



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4283.6—2015

国境口岸微孔板基因芯片检测方法 第6部分:12种食源性致病菌

Test method of microplate gene chip at frontier port—
Part 6: Twelve food borne pathogenic bacteria

2015-05-26 发布

2016-01-01 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

SN/T 4283《国境口岸微孔板基因芯片检测方法》为系列标准,分为六个部分:

- 第1部分:通用技术规程;
- 第2部分:结核分枝杆菌及 katG 和 rpoB 耐药变异基因;
- 第3部分:7种呼吸道病毒;
- 第4部分:肠道病毒及肠道病毒 71 型、柯萨奇病毒 A16 型;
- 第5部分:肺炎支原体、肺炎衣原体及嗜肺军团菌;
- 第6部分:12种食源性致病菌。

本部分为 SN/T 4283 的第6部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

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:中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、深圳市检验检疫科学研究院、中华人民共和国河南出入境检验检疫局、珠海精标仪器有限公司。

本部分主要起草人:赵芳、张勤、张树平、顾大勇、刘春晓、赵纯中、何建安、史蕾、徐云庆、李永进。

国境口岸微孔板基因芯片检测方法

第6部分:12种食源性致病菌

1 范围

SN/T 4283 的本部分规定了国境口岸金黄色葡萄球菌、沙门氏菌属、大肠杆菌 O157 : H7、志贺氏菌属、单增李斯特氏菌、蜡样芽孢杆菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌、弧菌属、副溶血弧菌、霍乱弧菌、梭菌属及弯曲杆菌属共 12 种食源性致病菌的微孔板基因芯片检测方法。

本部分适用于在国境口岸实验室采用微孔板基因芯片技术对上述 12 种食源性致病菌进行检测。

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。

GB 4789.1 食品安全国家标准 食品微生物学检验 总则

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

SN/T 1543 食源性致病菌基因芯片鉴定方法

SN/T 2752.4—2011 卫生检疫人员的自我防护规范 第4部分:实验室人员

SN/T 4283.1 国境口岸微孔板基因芯片检测方法 第1部分:通用技术规程

WS 233 微生物和生物医学实验室生物安全通用准则

3 术语和定义

SN/T 4283.1 和 SN/T 1543 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

食源性致病菌 food borne pathogenic bacteria

食源性疾病中最常见的生物致病因素,感染后可引起细菌性食物中毒和感染性腹泻的一类细菌。本部分主要涉及了 12 种常见的食源性致病菌,包括金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、沙门氏菌属(*Salmonella* spp.)、大肠杆菌 O157 : H7(*Escherichia coli* O157 : H7)、志贺氏菌属(*Shigella* spp.)、单增李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*)、弧菌属(*Vibrio* spp.)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)、梭菌属(*Clostridium* spp.)及弯曲杆菌属(*Campylobacter* spp.)。

3.2

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*

也称“金葡萄”,属于葡萄球菌属(*Staphylococcus*),为革兰氏阳性球菌,显微镜下排列成葡萄串状,无芽孢、鞭毛,大多数无荚膜。其广泛存在于自然界中,由金黄色葡萄球菌肠毒素引起的食物中毒,大约占整个细菌性食物中毒的三分之一。

3.3

沙门氏菌属 *Salmonella* spp.

具有共同特征的一大属革兰氏阴性肠道杆菌,菌体大小约 $(0.7\ \mu\text{m}\sim 1.5\ \mu\text{m})\times(2.0\ \mu\text{m}\sim 5.0\ \mu\text{m})$,周生鞭毛,兼性厌氧。

3.4

大肠杆菌 O157 : H7 *Escherichia coli* O157 : H7

一种肠道出血性大肠杆菌,食物中毒的主要原因之一。属于肠杆菌科埃希氏菌属,革兰氏阴性,无芽孢,有鞭毛。可产生大量的 Vero 毒素(VT),也称作大肠埃希菌志贺样毒素(Shiga toxin),按免疫原性的不同可分为 Stx I, Stx II, 是其主要致病因子。

3.5

志贺氏菌属 *Shigella* spp.

