操作，以获得可靠的富集效果。将富集后的膜从过滤装置中取出，并将上面的大肠杆菌菌体洗净。可以使用适当的新鲜的 LB 液体培养基进行洗涤，以确保将菌体从膜上彻底回收。将洗涤后的菌体溶解并进行稀释，然后使用 OD 法（通过查阅得知大肠杆菌中 OD600=0.1 相当于菌浓度每 mL 有 10^7cfu 。），对菌体进行计数。确保使用适当的稀释倍数，以获得准确的菌体计数结果。具体步骤如下：（1）培养基准备。制备 100 mL 新鲜的 LB 液体培养基（高温灭菌）。（2）菌株培养。用移液器插上 200 μL 的无菌枪头往穿刺线里面插一点，然后把枪头打在新鲜的 LB 培养液里面在恒温培养箱过夜培养（37 °C 200 r/min）。取 3 mL 菌液用分光光度计测定 OD 值为 OD1。（3）富集浓缩。选用 0.22 μm 孔径的无菌滤膜，放置在过滤装置上。将含有 *E.coli DH5 α* 的 50 mL 菌液通过滤膜，细菌细胞会被截留在膜表面。取下装有富集细菌的滤膜，将膜表面的细菌用新鲜的 LB 培养液轻轻洗脱到 50 mL 离心管中，得到浓缩

的细菌样品。（4）将从过滤膜上洗脱下来的 50 mL 菌液样品充分混匀。将 50 mL 菌液用分光光度计测定 OD 值为 OD₂。（5）将 OD₁、OD₂ 分别按照 OD₆₀₀=0.1 相当于菌浓度每 mL 有有 10⁷ cfu 的关系换算对应的数量。计算菌体富集效率为：

$$\text{回收率} = \text{OD}_2 \text{ 换算后的 } E.coli \text{ 数量} / \text{OD}_1 \text{ 换算后的 } E.coli \text{ 数量} \times 100\%$$

表 4.6.1-2 水中菌体富集效率的验证

方法	初始 OD ₆₀₀	处理后 OD ₆₀₀	回收率	平均值
直接过膜法	0.515	0.613	119.02%	105.64%
	0.516	0.512	99.24%	
	0.519	0.512	98.65%	
低温高速离心	1.400	1.320	94.29%	92.72%
	1.373	1.221	88.93%	
	1.380	1.310	94.93%	

综合考虑上述验证结果和实际可操作性，采用直接过膜法，水体中 DNA 的提取效果较为理想。

4.7 DNA 提取方法对比

4.7.1 DNA 试剂盒提取效果

1. FastDNA™ SPIN Kit DNA 提取试剂盒提取原理及步骤

通过机械裂解-化学沉淀-硅胶膜吸附联用技术实现环境样本中 DNA 的高效提取。核心步骤依次为（1）细胞裂解：将样本与裂解基质（Lysing Matrix E）及磷酸钠缓冲液混合，通过涡旋振荡（6 m/s，40 s）和高温水浴（99℃）协同作用，机械破碎细胞壁并释放核酸；（2）杂质分离：加入 MT Buffer 和 PPS 溶液，通过离心（14,000g，10 min）去除细胞碎片及蛋白质沉淀，保留含 DNA 的上清液；（3）核酸富集：引入 Binding Matrix（二氧化硅基质），通过翻转吸附使

DNA 特异性结合至硅胶膜表面，经 SEWS-M 缓冲液洗涤去除腐殖酸等环境抑制剂；（4）DNA 洗脱：采用 DES 洗脱液（55℃预孵育）解离硅胶膜结合的 DNA，最终获得高纯度 DNA 溶液（A260/A280≈1.8），适用于 qPCR 扩增。

2. DP712 磁珠法 DNA 提取试剂盒提取原理及步骤

基于 DP712 磁珠法试剂盒，通过磁珠特异性吸附-梯度洗涤技术实现环境样本中 DNA 的高效纯化，尤其适用于腐殖酸含量高的水质样本。核心步骤依次为（1）样本裂解：样本与研磨珠、缓冲液 SA/SC 混合，经涡旋振荡（6 m/s，30 s×2 循环）或组织匀质仪破碎细胞壁；热裂解强化。针对革兰氏阳性菌或真菌基因组，采用 70-95℃加热（15 min）协同裂解，释放胞内 DNA；（2）杂质清除：加入缓冲液 SH 沉淀腐殖酸及多糖，离心（13,400×g，3 min）去除沉淀。异丙醇活化缓冲液 GFA 促进 DNA 与磁珠结合，通过磁力架分离磁珠-核酸复合物；（3）核酸纯化：去蛋白，RD 缓冲液（含乙醇）洗涤去除蛋白质及脂类。深度脱盐，PWD 缓冲液（含乙醇）梯度洗涤（2 次）清除环境抑制剂。干燥优化，磁珠室温晾干 5-10 min，彻底去除乙醇残留；（4）DNA 洗脱：采用 56℃预热的洗脱缓冲液 TB 解离磁珠-DNA 复合物，震荡孵育（5 min）提升回收率，最终获得高纯度 DNA（A260/A280≈1.8）。

DNA 提取结果见表 4.6.3-1。由此，FastDNA™ SPIN Kit for DNA 提取试剂盒的提取效果更为理想。

表 4.6.3-1 两种 DNA 提取试剂盒核酸浓度检测结果对比

组别	水样 体积	方法 参数	试剂盒 种类	浓度 ng/μL	浓度 平均值	相对标准 偏差
MPW1				41.00	43.60	0.44
MPW2				63.80		

MPW3	100 mL	50 mm 直径	FastDNA™	26.0		
MPH1		0.22 μm	SPIN Kit for	14.50		
MPH2		孔径	Soil 试剂盒	10.60	11.83	0.20
MPH3		亲水聚四		10.40		
TGW1		氟乙烯滤		2.88		
TGW2		膜		21.80	17.56	0.75
TGW3				28.00		
TGH1		在各个试	DP712 磁珠法	4.82		
TGH2		剂盒裂解	DNA 提取试	1.25		
		步骤后加	剂盒		2.37	0.90
TGH3		入 5 μL		1.03		
DNA 标品						

表 4.组别：MP 为 FastDNA™ SPIN Kit DNA 提取试剂盒，TG 为 DP712 磁珠法 DNA 提取试剂盒；W：生活污水，H：地表水。

4.7.2 DNA 样品质量判定

对上述方法获得的 DNA 样品进行质量判定,判定操作过程如下:

- (1) 浓度测定，荧光定量仪进行浓度测定；(2) 核酸完整性，琼脂糖电泳检测核酸完整性，依次分为无降解、轻微降解和重度降解；(3) 细菌微生物含量，利用 16S rRNA 特异性引物对提取的核酸样本进行 qPCR 验证，根据 Ct 值判定细菌微生物含量情况。

具体判定标准见表 4.6.4-1。

表 4.6.4-1 DNA 样品质量判断标准

样品类型	检测结果	16S rRNA Ct 值	判定结论
微生物 DNA	两次检测要求	无降解	A 类
	一次检测要求	轻微降解	B 类
	低于检测要求	重度降解	C 类
	两次检测要求	无降解	A 类

注 1: c—浓度(concentration)的缩写，此处指 DNA 浓度；

注 2: A 类样品应同时满足总量满足两次上机要求, $c \geq 10.0 \text{ ng}/\mu\text{L}$, 16S rRNA 扩增的 $Ct \leq 17$, 合格;

注 3: B 类样品应同时满足一次上机要求, $c \geq 10.0 \text{ ng}/\mu\text{L}$, 16S rRNA 扩增的 $17 < Ct \leq 20$, 合格;

注 4: C 类样品应满足少于一次上机要求的 80%, $20 < Ct$, 该样品判为 C 类, 不完全合格。

注 5: DNA 降解情况示例胶图见附件二: 1~3。

注 6: 本标准中加入 16S rRNA Ct 值, 主要参考团体标准 T/AHEPI 02-2020【环境微生物抗生素抗性基因检测 高通量荧光定量 PCR 法】, 用于进一步排查提取的核酸中是否有动植物核酸残留过高的情况。

4.8 质粒重组与 qPCR 反应体系建立

4.8.1 质粒构建

(1) 融合基因片段获取: 在 NCBI 数据库重使用 Primer blast 功能, 根据上下游引物序列, 找出 12 种抗生素抗性基因和 1 种可移动遗传元件的目的序列。并通过基因合成的手段对 13 种目的序列合并合成 1 条基因片段(由擎科生物完成), 即为本标准中构建标准质粒的融合基因片段。

(2) 利用 A-T 碱基的互补性, 将融合基因片段连接到 T 载体(pUC57 Simple Vector)中, 形成含有 12 种抗生素抗性基因和 1 种可移动遗传元件基因的重组质粒。在无菌离心管中加入 $4 \mu\text{L}$ 合成的融合基因片段和 $1 \mu\text{L}$ T-载体, 立即将离心管置于冰上; 轻摇混合, 在室温下 (20°C - 37°C) 反应 5 分钟使目的基因与载体连接, 反应结束。

(3) 转化: 将连接产物加于刚刚解冻 $50 \mu\text{L}$ *E.coil* DH5 α 感受态细胞中, 轻弹混匀后, 置于冰上 20-30 min; 冰浴后随即将其置 42°C

的水浴中热激 30 s，再立刻放在冰上 2 min，使构建的质粒 DNA 转入感受态细胞中。然后，向此菌液加入 250 μL 已灭菌液体新鲜 LB 液体培养基，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的摇床培养箱中 200 rpm 条件下孵育 1 小时使感受态细胞复苏；复苏后再取 100 μL 菌液均匀涂布在已准备好的含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 LB 固体平板上，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养箱中培养 12-16 h。培养完毕后，在无菌条件下，挑取白色菌斑接种至含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中，再置于在转速为 200 rpm 的摇床培养箱中，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 12-16 h 对含有融合基因的大肠杆菌进行扩大培养。

(4) 阳性重组子的测序鉴定。过夜培养后的菌液，用质粒提试剂盒 (OMEGA) 提取阳性克隆子中的质粒，然后以提取的质粒 DNA 作为模板，利用载体试剂盒中自带的引物 M13F、M13R 对在载体中插入的片段进行扩增和测序验证（由擎科生物完成），找到在多克隆位点插入的片段，然后将获得插入序列与融合基因片段比对，检测是否与融合基因序列一致，以此确定含有融合基因片段的标准质粒的制备是否成功。

最终，构建同时含有 13 种目标物的标准质粒，用于后续实验。

4.8.2 标准质粒稀释

针对每一个目标物，需制备系列浓度的标准质粒，具体步骤如下：

- a. 准确定量标准质粒的 DNA 浓度。
- b. 计算拷贝数。
- c. 进行 10 倍系列稀释，通常从 10^7 至 10^1 拷贝/ μL 。

4.8.3 引物设计和验证

a. 引物设计：确保引物特异性，避免与其他 ARGs 或微生物 DNA 交叉反应。

b. 确定 qPCR 反应体系和条件，以最大化效率和特异性。

公司合成的引物（干粉：有效期较长）首先用离心机微离，使得干粉聚集离心管底部（防止超净台稀释引物或探针时粉末被吹出，造成引物或探针量减少），分别用 TE buffer 稀释（推荐加入量参见引物合成报告对应项或产品标签）。

