

ICS 67.050

X 04

DB22

吉 林 省 地 方 标 准

DB 22/T 1828—2013

农产品中沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄 球菌的多重 PCR 检测

Detection of Salmonella, Shigella and Staphylococcus aureus in agricultural products
by multiplex PCR method

地方标准信息服务平台

2013 - 05 - 15 发布

2013 - 09 - 01 实施

吉林省质量技术监督局 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1-2009 和 GB/T 20001.4-2001 给出的规则起草。

本标准由吉林省质量技术监督局提出并归口。

本标准起草单位：吉林省产品质量监督检验院、吉林农业大学。

本标准主要起草人：邴炜、陈萍、史艳宇、李月红、任常菲、王秀娟、崔敬爱。

地方标准信息服务平台

农产品中沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌的多重 PCR 检测

1 范围

本标准规定了农产品中沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌核酸的多重PCR检测方法。

本标准适用于农产品中沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌的快速筛选检测。

本标准不适合仲裁检验。

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，仅所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 4789.4 食品微生物学检验 沙门氏菌检验

GB 4789.5 食品微生物学检验 志贺氏菌检验

GB 4789.10 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

WS/T 230 临床诊断中聚合酶链式反应（PCR）技术的应用

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

多重聚合酶链式反应（多重 PCR） multiple polymerase chain reaction

多重 PCR 又称多重引物 PCR，是在同一 PCR 反应体系中加上两对以上引物，同时扩增出多个核酸片段的 PCR 反应。

4 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

invA 基因：侵袭蛋白基因（invasion protein A gene）

nuc 基因：耐热核酸酶基因（thermo-stable nuclease gene）

ipaH 基因：侵袭性质粒抗原基因（invasive plasmid antigen H gene）

5 试剂

除特别说明以外，所用试剂为分析纯或生化试剂。

- 5.1 水：应符合 GB/T 6682 中一级水的规格。
- 5.2 缓冲蛋白胨水（BPW）：按 GB 4789.4 规定。
- 5.3 7.5%氯化钠增菌肉汤：按 GB 4789.10 规定。
- 5.4 志贺氏菌增菌肉汤-新生霉素：按 GB 4789.5 规定。
- 5.5 引物：见表 1。

表 1 引物序列

致病菌名称	靶基因	上下游引物序列	产物长度 /bp	终浓度/ (mmol/L)
沙门氏菌	<i>invA</i>	5' -GTCATGATATTCGCCCCATATT -3'	255	40
		5' -CGGTGCGATGAAGTTTATCAAAG -3'		40
金黄色葡萄球菌	<i>nuc</i>	5' -GCTCAGCAAATGCATCACAAAC -3'	506	120
		5' -AGCGTTGTCTTCCGCTCCAAA -3'		120
志贺氏菌	<i>ipaH</i>	5' -GTTCCCTTGACCGCCTTCCGATACCGTC -3'	620	80
		5' -GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC -3'		80

- 5.6 细菌基因组 DNA 提取试剂盒。
- 5.7 10×PCR 缓冲液：200 mmol/L Tris-HCl (pH8.4)，200 mmol/L 氯化钾，20 mmol/L 氯化镁。
- 5.8 dNTP：dATP、dCTP、dGTP、dTTP。
- 5.9 *Taq* DNA 聚合酶。
- 5.10 分子量标记：100 bp DNA Marker。
- 5.11 琼脂糖：电泳纯。
- 5.12 溴化乙锭。
- 5.13 50×TAE 电泳缓冲液（储备液）：称取 484 g Tris，量取 114 mL 冰醋酸，200 mL 0.5 mol/L EDTA，溶于水中，定容至 2 L。分装后高压灭菌备用。使用前稀释成 1×TAE 电泳缓冲液（工作液）。
- 5.14 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。
- 5.15 阳性质控菌株：来源于正规菌种保藏机构的沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、志贺氏菌标准菌株。
- 5.16 阴性质控菌株：来源于正规菌种保藏机构的任何非目标菌株。

6 设备和材料

- 6.1 天平：感量 0.001 g。
- 6.2 生物安全柜：AII 型。
- 6.3 厌氧培养系统。

- 6.4 恒温培养箱：36℃±1℃，42±1℃。
- 6.5 高压灭菌器。
- 6.6 均质器或灭菌研钵。
- 6.7 高速冷冻离心机：12 000 r/min 以上。
- 6.8 紫外分光光度计或核酸蛋白分析仪。
- 6.9 PCR 仪。
- 6.10 电泳装置。
- 6.11 凝胶成像分析系统。
- 6.12 微量移液器：0.2 μL~2 μL、2 μL~10 μL、20 μL~200 μL、100 μL~1 000 μL。
- 6.13 离心管：1.5 mL、2 mL。