一类革兰氏阴性直杆菌,菌体大小约为 $(0.5\ \mu\text{m}\sim 0.7\ \mu\text{m})\times(2.0\ \mu\text{m}\sim 3.0\ \mu\text{m})$,无芽孢,无荚膜,无鞭毛,有的菌株有菌毛。是人和灵长类的肠道致病菌,引起细菌性痢疾。

3.6

单增李斯特氏菌 *Listeria monocytogenes*

革兰氏阳性短杆菌,大小约为 $0.5\ \mu\text{m}\times(1.0\ \mu\text{m}\sim 2.0\ \mu\text{m})$,直或稍弯,两端钝圆,常呈 V 字型排列,偶有球状、双球状,兼性厌氧、无芽孢。广泛存在于自然界中,能引起严重食物中毒,主要表现为败血症、脑膜炎和单核细胞增多。

3.7

蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus*

又称仙人掌杆菌,革兰氏阳性、 β 溶血性的杆状细菌。菌体细胞杆状,末端方,成短或长链,大小约为 $(1.0\ \mu\text{m}\sim 1.2\ \mu\text{m})\times(3.0\ \mu\text{m}\sim 5.0\ \mu\text{m})$,产芽孢。广泛存在于自然与食物中,在夏秋季极易引发食物中毒,主要症状为腹痛、呕吐腹泻。

3.8

小肠结肠炎耶尔森氏菌 *Yersinia enterocolitica*

属肠杆菌科,为革兰阴性、卵圆形粗短杆菌,可产生耐热肠毒素。冬春发病较多见,主要是通过污染的饮水和食品经消化道传播,临床表现以急性胃肠炎、小肠结肠炎和败血症等类型为主。

3.9

弧菌属 *Vibrio* spp.

革兰氏阴性菌,形状短小,约 $0.5\ \mu\text{m}\times(1.0\ \mu\text{m}\sim 5.0\ \mu\text{m})$,因弯曲如弧而得名。普遍存在于海洋、河口与水生生物体,人常因进食未煮熟的污染本菌的海产品或盐渍食物(蔬菜、肉类、蛋等)而受感染。

3.10

副溶血弧菌 *Vibrio parahaemolyticus*

又称嗜盐菌,属于弧菌属。该菌嗜盐畏酸,在无盐培养基上,不能生长,3%~6%食盐水繁殖迅速。对人和动物均有较强的毒力,临床上以急性起病、腹痛、呕吐、腹泻及水样便为主要症状。

3.11

霍乱弧菌 *Vibrio cholera*

属于弧菌属,为需氧菌,营养要求不高,在 pH 8.8~pH 9.0 的碱性蛋白胨水或平板中生长良好。共分为 139 个血清群,其中 O1 群和 O139 群可引起霍乱,主要表现为剧烈的呕吐、腹泻、失水,死亡率甚高,属于国际检疫传染病,为我国的甲类法定传染病。

3.12

梭菌属 *Clostridium* spp.

革兰氏阳性大杆菌,又称梭状芽孢杆菌属或厌氧芽孢杆菌属。菌体呈梭状,常排列成对或短链,圆

的或渐尖的末端。广泛分布在环境中,许多种可产生外毒素,如肉毒梭菌分泌的肉毒素,其毒力强,误食后严重时可导致呼吸困难和心力衰竭而死亡。

3.13

弯曲杆菌属 *Campylobacter* spp.

主要为螺旋形、S形或弧形以及杆状细菌。革兰氏阴性,菌体大小($0.2\ \mu\text{m}\sim 0.5\ \mu\text{m}$) \times ($1.5\ \mu\text{m}\sim 5\ \mu\text{m}$),较长的可有4个~5个弯曲。共有17个菌种和6个亚种,在人类疾病中最常发生的为空肠弯曲菌(空肠亚种)和大肠弯曲菌,常见临床症状包括腹泻(经常伴有便血)、腹痛、发热、头痛、恶心和/或呕吐。

4 缩略语

SN/T 4283.1 界定的以及下列缩略语适用于本文件。

Stx:大肠埃希菌志贺样毒素(shiga toxin)

5 生物安全防护要求

5.1 实验室应遵循 GB 19489 和 WS 233 对应的生物安全要求。

5.2 实验人员的防护遵循 SN/T 2752.4—2011 的要求。

6 主要设备和试剂

6.1 主要设备:基因芯片点样仪、芯片杂交仪、芯片清洗显色仪、生物芯片全自动扫描判读仪、PCR 仪、生物安全柜、离心机、移液器、恒温水浴锅等。

6.2 主要试剂:食源性致病菌微孔板基因芯片检测试剂盒或自行设置的食源性致病菌微孔板基因芯片检测试剂(相关引物及探针序列参见附录 A)。

7 检测流程

7.1 样品核酸的提取

可以直接从样品中提取基因组 DNA,提取方法参照 SN/T 4283.1,也可依照 GB 4789.1 以及 SN/T 1543 方法对样品进行增菌培养后,提取基因组 DNA。

