SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1632.2—2005

奶粉中阪崎肠杆菌检验方法 第2部分:PCR方法

Detection of Enterobacter sakazakii from dehydrated powdered milk—Part 2:PCR method

2005-08-18 发布　　2006-02-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局　发布

前　言

SN/T 1632《奶粉中阪崎肠杆菌检验方法》分为三个部分：

——第1部分：分离与计数方法；

——第2部分：PCR方法；

——第3部分：荧光PCR方法。

本部分为SN/T 1632的第2部分。

本部分的附录A为规范性附录，附录B为资料性附录。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位：中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国天津出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：高旗利、张霞、罗茂凰、张海滨、张海英、赵贵明、姚霞。

本部分系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

奶粉中阪崎肠杆菌检验方法
第2部分:PCR方法

1 范围

SN/T 1632的本部分规定了奶粉中阪崎肠杆菌的PCR检验方法。

本部分适用于奶粉中阪崎肠杆菌的快速检验,其他食品可参照执行。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过SN/T 1632本部分的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本部分,然而,鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本部分。

SN/T 1632.1 奶粉中阪崎肠杆菌检验方法 第1部分:分离与计数方法

3 定义、术语和缩略语

下列术语、定义和缩略语适用于SN/T 1632的本部分。

3.1

阪崎肠杆菌 Enterobacter sakazakii

阪崎肠杆菌为肠杆菌科肠杆菌属革兰氏阴性无芽孢杆菌,周身鞭毛有动力,大多数产黄色素,具有α-葡萄糖苷酶活性。

3.2

聚合酶链式反应 polymerase chain reaction

聚合酶链式反应,简称PCR。使用两段(通常长度为15个~25个核苷酸)寡脱氧核苷酸作为反应的引物,这两段寡脱氧核苷酸引物的序列应不发生互补作用,但它们可以和称为模板的待测DNA两条链上的特定位点分别发生互补。反应液包括含有镁离子的反应缓冲液、4种脱氧核苷三磷酸(dNTP)、模板DNA、引物及热稳定DNA聚合酶组成。在DNA聚合酶催化下,通过温度数十个循环的反复变化(DNA变性、退火及延伸)而获得两个互补位点之间DNA片段的大量拷贝。

3.3 缩略语

3.3.1 PCR:polymerase chain reaction,简称PCR。

3.3.2 DNA:deoxyribonucleic acid,脱氧核糖核酸。

3.3.3 dNTP:deoxyribonucleoside triphosphate,脱氧核苷三磷酸。

3.3.4 dATP:deoxyadenosine triphosphate,脱氧腺苷二磷酸。

3.3.5 dCTP:deoxycytidine triphosphate,脱氧胞苷三磷酸。

3.3.6 dGTP:deoxyguanosine triphosphate,脱氧鸟苷三磷酸。

3.3.7 dTTP:deoxythymidine triphosphate,脱氧胸苷三磷酸。

3.3.8 dUTP:deoxyuridine triphosphate,脱氧尿苷三磷酸。

3.3.9 UDG:uracil DNA glycosylase,尿嘧啶DNA-糖基酶。

3.3.10 bp:base pair,碱基对。

3.3.11 *Taq*:Thermus aquaticu,水生栖热菌。

3.3.12 Tris:tris(hydroxymethyl) aminomethane,三(羟甲基)氨基甲烷。

3.3.13 TE:Tris-HCl、EDTA 缓冲液。

4 检验方法

4.1 方法提要

奶粉经增菌后,采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA,以提取的 DNA 为模板进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳检验 PCR 产物是否有特征条带,从而对奶粉中是否污染阪崎肠杆菌进行快速检验。

4.2 试剂和材料

除另有规定外,试剂为分析纯或生化试剂,水为灭菌双蒸水。

4.2.1 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤(MLST)(见附录 A.1)。

4.2.2 脑心浸液(BHI)(见附录第 A.2 章)。

4.2.3 营养肉汤(NB)(见附录第 A.3 章)。

4.2.4 引物:

