

# 中华人民共和国国家标准

GB/TXXXXX—201X

## 动物和动物产品沙门氏菌检测方法

Detection methods for *Salmonellain* animal and animal products

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

国家市场监督管理总局  
国家标准化管理委员会 发布

## 前 言

本标准按照GB/T1.1—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。

本文件代替NY/T 550—2002《动物和动物产品沙门氏菌检测方法》，与NY/T 550-2002相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

——增加了缩略语（见第4章）；

——增加了生物安全要求（见第7章）；

——增加了附录（见附录A、B、C）

——增加了不同类型动物和动物产品相关样品的采集、保存、运输、处理方法，以及沙门氏菌的PCR鉴定方法（见第9章）。

——增加了沙门氏菌的实时荧光定量PCR定量检测方法（见第10章）。

——删除了采样及制备检样（见2002年版的3.3）；

——修改了设备和材料（见第5章，2002年版的3.1）；

——修改了培养基与试剂（见第6章，2002年版的3.2）；

——修改了检测程序（见第8章，2002年版的3.4）；

——修改了操作步骤（见第9章，2002年版的3.5）；

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。

本文件由中华人民共和国农业农村部提出。

本文件由全国动物卫生标准化技术委员会（SAC/TC181）归口。

本文件起草单位：扬州大学、华中农业大学。

本文件主要起草人：焦新安、潘志明、孟闯、栗绍文、耿士忠、胡茂志、康喜龙、田禹齐、刘博闻、顾丹、许辰、李求春、黄金林。

本文件所代替文件的历次版本发布情况为：

——NY/T 550-2002。

# 动物和动物产品沙门氏菌检测方法

## 1 范围

本文件规定了动物和动物产品中沙门氏菌 (*Salmonella*) 的检验程序、样品采集、样品处理、细菌分离、细菌 PCR 检测以及实时荧光定量 PCR 检测方法。

本文件适用于动物和动物产品中沙门氏菌的检测。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款,其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改版)适用本文件。

GB 4789.4 食品安全国家标准食品微生物学检验沙门氏菌检验。

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

NY/T1948 兽医实验室生物安全要求通则。

## 3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

4.1 BPW: 缓冲蛋白胨水 (Buffered Peptone Water)

4.2 CFU: 菌落形成单位 (Colony-Forming Unit)

4.3 DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid)

4.4 EDTA: 乙二胺四乙酸 (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid)

4.5 MSR/V: 改良半固体 RV 培养基 (Modified Semi-Solid Rappaport-Vassiliadis Medium Base)

4.6 PCR: 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction)

4.7 RT-qPCR: 实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR)

4.8 r/min: 转/分钟 (Revolutions Per Minute)

