

T/CAIA

中国分析测试协会标准

T/CAIA/SH006-2017

食品单核细胞增生李斯特氏菌实时荧光核酸 恒温扩增检测（SAT）方法

Real-Time Simultaneous Amplification and Testing (SAT)
method for detecting *L. monocytogenes* in foods

2017-07-20 发布

2017-10-01 实施

中国分析测试协会发布

前言

本标准按照 GB/T 1.1-2009 规则起草。

本标准由中国分析测试协会标准化委员会提出并归口。

本标准起草单位：上海交通大学公共卫生学院、中国科学院上海生命科学研究院及上海仁度生物科技有限公司。

本标准的附录 A、附录 B 为资料性附录，附录 C 为规范性附录。

本标准主要起草人：王慧、储瑞蔼、邱红玲、张常娥、于明辉。

本标准为首次发布

食品单核细胞增生李斯特氏菌实时荧光 核酸恒温扩增检测（SAT）方法

1 范围

本标准规定了食品中单核细胞增生李斯特氏菌（*L.monocytogenes*）的实时荧光核酸恒温扩增检测方法。本标准适用于肉制品（熟肉制品、即食生肉制品），与乳制品（乳及液态乳制品、半固态乳制品、固态乳制品）等食品中单核细胞增生李斯特氏菌的检验。

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，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本部分。

GB 4789.30 食品安全国家标准食品微生物学检验单核细胞增生李斯特氏菌检验

GB 4789.1 食品安全国家标准食品微生物学检验总则

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

GB/T 27403 实验室质量控制规范食品分子生物学检测

GB/T 27405 实验室质量控制规范食品微生物检测

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准：

恒温扩增实时荧光检测技术（Simultaneous Amplification and Testing，**SAT**）：指 RNA 恒温扩增实时荧光检测技术。

4 SAT 原理

在同一温度下，以细菌 RNA 为起始模板，通过 M-MLV 反转录酶产生靶标 RNA 的一个双链 DNA，然

后利用 T7 RNA 多聚酶以该 DNA 为模板产生多个 (100~1000) RNA 拷贝；每个 RNA 拷贝数再从反转录开始进入下一个扩增循环；同时，带有荧光标记的优化探针和这些 RNA 拷贝特异结合后，打开茎环结构，从而产生荧光，根据实时荧光信号的出现时间和强度，结合阳性对照和阴性对照即可对检测结果进行判定。

5 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其它设备如下：

- 5.1 实时荧光恒温检测系统。
- 5.2 台式离心机。
- 5.3 恒温培养箱：30°C±1 °C。
- 5.4 振荡器。
- 5.5 冰箱（2°C~8 °C和-20 °C或-80 °C）。
- 5.6 均质器。
- 5.7 电子天平（感量 0.1 g）。
- 5.8 微量可调移液器及配套无 DNA/RNA 酶吸头（10μL、100μL、1000μL）。
- 5.9 无 DNA/RNA 酶离心管（0.5 mL、1.5mL、2.0 mL）
- 5.10 水浴槽
- 5.11 恒温混匀仪
- 5.12 制冰机
- 5.13 干热恒温器
- 5.14 分光光度计
- 5.15 比色皿
- 5.16 溶菌酶

6 试剂

除特别说明外，所用试剂均为分析纯，实验用水为一级水，溶解 RNA 实验用水必须为无 RNA 酶污染一级水，所用试剂均用无 DNA/RNA 酶污染的容器分装。

- 6.1 李氏增菌肉汤 LB (LB₁ , LB₂)：见附录 A 中 A.1。
- 6.2 无菌生理盐水：见附录 A 中 A.2。

6.3 单核细胞增生李斯特氏菌 SAT 实验相关引物、探针

上游引物:扩增单核细胞增生李斯特氏菌种属特异性基因的转录产物 RNA 的上游引物 (序列见附录 B 中 B. 1.1)。

下游引物: 扩增单核细胞增生李斯特氏菌种属特异性基因的转录产物 RNA 的下游引物, 包含 T7 启动子识别位点 (序列见附录 B 中 B. 1.1)。

单核细胞增生李斯特氏菌特异性探针: 探针的 5'端标记荧光报告基团 FAM, 3'端标记荧光淬灭基团 DABCYL (序列见附录 B 中 B. 1.1)。

内质控 RNA (IC-RNA), 体外转录成 RNA, 加入到每个反应体系中 (序列见附录 B 中 B. 1.1)。

内质控探针: 探针的 5'端标记荧光报告基团 HEX, 3'端标记荧光淬灭基团 DABCYL, 识别内质控 RNA 上的特定序列 (序列见附录 B 中 B. 1.1)。