表 4.6.5.3-1 荧光定量 PCR 使用的引物序列

抗生素大类	抗性基因	引物序列
四环素类	<i>tetO</i>	F-AGAATCTGCTGTTTGCCAGTG R-CGGAGTGTCAATGATATTGCA
	<i>tetW</i>	F-ATGAACATTCCCACCGTTATCTTT R-ATATCGGCGGAGAGCTTATCC
磺胺类	<i>sul1</i>	F-CACCGGAAACATCGCTGCA R-AAGTTCCGCCGCAAGGCT
	<i>sul2</i>	F-TCATCTGCCAAACTCGTCGTTA R-GTCAAAGAACGCCGCAATGT
大环内酯类	<i>ermB</i>	F-CTATCTGATTGTTGAAGAAGGATT R-GTTTACTCTTGTTTAGGATGAAA
	<i>lnuB</i>	F-GATGTACGACGCACCAAACG R-CCAGTTCTTGGCGGTAAGGT
喹诺酮类	<i>qnrA</i>	F-CAGCAAGAGGATTTCTCACG R-AATCCGGCAGCACTATTACTC
	<i>qnrS</i>	F-GCAAGTTCATTGAACAGGGT R-GTCAGGAWAAACAACAATACC
β-内酰胺类	<i>bla_{OXA-1}</i>	F-TATCTACAGCAGCGCCAGTG R-CGCATCAAATGCCATAAGTG
	<i>bla_{TEM-1}</i>	F-CATTTTTCGTGTCGCCCTTAT R-GGGCGAAAACCTCTCAAGGAT
氨基糖苷类	<i>ant(9)-Ia</i>	FTTTGGTTCAGCAGTAAATGGTGGTT R-TTTGGAGGATATTGCCAAGGGAC

	<i>ant(6)-Ia</i>	F-TCGCCATGAGCTGCTGA R-CCTATCATACTCCGGATAGGCATA
1 类整合子	<i>IntI1</i>	F-GGCTTCGTGATGCCTGCTT R-CATTCCTGGCCGTGGTTCT

4.8.4 qPCR 反应设置

按照以下步骤设置 qPCR 反应体系：

- 将 qPCR 混合液、引物和模板 DNA 混合。
- 在 96 孔板中分配混合液。
- 加入不同浓度的标准品作为模板。
- 包含无模板对照 (NTC) 和无引物对照以检测污染和引物二聚体。

4.8.5 qPCR 循环条件

采用 25 μ L 的 qPCR 反应体系 (2 $\times$ TransStart Green qPCR Supermix 12.5 μ L、Forward Primer 1.0 μ L、Reverse Primer 1.0 μ L、ddH₂O 9.5 μ L、Template DNA 1 μ L)。每个 DNA 样品均设置三个平行样，同时设置空白对照。反应程序为：

预变性：94 $^{\circ}$ C，保持 40s。

40 个循环扩增：94 $^{\circ}$ C，保持 5s，60 $^{\circ}$ C 退火 15s，72 $^{\circ}$ C，保持 10s。

熔解曲线的检验：从 72 $^{\circ}$ C - 94 $^{\circ}$ C，每个循环升高 0.5 $^{\circ}$ C，且每 0.5 $^{\circ}$ C 记录一次，中间停留 30s，经 80 个循环完成。

4.8.7 qPCR 测定结果判定

使用 qPCR 仪器软件进行数据分析，包括：

- 设定基线和阈值。

- b. 记录每个循环阈值（Ct 值）。
- c. 确保标准曲线的相关系数（ R^2 ）至少为 0.990 且斜率在-3.3 到 -3.8 之间。
- e. 阳性与阴性的判定：由于本标准中基因数较多，所以根据美国相关标准 ASTM D8412-21（2021 年）将阳性及与阴性的分界线定为 $Ct=35$ ，当 $Ct \geq 35$ 判定为阴性， $Ct < 31$ 为阳性。具体见表 4.8.7。

表 4.8.5-1 抗生素抗性基因的检出判定

ARGs 类型	检出 Ct 值	检测结果表述
<i>tetO</i>	34.84	$Ct > 34.84$ 即为检出， 若 $Ct < 34.84$ 为未检出
<i>tetW</i>	34.56	$Ct > 34.56$ 即为检出， 若 $Ct < 34.56$ 为未检出
<i>sul1</i>	34.16	$Ct > 34.16$ 即为检出， 若 $Ct < 34.16$ 为未检出
<i>sul2</i>	33.60	$Ct > 33.60$ 即为检出， 若 $Ct < 33.60$ 为未检出
<i>ermB</i>	34.36	$Ct > 34.36$ 即为检出， 若 $Ct < 34.36$ 为未检出
<i>lnuB</i>	32.16	$Ct > 32.16$ 即为检出， 若 $Ct < 32.16$ 为未检出
<i>qnrA</i>	32.30	$Ct > 32.30$ 即为检出， 若 $Ct < 32.30$ 为未检出
<i>qnrS</i>	33.31	$Ct > 33.31$ 即为检出， 若 $Ct < 33.31$ 为未检出
<i>bla_{OXA-1}</i>	32.72	$Ct > 32.72$ 即为检出， 若 $Ct < 32.72$ 为未检出
<i>bla_{TEM-1}</i>	32.62	$Ct > 32.62$ 即为检出， 若 $Ct < 32.62$ 为未检出
<i>ant(6)-Ia</i>	33.44	$Ct > 33.44$ 即为检出， 若 $Ct < 33.44$ 为未检出
<i>ant(9)-Ia</i>	31.36	$Ct > 31.36$ 即为检出，

		若 Ct<31.36 为未检出
		Ct>31.40 即为检出，
<i>IntI1</i>	31.40	若 Ct<31.40 为未检出

4.9 标准曲线的构建

针对每一个目标物，需制备系列浓度的标准质粒，构建标准曲线。

具体步骤如下：

- 准确定量标准质粒的 DNA 浓度。
- 计算拷贝数。
- 进行 10 倍系列稀释，通常从 10^7 至 10^1 拷贝/ μL 。
- 利用 Ct 值与标准品拷贝数的对数构建标准曲线。目标物的标准曲线方程见表 4.9-1。标准曲线图见附件四。

表 4.9-1 目标物的标准曲线方程

ARGs 种类	标准曲线方程
<i>tetO</i>	$\text{Ct (value)} = -3.5726 \text{LgN (DNA Copies)} + 38.363$
<i>tetW</i>	$\text{Ct (value)} = -3.1559 \text{LgN (DNA Copies)} + 38.563$
<i>sul1</i>	$\text{Ct (value)} = -3.1822 \text{LgN (DNA Copies)} + 37.308$
<i>sul2</i>	$\text{Ct (value)} = -3.0279 \text{LgN (DNA Copies)} + 35.004$
<i>ermB</i>	$\text{Ct (value)} = -3.3503 \text{LgN (DNA Copies)} + 37.486$
<i>lnuB</i>	$\text{Ct (value)} = -3.2999 \text{LgN (DNA Copies)} + 34.787$
<i>qnrA</i>	$\text{Ct (value)} = -3.2673 \text{LgN (DNA Copies)} + 34.527$
<i>qnrS</i>	$\text{Ct (value)} = -3.3000 \text{LgN (DNA Copies)} + 35.829$
<i>bla_{OXA-1}</i>	$\text{Ct (value)} = -3.1550 \text{LgN (DNA Copies)} + 35.201$
<i>bla_{TEM-1}</i>	$\text{Ct (value)} = -3.1224 \text{LgN (DNA Copies)} + 34.233$
<i>ant(6)-Ia</i>	$\text{Ct (value)} = -3.1975 \text{LgN (DNA Copies)} + 36.245$
<i>ant(9)-Ia</i>	$\text{Ct (value)} = -3.2463 \text{LgN (DNA Copies)} + 35.187$
<i>IntI1</i>	$\text{Ct (value)} = -3.0532 \text{LgN (DNA Copies)} + 34.084$

4.10 测定

按照本方法的 qPCR 反应体系对水样的核酸样本进行测定。

4.11 空白分析

每批样品至少做两组空白试验，一组为超纯水+引物体系，另一组为超纯水体系。

4.12 结果计算与表示

标准质粒的质粒拷贝数按照如下公式计算：

$$N = \frac{6.02 \times C \times 10^{23}}{B \times 660}$$

式中：

N——质粒拷贝数，单位拷贝数/ml；

C——质粒浓度，单位 g/ml；

B——碱基数；

660——每个碱基的分子量，单位为道尔顿(Da)；

6.02×10^{23} ——每摩尔 DNA 所拷贝的次数，单位次拷贝数/mol。

4.13 方法特性参数

4.13.1 定量限及检出限

将上述稀释的梯度溶液每管中吸取 1 μ L DNA，上机测量 qPCR。

使用无核酸超纯水作为阴性对照组，同步进行 qPCR 测定。

记录每个基因每个浓度梯度的 Ct 值并根据对应的标准曲线计算出基因拷贝数，计算个基因拷贝的相对标准偏差 CV。

CV 公式：

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100\% = \frac{\sqrt{\frac{(\sum_{i=1}^n X_i - \bar{X})}{n-1}}}{\bar{X}} \times 100\%$$

判定方法:

CV 范围: $\leq 15\%$ (CV 的临界值), 若梯度 6 的 $CV < 15\%$, 梯度 7 出现 $CV > 15\%$, 则定量限为梯度 6 所对应的基因拷贝数。第一个梯度是 10^8 拷贝数, 稀释到第 8 个梯度的时候就是 10 个拷贝数, 即 10 个拷贝数, 然后对第 8 个梯度进行小梯度的稀释, 然后再进行 qPCR, 一直找到极限梯度 (出现阴性, Ct 值大于 35), 然后对极限那个梯度做 10 个以上的重复实验, 如果阳性 (Ct 值小于 35 依照美国标准) 率高于 90%, 则该梯度对应的拷贝数就是检出限。

表 4.6.6-1 目标物测定方法的定量限与检出限

ARGs 类型	LOQ 对应 Ct 值	LOQ (copies per run)	LOD 对应 Ct 值	LOD (copies per run)
<i>tetO</i>	32.04	58.93	34.84	9.66
<i>tetW</i>	31.15	222.61	34.56	19.32
<i>sulI</i>	32.51	32.14	34.16	1.84
<i>sul2</i>	31.30	16.75	33.60	2.91
<i>ermB</i>	32.49	31.04	34.36	8.01
<i>lnuB</i>	31.46	10.21	32.16	6.27
<i>qnrA</i>	30.58	16.14	32.30	4.82
<i>qnrS</i>	31.47	20.96	33.31	5.78
<i>bla_{OXA-1}</i>	31.51	14.80	32.72	6.11
<i>bla_{TEM-1}</i>	30.37	17.32	32.62	3.28
<i>ant(6)-Ia</i>	31.17	38.67	33.44	7.54
<i>ant(9)-Ia</i>	30.28	32.40	31.36	15.06
<i>IntI1</i>	30.97	10.45	31.40	7.54

4.13.2 精密度

4.13.2.1 样本提取精密度

提取污水中 DNA 样品进行精密度测定。水体 DNA 样品：提取 100 mL 使用直接过膜法处理得到的样品，使用 FastDNA™ SPIN Kit DNA 提取试剂盒进行 DNA 的提取，共计 6 次，使用紫外分光光度计检测浓度值分别记为 X_i ($i=1, 2, \dots, 10$)，根据数据计算重复性误差 CV 值。

