

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1942.2—2007

SN/T 1942.2—2007

进出口动物源性食品中布鲁氏菌属 检验方法 第 2 部分:PCR 检验方法

Detection of *Brucella* in food from animal for import and export—
Part 2: PCR method

中华人民共和国出入境检验检疫
行业标准
进出口动物源性食品中布鲁氏菌属
检验方法

第 2 部分:PCR 检验方法

SN/T 1942.2—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

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 14 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: 155066·2-18200 定价 8.00 元



SN/T 1942.2-2007

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

A.4 胰蛋白胨培养基

A.4.1 成分

胰蛋白胨	20.0 g
氯化钠	5.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.4.2 制法

将各成分加入蒸馏水中,加热并不断搅拌,煮沸 1 min,使各成分完全溶解,121℃高压灭菌 15 min,最终 pH 7.2±0.2。

前 言

SN/T 1942—2007《进出口动物源性食品中布鲁氏菌属检验方法》分为两部分:

——第 1 部分:分离与计数方法;

——第 2 部分:PCR 检验方法。

本部分为 SN/T 1942 的第 2 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、中华人民共和国黑龙江出入境检验检疫局。

本部分主要起草人:吴斌、郑秋月、贾赟、李苏龙、李振荣、胡传伟。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

8.3 步骤

8.3.1 增菌

以无菌操作称取食品试样 25 mL(g),加到含有 225 mL 布鲁氏菌肉汤培养基的灭菌广口瓶内,振荡使样品充分混匀后,分别于有氧和微需氧条件下,36℃±1℃恒温培养 72 h。

8.3.2 模板 DNA 提取

取布鲁氏菌肉汤培养基 1.5 mL,10 000 r/min 离心 2 min,尽量倒尽上清液。按细菌基因组 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 μL TE 中。剩余布鲁氏菌肉汤增菌液分别于有氧和微需氧条件下 36℃±1℃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 μL:10×PCR 缓冲液(Mg²⁺ Plus)5 μL、引物对(20 p mol/L)各 0.5 μL、dNTP(2.5 mmol/L)4 μL、Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)0.25 μL、模板 DNA 1 μL、水补足至 50 μL。

反应条件:93℃预变性 5 min,93℃变性 60 s,60℃退火 60 s,72℃延伸 60 s,进行 40 个循环,72℃延伸 10 min,4℃下保存。

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。分别接种布鲁氏菌标准菌株和大肠埃希氏菌标准菌株到营养肉汤中,36℃+1℃培养,各取 1.5 mL 增菌液,离心,提取 DNA 模板。布鲁氏菌属 DNA 模板作阳性对照,大肠埃希氏菌 DNA 模板作阴性对照,空白对照加水 1 μL。

8.3.5 PCR 扩增产物电泳检验

用 50×TAE 电泳缓冲液应用液配制 2%琼脂糖电泳凝胶,并趁凝胶未凝固时加入溴化乙锭使其最终浓度达到 1 μg/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 μL PCR 扩增产物分别和 1.5 μL 6×加样缓冲液混合,点样,其中一孔加入 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

布鲁氏菌属 PCR 扩增产物为 223 bp。

8.4.2 结果判断

阴性对照和空白对照均未出现条带;阳性对照出现预期大小的扩增条带;待测样品出现预期大小的扩增条带,怀疑存在布鲁氏菌属,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 36℃±1℃恒温培养的相应增菌液接种于平板中,按照 SN/T 1942.1 中 6.3.3 的分离方法,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,报告该食品中检出布鲁氏菌。

PCR 扩增产物电泳检验结果阴性,报告该食品中未检出布鲁氏菌。

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 中的规定执行。

进出口动物源性食品中布鲁氏菌属 检验方法 第 2 部分:PCR 检验方法

1 范围

SN/T 1942 的本部分规定了进出口动物源性食品中布鲁氏菌属 PCR 检验方法。

本部分适用于进出口动物源性食品中布鲁氏菌属的快速检验。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过 SN/T 1942 的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。

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

SN/T 1942.1 进出口动物源性食品中布鲁氏菌属检验方法 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布鲁氏菌,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 1942 的本部分。

5.1.1

布鲁氏菌属 *Brucella*

布鲁氏菌属为一类革兰氏阴性短小球杆菌,可分解葡萄糖等糖类,产酸量少,无动力,无芽胞,过氧化氢酶阳性。

5.1.2

聚合酶链反应 polymerase chain reaction, PCR

使用两段(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,这两段引物序列应不发生互补作用,可以和作为模板的待测 DNA 两条链上的特定位点分别发生互补。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。在 DNA 聚合酶催化下,通过 DNA 变性、退火及延伸数十个循环的反复变化而获得两个互补位点之间 DNA 片段的大量拷贝。