5'-GGGTTGTCTGCGAAAGCGAA-3'

5'-GTCTTCGTGCTGCGAGTTTG-3'

4.2.5 Taq DNA 聚合酶。

4.2.6 dNTP:dATP、dTTP、dCTP、dGTP。

4.2.7 阪崎肠杆菌质控菌株:ATCC 29544。

4.2.8 琼脂糖:分析纯。

4.2.9 溴化乙锭。

4.2.10 分子量标记:100 bp DNA ladder。

4.2.11 DNA 提取试剂:细菌基因组 DNA 提取试剂盒。

4.2.12 TE 缓冲液:10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)、1 mmol/L EDTA(pH 8.0)。

4.2.13 10×PCR 缓冲液:200 mmol/L Tris-HCl(pH 8.4)、200 mmol/L 氯化钾、15 mmol/L 氯化镁。

4.2.14 5×TBE 电泳缓冲液:Tris 54 g、硼酸 27.5 g、0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)20 mL,加蒸馏水至 1 000 mL,使用时稀释为 0.5×TBE 电泳缓冲液。

4.2.15 6×加样缓冲液:30 mmol/L EDTA、36%(体积分数)甘油、0.05%(质量浓度)二甲苯腈蓝 FF、0.05%(质量浓度)溴酚蓝。

4.2.16 结晶紫中性红胆盐葡萄糖琼脂(VRBGA)(见附录第 A.4 章)。

4.2.17 显色培养基琼脂(Xα-GIcA)(见附录第 A.5 章)。

4.3 仪器和设备

4.3.1 天平:量程 2 kg,感量 0.1 g。

4.3.2 PCR 仪。

4.3.3 离心机。

4.3.4 紫外凝胶成像仪。

4.3.5 电泳仪。

4.2.6 pH 计。

4.3.7 移液器:2 μL～10 μL、10 μL～100 μL、20 μL～200 μL、100 μL～1 000 μL。

4.3.8 恒温培养箱。

4.3.9 恒温水浴锅。

4.4 检验程序

阪崎肠杆菌 PCR 检验程序见图 1。

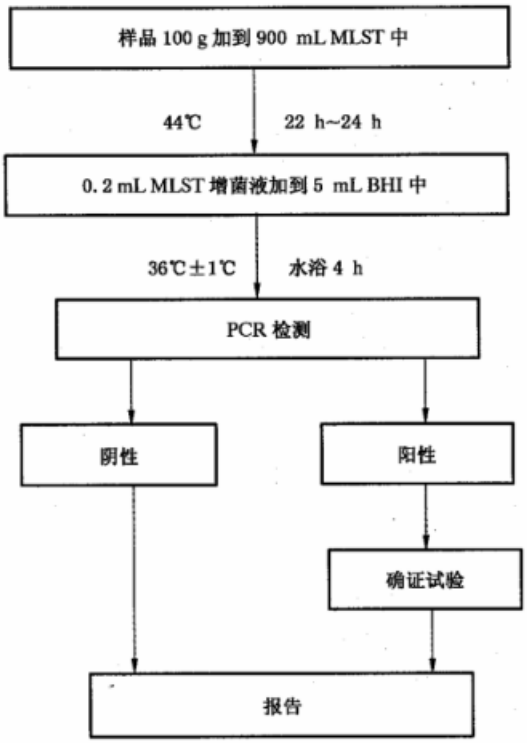


图 1 阪崎肠杆菌 PCR 检验程序

4.5 步骤

4.5.1 增菌

无菌称取奶粉试样 100 g,加到已预热的(44℃)装有 900 mL MLST 的 2 L 三角瓶中,振摇使样品充分混匀后,44℃恒温培养 22 h~24 h。在液面 1 cm 以下取 MLST 增菌液 0.2 mL 加到装有 5 mLBHI 的小试管中,混匀,36℃±1℃恒温水浴 4 h,水面要高于试管中培养基高度。

