SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1632.3—2005

奶粉中阪崎肠杆菌检验方法 第3部分：荧光PCR方法

Detection of *Enterobacter sakazakii* from dehydrated powdered milk—Part 3: Real-time 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3部分。

本部分的附录A、附录B为规范性附录。

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、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、深圳太太基因工程有限公司。

本部分起草人：吕敬章、赵贵明、谢丽琪、郑卫平、林镜中、肖性龙。

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3部分:荧光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荧光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 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***

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(20个~24个核苷酸)寡核苷酸作为反应的引物,这两段寡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两条链上的位点分别发生互补。反应液由包括含有镁离子的反应缓冲液、4种单核苷酸(dNTP)、模板DNA及引物。在DNA聚合酶催化下,通过温度的变化(DNA变性、退火及延伸)而合成两个互补位点之间的DNA片断。这样的反应反复进行,使第一个循环产生的DNA片段得以扩增。经30左右个循环,扩增倍数达10^6。

3.3 缩略语

3.3.1 PCR:polymerase chain reaction,简称PCR。

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

3.3.3 dNTP:deoxyribonucleoside triphosphate,脱氧核苷酸三磷酸。

3.3.4 dATP:deoxyadenosine triphosphate,脱氧腺苷三磷酸。

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,脱氧鸟苷三磷酸。

3.3.9 UNG:uracil N-glycosylase,尿嘧啶N-糖基化酶。

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

3.3.11 *Ct*值:每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

4 测定方法

4.1 方法提要

在普通 PCR 基础上，加入一条特异的寡核苷酸荧光探针。该探针 5′端标记了 FAM 荧光素，3′端标记 TAMRA 荧光素，此时 FAM 的荧光被 TAMRA 淬灭，仪器检验不到其荧光信号；PCR 延伸阶段，*Taq* DNA 聚合酶发挥其 5′→3′外切核酸酶功能，将探针切割，与此同时标记在探针上的 FAM 游离出来，其所发出的荧光不再为 TAMRA 所淬灭而被仪器检验到。PCR 过程中，对目的片断进行一次有效的扩增，同时对探针进行了一次切割以及对 FAM 进行了一次检验。仪器检验到的 FAM 的增量，可以间接地反映目的片段的扩增量。

奶粉经增菌后，取增菌液 1 mL 加到 1.5 mL 无菌离心管中，8 000 r/min 离心 5 min，尽量吸弃上清液；加入 50 μL DNA 提取液（使用前室温解冻并充分混匀，快速吸取），混匀后沸水浴 5 min，12 000 r/min离心 5 min，取上清液作为模板进行荧光 PCR 扩增，观察荧光 PCR 仪的实时曲线，对奶粉中的阪崎肠杆菌进行快速检验。

4.2 试剂和材料

见 SN/T 1632.1。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 引物

5′-CCGTTCGACGTAGCACTGC-3′

5′-CATAGAATTCACGACGACGAACTTC-3′

4.2.2 探针

FAM-5′-TTCAAACGTTCCTGCGAGAAAGCGG-3′-TAMRA

4.2.3 *Taq* DNA 聚合酶。

4.2.4 dNTP、dATP、dTTP、dCTP、dGTP。

4.2.5 DNA 提取试剂：0.1% Chelex100 水溶液。

4.2.6 10×PCR 缓冲液：200 mmol/L Tris-HCl(pH8.4)，200 mmol/L 氯化钾，15 mmol/L 氯化镁。

4.3 仪器和设备

见 SN/T 1632.1。

4.3.1 荧光 PCR 仪。

4.3.2 离心机：20 000 r/min。

4.3.3 移液器：10 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL。

4.3.4 水浴锅。

4.4 步骤

4.4.1 阪崎肠杆菌定量检验（MPN 法）

定量检验是基于“三管”增菌法，以定量检验样品中极少量的微生物。试验至少需要 333 g 样品。

4.4.2 取样和增菌

取样前消毒样品包装的开启处和取样工具。按照“三管”增菌法，无菌称取样品 100 g、10 g 和 1 g 各三份分别加入 2 L、250 mL 和 125 mL 的样品稀释瓶中，加入 9 倍预热到 45℃的灭菌水（1∶10 稀释），或者将样品直接称量到装有 9 倍预热到 45℃的灭菌水的样品稀释瓶中，振摇使样品充分混匀，36℃±1℃培养 18 h～22 h。

分别移取培养 18 h～22 h 的悬液各 10 mL 加入 90 mL 肠杆菌增菌肉汤（EE 肉汤）中，36℃±1℃培养 18 h～22 h。

4.4.3 模板 DNA 准备

每瓶培养的 EE 肉汤分别取 1 mL 加到 1.5 mL 无菌离心管中，8 000 r/min 离心 5 min，尽量吸弃上清液；加入 50 μL DNA 提取液（使用前室温解冻并充分混匀，快速吸取），混匀后沸水浴 5 min，

