

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1632.3—2013  
代替 SN/T 1632.3—2005

---

### 出口奶粉中阪崎肠杆菌(克罗诺杆菌属) 检验方法 第3部分:荧光 PCR 方法

Determination of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) from dehydrated powdered milk for export—Part 3: Real-time PCR method

2013-11-06 发布

2014-06-01 实施

---

中华人民共和国  
国家质量监督检验检疫总局 发布

# 前 言

SN/T 1632《出口奶粉中阪崎肠杆菌(克罗诺杆菌属)检验方法》共分为 3 个部分:

- 第 1 部分:分离与计数;
- 第 2 部分:PCR 方法;
- 第 3 部分:荧光 PCR 方法。

本部分为 SN/T 1632 的第 3 部分。

本部分依照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本部分代替 SN/T 1632.3—2005《奶粉中阪崎肠杆菌检验方法 第 3 部分:荧光 PCR 方法》。

本部分与 SN/T 1632.3—2005 相比,除编辑性修改外,主要技术变化如下:

- 修改了标准的中英文名称;
- 修改了引物和探针;
- 删除了定义、术语和缩略语;
- 增加了克罗诺杆菌属内种的分型鉴别方法的资料性附录。

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这些专利的责任。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位:中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、中华人民共和国天津出入境检验检疫局。

本部分主要起草人:赵贵明、王娉、吕敬章、陈颖、杨海荣、赵勇胜、高旗利、张霞、刘培。

本部分所代替标准的历次版本发布情况为:

- SN/T 1632.3—2005。

# 出口奶粉中阪崎肠杆菌(克罗诺杆菌属) 检验方法 第3部分:荧光 PCR 方法

## 1 范围

SN/T 1632 的本部分规定了奶粉中阪崎肠杆菌(克罗诺杆菌属)的荧光 PCR 检测方法。  
本部分适用于奶粉中阪崎肠杆菌(克罗诺杆菌属)的快速定性检测,其他食品可参照执行。

## 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。

SN/T 1632.1 出口奶粉中阪崎肠杆菌(克罗诺杆菌属)检验方法 第1部分:分离与计数

SN/T 1632.2—2013 出口奶粉中阪崎肠杆菌(克罗诺杆菌属)检验方法 第2部分:PCR 方法

## 3 测定方法

### 3.1 方法提要

奶粉经增菌后,取增菌液 1 mL 加到 1.5 mL 无菌离心管中,以 8 000 r/min 的转速离心 5 min,轻轻倒去上清液,倒置于吸水纸上,吸干液体,不同样品应在吸水纸不同地方吸干;加入 50  $\mu$ L DNA 提取液(使用前室温解冻并充分混匀,快速吸取),混匀后沸水浴 5 min,以 12 000 r/min 的转速离心 5 min,取上清液作为模板进行荧光 PCR 扩增,观察荧光 PCR 仪的实时曲线,从而对奶粉中的阪崎肠杆菌(克罗诺杆菌属)进行快速检测。

### 3.2 试剂和材料

见 SN/T 1632.1。除另有规定外,试剂为分析纯或生化试剂,水为灭菌双蒸水。

#### 3.2.1 引物:

5'-GGCGAGCGGCGAATATTAT -3'

5'-CGGGTTTTCCAGTTGAGATC -3'

#### 3.2.2 探针:

5'-FAM-CACCAGTTTTTCGGTGCGCCAGC-BHQ-3'

#### 3.2.3 *Ex Taq* DNA 聚合酶。

#### 3.2.4 dNTPs:dATP、dTTP、dCTP、dGTP。

#### 3.2.5 DNA 提取试剂:0.1%Chelex100(螯合树脂)水溶液。

#### 3.2.6 10 $\times$ PCR 缓冲液:200 mmol/L Tris-HCl(pH 8.4),200 mmol/L 氯化钾,15 mmol/L 氯化镁。

#### 3.2.7 FastSartUniversal Probe Master(2 $\times$ )。

#### 3.2.8 阪崎肠杆菌(克罗诺杆菌属)质控菌株:ATCC 29544,或等效菌株。

#### 3.2.9 仪器和设备。

#### 3.2.10 荧光 PCR 仪。

3.2.11 离心机:20 000 r/min。

3.2.12 移液器:10  $\mu$ L、100  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1 000 $\mu$ L。

3.2.13 水浴锅。

### 3.3 操作步骤(流程见附录 A)

#### 3.3.1 前增菌和增菌

取检样 100 g 加入已预热至 45  $^{\circ}$ C 装有 900 mL 灭菌水的锥形瓶中,振摇使样品充分溶解,36  $^{\circ}$ C  $\pm$  1  $^{\circ}$ C 培养 18 h~22 h。移取 1 mL 转种于 10 mL 改良月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤中(MLST,见 SN/T 1632.2—2013 中 A.1),36  $^{\circ}$ C  $\pm$  1  $^{\circ}$ C 培养 18 h~22 h。