4.9 RV R10: 沙门氏菌选择性增菌液体培养基 (Rappaport-Vassiliadis R10 Broth)

4.10 TAE: 三羟甲基氨基甲烷-乙酸-乙二胺四乙酸 (Tris-Acetic Acid-Ethylenediaminetetraacetic Acid)

4.11 XLT4: 木糖-赖氨酸-硫酸四癸钠琼脂 (Xylose Lysine Tergitol 4 Agar Base)

## 5 培养基与试剂

除非另有说明, 本方法所用试剂均为分析纯, 水为GB/T 6682规定的二级水。

5.1 BPW: 见附录 A.1。

5.2 RV R10: 见附录 A.2。

5.3 MSRV: 见附录 A.3。

5.4 XLT4: 见附录 A.4。

5.5 1.2%琼脂糖凝胶: 见附录 A.5。

5.6 PCR Master Mix。

5.7 PCR Master Mix (Premix Ex Taq™)。

5.8 沙门氏菌诊断血清。

5.9 生化鉴定试剂盒。

## 6 主要设备和耗材

6.1 冰箱 (冷藏温度为 2℃~8℃)。

6.2 恒温培养箱 (37℃±1℃、42℃±1℃)。

6.3 高压灭菌锅 (121℃、103 kPa)。

6.4 恒温摇床 (180 r/min、37℃±1℃)。

6.5 无菌采样袋 (120 mm×180mm、450mm×550mm)。

6.6 无菌培养皿 (直径 90mm)。

6.7 无菌接种环 (1 μL)。

6.8 无菌棉签 (10 cm)。

6.9 均质器。

6.10 无菌均质袋、无菌均质杯。

6.11 电子天平 (感量 0.1 g)。

6.12 过滤装置及滤膜 (0.22 μm)。

- 6.13 微量移液器（200  $\mu\text{L}$ 、1000  $\mu\text{L}$ ）。
- 6.14 离心机（最高转速 $\geq 12\,000\text{ r/min}$ ）。
- 6.15 离心管（1.5 mL，10 mL）。
- 6.16 干式恒温金属浴。
- 6.17 普通 PCR 扩增仪。
- 6.18 荧光定量 PCR 扩增仪。
- 6.19 PCR 管（100  $\mu\text{L}$ ）。
- 6.20 细菌 DNA 提取试剂盒。
- 6.21 凝胶成像仪。
- 6.22 生物安全柜。

## 7 生物安全要求

采样、样品处理及检测过程所涉及的实验操作，应遵守NY/T1948-2010的有关规定。

## 8 检测程序

沙门氏菌检测程序见图1。

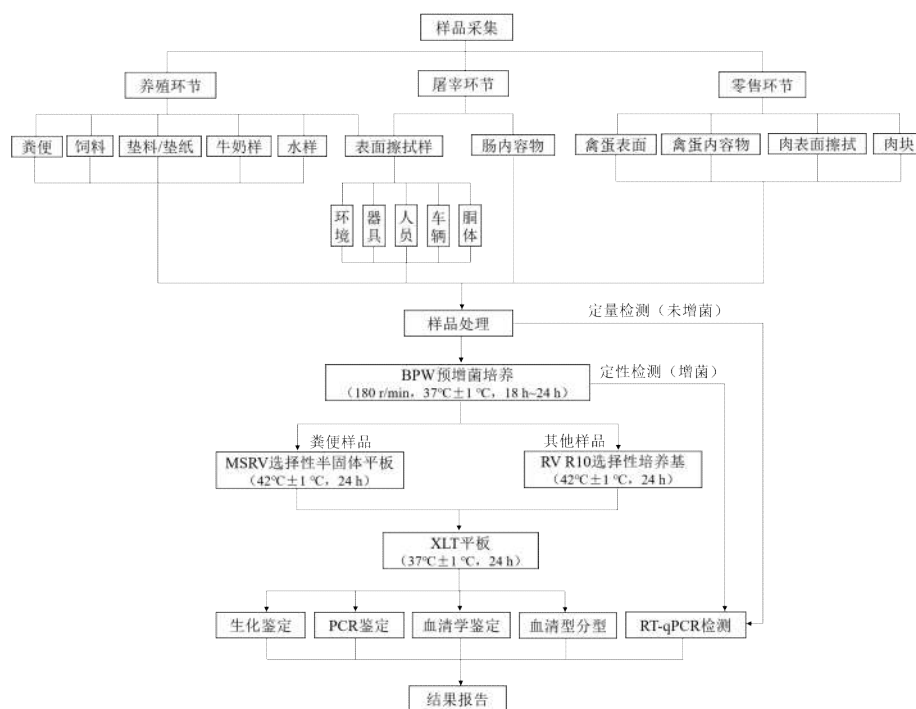


图1沙门氏菌检测程序

## 9 样品采集和检测过程

### 9.1 样品采集

#### 9.1.1 动物粪便样品

用一次性无菌取样勺子采集新鲜粪便约 25 g，置于无菌采样袋内密封保存并做好标记。每采集 1 份样品需更换手套。

#### 9.1.2 饲料样品

对各种类别的饲料分别进行采集。使用一次性无菌取样勺子随机分散采集饲料，每份约 25 g，置于无菌采样袋内密封保存并做好标记。

#### 9.1.3 养殖垫料样品

分别采集不同栏、圈中的垫料。使用一次性无菌取样勺子随机分散采集垫料，每份约25 g，置于无菌采样袋内密封并做好标记。

#### 9.1.4 养殖垫纸样品

佩戴一次性手套，将每份垫纸折叠好后分别置于无菌采样袋内密封保存并做好标记。每采集1份样品需更换手套。

#### 9.1.5 养殖器具擦拭样品

分别使用3~4个无菌BPW浸泡过的棉球擦拭围栏、水槽、料槽等舍内器具，其中围栏反复擦拭不少于4次，水槽和料槽等根据现场实际擦拭槽体外立面和槽内四周等。将不同养殖器具的擦拭样分类置于无菌采样袋内密封保存并做好标记。