表 4.13.2.1-1 生活污水精密度测试

序号	样本	提取核酸浓度 ng/μL	标准偏差 SD	平均值	CV
1	W1	24.26	0.47	24.97	1.88%
2	W2	24.50			
3	W3	25.07			
4	W4	25.31			
5	W5	25.38			
6	W6	25.29			

表 4.13.2.1-2 地表水精密度测试

序号	样本	提取核酸浓度 ng/μL	标准偏差 SD	平均值	CV
1	W1	26.79	0.11	26.93	0.41%
2	W2	26.92			
3	W3	27.03			
4	W4	26.81			
5	W5	27.03			
6	W6	27.01			

4.13.2.2 qPCR 检测精密度

使用中国计量科学研究院提供的 *sul1* 标准品质粒进行正确度的验证。将 *sul1* 标准品进行逐级梯度稀释。稀释 7 个梯度，做 1/10 的梯度稀释。找 8 连管，标号 1-7，每管加 45 μL 的超纯水，然后 1 号管加入 5 μL 标准质粒。1 号管盖上混匀后，取 5 μL 的 1 号管转入 2 号管，盖上 2 号管混匀，依次往下添加。并进行标准曲线绘制，并进行标准曲线的拟合。中国计量科学研究院提供的 *sul1* 已经通过数字 PCR 定标为 10^8 个拷贝，我们将其稀释至 10^3 个拷贝。按照本标准给出的 qPCR 体系和反应程序进行 6 次技术重复。测定结果分别计算平均值、标准偏差和相对标准偏差，要求相对标准偏差小于 15%。

表 4.13.2.2-1 qPCR 检测精密度

序号	Ct 值	Ct 值	Ct 值	Ct 值	Ct 值	Ct 值	标准 偏差 SD	平均 值	相对 标准 偏差
1	6.97	6.58	6.19	6.57	7.02	5.85	0.45	6.53	6.89%
2	10.34	10.09	9.88	10.09	10.28	9.75	0.23	10.07	2.28%
3	13.03	13.61	13.56	13.61	13.54	13.01	0.23	13.39	1.72%
4	16.74	17.13	17.25	17.12	16.80	16.72	0.21	16.96	1.24%
5	20.14	20.64	20.93	20.64	20.06	20.18	0.31	20.43	1.52%
6	24.56	24.16	23.39	24.17	23.32	24.50	0.54	24.02	2.25%

4.13.3 正确度

4.13.3.1 qPCR 检测正确度

中国计量科学研究院提供的 *sul1* 已经通过数字 PCR 定标为 10^8 个拷贝，我们将其稀释至 10^3 个拷贝，并将 10^3 个拷贝定为标准值。

对稀释为 10^3 个拷贝的质粒按照本标准给出的 qPCR 体系和反应程序进行 6 次技术重复，并根据 *sull* 的标准曲线计算出实际基因拷贝数。计算出实际基因拷贝数与标准值的绝对误差(E)和相对误差(RE)。平均相对误差小于 10%满足正确度要求。

$$E=X_i-X_T$$

X_i -测量值， X_T 为标准值

$$RE=\frac{E}{X_T}\times100\%$$

4.13.3.1-1 组 1 qPCR 正确度检测

序号	标准值	组 1 平行	绝对误差（E）	相对误差（RE）
1	10.73	10.97	0.24	2.24%
2	12.90	12.34	-0.56	4.34%
3	16.74	16.03	-0.71	4.24 %
4	20.08	20.74	0.66	3.29%
5	23.02	22.14	0.88	3.82%
6	26.81	24.56	-2.25	8.39%

4.13.3.1-2 组 2 qPCR 正确度检测

序号	标准值	组 2 平行	绝对误差（E）	相对误差（RE）
1	10.73	10.58	-0.15	1.40%
2	12.90	12.09	-0.81	6.28%
3	16.74	16.61	-0.13	0.78%
4	20.08	20.13	0.05	0.25%
5	23.02	23.64	0.62	2.69%
6	26.81	27.16	0.35	1.31%

4.13.3.1-3 组 3 qPCR 正确度检测

序号	标准值	组 3 平行	绝对误差（E）	相对误差（RE）
----	-----	--------	---------	----------

1	10.73	10.19	-0.54	5.03%
2	12.90	12.88	-0.02	0.16%
3	16.74	17.56	0.82	4.90%
4	20.08	20.25	0.17	0.85%
5	23.02	22.93	-0.09	0.39%
6	26.81	27.39	0.58	2.16%

4.13.3.1-4 组 4 qPCR 正确度检测

序号	标准值	组 4 平行	绝对误差 (E)	相对误差 (RE)
1	10.73	10.57	-0.16	1.49%
2	12.90	12.09	-0.81	6.28%
3	16.74	16.61	-0.13	0.78%
4	20.08	20.12	0.04	0.20%
5	23.02	23.64	0.62	2.69%
6	26.81	25.17	-1.64	6.12%

4.13.3.1-5 组 5 qPCR 正确度检测

序号	标准值	组 1 平行	绝对误差 (E)	相对误差 (RE)
1	10.73	9.92	-0.81	7.55%
2	12.90	13.28	0.38	2.95%
3	16.74	16.54	-0.20	1.19%
4	20.08	19.80	-0.28	1.39%
5	23.02	23.06	0.04	0.17%
6	26.81	27.32	0.51	1.90%

4.13.3.1-6 组 6 qPCR 正确度检测

序号	标准值	组 6 平行	绝对误差 (E)	相对误差 (RE)
1	10.73	10.85	0.12	1.12%
2	12.90	12.75	-0.15	1.16%

3	16.74	16.01	-0.73	4.36%
4	20.08	20.72	0.64	3.19%
5	23.02	23.18	0.16	0.70%
6	26.81	26.50	-0.31	1.16%

4.13.3.2 提取方法正确度

我们充分考虑了环境样本中核酸提取的正确度评估。经本实验室验证（见下表-标准质粒回收率），环境样本的核酸回收率普遍较低，这与化学类物质标准中可达到的提取效率存在显著差异。因此，本标准对提取方法的正确度要求进行了适应性调整，不再完全参照化学类物质标准。基于实验数据和实际可操作性，本标准规定：只要 DNA 提取质量经判定达到 A 级或 B 级，即可满足后续检测要求。这一规定既保证了检测结果的可靠性，又兼顾了实际操作的可行性，符合环境样本检测的技术特点。

表 4.8.6-1 标准质粒回收率

标准质粒投入拷贝数 N_0	提取完成后标准质粒拷贝数 N_1	标准质粒回收率 $C_1/C_0 \times 100\%$
91266000.4	14434261.27	15.82
	15407663.28	16.88
	17980026.04	19.70
	15056128.47	16.50
	14794806.94	16.21
	16628776.65	18.22
	8556796.235	9.38
	8495725.252	9.31
	7965331.941	8.73

	8645785.736	9.47
	10542063.8	11.55
	10668667.79	11.69

4.8.6-2 <i>tetO</i> Ct 值指标评估					
抗性基因	标号	Ct 值	平均值	标准差	RSD 值(%)
<i>tetO</i>	1	9.96	9.95	0.04	0.39
		9.98			
		9.93			
		9.89			
		9.99			
	2	11.67	11.65	0.43	0.37
		11.69			
		11.65			
		11.58			
		11.67			
	3	16.32	16.39	0.06	0.38
		16.35			
		16.40			
		16.49			
		16.39			
	4	20.68	20.75	0.09	0.45
		20.87			
		20.64			
		20.81			
	5	20.76	23.65	0.03	0.14
		23.63			
		23.66			

	23.69			
	23.68			
	23.61			
	27.30			
	27.28			
6	27.37	27.30	0.10	0.38
	27.40			
	27.13			
	31.81			
	32.01			
7	31.86	32.04	0.23	0.72
	32.12			
	32.39			
	35.30			
	35.43			
8	36.32	35.84	0.47	1.31
	35.89			
	36.28			

表 4.8.6-3 *tetW* Ct 值指标评估

抗性基因	标号	Ct 值	平均值	标准差	RSD 值(%)
<i>tetW</i>	1	13.02	12.98	0.05	0.37
		12.90			
		13.00			
		13.02			
		12.99			
	2	15.84	15.82	0.02	0.10
		15.82			
		15.80			

	15.80			
	15.82			
	19.56			
	19.49			
3	19.54	19.52	0.03	0.13
	19.50			
	19.51			
	21.22			
	21.20			
4	21.17	21.23	0.09	0.44
	21.17			
	21.39			
	25.17			
	25.10			
5	25.17	25.15	0.03	0.13
	25.16			
	25.17			
	28.94			
	28.95			
6	28.82	28.91	0.06	0.21
	28.96			
	28.87			
	31.53			
	31.22			
7	31.24	31.15	0.28	0.89
	30.98			
	30.80			
	35.75			
8		35.56	0.33	0.92
	35.73			

34.98
35.61
35.73

表 4.8.6-4 *sulI* Ct 值指标评估

抗性基因	标号	Ct 值	平均值	标准差	RSD 值(%)
<i>sulI</i>	1	11.68	11.65	0.038	0.33
		11.61			
		11.69			
		11.61			
		11.67			
	2	13.75	13.79	0.042	0.31
		13.76			
		13.78			
		13.86			
		13.78			
	3	18.95	18.97	0.041	0.22
		18.91			
		19.01			
		18.97			
		18.99			
	4	24.68	24.78	0.10	0.40
		24.89			
		24.68			
		24.80			
		24.87			
	5	28.88	28.75	0.12	0.41
		28.64			
		28.87			

	28.64			
	28.73			
	31.77			
	31.91			
6	31.97	31.86	0.12	0.38
	31.96			
	31.70			
	34.50			
	34.64			
7	34.78	34.51	0.24	0.68
	34.50			
	34.15			
	35.17			
	35.49			
8	34.64	35.16	0.33	0.94
	35.40			
	35.13			

表 4.8.6-5 *sul2* Ct 值指标评估

抗性基因	标号	Ct 值	平均值	标准差	RSD 值(%)
<i>sul2</i>	1	10.99	11.03	0.043	0.39
		11.01			
		11.02			
		11.10			
		11.00			
	2	16.06	16.10	0.074	0.46
		16.02			
		16.22			
		16.07			

	16.11			
	22.68			
	22.65			
3	22.70	22.67	0.041	0.18
	22.69			
	22.60			
	27.42			
	27.78			
4	27.70	27.65	0.14	0.45
	27.72			
	27.65			
	31.72			
	31.58			
5	31.66	31.65	0.053	0.18
	31.67			
	31.64			
	33.53			
	33.32			
6	33.33	33.43	0.10	0.30
	33.49			
	33.50			
	35.32			
	35.09			
7	35.08	35.30	0.22	0.61
	35.58			
	35.43			
	35.72			
8	35.58	35.60	0.32	0.91
	35.07			

35.71
35.93

表 4.8.6-6 *ermB* Ct 值指标评估

抗性基因	标号	Ct 值	平均值	标准差	RSD 值(%)
<i>ermB</i>	1	14.94	14.91	0.062	0.42
		14.99			
		14.82			
		14.89			
		14.93			
		16.85			
	2	16.78	16.86	0.059	0.35
		16.94			
		16.89			
		16.84			
		20.89			
		20.77			
	3	20.85	20.82	0.045	0.22
		20.81			
		20.80			
		24.07			
		24.08			
		24.13			
	4	24.09	24.10	0.026	0.11
		24.12			
		28.41			
		28.41			
		28.40			
		28.37			
	5	28.41	28.40	0.018	0.062
		28.40			
		28.37			

