SN

# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2101—2016
代替 SN/T 2101—2008

# 出口乳及乳制品中结核分枝杆菌检测方法 荧光定量 PCR 法

**Determination of *Mycobacterium tuberculosis* in milk and dairy products for export—Real-time PCR method**

2016-03-09 发布　　2016-10-01 实施

手机逐项防伪码至13720082315
网站www.cnfw315.com
电话400698315
刮涂层 查真伪

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局　发布

# 前　言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 SN/T 2101—2008《乳及乳制品中结核分枝杆菌检测方法　荧光定量 PCR 法》。

本标准与 SN/T 2101—2008 相比，主要变化如下：

——修改了乳及乳制品中提取结核分枝杆菌的乳液处理办法；

——增加了确证实验；

——修改了附录 B。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：吴斌、王刚、徐凤敏、刘钊、于畅、贾赟。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——SN/T 2101—2008。

# 出口乳及乳制品中结核分枝杆菌检测方法 荧光定量 PCR 法

## 1 范围

本标准规定了乳及乳制品中牛型结核分枝杆菌和人型结核分枝杆菌荧光 PCR 检测的操作方法。

本标准适用于鲜乳、乳粉中结核分枝杆菌的检测，其他乳制品可参照执行。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 18645 动物结核病诊断技术

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 19495.2—2004 转基因产品检测 实验室技术要求

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

**实时荧光 PCR real-time fluorescent PCR**

在普通聚合酶链反应的基础上，加入一条特异性的荧光探针。该探针为一寡核苷酸，两端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团。探针完整时，报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收，PCR 扩增时，*Taq* 酶的 5′-3′外切酶活性将探针酶切降解，使报告基团和淬灭基团分离，从而荧光监测系统可接收到荧光信号，即每扩增一条 DNA 链，就有一个荧光分子形成，实现了荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步。

3.2

**Ct 值 cycle threshold**

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。

3.3

**Triton X-100**

一种非离子型去垢剂。

## 4 材料和试剂

### 4.1 仪器和器材

4.1.1 荧光 PCR 检测仪。

4.1.2 高速台式冷冻离心机：0～20 000 r/min。

4.1.3 普通台式离心机。

4.1.4 涡旋振荡器。
4.1.5 冰箱:4 ℃±1 ℃,−20 ℃±2 ℃。
4.1.6 微量可调移液器及配套带滤芯洗头:0～100 μL,0～1 mL。
4.1.7 量筒:0～10 mL,0～100 mL。
4.1.8 吸管:1 mL、10 mL,具刻度。
4.1.9 Eppendorf 管:1.5 mL。
4.1.10 离心管:10 mL。
4.1.11 生物安全柜。

### 4.2 试剂

除特别说明以外,所用试剂均为分析纯,实验用水为去离子水。
4.2.1 NaOH 溶液(4%):见附录 A 中的 A.1。
4.2.2 灭菌生理盐水(0.9%):见 A.2。
4.2.3 蛋白酶 K(20 mg/mL):见 A.3。
4.2.4 SDS(10%):见 A.4。
4.2.5 醋酸钠(3 mol/L,pH5.2):见 A.5。
4.2.6 TE 缓冲液(pH8.0):见 A.6。
4.2.7 结核分枝杆菌卡介苗阳性样本:由中国兽医微生物菌种保藏管理中心提供。

### 4.3 抽样、采样工具

采样工具(棉拭子、剪刀、镊子、注射器、离心管、研钵)121 ℃±2 ℃,15 min 高压灭菌并烘干。

### 4.4 检测引物和探针

引物和探针序列见表 1,参见附录 B。

**表 1 荧光定量 PCR 检测引物和探针**

| 引物和探针序列 | 扩增片段大小(bp) |
|---|---|
| 上游引物 P1:5'-GGTCGACACATAGGTGAGGTCT-3'<br>下游引物 P2:5' -CGCTGATCCGGCCAC-3'<br>探针:5'-FAM-CCGAAGCGGCGCTGGACGAG-TAMRA-3' | 103 |

## 5 操作方法

### 5.1 样品采集

#### 5.1.1 鲜乳的采集

用无菌吸管直接吸取 5 mL～10 mL 置离心管中,编号备用。

#### 5.1.2 乳粉的采集

无菌操作取 25 g 样品,放入无菌袋中,编号备用。

### 5.2 样品贮运

样品采集后，4 ℃保存应不超过 24 h，若需长期保存应置－20 ℃以下，但应避免反复冻融，或放于加入冰块的保温箱中，密封后直接送实验室检测。

### 5.3 样品制备

#### 5.3.1 鲜乳

10 mL 鲜乳，加 100 μL Triton X-100，振荡混匀，经 4 000 r/min 离心 40 min，弃上清，取沉淀，加 5 mL 生理盐水重悬沉淀，定性滤纸过滤，滤液经 4 000 r/min 离心 40 min，弃上清，加入 500 μL 生理盐水重悬沉淀，编号备用。