#### 9.1.6 动物胴体擦拭样品

依照屠宰环节/生产流程，用无菌BPW浸润的棉球在动物体表尽可能多的不同部位擦拭50cm<sup>2</sup>~100 cm<sup>2</sup>（视动物体型而定），然后将棉球置于无菌采样袋内密封保存并做好标记。

#### 9.1.7 肠内容物样品

用无菌棉签收集约5 g小肠内容物，折断手柄后将棉签头部置于无菌采样袋内密封保存并做好标记。

#### 9.1.8 直肠或泄殖腔拭子样品

将无菌棉签伸入家畜直肠内或家禽泄殖腔内3cm~5 cm，棉签靠近肠壁侧擦拭，旋转不少于3次，取出棉签折断手柄后将棉签头部置于无菌采样袋内密封保存并做好标记。成本条件允许时，也可放置于含有运送培养基的采样管中保存和运输。

#### 9.1.9 屠宰器具擦拭样品

分别使用3~4个无菌BPW浸泡过的棉球擦拭屠宰台、水池、传送带、刀具等器具，擦拭面积50cm<sup>2</sup>~100 cm<sup>2</sup>（刀具等小面积器具可擦拭整个表面）。将不同器具的擦拭样分类置于无菌采样袋内密封保存并做好标记。

#### 9.1.10 禽蛋表面擦拭样品

用无菌BPM浸泡过的棉签小心擦拭整个禽蛋表面，折断手柄后将棉签头部置于无菌采样袋内密封保存并做好标记。

#### 9.1.11 禽蛋内容物样品

将禽蛋置于75%酒精浸泡1 min对蛋壳外表面进行消毒，静置待干后使用无菌镊子等敲破蛋壳，将蛋清和蛋黄内容物转移至无菌采样袋中，反复拍打均匀，加入约200 mL BPW后密封保存并做好标记。

#### 9.1.12 生肉样品

随机采集生肉块样品，每份约100 g，放入无菌采样袋密封并做好标记。

#### 9.1.13 生肉表面擦拭样品

用无菌棉签转动擦拭生肉样品的表面（面积不少于100 cm<sup>2</sup>），折断手柄后将棉签头部置于无菌采样袋内密封保存并做好标记。

#### 9.1.14 水样

使用500 mL无菌试剂瓶或采样袋采集河流或井水等水源地水样、舍内储水容器或水线末端水样或屠宰过程污水样等，一般每个样品采集250 mL~500 mL，密封保存并做好标记。

#### 9.1.15 牛奶样品

使用50 mL无菌离心管接取牛奶样品，一般每个样品采集50 mL，密封保存并做好标记。

#### 9.1.16 环境擦拭样品

包括地面、墙壁的样品，使用3~4个无菌BPW浸润的棉球反复擦拭约1 m<sup>2</sup>的区域3~4次，置于无菌采样袋内密封保存并做好标记。

#### 9.1.17 人员擦拭样品

使用3~4个无菌BPW浸泡过的棉球分别反复擦拭工作人员双手的手心和指缝以及鞋靴底部等部位3~4次，置于无菌采样袋内密封保存并做好标记。

#### 9.1.18 车辆擦拭样品

使用3~4个无菌BPW浸泡过的棉球分别反复擦拭动物/动物产品运输车辆车厢内侧和底部3~4次，擦拭面积约1 m<sup>2</sup>，置于无菌采样袋内密封保存并做好标记。

### 9.2 样品运输和临时存放

样品应避光存放于含有预冷冰袋的保温箱中，确保运输过程中的温度在4℃左右，样品应在采集后24 h内及时进行处理。如果采样与样品处理的间隔时间超过24 h，样品应在4℃±2℃中低温保存，并在24 h（最长不超过48 h）内进行处理。

