



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 5516.2—2023

出口食品中致病菌荧光重组酶介导链替换 核酸扩增(RAA)检测方法 第2部分:志贺氏菌

Real-time recombinase-aid amplification detection method for pathogens in export
food—Part 2: *Shigella*

2023-05-05 发布

2023-12-01 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《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件是 SN/T 5516《出口食品中致病菌荧光重组酶介导链替换核酸扩增(RAA)检测方法》的第2部分。SN/T 5516 已经发布了以下部分：

- 第1部分：沙门氏菌；
- 第2部分：志贺氏菌；
- 第3部分：金黄色葡萄球菌；
- 第4部分：副溶血性弧菌；
- 第5部分：克罗诺杆菌属；
- 第6部分：大肠埃希氏菌 O157；
- 第7部分：产志贺毒素大肠埃希氏菌；
- 第8部分：空肠弯曲菌；
- 第9部分：单核细胞增生李斯特氏菌；
- 第10部分：小肠结肠炎耶尔森氏菌；
- 第11部分：肺炎克雷伯氏菌；
- 第12部分：铜绿假单胞菌；
- 第13部分：蜡样芽孢杆菌；
- 第14部分：产气荚膜梭菌；
- 第15部分：霍乱弧菌；
- 第16部分：创伤弧菌。

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：中华人民共和国石家庄海关、中华人民共和国西安海关、中华人民共和国上海海关、石家庄学院。

本文件主要起草人：王建昌、员丽娟、黄新新、刘立兵、孙晓霞、陈佳、申进玲、王金凤、项佳林、姜彦芬、娄巧哲。

出口食品中致病菌荧光重组酶介导链替换 核酸扩增(RAA)检测方法

第2部分:志贺氏菌

1 范围

本文件规定了出口食品中志贺氏菌的荧光重组酶介导链替换核酸扩增(RAA)检测方法。
本文件适用于出口食品中志贺氏菌的快速筛选。

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 4789.5 食品安全国家标准 食品微生物学检验 志贺氏菌检验

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

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。

实时荧光 RAA real time RAA

RAA 是一种核酸恒温扩增技术,在恒温下(一般为 37 °C—42 °C),重组酶和寡核苷酸引物结合形成蛋白-DNA 复合物,该复合物能够移动寻找模板 DNA 中的同源序列,在单链 DNA 结合蛋白的帮助下,打开模板 DNA 的双链结构,在 DNA 聚合酶的作用下,形成新的双链,产物呈指数级扩增。在 *exo* 探针中包含一个四氢呋喃残基(THF),其两侧分别为 dT-荧光基团(FAM)和 dT-淬灭基团(BHQ-1)。探针 3'端通过适当的修饰(C3 Spacer)被封闭,以阻止聚合酶的进一步延伸。只有当探针和目的 DNA 结合后,核酸外切酶 III(Exonuclease III, ExoIII)能够识别并切除 THF 残基,并解除 3'端阻断,荧光基团和淬灭基团分开并产生荧光信号,RAA 产物与荧光信号的增长存在对应关系。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BHQ1:黑洞淬灭基团 1(black hole quencher 1)

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

dNTP:脱氧核糖核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate)

Exo III:核酸外切酶 III(Exonuclease III)

FAM:6-羧基荧光素(6-carboxyfluorescein)

ipaH 基因:侵袭性质粒抗原 H 基因(invasion plasmid antigen H)

PEG:聚乙二醇(polyethylene glycol)

RAA:重组酶介导链替换核酸扩增(recombinase-aid amplification)

Tricine:三(羟甲基)甲基甘氨酸(N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycine)

4 技术概要

以提取的 DNA 为模板,采用志贺氏菌特异性 RAA 引物和 *exo* 探针,进行实时荧光 RAA 的扩增,根据实时荧光 RAA 的增幅情况,实现对食品中志贺氏菌的快速筛选。