#### 3.3.2 模板 DNA 准备

每瓶培养的 MLST 分别取 1 mL 加到 1.5 mL 无菌离心管中,8 000 r/min 离心 5 min,轻轻倒去上清液,倒置于吸水纸上,吸干液体,不同样品应在吸水纸不同地方吸干;加入 50  $\mu$ L DNA 提取液(使用前室温解冻并充分混匀,快速吸取),混匀后沸水浴 5 min,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液以待检验(如不能及时检验,可将上清液于-20  $^{\circ}$ C 保存)。也可使用其他经验证的 DNA 提取方法。

#### 3.3.3 荧光 PCR 检测

反应体系总体积为 25  $\mu$ L,其中含:上游引物和下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.4  $\mu$ L、FastSartUniversal Probe Master(2 $\times$ )12.5  $\mu$ L、探针(10  $\mu$ mol/L) 0.2  $\mu$ L、模板 DNA 2  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 补齐至 25  $\mu$ L。反应步骤:反应步骤一,95  $^{\circ}$ C 10 min;反应步骤二,95  $^{\circ}$ C 5 s,55  $^{\circ}$ C 退火 20 s,同时收集荧光信号,共进行 40 个循环。反应产物可在 4  $^{\circ}$ C 保存。检测过程中要设阳性对照、阴性对照和空白对照。分别接种阪崎肠杆菌和大肠杆菌到 10 mL NB 中,36  $^{\circ}$ C  $\pm$  1  $^{\circ}$ C 过夜培养,各取 1.5 mL 增菌液,离心,提取 DNA 模板。阪崎肠杆菌 DNA 模板作阳性对照,大肠杆菌 DNA 模板作阴性对照,空白对照以无菌水作为模板,加样量与样品加样量一致。

## 4 结果与报告

4.1 检测样本 C<sub>t</sub> 值小于或等于 35.0 时,报告阪崎肠杆菌(克罗诺杆菌属)筛选阳性;检测样本 C<sub>t</sub> 值大于 35.0 且小于 40.0 时,重复一次,如果 C<sub>t</sub> 值仍小于 40.0,且曲线有明显的对数增长期,可报告阪崎肠杆菌(克罗诺杆菌属)筛选阳性,否则报告阪崎肠杆菌(克罗诺杆菌属)未检出;样本检测不到 C<sub>t</sub> 值时,报告阪崎肠杆菌(克罗诺杆菌属)未检出。