### 9.3 样品处理及增菌

#### 9.3.1 擦拭样品处理

向无菌采样袋中加入无菌BPW至液体充分浸没采样棉球或棉签，一般40 mL左右，将采样袋密封后置于恒温摇床中，37℃±1℃，180 r/min条件下培养18 h~24 h。

### 9.3.2 垫纸样品处理

使用3~4个无菌BPW浸泡过的棉球于9.1.4采集的垫纸四角和中心区域进行充分擦拭后，放入采样袋密封，加入约40 mL无菌BPW至液体充分浸没棉球，将采样袋置于恒温摇床中， $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，180 r/min条件下培养18 h~24 h。

### 9.3.3 肉块样品处理

在无菌条件下，将肉块样品称重后取25 g作为样品，置于无菌均质杯（已按1:9质量体积比的量加入无菌BPW）中进行均质，8000r/min~10000r/min均质1min~2min，将均质杯密封后置于恒温摇床中，或者用无菌剪刀将肉块剪碎至5 mm左右大小，置于无菌采样袋中按1:9质量体积比的量加入无菌BPW，反复揉搓或使用拍击式均质器拍击肉表面1 min，将均质杯或采样袋密封后置于恒温摇床中， $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，180 r/min条件下培养18 h~24 h。

### 9.3.4 水和牛奶等液体样品处理

如样品杂质较多，可先用普通双层滤纸或纱布预过滤处理，然后用0.22  $\mu\text{m}$ 滤膜过滤进行富集，并将富集后的滤膜置于无菌采样袋后加入10 mL无菌BPW，密封后置于恒温摇床中， $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，180 r/min条件下培养18 h~24 h。

### 9.3.5 可称重样品的处理

对粪便、饲料、垫料等样品进行称重，置于无菌采样袋中按1:9质量体积比的量加入无菌BPW，轻轻拍打或揉搓，使样品与BPW充分混合，将采样袋密封后置于恒温摇床中， $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，180 r/min条件下培养18 h~24 h。

## 9.4 沙门氏菌的分离

### 9.4.1 粪便样品

对于粪便样品，BPW增菌培养后，吸取300  $\mu\text{L}$ 增菌液，加至MSRV半固体改良培养基平板（含终浓度10 mg/L的新生霉素）， $42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 条件下静置培养24 h；挑取培养板上生长的细菌，分区划线接种至XLT4琼脂培养基， $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养24 h。

### 9.4.2 其他样品

吸取1 mL增菌液，加入9 mL RV R10肉汤中， $42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 条件下培养24 h。培养后用接种环蘸取培养液，分区划线接种至XLT4琼脂培养基， $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养24 h。

### 9.4.3 可疑菌落特征

在XLT4平板上，鸡白痢沙门氏菌/鸡伤寒沙门氏菌形成针尖般细小透明、光滑湿润、边缘整齐的菌落，其他沙门氏菌多呈黑色透明晕环的细小菌落，如图A.1所示。

## 9.5 沙门氏菌的生化鉴定

沙门氏菌的生化鉴定按GB4789.4-2024中5.4项的实验方法进行操作。

## 9.6 沙门氏菌的PCR鉴定

### 9.6.1 PCR扩增模板制备



吸取样品经 BPW 增菌培养后的液体 1 mL, 12000 r/min 离心 5 min, 用移液枪缓慢吸掉上清液 (尽量减少吸取菌体沉淀), 加入 1 mL 无菌去离子水洗涤 1 次, 用无菌去离子水重悬沉淀至 200  $\mu$ L; 或者挑选 XLT4 平板疑似沙门氏菌菌落 (建议每个样本至少同时选择 3 个以上菌落) 重悬至 200  $\mu$ L 无菌去离子水中; 煮沸法 (沸水浴 10 min, 12000 r/min 离心 5 min, 吸取上清) 提取其基因组 DNA 作为 PCR 模板; 或使用商品化基因组提取试剂盒提取其基因组 DNA 作为 PCR 模板。

### 9.6.2 PCR 扩增体系

以 *stn* 基因作为目的基因片段, 引物序列见附录表 B.1, 按照 B.2 制备 PCR 反应体系。在基因扩增仪设置 PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 反应结束后立即电泳, 或将扩增产物置于 4 $^{\circ}$ C 保存。

