

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2529—2010

进出口食品中香港海鸥菌检测方法

Determination of *Laribacter hongkongensis* in foods for import and export

2010-03-02 发布

2010-09-16 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
进出口食品中香港海鸥菌检测方法
SN/T 2529—2010

*

中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 17 千字

2010年5月第一版 2010年5月第一次印刷

印数 1—1 600

*

书号: 155066·2-20861 定价 16.00 元

前 言

本标准的附录 A、附录 B 为规范性的附录、附录 C 为资料性附录。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国上海出入境检验检疫局、广东出入境检验检疫局、杭州疾病预防控制中心。

本标准主要起草人：李晓虹、韩伟、李志勇、倪晓平。

本标准是首次发布的出入境检验检疫行业标准。

进出口食品中香港海鸥菌检测方法

1 范围

本标准规定了进出口食品中香港海鸥菌的检验方法。
本标准适用于淡水鱼中香港海鸥菌的检验。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

- GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测
- GB/T 27405 实验室质量控制规范 食品微生物检测
- SN/T 1538.1 培养基制备指南 第1部分:实验室培养基制备质量保证通则
- SN/T 1538.2 培养基制备指南 第2部分:培养基性能测试实用指南

3 定义和术语

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

香港海鸥菌 *Laribacter hongkongensis*, LH

香港海鸥菌(*Laribacter hongkongensis*, LH),为变形菌门(Proteobacteria)、 β -变形菌纲(Betaproteobacteria)、奈瑟菌科(Neisseriaceae)的一个新属。呈海鸥形或螺旋形杆状,兼性厌氧,不产芽孢,大小直径在0.5 mm~1 mm之间的革兰氏阴性细菌。

4 设备和材料

- 4.1 恒温培养箱:36 °C \pm 1 °C。
- 4.2 吸管:1 mL、5 mL 和 10 mL,分刻度 0.1 mL。
- 4.3 接种环:直径 3 mm。
- 4.4 天平:感量 0.1 g。
- 4.5 全自动细菌鉴定系统(VITEK 或同类仪器)。
- 4.6 灭菌平皿:皿底直径 9 cm。
- 4.7 浊度仪:法国生物梅里埃公司或同类仪器。
- 4.8 PCR 扩增仪。
- 4.9 台式离心机:最高离心力 13 000 r/min。
- 4.10 恒温水浴锅:36 °C \pm 1 °C。
- 4.11 均质器。
- 4.12 微量可调移液器。1 μ L~10 μ L,100 μ L,200 μ L,1 000 μ L。
- 4.13 旋涡振荡器。
- 4.14 电泳仪。
- 4.15 凝胶成像分析系统。
- 4.16 微波炉。

5 培养基和试剂

除另有规定外,所用试剂均为分析纯,试验用水和培养基配制应符合 GB/T 27405 和 GB/T 27403

的规定。

- 5.1 肠道菌增菌肉汤(EE肉汤):见附录第 A.2 章。
- 5.2 头孢哌酮麦康凯(CMA)琼脂:见附录第 A.3 章。
- 5.3 三糖铁琼脂(TSI):见附录第 A.4 章。
- 5.4 胰化大豆胨蛋白胨肉汤(TSB):见附录第 A.5 章。
- 5.5 绵羊头孢哌酮血平板:见附录第 A.6 章。
- 5.6 $2 \times Taq$ PCR Master Mix[0.1U *Taq* Polymerase/ μ L, 500 μ mol/L dNTP each, 20 mol/L Tris-HCl(pH 8.3), 100 mol/L KCl, 3 mol/L $MgCl_2$]。
- 5.7 PCR 引物见表 1。

表 1 香港海鸥菌引物序列及扩增片段长度

引物名称	引物序列(5'-3')	扩增片段大小/bp
P2F ^a	TTGAGGGTGTCCCGAAAGGGA	424
P2R ^b	CTACCCACTTCTGGCGGATT	

