

T/SDAQI

团 体 标 准

T/SDAQI 043—2021

饲料中沙门氏菌、副溶血性弧菌、志贺氏菌 三重荧光定量 PCR 快速检测方法

Detection of salmonella, vibrio parahaemolyticus and shigella in animal feed by
Real-time PCR

2021-09-25 发布

2021-10-25 实施

版 权 说 明

本文件系由山东质量检验协会（简称“协会”）组织创制的团体标准文本（含制定过程中的草案），协会拥有本文件的著作权，受《中华人民共和国著作权法》保护。除法律所允许的情形或事先得到协会书面许可外，任何组织和个人不得以任何理由进行复制、销售、传播本文件，或抄袭、歪曲本文件等侵权行为，否则，行为人应承担相应的民事、行政责任，构成犯罪的，将依法追究其刑事责任。其他文件引用本文件，不属侵权行为。

凡利用本文件进行或支持贸易、认证等商业活动，应事先购买正式文本或得到协会书面授权。购买本文件或获得授权，请与协会联系。

欢迎社会各界举报侵权盗版行为，协会将依法严格保护举报人信息。

联系人：范红梅

联系电话：0531-89701986 15668365153

联系邮箱：keyanjishuzhongxin@163.com

协会对本版权声明拥有最终解释权。

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意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。

本文件由山东质量检验协会提出并归口。

本文件起草单位：山东省产品质量检验研究院、滨州市食品药品检验检测中心。

本文件主要起草人：李娜、王一村、周莉莉、高静静、才美佳、赵彤彤、张宇鑫、侯广月、康兆广、徐正、孙全胜、张鑫、朱富强。

本文件的所有权和解释权归山东质量检验协会。

如果您在本文件使用中发现错误或技术内容有不当之处，请及时与协会秘书处联系，将意见发送到keyanjishuzhongxin@163.com。

饲料中沙门氏菌、副溶血性弧菌、志贺氏菌三重荧光定量 PCR 快速检测方法

1 范围

本文件规定了宠物饲料中沙门氏菌、副溶血性弧菌、志贺氏菌的三重快速检测方法。
本文件适用于宠物饲料产品。
本方法检出限分别为沙门氏菌10 CFU/g、副溶血性弧菌20 CFU/g、志贺氏菌20 CFU/g。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测
GB/T 19495.2 转基因产品检测 实验室技术要求
GB 19489 实验室 生物安全通用要求

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

样品经增菌培养，收集培养后的增菌液进行DNA提取。以DNA为模板，采用细菌16S rDNA基因序列作为内参照，以沙门氏菌中*invA*基因、副溶血性弧菌*tlh*基因和志贺氏菌*ipaH*基因中相对保守且高度特异的序列设计引物与探针，进行目标物的三重实时荧光PCR扩增，根据Ct值，判断样品中是否含有沙门氏菌、副溶血性弧菌和志贺氏菌。其中，对内参照反应的检测，可以监控反应是否正常进行，防止假阴性结果。

5 仪器设备

- 5.1 电子天平，感量 0.01 g。
- 5.2 微量可调移液器（最大量程为 10 μ L、20 μ L、100 μ L、1000 μ L）。
- 5.3 恒温水浴锅。
- 5.4 磁力搅拌器。
- 5.5 高速冷冻离心机：最高离心力不低于 12000 g。
- 5.6 二级生物安全柜。

- 5.7 高压灭菌锅。
 5.8 普通冰箱：4℃，-20℃。
 5.9 pH 计。
 5.10 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。
 5.11 实时荧光定量 PCR 仪。
 5.12 恒温培养箱：36℃±1℃。

