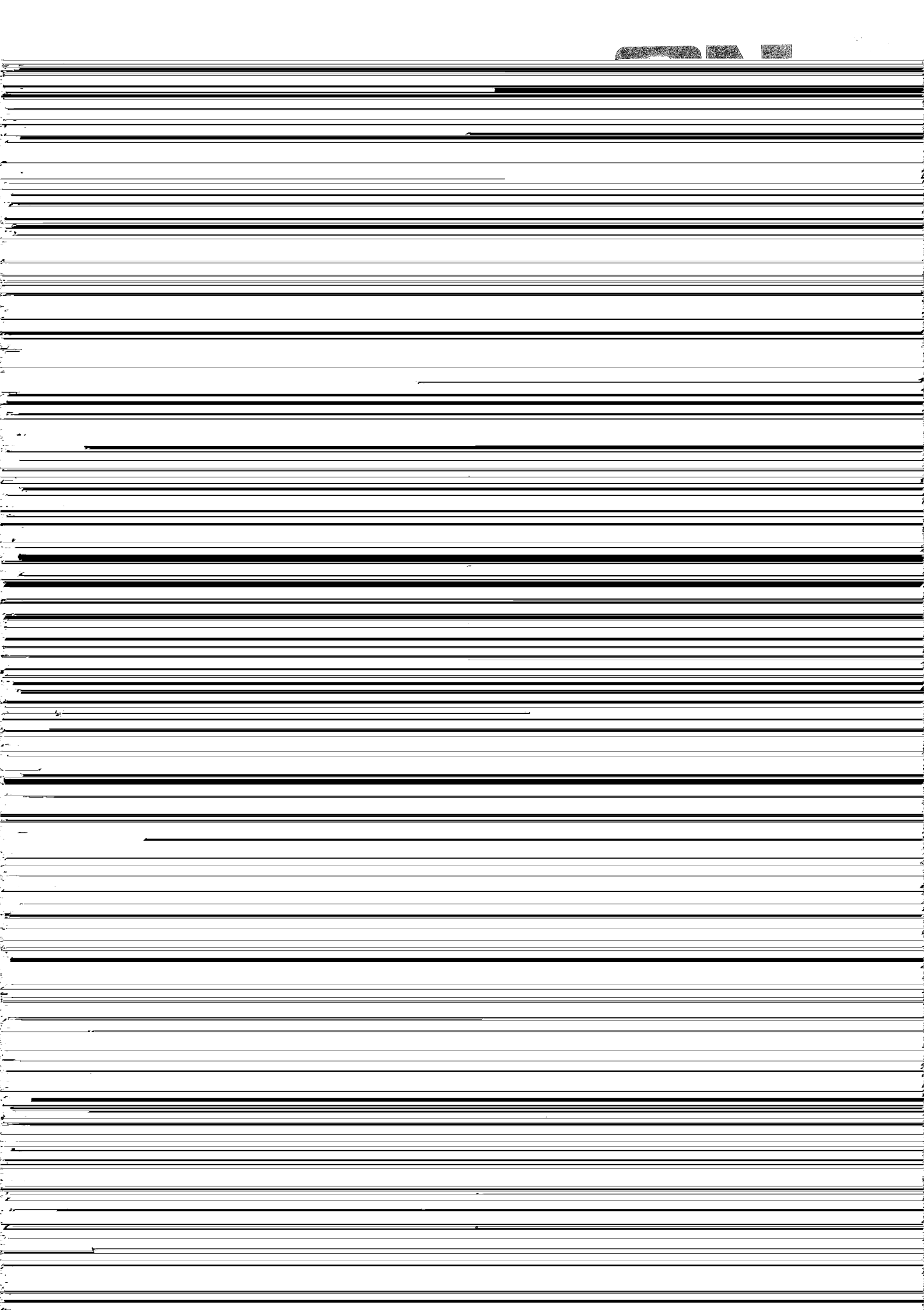




中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

前 言

- 第1部分：取样指南；
- 第2部分：检验样品的制备与稀释；
- 第3部分：酵母、霉菌菌落计数；
- 第4部分：嗜冷菌微生物菌落计数；
- 第5部分：沙门氏菌检验；
- 第6部分：大肠杆菌检验。