12 000 r/min离心 5 min，取上清液以待检验（如不能及时检验，可将上清液于－20℃保存）。

4.4.4 荧光 PCR 检验

反应体系总体积为 25 μL，其中含：10×PCR 缓冲液 2.5 μL、引物对（10 μmol/L）各 1 μL、dNTP（10 mmol/L）1 μL、*Taq* DNA 聚合酶（5 U/μL）0.5 μL、水 17 μL、模板 DNA 2 μL。反应步骤一：37℃ 5 min，95℃预变性 3 min。反应步骤二：95℃变性 5 s，60℃退火延伸 40 s，同时收集 FAM 荧光，共进行 40 个循环。反应产物可在 4℃保存。

检验过程中分别设阳性对照、阴性对照。以含有扩增片断的质粒为阳性对照，以灭菌水作为阴性对照。

5 结果及判断

检验样本 C_t 值小于或等于 35.0 时，报告阪崎肠杆菌筛选阳性；检验样本 C_t 值大于 35.0 且小于 40.0 时，重复一次，如果 C_t 值仍小于 40.0，且曲线有明显的对数增长期，可报告阪崎肠杆菌筛选阳性，否则报告阪崎肠杆菌未检出；样本检验不到 C_t 值时，报告阪崎肠杆菌未检出。筛选阳性的样本，按 SN/T 1632.1—2005中 5.2 进行确证。

阪崎肠杆菌的计数按 SN/T 1632.1 的规定进行。

本部分的检验程序见附录 A。

6 废弃物处理和防止污染的措施

检验过程中的废弃物，收集后在焚烧炉中焚烧处理。

检验过程中防止交叉污染的措施见附录 B。

附 录 A
（规范性附录）
荧光 PCR 检验方法程序

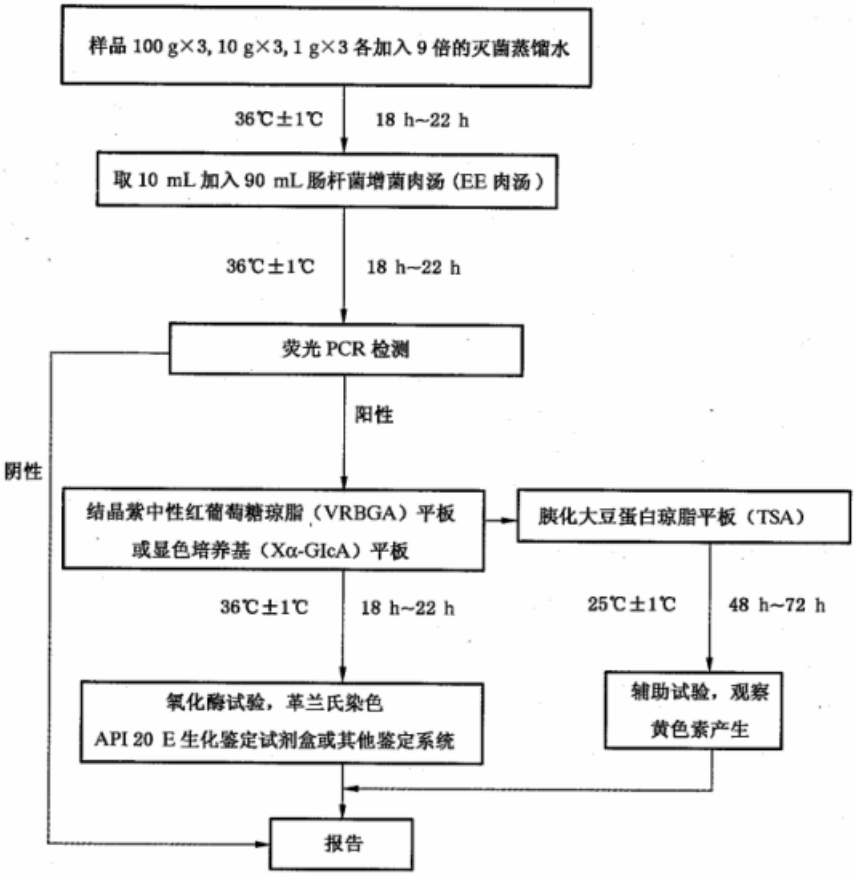


图 A.1 程序图

附 录 B
（规范性附录）
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，或为一次性灭菌容器。

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，避免核酸和（或）核酸酶污染。每种溶液必须使用高质量的成分和新蒸馏的双蒸水。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以破坏残留的 DNA。

B.2.8 可使用 UNG 酶和 dUTP 系统控制污染。

B.2.9 应遵循 PCR 操作的其他要求。