### 9.6.3 实验对照

同法采用商品化基因组提取试剂盒或煮沸法制备已鉴定的沙门氏菌的基因组 DNA 作为阳性对照样品的模板, 其他细菌 (建议使用大肠杆菌) 的基因组 DNA 作为阴性对照样品的模板, 以灭菌去离子水作为空白对照样品的模板。

### 9.6.4 PCR 产物检测

按照附录 A.5 和 A.6 制备 1.2% 琼脂糖凝胶, 取 10  $\mu$ L 的 PCR 产物加样, 130V 左右电压电泳 45min 左右, 在凝胶成像仪中观察结果并拍照。

### 9.6.5 质量控制

如阳性对照出现相应大小的目的条带同时阴性对照和空白对照均未扩增出相应大小的片段, 则 PCR 反应判定为有效; 如阳性对照未扩增出相应大小的片段, 或者阴性对照和空白对照任一扩增出相应大小的片段, 则反应无效。

### 9.6.6 结果判定

在阳性对照、阴性对照和空白对照结果正确的情况下, 如样品出现 260 bp 扩增产物条带, 则判定样品为阳性; 如样品未出现相应大小的扩增条带, 则样品判定为阴性, 如图 B.1 所示。

## 9.7 沙门氏菌的血清学鉴定和血清型分型

沙门氏菌血清学鉴定和血清型分型分别按 GB4789.4-2024 中 5.5 和 5.6 项的实验方法进行操作。

## 9.8 沙门氏菌实时荧光定量 PCR 检测方法

### 9.8.1 RT-qPCR 扩增模版制备

本方法为基于 TaqMan 探针的荧光 PCR 方法, 可使用未增菌处理的样品模板结合标准曲线进行定量检测, 也可直接进行定性检测 (未增菌或增菌处理后的样品模板均可)。未增菌处理样品以水样等液体样品为主, 需要过滤富集; 增菌处理样品为经 BPW 增菌培养后的液体 (具体处理方法见附录 C.4), 用商品化基因组提取试剂盒或煮沸法提取样品中基因组 DNA 作为 PCR 模板。

### 9.8.2 RT-qPCR 扩增体系

以 *stn* 基因作为目的基因片段, 引物和探针序列见附录表 C.1, 按照 C.5 按附录 C 配制 RT-qPCR 反应体系, 然后在荧光定量 PCR 仪中按设置的反应程序进行扩增: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10s; 95 $^{\circ}$ C 10s, 60 $^{\circ}$ C 34s, 40 个

循环。反应结束后，对获得的信号数据进行处理。

### 9.8.3 标准曲线的制作（定量检测选做）

细菌培养后平板计数确定细菌浓度，提取基因组DNA，通过10倍梯度稀释制备一定浓度梯度的DNA模板（具体浓度见附录C.2），进行RT-qPCR扩增，得到相应的扩增曲线，绘制反映Ct值随细菌数量变化的标准曲线，用于样品中沙门氏菌量的估算。

### 9.8.4 实验对照

以沙门氏菌的基因组DNA作为阳性对照样品的模板，以其他细菌（建议使用大肠杆菌）的基因组DNA作为阴性对照样品的模板，以灭菌去离子水作为空白对照样品的模板。

### 9.8.5 质量控制

以下条件有一条不满足时，实验视为无效，需重新进行实验：

- 1) 空白对照：无荧光对数增长，相应的Ct值 $>40.0$ 或无Ct值；
- 2) 阴性对照：无荧光对数增长，相应的Ct值 $>40.0$ 或无Ct值；
- 3) 阳性对照：有荧光对数增长且荧光通道出现典型的扩增曲线，相应的Ct值 $<30.0$ ；
- 4) 标准曲线：标准品扩增获得的标准曲线，各参数应与本标准提供的接近。

### 9.8.6 结果判定

定性检测：在阳性对照、阴性对照和空白对照结果正确的情况下，如样品Ct $\leq 36$ 判定为阳性， $36 < Ct \leq 40$ 判定为可疑，需重复检测或结合其他检测方法判定结果。

