

低温乳制品中沙门氏菌检验 实时荧光 PCR 方法

Detection of Salmonella in low-temperature dairy products by real-time
PCR method

(征求意见稿)

20XX- XX -XX 发布

20XX- XX - XX 实施

上海市食品学会 发 布

目 次

前 言..... II

1 范围..... 1

2 规范性引用文件..... 1

3 缩略语..... 1

 3.1 PCR..... 1

 3.2 实时荧光 PCR 1

 3.3 Ct 值 2

4 仪器和设备..... 2

5 试剂和耗材..... 2

6 操作流程..... 2

7 操作步骤..... 3

 7.1 样品制备及增菌培养..... 3

 7.2 PCR 检测 3

 7.3 确证实验..... 5

 7.4 PCR 鉴定（可选） 5

8 结果与报告..... 5

附 录 A 培养基和试剂..... 6

附 录 B 核酸污染预防及废弃物处理 7

附 录 C 培养基和试剂盒的验收 8

附 录 D 低温乳制品中沙门氏菌检验 实时荧光 PCR 方法评价结果..... 9

前 言

本文件按照 GB/T 1.1 的编写规则起草。

本文件中附录 A 为资料性附录。

本文件由上海市食品学会提出并组织实施。

本文件由上海市食品学会归口。

本文件起草单位：XXX

本文件主要起草人：XXX

本文件承诺执行单位：XXX

声明：本文件的知识产权归属于上海市食品学会，未经上海市食品学会同意，不得印刷、销售。任何组织、个人使用本标准开展认证、检测等活动应经上海市食品学会批准授权。本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

低温乳制品中沙门氏菌检验 实时荧光 PCR 方法

1 范围

本标准规定了巴氏杀菌乳、高温杀菌乳（低温保存）、发酵乳、调制乳及奶油等低温乳制品中沙门氏菌的实时荧光 PCR 检测法（商品化试剂盒方法）。

本标准适用于巴氏杀菌乳、高温杀菌乳（低温保存）、发酵乳、调制乳及奶油等低温乳制品中沙门氏菌的快速初筛及鉴定。

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 4789.1 食品安全国家标准 食品微生物检验总则

GB 4789.4 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验

GB 4789.28 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检验

SN/T 2415-2010 进出口乳及乳制品中沙门氏菌快速检测方法 实时荧光 PCR 法

3 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

3.1 PCR

Polymerase Chain Reaction，聚合酶链式反应。

3.2 实时荧光 PCR

Real time Polymerase Chain Reaction，实时荧光聚合酶链式反应。

3.3 Ct 值

Cycle threshold, 每个实时荧光 PCR 反应管内的荧光信号达到设定阈值时所经历的循环数。

4 仪器和设备

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外, 其他设备如下:

- 4.1 恒温培养箱: $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$
- 4.2 电子天平: 感量 0.1 g
- 4.3 均质器 (旋刀或拍击式) 或等效设备
- 4.4 pH 计或精密 pH 试纸: 精密度 0.1
- 4.5 微量移液器及无菌带滤芯吸头
- 4.6 干浴加热器: $98\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$
- 4.7 掌式离心机
- 4.8 实时荧光定量 PCR 仪
- 4.9 低温冰箱

注: 确证实验需要的其他仪器设备参照 GB4789.4。

5 试剂和耗材

- 5.1 MicroFast®沙门氏菌快速增菌培养基
- 5.2 MicroFast®沙门氏菌核酸检测试剂盒
 - 5.2.1 裂解液
 - 5.2.2 对照管
 - 5.2.3 试剂管