5 试剂和材料

除另有规定外,试剂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 酶污染的容器分装。

5.1 检测用引物(对)序列和探针

根据志贺氏菌 *ipaH* 基因设计的上下游引物和一条 *exo* 探针,详见表 1。

表 1 引物和探针序列

名称	序列(5'-3')	目的基因
上游引物 <i>ipaH</i> -F	CTGCATGGCTGGAAAACTCAGTGCCTCTG	<i>ipaH</i> 基因
下游引物 <i>ipaH</i> -R	GTTCTGACTTTATCCCGGGCAATGTCCTCC	
<i>exo</i> 探针 <i>ipaH</i> -P	CCATCAGGCATCTGAAGGCCTTTTCGA-T (FAM)-THF-A-T (BHQ1)-GATACCGCGCTCTGCTC-C3 Spacer	

5.2 试剂

5.2.1 细菌 DNA 提取试剂盒。

5.2.2 RAA 反应缓冲液:20% PEG。也可采用等效的商品试剂盒。

5.2.3 280 mmol/L 乙酸镁。

5.2.4 冻干酶制剂:1 mmol/L dNTP、90 ng/ μ L 单链结合蛋白、120 ng/ μ L *recA* 重组酶、30 ng/ μ L *Bsu* DNA 聚合酶、30 ng/ μ L *ExoIII*、100 mmol/L Tricine、5 mmol/L 二硫苏糖醇、100 ng/ μ L 肌酸激酶,保存于 200 μ L 反应管中冻干。也可采用等效的商品试剂盒。

5.2.5 阳性对照:志贺氏菌标准菌株,或含目的片段的 DNA。

6 仪器和设备

6.1 荧光检测仪:具有恒温(39 \pm 1 $^{\circ}$ C)扩增功能的荧光检测仪。

6.2 微量移液器:100 μ L-1 000 μ L,20 μ L-200 μ L,10 μ L-100 μ L,0.5 μ L-10 μ L,并配备与移液器匹配的吸头。

6.3 高速台式离心机:离心力 \geq 12 000 $\times g$ 。

6.4 恒温金属浴:100 \pm 1 $^{\circ}$ C。

6.5 天平:感量 0.01 g。

7 检测程序

食品中志贺氏菌实时荧光 RAA 检测程序见图 1。

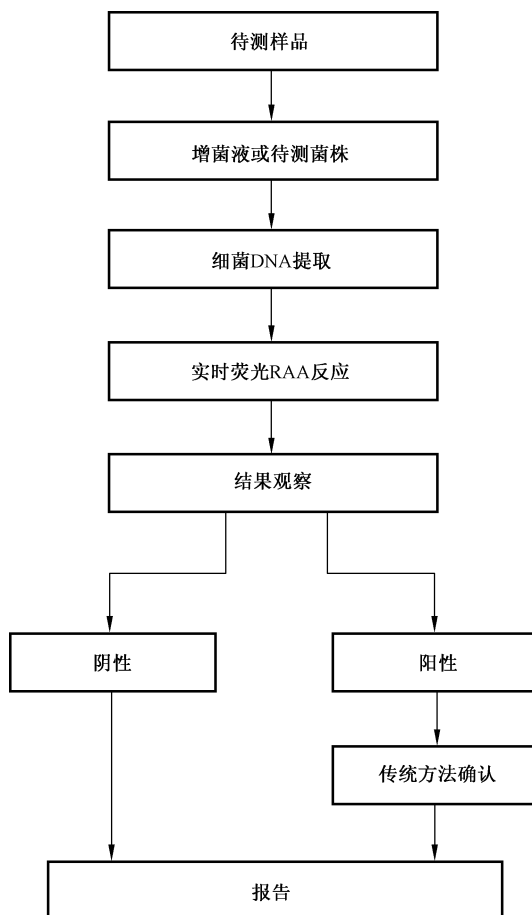


图 1 食品中志贺氏菌实时荧光 RAA 检测程序

8 操作步骤

8.1 样品制备、增菌培养

按照 GB 4789.5 的方法进行样品制备和增菌。

8.2 细菌模板 DNA 的制备

8.2.1 增菌液模板 DNA 的制备

对于 8.1 获得的增菌液,吸取 1 mL 菌液加入 1.5 mL 离心管中,12 000×g 离心 2 min,弃上清。采用试剂盒中的细菌悬浮液重悬细菌,并按照细菌 DNA 提取试剂盒说明书制备模板 DNA。