#### 5.3.2 乳粉

无菌操作取待检样品 5.0 g 放入灭菌烧杯中，加 50 mL 生理盐水，剧烈振荡混匀，再加入 500 μL Triton X-100，再度振荡混匀，4 000 r/min 离心 40 min，弃上清，加入 10 mL 生理盐水重悬沉淀，定性滤纸过滤，滤液 4 000 r/min 离心 40 min，弃上清，加入 500 μL 生理盐水重悬沉淀，编号备用。

### 5.4 模板 DNA 提取

提取两份平行样品，用于荧光 PCR 检测。

5.4.1 在样品中加入 1.5 mL 4%的 NaOH 溶液，37 ℃恒温处理 30 min 或常温下 1 h，使其充分液化；若液化不完全，可适当再加入少量 4%的 NaOH。

5.4.2 将液化后的样本 500 μL 以及试剂盒中的阴性对照、阳性对照各 500 μL 分别加入 1.5 mL 无菌离心管中，13 000 r/min 离心 10 min。

5.4.3 弃上清，用微量移液器尽量吸干液滴，沉淀中加入 1 mL 灭菌生理盐水，振荡悬浮，13 000 r/min 离心 10 min。

5.4.4 弃上清，加入 1 mL 灭菌生理盐水，13 000 r/min 离心 10 min。

5.4.5 弃上清，用 0.5 mL 灭菌生理盐水重新悬浮沉淀，加 12.5 μL 20 mg/mL 的蛋白酶 K 和 50 μL 的 10%的 SDS，55 ℃水浴作用 30 min。

5.4.6 分别用 Tris 饱和酚、等体积酚∶氯仿和氯仿各抽提一次。

5.4.7 吸取上层水相，加 1/10 体积的 pH5.2　3 mol/L 醋酸钠和 2.5 倍体积的无水乙醇，－20 ℃沉淀 2 h，4 ℃ 13 000 r/min 离心 10 min。

5.4.8 弃上清，加入 75%的乙醇，4 ℃ 13 000 r/min 离心 10 min。

5.4.9 弃上清，晾干，加 20 μL TE 缓冲液溶解，直接用于检测或－20 ℃保存备用。

可以采用等效商品化 DNA 提取试剂盒进行操作。

### 5.5 荧光定量 PCR 测定

#### 5.5.1 检验准备

在反应混合物配制区进行。取出相应的荧光 PCR 反应液、*Taq* 酶，室温融化后，2 000 r/min 离心 5 s。反应体系配制见表 2。并将总样品反应组分涡旋，充分混匀，向每个荧光 PCR 管中各分装 15 μL，转移至样本处理区。检验过程中分别设置阳性、阴性对照及空白对照。以含有扩增片段的质粒为阳性对照，以灭菌双蒸水为阴性对照。

表 2　反应体系配制

| PCR 反应体系中各成分 | 每个样品反应组分用量/μL |
|---|---|
| 10×PCR buffer ($Mg^{2+}$ free) | 2.5 |
| $MgSO_4$(25 mmol/L) | 0.5 |
| dNTP(2.5 mmol/L) | 2.0 |
| 上游引物 (10 μmol/L) | 0.5 |
| 下游引物 (10 μmol/L) | 0.5 |
| 探针(5 μmol/L) | 1.0 |
| $ddH_2O$ | 7.5 |
| *Taq* 酶 | 0.5 |
| 总体积 | 15 |

### 5.5.2　加样

在样本处理区进行。在各设定的荧光 PCR 管中分别加入 5.4.9 中制备的 DNA 样本各 10 μL，盖紧管盖，500 r/min 离心 30 s。

### 5.5.3　荧光 PCR 检测

荧光 PCR 检测循环程序为：37 ℃ 3 min；93 ℃ 1 min；93 ℃，5 s，60 ℃ 40 s，40 个循环。

单通道荧光 PCR 检测仪，无需选择检测通道；多荧光检测仪，荧光信号收集时设定为 FAM 荧光素，60 ℃收集荧光信号。

## 6　结果判定

### 6.1　阈值设定

直接读取检测结果。阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点，结果显示阴性为准。或可根据仪器噪声情况进行调整。