7.2 PCR 扩增反应

7.2.1 可使用试剂盒附带的试剂按说明书要求配置 PCR 反应体系,或自行配置 $25\ \mu\text{L}$ PCR 反应体系: $10\times$ PCR 缓冲液 $2.5\ \mu\text{L}$, dNTPs(各 $5\ \mu\text{mol/L}$) $2\ \mu\text{L}$, MgCl_2 ($25\ \text{mmol/L}$) $2\ \mu\text{L}$, 所有上下游引物(含 PCR 阳性对照)(各 $5\ \mu\text{mol/L}$)混合液 $2\ \mu\text{L}$, *Taq* DNA 聚合酶 $0.25\ \mu\text{L}$, 模板核酸 $5\ \mu\text{L}$ (含阳性对照核酸 $1\ \mu\text{L}$, 主要为细菌基因组 DNA), ddH_2O $11.25\ \mu\text{L}$;振荡混匀,并轻微离心。

7.2.2 将上述 PCR 反应管放入 PCR 仪,设定 PCR 反应程序:首先 $95\ ^\circ\text{C}$ 变性 $5\ \text{min}$;然后 $95\ ^\circ\text{C}$ 变性 $30\ \text{s}$, $56\ ^\circ\text{C}$ 退火 $30\ \text{s}$, $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 $30\ \text{s}$, 35 个循环;最后 $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 $7\ \text{min}$, $4\ ^\circ\text{C}$ 保存备用;若需长期使用请置于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 保存。

7.3 微孔板基因芯片杂交反应

7.3.1 开启芯片杂交仪,并设置芯片杂交仪预加热至 $45\ ^\circ\text{C}$ 。

SN/T 4283.6—2015

7.3.2 按试验要求准备所需的微孔板基因芯片,并准确、清晰标记。将杂交反应液平衡至室温,轻轻摇动混合均匀后,分别取 100 μL 加入微孔板各检测孔中;在桌面轻轻平行晃动微孔板,使各孔中的杂交反应液均匀覆盖于芯片检测表面并且无气泡产生,如有气泡可以用洁净的细针或加样枪头去除。

7.3.3 取样品 PCR 产物 10 μL 于 PCR 仪中 95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min,待 PCR 仪降温至 4 $^{\circ}\text{C}$ 后取出并立即置于冰上备用。

7.3.4 取上述已变性处理的 PCR 产物 10 μL 加入芯片的对应检测孔中,贴上杂交反应盘胶膜,置于芯片杂交仪中 45 $^{\circ}\text{C}$,振荡反应 1 h。

7.4 微孔板基因芯片显色反应

7.4.1 杂交反应结束后,取出微孔板芯片将微孔内的液体用力甩出倒空,每孔加入洗涤液 200 μL ,在桌面轻轻平行晃动微孔板 20 s(以反应孔内液体不溢出为限),然后用力甩干反应孔中液体,重复上述动作 2 遍,最后一次在液体倒掉后将芯片置于擦手纸上轻拍数次,以去除残留液体。

7.4.2 于各反应孔中加入 100 μL 显色检测液,室温静置反应 20 min 后,用力甩干反应孔中液体。然后加入 200 μL 洗涤液,静置 1 min,甩干孔中液体,重复上述动作 2 遍,最后一次在液体倒掉后将芯片置于擦手纸上轻拍数次,以去除残留液体。

7.4.3 于各反应孔中加入 100 μL 显色液,室温避光反应 8 min 后,用力甩干孔中液体。ddH₂O 冲洗芯片内部,于擦手纸上轻拍数次,以去除残留之液体,置于 50 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱或室温干燥。

注:配置芯片清洗显色仪的可使用仪器自带程序,按照操作说明书实施 7.4 的步骤和流程。

7.5 微孔板基因芯片结果检测

将显色反应后的芯片放入生物芯片全自动扫描判读仪内,扫描获得杂交结果图。运行设定的图像分析软件,选择食源性微生物芯片结果分析程序,依据芯片探针设置模式(参见附录 B),对扫描获得的杂交结果进行自动化的数据分析判定,获得检测结果。

8 结果报告

检测结果可报告为“微孔板基因芯片检测方法:×××,×××(如有,应列出全部阳性检测目标)为阳性;×××,×××(如有,列出全部阴性检测目标)为阴性”。

9 阳性结果的处置

9.1 检测结果为阳性的样品应做进一步确诊。

9.2 确诊为阳性结果后应按规定和程序向相应部门报告。

附 录 A
(资料性附录)