- 5.8 琼脂糖(电泳级)。
- 5.9 溴化乙锭。
- 5.10 DNA 抽提试剂盒。
- 5.11 DNA marker。
- 5.12 常用生化试剂。
- 5.13 TAE 电泳储备液(50 \times):见附录第 A.7 章。
- 5.14 API 20NE 生化鉴定试剂盒或类似产品。

注: API 20NE 是由法国生物梅里埃公司提供的产品的商品名。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。

6 检验程序

香港海鸥菌检验程序见图 1。

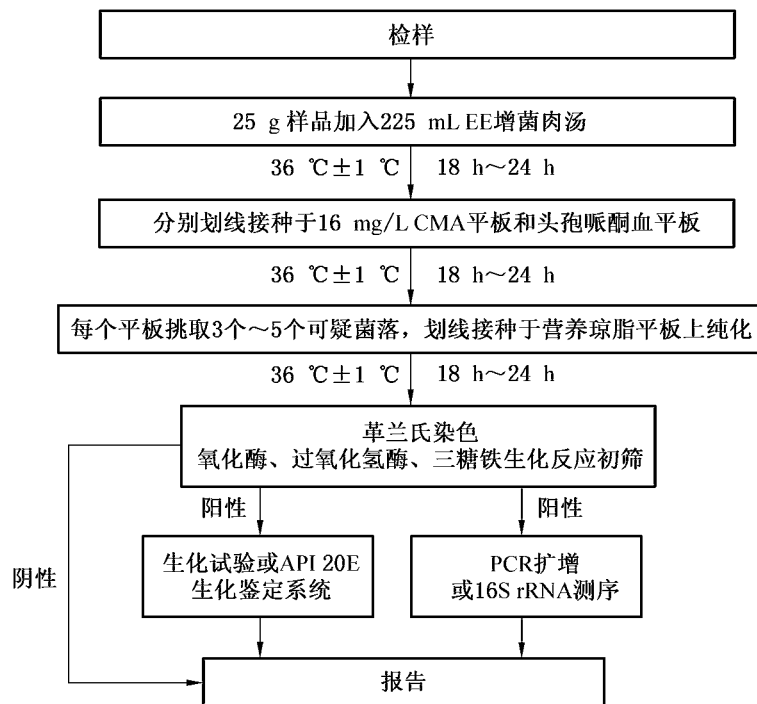


图 1 香港海鸥菌的检测程序

7 检验步骤

7.1 样品处理

冷冻样品应在 45 ℃ 以下不超过 15 min 或在 2 ℃~5 ℃ 不超过 18 h 解冻。若不能及时检验,应放于 -15 ℃ 左右保存;非冷冻而易腐的样品应尽可能及时检验。若不能及时检验,应置于 0 ℃~4 ℃ 冰箱保存,在 24 h 内检验。

7.2 样品制备

无菌操作,取鱼体不同部位 500 g 充分均质混匀,放于灭菌容器内,加封标记后 0 ℃~4 ℃ 或 -15 ℃ 以下冷冻保存备用。

7.3 增菌

无菌操作取 7.1 制得的样品 25 g 放入盛有 225 mL EE 增菌肉汤的 500 mL 灭菌广口瓶内,36 ℃ ± 1 ℃ 培养 18 h~24 h。对于经过冷冻处理的样品,可以用 TSB 肉汤经 36 ℃ ± 1 ℃ 培养 4 h~6 h 后,按照 1:10 接种 EE 肉汤 36 ℃ ± 1 ℃ 培养 18 h~24 h 后备用。

7.4 分离

用接种环挑取一环增菌液,接种于 16 mg/L CMA 和绵羊血平板,36 ℃ ± 1 ℃ 培养 18 h~24 h。挑取 3 个~5 个革兰氏染色阴性,在绵羊血琼脂平板上不发生溶血反应,在 CMA 培养基上呈无色、透明、扁平状,边缘光滑整齐,直径在 0.5 mm~1 mm 之间的微小疑似单菌落,进行氧化酶、过氧化氢酶和三糖铁初筛实验。筛选结果不符合表 1 判断标准按照 8.1 报告结果;阳性结果菌落纯化后,按下面的方法进行确证试验。