6.4 阳性质控品: 由有资质的权威机构提供单核细胞增生李斯特氏菌标准菌株, -80℃冰箱保存。(来源和编号见附录 B. 1.1)

6.5 SAT 反应液 (成分见附录 B. 1.1)

6.6 SAT 酶液 (含 M-MLV 反转录酶、T7 RNA 多聚酶等成分, 见附录 B.1.1)

6.7 Trizol 溶液

6.8 氯仿

6.9 异丙醇

6.10 无水乙醇

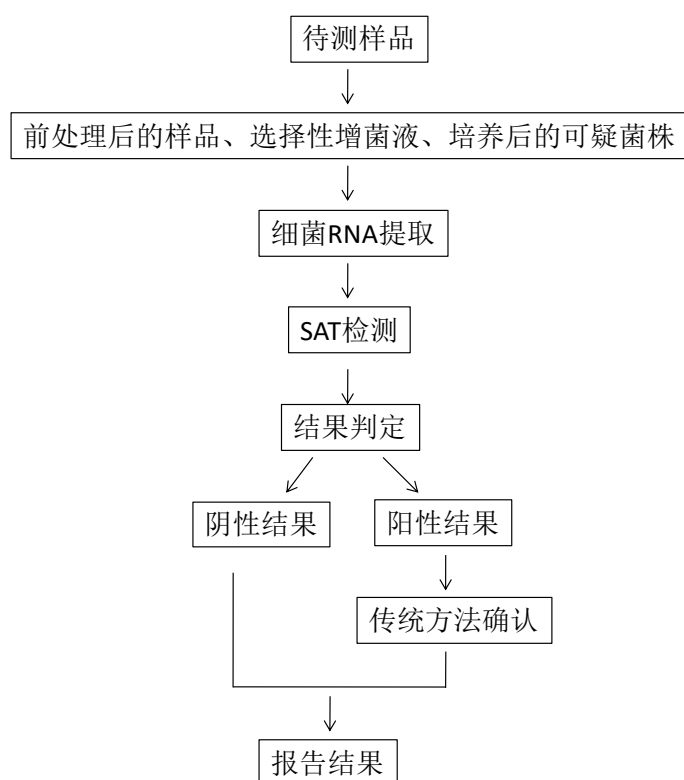
6.11 RNA 提取试剂盒

6.12 溶菌酶

7 实验室安全防护

实验室结构和设施、安全操作规程、安全设备及个体防护应符合 GB 19489 中二级生物安全防护实验的要求。

8 检测流程



9 样本的采集、保存和运送

9.1 样品采集

食品样品的采集按照 GB 4789.1 要求执行。

9.2 样本的保存

样品采集后应尽早检测，如需保存，非冷冻样品采集后应立即置 7°C~10°C 冰箱保存，冷冻样品置于 -20°C 冰箱保存。

10 实验室检测

实验室质量控制应按 GB/T 27403 和 GB/T 27405 进行。SAT 检测质量控制见附录 C。

10.1 样品制备

10.1.1 实验室收到样品后，应尽可能及早检验，若不能及时检验，应采取必要的措施保持样品的原有状态；冷冻样品应在 45 °C 以下不超过 15 min 或在 2°C~5°C 不超过 18 h 解冻。

10.1.2 固体样品以无菌操作取样品 25 g，若需要增菌培养，加入 225 mL LB₁ 增菌液，若不需要增菌培养，则加入 225 mL 无菌生理盐水。用旋转刀片式均质器以 8 000 r/min 均质 1 min，或拍击式均质器