4.2 筛选阳性的样本按 SN/T 1632.1 进行确证,必要时参考附录 B 方法,进一步区分到种。

4.3 报告每 100 g 样品中检出或未检出阪崎肠杆菌(克罗诺杆菌属)。

附录 A  
(规范性附录)  
荧光 PCR 检测方法程序

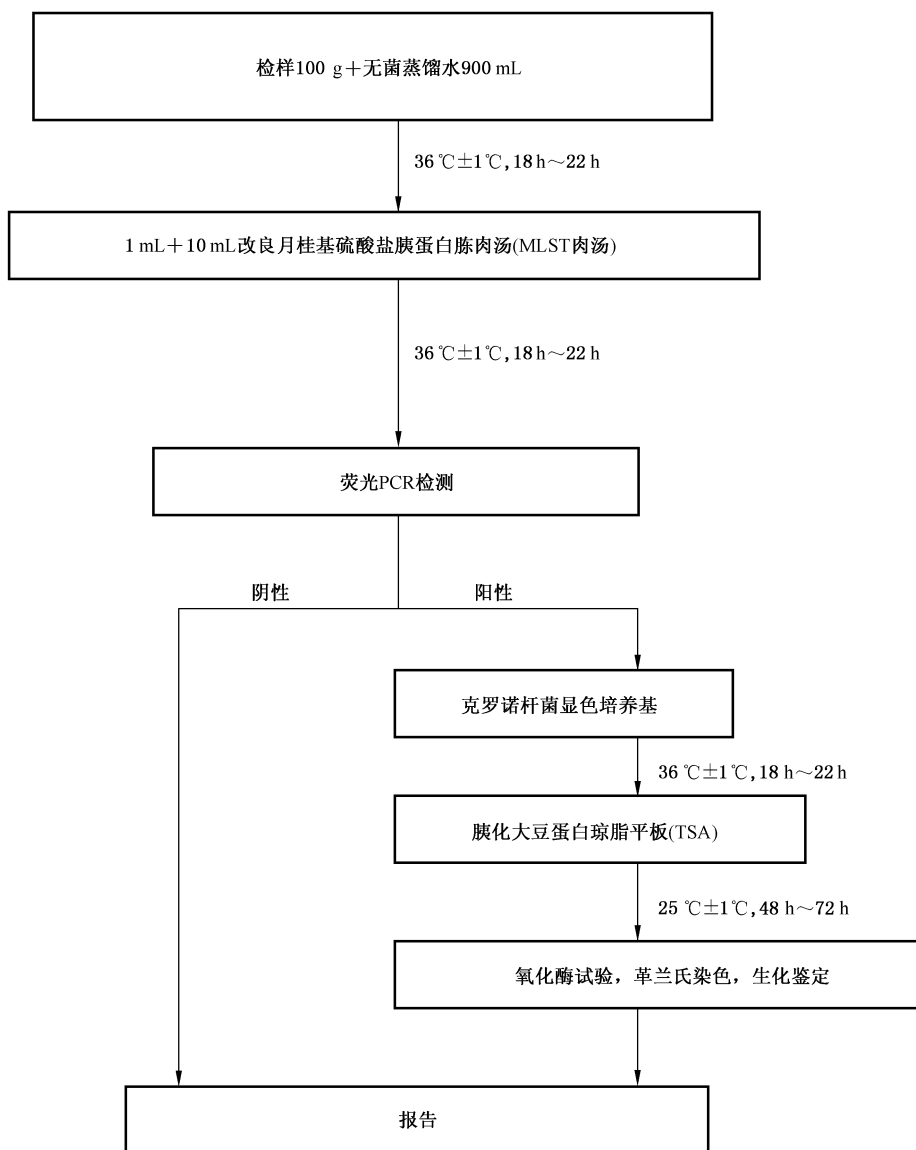


图 A.1 程序图

## 附录 B

(资料性附录)

## 克罗诺杆菌属内种的分型鉴别方法

## B.1 测试样品基因组 DNA 的制备

实验菌株纯培养物经 36 °C 24 h 增菌后,取增菌液 1 mL 加到 1.5 mL 无菌离心管中,以 8 000 r/min 的转速离心 5 min,轻轻倒去上清液,倒置于吸水纸上,吸干液体,不同样品应在吸水纸不同地方吸干;加入 50  $\mu$ L DNA 提取液(使用前室温解冻并充分混匀,快速吸取),混匀后沸水浴 5 min,以 12 000 r/min 的转速离心 5 min,取上清液作为模板。

## B.2 引物

引物见表 B.1。

表 B.1 克罗诺杆菌 *recN* 基因引物

基因名称	引物序列(5'-3')	扩增片段长度/bp
<i>recN</i>	F:CTGGCACAATTAACCATCAGTAA R:TGGGTAACGCACATCACCTGAGT	1 800

## B.3 聚合酶链式反应

采用表 B.1 中的引物对检测样品 DNA 进行 PCR 扩增。25  $\mu$ L PCR 反应体系中,10 $\times$ PCR buffer (含 Mg<sup>2+</sup>) 2.5  $\mu$ L,dNTPs(各 2.5 mol/L)1.0  $\mu$ L, Ex *Taq* DNA polymerase(5 U/ $\mu$ L) 0.2  $\mu$ L,上下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.5  $\mu$ L, DNA 模板 2.0  $\mu$ L,加灭菌 ddH<sub>2</sub>O 至 25  $\mu$ L。PCR 循环反应参数为,95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 30 s, 55 °C 30 s,72 °C 延伸 2 min;30 个循环;循环完成后 72 °C,10 min 充分延伸,4 °C 保存。

## B.4 产物鉴定及测序

配制 2%琼脂糖凝胶,取 5  $\mu$ L PCR 产物加溴酚蓝混匀,加入合适的 DNA 分子量标记物,根据电泳槽的长度设定合适的电压进行电泳。凝胶经 GelRed 染色后,用凝胶成像系统成像,分析 PCR 反应结果,然后将阳性 PCR 产物纯化,送至上海生工进行克隆测序。

## B.5 聚类分析

将测序结果拼接后,选取其中的 1662 bp 进行多序列比对,用 Mega4.0 进行聚类分析。同时以 GeneBank 上已经公布的克罗诺杆菌属不同种的 *renN* 基因序列作为阳性参考:*C. dublinensis* (EU569474),*C. genomospecies1* (EU569479),*C. muytjensii* (EU569492),*C. turicensis* (EU569523),*C. sakazakii* (EU569522)、*C. malonaticus*(EU569491)。

## B.6 结果判定

聚类分析中,将测序结果拼接后,用 Lasergene 软件选择其中最长的一个 ORF1662bp(从起始密码子 ATG 开始到终止密码子结束),或与参考序列 *C.dublinensis* (EU569474) 等比对,截取等长的片段 1662 bp,与 GeneBank 中的参考序列进行 blast 比对,同源性大于 97% 时,可判断为同一种菌。

---