

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1632.4—2022

出口乳粉中克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)
检测方法 第4部分:PCR-CRISPR 法

Test method of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*)
in export milk powder—Part 4: PCR-CRISPR method

2022-03-14 发布

2022-10-01 实施

中华人民共和国海关总署 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020 和 GB/T 20001.4—2015 的规定起草。

本文件是 SN/T 1632《出口乳粉中克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)检测方法》的第 4 部分。SN/T 1632 已经发布了以下部分：

- 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；
- 第 4 部分：PCR-CRISPR 法。

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。

本文件由中华人民共和国海关总署提出并归口。

本文件起草单位：中华人民共和国上海海关、上海市质量监督检验技术研究院、深圳大学第一附属医院、大连民族大学。

本文件主要起草人：杨捷琳、刘洋、张清平、薛俊欣、杨娟、张懿翔、袁辰刚、李林显、蒋原、王金、郭德华、王越、申进玲、曲勤凤、郑秋月、张奕南、赵磊。

以正式出版文本为准

出口乳粉中克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌) 检测方法 第4部分:PCR-CRISPR法

1 范围

本文件规定了乳粉中克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)(*Cronobacter spp.*)的PCR-CRISPR检测方法。本文件适用于乳粉中克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)(*Cronobacter spp.*)的定性检测。

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 4789.40 食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)检验

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 27403—2008 实验室质量控制规范食品分子生物学检测

3 术语、定义和缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

Cas 蛋白 Cas protein

Cas 蛋白是指 CRISPR-associated 蛋白,它是 CRISPR 系统中起功能作用的相关蛋白。

3.1.2

Cas12b 酶 Cas12b enzyme

Cas 蛋白的一种,属于 II 类 V-b 型 Cas 蛋白,是 crRNA:tracrRNA(sgRNA)依赖的核酸内切酶。

3.1.3

向导 RNA guide RNA

向导 RNA 是指引导 Cas 蛋白特异性结合靶标 DNA 序列的 RNA,通常由 crRNA 或 crRNA:tracrRNA(sgRNA)复合物组成。

3.1.4

N 值 N value

CRISPR 方法检测结果的判定值。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CRISPR:成簇的规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)

tracrRNA:反式激活 CRISPR RNA(trans-activation CRISPR RNA)

4 方法提要

本文件通过 PCR-CRISPR 方法对乳粉中克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)开展定性检测。首先采用普通 PCR 进行克罗诺杆菌属 *fusA* 基因特异性扩增,再用 CRISPR 反应特异性切割扩增产物,观察荧光值增量并给出结果判定。CRISPR/Cas12b 是基因编辑系统中的一种,其对应的 tracrRNA 和 crRNA 通过碱基互补配对方式形成 RNA 复合结构,该结构与 Cas12b 结合形成复合物,如果有目标 DNA 存在,Cas12b 蛋白在 crRNA:tracrRNA 引导下特异性结合靶标核酸,之后其非特异性切割单链 DNA 的活性被激活,从而将体系中单链 DNA 报告分子切开并释放出可检测的信号。

5 试剂和材料

除另有规定外,所有试剂均为分析纯或生化试剂。实验用水符合 GB/T 6682 一级水的要求。所有试剂均用无 DNA/RNA 酶污染的容器分装。

- 5.1 缓冲蛋白胨水(BPW)。
- 5.2 裂解液:20 g/L CTAB,1.4 mol/L NaCl,0.1 mol/L Tris-HCl,0.02 mol/L EDTA,pH 调至 8.0。
- 5.3 TE 缓冲液:1 mmol/L Tris-HCl,0.1 mmol/L EDTA,pH8.0。
- 5.4 蛋白酶 K:20 mg/mL。
- 5.5 Tris 饱和酚。
- 5.6 三氯甲烷。
- 5.7 异戊醇。
- 5.8 乙醇。
- 5.9 2×PCR 缓冲液:Phanta[®] Max Buffer。
- 5.10 dNTP 混合液(10 mM)。
- 5.11 DNA 聚合酶。
- 5.12 NEBuffer:100 mM NaCl,50 mM Tris-HCl,10 mM MgCl₂,100 ug/ml BSA,pH7.9。
- 5.13 RNA 酶抑制剂。
- 5.14 TaqMan 实时荧光 PCR 预混液:Taq DNA 聚合酶、PCR 反应缓冲液、氯化镁、dNTPs(含 dATP、dUTP、dCTP、dGTP)和 UNG 酶按比例配制的溶液。
- 5.15 检测用引物和探针