7 检验程序

沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌检验程序见图 1。

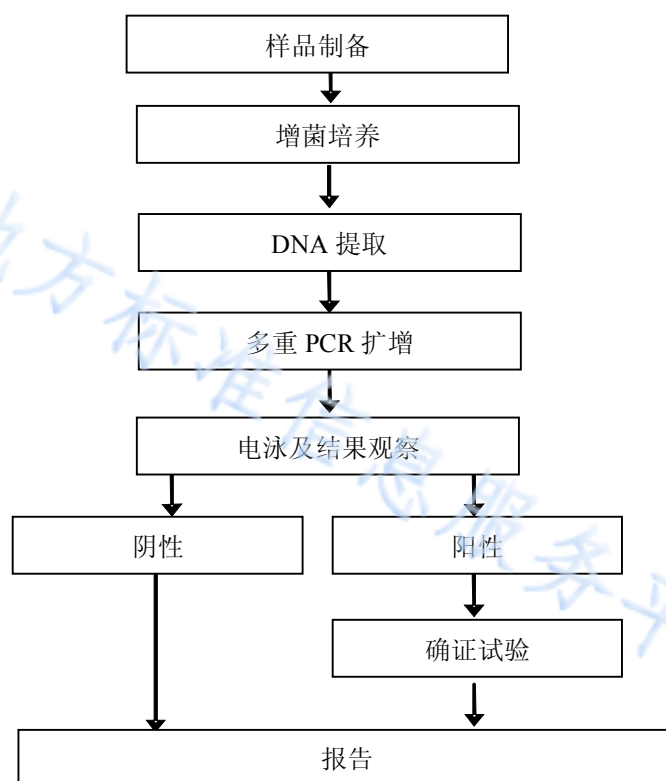


图 1 PCR 方法检测沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌程序图

8 生物安全措施

为了保护实验室人员的安全，应由具备资格的工作人员操作，所有培养物应小心处置。应按照 GB 19489 的规定执行。

9 废弃物处理和防止污染的措施

9.1 检验过程中的废弃物需经 121 °C 高压灭菌处理至少 30 min 后再弃置。

9.2 检验过程中防止交叉污染的措施按 WS/T 230 执行。

10 检测

10.1 样品制备、增菌培养

分别参照 GB 4789.4、GB 4789.5 和 GB 4789.10 进行。

10.2 DNA 的提取

对于 10.1 培养的增菌液，各取 0.5 mL 加到一个 2 mL 无菌离心管中，12 000 r/min 离心 2 min，尽量弃去上清液，使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒并按其说明提取制备模板 DNA。如不能及时检验，提取的 DNA 溶液可于 -20 °C 保存。

10.3 DNA 浓度测定

采用紫外分光光度法测定 DNA，所测得 OD 值为核酸总量。紫外分光光度法检测核酸浓度的最佳范围是 2 µg/mL~50 µg/mL，值应该在 0.05~1 的区间内。

将 DNA 溶液做适当的稀释，放入紫外分光光度计的比色皿中，于 260 nm 处测定其吸收值， $1 \text{ OD}_{260\text{nm}}=50 \text{ µg/mL}$ 双链 DNA 或 38 µg/mL 单链 DNA。PCR 级 DNA 溶液的 $\text{OD}_{260\text{nm}} / \text{OD}_{280\text{nm}}$ 比值为 1.7~2.0。

10.4 多重 PCR 扩增

10.4.1 空白对照、阴性对照和阳性对照试验

检验过程中分别设空白对照、阴性对照、阳性对照。空白对照设为以水代替 DNA 模板；阴性对照采用非目标菌的 DNA 作为 PCR 反应的模板；阳性对照分别采用沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌标准菌株 DNA 模板来作为阳性对照。

10.4.2 反应体系

PCR 反应体系各成分的组成：10×PCR 缓冲液（含 Mg^{2+} ）2.5 µL，dNTP（10 mmol/L）2.5 µL，*Taq* DNA 聚合酶（5U/µL）1.5 µL，DNA 模板（100 ng/µL）2 µL，混合引物 3.0 µL（*invA*、*ipaH* 和 *nuc* 的上下游引物分别加入 0.5 µL），补充灭菌超纯水至总体积 25 µL。

10.4.3 反应条件

94 °C 预变性 5 min，94 °C 变性 45 s，54 °C 退火 45 s，72 °C 延伸 1 min，35 个循环，72 °C 后延伸 10 min。结束反应，4 °C 保存。

10.4.4 扩增产物电泳检测

用电泳缓冲液（1×TAE）制备1.5%~2%琼脂糖凝胶（55℃~60℃时加入溴化乙锭至终浓度为0.5 μg/mL）。取8 μL~15 μL PCR扩增产物，分别和2 μL上样缓冲液混合，进行点样，用DNA Marker作参照。3 V/cm~5 V/cm恒压电泳，电泳20 min~40 min，电泳检测结果用凝胶成像分析系统记录并保存。

11 结果判定

11.1 若样品 PCR 扩增产物电泳出现 255 bp (*invA* 基因片段)、506 bp (*nuc* 基因片段) 和 620 bp (*ipaH* 基因片段) 的任一扩增条带或三者均出现，同时阳性对照扩增产物电泳后出现目的条带（255 bp、506 bp 和 620 bp 同时出现），阴性对照和空白对照扩增产物电泳后没有出现目的片段，判定结果可疑阳性。

11.2 PCR 扩增产物电泳无目的扩增条带，且阳性对照扩增产物电泳后出现目的片段，阴性对照和空白对照扩增产物电泳后没有出现目的片段，判定结果阴性。

11.3 对于可疑阳性样品建议按 GB 4789.4、GB 4789.5 和 GB 4789.10 规定的方法进行确证试验。如果确证结果为阳性，判定结果阳性；如确证结果为阴性，判定结果阴性。

地方标准信息服务平台