### 6.2　质控标准

阴性对照：Ct 值≥30。

阳性对照：Ct 值应≤28，并出现典型的扩增曲线。

以上要求需在同一次实验中同时满足，否则，本次实验视为无效，需重新进行。

### 6.3　结果描述及判定

#### 6.3.1　阴性

待测样品 2 个平行样检测结果 Ct≥30，同时实验对照结果正常，此时可以判定该样品中无结核分枝杆菌核酸。

#### 6.3.2　阳性

待测样品 2 个平行样检测结果 Ct≤28，且出现典型的扩增曲线，同时实验对照结果正常，表示样品

中有结核分枝杆菌核酸。

待测样品至少有 1 个平行样检测结果 28＜Ct＜30，并出现典型的扩增曲线，同时实验对照结果正常，此时应适当增加 DNA 模板量后重新实时荧光 PCR 检测。再次检测结果 Ct＜30 并出现典型扩增曲线，同时实验对照结果正常，表示样品中有结核分枝杆菌核酸；再次检测结果 Ct≥30，同时实验对照结果正常，可以判定该样品中无结核分枝杆菌核酸。

#### 6.3.3 确证

检验筛选出阳性的样本，按 GB/T 18645 进行确认，将筛选出的阳性样品制备平行样品，保留一份，另一份作为确认样品。

#### 6.3.4 结果报告

如果检测结果阳性，则可报告分枝杆菌属筛选结果阳性，否则，可报告分枝杆菌属筛选结果阴性。

## 7 防止污染和废弃物处理的措施

检验过程中防止交叉污染的措施按照 GB/T 19495.2—2004 的规定执行。

检验过程中的废弃物按照 GB 19489 的规定执行。

# 附 录 A
（规范性附录）
试剂的配制

## A.1 NaOH 溶液（4%）

取 80 mL 去离子水置于 100 mL～200 mL 塑料烧杯中，称取 4 g NaOH 逐渐加入到烧杯中，边加边搅拌，完全溶解之后，定容至 100 mL。将溶液转移至塑料容器中，室温保存。

## A.2 灭菌生理盐水（0.9%）

取 9 g NaCL，加入 800 mL 去离子水，完全溶解后，定容至 1 L，121 ℃ 15 min 灭菌后，室温保存。

## A.3 蛋白酶 K（20 mg/mL）

取 200 mg 的蛋白酶 K 加入到 9.5 mL 水中，轻轻摇动至蛋白酶 K 完全溶解。不要涡旋混合。加水定容到 10 mL，然后分装成小份－20 ℃保存。

## A.4 SDS（10%）

取 10 g SDS 置于 100 mL～200 mL 烧杯中，加入 80 mL 的去离子水，68 ℃加热溶解，用浓盐酸调节 pH 值至 7.2。定容至 100 mL 后，室温保存。

## A.5 醋酸钠（3 mol/L，pH5.2）

取 40.8 g NaOAC·$3H_2O$ 置于 100 mL～200 mL 烧杯中，加入约 40 mL 去离子水搅拌溶解，加入冰醋酸调节 pH 值至 5.2，定容至 100 mL。121 ℃ 15 min 灭菌后，室温保存。

## A.6 TE 缓冲液（pH8.0）

### A.6.1 1 mol/L Tris-HCl（pH8.0）溶液

取 121.1 g Tris 置于 1 L 烧杯中，加入 800 mL 去离子水，充分搅拌溶解，冷却至室温后，用浓盐酸调 pH 值至 8.0，定容至 1 L，121 ℃ 15 min 灭菌后，室温保存。

### A.6.2 500 mmol/L EDTA（pH8.0）溶液

取 186.1 g $Na_2$EDTA·$2H_2O$ 置于 1 L 烧杯中，加入 800 mL 去离子水，充分搅拌溶解，用 NaOH 调 pH 值至 8.0，定容至 1 L，121 ℃ 15 min 灭菌后，室温保存。

### A.6.3 10×TE Buffer

取 1 mol/L Tris-HCl(pH8.0)溶液 100 mL 和 500 mmol/L EDTA(pH8.0)溶液 20 mL 置于 1 L 烧杯中，加入 800 mL 去离子水，均匀混合，定容至 1 L 后，121 ℃ 15 min 灭菌后，室温保存。使用时工作液浓度为 1×。

# 附　录　B
（资料性附录）
结核分枝杆菌转座酶基因（transposase gene）扩增片段核苷酸序列

GGTCGACACATAGGTGAGGTCTGCTACCCACAGCCGGTTAGGTGCTGGTGGTCCGAAG
CGGCGCTGGACGAGATCGGCGGGACGGGCTGTGGCCGGATCAGCG