



中华人民共和国国家标准

GB/T 28642—2012

饲料中沙门氏菌的快速检测方法 聚合酶链式反应(PCR)法

Rapid determination of *Salmonella* spp. in animal feeding stuffs—
PCR method

2012-07-31 发布

2012-11-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC76)归口。

本标准起草单位:农业部饲料质量及畜产品安全监督检验测试中心(沈阳)。

本标准主要起草人:张秀芹、张建勋、杜柏林、李欣南、杨希国、马俊驰、陈晓月。

饲料中沙门氏菌的快速检测方法 聚合酶链式反应(PCR)法

1 范围

本标准规定了饲料中沙门氏菌的快速检测的 PCR 方法。
本标准适用于饲料中沙门氏菌的定性筛选。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 13091 饲料中沙门氏菌的检测方法

GB/T 14699.1 饲料 采样

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

SN/T 1870 食品中致病菌检测方法 实时 PCR 法

3 原理

利用沸水浴使菌体细胞破裂,释放基因组 DNA,离心使细胞壁等有形物沉淀,以上清液为模板进行扩增,琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。

4 试剂和材料

除另有规定外,试剂为分析纯或生化试剂,试验用水符合 GB/T 6682 的要求。

4.1 沙门氏菌检测用引物(对)序列为:

Sal F:5'-TCG CAC CGT CAA AGG AAC CGT AAA GC-3'

Sal R:5'-GCA TTA TCG ATC AGT ACC AGC CGT CT-3'

4.2 Premix *Taq* 缓冲液(2×):内含 *Taq* DNA 聚合酶 1.25 U/25 μL, 4 mmol Mg²⁺, dNTP 各0.4 mmol。

4.3 琼脂糖:电泳级。

4.4 Marker 2000。

4.5 缓冲蛋白胨水(BPW):见 A.1。

4.6 大豆蛋白胨肉汤(RVS):见 A.2。

4.7 亚硒酸盐胱氨酸增菌液(SC):见 A.3。

4.8 10 倍上样缓冲液(10×loading buffer):0.05%的溴酚蓝,50%丙三醇溶液,1%的 SDS。

4.9 质控菌株:沙门氏菌阳性标准菌株。

4.10 50×TAE 缓冲液:见 A.4。

4.11 1×TAE 缓冲液:见 A.5。

4.12 溴化乙锭(5 mg/mL):见 A.6。

注:4.2和4.8缓冲液为商品化成品。以上用于PCR反应及电泳试验的试剂可用功能相当的其他产品替代。

5 仪器设备

5.1 PCR 仪。

5.2 恒温水浴锅。

5.3 离心机:离心转速 12 000 g。

5.4 微量移液器。

5.5 电泳仪。

5.6 凝胶成像仪。

5.7 天平:感量 0.01 g。

5.8 电热恒温培养箱。

6 试样选取与制备

按照 GB/T 14699.1 采样,将实验室样品充分混匀后密封低温保存待用,注意整个过程中不要将样品人为污染。

7 检验步骤

7.1 样品的增菌及模板的制备

取 25 g 样品于 225 mL 的缓冲蛋白胨水(BPW,4.5)中,37 °C±1 °C 培养 18 h±2 h 进行预增菌,取 0.1 mL 预增菌液转移至 10 mL 大豆蛋白胨肉汤(RVS,4.6)培养基内,41.5 °C±1 °C 培养 24 h±3 h。同时取 10 mL 预增菌液于 100 mL 亚硒酸盐胱氨酸增菌液(SC,4.7)中 37 °C±1 °C 培养 24 h±3 h,进行选择性的增菌,取选择性增菌液 1 mL 于离心管中 10 000 g 离心 10 min,弃上清,1 mL 无菌去离子水悬浮离心 10 min,弃上清,再用 0.2 mL 无菌去离子水悬浮,95 °C 水浴 20 min,将离心管迅速转移至冰浴中使其迅速冷却,用涡旋仪混匀裂解物,20 °C~25 °C 下 10 000 g 离心 3 min,转移上清至新鲜管中备用(模板制备可选用商业试剂盒)。检测过程中分别设阳性对照和阴性对照,用添加沙门氏菌阳性标准菌株的样品作阳性对照,用不含沙门氏菌的样品作阴性对照。

7.2 PCR 扩增

50 μL 的反应体系,在 0.2 mL 的反应管中, Premix Taq 缓冲液(4.2)25 μL,模板 4 μL,浓度为 20 μmol/L 的上下游引物各 1 μL,去离子水 19 μL。

反应程序为:94 °C 预变性 2 min,30 个循环:94 °C 变性 1 min,58.4 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 30 s;72 °C 终延伸 7 min 后 4 °C 保存。

7.3 电泳检测 PCR 扩增产物

取 1.5 g 琼脂糖(4.3),于 100 mL 1×TAE 缓冲液(4.11)中加热,充分熔化,冷至 65 °C 左右的时候,加入 10 μL 溴化乙锭(4.12),充分混匀,根据需要在模板内放入合适的梳子,制成约 5 mm 厚的胶块。在电泳槽中加入 1×TAE 缓冲液,使液面没过凝胶 2 mm~3 mm。将 6 μL~8 μL 的 PCR 扩增产物与 1 μL 10 倍上样缓冲液(4.8)混合后点样,取 6 μL Marker 2000 (4.4)点样。5 V/cm~8 V/cm 恒压电泳,直至溴酚蓝指示剂迁移至凝胶中部,用成像仪进行凝胶成像。