拍击 2 min，制备成 1:10 的样品匀液。

10.1.3 液体样品以无菌操作取样品 25 mL，若需要增菌培养，加入 225 mL LB₁ 增菌液，混匀；若不需要增菌培养，则直接取样品进行测试。

10.2 增菌（可选择）

将上述需要增菌的 1:10 样品匀液（LB₁ 增菌液）于 30°C±1°C 培养 24h；不需要增菌的样品，直接取 1:10 样品匀液上清液或样品原液备用。

10.3 样品 RNA 提取

10.3.1 样品处理

在样品制备区进行，为确保检测结果的准确性，在进行实际样品检测时，应设立阳性对照、阴性对照试验；然后提取实际样品、阳性对照样品和阴性对照样品中的 RNA。

10.3.2 提取方法

Trizol 法提取 RNA

(1) 取 1 mL 样品至 1.5 mL 离心管中，10,000 rpm 离心 1min，彻底弃掉培养基，加入 100 μL (3mg/mL) 溶菌酶，立即悬浮菌液，37°C 酶解 5 ~10 min。

(2) 立即加入 1 mL Trizol 溶液，盖紧管盖，激烈震荡 15s，冰上静置 5min，12,000 r/min 离心 10min，取上层无色水相转入新的 1.5 mL 离心管中；

(3) 每管加入 200 μL 的氯仿，盖紧管盖，激烈震荡 15s，冰上静置 5min，12,000 r/min 2°C~8°C 离心 10min，小心吸取上层水相，转入新的 1.5mL 离心管，定量；

(4) 加入等体积的氯仿盖紧管盖，激烈震荡 15s，冰上静置 5min，12,000 r/min 2°C~8°C 离心 10min，小心吸取上层水相，转入新的 1.5mL 离心管。

(5) 加入 500 μL -20°C 预冷的异丙醇，轻轻颠倒混匀； 12,000 r/min 2°C~8°C 离心 10min，小心吸去上清；

(6) 加入 500 μL -20°C 预冷的 75% 的乙醇（使用无 RNA 酶的灭菌水配制），并轻柔颠倒，洗涤沉淀；12,000 r/min 2°C~8°C 离心 5min，小心吸去上清；微离，吸去剩余乙醇，室温干燥 5min；

(7) 加入 20 μ L 无 RNA 酶水溶解 RNA。

(8) 利用分光光度计测定样品 OD₂₆₀，以 1 个 OD 相当于 40mg/L RNA 浓度来计算 RNA 浓度。

注：RNA 提取可采用上述方法，也可使用等效的商品化 RNA 提取试剂盒、RNA 纯化磁珠等，并按其说明提取制备模板 RNA。

10.4 扩增检测液配制

在 PCR 反应管中按表 1 依次加入反应试剂，混匀。也可采用经验证的、等效的 SAT 检测反应试剂盒，见附录 B。

表 1 扩增检测液配制

加入试剂成分	工作液浓度	加样量/ μ L
SAT 反应液	1 ×	28 μ L
上游引物	10 μ M	0.25 μ L
下游引物	10 μ M	0.25 μ L
单核细胞增生李斯特氏菌特异性探针	10 μ M	0.25 μ L
内质控探针	10 μ M	0.25 μ L
内质控 RNA	-	0.5 μ L
RNA 样品	-	2 μ L

10.5 恒温扩增检测

10.5.1 设定荧光检测仪器反应条件为：42 $^{\circ}$ C 1min，共 60 个循环，荧光通道设定为 F1（FAM）和 F2（HEX 或波长相近的其他染料，如：VIC），荧光信号每分钟收集 1 次，反应体系为 40 μ L。

10.5.2 移取 30 μ L 上述扩增检测液转移至微量反应管中，放置在干热恒温器上 60 $^{\circ}$ C 保温 10min，然后

42℃保温 5min。快速加入提前预热至 42℃的 SAT 酶液 10μL（含 2000U MMLV 逆转录酶和 2000U T7 RNA 多聚酶）于每个反应管中，12,000 r/min 离心 15s 混匀。

