



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2728—2010

---

## 枯草芽孢杆菌检测鉴定方法

Detection and identification of *Bacillus subtilis*

2010-11-01 发布

2011-05-01 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

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局、中华人民共和国山东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：王芳、王金玲、张莹、马骏、王涛、孟祥勇、林颖、耿庆华、李成塘、雷质文。

## 枯草芽孢杆菌检测鉴定方法

### 1 范围

本标准规定了枯草芽孢杆菌的形态学鉴定、生化鉴定以及 PCR、荧光 PCR 检测鉴定方法。  
本标准适用于枯草芽孢杆菌检测鉴定。

### 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,仅注日期的版本使用于本文件。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/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文件。

#### 3.1

枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*

革兰氏阳性杆菌,芽孢杆菌科,芽孢杆菌属,内生孢子,接触酶阳性,发酵葡萄糖产酸,水解淀粉,不水解马尿酸盐,可还原硝酸盐,水解酪素,在 55℃可生长的一群芽孢菌。

### 4 人员防护

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,所有培养物应小心处置。在对微生物菌剂的取样和检测过程中,按照 GB 19489 中的生物二级防护的规定执行。

### 5 主要试剂和培养基

除另有规定外,试剂为分析纯或生化试剂,试验用水应符合 GB/T 6682。所有试剂均用无 DNA 酶污染的容器分装。

5.1 营养琼脂:蛋白胨 10 g,牛肉浸膏 3.0 g,氯化钠 5.0 g,琼脂 15.0 g,1 L 蒸馏水,加热煮沸到完全溶解,调节 pH  $7.3 \pm 0.1$ ,121℃灭菌 15 min。

5.2 营养肉汤:蛋白胨 10 g,牛肉浸膏 3.0 g,氯化钠 5.0 g,1 L 蒸馏水,加热煮沸到完全溶解,调节 pH  $7.3 \pm 0.1$ ,121℃灭菌 15 min。

5.3 TE 缓冲液:10 mmol/L Tris,1 mmol/L EDTA,pH8.0。

5.4 10×PCR 缓冲液:100 mmol/L Tris-HCl(pH8.4),500 mmol/L 氯化钾(KCl),15 mmol/L 氯化镁( $MgCl_2$ )。

5.5 TBE:54 g Tris,27.5 g 硼酸,800 mL 去离子水溶解,20 mL 0.5 mol/L EDTA (pH8.0)定容至 1 L。

## 6 主要仪器和设备

- 6.1 天平：精度为 0.1 g。  
 6.2 恒温培养箱： $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。  
 6.3 恒温水浴锅。  
 6.4 离心机：转数 12 000 r/min 以上。  
 6.5 PCR 仪。  
 6.6 荧光 PCR 仪。  
 6.7 微量移液器和灭菌吸头：10  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$ 、1 000  $\mu\text{L}$ 。

## 7 样品制备、培养

以无菌操作将检样 25 g(mL)用灭菌生理盐水或磷酸盐缓冲溶液做成  $10^{-1}\sim 10^{-10}$  的稀释液，充分混匀。选择适宜的 2 个~3 个连续稀释度的菌液 1 mL 于灭菌平皿内，将冷却到  $40\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$  的营养琼脂倒入平皿，轻轻混匀，制成混板，每个稀释度做两个平行样。待培养基凝固后倒置于  $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱内培养 24 h~48 h。挑取平板上 3 个~5 个无色透明菌落进行形态学鉴定并挑单菌落转营养肉汤  $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱内增菌培养 18 h~24 h 后进行生化鉴定。

## 8 形态学及生化鉴定

### 8.1 革兰氏及芽孢染色

将第 7 章中平板上的菌落做涂片进行革兰氏和芽孢染色，镜检。

### 8.2 生化鉴定法

取菌液利用细菌微量生化鉴定管进行生化鉴定，每管 100  $\mu\text{L}$ 。

### 8.3 枯草芽孢杆菌形态学及生化特征

枯草芽孢杆菌为革兰氏阳性杆状细菌，细胞直径  $< 1\text{ }\mu\text{m}$ ，很少成链，鞭毛侧生，内生孢子，芽孢不膨大，不形成伴孢晶体。生化特征见表 1。

表 1 枯草芽孢杆菌生化特征

鉴定项目	枯草芽孢杆菌
接触酶	+
氧化酶	+
厌氧生长	—
VP 试验	+
VP < pH6	—/+
VP > pH7	—
甲基红试验	—/+
葡萄糖	+

表 1 (续)

