



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 5361—2021

出口食品中阪崎克罗诺杆菌检测方法 *fusA* 基因测序法

Detection of *Cronobacter sakazakii* in export food *fusA* gene sequencing method

2021-11-22 发布

2022-06-01 实施

中华人民共和国海关总署 发布

以正式出版文本为准

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
出口食品中阪崎克罗诺杆菌检测方法
fusA 基因测序法
SN/T 5361—2021

*

中国海关出版社有限公司出版发行
北京市朝阳区东四环南路甲 1 号(100023)
编辑部:(010)65194242-7509
网址 www.customskb.com/book
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.5 字数 15 千字
2022 年 6 月第一版 2022 年 6 月第一次印刷
印数 1—500

*

书号: 155175 • 730 定价 8.00 元

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由中华人民共和国海关总署提出并归口。

本文件起草单位：中国海关科学技术研究中心。

本文件主要起草人：汪琦、曾静、徐蕾蕊、付溥博、赵晓娟、李丹、马丹、魏海燕、王紫薇、张西萌。

正式出版文本为准
行业标准信息服务平台

出口食品中阪崎克罗诺杆菌检测方法

fusA 基因测序法

1 范围

本文件规定了出口食品中阪崎克罗诺杆菌的检测方法。

本文件适用于出口食品中阪崎克罗诺杆菌(*Cronobacter sakazakii*)的检测。

本文件也适用于出口食品中克罗诺杆菌属其他六个种,分别为丙二酸盐阳性克罗诺杆菌(*Cronobacter malonaticus*)、苏黎世克罗诺杆菌(*Cronobacter turicensis*)、穆汀斯克罗诺杆菌(*Cronobacter muytjensii*)、都柏林克罗诺杆菌(*Cronobacter dublinensis*)、尤尼沃斯科罗诺杆菌(*Cronobacter universalis*)和康帝蒙提克罗诺杆菌(*Cronobacter condimenti*)的检测。

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 4789.40 食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)检验

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室生物安全通用要求

GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 管家基因 house-keeping gene

其是所有细胞中均要表达的一类基因,其产物是对维持细胞基本生命活动所必需的,其基因序列高度保守并且在大多数情况下持续表达。其又称看家基因,持家基因。

3.2 Taq DNA 酶 *Thermus aquaticus* DNA polymerase

其是从 *Thermus aquaticus* 细菌中提取的耐热 DNA 聚合酶。

3.3 多位点序列分型 multilocus sequence typing

其是一种基于核酸序列测定的细菌分型方法。这种方法通过 PCR 扩增多个管家基因内部片段并测定其序列以分析菌株的差异。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BHI:脑心浸出液肉汤(brain heart infusion broth);

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid);

dNTP:脱氧核糖核苷三磷酸(deoxy-ribonucleoside triphosphate);

EDTA:乙二胺四乙酸(ethylene diaminetetraacetic acid);

fusA: 延长因子 G 基因(elongation factor G);
GTP: 三磷酸鸟苷(guanosine triphosphate);
MLST: 多位点序列分型(multilocus sequence typing);
PCR: 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction)。

5 原理

fusA 基因是细菌延长因子的编码基因。在克罗诺杆菌属细菌中负责编码延长因子 G, 该因子在翻译延长过程中催化 GTP 依赖的核糖体的转运。*fusA* 基因是克罗诺杆菌属 MLST 分型使用的七个管家基因之一, 其基因的序列对克罗诺杆菌属的分类效果好, 相同的 *fusA* 基因序列基本不会同时存在于两种克罗诺杆菌中。因此, 可利用该基因片段的序列信息区分克罗诺杆菌属的不同种。

6 试剂和材料

除有特殊说明外, 所有实验用试剂均为分析纯或生化试剂。实验用水符合 GB/T 6682 中一级水的要求。所有试剂均用无 DNA 酶污染的容器分装。

- 6.1 Ex *Taq* DNA 聚合酶。
- 6.2 dNTP: dATP、dTTP、dCTP、dGTP。
- 6.3 DNA 提取试剂: DNA 提取试剂盒。
- 6.4 10×Ex *Taq* 缓冲液。
- 6.5 MgCl₂ 溶液(25 mmol/L)。
- 6.6 TE 缓冲液: 10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 1 mmol/L EDTA(pH 8.0)。
- 6.7 琼脂糖。
- 6.8 50×TAE 缓冲液: 2 mol/L Tris-HCl(pH 8.4), 1 mol/L 乙酸, 0.1 mol/L EDTA。
- 6.9 DNA 分子量标记物(100 bp~2 000 bp)。
- 6.10 参考菌株: 阪崎克罗诺杆菌 ATCC 29544。

7 仪器和设备

- 7.1 PCR 扩增仪。
- 7.2 电泳仪。
- 7.3 凝胶成像系统。
- 7.4 离心机: 离心力不小于 12 000 g。
- 7.5 恒温培养箱: 36 °C±1 °C。
- 7.6 恒温水浴锅: 44 °C±0.5 °C。
- 7.7 微量移液器和无菌吸头: 10 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL。
- 7.8 天平: 感量为 0.1 g。
- 7.9 灭菌三角烧瓶: 500 mL、250 mL。
- 7.10 灭菌平皿: 90 mm×15 mm。
- 7.11 无菌离心管: 1.5 mL、200 μL。

8 检测步骤

8.1 样品制备、增菌培养和分离

样品的制备、增菌培养和分离步骤参照 GB 4789.40 的方法进行。

8.2 模板 DNA 的制备

取分离菌株 BHI 液体培养物适量, 加到 1.5 mL 无菌离心管中, 13 000 r/min 离心 5 min, 吸弃上清, 加 50 μ L TE 缓冲液, 混匀后沸水浴 10 min, 13 000 r/min 离心 5 min, 上清液用于后续实验。也可使用商业化的 DNA 提取试剂盒, 并按其说明制备模板 DNA。

8.3 PCR 反应体系

8.3.1 PCR 扩增和测序引物序列

扩增正向引物: 5'-GAA ACC GTA TGG CGT CAG-3';
扩增反向引物: 5'-AGA ACC GAA GTG CAG ACG-3';
测序正向引物: 5'-GCT GGA TGC GGT AAT TGA-3';
测序反向引物: 5'-CCC ATA CCA GCG ATG ATG-3'。

8.3.2 PCR 反应体系

见表 1。

表 1 PCR 反应体系

试剂	贮备液浓度	加样体积/ μ L	终浓度
双蒸水	—	补至 50 μ L	—
10 \times PCR 缓冲液	—	5.0	1 \times
MgCl ₂	25 mmol/L	3.0	1.5 mmol/L
dNTP	2.5 mmol/L each	4.0	0.2 mmol/L each
上游引物	10 pmol/ μ L	2.0	0.4 pmol/ μ L
下游引物	10 pmol/ μ L	2.0	0.4 pmol/ μ L
Taq 酶	5 U/ μ L	0.5	0.05 U/ μ L
模板 DNA	—	2.0	—
注: 反应体系中各试剂的量可根据具体情况或不同的反应总体积进行适当调整。			

8.3.3 反应条件

96 $^{\circ}$ C 预变性 1 min; 96 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 58 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min; 4 $^{\circ}$ C 保存反应产物。

注: PCR 反应参数也可根据基因扩增仪型号的不同进行适当的调整。

检测过程中分别设阳性对照、空白对照。阳性对照为阪崎克罗诺杆菌参考菌株 ATCC 29544 的基因组 DNA, 空白对照为无菌水。