10.5.3 将微量反应管迅速放置荧光检测仪器内，立即启动反应程序。

11 结果判定

11.1 阈值设定

以阈值线刚好超过阴性对照扩增曲线的最高点来设置荧光信号阈值，并扣除仪器噪声。

11.2 对照检测结果分析

阳性对照出现典型扩增曲线，且 dt 值≤55，而阴性对照无典型扩增曲线，且荧光信号低于设定阈值，表明反应体系工作正常。否则，重新检测。

11.3 样品检测结果判定

检测结束后，在反应体系工作正常的前提下，根据样品的扩增曲线和 dt 值判定结果，判定情况说明见表 2。

表 2 单核细胞增生李斯特氏菌实时荧光核酸扩增检测结果判定情况

反应类别	F1 通道 (FAM)	F2 通道 (HEX 或波长相近的其他染料, 如: VIC)	结果判定
1	+	+	<p>(1) dt 值≤55, 表明“样品中检出单核细胞增生李斯特氏菌, 检出结果为阳性”;</p> <p>(2) 若 55<dt 值<60, 应重复实验, 如重复检测结果 dt 值<60, 则表明样品中检出单核细胞增生李斯特氏菌, 检出结果为阳性; 如重复检测结果 dt 值≥60, 表明样品中未检出单核细胞增生李斯特氏菌, 检出结果为阴性。</p> <p>对筛检结果为阳性的样品, 对样品的增菌液或可疑菌落进一步按 GB 4789.30 中的操作步骤进行确认后报告结果。</p>

2	—	+	dt 无数值或 ≥ 60 ，则表明样品中未检出单核细胞增生李斯特氏菌，检出结果为阴性。
3	—	—	反应失败。样品中可能存在反应抑制物，或样品比较粘稠，油脂含量高等原因影响 RNA 提取，建议将样品稀释后重新检测。

11.4 报告

根据表 2 进行结果判定，报告“每 25g (mL) 样品中检出或未检出单核细胞增生李斯特氏菌”。

附录 A 培养基和试剂

(资料性附录)

A.1 李氏增菌肉汤(LB 1 , LB 2)

A.1.1 成分

胰胨	5.0 g
多价胨	5.0 g
酵母膏	5.0 g
氯化钠	20.0 g
磷酸二氢钾	1.4 g
磷酸氢二钠	12.0 g
七叶苷	1.0 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.2~7.4

A.1.2 制法

将上述成分加热溶解, 调节 pH, 分装, 121 °C 高压灭菌 15 min, 备用。

A.1.2.1 李氏 I 液 (LB 1) 225 mL 中加入:

1 % 萘啶酮酸 (用 0.05 mol/L 氢氧化钠溶液配制)	0.5 mL
1 % 吡啶黄 (用无菌蒸馏水配制)	0.3 mL

A.1.2.2 李氏 II 液 (LB 2) 200 mL 中加入:

1 % 萘啶酮酸	0.4 mL
1 % 吡啶黄	0.5 mL

A.2 生理盐水

A.2.1 成分

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.2.2 制法

称取 8.5g 氯化钠溶于 1000mL 蒸馏水中, 121 °C 高压灭菌 15 min。

附录 B

(资料性附录)

食品中单核细胞增生李斯特氏菌实时荧光核酸扩增检测试剂盒(LM-SAT)的组成、使用方法和注意事项

检测试剂盒组成及分类由指定单位提供,仅供参考,使用时,可根据所使用产品说明进行操作。

B.1 试剂盒组成

试剂盒有试剂 A 和试剂 B 组成,用于样本的提取及扩增检测。

试剂 A

组成成分	主要成分
裂解液	去垢剂
核酸提取液	捕获探针和磁性颗粒
洗涤液	SDS

试剂 B

组成成分	主要成分
反应液	dNTPs、NTPs
SAT 酶液	反转录酶, T7 聚合酶
检测液	引物、荧光探针
阳性对照	LM. RNA
内标	LM. IC RNA
阴性对照	生理盐水

B. 1.1 试剂盒各成分的组成

单核细胞增生李斯特氏菌 SAT 实验相关引物和探针序列:

上游引物:5' -AGTGGCGGACGGGTGAGTAAC-3' ;

下游引物:5' -AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCCATTACCCTACCAACTAGCTAATG-3' 。