注: 确证实验需要的其他试剂和耗材参照 GB4789.4。

6 操作流程

沙门氏菌检验程序见图1。

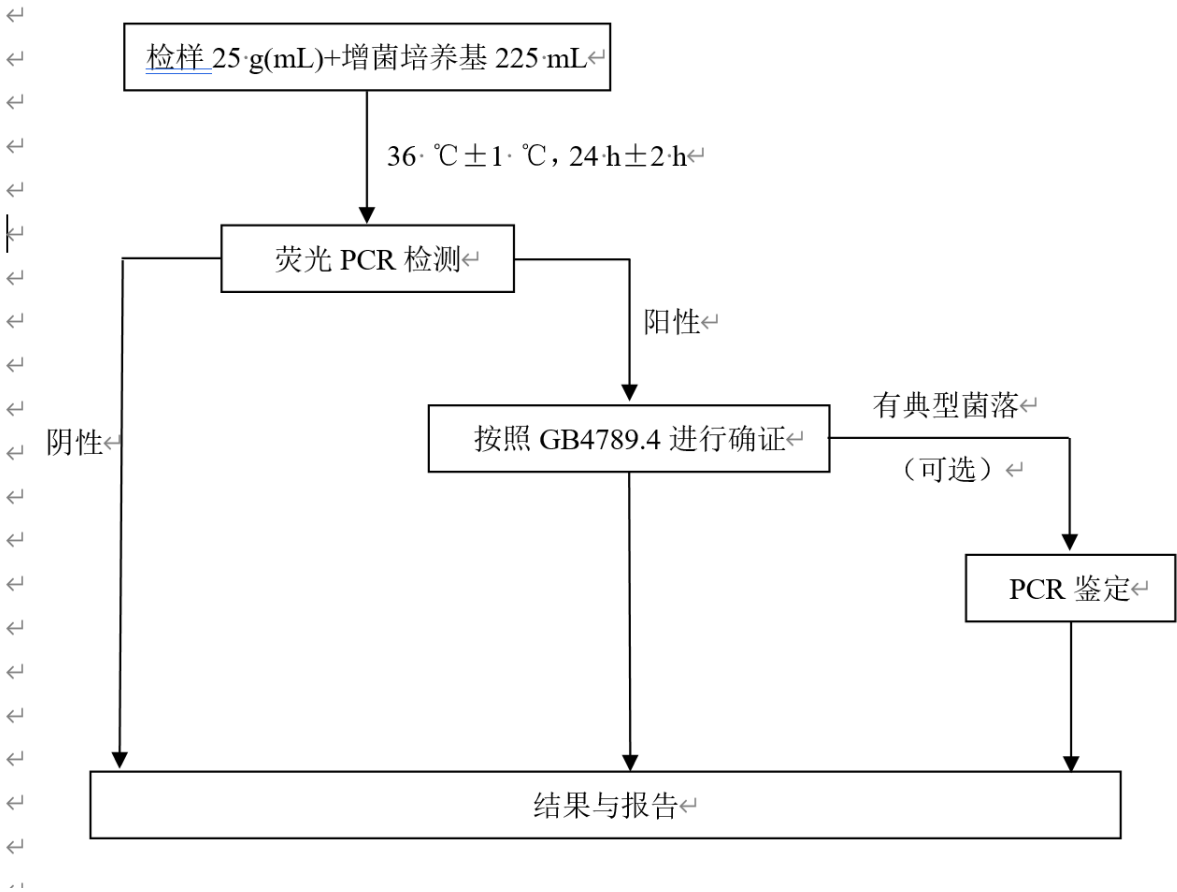


图 1 沙门氏菌检验程序

7 操作步骤

7.1 样品制备及增菌培养

将样品恢复至室温，无菌操作称取 25 g（mL）样品，置于盛有 225 mL MicroFast®沙门氏菌快速增菌培养基（培养基应在煮沸后降温至 40℃左右时使用）的无菌均质袋或其他无菌容器中，若样品是固态或半固态，用拍击式均质器拍打 1 min~2 min 混匀（或用旋转式均质器 8000 rpm~10000 rpm 均质 1 min~2 min）；若样品是液态，不需要均质，震荡混匀即可。如需调整 pH，用 1 mol/mL NaOH 或 HCl 调整 pH 至 6.8±0.2，如使用均质袋，可直接进行培养；如使用均质杯或其他容器，无菌操作将样品转移到其他培养容器内于 36℃±1℃培养 24 h±2 h。

7.2 PCR 检测

7.2.1 模板制备

将 7.1 中的增菌液混匀后，用移液器移取 40 μL 至 MicroFast®沙门氏菌核酸检测试剂盒的裂解液管

中（裂解液可在开盖前采用合适方式将管中液体集中至底部），盖好管盖，使用干浴加热器 98 ℃±1 ℃ 加热 10 min，冷却至室温，取上清液以待检测。如无法立即检测，上清液可置于 2 ℃~8 ℃ 保藏不超过 24 h。

7.2.2 体系配置

MicroFast®沙门氏菌核酸检测试剂盒的 PCR 反应体系为预分装的体系，每个 0.2 mL 的 PCR 管中都含有除模板外的沙门氏菌引物探针及其他需要的 PCR 反应成分。使用前从冰箱或冰柜中取出分装的预混液，待预混液融化后，使用掌式离心机离心 5 s~10 s 后，打开 PCR 管盖，向其中加入 5 μL 模板（空白对照、阴性对照、样品增菌液提取的核酸、阳性对照），盖好管盖，使用掌式离心机离心 5 s~10 s，即可上机检测。

