

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 5228.6—2019

出口食品中病原微生物快速筛选方法 MALDI-TOF MS 法 第 6 部分：蜡样芽胞杆菌

Rapid detection of pathogens in export food-MALDI-TOF MS method-
Part 6: *Bacillus cereus*

2019-12-27 发布

2020-07-01 实施

中华人民共和国海关总署

发布

前 言

SN/T XXXX《出口食品中病原微生物快速筛选方法 MALDI-TOF MS 法》分为九个部分：

- 第 1 部分：溶藻弧菌；
- 第 2 部分：产气荚膜梭菌；
- 第 3 部分：金黄色葡萄球菌；
- 第 4 部分：克罗诺杆菌属；
- 第 5 部分：创伤弧菌；
- 第 6 部分：蜡样芽胞杆菌；
- 第 7 部分：空肠弯曲菌；
- 第 8 部分：肺炎克雷伯氏菌；
- 第 9 部分：铜绿假单胞菌。

本部分为 SN/T XXXX 的第 6 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国海关总署提出并归口。

本部分起草单位：中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国吉林海关、中华人民共和国伊宁海关、中华人民共和国北京海关。

本部分主要起草人：陈颖、王婷、赵晓美、蔡阳、孟茹、曾静。

出口食品中病原微生物快速筛选方法 MALDI-TOF MS 法

第 6 部分：蜡样芽胞杆菌

1 范围

SN/T 5228 的本部分规定了出口食品中蜡样芽胞杆菌的 MALDI-TOF MS 快速筛选方法。
本部分适用于出口食品中蜡样芽胞杆菌的快速筛选。

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 4789.14 食品安全国家标准 食品微生物学检验 蜡样芽胞杆菌检验

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

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BTS：细菌检测标准品（bacterial test standard）。

CHCA： α -氰基-4-羟基肉桂酸（ α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid）。

MALDI-TOF MS：基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry）。

4 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检测蜡样芽胞杆菌，所有培养物和废弃物应参照 GB 19489 中的有关规定执行。

5 方法提要

MALDI-TOF MS 是应用于微生物全细胞快速检测的技术，主要依据微生物特征蛋白指纹图谱分析，完成微生物的鉴定和分类。将待鉴定的菌落样品与适量的基质溶液点加在样品板上，溶剂挥发后形成样品与基质的共结晶，利用激光作为能量来源辐射共结晶体，基质分子吸收能量与样品解吸附并使样品电离，经过飞行时间分析器，将不同质荷比的离子分开，形成微生物特异性的质谱图。将待测微生物质谱图与已知微生物的标准蛋白指纹图谱数据库进行比较，可以确定微生物的种属，进行微生物种属鉴定。

6 试剂和材料

除有特殊说明外，所有试剂均使用色谱纯试剂。实验用水符合 GB/T 6682 中一级水的要求。

- 6.1 脑心浸液琼脂 (Brain Heart Infusion Agar, BHIA)。
- 6.2 乙腈 (acetonitrile, ACN)。
- 6.3 无水乙醇。
- 6.4 三氟乙酸 (trifluoroacetic acid, TFA)。
- 6.5 α -氨基-4-羟基肉桂酸 (CHCA)。
- 6.6 甲酸。
- 6.7 BTS 标准品。
- 6.8 溶剂 I: 按照水:乙腈 (6.2):三氟乙酸 (6.5) 为 50:47.5:2.5 (体积比) 的比例配制, 现配现用。
- 6.9 BTS 标准溶液的配制: 用 50 μ L 溶剂 I (6.8) 溶解 BTS 标准品 (6.7)。用移液器反复吹吸溶解 BTS 粉末 (避免剧烈振荡), 室温放置 5 min, 再次溶解, 待 BTS (6.7) 全部溶解后, 瞬时离心, 用 200 μ L PCR 管进行分装, 每管 5 μ L, -20°C 保存备用。
- 6.10 CHCA 基质溶液的配制: 在 CHCA (6.6) 粉末中加入溶剂 I (6.8), 使 CHCA 终浓度为 10 mg/mL。振荡混匀, 直至溶液澄清。用 1.5 mL 离心管进行分装, 每管 50 μ L, 用封口膜密封管口, 室温放置备用。放置后, 如出现大量沉淀应弃用。