单核细胞增生李斯特氏菌特异性探针: 5' -CACGGCATGCCACGCTTTTGAAAGATCCGTG-3' , 5' 端标记荧光报告基团 FAM, 3'端标记荧光淬灭基团 DABCYL。

内质控探针: 5' -CGUGGUAUUCGGCACGUGGCCACG-3' , 5'端标记荧光报告基团 HEX, 3'端

标记荧光淬灭基团 DABCYL。

内标 RNA (*LM.IC RNA*):

5' -GAACGAACGGAGGAAGAGCUUGCUCUCCAAAGUUAGUGGCGGACGGGUGAGUAACAC
GUGGGCAACCUGCCUGUAAGUUGGGGAUAACUCCGGGAAACCGGGGCUAAUACCGAAUGAU
AAGAUGUGGCUAAUUCGGCACGUGGGGUUCGGCUAUCGCUUACAGAUGGGCCCGCGGUGCA
UUAGCUAGUUGGUAGGGUAAUGGCCUACCAAGGCAACGAUGCAUAGCCGACCUGAGAGGGU
GAUCGGCCACACUGGGACUGAGACACGGCCCAGACUCCUACGGGAGGCAGCAGUAGGGAAUC
UCCGCAAUGGACGAAAGUCUGACGGAGCAACGCCGCGUGUAUGA-3' 。

裂解液: 50mM Tris (pH7.0), 0.1% (V/V) SDS, 1% (V/V) Triton X-100, 0.1% (V/V) NP-40。

核酸提取液: HEPES 50~400mM, EDTA 40~200mM, LiCl 400~2000mM, 0.25 μ M 捕获探针和
250mg/mL 磁珠。

洗涤液: HEPES 5~50mM, NaCl 150mM, 1% SDS, EDTA 1~10mM。

SAT 反应液: Tris 30mM, MgCl₂ 10 mM, dNTPs 4mM, NTPs 8mM, PVP40 5%, KCl 25mM, 5% (v/v)
丙三醇的溶液。

SAT 检测液: 含有 0.3 μ M SAT 上游引物, 0.3 μ M SAT 下游引物, 0.16 μ M 单核细胞增生李斯特氏菌
特异性探针和 0.3 μ M 单链内质控探针。

SAT酶液: 含有1200U M-MLV 反转录酶、1200U T7 RNA 聚合酶, 10mM HEPES (pH7.5), 20 mM
N-acetyl-L-cysteine (N- 乙酰-L- 半胱氨酸), 0.4 mM zinc acetate (乙酸锌)、30 mM trehalose (海藻糖)、
100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 200mM KCl, 0.1mM EDTA, 0.8% (v/v) Triton X-100 和40% (v/v) glycerol
(丙三醇);

内标: 含单核细胞增生李斯特氏菌内质控RNA (*LM.IC RNA*) 的稀释物

阳性对照: 单核细胞增生李斯特氏菌的体外转录RNA 稀释物

阴性对照: 不含有单核细胞增生李斯特氏菌序列或不含有单核细胞增生李斯特氏菌的溶液

阳性质控品: 单核细胞增生李斯特氏菌标准菌株CMCC(B)54002。

B.2 试剂盒使用方法

B.2.1 样品制备

B.2.1.1 实验室收到样品后, 应尽可能及早检验, 若不能及时检验, 应采取必要的措施保持样品的原有
状态; 冷冻样品应在 45 $^{\circ}$ C 以下不超过 15 min 或在 2 $^{\circ}$ C~5 $^{\circ}$ C 不超过 18 h 解冻。

B.2.1.2 固体样品以无菌操作取样品 25 g, 若需要增菌培养, 加入 225 mL LB₁ 增菌液, 若不需要增

菌培养，则加入 225 mL 无菌生理盐水。用旋转刀片式均质器以 8 000 r/min 均质 1 min，或拍击式均质器拍击 2 min，制备成 1:10 的样品匀液。