	28.40			
	33.31			
	32.99			
6	33.11	33.12	0.12	0.36
	33.11			
	33.07			
	34.16			
	34.14			
7	34.56	34.49	0.32	0.93
	34.76			
	34.81			
	35.10			
	35.39			
8	35.24	35.36	0.36	1.02
	35.97			
	35.10			

表 4.8.6-7 *lnuB* Ct 值指标评估

抗性基因	标号	Ct 值	平均值	标准差	RSD 值(%)
<i>lnuB</i>	1	14.07	14.08	0.036	0.26
		14.03			
		14.10			
		14.12			
		14.08			
		18.65			
	2	18.51	18.63	0.078	0.42
		18.72			
		18.66			

	18.60			
	21.90			
	22.02			
3	21.98	21.97	0.046	0.21
	21.99			
	21.99			
	25.52			
	25.55			
4	25.50	25.53	0.094	0.38
	25.67			
	25.41			
	29.41			
	29.47			
5	29.46	29.46	0.071	0.24
	29.58			
	29.40			
	32.36			
	32.46			
6	32.26	32.46	0.18	0.57
	32.44			
	32.75			
	34.29			
	34.81			
7	34.13	34.46	0.32	0.93
	34.27			
	34.80			
	35.05			
8	34.86	35.16	0.30	0.85
	34.99			

35.26
35.12

表 4.8.6-8 *qnrA* Ct 值指标评估

抗性基因	标号	Ct 值	平均值	标准差	RSD 值(%)
<i>qnrA</i>	1	11.98	11.98	0.060	0.50
		11.89			
		12.01			
		11.96			
		12.05			
	2	16.98	16.91	0.074	0.44
		16.98			
		16.82			
		16.91			
		16.85			
	3	21.32	21.38	0.038	0.16
		21.41			
		21.40			
		21.36			
		21.40			
	4	24.33	24.42	0.10	0.41
		24.35			
		24.35			
		24.55			
		24.50			
	5	27.38	27.38	0.020	0.075
		27.37			
		27.35			
		27.40			

	27.39			
	30.38			
	30.37			
6	30.42	30.38	0.041	0.13
	30.40			
	30.31			
	34.73			
	34.13			
7	34.27	34.58	0.36	1.04
	34.94			
	34.84			
	35.85			
	35.30			
8	34.50	35.30	0.33	0.94
	35.20			
	35.13			

表 4.8.6-9 *qnrS* Ct 值指标评估

抗性基因	标号	Ct 值	平均值	标准差	RSD 值(%)
<i>qnrS</i>	1	11.56	11.52	0.049	0.42
		11.44			
		11.51			
		11.56			
		11.50			
		15.97			
	2	15.98	15.95	0.044	0.28
		15.96			
		15.87			
		15.98			

	19.85			
	19.95			
3	19.95	19.91	0.043	0.22
	19.90			
	19.89			
	21.90			
	21.89			
4	21.93	21.92	0.036	0.17
	21.98			
	21.91			
	25.49			
	25.69			
5	25.63	25.60	0.072	0.28
	25.57			
	25.60			
	29.33			
	29.31			
6	29.32	29.33	0.012	0.042
	29.32			
	29.35			
	33.42			
	33.67			
7	33.14	33.47	0.38	1.14
	34.01			
	33.10			
	35.02			
8	35.99	35.31	0.42	1.20
	35.08			
	35.49			

34.99

表 4.8.6-10 *bla*_{OXA-1} Ct 值指标评估

抗性基因	标号	Ct 值	平均值	标准差	RSD 值(%)
<i>bla</i> _{OXA-1}	1	11.84	11.88	0.046	0.39
		11.85			
		11.96			
		11.88			
		11.89			
		15.79			
	2	15.80	15.82	0.037	0.23
		15.80			
		15.88			
		15.84			
		19.81			
		19.84			
	3	19.88	19.81	0.054	0.27
		19.74			
		19.79			
		22.97			
		23.02			
		23.02			
	4	23.10	23.02	0.051	0.22
		22.99			
		27.84			
		27.89			
		27.79			
		27.75			
	5	27.85	27.83	0.052	0.19

		30.59			
		30.34			
	6	30.48	30.46	0.10	0.33
		30.49			
		30.38			
		34.43			
		34.67			
	7	34.55	34.51	0.25	0.72
		34.77			
		34.13			
		35.90			
		35.21			
	8	36.09	35.72	0.36	1.01
		35.92			
		35.48			

表 4.8.6-11 *bla*_{TEM-1} Ct 值指标评估

抗性基因	标号	Ct 值	平均值	标准差	RSD 值(%)
<i>bla</i> _{TEM-1}	1	9.98	9.92	0.044	0.44
		9.92			
		9.98			
		9.86			
		9.90			
	2	11.84	11.80	0.057	0.48
		11.82			
		11.83			
		11.70			
		11.83			
	3	17.65	17.70	0.064	0.36

	17.78			
	17.62			
	17.71			
	17.73			
	24.49			
	24.52			
4	24.50	24.53	0.052	0.21
	24.62			
	24.51			
	28.72			
	28.78			
5	28.78	28.75	0.030	0.11
	28.72			
	28.73			
	32.99			
	32.90			
6	32.99	32.90	0.15	0.45
	32.97			
	32.64			
	35.09			
	35.39			
7	35.24	35.37	0.25	0.71
	35.76			
	35.35			
	35.38			
	35.90			
8	36.02	35.62	0.33	0.92
	35.55			
	35.27			

表 4.8.6-12 *ant(6)-Ia* Ct 值指标评估

抗性基因	标号	Ct 值	平均值	标准差	RSD 值(%)
<i>ant(6)-Ia</i>	1	10.35	10.33	0.042	0.41
		10.27			
		10.08			
		10.30			
		10.32			
	2	13.83	13.82	0.042	0.30
		13.86			
		13.79			
		13.86			
		13.76			
	3	17.46	17.44	0.078	10.46
		17.33			
		17.43			
		17.55			
		17.44			
	4	23.41	23.46	0.080	0.34
		23.56			
		23.35			
		23.46			
		23.50			
	5	27.30	27.24	0.12	0.45
		27.30			
		27.03			
		27.22			
		27.33			
	6	31.99	31.93	0.063	0.20

		32.00			
		31.87			
		31.91			
		31.88			
		34.37			
		35.66			
	7	35.59	35.17	0.62	1.76
		34.69			
		35.59			
		35.90			
		35.55			
	8	35.04	35.44	0.35	1.00
		35.59			
		35.12			

表 4.8.6-13 *ant(9)-Ia* Ct 值指标评估

抗性基因	标号	Ct 值	平均值	标准差	RSD 值(%)
<i>ant(9)-Ia</i>	1	10.35	10.37	0.015	0.14
		10.38			
		10.38			
		10.38			
		10.36			
	2	13.57	13.64	0.066	0.48
		13.67			
		13.72			
		13.64			
		13.58			
	3	18.40	18.38	0.047	0.25
		18.43			

	18.35			
	18.31			
	18.40			
	24.25			
	24.22			
4	24.21	24.23	0.018	0.074
	24.23			
	24.25			
	28.69			
	28.71			
5	28.63	28.67	0.038	0.13
	28.63			
	28.70			
	33.76			
	33.16			
6	33.65	33.42	0.31	0.93
	33.05			
	33.46			
	35.28			
	35.586			
7	35.56	35.28	0.29	0.82
	35.02			
	34.98			
	35.02			
	35.09			
8	35.77	35.3	0.41	1.16
	35.09			
	35.86			

表 4.8.6-14 *Int11* Ct 值指标评估

抗性基因	标号	Ct 值	平均值	标准差	RSD 值(%)
<i>Int11</i>	1	9.89	9.92	0.048	0.48
		9.88			
		9.99			
		9.96			
		9.89			
	2	15.95	15.93	0.051	0.32
		15.99			
		15.91			
		15.94			
		15.85			
	3	18.56	18.54	0.032	0.17
		18.53			
		18.52			
		18.50			
		18.57			
	4	24.85	24.90	0.039	0.16
		24.94			
		24.89			
		24.94			
		24.90			
	5	28.38	28.43	0.057	0.20
		28.49			
		28.41			
		28.50			
		28.40			
	6	32.85	32.72	0.18	0.55
		32.58			

	32.65			
	32.96			
	32.55			
	35.34			
	35.02			
7	34.53	34.97	0.30	0.86
	35.09			
	34.87			
	35.46			
	35.10			
8	35.47	35.40	0.20	0.57
	35.34			
	35.65			

4.14 方法验证

4.14.1 方法验证方案

按照《环境监测分析方法标准制订技术导则》（HJ 168-2020），组织多家有资质的实验室进行验证。根据影响方法的精密度和正确度的主要因素和数理统计学要求，编制方法验证报告，验证数据主要包括定量限、检出限、精密度、正确度以及标准质粒加标回收率等。

方法检出限、精密度、正确度等方法特性指标均按照 HJ168-2020 附录 A 的规定进行验证，验证结果符合方法特性的要求。考虑到方法验证实验数据的一致性，以及邮寄成本，实验室用水、实验中所用到的溶剂和样品瓶等耗品由各实验室自行准备；地表水、生活污水等样品和有证标准溶液由生态环境部南京环境科学研究所提供。联系人负

责接收样品和有证标准物质并提交测试数据报告。

4.14.2 方法验证过程

筛选有资质的验证单位，向验证单位提供方法草案、验证方案、标准溶液和验证报告格式。验证单位按照验证方案准备实验用品，在规定时间内完成验证实验并反馈验证结果报告。在方法验证前，参加验证的操作人员应熟悉和掌握方法原理、操作步骤及流程。方法验证过程中所用的试剂和材料、仪器和设备及分析步骤应符合方法相关要求。

4.14.2.1 方法验证前期准备

通过筛选确定有资质的验证单位。按照方法验证方案准备实验用品，与验证单位确定验证时间。在方法验证前，确保参加验证的操作人员已经熟悉和掌握方法原理、操作步骤及流程。方法验证过程中所用的试剂和材料、仪器和设备及分析步骤应符合方法相关要求。

4.14.2.2 方法定量限与检出限验证

按照样品分析的全部步骤进行分析，参考 HJ168-2020 附录 A 中检出限的计算原理并根据本本编制说明 4.13.1 定量限及检出限计算公式得出方法得出定量限和检出限。最终方法的定量限为各实验室所得定量限数据的最高值，检出限为各实验室做得检出限的最高值。

4.14.2.3 精密度验证

参考 HJ168-2020 的指控要求，并依据 4.13.2.1 样本提取精密度和 4.13.2.2 qPCR 检测精密度验证实验。每类样品水平测试 6 个平行样品，分别计算其平均值、标准偏差、相对标准偏差等。

4.14.2.4 正确度验证

依据 4.13.3.1 qPCR 检测正确度：6 家实验室分别对经数字 PCR 定标的特定拷贝数浓度的 *sul1* 质粒标准品进行不低于 6 次的实际测定，计算相对误差。