7 主要仪器和设备

- 7.1 台式离心机: 最大离心力 $\geq 16\ 000\ \text{g}$ 。
- 7.2 涡旋振荡器。
- 7.3 微量移液器: 10 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1 000 μ L。
- 7.4 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪。

8 检测步骤

8.1 检测流程图

食品中蜡样芽胞杆菌 MALDI-TOF MS 检测流程见图 1。

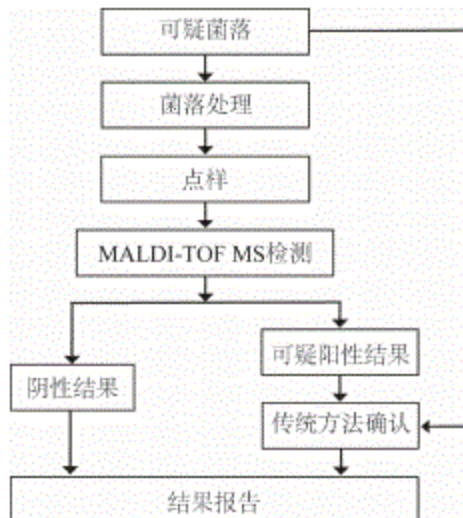


图 1 蜡样芽胞杆菌 MALDI-TOF MS 检测流程图

8.2 样品制备、增菌培养和分离

食品中蜡样芽胞杆菌检测样品的制备、增菌培养和分离步骤按照 GB 4789.14 方法进行。

8.3 可疑菌落的处理

8.3.1 接种培养

至少应挑取 5 个可疑菌落，划线接种 BHIA (6.1) 培养基上， $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。如果平板上的可疑菌落少于 5 个，则应全部挑取。

8.3.2 菌落蛋白提取

8.3.2.1 取适量细菌培养物 (5 mg~10 mg)，将细菌细胞重悬于 300 μL 水中，充分混匀；加入 900 μL 无水乙醇 (6.3)，涡旋振荡混匀；13 000 g，离心 2 min，弃上清，相同条件瞬时离心 30 s，用移液器移除剩余上清液，室温放置 5 min，使乙醇挥发。

8.3.2.2 加入 30 μL ~50 μL 70% 甲酸 (6.4) (甲酸的量可以根据细菌沉淀的量进行调整)，充分混匀，加入等体积乙腈 (6.2)，涡旋振荡混匀；13 000 g，离心 2 min，上清液用于点样。

8.4 点样

取 1 μL 8.3.2.2 中制备的上清液点到靶板上，同时在靶板上点 BTS 标准品 (6.7)，置室温，待液滴干燥后，在样品上覆盖 1 μL CHCA 基质溶液 (6.10)，待 CHCA 基质溶液 (6.10) 干燥后进行 MALDI-TOF MS 检测。

8.5 MALDI-TOF MS 检测

8.5.1 仪器参数的设置

选择线性操作模式，正离子模式；检测范围：2 000 Da~20 000 Da；激光点击数：每图谱 40 次 (6 次激光累积)；激光频率：60.0 Hz；离子源加速电压：20 kV。

8.5.2 仪器校正

对可疑菌落进行质谱数据采集前，应先使用 BTS 标准品 (6.7) 对仪器的质荷比进行校准，确保质荷比误差范围小于 0.030 0%。

8.5.3 数据采集及分析

对可疑菌落进行质谱数据采集并保存，通过 Biotyper 软件进行分析鉴定。

8.5.4 结果判定标准

MALDI-TOF MS 鉴定结果给出数据库中与鉴定菌种最为匹配的 10 个菌株种属，并给出相对应的匹配分值。分值在 2.300~3.000 之间，表示菌种鉴定的可信度很高；在 2.000~2.299 之间，表示可信的菌属鉴定和可能的菌种鉴定；在 1.700~1.999 之间，表示可能的菌属鉴定；在 0.000~1.699 之间，表示不可信的鉴定结果。

9 结果判定与报告

9.1 可疑菌落经 MALDI-TOF MS 鉴定为蜡样芽胞杆菌，且匹配分值大于等于 1.700，可判定检测结果为阳性可疑，应按照 GB 4789.14 方法做进一步确证和报告。

SN/T 5228.6—2019

9.2 除 9.1 以外的结果，可判定检测结果为阴性，报告未检出蜡样芽胞杆菌。

10 废弃物处理和防污染措施

检测过程中的废弃物需经 121℃ 高压灭菌处理至少 30 min 后再弃置。