4.5.2 模板 DNA 提取

取 BHI 增菌液 1.5 mL,10 000 r/min 离心 2 min,尽量倒尽上清液。按细菌基因组 DNA 提取试剂盒操作说明书提取模板 DNA,所提取的模板 DNA 溶于 50 μL TE 中。剩余 BHI 增菌液 36℃±1℃恒温过夜培养,以备确证试验使用。

4.5.3 PCR 扩增

反应体系体积为 50 μL:10×PCR 缓冲液 5 μL、引物对(10 μmol/L)各 2 μL,dNTP(10 mmol/L) 1 μL,*Taq*DNA 聚合酶(5U/μL)0.5 μL、水 38.5 μL 模板 DNA 1 μL。反应条件:94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,57℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,进行 35 个循环,72℃延伸 5 min,4℃下保存。

4.5.4 质控

检验过程中要设阳性对照、阴性对照和空白对照。分别接种阪崎肠杆菌和金黄色葡萄球菌到 10 mL NB中,36℃±1℃过夜培养,各取 1.5 mL 增菌液,离心,提取 DNA 模板。阪崎肠杆菌 DNA 模板作阳性对照,金黄色葡萄球菌 DNA 模板作阴性对照,空白对照加水 1 μL。

4.5.5 PCR 扩增产物电泳检验

用 0.5×TBE 电泳缓冲液配制 1.5%琼脂糖电泳凝胶并趁凝胶未凝固时加入溴化乙锭使其最终浓度达到 1 μg/mL,制胶。在电泳槽中加入电泳缓冲液,使液面没过胶面。将 7.5 μLPCR 扩增产物分别和 1.5 μL 6×加样缓冲液混合,点样,其中一孔加入 100 bpDNA ladder。9 V/cm 恒压,电泳 20 min~30 min。紫外凝胶成像仪下观察电泳结果,拍照并记录结果。

5 结果及判断

5.1 PCR 扩增产物电泳检验结果

阪崎肠杆菌 PCR 扩增产物为 282 bp。

5.2 结果判断

阴性对照和空白对照均未出现条带；阳性对照出现预期大小的扩增条带；待测样品出现预期大小的扩增条带，怀疑存在阪崎肠杆菌，需进一步确证；待测样品未出现预期大小的扩增条带，为阴性结果。

5.3 确证试验

取 36℃±1℃恒温培养的相应 BHI 增菌液接种于 VRBGA 及 Xα-GIcA 中，按照 SN/T 1632.1 规定，挑取可疑菌落并进行鉴定。

5.4 结果表述

PCR 扩增产物电泳检验结果阳性，且经确证为非假阳性，每 100 g 奶粉中检出阪崎肠杆菌。

PCR 扩增产物电泳检验结果阴性，每 100 g 奶粉中未检出阪崎肠杆菌。

6 废弃物处理和防止污染的措施

检验过程中的废弃物，收集后焚烧处理。

检验过程中防止交叉污染的措施参见附录 B。

附 录 A
（规范性附录）
培养基制作

A.1 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤(MLST)

A.1.1 成分

胰酪胨	20.0 g
氯化钠	34.22 g
乳糖	5.0 g
磷酸氢二钾	2.75 g
磷酸二氢钾	2.75 g
月桂基硫酸钠	0.1 g
万古霉素	0.01 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.1.2 制法

除万古霉素外将各成分加入蒸馏水中，加热溶解，调节 pH 至 6.8±0.2。121℃高压灭菌 15 min。万古霉素配成 10 mg/mL 的溶液，用 0.2 μm 的滤膜过滤除菌。临用时，取 1mL 万古霉素溶液加到 1 000 mL MLST 中。

A.2 脑心浸液(BHI)