4.14.3 方法验证结论

4.14.3.1 检出限和测定下限

6 家实验室按照本标准中样本提取的全部步骤进行核酸提取和 qPCR 检测，根据 4.13.1 定量限及检出限计算公式得出方法得出定量限和检出限。

4.14.3.1-1 目标物定量限和检出限的最高值（拷贝数）

基因	定量限最高值	检出限最高值
<i>ant(6)-Ia</i>	42.49	10.88
<i>ant(9)-Ia</i>	47.26	11.55
<i>bla_{OXA-1}</i>	18.37	4
<i>bla_{TEM-1}</i>	24.17	5.31
<i>ermB</i>	38.84	9.65
<i>IntI1</i>	21.85	5.52
<i>lnuB</i>	14.73	3.12
<i>qnrA</i>	19.09	5.54
<i>qnrS</i>	32.74	8.85
<i>sul1</i>	52.01	13.46
<i>sul2</i>	29.22	7.63
<i>tetO</i>	92.54	23.03
<i>tetW</i>	241.59	60.8

4.14.3.2 精密度

6 家实验室采用 qPCR 法对定标为 1000 拷贝数的 *sul1* 标准品分别进行了 6 次重复测定：实验室内相对标准偏差分别为 2.21%~9.30%。实验室间相对标准偏差分别为 8.62%~13.05%。

4.14.3.3 正确度

6 家实验室对计量院提供的定标的 *sul1* 标准质粒，按照本标准给出的 qPCR 体系和反应程序进行 6 次技术重复。计算实际检测拷贝数与理论拷贝数的平均相对误差。平均相对误差为 3.71%~8.43%。

4.14.3.4 整体结论

采用直接过膜-高效 DNA 试剂盒提取-实时荧光定量 PCR 法测定，12 种 ARGs 和 1 种可移动遗传元件的方法定量限最高值范围为 14.73~241.59 拷贝数，检出限最高值范围为 3.12~60.8 拷贝数。对定标为 1000 个拷贝的 *sul1* 标准品分别进行了 6 次重复测定：实验室内相对标准偏差分别为 2.21%~9.30%，实验室间相对标准偏差分别为 8.62%~13.05%并计算实际检测拷贝数与理论拷贝数的平均相对误差。平均相对误差为 3.71%~8.43%。

5 与相关标准的关系分析

本标准团体标准，标准内容与我国现行其他标准协调一致。

本标准可以为《关于印发遏制微生物耐药国家行动计划（2022-2025 年）的通知》、《多重耐药菌防控工作方案》、《多重耐药菌监测与管理指南》等管理文件提供检测依据。

目前，与 ARGs 检测相关的标准主要包括《细菌常见主要耐药基因检测技术》（DB21/T 2872-2017）和《结核分枝杆菌耐药基因芯片

检测基本要求》（GB/T 36136-2018）。前者采用传统 PCR 技术，后者基于基因芯片技术，但两者均无法实现 ARGs 的精准定量检测，难以满足环境介质中 ARGs 痕量监测的需求。此外，《固体废弃物堆肥处置中抗生素抗性基因检测技术规范》（DB23/T 2932—2021）虽采用了实时荧光定量 PCR（qPCR）技术，但其针对固体废弃物堆肥介质，在样品前处理及 DNA 提取方法上与水质样品存在显著差异，无法直接适用于水质中 ARGs 的检测。因此，制定《水质 12 种抗生素抗性基因和 1 种可移动遗传元件的测定 实时荧光定量 PCR 法》标准，不仅填补了水环境中 ARGs 定量检测标准的空白，还为精准评估抗生素耐药性环境风险提供了技术支撑，对完善新污染物治理体系具有重要意义。

6 采用国际标准的程度及水平说明

美国 ASTM（American Society of Testing Materials）建立了 qPCR 法测定液体燃料和燃料相关水中的微生物 DNA，水研究基金会（Water Research Foundation）建立了 qPCR 法测定地表水、废水以及循环水中微生物 DNA。标准方法具体情况如表 6-1。

ASTM D8412-21（2021 年）建立了 qPCR 法测定液体燃料和燃料相关水中的微生物 DNA，其中采用了磁珠法提取分离水中 DNA。本标准在 DNA 提取方法部分选用了相同试剂盒作为对比。DRPT-5052 2023 采用 qPCR 测序技术、内参基因（如 16S rRNA 基因）校正微生物群落差异、阳性对照（加标回收实验）验证提取效率、阴性对照排除交叉污染。本标准相关实验过程参考借鉴了以上方法。

表 6-1 主要国家、地区及国际组织关于抗生素抗性基因的标准分析方法

标准来源	标准名称	标准编号	分析对象	分析方法	适用范围
美国 ASTM	Standard Guide for Quantification of Microbial Contamination in Liquid Fuels and Fuel-Associated Water by Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)	ASTM D8412-21 (2021 年)	DNA	qPCR	液体燃料 和染料相 关水样
	Standardizing Methods with QA/QC Standards for Investigating the Occurrence and Removal of Antibiotic Resistant Bacteria/Antibiotic Resistance Genes (ARB/ARGs) in Surface Water, Wastewater, and Recycled Water	DRPT- 5052 2023	DNA	qPCR	地表水、 废水以及 循环水

7 重大分歧或重难点的处理经过和依据

本标准制定符合《环境监测分析方法标准制订技术导则》（HJ 168-2020）提出的技术要求，采用的分析技术成熟度高，广泛应用于 ARGs 的监测，无重大分歧。

在方法学验证过程中，针对环境水体 DNA 提取效率偏低的质控难题，编制组系统开展了多维度技术验证：选取地表水（低浊度）、生活污水（高浊度）两类典型水质样本，分别采用 FastDNA™ SPIN

Kit、DP712 磁珠法及 OMEGA E.Z.N.A.® Stool DNA Kit 水样提取试剂盒进行平行提取实验 (n=36)，并通过 DNA 标准品 (*E.coli*) 加标回收验证，结果显示平均回收率仅为 $12.3\% \pm 2.1$ (RSD= 10.1%)。经横向对比 3 种市售试剂盒性能数据，确认环境样本 DNA 回收率普遍低于 15% 属行业共性技术瓶颈，其主要原因在于：裂解步骤中革兰氏阳性菌破壁不充分、离心分离过程中小片段 DNA (<200 bp) 流失，以及洗脱阶段硅胶膜/磁珠表面 DNA 残留。基于此，编制组参考了美国 ASTM 标准《Standard Guide for Quantification of Microbial Contamination in Liquid Fuels and Fuel-Associated Water by Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)》(ASTM D8412-21)、《猪流行性腹泻病毒经典与变异毒株鉴别 qPCR 法》(DB 22/T 3087—2019)、《禽流感病毒通用荧光 RT-PCR 检测方法》(GB/T19438.1—2004)、《有机肥中活性大肠杆菌快速测定 PMA-qPCR 法》(DB12/T 1271—2023)。本标准中实验数据表明，在满足提取 DNA 浓度 $\geq 10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，质量判定为等级 A 或 B，胶图显示 DNA 片段完整等要求的前提下，DNA 提取效率的差异不会显著影响后续 qPCR 定量结果的准确性。

8 标准推广应用措施及预期效果

标准发布实施后，通过在网站、公众号发布新闻等方式开展标准文本解读与宣贯；在各监测机构或科研机构对相关科研实验人员开展培训，形成培训记录；加强探索本标准的多学科及跨学科的应用方式，在监测、科研、第三方检测等多领域展开推广。

本标准工作符合国家生态环境监测标准预研究工作要求，标准编制单位将进一步申报制定地表水中抗生素抗性基因检测方法标准相关的行业和国家标准。2024 年 12 月 24 日，中国环境监测总站发布

2024 年国家生态环境监测标准预研究项目清单，本标准主编人员倪妮作为负责人承担《水环境抗生素抗性基因检测方法标准》的标准预研究工作，为本标准转化为行业标准奠定良好基础。

参考文献

- [1] Jian, Z., Zeng, L., Xu, T., Sun, S., Yan, S., Yang, L., Dou, T. (2021). Antibiotic resistance genes in bacteria: Occurrence, spread, and control. *Journal of Basic Microbiology*, 61(12), 1049-1070.
- [2] 朱永官, 陈青林, 苏建强, 等. 环境中抗生素与抗性基因组的研究[J]. *科学观察*, 2017, 12(6): 60-62.
- [3] 朱永官, 欧阳纬莹, 吴楠, 等. 抗生素耐药性的来源与控制对策[J]. *中国科学院院刊*, 2015, 30(4): 509-51
- [4] Forsberg, K. J., Reyes, A., Wang, B., Selleck, E. M., Sommer, M. O., Dantas, G. (2012). The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science*, 337(6098), 1107-1111.
- [5] 周谊霞, 田永明. 急危重症护理学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2016.
- [6] Infectious Diseases Society of America (IDSA). Combating antimicrobial resistance: policy recommendations to save lives[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2011, 52(suppl_5): S397-S428.
- [7] Machado E C, Freitas D L, Leal C D, et al. Antibiotic resistance profile of wastewater treatment plants in Brazil reveals different patterns of resistance and multi resistant bacteria in final effluents[J]. *Science of the Total Environment*, 2023, 857: 159376.
- [8] Goh S G, You L, Ng C, et al. A multi-pronged approach to assessing antimicrobial resistance risks in coastal waters and aquaculture systems[J]. *Water Research*, 2024, 266: 122353.
- [9] Jiang C, Zhao Z, Zhu D, et al. Rare resistome rather than core resistome exhibited higher diversity and risk along the Yangtze River[J]. *Water Research*, 2024, 249: 120911.
- [10] Zhou Z, Zhu R, Song Y, et al. Penguin-Driven Dissemination and High Enrichment of Antibiotic Resistance Genes in Lake Sediments across Antarctica[J]. *Environmental Science & Technology*, 2024, 58(32): 14460-14474.
- [11] Yang Y, Li H, Wang D, et al. Metagenomics of high-altitude groundwater reveal different health risks associated with antibiotic-resistant pathogens and bacterial resistome in the latitudinal gradient[J]. *Water Research*, 2024, 262: 122032.
- [12] 吴韵斐, 何义亮, 袁其懿, 等. 水源型水库抗生素抗性基因赋存特征研究[J]. *环境科学学报*, 2019, 39(6): 1834-1841.
- [13] Szekeres E, Chiriac C M, Baricz A, et al. Investigating antibiotics, antibiotic

resistance genes, and microbial contaminants in groundwater in relation to the proximity of urban areas[J]. *Environmental Pollution*, 2018, 236: 734-744.

[14] An X L, Su J Q, Li B, et al. Tracking antibiotic resistome during wastewater treatment using high throughput quantitative PCR[J]. *Environment International*, 2018, 117: 146-153.