6 试剂或材料

试剂的配制及试验中的操作规范应按GB/T 27403的规定执行。

除另有规定外，试剂应为分析纯级别，实验用水应符合GB/T 6682的要求。所有试剂均用无DNA酶污染的容器分装。

6.1 检测用引物和 Taqman 探针序列（详见表 1）

表1 检测用引物和Taqman探针

| 名称 | 序列（5'—3'） | 目的基因 |
|--|---|----------------------|
| 内参照5'端引物 内参照3'端引物 内参照探针 | F: 5'- TTAAGTCCCGCAACGAGC--3' R:5'- TTGTAGCACGTGTGTAGCCC -3' P:5'-VIC-TTGACGTCATCCCCACCTTCCTCC-BHQ1-3' | 原核生物16S rDNA基因 |
| 沙门氏菌5'端引物 沙门氏菌3'端引物 沙门氏菌探针 | F:5'- CTCAACTTGC GGAGCGTCTAC -3' R:5'- CGGAATAATTTACCACTCGCATC-3' P: 5' - HEX - CGCCTGCCGGAAGTATTGTTACGAGAT-BHQ1-3' | 沙门氏菌 <i>inv A</i> 基因 |
| 副溶血性弧菌5'端引物 副溶血性弧菌3'端引物 副溶血性弧菌探针 | F: 5'-ACTCAACACAAGAAGAGATCGACAA-3' R: 5'-GATGAGCGGTTGATGTCCAA-3' P: 5'-CY5-CGCGTTCACGAAACCGTGC- MGBNFQ-3' | 副溶血性弧菌 <i>tlh</i> 基因 |
| 志贺氏菌5'端引物 志贺氏菌3'端引物 志贺氏菌探针 | F: 5'-TGGTCCATCAGGCATCAGAAG-3' R: 5'-CTGCGAGCATGGTCTGGAA-3' P: 5'-FAM-TAATGATACCGGCGCTCTGCTCTCCC- BHQ1-3' | 志贺氏菌 <i>ipaH</i> 基因 |

- 6.2 十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）缓冲液：55 mmol/L CTAB，1.4 mol/L NaCl，20 mmol/L 乙二胺四乙酸（EDTA），100 mmol/L Tris，调 pH 至 8.0。121℃高压灭菌 20 min，备用。
 6.3 TE 缓冲液：10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)，1 mmol/L EDTA (pH 8.0)。
 6.4 蛋白酶 K：20 mg/μL。
 6.5 RNA 酶溶液：5 μg/μL。
 6.6 Tris 饱和酚。
 6.7 三氯甲烷。
 6.8 异戊醇。
 6.9 异丙醇。
 6.10 70%乙醇。
 6.11 商品化 2×荧光定量 PCR 预混液。
 6.12 营养肉汤培养基：见附录 A。

7 试验步骤

7.1 预增菌

称取 10 g 饲料样品充分粉碎混合均匀后，于 90 mL 营养肉汤中 $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h 进行预增菌。取培养好的增菌液进行 DNA 提取。固体样品要充分粉碎研磨，必要时用液氮研磨。

7.2 DNA 提取

量取 1 mL~1.5 mL 已培养好的增菌液于 2.5 mL 离心管中，加入 1 000 μL CTAB 缓冲液和 40 μL 蛋白酶 K，震荡混匀， 65°C 温浴 30 min，每隔 10 min 振荡混匀。12 000 g 离心 10 min，吸取 1 mL 上清液至 2 mL 离心管中，勿吸取管内杂质。向离心管中加入 500 μL 体积比为 25:24:1 的酚-三氯甲烷-异戊醇的混合液，剧烈震荡，12 000 g 离心 12 min。吸取上清液至一新离心管中，加入等体积异丙醇，剧烈震荡，12 000 g 离心 10 min。弃上清液，用 65°C 预热的双蒸水溶解 DNA。加入 5 μL RNA 酶， 37°C 温浴 30 min。加入 200 μL 体积比为 24:1 的三氯甲烷-异戊醇混合液，剧烈震荡，12 000 g 离心 12 min。吸取上清液至一新离心管中，加入等体积异丙醇，震荡均匀，12 000 g 离心 10 min。弃上清，70% 乙醇洗涤一次，12 000 g 离心 1 min。弃上清液，晾干后加入 50 μL TE 缓冲液溶解 DNA， -20°C 保存。

