



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

鸡肠炎沙门氏菌 PCR 检验技术规范

Technical Standard of PCR for Detection of Salmonella enteritidis

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

(送审稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准主要起草单位：略。

本标准主要起草人：略。

引 言

肠炎沙门氏菌是引起人类食物中毒的主要病原菌，也是引起动物肠炎的主要病原菌。传统的检测沙门氏菌、确定沙门氏菌血清型的方法却非常繁琐。

目前，国际上流行一种利用多基因PCR检测病原细菌的技术（MLST-PCR）。本标准规定了MLST-PCR确定沙门氏菌基因分型标准。

鸡肠炎沙门氏菌 PCR 检验技术规范

1. 范围

本标准规定了肠炎沙门氏菌MLST-PCR检测技术。

本标准适用于各种动物及其产品中携带肠炎沙门氏菌的检测或检疫,也可用于养殖场中环境中肠炎沙门氏菌的检测。

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 4789.4-2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验

GB/T 6682-2008 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 28642-2012 饲料中沙门氏菌的快速检测方法聚合酶链式反应(PCR)法

SN/T 4525.2-2016 出口食品中致病菌的分子分型MLST方法 第1部分

3. 仪器、耗材、试剂

3.1 仪器 -20 °C普通冰箱、4 °C冰箱

3.1.1 微量冷冻高速离心机

3.1.2 生物安全柜

3.1.3 PCR 仪

3.1.4 电泳仪

3.1.5 凝胶成像仪或紫外透射仪

3.1.6 核酸蛋白测定仪

3.1.7 高压灭菌锅

3.1.8 恒温水浴锅

3.1.9 微量移液器

3.2 耗材

3.2.1 1.5 mL离心管

3.2.2 200 μ L吸头

3.3 试剂

3.3.1 酚-氯仿抽提法细菌染色体 DNA 抽提试所需要的相关试剂或商品化细菌染色体 DNA 抽提试剂盒

3.3.2 DNA 体外扩增 (PCR) 试剂盒: PCR buffer、MgSO₄、dNTP (2.5 mmol/L 或 10 mmol/L)、DNA 聚合酶

3.3.3 DNA Makers

3.3.4 电泳上样缓冲液: 配制方法见 GB/T 28642-2012

3.3.5 无水乙醇

3.3.6 琼脂糖

3.3.7 电泳缓冲液: 配制方法见 GB/T 28642-2012

3.3.8 多基因位点分型 PCR 引物

3.3.9 双蒸水: 符合GB/T 6682-2008 分析实验室用水

3.3.10 七对看家基因片段PCR引物序列。见表1

表1 多基因位点 PCR 分型引物

基因名称	设计引物
thra	F 5' - TATTATCGCCGCCAGCCAGAT-3' R 5' - GGCGCTCCAGATAGAACTCAT-3'
dnaN	F 5' -GATTCTCGGTAACCTGCTCCT-3' R 5' -GCCCTGGTGAAGATAAAGTCG-3'
hemD	F 5' -ACGACCAATAGCCGACAGCGT-3' R 5' -AAATGCGCACTGGGGCAGGT-3'
hisD	F 5' -TCGCGTCTGTCGGTCTGTAT-3' R 5' -GGCGCAGTATAGCCATAGGT-3'
pure	F 5' -AAGGCATGTCTTCCCgCAAT-3' R 5' -AAGGCCAGTACTTCATCGGT-3'
sucA	F 5' -AGCACCGAAGAGAAACGCTG-3' R 5' -GGTTGTTGATAACGATACGTAC-3'
aroC	F 5' -CCTGGCACCTCGCGCTATAC-3' R 5' -CCACACACGGATCGTGGCG-3'