附件一 初稿审查会专家意见汇总处理表

序号	章条号 (按照条目顺序排列)	意见内容	处理意见	处理结果
专家：张秀兰				
1	11.质量控制	需要根据标准编制规范要求，对文本和编制说明中数据的表述方式、语言逻辑、项目编号（如“11.质量控制 下的条款编号从“a”重新开始，建议调整为 11.1）等进行修改和完善。	采纳	已调整编号格式
2	5.方法原理；6 试剂和材料	补充完善第 5 和第 6 部分内容，如缺少对 1%琼脂糖凝胶电泳、采样瓶材质体积、恒温水浴锅的温度范围等内容的描述。	采纳	已完善相关内容
3	9.实验方法	实验内容中缺少对照组	采纳	本实验的对照组为 qPCR 实验中设置的超纯水对

				照组
4	4.3 试剂和材料；4.4 仪器和设备	编制说明：明确标准中样品富集体积，仪器和设备应满足实验需要。	采纳	已补充样品富集体积和相关仪器设备参数
5	附录	编制说明：数据统计时，应注意数字有效位数，根据标准编制要求做相应的修改。	采纳	已统一有效数字
6	附录	补充实验室间比对的验证内容和数据统计。	采纳	已补充
专家：王丽媛				
1	1.范围	本文件规定了水环境中抗生素抗性基因的测定方法，修改为本文件规定了水中 12 种抗生素抗性基因和 1 种可移动遗传元件的实时荧光定量 PCR 法。	采纳	已修改为本文件规定了水中 12 种抗生素抗性基因和 1 种可移动遗传元件的实时荧光定量 PCR 法。
2	1.范围	范围：本文件适用于四环素类(tetO、tetW)、磺	采纳	已表述水体类型

		胺类(sul1、sul2)、MLS类(ermB、lnuB)、喹诺酮类(qnrA、qnrS)、 β 内酰胺类(bla OXA-1、bla TEM-1)、氨基糖苷类(ant(9)-Ia、ant(6)-Ia)抗性基因和一类整合子(IntI1)的测定。需明确表述地表水、地下水……水体的类型。		
3	1.范围	本文件适用于用实时荧光定量 PCR 和高通量实时荧光定量 PCR 法进行环境检测的机构。不应该对方法适用的监测机构列入范围，此部分是对设备的要求及检测方法的要求，考虑列入设备。	采纳	已修改为：“本文件规定了使用实时荧光定量 PCR 仪、高通量实时荧光定量 PCR 仪及相关检测方法开展环境监测的仪器设备要求和操作规范。”
4	2.规范性引用文件	规范性引用文件是考虑	未采纳	已修改

		都不带年代号。		
5	8.仪器和设备	7.1、7.2 标题和内容应合并。仪器设备应说清规格，例如采样瓶的材质和容量、离心机的离心力或者转速范围等。	采纳	已将标题及内容合并并对仪器设备说明进行补充
6	9.实验方法	样品的采集及保存，不应归在实验方法里。请对照标准要求的格式，重新调整采样及样品保存、样品制备、空白样品制备归属的章节	采纳	已将样品采集及保存等内容调整至 8 样品
7	5.样品的采集及保存；9 实验方法	8.1 样品的采样和保存与样品的前处理，没有表述采样量。过滤的内容重复，是否应用抽滤等需要与样品前处理章节一并考虑，重新划分样品采集保存、样品制备内容。	采纳	已在对应内容上添加采集量并删除重复内容

8	7.试剂和材料	6 试剂和材料章节没有提及配置曲线的标准溶液。后文中用到的试剂需要标明在试剂和材料章节的序号。	采纳	配置曲线的标准溶液其实是提取的 DNA 溶液，已添加试剂对应的材料章节序号
9	11.精确度	精密度和正确度数据应有试验数据支撑	采纳	精密度和正确度数据添加至附录 D
专家：杨凤霞				
1	5 方法原理	专业术语问题，在 5 方法原理部分，“在 qPCR 扩增结束后，增加溶解曲线的步骤，监测扩增产物的特异性情况”，其中验证扩增产物特异性的“溶解曲线”（Melting Curve），而非“溶解曲线”。请核查修正。	采纳	已将“溶解曲线”改为“熔解曲线”
2	8 样品	PTFE 建议补充缩略语说明	采纳	已修改为“亲水聚四氟乙烯”并将 PTFE 删除
3	8.2 样品前处理	8.2 样品前处理部分，提	采纳	已补全单位

		到的 10000 r 和 14000 r 需要补全转速的单位， “r/min”?		
4	8.5.2b 部分	8.5.2b 部分的“形成含有 目的耐药性基因的重组 质粒”，建议将其中的 “耐药性基因”修改为“抗 性基因”，与全文保持统 一	采纳	已将“耐药性基因”修改 为“抗性基因”
5	8.5.2e	8.5.2e 部分的“换算公式 为换算公式：”存在重复 词组，建议删除后者。	采纳	已将“换算公式为换算公 式：”重复部分删除
6	8.6c 部分的 溶解曲线的 检验	8.6c 部分的 溶解曲线的 检验：“72°C-94°C，每循 环升高 0.5°C”与“80 个循 环完成“是不匹配的，请 进一步审查温度范围或 者循环数	采纳	已将 “72°C-94°C，每循 环升高 0.5°C”与“80 个循 环完成”修改为 “使用 仪器默认溶解曲线采集 程序”
7	9c 数据处理	9c 数据处理部分的标准 曲线的相关系数	采纳	已将 R^2 “0.99”修改为 “0.990”

		R ² “0.99”建议修改为”0.990“。		
8	10.1 精密度部分	10.1 精密度部分的句首“对对特定浓度水平...”，存在字重复，请删除多余的。	采纳	已将“对对特定浓度水平...”中的重复删除
9	表 1	表 1 中的一类整合酶基因 建议统一为” <i>Int1</i> “	采纳	已进行统一
10	编制说明：1.1 任务来源	在编制说明中 1.1 任务来源中“ <i>Escherichiacoli</i> 、 <i>Salmonella</i> “，细菌名称需要斜体，并大肠杆菌名字中缺少空格，应为 <i>Escherichia coli</i> 。	采纳	已进行斜体修改
专家：张霖琳				
1	1 范围	①范围规定了“水环境中.....”建议与标准名称一致，改为“水质”或具体哪些类型的水质；不是“适用于.....的机	采纳	已修改为：“本文件规定了使用实时荧光定量 PCR 仪、高通量实时荧光定量 PCR 仪及相关检测方法开展环境监测的

		构”，		仪器设备要求和操作规范。”
2	1 范围	②请确认规范性引用文件是否有些需要列出版本日期，且有些标准名称不对；	采纳	已删除日期，并更正标准名称
3	5 方法原理；7 仪器与设备	③建议方法原理简化，只写关键步骤的原理；仪器设备下面的二级标题不用再细分仪器和设备，按顺序列出即可，且采样瓶等也不属于仪器，设备中又是仪器。	采纳	以简化方法原理为：“本方法基于 SYBR Green I 染料的实时荧光定量 PCR 技术，通过特异性引物扩增水环境 DNA 中的目标基因。在 PCR 循环中，染料嵌入双链 DNA 并释放荧光信号，其强度与产物量成正比。系统实时监测荧光值，生成扩增曲线，反映靶基因的指数增长。扩增后，熔解曲线分析验证产物特异性（ Tm 值

				匹配)。阳性判定需满足：Ct 值在标准曲线范围内，且熔解峰与对照一致。适用于本标准规定的 12 种 ARGs 和 1 种 MGE 的高灵敏定量检测。”并合并了仪器与设备内容。
4	9 实验方法；12 质量保证与质量控制	④8.6、9 和 11 等下面的序号不应用 abc.....，各级标题写法统一	部分采纳	8.6 与 9 为步骤顺序，故使用 abc 排序，已对 12 质量控制进行序号更正
5	12 质量保证与质量控制	⑤在文本的写法和表述上，建议与上一个标准保持一致，如质量保证和质量控制等。	采纳	已改为“12 质量保证与质量控制”
专家：任立人				
1		补充完善 6 家实验室分析验证资料	采纳	已补充
2		标准编制说明中的 1.2 主要工作过程按照本标准	采纳	已修改

		编制阶段表述相关内容 (如标准网上征求意见 及意见处理等尚未开展 的工作可先不写)		
3		P3,应按标准表述方式规范 3.6 术语内容的表述	采纳	已修改
4	条文 8.5 抗性基因标准 曲线的绘制 b	条文 8.5 抗性基因标准 曲线的绘制 b 中, 应说明 T 载体的具体类型 (8.5.2 b)	采纳	已添加 T 载体具体类型
5	附录 C 表 C.1	附录 C 表 C.1, 16S 应统一为 16S rRNA CT 值	采纳	已统一格式为 16S rRNA CT
6	全文	一些单位写法前后要保持统一(如: CT 和 Ct、 μL 和 μl 等)	采纳	已统一格式为 Ct、 μL
专家: 苏冠勇				
1	5 方法原理	文中出现明显错别字, 其中验证扩增产物特异性的“溶解曲线”应改为“熔解曲线”(Melting	采纳	已将“溶解曲线”改为“熔解曲线”

		Curve) 。		
2	编制说明：1.1 任务来源	“Escherichiacoli、 Salmonella”，文中细菌 名称需要斜体，建议更 正	采纳	已进行更正
专家：朱冬				
1	3 术语与定义	抗性基因标准中术语和 定义里面可能需要对一 类整合子进行定义	采纳	已对 1 类整合子定义进 行补充
2	5 方法原理	抗性基因的标准中方法 原理章节中可能需要提 一下利用已知浓度的质 粒制作标准曲线进行定 量	未采纳	已更改方法原理为：“本 方法基于 SYBR Green I 染料的实时荧光定量 PCR 技术，通过特异性 引物扩增水环境 DNA 中 的目标基因。在 PCR 循 环中，染料嵌入双链 DNA 并释放荧光信号， 其强度与产物量成正 比。系统实时监测荧光 值，生成扩增曲线，反

				映靶基因的指数增长。扩增后，熔解曲线分析验证产物特异性（Tm 值匹配）。阳性判定需满足：Ct 值在标准曲线范围内，且熔解峰与对照一致。适用于本标准规定的 12 种 ARGs 和 1 种 MGE 的高灵敏定量检测。”
3	起草人	抗性基因标准中第一个起草人的姓名编制说明与标准初稿里不一致	采纳	已进行更改