7.2.3 PCR 扩增

推荐反应程序设定如下：反应体系为 25 μL，在第二步每个循环 60 ℃时检测荧光信号，检测通道选择 FAM。

第一步	第二步		
1 次	45 个循环		
95 ℃	95 ℃	60 ℃√	72 ℃
5 min	15 s	30 s√	30 s

7.2.4 对照设置

每次 PCR 反应都需要设置空白对照、阴性对照及阳性对照。

空白对照：不含有 DNA 酶的灭菌去离子水。

阴性对照：不含沙门氏菌的样品按照检验程序进行处理后获得的核酸。

阳性对照：沙门氏菌基因组 DNA。

7.2.5 结果判定

质控系统：空白对照和阴性对照均未出现典型的扩增曲线或 Ct 值≥40，阳性对照出现典型的扩增曲线并且 Ct 值<30，则检测系统正常。否则，任一种对照出现非上述正常结果，应重做实验，同时排除污染。

检测系统正常的情况下，检测样品 Ct 值≤35 时，判定 PCR 结果为阳性；当 35<检测样品 Ct 值<40 时，重复检测一次，如果 Ct 值<40 并且曲线有明显的对数增长期，判定 PCR 结果为阳性，否则判定 PCR 结果为阴性；当 Ct 值≥40 或无 Ct 值时，判定 PCR 结果为阴性。

如果 PCR 结果为阴性，则直接报告阴性结果。如果 PCR 结果为阳性，则需要根据 7.3 进行阳性确证实验。

7.3 确证实验

PCR 结果阳性的样品，按照 GB 4789.4 进行确证实验。

如不能及时进行确证实验，可将增菌液在 4℃ 左右保存不超过 72 h，再进行确证。

7.4 PCR 鉴定（可选）

对于 7.3 中的典型菌落，可直接挑取菌落，加入到裂解液管中，使用干浴加热器 $98\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min，冷却至室温后，按照 7.2 进行沙门氏菌的快速鉴定。

8 结果与报告

根据 PCR 检测结果及确证实验结果，报告 25 g（mL）样品中检出或未检出沙门氏菌。

附 录 A

培养基和试剂

A. 1 MicroFast®沙门氏菌快速增菌培养基

制法：称取 50.0 g，加热搅拌溶解于 1000 mL 蒸馏水中，煮沸 2 min -3 min，分装备用。

注：本培养基不需要高压灭菌，在制备过程中不宜过分加热，避免降低其选择性，贮于室温暗处。本培养基宜于当天制备，当天使用。

A. 2 MicroFast®沙门氏菌核酸检测试剂盒

裂解液保存于室温，预混液及对照管保存于-20 ℃。

附 录 B

核酸污染预防及废弃物处理

实验过程中的污染防治及废弃物和扩增产物等处理可参考《GB/T 27403-2008 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测》。

附 录 C

培养基和试剂盒的验收

C.1 培养基的验收

参照 GB 4789.28 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求进行验收。

C.2 试剂盒的验收

C.2.1 工作菌株的准备

参照 GB 4789.28 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求准备工作菌株，至少选择一株沙门氏菌与一株非沙门氏菌。

C.2.2 核酸提取

参照标准文本中 7.4 进行。

C.2.3 PCR 操作及结果判定

参照标准文本中 7.2 进行。

C.2.4 试剂盒验收标准

沙门氏菌的检测结果为阳性，非沙门氏菌的结果为阴性，本批次试剂盒合格。否则，任一种非上述正常结果，试剂盒不合格。

附 录 D

低温乳制品中沙门氏菌检验 实时荧光 PCR 方法评价结果

D.1 试剂盒的包容性、排他性

对 20 株沙门氏菌的包容性为 100%，对 15 株非沙门氏菌的排他性为 100%。

D.2 试剂盒的稳定性

3 个不同批次的试剂盒检测结果之间没有显著性差异。

D.3 本方法与 GB 4789.4-2016 的一致性评价

本方法与 GB 4789.4-2016 验证结果的显著性差异 $\chi^2 < 3.84$ ，两种方法阳性确证率在 5%置信区间内没有统计学差异。

注：本评价结果仅适用于 MicroFast®沙门氏菌快速增菌培养基和 MicroFast®沙门氏菌核酸检测试剂盒。