定量检测：通过标准品的扩增获得标准曲线（具体见附录C.6），将待测样品的Ct值代入该标准曲线即可获得样品中细菌的数量。

## 10 结果与报告

综合以上血清学和分子生物学等鉴定结果，报告样品中检出或未检出沙门氏菌，或沙门氏菌的含量。

附录A  
(规范性)  
培养基与试剂

### A.1 缓冲蛋白胨水 (BPW)

#### A.1.1 成分

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠	9.0 g
磷酸二氢钾	1.5 g
硫酸亚铁	0.25 g

#### A.1.2 制法

将 A.1.1 成分溶于 1000 mL 蒸馏水中，调节 pH 为  $7.2 \pm 0.2$ ， $121^\circ\text{C}$  高压灭菌 15 min，备用。

### A.2 RVR10 肉汤

#### A.2.1 成分

胰酪蛋白胨	4.54 g
氯化钠	7.3 g
磷酸二氢钾	1.45 g
无水氯化镁	13.4 g
孔雀绿草酸盐	0.036 g

#### A.2.2 制法

将 A.2.1 成分加热溶于 1000 mL 蒸馏水中，调节 pH 值至  $5.1 \pm 0.2$ ，分装于试管中， $115^\circ\text{C}$  高压灭菌 15 min，冷却，备用。

### A.3 改良 MSR/V 培养基

#### A.3.1 成分

胰蛋白胨	4.6 g
酸水解酪蛋白	4.6 g
氯化钠	7.3 g
磷酸二氢钾	1.5 g
无水氯化镁	10.9 g
孔雀绿草酸盐	0.04 g
琼脂	2.7 g

## A.3.2 制法

将 A.3.1 成分加热溶于 1000 mL 蒸馏水中，调节 pH 值至  $5.2 \pm 0.2$ ，煮沸 1min，无需高压灭菌，冷至 50 °C 左右时，加入 10 mg 新生霉素，混匀，倾入无菌皿中，备用。

## A.4XLT4 琼脂培养基

## A.4.1 成分

木糖	3.75 g
蛋白胨	1.6 g
L-赖氨酸	5.0 g
乳糖	7.5 g
蔗糖	7.5 g
氯化钠	5.0 g
酵母膏粉	3.0 g
酚红	0.08 g
硫代硫酸钠	6.8 g
柠檬酸铁铵	0.8 g
琼脂	18.0 g

## A.4.2 制法

将 A.4.1 成分溶于 1000 mL 蒸馏水中，调节 pH 值至  $7.4 \pm 0.2$ ，搅拌加热煮沸至完全溶解，冷却至 45 °C，添加 4.61 mL XLT4 添加剂（7-乙基-2-甲基-4-十一烷基硫酸钠），倾入无菌皿中，备用。

## A.50.5 × TAE 电泳缓冲液

## A.5.1 50 × TAE 电泳缓冲母液

## A.5.1.1 成分

Tris	242.0 g
EDTA	18.612 g
冰乙酸	57.1 mL

## A.5.1.2 制法

将 A.5.1.1 成分中的 Tris 和 EDTA 溶于 800 mL 的去离子水中，充分搅拌均匀，加入冰乙酸，充分溶解，用 5mol/L 的 NaOH 将 pH 调节至 8.3，加去离子水定容至 1000 mL 后，室温保存。

## A.5.2 0.5 × TAE 电泳缓冲液

## A.5.2.1 成分

50 × TAE 电泳缓冲母液	10 mL
-----------------	-------

### A. 5.2.2 制法

将 A.5.2.1 成分溶于 990mL 去离子水中，混匀备用。

### A. 6.1.2%琼脂糖凝胶

#### A. 6.1 成分

琼脂糖	1.2 g
0.5 × TAE 电泳缓冲液	100 mL

#### A. 6.2 制法

称量 1.2g 琼脂糖，加入 100mL 的 0.5 × TAE 电泳缓冲液，缓慢加热至琼脂糖完全溶解，待冷却至 60℃左右时，加入核酸染料，倒入插有点样梳的制胶槽内，静置待其冷却凝固后备用。

### A. 7 沙门氏菌在 XLT4 平板的可疑菌落



图 A.1 沙门氏菌 PCR 扩增结果

左图为鸡白痢沙门氏菌/鸡伤寒沙门氏菌的可疑菌落；右图为其他血清型沙门菌的可疑菌落

## 附录 B

(规范性)