附件二 DNA 降解情况示例胶图

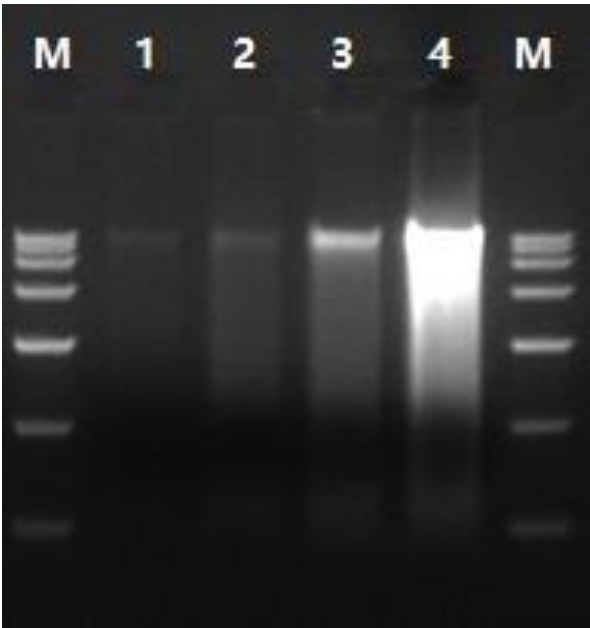


图 1 DNA 轻微降解胶图

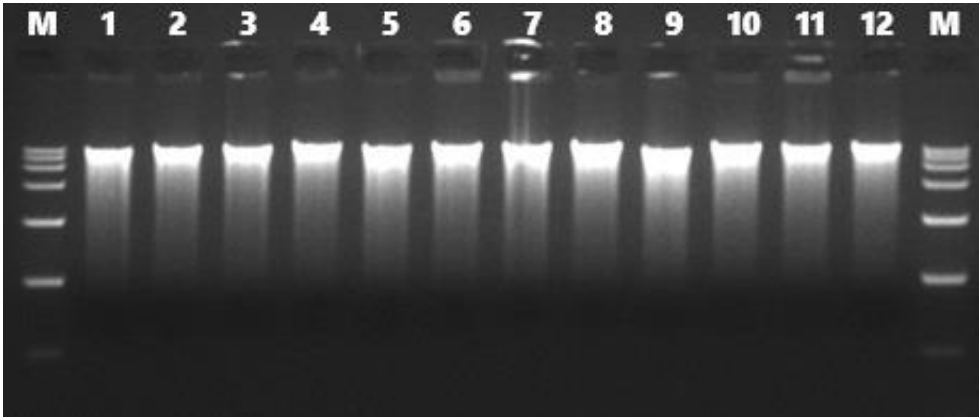


图 2 DNA 无降解胶图

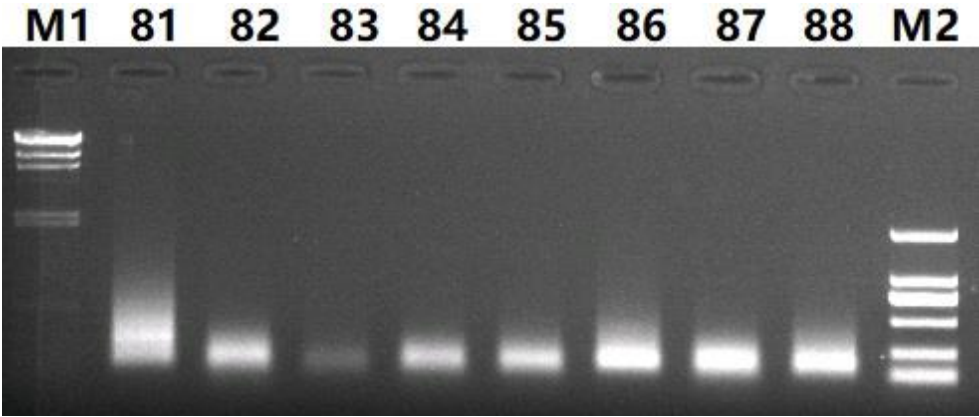


图 3 DNA 重度降解胶图

附件三 目标物的标准曲线图

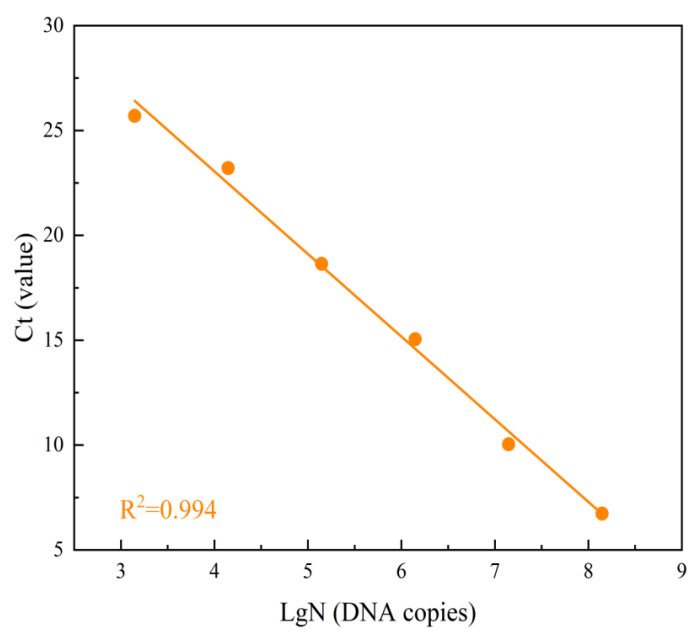


图 1 16S rRNA 标准曲线

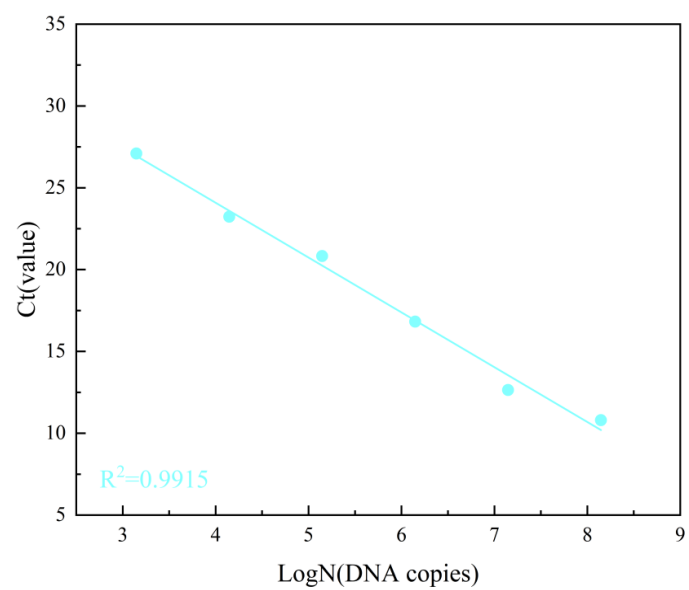


图 2 *ermB* 标准曲线

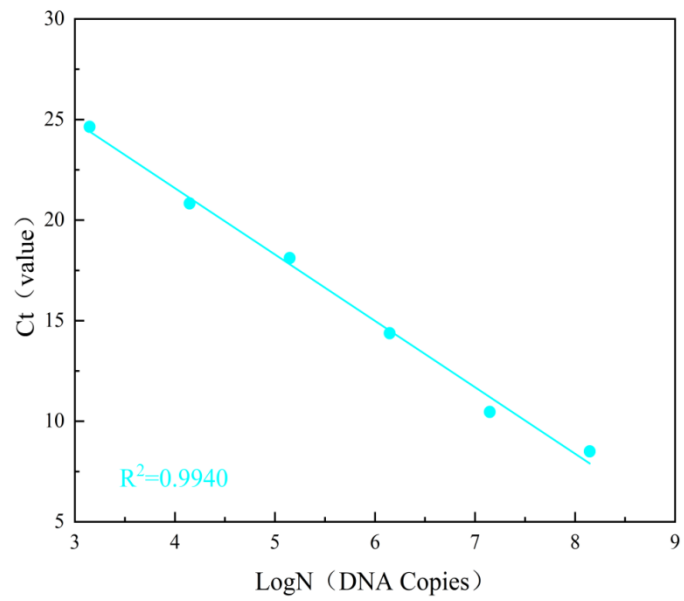


图 3 *lnuB* 标准曲线

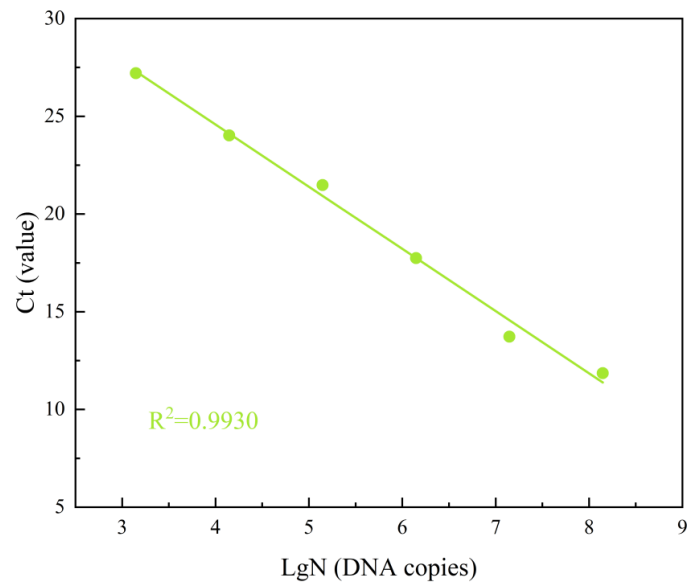


图 4 *sul1* 标准曲线

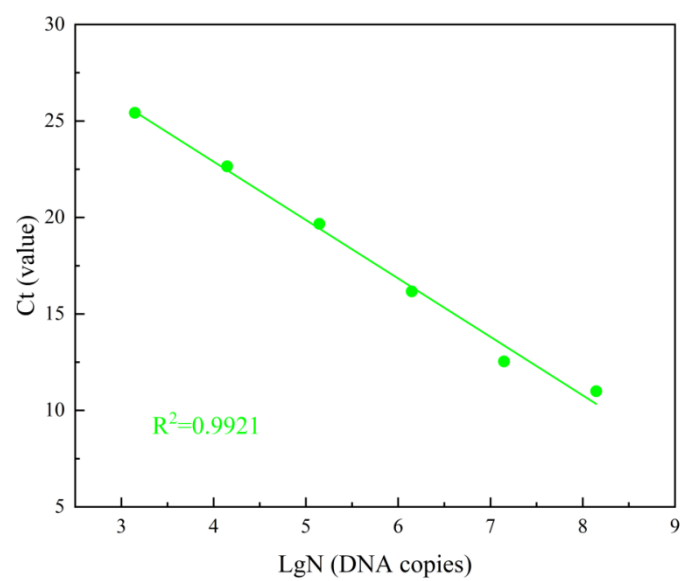


图 5 *sul2* 标准曲线

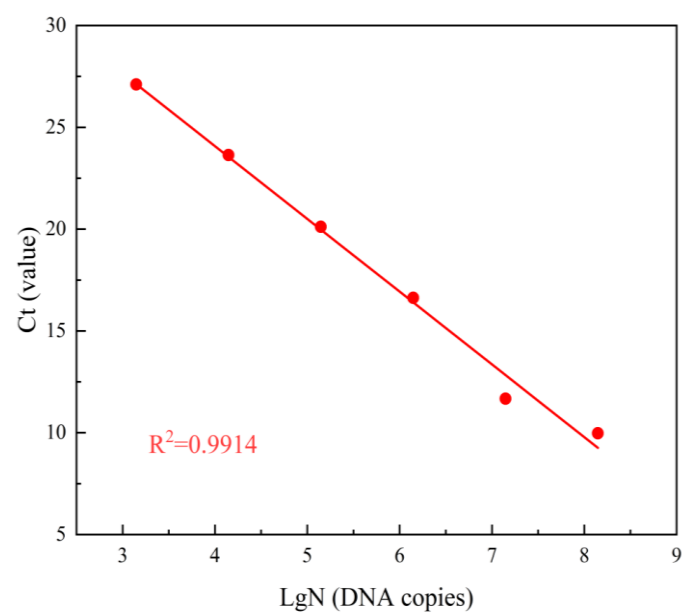