8 结果表述

在阴性对照于 330 bp 处未出现条带,而阳性对照在 330 bp 处出现扩增条带的条件下,如待测样品在 330 bp 处未出现相应大小的扩增条带,则可报告待测样品未检出沙门氏菌;如待测样品在相应处出现扩增条带,则为疑似阳性样品,此时需用 GB/T 13091 进行确证,最终结果以后者检测结果为准。对于疑似阳性样品,可以对其扩增产物进行测序,结果参照附录 B。

如果阴性对照出现条带和(或)阳性对照未出现预期大小的扩增条带,本次待测样品的结果无效,应重新进行检测,并排除污染因素。

9 检测过程中防止交叉污染的措施

按照 SN/T 1193、SN/T 1870 和 GB 19489 的要求执行。

10 废弃物处理

检测过程中的废弃物及一切可能被污染的物品均应做无害化处理。

附录 A
(规范性附录)
培养基及缓冲液的配制

A.1 缓冲蛋白胨水(BPW)

A.1.1 成分

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠	9.0 g
磷酸二氢钾	1.5 g
蒸馏水	1 000 mL
pH7.0	

A.1.2 制法

按上述成分分配好,校正 pH,分装于大瓶中,121 °C 高压灭菌 20 min,临用时分装在 500 mL 无菌瓶中,每瓶 225 mL,或配好后校正 pH,分装于 500 mL 瓶中,每瓶 225 mL,121 °C 高压灭菌 20 min,冷却备用。

A.2 大豆蛋白胨肉汤(RVS)

A.2.1 溶液 A

A.2.1.1 成分

蛋白胨	5.0 g
氯化钠	8.0 g
磷酸二氢钾	1.4 g
磷酸氢二钾	0.2 g
蒸馏水	1 000 mL
pH7.0	

A.2.1.2 制法

将各成分加入蒸馏水中,加热至约 70 °C 溶解。此溶液需当天使用。

A.2.2 溶液 B

A.2.2.1 成分

氯化镁	400.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.2.2.2 制法

将氯化镁溶于水中。

A.2.3 溶液 C

A.2.3.1 成分

孔雀绿	0.4 g
蒸馏水	100 mL

A.2.3.2 制法

将孔雀绿溶于水中。溶液可室温保存于棕色玻璃瓶中。

A.2.4 完全培养基

A.2.4.1 成分

溶液 A	1 000 mL
溶液 B	100 mL
溶液 C	10 mL

A.2.4.2 制法

按上述比例配制,校正 pH,使灭菌后 pH 为 5.2,分装于试管中,每管 10 mL。115 °C 高压灭菌 15 min。

冰箱保存。

A.3 亚硒酸盐胱氨酸增菌液(SC)

A.3.1 基础液

A.3.1.1 成分

胰蛋白胨	5.0 g
乳糖	4.0 g
磷酸氢二钠	10.0 g
亚硒酸钠	4.0 g
蒸馏水	1 000 mL
pH7.0	

A.3.1.2 制法

溶解前三种成分于水中,煮沸 5 min,冷却后,加入亚硒酸钠,校正 pH 后分装,每瓶 1 000 mL。

A.3.2 L-胱氨酸溶液

A.3.2.1 成分

L-胱氨酸	0.1 g
1 mol/L 氢氧化钠溶液	15 mL

A.3.2.2 制法

在无菌环境中,用灭菌水将上述成分稀释到 100 mL。母液蒸汽灭菌。

A.3.3 完全培养基制备

基础液	1 000 mL
L-胱氨酸溶液 pH7.0	10 mL

基础液冷却后,以无菌操作加 L-胱氨酸溶液,将培养基分装于适当容量的灭菌瓶中,每瓶 100 mL。

注:培养基在配制当日使用。

A.4 50×TAE 缓冲液

A.4.1 0.5 mol/L EDTA (pH8.0)

取二水乙二胺四乙酸二钠 186.1 g,加入 800 mL 蒸馏水充分搅拌,加 10 mol/L 的氢氧化钠调解 pH 至 8.0,待完全溶解后,定容至 1 L。高压灭菌。

A.4.2 制法

Tris 碱 242.0 g 溶于 700 mL 的水中,加入 0.5 mol/L EDTA (pH8.0) 100 mL,冰乙酸 57.1 mL,充分溶解,用水定容至 1 L。

A.5 1×TAE 缓冲液

取 20 mL 50×TAE,加水定容至 1 000 mL。Tris-乙酸终浓度为 0.04 mol/L,EDTA 终浓度为 0.001 mol/L。

A.6 溴化乙锭(5 mg/mL)

取溴化乙锭 0.050 0 g 溶于 10 mL 水中。

附录 B
(资料性附录)
PCR 产物测序结果

沙门氏菌阳性菌株 PCR 产物测序结果(331 bp)如下：

TCGCACCGTCAAAGGAACCGTAAAGCTGGCTTTCTCTTTCCAGTACGCTT
CGCCGTTTCGCGCGCGGCATCCGCATCAATAATACCGGCCTTCAAATCGGC
ATCAATACTCATCTGTTTACCGGGCATACCATCCAGAGAAAATCGGGCCG
CGACTTCGCGACGCGTTCTGAACCTTTGGTAATAACGATAAACTGGACC
ACGGTGACAATAGAGAAGACAACAAAACCCACCGCCAGGCTATCGCCAAT
AACGAATTGCCGAACGTGGCGATAATTTACCGGCATCAGCTTCAATCA
AGATAAGACGGCTGGTACTGTCCGATAATGC