鉴定项目	枯草芽孢杆菌
木糖	+
L-阿拉伯糖	+
甘露醇	+
利用葡萄糖产气	—
利用柠檬酸盐	+
硝酸盐还原	+
50℃生长	+
pH5.7生长	-/+
7%氯化钠生长	+
淀粉水解	+
明胶液化	+
分解酪素	+

注：“+”为反应阳性；“—”为反应阴性；“+/-”或“-/+”为反应不定。

## 9 PCR 检测鉴定方法

### 9.1 细菌模板 DNA 的提取

#### 9.1.1 蛋白酶水解提取法

取上述培养的增菌液 2 mL 加到 2 mL 无菌离心管中,10 000 r/min 离心 2 min,尽量弃净上清液,沉淀加入 TE100  $\mu$ L、10 mg/mL 溶菌酶 100  $\mu$ L,37℃温育 30 min,12 000 r/min 离心 2 min,弃上清液,沉淀加入 TE 缓冲液 600  $\mu$ L 重悬,再加入 15 mg/mL 蛋白酶 K25  $\mu$ L,55℃温育 1 h 后沸水浴 10 min,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液于-20℃保存以待检测。

#### 9.1.2 酚/三氯甲烷抽提法

取上述培养的增菌液 2 mL 加到 2 mL 无菌离心管中,10 000 r/min 离心 2 min,尽量弃净上清液,沉淀加入 TE 缓冲液 570  $\mu$ L 重悬,然后加入 10 mg/mL 溶菌酶 100  $\mu$ L,37℃温育 30 min,再加入 10% SDS30  $\mu$ L,65℃温育 10 min,加入等体积的酚混匀,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液移入一新离心管中,重复一次,两次酚抽提后取上清加等体积的酚/三氯甲烷(1:1,体积比)混匀,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液再移入一新离心管中,加等体积的无水乙醇,1/10 体积的 3 mol/L 乙酸钠,轻缓颠倒混匀,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,沉淀用 500  $\mu$ L 75%乙醇洗两次,离心管开盖室温放置数分钟使乙醇挥发,加入 100  $\mu$ L 无菌水(预先加热至 65℃有利于 DNA 溶解),-20℃保存以待检测。

#### 9.1.3 试剂盒提取法

使用商品化的细菌基因组 DNA 提取试剂盒,具体提取操作参照说明书进行。

### 9.2 PCR(聚合酶链式反应)检测鉴定

#### 9.2.1 引物序列

上游引物:5'-GCGGAATCATCCGTATTGGGGCAGA-3'

下游引物:5'-AACCTCGCGGGCTTTCTCGCCAA-3'

#### 9.2.2 空白对照、阴性对照和阳性对照设置

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。

阳性对照采用目标菌标准株的 DNA 作为 PCR 反应的模板。

#### 9.2.3 PCR 反应体系

反应体系体积为 25  $\mu\text{L}$ :10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5  $\mu\text{L}$ 、引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 0.5  $\mu\text{L}$ 、dNTP(2.5  $\text{mmol/L}$ )2  $\mu\text{L}$ 、UNG 酶(1 U/ $\mu\text{L}$ )0.06  $\mu\text{L}$ 、模板 DNA 2  $\mu\text{L}$ 、灭菌去离子水补足 25  $\mu\text{L}$ 。反应体系中各试剂的量可根据具体情况或不同的反应总体积进行适当调整,每个反应体系应设置两个平行反应。

#### 9.2.4 PCR 反应参数

94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,60  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s,进行 30 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min,4  $^{\circ}\text{C}$  保存反应产物。

#### 9.2.5 PCR 扩增产物的电泳检测

用电泳缓冲液(0.5 $\times$ TBE)制备 2% 琼脂糖凝胶,5  $\mu\text{L}$  PCR 扩增产物点样,核酸染料染色,DNA marker(100 bp DNA ladder)做参照。3 V/cm $\sim$ 5 V/cm 恒压电泳,电泳 50 min $\sim$ 60 min,电泳检测结果用凝胶成像分析系统记录并保存。

