



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1059.7—2010

进出口食品中沙门氏菌检测方法
实时荧光 PCR 法

Detection of *Salmonella* in food for import and export—
Real-time PCR method

2010-01-10 发布

2010-07-16 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 1059 系列标准共分为 7 部分：

- 进出口食品中沙门氏菌 滤膜筛选法；
- 进出口食品中大肠菌群、大肠杆菌计数 滤膜/MUG 法；
- 进出口食品平板菌落计数 滤膜法；
- 进出口食品中大肠杆菌检验方法 谷氨酸脱羧酶法；
- 食品和动物饲料大肠杆菌 O157 的检测方法 免疫磁珠法；
- 进出口食品中沙门氏菌属检测方法 垂直膜过滤法；
- 进出口食品中沙门氏菌检测方法 实时荧光 PCR 法。

本部分为 SN/T 1059 的第 7 部分。

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：中华人民共和国广西出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：盘宝进、韦梅良、汪文龙、罗兆飞、刘军义、陈立标。

本部分是首次发布的出入境检验检疫行业标准。

进出口食品中沙门氏菌检测方法

实时荧光 PCR 法

1 范围

SN/T 1059 的本部分规定了食品中沙门氏菌实时荧光 PCR 检测操作规程。
本部分适用于食品中沙门氏菌的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过 SN/T 1059 本部分的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本部分，然而，鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本部分。

SN 0170 出口食品沙门氏菌属(包括亚利桑那菌)检验方法

SN/T 1193 基因分析检测实验室技术要求

3 缩略语

下列缩略语适用于 SN/T 1059 的本部分。

3.1

PCR polymerase chain reaction

聚合酶链反应。

3.2

DNA deoxyribonucleic acid

脱氧核糖核酸。

3.3

dNTP deoxyribonucleoside triphosphate acid

脱氧核苷三磷酸。

3.4

dATP deoxyadenosine triphosphoric acid

脱氧腺苷三磷酸。

3.5

dGTP deoxyguanosine triphosphoric acid

脱氧鸟苷三磷酸。

3.6

dCTP deoxycytidine triphosphate acid

脱氧胞苷三磷酸。

3.7

dUTP deoxyuridine triphosphate acid

脱氧尿苷三磷酸。

3.8

UNG uracil N-glycosylase

尿嘧啶 N-糖基化酶。

3.9

Tris Tris(hydroxymethylamino)methane acetate
三羟甲基氨基甲烷。

3.10

Ct 值

每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

4 试验材料

4.1 试剂、溶液

除特别说明外,所有实验试剂均为分析纯级别试剂,实验用水为二次蒸馏水或去离子水。

4.1.1 缓冲胨水增菌液,配方见 SN 0170。

4.1.2 亚硒酸胱氨酸增菌液,配方见 SN 0170。

4.1.3 四硫磺酸钠孔雀绿增菌液,配方见 SN 0170。

4.1.4 10×PCR 缓冲液。

4.1.5 dNTPs(含 dATP,dUTP,dCTP,dGTP),各 10 mmol/L。

4.1.6 *Taq* DNA 聚合酶,5 U/μL。

4.1.7 美国 Promega 公司生产的 DNA 抽提试剂盒;或其他等效产品。

4.1.8 引物:引物序列为 P1:5'-CTC ACC AGG AGA TTA CAA CAT GG-3',P2:5'-AGC TCA GAC CAA AAG TGA CCA TC-3'。用灭菌去离子水分别配制,浓度为 25 mmol/L。

4.1.9 探针:探针序列为 FAM-CAC CGA CGG CGA GAC CGA CTT T-TAMARA,用灭菌去离子水配制,浓度为 10 mmol/L。

4.1.10 沙门氏菌阳性菌株,来源于国家认可的菌种保藏机构。

4.2 仪器和耗材

4.2.1 ABI7300 型荧光定量 PCR 仪或功能相当的其他型荧光定量 PCR 仪。

4.2.2 冷冻高速离心机:离心速度 12 000 r/min 以上。

4.2.3 匀浆器。

4.2.4 恒温水浴锅。

4.2.5 微量可调加样器:10 μL、100 μL、1 000 μL。

4.2.6 微量加样器吸头。

4.2.7 天平:感量 0.01 g。

4.2.8 高压灭菌锅。

4.2.9 冰箱:2℃~8℃和-20℃两种。

4.2.10 PCR 反应管。

4.2.11 离心管:1.5 mL、5 mL、10 mL。

5 操作方法

5.1 取样和增菌

实验室设施应达到 SN/T 1193 实验室技术要求。

无菌称取食品样品 25 g,加入 25 mL 缓冲胨水增菌液,8 000 r/min~10 000 r/min 均质 1 min,加入 200 mL 缓冲胨水增菌液,混合均匀,37℃培养 4 h。移取 10 mL 缓冲胨水增菌液加入 100 mL 亚硒酸胱氨酸增菌液中,37℃培养 24 h;或移取 10 mL 缓冲胨水增菌液加入 100 mL 四硫磺酸钠孔雀绿增菌液中,42℃培养 24 h,增菌液备用。

5.2 模板 DNA 的制备

以下两种提取方法均能达到预期的效果,方法一提取速度比方法二更快速。

5.2.1 热裂解法提取(方法一):取增菌液 1 mL,置于离心管中,5 000 r/min 离心 5 min,灭菌生理盐水洗涤 2 次,最后用 1 mL 灭菌去离子水悬浮,隔水煮沸 15 min,10 000 r/min 离心 5 min,取上清液作为 DNA 模板溶液。

5.2.2 试剂盒法(方法二):参照美国 Promega 公司生产的 DNA 抽提试剂盒,或其他等效产品操作程序进行。

5.3 荧光 PCR 检验

反应总体积为 25 μ L,其中含:10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L,dNTPs 1 μ L,正向和反向引物各 1 μ L,探针 1 μ L,模板溶液 2 μ L,*Taq* DNA 聚合酶 0.5 μ L,双蒸水 16 μ L。反应步骤一:95 $^{\circ}$ C 10 min。反应步骤二:95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,65 $^{\circ}$ C 30 s,同时收集 FAM 荧光,共进行 40 个循环。检验过程分别设阳性对照(添加阳性菌株的基因组 DNA)、阴性对照(添加非阳性菌株的基因组 DNA)和空白对照(添加无菌水)。

6 结果及判断

检验样本 Ct 值小于或等于 35 时,报告沙门氏菌筛选阳性;检验样本 Ct 值大于 35 且小于 40 时,重复一次,如果 Ct 值仍然小于 40,并且曲线有明显的对数增长期,报告沙门氏菌筛选阳性,否则报告未检出沙门氏菌;样本 Ct 值为零或大于等于 40 时,报告未检出沙门氏菌;筛选阳性的样本按 SN 0170 的规定进行确证,确证为阳性时,报告检出沙门氏菌,确证为阴性时,报告未检出沙门氏菌。

7 检测低限

在上述条件下,本方法对沙门氏菌增菌液的检测低限为 240 CFU/mL。

8 废弃物的处理和防止污染措施

检验过程中产生的废弃物,收集后在焚烧炉中焚烧处理。

检验过程中防止交叉污染的措施按照 SN/T 1193 的规定执行。