乳及乳制品卫生微生物学检验方法

奇异变形杆菌检验

3.7

dTTP deoxythymidine triphosphate

脱氧胸苷三磷酸

3.8

bp base pair

碱基对。

4 培养基和试剂

- 5.1 培养箱:36℃±1℃。
- 5.2 天平:0 g~500 g,感量 0.1 g。
- 5.3 均质器及配套的均质杯或均质袋。
- 5.4 吸管:1 mL、10 mL,具刻度。
- 5.5 玻璃三角瓶:250 mL。
- 5.6 培养皿:直径 90 mm。
- 5.7 PCR 仪。
- 5.8 离心管:1.5 mL。
- 5.9 PCR 反应管。
- 5.10 离心机。
- 5.11 冰箱:4℃~-20℃。
- 5.12 微量可调移液器和灭菌吸头:2 μL、10 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL。

6.1.2 检测步骤

6.1.2.1 选择性增菌

以无菌操作取样 25 g(mL),按 SN 12532.1 操作,加入装有 225 ml GN 增菌液的无菌均质杯中

用均质器均质 1 min~3 min,抽样量公称容积为 $26^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h

6.1.2.2 选择性分离

取增菌液 1 环,划线接种于 SS 平板,于 $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h,並通亦亚红菌和大肠亦形杆

6.2.2.2 模板 DNA 提取

1. 将待测样品放入离心管中，加入适量的裂解液，充分混匀，静置 5 min。

取 10 μL DCD 产物,加 1.5 μL 1% 羟甲基纤维素凝胶电泳,并加 DNA 分子量标准,按 11 步骤 DCD 步

物的片段大小。电压大小根据电泳槽长度来确定,一般控制在 3 V/cm~5 V/cm 长度,待电泳溴酚蓝移
动到凝胶的三分之一处时停止。将凝胶放入 0.5 mol/L 氯化乙酸钠溶液中浸泡 20 min~20 min,用

附 录 A
(规范性附录)
培养基和溶液的配制

A.1 GN 增菌液

A.1.1 成分

胰蛋白胨	20 g
葡萄糖	1 g
甘露醇	2 g
柠檬酸钠	5 g
去氧胆酸钠	0.5 g
磷酸氢二钾	4 g
磷酸二氢钾	1.5 g
氯化钠	5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

按上述成分配好,加热使溶解,校正 pH7.0。分装每瓶 225 mL,115 ℃ 高压灭菌 15 min。

A.2 SS 琼脂

A.2.1 基础培养基

牛肉膏	5 g
蛋白胨	5 g

三号胆盐	3.5 g
琼脂	17 g
蒸馏水	1 000 mL

将牛肉膏、蛋白胨和胆盐溶解于 400 mL 蒸馏水中,将琼脂加入于 600 mL 蒸馏水中,煮沸使其溶

解。再将两液混匀,121 ℃ 高压灭菌 15 min,保存备用。

培养基的配制方法如下：

注 1：制好的培养基宜当日使用，若因存放时间过长，应重新灭菌。

注 2：煌绿溶液配好后应在 10 d 以内使用。

注 3：可用 0.1% 的煌绿溶液代替培养基。

A.3 克氏双糖培养基

A.3.1 成分

蛋白胨	20 g
牛肉膏	3 g
酵母膏	3 g
乳糖	10 g
葡萄糖	1 g
氯化钠	5 g
柠檬酸铁铵	0.5 g
硫代硫酸钠	0.5 g

A.4.3 试验方法

为红色。

蒸馏水
pH7.4

1 000 mL

取磷酸二氢钾可溶性盐 1.3418 g 配成 100 mL 0.1% 溶液于 25℃ 下测定其 pH 值。

A.9.3 靛基质试剂

A.9.3.1 靛基质试剂。将5 g 对二甲氨基甲醛溶解于75 mL 戊醇中,然后缓慢加入浓盐酸 25 mL。

将 5 g 对二甲氨基甲醛溶解于 75 mL 戊醇中,然后缓慢加入浓盐酸

20 mL。

A.9.4 试验方法

将 10 mL 待测样品 (20 mL 样品溶液) 加入 2 mL 靛基质试剂可接受 4.1.5.1 加入靛基质试剂的

SN/T 2552.8—2010

灭菌双蒸水 800 mL

用 5 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 至 8.0。灭菌双蒸水加至 1 000 mL, 121 °C, 15 min 灭菌备用。

A. 12.2 TAE 电泳缓冲液(50×)配制

羟基甲基氨基甲烷(Tris) 242 g

冰乙酸 57.1 mL

0.5 mol/L EDTA 溶液, pH8.0 100 mL

将上述成分混合, 灭菌双蒸水加至 1 000 mL, 121 °C, 15 min 灭菌备用。用时用灭菌双蒸水稀释至

1×使用。

A. 13 溴化乙锭(EB)溶液(10 mg/mL)

灭菌双蒸水 20 mL

A. 14 含 0.5 μ g/mL 溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶的配制