## 沙门氏菌的 PCR 鉴定

## B.1 PCR 引物序列及扩增片段长度

沙门氏菌 PCR 反应体系的引物序列及扩增片段长度见表 B.1。

表 B.1 鉴定沙门氏菌的 PCR 引物序列及扩增片段长度

基因	引物	引物序列	扩增片段长度
<i>stn</i>	<i>stn</i> <sub>1</sub>	5'-CTTTGGTCGTAAAATAAGGCG-3'	260 bp
	<i>stn</i> <sub>2</sub>	5'-TGCCCAAAGCAGAGAGATTC-3'	

## B.2 PCR 反应体系

采用商品化基因组提取试剂盒或煮沸法提取 XLT4 平板疑似沙门氏菌菌落的基因组 DNA 作为 PCR 模板，同时制备已鉴定的沙门氏菌的基因组 DNA 作为阳性对照模板，大肠杆菌等非沙门氏菌的基因组 DNA 作为阴性对照模板，以及去离子水作为阴性对照模板，按照以下组成制备 PCR 反应体系（25 μL）进行 *stn* 基因的 PCR 扩增。

2×PCR Master Mix	12.5μL
上游引物 <i>stn</i> <sub>1</sub> (2.5 μmol/L)	1.0μL
下游引物 <i>stn</i> <sub>2</sub> (2.5 μmol/L)	1.0μL
模板 DNA	2.0μL
去离子水	8.5μL

## B.3 PCR 结果判定

沙门氏菌 PCR 扩增反应结果的凝胶电泳鉴定示例图示（图 B.1）。

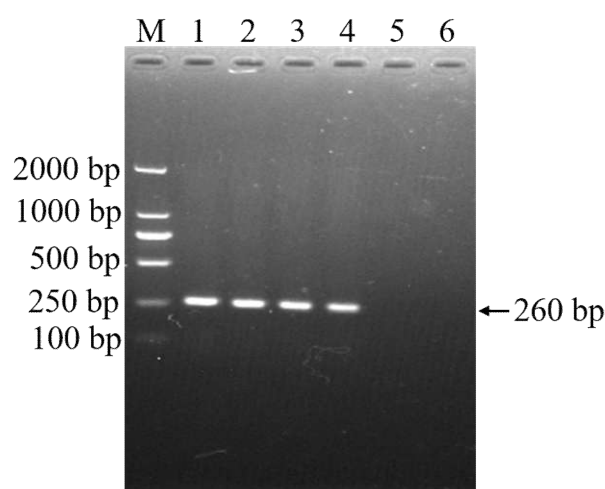


图 B.1 沙门氏菌 PCR 扩增结果

M: DNA 分子量标准 DL1000; 1: 阳性对照; 2~4: 不同阳性样品; 5: 阴性对照; 6: 空白对照

## 附录 C

(规范性)

## 沙门氏菌实时荧光定量PCR检测

## C.1 引物和探针的合成

以沙门氏菌肠毒素 *stn* 基因作为检测靶基因，RT-qPCR 反应体系的引物序列、探针序列及扩增片段长度见表 C.1，其中 *stn* 引物序列与普通 PCR 相同，两者可通用。

表 C.1 沙门氏菌 RT-qPCR 反应体系的引物序列、探针序列及扩增片段长度

基因	引物名称	引物序列	扩增片段长度
	荧光探针	5'-FAM-CCTTTCCCGCTATCGGTAAC-BHQ1-3'	
<i>stn</i>	<i>stn</i> <sub>1</sub>	5'-CTTTGGTCGTAAAATAAGGCG-3'	260 bp
	<i>stn</i> <sub>2</sub>	5'-TGCCCAAAGCAGAGAGATTC-3'	

## C.2 标准品模板的制备

取培养过夜的沙门氏菌菌液用无菌 PBS 稀释后 CFU 平板计数，将细菌分别稀释至  $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^2$  CFU/mL，分别取 1 mL 菌液置于 1.5 mL 离心管中，12000 r/min 离心 5 min，用移液枪缓慢吸掉上清液（尽量减少吸取菌体沉淀），加入 1 mL 无菌去离子水重悬，重复此步骤一次。然后用无菌去离子水重悬沉淀至 200  $\mu$ L，沸水浴 10 min 后 12000 r/min 离心 5 min，取上清即为标准品 DNA 模板。