B.2.1.3 液体样品以无菌操作取样品 25 mL，若需要增菌培养，加入 225 mL LB₁ 增菌液，混匀；若不需要增菌培养，则直接取样品进行测试。

B.2.2 增菌（可选择）

将上述需要增菌的 1:10 样品匀液（LB₁ 增菌液）于 30℃ ± 1℃ 培养 24h；不需要增菌的样品，直接取 1:10 样品匀液上清液或样品原液备用。

B.2.3 样品 RNA 提取

B.2.3.1 样品处理

在样品制备区进行，为确保检测结果的准确性，在进行实际样品检测时，应设立阳性对照、阴性对照试验。与样品一起同时提取对照试验中 RNA，RNA 提取体系见表 1。从 LM-SAT 提取试剂 A、SAT 检测试剂 B（参见附录 B）中取出相应试剂，放置常温，充分混匀，按照试剂盒的说明书加入相应试剂和待测样品。

样品处理步骤：分别加入表 B 1 中所列的 200μL 样品、阴阳性对照至核酸提取液管中（离心管或深孔板）→每管中依次加入，200μL 裂解液、100μL 核酸提取液、10μL 内标，60℃ 保温 5min，然后室温放置 10min。

表 B 1 LM-SAT 提取体系

加入试剂成分	制备方法	每个反应管中加入体积
内标	取 0.4mL 裂解液，加入 10μL 内标，混匀备用。	10 μL
核酸提取液	使用前混匀	100 μL
裂解液	直接使用	200 μL
检测样本	A、阳性对照：取 0.2mL 生理盐水，加入 10μL 阳性对照品，混匀备用。 B、阴性对照：取 0.2mL 生理盐水，加入 10μL	200 μL

	阴性对照品，混匀备用。 C、食品样本：增菌后培养液或 1:10 生理盐水稀释液，或样品原液。	
洗涤液	直接使用	每次 700 μ L(仪器提取)、1mL(手工提取)
扩增检测液 (扩增体系用于磁珠洗脱，后期直接带着磁珠进行反应)	按照 40 μ L 反应液加 2.5 μ L 检测液比例直接混合，振荡混匀，3000rpm 离心 10s 备用。	40 μ L

B.2.3.2 提取方法

B.2.3.2.1 仪器提取

样品处理过程中，将样品及试剂加入到 96 孔深孔板中，同时将对应的孔中加入 700 μ L 洗涤液（2 次以上洗涤），每个检测液孔中加入 40 μ L 扩增检测液。按照磁珠吸附核酸→第 1 次洗涤→第 2 次洗涤→释放磁珠至扩增检测液中的步骤，设置好仪器程序，进行提取。

B.2.3.2.2 手工提取

将样品处理管（离心管）放置于磁力架上，静置 5min，待磁珠吸附于管壁后，用移液器吸干管盖和管中的气泡和液体，保留磁珠；加入洗涤液 2 次，每次加入 1mL 洗涤液振荡后，重复前面操作；将样品管移离磁力架，每管中加入 40 μ L 扩增检测液，振荡混匀，完成提取过程。

B.2.4 恒温扩增检测

B.2.4.1 设定荧光检测仪器反应条件为：42 $^{\circ}$ C 1min，共 60 个循环，荧光通道设定为 F1（FAM）和 F2（HEX 或波长相近的其他染料，如：VIC），荧光信号每分钟收集 1 次，反应体系为 40 μ L。

B.2.4.2 移取 30 μ L 上述提取后扩增检测液转移至微量反应管中，放置在干热恒温器上 60 $^{\circ}$ C 保温 10min，然后 42 $^{\circ}$ C 保温 5min。快速加入提前预热至 42 $^{\circ}$ C 的 SAT 酶液 10 μ L 于每个反应管中，1200r/min 离心 15s 混匀。