食源性致病菌微孔板基因芯片检测相关的引物及探针

食源性致病菌微孔板基因芯片检测相关的引物及探针如表 A.1 所示。

表 A.1 食源性致病菌微孔板基因芯片检测相关的引物及探针

目标名称	引物及探针序列
金黄色葡萄球菌	F:AATTGATTGTTTTATAAGGT
	R:TAATGGGGATATCATTTT
	P:GTACGTTAGATAACTGTGCG
沙门氏菌属	F:TGGATTAATGCCAAAGGAAA
	R:CTAAAACCAGCAAAGGCGA
	P:ACAATACTCCGGCAGGCGCACGCCATAAT
大肠杆菌 O157 : H7	F:GGGATTTTCGTACAACACTTGATG
	R:ACAATTCAGTATTAATGCCACG
	P(Stx I):TTTCAGAGGGGATTTTCGTACA
	P(Stx II):TAATGGAGTTCAGTGGTAAT
志贺氏菌属	F:TCAACCAGTAATGAACAT
	R:ATTAATCCTGTAACCTGAAT
	P:CAGGCTTTCTGTGATACCAGAA
单增李斯特氏菌	F:AAACTTGGAGCTAACCAAAATAAG
	R:GAGATTTTTCAGGTTAG
	P:TTAATGAAAATCAGCTGGAA
蜡样芽孢杆菌	F:TATGGTCGTAAAAATAGCATT
	R:CACTAATTGCTGGATCTTTCGAAGAGC
	P:TCGTGAAGGTTTAACAGCAATTGTATCAATCAAGCA
小肠结肠炎耶尔森氏菌	F:ATAAAAAGGCACTAAAAGCCTATGCGC
	R:TCCCAGGAACCATTACGCGGAA
	P:TTGGCTGCTGATGTACTGGG
弧菌属	F:AACTCAAATGAATTGAC
	R:GGCCCGGAACGTATTC
	P:GCATACAGAGGGCGGCC
副溶血弧菌	F:AACCAAACCTATACCTATGTTTCG
	R:GGCAATGTATTCTGTCCACACAAA
	P:TAAAAACATGTTCTACACCAACA

SN/T 4283.6—2015

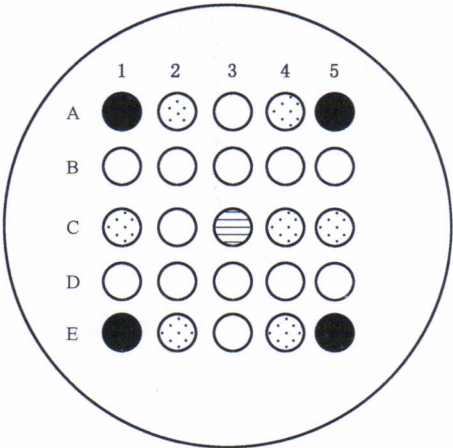
表 A.1 (续)

目标名称	引物及探针序列
霍乱弧菌	F:TGGAGAGAAAAACACTCACTGTGG
	R:AATGGCTGGTTTGGGTTC
	P:GTGCGGAATCGGCACTGGCGGCAG
梭菌属	F:AACTCAAATGAATTGAC
	R:GGCCCGGGAACGTATTC
	P:CTTGCATAGCCTAGAGATA
弯曲杆菌属	F:AACTCAAATGAATTGAC
	R:GGCCCGGGAACGTATTC
	P:CACGTATTTAGTTGCTAA
PCR 阳性对照(16S rRNA)	F:AAAACACTCAAATGAATTGACGG
	R:GTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGT
	P:GTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATG
杂交阳性对照	P:ATGAAGCAYGTCAGGGCCTGGATACCTCG
阴性对照	P:TCCTCCAATTTGTCCGGTTATCGCT
<p>注 1: F 表示上游引物, R 表示下游引物, P 表示探针。</p> <p>注 2: 引物 5' 端生物素修饰。</p> <p>注 3: 探针 5' 端 20 个 poly(T) 的修饰。</p> <p>注 4: 序列中 R 代表 A/G, Y 代表 C/T。</p> <p>注 5: 杂交阳性探针的配对杂交片段为 5' 端生物素修饰的 CGAGGTATCCAYGCCCTGACRTGCTTCAT。</p>	

附录 B
(资料性附录)

食源性致病菌微孔板基因芯片检测探针设置模式

食源性致病菌微孔板基因芯片检测探针设置模式如图 B.1 所示。



注：A1,A5,E1,E5:杂交阳性对照探针点；A2,A4,C1,C4,C5,E2,E4:阴性对照探针点；A3:梭菌属 B1:金黄色葡萄球菌；B2:沙门氏菌属；B3:大肠杆菌 O157 : H7 StxI ；B4:大肠杆菌 O157 : H7 Stx II ；B5:志贺氏菌属；C2:弧菌属；C3:PCR 阳性对照探针点；D1:单增李斯特氏菌；D2:蜡样芽孢杆菌；D3:小肠结肠炎耶尔森氏菌；D4:副溶血弧菌；D5:霍乱弧菌；E3:弯曲杆菌属。

图 B.1 食源性致病菌微孔板基因芯片检测探针设置模式图