8.2.2 可疑菌落模板 DNA 的制备

对于分离到的可疑菌落,可直接挑取可疑单菌落于 100 μ L 无菌水混匀,沸水浴 10 min,立即置冰

上冷却,12 000×g 离心 2 min,上清液即为模板 DNA。也可使用等效的商品化细菌 DNA 提取试剂盒并按其说明书制备模板 DNA。

8.3 实时荧光 RAA 扩增

8.3.1 实时荧光 RAA 反应体系

志贺氏菌 RAA 检测,50 μL 反应体系见表 2。

表 2 志贺氏菌实时荧光 RAA 反应体系

组分名称	体积 μL
RAA 反应缓冲液	25
<i>ipaH</i> -F(10 μmol/L)	2.1
<i>ipaH</i> -R(10 μmol/L)	2.1
<i>ipaH</i> -P(10 μmol/L)	0.6
DNA 模板(20 ng/μL)	4.0
无菌双蒸水	13.7
乙酸镁(280 mmol/L)	2.5
总量	50

注 1: DNA 模板量可根据不同样品,具体情况进行调整。
注 2: 将除乙酸镁和模板 DNA 以外的所有成分涡旋混匀,分装混合液至含有冻干酶制剂的 200 μL 反应管中,轻柔手弹使冻干粉充分重溶均匀,短暂离心,打开反应单元,向每个反应单元的管盖上加入 2.5 μL 乙酸镁,然后向各反应单元加入模板 DNA,充分混匀并离心。
注 3: 可使用等效的商品化荧光 RAA 试剂盒按照其说明书进行检测。

8.3.2 反应条件

将反应管置于荧光检测仪中,39 °C,20 min。在反应过程中实时监测荧光信号。

8.4 实验对照

检测过程中分别设空白对照、阴性对照和阳性对照。

空白对照以无菌水代替模板 DNA。

阴性对照以非志贺氏菌标准菌株 DNA 代替模板 DNA。

阳性对照制备:用棉签挑取新鲜生长于麦康凯琼脂平板上的志贺氏菌标准菌株至 0.85%生理盐水中,调至麦氏浊度 0.5 左右,12 000 ×g 离心 2 min,弃上清;加入 1 mL 0.85%无菌生理盐水重悬沉淀,12 000 ×g 离心 2 min,弃上清;加入 100 μL 无菌水混匀后沸水浴 10 min,立即置冰上冷却;12 000 ×g 离心 2 min,上清液即为志贺氏菌 RAA 反应的阳性 DNA 模板。

9 结果判定

9.1 质控标准

以下要求需在同一次实验中同时满足,否则,本次实验无效,需重新进行:

- a) 空白对照: 在 20 min 内无扩增曲线。
- b) 阴性对照: 在 20 min 内无扩增曲线。
- c) 阳性对照: 在 10 min 内出现典型的扩增曲线。

9.2 结果描述及判定

9.2.1 样品在 20 min 内无扩增曲线,可判定样品结果为阴性,可直接报告未检出志贺氏菌。

9.2.2 样品在 20 min 内出现扩增曲线,则样品结果为志贺氏菌初筛阳性。对于初筛阳性结果,应参按照 GB 4789.5 进行确证。

10 生物安全和防污染措施

为了保护实验室人员的安全,应由具备资格的工作人员进行检测,所有培养物和废弃物应按照 GB 19489 中的有关规定执行。

防止污染措施应符合 GB/T 27403 的规定。

以正式出版文本为准

附 录 A

(规范性)

志贺氏菌 *ipaH* 基因扩增序列

CTGCATGGCTGGAAAACTCAGTGCCTCTGCGGAGCTTCGACAGCAGTCTTTCCTGT
TGCTGCTGATGCCACTGAGAGCTGTGAGGACCGTGTCGCGCTCACATGGAACAATCTCCGG
AAAACCCTCCTGGTCCATCAGGCATCTGAAGGCCTTTTCGATAATGATACCGGCGCTCTGC
TCTCCCTGGGCAGGGAAATGTTCCGCCTCGAAATTCTGGAGGACATTGCCCGGGATAAGT
CAGAAC

以正式出版文本为准

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
出口食品中致病菌荧光重组酶介导链替换
核酸扩增(RAA)检测方法
第2部分:志贺氏菌
SN/T 5516.2—2023

*

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
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 17 千字
2023年11月第一版 2023年11月第一次印刷
印数 1—500

*

书号: 155175·939 定价 16.00 元



SN/T 5516.2—2023