A.2.1 成分

犊牛脑	200.0 g
牛心	250.0 g
多价蛋白胨	10.0 g
葡萄糖	2.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠	2.5 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.2.2 制法

将除去结缔组织并绞碎的犊牛脑和牛心肌分别加水各 500 mL，搅拌，放入 4℃左右冰箱过夜，次日取出，分别加热至 60℃～70℃约 30 min，再煮沸约 1 h，搅拌并补充蒸发水分，防止沉渣烧焦。以纱布过滤。再将两液混合于同一容器，并补充水分至 1 000 mL，加入其它成分，适当加热使完全溶解，调节 pH 至 7.4±0.2。再适当加热后过滤，分装，121℃灭菌 15 min。

A.3 营养肉汤(HB)

A.3.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉粉	3.0 g
氯化钠	5.0 g
葡萄糖	1.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.3.2 制法

将各成分加入蒸馏水中，加热溶解，调节 pH 至 7.4±0.1。分装，121℃高压灭菌 15 min。

A.4 结晶紫中性红胆盐葡萄糖琼脂(VRBGA)

A.4.1 成分

酵母抽取物	3.0 g
蛋白胨	7.0 g
氯化钠	5.0 g
3 号胆盐	1.5 g
乳糖	10.0 g
中性红	0.03 g
结晶紫	0.002 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.4.2 制法

将各成分加入蒸馏水中(染料配成 1%的水溶液过滤后加入)，加热并不断搅拌至沸腾，使各成分完全溶解，调节 pH 至 7.4±0.1。冷却至 45℃倾注直径 15 cm 平板，可放置 2℃～8℃冷藏柜保存，4 周内使用。

A.5 显色培养基琼脂(Xα-GlcA)：

A.5.1 成分

蛋白胨	20.0 g
牛肉膏	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	20.0 g
月桂基硫酸钠	0.25 g
5-溴 4-氯 3 吲哚 α-D 葡萄糖苷	0.08 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.5.2 制法

将各成分加入蒸馏水中，加热溶解，调节 pH 至 7.3±0.1，分装适当容器，121℃高压灭菌 3 min。

附 录 B
（资料性附录）
检验过程中防止交叉污染的措施

B.1 抽样和制样过程

抽样和制样工具，必须清洗干净，121℃高压灭菌 15 min～20 min，一套洁净工具限于一份样品使用。存放样品的容器应该经过清洗、高压灭菌，或为一次性无菌容器。

B.2 检验过程

B.2.1 PCR 实验室应分为样品制备区、前 PCR 区、PCR 区和后 PCR 区。将模板提取、PCR 反应液配制、PCR 循环扩增及 PCR 产物的鉴定等步骤分区或分室进行。实验室的运作应从“净区”到“脏区”单向进行。

B.2.2 实验过程中，必须穿戴实验服和手套，手套要经常更换。各区要有专用实验服，经常清洗。

B.2.3 各区所有的试剂、器材（尤其是移液器）、仪器都应专用，不得带出该区。

B.2.4 所有溶液、水、耗材和器具要 121℃、15 min 高压灭菌，避免核酸和（或）核酸酶污染。每种溶液必须使用分析纯试剂和新蒸馏的双蒸水。在 20℃～25℃贮存的试剂中，可加入 0.025%的叠氮化钠。所有试剂应该以大体积配制，然后分装成仅够一次使用的量进行贮存。

B.2.5 DNA 模板或引物的离心管打开之前，要简短离心，离心管不能用力崩开，以免产生气溶胶。

B.2.6 前 PCR 区中，最好能在 PCR 操作箱中加入 PCR 反应各组分。

B.2.7 实验前后，实验室用紫外线消毒及通过反复清洗、擦拭去除各种器具和设备表面残留的 DNA。

B.2.8 可使用 UDG 和 dUTP 系统控制污染。

B.2.9 应遵循 PCR 操作的其他要求。