



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4545.1—2016

商品化试剂盒检测方法 沙门氏菌 方法一

Commercial kit method—*Salmonella*—Test method I

2016-08-23 发布

2017-03-01 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

本部分是 SN/T 4545 的第 1 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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：中华人民共和国福建出入境检验检疫局、广州华峰生物科技有限公司。

本部分主要起草人：邵碧英、郑晶、董健、陈彬、黄晓蓉、彭华毅、林杰。

商品化试剂盒检测方法

沙门氏菌 方法一

1 范围

SN/T 4545 的本部分规定了食品中沙门氏菌的环介导恒温核酸扩增(LAMP)检测方法。
本部分适用于家禽、鱼类和海产品、乳制品和杂品中沙门氏菌的筛选检测。

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。

GB 4789.4 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验

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

SN/T 2775 商品化食品检测试剂盒评价方法

SN/T 3266 食品微生物检验方法确认技术规范

3 生物安全措施

为了保护实验室人员的安全和防止污染,应由具备资格的工作人员检测沙门氏菌。所有培养物、DNA 提取物和废弃物应按照 GB 19489 和 GB/T 27403 中的有关规定执行。

4 技术概要

利用环介导恒温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术进行沙门氏菌的筛选检测。根据沙门氏菌属特有靶序列上的 6 个独立区域,采用 4 条特异引物及一种链置换活性的 DNA 聚合酶,在 65 °C 左右完成恒温扩增。在环介导恒温扩增反应中,产生肉眼可见的副产物焦磷酸镁乳白色沉淀,反应产物在荧光染料的作用下,阴阳性结果产生显色差异,即可通过颜色变化观察判定结果。

5 试剂和材料

5.1 沙门氏菌核酸 LAMP 检测试剂盒

本试剂盒参考 SN/T 2775 和 SN/T 3266 由国家认监委商品化食品检测试剂盒评价专家委员会组织评价。具体评价结果参见附录 A。试剂盒组成如下:

a) DNA 提取液。

b) 沙门氏菌 HF 反应管:为环介导恒温扩增反应管,每管内含 22.5 μL 工作液(包括反应液及 Bst DNA 聚合酶),2 μL 显色液和 50 μL 稳定液。

c) 阳性对照:沙门氏菌 DNA。

d) 阴性对照。

试剂盒储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下,有效期 6 个月。试剂盒内各试剂使用前,充分解冻,并避免反复冻融。

5.2 沙门氏菌质控菌株

实验室保存的沙门氏菌标准菌株或沙门氏菌标准菌株的 DNA。

6 仪器和设备

6.1 移液器:量程 $0.5\text{ }\mu\text{L}\sim 10\text{ }\mu\text{L}$;量程 $10\text{ }\mu\text{L}\sim 100\text{ }\mu\text{L}$;量程 $100\text{ }\mu\text{L}\sim 1\text{ }000\text{ }\mu\text{L}$ 。

6.2 高速台式离心机:转速不低于 $10\text{ }000\text{ r/min}$,最大相对离心力不低于 $7\text{ }000\text{ g}$ 。

6.3 水浴锅或加热模块: $65\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $100\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

6.4 计时器。

7 检测程序

食品中沙门氏菌 LAMP 检测程序见图 1。

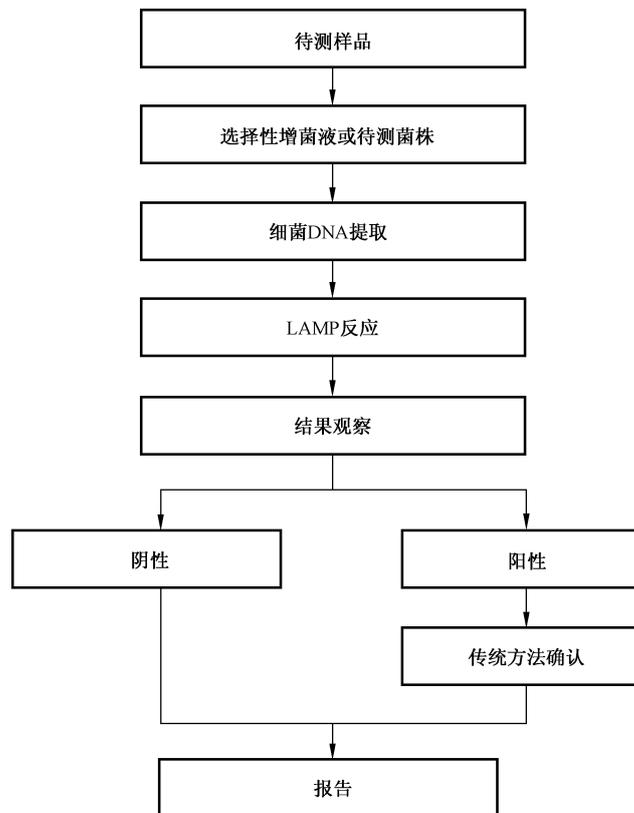


图 1 食品中沙门氏菌 LAMP 检测程序

8 操作步骤

8.1 样品制备、增菌培养

按照 GB 4789.4 进行样品制备、增菌和分离。

8.2 细菌模板 DNA 的制备

8.2.1 增菌液模板 DNA 的制备

对于从 8.1 获得的缓冲蛋白胨水增菌液,采用如下方法制备模板 DNA:

- a) 直接取该增菌液 1 mL 加到 1.5 mL 无菌离心管中,10 000 r/min 离心 2 min,尽量吸弃上清液;
- b) 加入 80 μ L DNA 提取液,混匀后沸水浴 10 min,置冰上 10 min;
- c) 10 000 r/min 离心 2 min,上清液即为模板 DNA 作为试样待测;取上清液置 -20°C 可保存 6 个月备用。

8.2.2 可疑菌落模板 DNA 的制备

对于 8.1 分离到的可疑菌落,可直接挑取可疑菌落,再按照 8.2.1b) 步骤制备模板 DNA 作为试样待检测。

8.3 环介导恒温核酸扩增

8.3.1 空白对照、阴性对照、阳性对照设置

每次反应必须设置空白对照、阴性对照和阳性对照。

空白对照以水替代 DNA 模板。阴性对照和阳性对照可使用试剂盒中自带的,也可使用实验室自行制备的阴性对照和阳性对照。当使用试剂盒中阴性对照和阳性对照时,应定期进行核查。

阴性对照制备:20 mmol/L Tris-HCl,2 mmol/L EDTA,1.2% Triton X-100(pH 8.0)。

阳性对照制备:将沙门氏菌标准菌株接种于营养肉汤中,36 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h,用无菌生理盐水稀释至 10^6 CFU/mL~ 10^8 CFU/mL(约麦氏浊度 0.4),按 8.2.1 提取模板 DNA 作为 LAMP 反应的模板。

8.3.2 反应过程

反应过程操作如下:

- a) 取出足够试验用的沙门氏菌 HF 反应管,于室温解冻;
- b) 分别吸取阴性对照、阳性对照和待测 DNA 试样各 2.5 μ L 加入到不同的沙门氏菌 HF 反应管中,每个样品做 2 个平行管,注意加样时枪头要穿透稳定液层至工作液中;
- c) 将反应管置于 65 $^{\circ}\text{C}$ 恒温扩增反应 60 min。

8.4 结果观察

反应结果,将反应管倒置甩动 2 次,再正置甩动 2 次,使工作液与显色液充分混合,冷却至室温后,在黑色背景下观察。

9 结果判定与报告

在空白对照和阴性对照反应管液体为橙色,阳性对照反应管液体呈绿色的条件下:

- a) 待检样品 2 个平行反应管液体至少 1 管呈绿色,该样品结果为沙门氏菌初筛阳性,需对样品的二次增菌液或可疑纯菌落按 GB 4789.4 进行确认,并报告结果;
 - b) 待检样品 2 个平行反应管液体均呈橙色,则沙门氏菌检验结果为阴性,报告未检出。
- 若与上述条件不符,则本次检测结果无效,应更换试剂按本方法重新检测。

附录 A (资料性附录)

沙门氏菌 LAMP 检测试剂盒评价结果¹⁾

A.1 包容性和排他性

选择 100 株经确认的沙门氏菌标准菌株和分离菌株,用 LAMP 试剂盒方法进行测试,结果全部为阳性。

选择 30 株经确认的非沙门氏菌的标准菌株,用试剂盒方法进行测试,结果全部为阴性。

A.2 灵敏度、特异性、准确度及检测限

选择 5 个食品种类,15 个食品类型的样品,采用人工污染的方式分别制备未接种(L_0)、低(L_1)、高(L_2)三个污染水平试验样品,分别用 LAMP 方法和 GB 4789.4 方法进行测试,相对灵敏度、特异性、准确度及检测限结果如表 A.1。

表 A.1 灵敏度、特异性、准确度及检测限

序号	食品基质	相对准确度 AC	相对特异性 SP	相对灵敏度 SE	检出限和置信区间/(CFU/g)
1	家禽	100%	100%	100%	1.12(0.47~2.71)
2	鱼类和海产品	100%	100%	100%	1.12(0.47~2.71)
3	蔬菜制品	76%	100%	27%	未检出(1.12 CFU/g 水平)
4	乳制品	97%	100%	95%	0.11(0.02~0.53)
5	杂品	100%	100%	100%	1.12(0.47~2.71)

A.3 耐变性

分别对反应温度(正常设置为 65 °C)和反应时间(正常设置为 60 min)两个变量进行耐变性实验,检测结果表明,超出反应温度与反应时间,则可能出现假阳性或假阴性。

A.4 批间变异

取 3 个不同批号试剂盒分别对含目标菌和非目标菌样品进行批间变异实验,检测结果表明,该试剂盒的批间总体差异较小,但个别可能出现假阳性和假阴性的结果。

1) 本评价结果仅适用于广州华峰生物科技有限公司的沙门氏菌 LAMP 检测试剂盒。