



中华人民共和国国家标准

GB/T 28642—2012

GB/T 28642—2012

饲料中沙门氏菌的快速检测方法 聚合酶链式反应(PCR)法

Rapid determination of *Salmonella* spp. in animal feeding stuffs—
PCR method

中华人民共和国
国家标准
饲料中沙门氏菌的快速检测方法
聚合酶链式反应(PCR)法
GB/T 28642—2012

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100013)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
网址 www.spc.net.cn
总编室:(010)64275323 发行中心:(010)51780235
读者服务部:(010)68523946
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

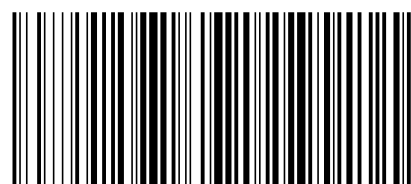
*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 14 千字
2012年11月第一版 2012年11月第一次印刷

*

书号: 155066·1-45619 定价 16.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107



GB/T 28642-2012

2012-07-31 发布

2012-11-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

A.3.3 完全培养基制备

基础液	1 000 mL
L-胱氨酸溶液	10 mL
pH7.0	

基础液冷却后,以无菌操作加 L-胱氨酸溶液,将培养基分装于适当容量的灭菌瓶中,每瓶 100 mL。

注:培养基在配制当日使用。

A.4 50×TAE 缓冲液**A.4.1 0.5 mol/L EDTA (pH8.0)**

取二水乙二胺四乙酸二钠 186.1 g,加入 800 mL 蒸馏水充分搅拌,加 10 mol/L 的氢氧化钠调解 pH 至 8.0,待完全溶解后,定容至 1 L。高压灭菌。

A.4.2 制法

Tris 碱 242.0 g 溶于 700 mL 的水中,加入 0.5 mol/L EDTA (pH8.0) 100 mL,冰乙酸 57.1 mL,充分溶解,用水定容至 1 L。

A.5 1×TAE 缓冲液

取 20 mL 50×TAE,加水定容至 1 000 mL。Tris-乙酸终浓度为 0.04 mol/L,EDTA 终浓度为 0.001 mol/L。

A.6 溴化乙锭(5 mg/mL)

取溴化乙锭 0.050 0 g 溶于 10 mL 水中。

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC76)归口。

本标准起草单位:农业部饲料质量及畜产品安全监督检验测试中心(沈阳)。

本标准主要起草人:张秀芹、张建勋、杜柏林、李欣南、杨希国、马俊驰、陈晓月。

附录 A
(规范性附录)
培养基及缓冲液的配制

A.1 缓冲蛋白胨水(BPW)

A.1.1 成分

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠	9.0 g
磷酸二氢钾	1.5 g
蒸馏水	1 000 mL
pH7.0	

A.1.2 制法

按上述成分分配好,校正 pH,分装于大瓶中,121 °C 高压灭菌 20 min,临用时分装在 500 mL 无菌瓶中,每瓶 225 mL,或配好后校正 pH,分装于 500 mL 瓶中,每瓶 225 mL,121 °C 高压灭菌 20 min,冷却备用。

A.2 大豆蛋白胨肉汤(RVS)

A.2.1 溶液 A

A.2.1.1 成分

蛋白胨	5.0 g
氯化钠	8.0 g
磷酸二氢钾	1.4 g
磷酸氢二钾	0.2 g
蒸馏水	1 000 mL
pH7.0	

A.2.1.2 制法

将各成分加入蒸馏水中,加热至约 70°C 溶解。此溶液需当天使用。

A.2.2 溶液 B

A.2.2.1 成分

氯化镁	400.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.2.2.2 制法

将氯化镁溶于水中。

饲料中沙门氏菌的快速检测方法
聚合酶链式反应(PCR)法

1 范围

本标准规定了饲料中沙门氏菌的快速检测的 PCR 方法。

本标准适用于饲料中沙门氏菌的定性筛选。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 13091 饲料中沙门氏菌的检测方法

GB/T 14699.1 饲料 采样

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

SN/T 1870 食品中致病菌检测方法 实时 PCR 法

3 原理

利用沸水浴使菌体细胞破裂,释放基因组 DNA,离心使细胞壁等有形物沉淀,以上清液为模板进行扩增,琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。

4 试剂和材料

除另有规定外,试剂为分析纯或生化试剂,试验用水符合 GB/T 6682 的要求。

4.1 沙门氏菌检测用引物(对)序列为:

Sal F:5'-TCG CAC CGT CAA AGG AAC CGT AAA GC-3'

Sal R:5'-GCA TTA TCG ATC AGT ACC AGC CGT CT-3'

4.2 Premix Taq 缓冲液(2×):内含 Taq DNA 聚合酶 1.25 U/25 μL,4 mmol Mg²⁺,dNTP 各0.4 mmol。

4.3 琼脂糖:电泳级。

4.4 Marker 2000。

4.5 缓冲蛋白胨水(BPW):见 A.1。

4.6 大豆蛋白胨肉汤(RVS):见 A.2。

4.7 亚硒酸盐胱氨酸增菌液(SC):见 A.3。

4.8 10 倍上样缓冲液(10×loading buffer):0.05%的溴酚蓝,50%丙三醇溶液,1%的 SDS。

4.9 质控菌株:沙门氏菌阳性标准菌株。

4.10 50×TAE 缓冲液:见 A.4。