DNA 提取也可使用等效的 DNA 提取试剂盒替代。

7.3 DNA 浓度及纯度的测定

取适量的 DNA 模板溶液加双蒸水稀释一定倍数后，使用紫外分光光度计测定 260 nm 和 280 nm 处的吸光值 A_{260} 和 A_{280} ，DNA 浓度计算按式 (1) 计算，

$$C=A\times N\times 50 \dots\dots\dots(1)$$

式中：

C-----DNA 浓度，单位为微克每微升 ($\text{ng}/\mu\text{L}$)；

A-----260 nm 处的吸光值；

N-----核酸稀释倍数；

50-----吸光值 A_{260} 为 1 时，相对应双链 DNA 的浓度常数；

当 A_{260}/A_{280} 比值在 1.8~2.0 之间时，DNA 模板适宜荧光定量 PCR 扩增。

若检测 DNA 模板浓度不在规定范围内，可适当增加样品采样量或增加荧光定量 PCR 反应过程中模板量或减少溶解 DNA 的溶剂的量，提高浓度，以保证检测的有效性。

7.4 实时荧光 PCR 检测

7.4.1 实时荧光 PCR 反应体系

表 2 实时荧光 PCR 反应体系

| 试剂成分 | 体积 (单位: μL) |
|---|-------------------------|
| 2 \times 荧光定量 PCR 预混液 | 12.5 |
| 引物 F 各 (10 μM) | 0.5 |
| 引物 R 各 (10 μM) | 0.5 |
| 探针 P 各 (5 μM) | 0.2 |
| 样品 DNA (10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ~100 $\text{ng}/\mu\text{L}$) | 1 |
| ddH ₂ O | 补至 25 |

7.4.2 实时荧光 PCR 反应参数

95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 5 s, 60°C 退火 30 s, 45 个循环。

7.4.3 实验对照

检验过程中分别设内参照、沙门氏菌阳性对照、副溶血性弧菌阳性对照、志贺氏菌阳性对照、阴性对照、空白对照。以任一细菌的DNA为内参照、以沙门氏菌、副溶血性弧菌、志贺氏菌提取的DNA分别为阳性对照、以其他细菌提取的DNA为阴性对照，以灭菌水为空白对照。

8 质量控制

以下条件有一条不满足时，实验视为无效，需重新进行实验。

- 空白对照：无荧光对数增长，相应的Ct值 >40.0 ；
- 阴性对照：无荧光对数增长，相应的Ct值 >40.0 ；
- 沙门氏菌阳性对照：有荧光对数增长且荧光通道出现典型的扩增曲线，相应的Ct值 <30.0 ；
- 副溶血性弧菌阳性对照：有荧光对数增长且荧光通道出现典型的扩增曲线，相应的Ct值 <30.0 ；
- 志贺氏菌阳性对照：有荧光对数增长且荧光通道出现典型的扩增曲线，相应的Ct值 <30.0 ；
- 内参照：有荧光对数增长且荧光通道出现典型的扩增曲线，相应的Ct值 <30.0 。

9 结果判定及表述

9.1 结果判定

在符合第7部分的情况下，被检样品进行检测时：

- 如沙门氏菌*invA*基因Ct值 ≤ 35.0 ，则判定为被检样品沙门氏菌检出；
- 如副溶血性弧菌*tlh*基因Ct值 ≤ 35.0 ，则判定为被检样品副溶血性弧菌检出；
- 如志贺氏菌*ipaH*基因Ct值 ≤ 35.0 ，则判定为被检样品志贺氏菌检出；
- 如Ct值 ≥ 40.0 ，则判定相应被检源性成分阴性；
- 如 $35.0 < \text{Ct值} < 40.0$ ，判为结果可疑，需要重新检测。重新检测需从提取DNA开始重新检测，由于为定性检测，可从多个方面提高检测率，根据各种具体情况在可选使用量的几个因素中重新调整优化检测过程，如增加样品取样量、减少溶解DNA的TE剂量，增加PCR反应中加入的模版量、适量增加PCR反应循环数等。如再次扩增后Ct值仍为 < 40.0 ，则判定相应被检致病菌为阳性；如再次扩增后Ct值 ≥ 40.0 ，则判定相应被检成分阴性。