7.5 鉴定

7.5.1 生化实验

挑取 7.4 筛选阳性的可疑香港海鸥菌纯菌落,按表 2 进行生化实验,37 ℃ 培养 18 h~24 h。

表 2 香港海鸥菌主要生化特征

鉴定程序	生化项目	结果判断
初筛	氧化酶	+
	过氧化氢酶	+
	三糖铁(TSI)	
	斜面	-(不变色)
	底层	-(不变色)
	H ₂ S	-
生化鉴别	精氨酸双水解酶(ADH)	+
	脲酶(URE)	+
	硝酸盐还原(NO ₃)	+
	β-半乳糖苷(βGAL)	-
	赖氨酸脱羧酶(LDC)	-
	鸟氨酸脱羧酶(ODC)	-
	七叶苷(ESC)	-
	吲哚实验(IND)	-
	明胶(GEL)	-
	葡萄糖发酵(GLU)	-
	山梨醇(SOR)	-
	L-阿拉伯糖(LARA)	-
	甘露醇(MAN)	-
	蔗糖(SAC)	-

表 2 (续)

鉴定程序	生化项目	结果判断
生化鉴别	鼠李糖(RHA)	—
	麦芽糖(MAL)	—
	葡萄糖酸盐(GNT)	—
	癸酸(CAP)	+
	己二酸(ADI)	+
	苹果酸(MLT)	+
	柠檬酸钠(CIT)	—
	苯乙酸(PAC)	—
	1%氯化钠胰胨水	+
	2%氯化钠胰胨水	+
	3%氯化钠胰胨水	—

7.5.2 PCR 检测

7.5.2.1 PCR 模板的制备

挑取经生化实验初筛为阳性的可疑纯菌落混于 100 μ L 蒸馏水中,振荡混匀,100 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min~10 min,10 000 r/min 离心 5 min,取上清液作为模板。

7.5.2.2 PCR 反应体系和条件

反应体系体积为 50 μ L;10 μ mol/L 引物各 2.5 μ L;2 \times *Taq* PCR Master Mix 25 μ L;模板 DNA 2 μ L;ddH₂O 补足 50 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min,4 $^{\circ}$ C 保存反应产物。

7.5.2.3 PCR 质控对照

每次进行 PCR 检测时均需要设置阳性对照、阴性对照和空白对照。其中,用香港海鸥菌标准阳性菌株提取的 DNA 作阳性对照。用非香港海鸥菌的淡水鱼致病菌标准菌株提取的 DNA 作阴性对照。用灭菌双蒸水替代模板作空白对照。

7.5.2.4 PCR 扩增产物电泳检测

取 1.5 g 琼脂糖于 100 mL 电泳缓冲液中加热,充分融化,加入溴化乙锭,使其最终浓度达到 1.0 μ g/mL,制胶。在电泳槽中加入电泳缓冲液,使液面刚刚没过胶面 1 mm。取 10.0 μ L PCR 扩增产物点样。9 V/cm 恒压,电泳 20 min~30 min。紫外凝胶成像仪下观察电泳结果,做好记录。PCR 扩增产物为 424 bp。

7.5.2.5 16S rRNA 序列测序

必要时,进行 PCR 扩增产物测序(序列见附录 B),进行确证实验。

8 结果及判定

8.1 当氧化酶、过氧化氢酶和三糖铁初筛生化反应结果不符合判断标准,报告 25 g 未检出香港海鸥菌。

8.2 当检出的可疑菌落,初筛生化反应结果符合判断标准,且生化结果符合表 1,报告 25 g 检出香港海鸥菌。

8.3 当检出的可疑菌落,初筛生化反应结果符合判断标准,且 PCR 产物电泳检验结果阳性,报告 25 g 检出香港海鸥菌。

8.4 当检出的可疑菌落生化结果符合表 1 要求且 PCR 产物电泳检验结果阳性,进行 16S rRNA 测序,报告检出的香港海鸥菌与已报道菌的同源性。

9 废弃物处理和防止污染的措施

检测过程中防止交叉污染的措施参见附录 C。

附 录 A
(规范性附录)
培养基和试剂

A.1 一般要求

为保证培养基的质量,宜按照 SN/T 1538.1 和 SN/T 1538.2 对培养基进行质量控制。

A.2 肠道菌增菌肉汤(EE 肉汤)**A.2.1 成分**

蛋白胨	10.0 g
葡萄糖	5.0 g
磷酸氢二钠	8.0 g
磷酸二氢钾	2.0 g
牛胆盐	20.0 g
煌绿	0.015 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.2.2 制备