## C.3 阳性对照和阴性对照样品模板的制备

取培养过夜的沙门氏菌、大肠杆菌菌液各 1 mL 置于 1.5 mL 离心管中，同 C.2 方法制备阳性对照和阴性对照样品基因组 DNA 模板。

## C.4 待测样品模板的制备

取水样或其他液体样品不经过增菌培养直接进行过滤或离心富集菌体沉淀（定量检测），或取各类样品增菌培养液离心获得菌体沉淀（定性检测），用 1 mL 无菌去离子水重悬洗涤 1 次，12000 r/min 离心 5 min，用移液枪缓慢吸掉上清液（尽量减少吸取菌体沉淀），用无菌去离子水重悬沉淀至 200  $\mu$ L；沸水浴 10 min，12000 r/min 离心 5 min，取上清即为待测样品 DNA 模板；或使用商品化基因组提取试剂盒提取其基因组 DNA 作为模板。

## C.5 RT-qPCR 扩增体系

以制备的标准品、待测样品、阳性对照、阴性对照基因组 DNA 作为模板，同时设置去离子水作为模板的空白对照，按照以下组成制备 RT-qPCR 反应体系（25  $\mu$ L）进行 *stn* 基因的特异性扩增。

2 $\times$ PCR Master Mix (Premix Ex Taq™)	12.5 $\mu$ L
上游引物 (10 $\mu$ mol/L)	0.5 $\mu$ L
下游引物 (10 $\mu$ mol/L)	0.5 $\mu$ L
荧光探针 (3 $\mu$ mol/L)	1.0 $\mu$ L
ROX Reference Dye (50 $\times$ )	0.5 $\mu$ L

模板 DNA  
去离子水

2.0 $\mu$ L  
8.0 $\mu$ L

### C.6 标准曲线的制作

通过标准品的扩增，获得反映 Ct 值随细菌数变化的标准曲线  $Ct = -3.602x + 36.409$ ，其中横坐标  $x$  为细菌数量值，纵坐标为循环阈值 Ct，曲线的斜率为 -3.602，截距为 36.409，相关系数  $R^2 = 0.993$ ，如图 C.1 所示。将待测样品的 Ct 值代入该标准曲线即可获得样品中细菌的数量。

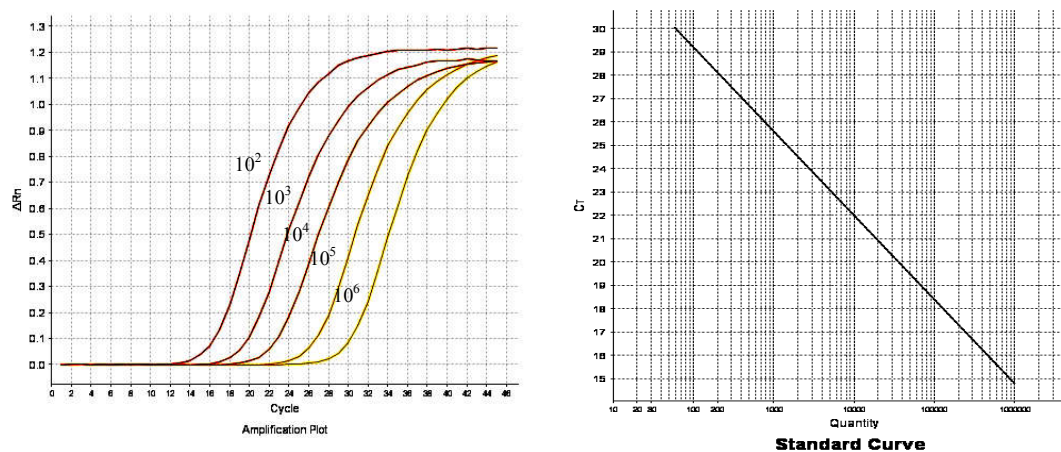


图 C.1 沙门氏菌 RT-qPCR 标准品的扩增曲线和标准曲线