

前言

本標準按照 GB/T 1.1—2009 给出的規則起草。

—本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。—

用入境檢驗檢疫局。——本標準起草單位：遼寧省入境檢驗檢疫局、山東省入境檢驗檢疫局、西藏

三、求、代、义、假、听、休、有、信。……本标在一旁部量上，故称身。曹詠妃：古即文、一秋、柳、休物、于例。

赤列加措。

食品中志贺氏菌分群检测 MPCR-DHPLC 法

1 范围

本标准规定了食品中志贺氏菌属四种菌株志贺氏菌、宋氏志贺氏菌、鲍氏志贺氏菌、痢疾志贺氏菌的分群检测方法。本标准适用于食品中志贺氏菌属四种菌株志贺氏菌、宋氏志贺氏菌、鲍氏志贺氏菌、痢疾志贺氏菌的MPCR-DHPLC快速分群检测。

2 规范性

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，仅所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 19489—2004 实验室生物安全通用要求

GB/T 27403—2011 实验室质量控制规范 食品分子生物学检验

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

3.1

PCR polymerase chain reaction
聚合酶链式反应

3.2

MPCR multiplex PCR
多重PCR

3.3

DHPLC denaturing high performance liquid chromatography
变性高效液相色谱

3.4

TEAA

二乙基胺乙酸盐。

4 生物安全措施

实验室工作人员应检测病原体，应在生物安全柜内进行，应遵守GB 19489的有关规定执行。

5 废弃物处理和防止污染的措施

- 5.1 检测过程中产生的废弃物按 GB/T 27153 规定执行。
- 5.2 检测过程中防止交叉污染的措施按 GB/T 27153 规定执行。

6 原理

核酸扩增反应是在热稳定的 DNA 聚合酶 (Taq DNA 聚合酶) 存在下, 以 DNA 模板和引物为起始, 在适当的反应条件下, 通过反复的变性、退火、延伸三个步骤, 实现 DNA 的指数级扩增。Taq DNA 聚合酶具有 5'→3' 的聚合活性, 且具有较高的热稳定性, 能够在 PCR 反应的高温条件下保持活性。Taq DNA 聚合酶在延伸过程中, 会以模板链为基准, 按照碱基配对原则 (A 与 T 配对, C 与 G 配对) 合成新的 DNA 链。随着反应的进行, 新合成的 DNA 链会与模板链形成双链, 并在下一次变性过程中分离, 从而形成指数级扩增的 DNA 产物。Taq DNA 聚合酶在延伸过程中, 还会在 DNA 链的 3' 末端添加一个 A 碱基, 形成 A 尾。A 尾的存在使得 DNA 产物更容易与荧光染料结合, 从而实现荧光检测。Taq DNA 聚合酶在延伸过程中, 还会在 DNA 链的 3' 末端添加一个 A 碱基, 形成 A 尾。A 尾的存在使得 DNA 产物更容易与荧光染料结合, 从而实现荧光检测。

7 试剂和材料

所有试剂均为分析纯, 除另有说明外, 均为国产试剂。所有试剂均需在 4℃ 保存, 使用前需经 0.22 μm 滤膜过滤。

7.1 10×PCR 缓冲液

7.1.1 10×PCR 缓冲液: 200 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8), 200 mmol/L 氯化钾, 15 mmol/L 氯化镁。

7.4 引物: 引物序列见附录 A 表 A.1。

7.5 TE 溶液。

7.6 PCR-SDS。

7.6.1 PCR-SDS: 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8), 1 mmol/L EDTA, 0.5% SDS。

7.7 10×Taq 聚合酶缓冲液: 200 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8), 200 mmol/L 氯化钾, 15 mmol/L 氯化镁。

7.9 10% CTAB。

7.10 三氯甲烷。

7.11 异戊醇。

7.12 酚。

7.13 10×Taq 聚合酶缓冲液。

7.14 10×Taq 聚合酶缓冲液: 200 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8), 200 mmol/L 氯化钾, 15 mmol/L 氯化镁。

7.15 DAPI 缓冲液: 缓冲溶液 A 为 50 mmol/L TEAA 和 250 μL 乙醇混合; 加水定容至 1 000 mL; 缓冲溶液 B 为 50 mmol/L TEAA 和 250 mL 乙醇混合, 加水定容至 1 000 mL; 缓冲溶液 C 为 75% 乙醇。

主要仪器和设备

8 主

PCR 仪。

8.1 I

DHPLC 仪。

8.2 I

8.3 高速离心机: 离心转速 18 000g。

8.4 PCR 超净工作台。

8.5 微量可调移液器和枪头。



图 1 MPCR-DHPLC 法分群检测食品中志贺氏菌流程图

[illegible]

4.2.2 DMLC 分析

[illegible]

图 3-3-1 后控对照设置

菌、痢疾志贺氏菌标准菌株, 阴性对照

11.1 结果及判断

11.11 质控标准:

产物吸收峰,且峰吸收值大于 3 mV。	11.11.1.1 阴性对照:无吸收峰出现。
视为无效。	11.11.1.2 阳性对照:出现典型的 PCR
	11.11.1.3 不符合上述对照质控标准的

判定 结果判定与报告

11.2.1 检测结果判定

1.263 bp 两个片段的产物, DHRMC 检测出该两

图例中两个片段的产物，DHPIC检测时距离为——1.2——1.2——未反应聚甲基丙烯酸MPC是可扩增产629bp和
个在扩增时出现的副峰。—————

[illegible]

两个 PCR 产物阳性吸收峰。

注: 鲍氏志贺氏菌引物与部分大肠埃希氏菌有交叉反应; DHPLC 检测大肠埃希氏菌-S88、55989、E24377A、O55、H6、O155、O59、O127、H6 等会出现 237 bp 的 PCR 单一产物吸收峰。

11.2.2.3 结果报告

工 志

11.2.2.4 对于可疑×××志贺氏菌阳性结果,应参见 GB/T 4789.5 做进一步的生化鉴定和报告。