B.2.4.3 将微量反应管迅速放置荧光检测仪器内，立即启动反应程序。

B.2.5 结果判定

B.2.5.1 阈值设定

以阈值线刚好超过正常阴性对照扩增曲线的最高点为荧光信号阈值，并扣除仪器噪声。

B.2.5.2 对照检测结果分析

阳性对照出现典型扩增曲线，且 dt 值 ≥ 55 ，而阴性对照无典型扩增曲线，且荧光信号低于设定阈值，表明反应体系工作正常。否则，重新检测。

B.2.5.3 样品检测结果判定

检测结束后，在反应体系工作正常的前提下，根据样品的扩增曲线和 dt 值判定结果，判定情况说明见表 B 2。

表 B 2 单核细胞增生李斯特氏菌实时荧光核酸扩增检测结果判定情况

反应类别	F1 通道 (FAM)	F2 通道 (HEX 或波长相近的其他染料, 如: VIC)	结果判定
1	+	+	<p>(1) dt 值≤ 55，表明“样品中检出单核细胞增生李斯特氏菌，检出结果为阳性”；</p> <p>(2) 若 $55 < dt$ 值 < 60，应重复实验，如重复检测结果 dt 值 < 60，则表明样品中检出单核细胞增生李斯特氏菌，检出结果为阳性；如重复检测结果 dt 值≥ 60，表明样品中未检出单核细胞增生李斯特氏菌，检出结果为阴性。</p> <p>对筛检结果为阳性的样品，对样品的增菌液或可疑菌落进一步按 GB 4789.30 中的操作步骤进行确认后报告结果。</p>
2	—	+	<p>dt 无数值或≥ 60，则表明样品中未检出单核细胞增生李斯特氏菌，检出结果为阴性。</p>
3	—	—	<p>反应失败。样品中可能存在反应抑制物，或样品比较粘稠，油脂含量高原因影响 RNA 提取，建议将样品稀释后重新检测。</p>

B.2.5.4 报告

根据表 2 进行结果判定，报告“每 25g (mL) 样品中检出或未检出单核细胞增生李斯特氏菌”。

B.3 注意事项

B.3.1 注意试剂盒的保存，一般通用情况为：试剂 A 应保存于 2°C~30°C，试剂 B 应保存于-15°C~-35°C（检测液应避光保存），避免反复冻融。试剂 A 和试剂 B 在打开包装使用后可于 2°C~8°C 存放一个月，试剂经冷藏可运输一周。使用时，注意试剂盒使用要在有效期内。

B.3.2 使用前应将所有试剂温度平衡至室温（18°C~26°C），充分混匀，洗涤液平衡后仍有白色絮状物沉淀，采用 37°C 水浴加热直至澄清。试剂 B 内各试剂在充分融解后，稍作离心，SAT 酶使用前要离心，并预热至 42°C。

B.3.3 操作过程中注意防止 RNA 酶对 RNA 的降解作用，所有使用的器皿、加样器均为专用，离心管、吸头等一次性耗材应为灭菌不含 RNA 酶产品，操作人员应戴无粉手套、口罩，穿好工作服进行试验操作。

B.3.4 提取时，如果磁珠吸附过程中，有个别磁珠难以吸附至管壁，则应适当延长吸附时间。

B.3.5 SAT 酶液加入反应管后，要立即启动反应，荧光检测反应需要马上开始。

B.3.6 反应结束后，应将微量反应管取出浸泡于 10% 84 消毒液中，取微量反应管时，严禁打开反应管（防止污染反应区域）。试验结束后，用 10% 84 消毒液清洁工作区域及用具，最后用清水擦拭干净。

附录 C

(规范性附录)

SAT 检测质量控制要求

C.1 应用临界弱阳性对照进行实验室质控

为了防止出现漏检（假阴性）的情况，SAT 检测实验室应定期应用临界弱阳性对照进行室内质量控制。

C.1.1 临界弱阳对照的制备

取生理盐水和裂解液按照 1:1 混合作为稀释液，将试剂盒提供阳性对照品稀释 100 倍即为临界弱阳性对照。

C.1.2 临界弱阳性对照的使用方法

取 200 μ L 生理盐水，加入 10 μ L 临界弱阳性对照，混匀备用；核酸提取及检测同阳性对照品处理过程。

C.2 质量控制

所设置阳性对照、临界弱阳性对照和阴性对照的 dt 值应满足以下条件，否则，实验视为无效，需重新进行。

1) 阳性对照、临界弱阳性对照：F1 通道：阳性对照 $dt \leq$ 临界弱阳性对照 $dt \leq 55$ ，F2 通道：有或者无数值。

2) 阴性对照：F1 通道：dt 无数值或为 60，同时 F2 通道： $dt \leq 55$ 。