#### 9.2.6 结果判定

在阴性对照未出现条带,阳性对照出现预期大小的扩增条带(产物 137 bp)条件下,如待测样品未出现相应大小的扩增条带,则可报告该样品检验结果为阴性;如待测样品出现相应大小扩增条带则可判定该样品 PCR 结果为阳性,需结合第 8 章的结果,作综合判定;如果阴性对照出现条带和(或)阳性对照未出现预期大小的扩增条带,本次待测样品的结果无效,应重新做实验,并排除污染因素。

### 9.3 荧光 PCR(荧光聚合酶链式反应)检测鉴定

#### 9.3.1 方法提要

在 PCR 基础上,加入一条与模板 DNA 匹配的、两端有荧光基团标记的寡核苷酸探针。PCR 每进行一次循环,合成的新链数与释放的荧光基团数呈对应关系,即 PCR 产物的量与荧光信号的强度呈对应关系。当荧光信号超过所设定的阈值(Threshold-value)时,荧光信号可被检测出来,仪器检测荧光基团的增加量可以间接地体现目的片段的扩增量。

样品的模板 DNA 进行荧光 PCR 扩增,观察荧光增幅曲线,从而对样品进行快速鉴定。

#### 9.3.2 引物和探针序列

上游引物:5'-GCGGAATCATCCGTATTGGGGCAGA-3'

下游引物:5'-AACCTCGCGGGCTTTCTCGCCAA-3'

探针:5'-AACTGAACTGACTGCCGAAGAACGCCT-3',5'端标记 FAM(6-羧基荧光素),3'端标记 TAMRA(6-羧基四甲基罗丹明)。

#### 9.3.3 空白对照、阴性对照和阳性对照设置

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。

阳性对照采用目标菌标准株的 DNA 作为 PCR 反应的模板。

#### 9.3.4 荧光 PCR 反应体系

反应体系体积为 25  $\mu\text{L}$ :10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5  $\mu\text{L}$ 、引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 1  $\mu\text{L}$ 、探针(3  $\mu\text{mol/L}$ )1  $\mu\text{L}$ 、dNTP(2.5 mmol/L)2  $\mu\text{L}$ 、UNG 酶(1 U/ $\mu\text{L}$ )0.06  $\mu\text{L}$ 、*Taq* 酶(5 U/ $\mu\text{L}$ )0.5  $\mu\text{L}$ 、模板 DNA 2  $\mu\text{L}$ 、灭菌去离子水补足 25  $\mu\text{L}$ 。反应体系中各试剂的量可根据具体情况或不同的反应总体积进行适当调整,每个反应体系应设置两个平行反应。

#### 9.3.5 荧光 PCR 反应参数

荧光 PCR 反应参数:50  $^{\circ}\text{C}$  2 min,95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 10 min,95  $^{\circ}\text{C}$  变性 15 s,58  $^{\circ}\text{C}$  退火延伸 30 s 同时收集 FAM 荧光,进行 40 个循环。

注:PCR 反应参数可根据基因扩增仪型号的不同进行适当的调整。

#### 9.3.6 结果判定

##### 9.3.6.1 质控标准

阴性对照:无扩增曲线,Ct $\geq$ 40.0;阳性对照:出现典型的扩增曲线,Ct 值应 $<$ 30.0;否则,检测视为无效。

##### 9.3.6.2 结果判定

Ct 值 $\geq$ 40.0,可判定样品结果为阴性;Ct 值 $\leq$ 35.0,可判定样品结果为荧光 PCR 结果阳性,需结合第 8 章的结果,作综合判定:Ct 值 $>$ 35.0 而 $<$ 40.0,建议重做。再次扩增后的 Ct 值仍小于 40,且曲线有明显的对数增长期,并且阴性对照、阳性对照和空白对照结果正常,则可判定为阳性;再次扩增后 Ct 值大于 40,且阴性对照、阳性对照和空白对照结果正常,可判定为阴性。

## 10 结果报告

10.1 若可疑菌落不符合第 8 章的要求,普通 PCR 结果阴性或者实时荧光 PCR 结果阴性则报告为“未检出枯草芽孢杆菌/25 g”;

10.2 若可疑菌落符合第 8 章的要求,普通 PCR 结果阳性或者实时荧光 PCR 结果阳性则报告“检出枯草芽孢杆菌/25 g”。

## 11 检测过程中防止交叉污染的措施

11.1 检测过程中的废弃物需经 121  $^{\circ}\text{C}$  高压灭菌处理至少 30 min 后再弃置。

11.2 检测过程中防止交叉污染的措施按照 WS/T 230 中有关的污染的预防和控制执行。