PCR 扩增及 CRISPR 反应所用引物、crRNA 和探针序列详见表 1。

表 1 克罗诺杆菌属引物、crRNA 与探针

	引物/探针序列(5'→3')	靶基因	碱基数(bp)	PCR 扩增 产物 长度 65 bp
引物 F	5'AACACGCTTTCTAACGTTGATAAGG3'	<i>fusA</i> ^a	25	
引物 R	5'CTTTTGTGCGTAAGAGCAGAGGTGAG 3'		25	
crRNA	5'CGAGCGAUCUGAGAAGUGGCACAUAAGGCCAAUAAUAAUG 3'		40	
Cas12b-tracrRNA	5'GUCUAGAGGACAGAAUUUUUCAACGGGUGUGCCAAUGGCCAC UUUCCAGGUGGCAAAGCCCGUUGAGCUUCUCAAAAA 3'	—	48	
探针	5'FAM-nnnnnnnnnnn-Eclipse 3'	—	12	

^a 靶序列参见附录 B。

6 仪器和耗材

- 6.1 PCR 仪。
- 6.2 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。
- 6.3 恒温水浴锅。
- 6.4 离心机:离心力 $\geq 13\ 000\ g$ 。
- 6.5 微量移液器:0.5 μL ~10 μL ,10 μL ~100 μL ,20 μL ~200 μL ,200 μL ~1 000 μL 。
- 6.6 涡旋震荡器。
- 6.7 荧光定量 PCR 仪或其他可检测荧光的设备。
- 6.8 恒温培养箱。

7 试样制备

7.1 增菌培养

按照 GB 4789.40 的方法进行样品制备和一次增菌,样品污染浓度较低时可进行二次增菌。取检样 100 g 置灭菌锥形瓶中,加入 900 mL 已预热至 44 $^{\circ}\text{C}$ 的缓冲蛋白胨水(参见附录 A),用手缓缓地摇动至充分溶解,36 $^{\circ}\text{C}$ \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h \pm 2 h。

7.2 DNA 提取

采用下述方法提取 DNA,也可使用等效的商品化 DNA 提取试剂盒提取制备模板 DNA。

对于 7.1 获得的增菌液,采用如下方法制备模板 DNA:吸取 1 mL 增菌液加入 1.5 mL 离心管中,12 000 g 离心 3 min,弃上清;加入 1 mL 0.85% 无菌生理盐水,完全溶解沉淀,12 000 g 离心 3 min,弃上清;加入 100 μL 无菌水混匀后沸水浴 10 min,置冰上冷却;12 000 g 离心 12 min,上清液即为模板 DNA。

8 细菌基因组 DNA 的提取纯化

- 8.1 增菌液 4 $^{\circ}\text{C}$ 留存。
- 8.2 取 2 mL 增菌液,置于 5 mL 离心管中,13 400 g 离心 2 min,弃上清,向沉淀中加入 400 μL 裂解液,20 μL 蛋白酶 K,56 $^{\circ}\text{C}$ 振荡 2 h,13 400 g 离心 5 min。
- 8.3 转移上清液到新的离心管中,加入与上清液等体积的酚/三氯甲烷/异戊醇(25 : 24 : 1,体积比)混合液振荡混匀,13 400 g 离心 10 min,将上清液转移到新的离心管中,再次加入与上清液等体积的三氯甲烷/异戊醇(24 : 1,体积比)溶液,振荡混匀,13 400 g 离心 10 min,将上清液转移到新的离心管中。
- 8.4 加入 2 倍体积的预冷的无水乙醇溶液,混合均匀后室温放置 20 min,13 400 g 离心 2 min,弃去上清液,加入 1 mL 70% 乙醇溶液洗涤沉淀 2 次,弃去乙醇溶液,将 DNA 晾干后,加入 50 μL TE 溶液充分溶解,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下备用。
- 8.5 也可用等效试剂盒提取模板 DNA。

9 PCR 扩增

9.1 阴性对照、阳性对照和空白对照的设置

- 9.1.1 检测过程中分别设阴性对照、空白对照和阳性对照。

- 9.1.2 空白对照以无菌水作为模板。
 9.1.3 阴性对照以非克罗诺杆菌种属细菌 DNA 作为模板。
 9.1.4 阳性对照以 ATCC25944 或等效标准菌株 DNA 作为模板。

9.2 反应体系

反应体系配制见表 2。每个样品设置 2 个平行。

表 2 PCR 反应体系

试剂	体积
PCR 反应混合液	12.5 μL
正向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	1 μL
反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	1 μL
DNA 模板(5 ng/ μL)	1 μL
灭菌 ddH ₂ O	补足至 25 μL

9.3 反应参数

95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,设 30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。
 注:不同型号仪器的使用可参考仪器使用操作说明。

10 CRISPR 反应与荧光检测

10.1 CRISPR 反应体系见表 3。

表 3 CRISPR 反应体系

试剂	体积
NEBuffer 3.1(10 \times)	2 μL
Cas12b(5 μM)	1 μL
crRNA(10 μM)	1 μL
tracrRNA(10 μM)	1 μL
探针(10 μM)	1 μL
RNA 酶抑制剂(40 U/ μL)	0.25 μL
PCR 产物	2 μL
灭菌 ddH ₂ O	补足至 20 μL