应使用纯净的牛胆盐和煌绿,减少对受损伤且数量极少的肠杆菌的生长抑制。将各成分加入蒸馏水中,加热煮沸,分瓶分装 225 mL,制成的培养基为绿色,可放置 2℃~8℃冷藏柜保存,4 周内使用。

A.3 改良头孢哌酮麦康凯琼脂(CMA)**A.3.1 成分**

蛋白胨	17.0 g
■ 胨	3.0 g
猪胆盐(或牛、羊胆盐)	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	17.0 g
乳糖	10.0 g
葡萄糖	10.0 g
0.01%结晶紫水溶液	10.0 mL
0.5%中性红水溶液	5.0 mL
蒸馏水	1 000.0 mL

A.3.2 制备

- a) 将蛋白胨、■ 胨、胆盐、氯化钠、乳糖及葡萄糖溶解于 400 mL 蒸馏水中。校正 pH 至 7.2,将琼脂加入于 600 mL 蒸馏水中加热溶解,将两液合并,分装于锥形瓶内高压灭菌(115℃,15 min 备用)。
- b) 临用时加热熔化琼脂,冷却至 50℃~55℃时加入结晶紫和中性红水溶液并加入过滤灭菌的头孢哌酮(Cefoperazone),使最终浓度为 16 mg/L。

注:结晶紫及中性红水溶液配好后应经高压灭菌。

A.4 三糖铁琼脂(TSI)

A.4.1 成分

聚脲(polypeptone)	20.0 g
乳糖	10.0 g
蔗糖	10.0 g
葡萄糖	1.0 g
六水硫酸亚铁胺	0.2 g
硫代硫酸钠	0.2 g
酚红	0.025 g
琼脂	13.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.4.2 制备

将以上各成分加热煮沸至完全溶解,调节 pH 至 7.4 ± 0.1 ,分装试管。115 °C 高压灭菌 15 min,制成高层斜面备用。

A.5 胰蛋白酶大豆肉汤(TSB)

A.5.1 成分

胰蛋白胨	17.0 g
大豆蛋白胨	3.0 g
氯化钠	20.0 g
磷酸氢二钾	2.5 g
葡萄糖	2.5 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.5.2 制备

将各成分加入水中,要不断搅拌,加热至煮沸 1 min。121 °C 高压灭菌 15 min,最终 pH 至 7.3 ± 0.2 。

A.6 头孢哌酮血琼脂

A.6.1 成分(豆粉琼脂)

牛心消化粉	3.0 g
豌豆粉	7.5 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.6.2 制备

将上述成分溶解于蒸馏水中,加热煮沸至完全溶解,121 °C 高压灭菌 15 min,最终 pH 6.8 ± 0.2 。冷却至 50 °C~55 °C 时加入,分别加入 5 mL~10 mL 无菌脱纤维羊血和过滤灭菌的头孢哌酮(Cefoperazone),使最终浓度为 16 mg/L。

A.7 TAE 电泳储备液($\times 50$)

Tris	24.2 g
冰乙酸	5.7 mL
0.5 mol/L EDTA 溶液(pH 8.0)	10.0 mL
加蒸馏水	定容至 100 mL
使用时稀释成 1×电泳缓冲液。	

附 录 B

(规范性附录)

香港海鸥菌基因序列(GenBank DQ396525)

