

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1941.3—2007

SN/T 1941.3—2007

### 进出口食品中乳酸菌检验方法 第3部分：乳酸杆菌的PCR法

Detection of lactic acid bacteria in food for import and export—  
Part 3: *Lactobacillus* PCR method

中华人民共和国出入境检验检疫  
行业标准  
进出口食品中乳酸菌检验方法  
第3部分：乳酸杆菌的PCR法  
SN/T 1941.3—2007

\*

中国标准出版社出版  
北京复兴门外三里河北街16号  
邮政编码：100045

网址 [www.spc.net.cn](http://www.spc.net.cn)

电话：68523946 68517548

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 15 千字  
2007年11月第一版 2007年11月第一次印刷  
印数 1—2 000

\*

书号：155066·2-18198 定价 8.00 元



SN/T 1941.3—2007

2007-08-06 发布

2008-03-01 实施

中华人民共和国  
国家质量监督检验检疫总局 发布

终 pH 7.3±0.2。

### A.3 改良番茄汁琼脂培养基(改良 TJA 培养基)

#### A.3.1 成分

|   |          |
|---|----------|
| 番茄汁                                     | 50 mL    |
| 酵母抽提液                                   | 5.0 g    |
| 牛肉膏                                     | 10.0 g   |
| 乳糖                                      | 20.0 g   |
| 葡萄糖                                     | 2.0 g    |
| 磷酸氢二钾(K <sub>2</sub> HPO <sub>3</sub> ) | 2.0 g    |
| 吐温-80                                   | 1.0 g    |
| 乙酸钠                                     | 5.0 g    |
| 琼脂                                      | 15.0 g   |
| 蒸馏水                                     | 1 000 mL |

#### A.3.2 制法

番茄汁的制作:将新鲜番茄洗净,切碎(切勿捣碎),放入锥形瓶,置 4℃ 冰箱 8 h~12 h,取出后用灭菌纱布过滤。将各成分加入蒸馏水中,加热并不断搅拌,煮沸 1 min,使琼脂溶解,分装适当的容器,121℃ 高压灭菌 15 min,最终 pH7.3±0.2。

### A.4 改良 MC 培养基

#### A.4.1 成分

|          |           |
|----------|-----------|
| 大豆蛋白胨    | 5.0 g     |
| 牛肉浸膏     | 5.0 g     |
| 酵母浸膏     | 5.0 g     |
| 葡萄糖      | 20.0 g    |
| 乳糖       | 20.0 g    |
| 碳酸钙      | 10.0 g    |
| 琼脂       | 15.0 g    |
| 蒸馏水      | 1 000 mL  |
| 1%中性红溶液  | 5 mL      |
| 硫酸多粘菌素 B | 100 000IU |

#### A.4.2 制法

将前面七种成分加入蒸馏水中,加热溶解,校正 pH6.0,加入中性红溶液。分装于烧瓶中,高压灭菌 121℃ 15 min。用时加热融化琼脂,冷至 50℃,酌情加或不加硫酸多粘菌素 B。

## 前 言

SN/T 1941《进出口食品中乳酸菌检验方法》分为三个部分:

——第 1 部分:分离与计数方法;

——第 2 部分:Petrifilm™ 测试片法;

——第 3 部分:乳酸杆菌的 PCR 法。

本部分为 SN/T 1941 的第 3 部分。

本部分的附录 A 和附录 B 均为规范性附录。

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:中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局。

本部分主要起草人:吴斌、郑秋月、李叶、胡传伟、李振荣。

本部分系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

DNA 提取试剂盒操作说明书提取模板 DNA,所提取的模板 DNA 溶于 50  $\mu\text{L}$  TE 中。剩余含乳酸杆菌的肉汤增菌液分别于有氧和厌氧条件下,36 $^{\circ}\text{C}$   $\pm$  1 $^{\circ}\text{C}$  恒温过夜培养,以备确证试验使用。

### 8.3.3 PCR 扩增(可参照相关试剂盒操作说明)

反应体系体积 50  $\mu\text{L}$ :10 $\times$ PCR 缓冲液( $\text{Mg}^{2+}$  Plus)5  $\mu\text{L}$ 、引物对(20 pmol/L)各 0.5  $\mu\text{L}$ 、dNTP (2.5 mmol/L)4  $\mu\text{L}$ 、*Taq* DNA 聚合酶(5 U/ $\mu\text{L}$ )0.25  $\mu\text{L}$ 、模板 DNA 1  $\mu\text{L}$ 、水补足至 50  $\mu\text{L}$ 。

反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min,95 $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s,进行 30 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min,4 $^{\circ}\text{C}$  保存。