10.2 仪器检测通道的选择

48 $^{\circ}\text{C}$ 温度下,每 1 分钟检测 1 次 FAM 荧光(492 nm~518 nm),持续 15 min。

11 计算公式

判定值 $N = (10 \text{ min 样品荧光值} / 10 \text{ min 对照荧光值}) / (2 \text{ min 样品荧光值} / 2 \text{ min 对照荧光值})$,如

公式(1)所示。

$$\text{判定值 } N = \frac{(\text{SF}_{10 \text{ min}} / \text{CF}_{10 \text{ min}})}{(\text{SF}_{2 \text{ min}} / \text{CF}_{2 \text{ min}})} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

SF —— 样品荧光值。

CF —— 对照荧光值。

12 质量控制

- 12.1 空白对照:无特异性扩增荧光增长。
- 12.2 阴性对照:无特异性扩增荧光增长,或 N 值低于 1.20(cut-off 值)。
- 12.3 阳性对照:有特异性扩增荧光增长,或 N 值高于 1.40(cut-off 值)。
- 12.4 空白对照和阴性对照有荧光增长时,实验视为无效。

13 检测结果判定和表述

- 13.1 $N \geq 1.40$ 时,判定在 100 g 样品中检出克诺罗杆菌属(阪崎肠杆菌)*fusA* 基因。
- 13.2 $N \leq 1.20$ 时,判定在 100 g 样品中未检出克诺罗杆菌属(阪崎肠杆菌)*fusA* 基因。
- 13.3 N 在 1.20~1.40 之间,则重复实验一次。重复实验的比值 > 1.20 ,则判定为检出克诺罗杆菌属(阪崎肠杆菌)*fusA* 基因;重复实验的比值 ≤ 1.20 ,则判定为未检出克诺罗杆菌属(阪崎肠杆菌)*fusA* 基因。
- 13.4 检出 *fusA* 基因的样品应进一步将留存的增菌液采用 GB 4789.40 进行确证。

14 结果报告

未检出 *fusA* 基因的阴性样品,报告 100 g 样品中未检出克诺罗杆菌属(阪崎肠杆菌);*fusA* 基因的阳性样品,经确证后按照确证结果报告 100 g 样品中检出或未检出克诺罗杆菌属(阪崎肠杆菌)。

15 检测过程中防止交叉污染的措施

检测过程中防止交叉污染的措施按照 GB/T 27403—2008 中附录 D 的规定执行。

附 录 A
(资料性附录)
培养基和试剂

A.1 缓冲蛋白胨水(BPW)

A.1.1 成分

蛋白胨	1.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸二氢钾	1.5 g
磷酸氢二钠	9.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

加热搅拌至溶解,调至 pH7.2±0.2,高压灭菌 121 °C,15 min。

以正式出版文本为准

附录 B

(资料性附录)

克罗诺杆菌属 *fusA* 基因片段扩增靶标参考序列

B.1 克罗诺杆菌属 *fusA* 基因片段扩增靶标参考序列(NCBI No. CP011047.1)如图 B.1 所示。

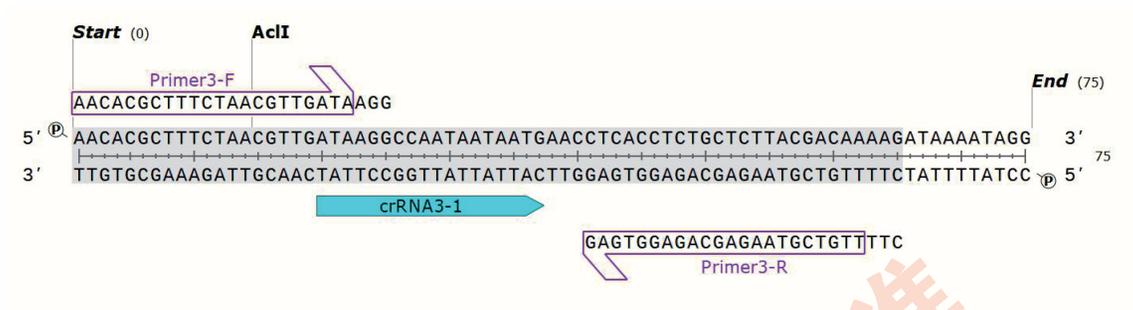


图 B.1 扩增靶标参考序列

以正式出版文本为准

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
出口乳粉中克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)
检测方法 第4部分:PCR-CRISPR 法
SN/T 1632.4—2022

*

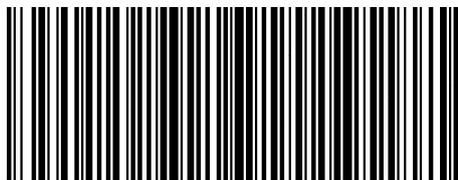
中国海关出版社有限公司出版发行
北京市朝阳区东四环南路甲1号(100023)
编辑部:(010)65194242-7530
网址 www.customskb.com/book
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 20 千字
年 月第一版 年 月第一次印刷
印数 1—500

*

书号: 155175·794 定价 12.00 元



SN/T 1632.4—2022