1 tgcaagtcga acggtaacag ggacttcggt ctgctgacga gtggcgaacg ggtgagtaat
61 gcatcggaac gtaccgagta atgggggata acgcatcgaa aggtgtgcta ataccgcata
121 cgccctgagg gggaaagcgg gggatcgaaa gacctcgcgt tattcgagcg gccgatgccg
181 gattagctag ttggtggggt aaaggctcac caaggcgacg atccgtagca ggtctgagag
241 gatgatctgc cacttgga ctgagacacg gccagactc ctacgggagg cagcagtggg
301 gaattttgga caatgggggc aacctgac cagccatgcc gcgtgtctga agaaggcctt
361 cgggttghaa aggactttg tcagggagga aatccctaag gctaataccc ttgggggatg
421 acagtacctg aagaataagc accggctaac tacgtgccag tagcccggt aatacgtagg
481 gtgcaagcgt taatcggaat tactgggcgt aaagcgtgcg caggcggtt gaaaagtcag
541 ctgtgaaagc cccgggctca acctgggaac tgcggtgaa actctcaagc tagagtgcgt
601 cagagggggg tggaacca cgtgtagcag tgaatgcgt agagatgtgg agaacacca
661 atggcgaagg cagccccctg ggatgacact gacgctcatg cagaaagcg tggggagcaa
721 acaggattag atacctggt agtccacgcc ctaaacgatg tcgactagcc gttggagatt
781 tcggtttctg gtggcgcagc taacgcgtga agtcgaccgc ctggggagta cggtcgcaag
841 attaaaacte aaaggaattg acgggggccc gcacaagcgg tggatgatgt ggattaatte
901 gatgcaacgc gaaaaactt acctggtctt gacatgtacc gaacctgaa gagatttgag
961 ggtgcccga agggagcggg aacacaggtg ctgcatgget gtcgtcagct cgtgtctga
1021 gatgttgggt taagtcccgc aacgagcgc accctgtca ttagttgcca gcattaagtt
1081 gggactccta atgagactgc cgtgacaaa ccggaggaag gtggggatga cgtaagtc
1141 tcattggcct tatgaccagg gttcacacg tcatacaatg gtcggtacag agggtcgcta
1201 agccgcgagg tagtgccaat ctataaac cgatcgtagt ccggatcgc gtctgcaact
1261 cgactgcgtg aagtcggaat cgctagtaat cgcggatcag catgtcgcgg tgaatcgtt
1321 cccgggctt gtacacaccg cccgtcacac catgggagtg gaatccgcca gaagtgggta
1381 gggtaaccgt aaggagcccc cttaccacgg tag

附录 C (资料性附录)

检测过程中防止交叉污染的措施

C.1 抽样和制样过程

抽样和制样工具,应清洗干净,121 °C 高压灭菌 15 min~20 min,一套洁净工具限于一份样品使用。存放样品的容器应该经过清洗、高压灭菌,或为一次性灭菌容器。

C.2 检测过程

C.2.1 PCR 实验室应分为样品制备区、前 PCR 区、PCR 区和后 PCR 区。将模板提取、PCR 反应液配制、PCR 循环扩增及 PCR 产物的鉴定等步骤分区或分室进行。实验室的运作应从“洁净区”到“污染区”单向进行。

C.2.2 实验过程中,应穿戴实验服佩戴手套。各区要有专用实验服。

C.2.3 各区所有的试剂、器材(尤其是移液器)、仪器都应专用,不得带出该区。

C.2.4 所有溶液、水、耗材和器具要 121 °C,15 min 高压,避免核酸和(或)核酸酶污染。每种溶液应使用高质量的成分和新蒸馏的双蒸水。在 20 °C~25 °C 贮存的试剂中,可加入 0.025% 的叠氮钠。所有试剂应该以大体积配制,然后分装成仅够一次使用的量进行贮存。

C.2.5 DNA 模板或引物的离心管打开之前,要短暂离心,离心管不能用力崩开,以免产生气溶胶。

C.2.6 前 PCR 区中,最好能在 PCR 操作箱中加入 PCR 反应各组分。

C.2.7 实验前后,实验室用紫外线消毒以破坏残留的 DNA。

C.2.8 可使用 UDG 和 dUTP 系统控制污染。

C.2.9 应遵循 PCR 操作的其他要求。



SN/T 2529-2010

书号:155066·2-20861

定价: 16.00 元