9.2 结果判定和表述

表 3 结果的判定和表述

| FAM荧光 (志贺氏菌) | CY5荧光 (副溶血性弧菌) | HEX荧光 (沙门氏菌) | 结果判定 | 结果表述 |
|-----------------|-------------------|-----------------|---|---------------------------------|
| + | + | + | 有FAM、CY5和HEX荧光同时被检出，且Ct值均 ≤ 35.0 。 | 表明从样品中同时检出沙门氏菌、副溶血性弧菌和志贺氏菌。 |
| + | + | - | 有FAM和CY5荧光同时被检出，但无HEX荧光，且Ct值均 ≤ 35.0 。 | 表明从样品中同时检出志贺氏菌和副溶血性弧菌，但未检出沙门氏菌。 |
| + | - | + | 有FAM和HEX荧光同时被检出，但无CY5荧光，且Ct值均 ≤ 35.0 。 | 表明从样品中同时检出沙门氏菌和志贺氏菌，但未检出副溶血性弧菌。 |
| - | + | + | 有HEX和CY5荧光同时被检出，但无FAM荧光，且Ct值均 ≤ 35.0 。 | 表明从样品中同时检出沙门氏菌和副溶血性弧菌，但未检出志贺氏菌。 |

| FAM荧光 (志贺氏菌) | CY5荧光 (副溶血性弧菌) | HEX荧光 (沙门氏菌) | 结果判定 | 结果表述 |
|---------------------------------------|-------------------|-----------------|--|-------------------------------------|
| + | - | - | 只有FAM荧光被检出, 且Ct值均 ≤ 35.0 , 但无HEX和CY5荧光。 | 表明从样品中只检出志贺氏菌成分, 但未检出沙门氏菌和副溶血性弧菌。 |
| - | + | - | 只有CY5荧光, 且Ct值均 ≤ 35.0 , 但无FAM和HEX荧光。 | 表明从样品中只检出副溶血性弧菌成分, 但未检出沙门氏菌和志贺氏菌成分。 |
| - | - | + | 只有HEX荧光, 且Ct值均 ≤ 35.0 , 但无FAM和CY5荧光。 | 表明从样品中只检出沙门氏菌成分, 但未检出志贺氏菌和副溶血性弧菌成分。 |
| - | - | - | 无FAM、HEX和CY5荧光被检出, 判定为阴性。 | 表明样品中未检出沙门氏菌、志贺氏菌和副溶血性弧菌成分。 |
| 注1: “+”表示阳性, “-”表示阴性。 | | | | |
| 注2: 上述判定和表述均在阴性对照和阳性对照及内参照同时成立的前提下进行。 | | | | |

10 生物安全和防污染措施

检测过程中生物安全相关措施按照GB 19489中的规定执行, 防止交叉污染的措施按照GB/T 27403中的规定执行。

附录 A
(规范性)
营养肉汤培养基

A.1 成分

表 A.1 营养肉汤培养基成分表

| 培养基成分 | 添加量 |
|-------|------------|
| 胰蛋白胨 | 10 g |
| 氯化钠 | 5 g |
| 牛肉膏 | 3 g |
| 蒸馏水 | 补水至1000 mL |

A.2 制法

先将上述几种成分混合，加热溶解，调pH为7.2—7.3分装，每瓶90 mL，121℃高压灭菌20 min。冷却至25℃左右使用。培养基于2℃~4℃保存，在一周内使用。