图 6 *tetO* 标准曲线

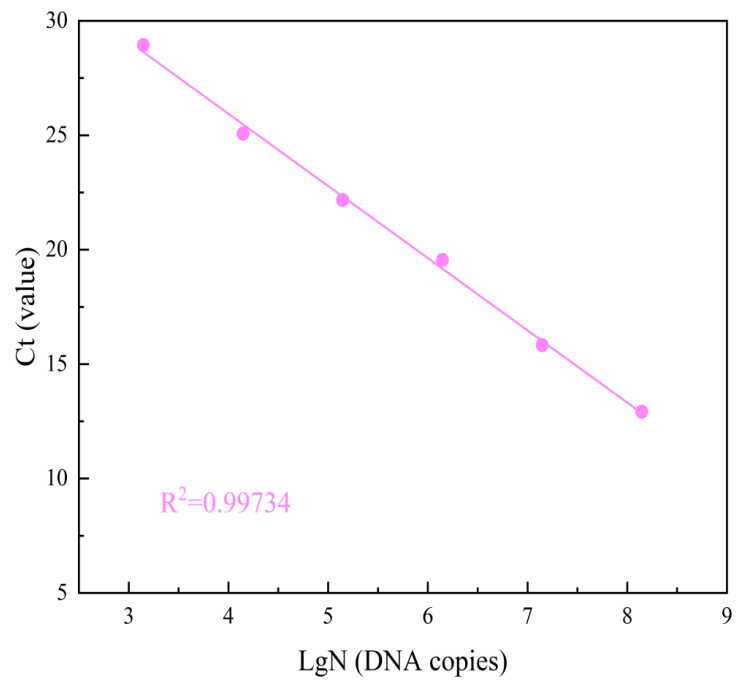


图 7 *tetW* 标准曲线

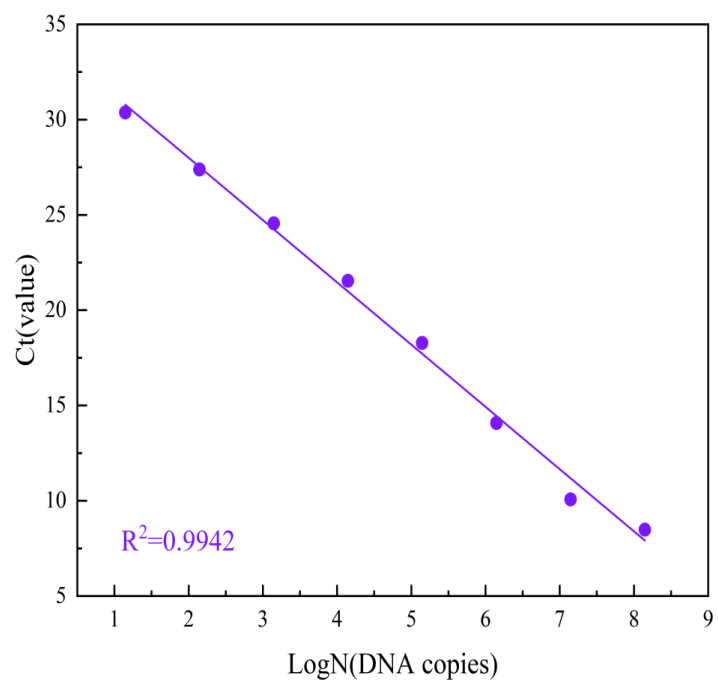


图 8 *qnrA* 标准曲线

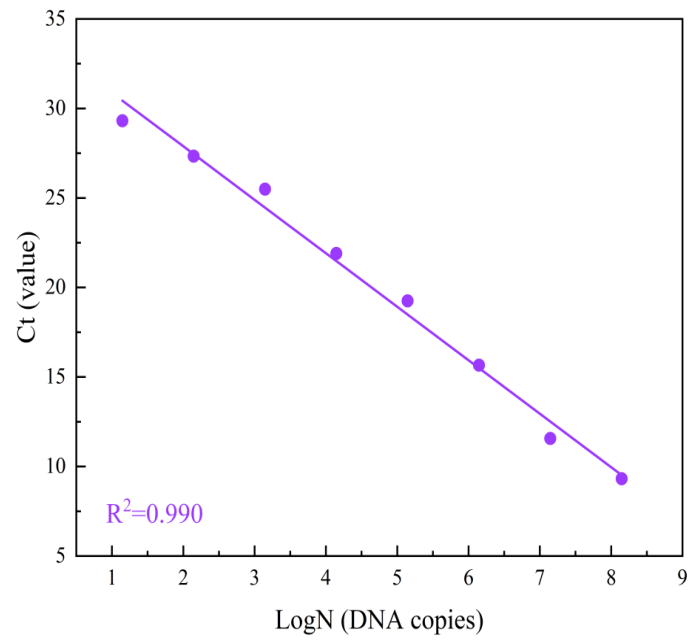


图 9 *qnrS* 标准曲线

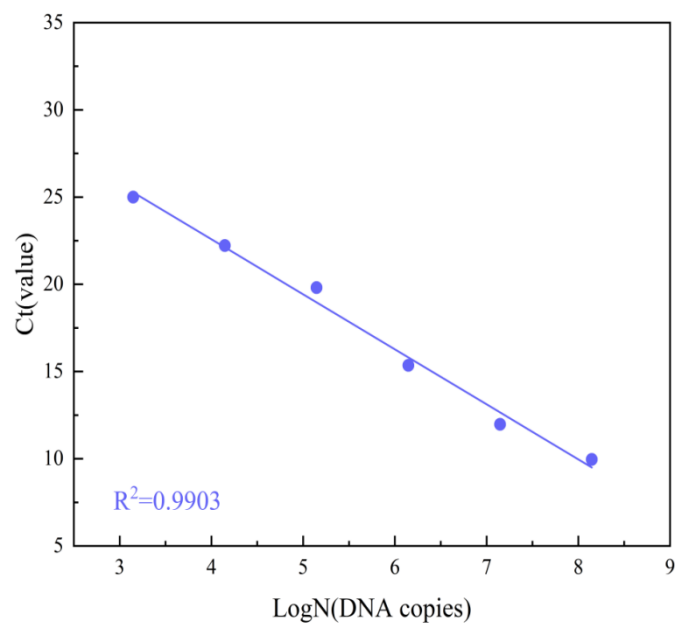


图 10 *blaOXA-1* 标准曲线

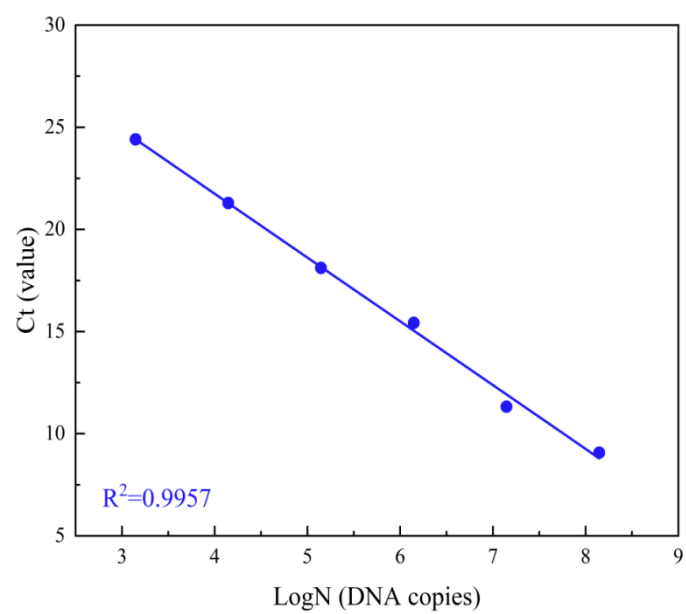


图 11 *bla*_{TEM-1} 标准曲线

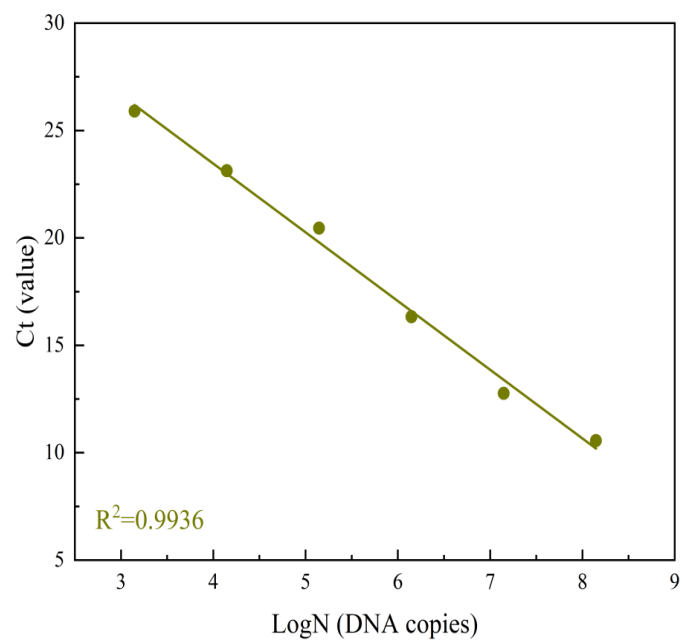


图 12 *ant(6)-Ia* 标准曲线

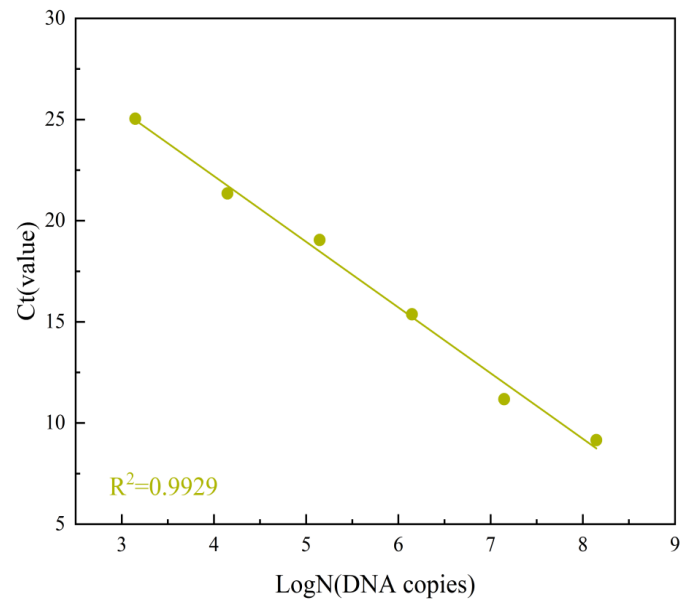


图 13 *ant(9)-Ia* 标准曲线

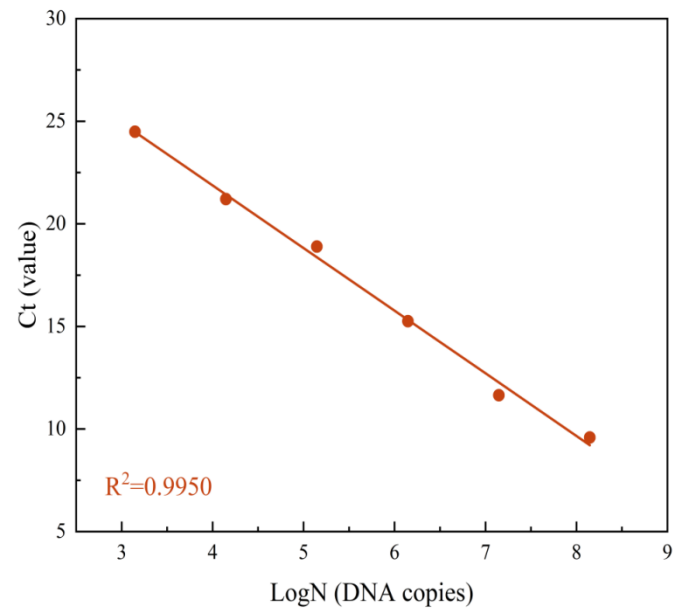


图 14 *IntI1* 标准曲线