



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

/ 2754 9—2011

出口食品中致病菌环介导恒温 扩增()检测方法 第 9 部分:溶血性链球菌

— 9:

2011 02 25 发布

2011 07 01 实施

中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

前言

q l / r A t t e n t i o n

出口食品中致病菌环介导恒温 扩增(j_k n)检测方法 第 9 部分:溶血性链球菌

1 范围

/ 的本部分规定了检测出口食品中溶血性链球菌的环介导恒温核酸扩增()法。
本部分适用于出口食品中溶血性链球菌的筛选检测。

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。

- / 食品微生物学检验 溶血性链球菌检验
- / 分析实验室用水规格和试验方法
- 实验室 生物安全通用要求
- / 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

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溶血性链球菌,所有培养物和废弃物应
按照 中的有关规定执行。

4 防污染措施

防止污染措施应符合 / 的规定。

5 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

- :甜菜碱
- Bst 酶[Bst ()]: Bst 聚合酶(大片段)
- ():脱氧核糖核酸
- ():脱氧核苷三磷酸
- ():乙二醇四乙酸
- ():环介导恒温扩增
- :聚乙二醇辛基苯基醚

6 技术概要

根据溶血性链球菌属特有的靶序列 *ska* 基因(参见附录)设计的两对特殊的内、外引物,特异性识

别靶序列上的六个独立区域,利用 *Bst* 酶启动循环链置换反应,在 *ska* 基因序列启动互补链合成,在同一链上互补序列周而复始形成有很多环的花椰菜结构的茎环混合物;从析出的焦磷酸根离子与反应溶液中的结合,产生副产物(焦磷酸镁)形成乳白色沉淀,加入显色液,即可通过颜色变化观察判定结果。

7 试剂和材料

- 除有特殊说明外,所有实验用试剂均为分析纯;实验用水符合 / 中一级水的要求。
- 7 1 引物:根据溶血性链球菌属特有的靶序列 *ska* 基因设计一套特异性引物,包括外引物 ,外引物和内引物 ,内引物 。
- 外引物扩增片段长度: 。
- 外引物 (, ' '):
- 外引物 (, ' '):
- 内引物 (, ' '):
- 内引物 (, ' '):
- 7 2 提取液: / , / , ()。
- 7 3 × 缓冲液含: / , / 氯化钾, / 硫酸铵, / 硫酸镁, 。
- 7 4 :每种核苷酸浓度 / 。
- 7 5 甜菜碱:浓度 / 。
- 7 6 硫酸镁():浓度 / 。
- 7 7 *Bst* 聚合酶:酶浓度 /μ 。
- 7 8 显色液: I 荧光染料, × 。
- 7 9 阳性对照:溶血性链球菌标准菌株,或含目的片段的 亦可。
- 7 10 溶血性链球菌 检测试剂盒¹,可选,参照试剂盒说明书操作。试剂盒组成及使用注意事项参见附录 。
- 7 11 塑料离心管。

8 仪器和设备

- 8 1 移液器:量程 μ ~ μ ;量程 μ ~ μ ;量程 μ ~ μ 。
- 8 2 高速台式离心机:≥ g。
- 8 3 水浴锅或加热模块: ± 和 ± 。
- 8 4 计时器。

9 检测程序

食品中溶血性链球菌 检测程序见图 。

) 由广州华峰生物科技有限公司提供,给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效产品。

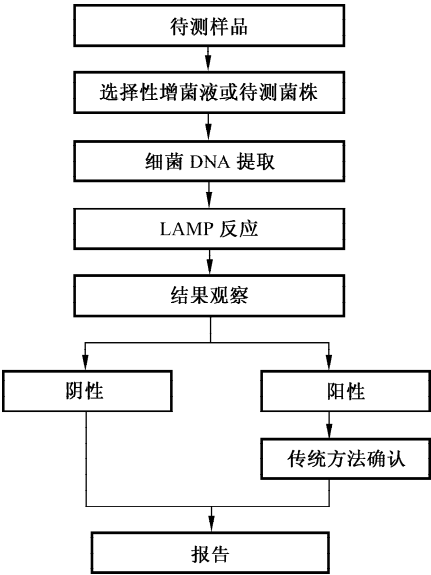


图 1 食品中溶血性链球菌 检测程序

10 操作步骤²⁾

10 1 样品制备、增菌培养

按照 / 的方法进行样品制备和增菌。

10 2 细菌模板 的制备³⁾

10 2 1 增菌液模板 的制备

- 对于 获得的增菌液,采用如下方法制备模板 :
- 直接取该增菌液 加到 无菌离心管中, g 离心 ,尽量吸弃上清液;
 - 加入 μ 提取液,混匀后沸水浴 ,置冰上 ;
 - g 离心 ,上清液即为模板 ;取上清液置 可保存 个月备用。

10 2 2 可疑菌落模板 的制备

对于 分离到的可疑菌落,可直接挑取可疑菌落,再按照)步骤制备模板 以待检测。

10 3 环介导恒温核酸扩增

10 3 1 反应体系

溶血性链球菌 反应体系见表 。

) 采用以下方法,也可使用溶血性链球菌 检测试剂盒按照说明书操作。
) 采用下述方法,也可使用等效的商品化的 提取试剂盒并按其说明提取制备模板 。

表 1 溶血性链球菌 反应体系

组 分	工作液浓度	加 样 量 μ
-----	-------	----------------

1 溶血性链球菌 基因序列(004092 1)

dv

附