### 8.3.4 质控

检验过程中要设阳性对照、阴性对照和空白对照。分别接种乳酸杆菌标准菌株目录号为 CMCC 1.2435、CMCC1.1878、CMCC1.1880 和大肠埃希氏菌标准菌株目录号为 ATCC25922 到营养肉汤中,36 $^{\circ}\text{C}$   $\pm$  1 $^{\circ}\text{C}$  培养,各取 1.5 mL 增菌液,离心,提取 DNA。乳酸杆菌 DNA 模板作阳性对照,大肠埃希氏菌 DNA 模板作阴性对照,灭菌双蒸水作空白对照。

### 8.3.5 PCR 扩增产物电泳检验

用 50 $\times$ TAE 电泳缓冲液(工作液为 1 $\times$ TAE)配制 2% 琼脂糖电泳凝胶(溴化乙锭终浓度达到 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),制胶。在电泳槽中加入电泳缓冲液,使液面没过胶面。将 7.5  $\mu\text{L}$  PCR 扩增产物分别和 1.5  $\mu\text{L}$  6 $\times$  加样缓冲液混合,点样,同时加入 100 bp DNA ladder。9 V/cm 恒压,电泳 20 min~30 min。紫外凝胶成像仪下观察电泳结果,拍照并记录结果。

## 8.4 结果及判断

### 8.4.1 PCR 扩增产物电泳检验结果

乳酸杆菌 PCR 扩增产物为 250 bp。

### 8.4.2 结果判断

阴性对照和空白对照均未出现特征条带;阳性对照出现预期大小的特征条带;待测样品出现预期大小的特征条带,怀疑存在乳酸杆菌,需进一步确证;待测样品未出现预期大小的扩增条带,为阴性结果。

### 8.4.3 确证试验

取 8.3.2 中 36 $^{\circ}\text{C}$   $\pm$  1 $^{\circ}\text{C}$  恒温培养的相应增菌液接种于 MRS 琼脂平板中,按照 SN/T 1941.1 挑取可疑菌落并进行鉴定。

### 8.4.4 结果表述

PCR 扩增产物电泳检验结果阳性,且经确证为非假阳性,报告该食品中检出乳酸杆菌。

PCR 扩增产物电泳检验结果阴性,报告该食品中未检出乳酸杆菌。

## 8.5 废弃物处理和防止污染的措施

检验过程中的废弃物,收集后焚烧处理。

检验过程中防止交叉污染的措施按照附录 B 的规定执行。

## 进出口食品中乳酸菌检验方法 第 3 部分:乳酸杆菌的 PCR 法

### 1 范围

SN/T 1941 的本部分规定了乳酸杆菌的 PCR 检验方法。

本部分适用于天然或添加乳酸菌的食品及原料中乳酸菌的测定。

### 2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过 SN/T 1941 的本部分的引用而成为本部分的条款。凡是注明日期的引用文件,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。

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

SN/T 1941.1 进出口食品中乳酸菌检验方法 第 1 部分:分离与计数方法

WS/T 230—2002 临床诊断中聚合酶反应技术的应用

### 3 生物安全措施

为了保护实验室人员的安全,应由具备资格的工作人员检测乳酸杆菌,所有培养物和废弃物应小心处置。并按照 GB 19489 中的有关规定进行。

### 4 防污染措施

参照 WS/T 230—2002 中第 6 章进行污染的预防和控制。

### 5 术语、定义和缩略语

#### 5.1 术语和定义

下列术语和定义适用于 SN/T 1941 的本部分。

##### 5.1.1

**乳酸杆菌属** *Lactobacillus*

乳酸杆菌为一类革兰氏阳性无芽孢的细长杆菌,能分解葡萄糖或乳糖产生污染的乳酸,专性厌氧、兼性厌氧或厌氧,多数无动力,过氧化氢酶阴性。

##### 5.1.2

**聚合酶链反应** polymerase chain reaction, PCR

用两段(通常长度为 15 个~25 个核苷酸)寡脱氧核苷酸作为反应的引物,与待测模板 DNA 链上的特定定位点分别发生互补。在适宜反应液中 DNA 聚合酶的催化下,通过 DNA 变性、退火及延伸数十个循环而获得两个互补位点之间 DNA 片段的大量拷贝。反应液包括含有镁离子的反应缓冲液、4 种脱氧核苷三磷酸(dNTP)、模板 DNA、引物及热稳定 DNA 聚合酶组成。

##### 5.1.3

**引物** primer

应用化学方法合成一对与已知待扩增基因片段两侧 DNA 序列互补的寡核苷酸,作为 PCR 扩增的