4. 沙门氏菌 PCR 检测方法

4.1 细菌基因组 DNA 提取

将经过GB/T 4789.4的方法鉴定为沙门氏菌的菌株，按照GB/T 28642-2012进行染色体基因组DNA提取。

4.2 PCR 扩增引物

引物在使用前按照相应分子量进行稀释到10 μM ，-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

4.3 管家基因片段的 PCR 扩增

4.3.1 PCR反应体系见表2。

表2 多基因 PCR 反应体系

组分	体积 (μL)
ddH ₂ O	18.3
10×Buffer (Mg ²⁺ free)	2.5
MgCl ₂ (15 mmol/L)	2
4dNTPs (2.5 mmol/L)	0.5
选择基因 P1 (25 $\mu\text{mol/L}$)	0.5
选择基因 P2 (25 $\mu\text{mol/L}$)	0.5
Taq enzyme (5U/ μL)	0.2
DNA 模板	0.5
总体积	25

注：选择基因为七个看家基因之一

4.3.2 PCR 反应程序

aroC、hemD、hisD、sucA、thrA 基因的反应条件为：预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min；变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s，退火 60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s，延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min，进行 35 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 7 min。

dnaN、purE 基因的反应条件为：预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min；变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s，退火 58 $^{\circ}\text{C}$ 45 s，延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min，进行 35 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 7 min。

5. 电泳

按照GB/T 28642-2012将PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳，染色后紫外光下成像观察，产物条带单一且明亮的样品进行产物纯化与DNA序列测定。

6. DNA 序列测定与修正

七段看家基因PCR产物可按附录A1的测序引物直接测序，也可与克隆载体重组测序。序列测定结果使用DNAStar软件根据MLST基因库模板长度要求（见附录A2）删除多余序列。

7. 结果

7.1 沙门氏菌属判断 按照 SN/T 4525.2-2016 方法，七段基因 PCR 扩增全部阳性，可判断为沙门氏菌阳性。

7.2 MLst 多基因位点分型：将测序结果上传至 MLST 网站 (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/>) 进行在线数据分析，得到的结果与 MLST 数据库进行比对。根据 PubMLST 回馈的各看家基因位点 DNA 序列参数判定 MLst 序列类型，如果是序列型为 ST11 则为肠炎沙门氏菌。

附 录 A
(资料性附录)
七对看家基因测序引物

七对看家基因测序引物。

A.1 七对看家基因测序引物

测序引物	aroC (Forward)	GGCACCAGTATTGGCCTGCT
	aroC (Reverse)	CATATGCGCCACAATGTGTTG
	dnaN (Forward)	CCGATTCTCGGTAACCTGCT
	dnaN (Reverse)	CCATCCACCAGCTTCGAGGT
	hemD (Forward)	GTGGCCTGGAGTTTTCCACT
	hemD (Reverse)	GACCAATAGCCGACAGCGTAG
	hisD (Forward)	GTCGGTCTGTATATCCCGG
	hisD (Reverse)	GGTAATCGCATCCACCAAATC
	purE (Forward)	CGCATTATCCGGCGCGTGT
	purE (Reverse)	CGCGGATCGGGATTTCCAG
	sucA (Forward)	AGCACCGAAGAGAAACGCTG
	sucA (Reverse)	GGTTGTTGATAACGATACGTAC
	thrA (Forward)	ATCCCGGCCGATCACATGAT
	thrA (Reverse)	CTCCAGCAGGGGCTCTTTCAG

附 录 B
(资料性附录)
7个看家基因基因序列

7个看家基因基因序列。

B. 1 Ae0r基因

GTTTTTCGTCCGGGACACGCGGATTACACCTATGAGCAGAAATACGGCCTGCGCGATTACCGTGGCGGTGGACGTTCTTC
CGCGCGTGAAACCGCGATGCGCGTAGCGGCAGGGCGATCGCCAAGAAATACCTGGCGGAAAAGTTCGGCATCGAAATCC
GCGGCTGCGTACCAGATGGCGATATCCGCTGGAGATTAAAGACTGGCGTCAGGTTGAGCTTAATCCGTTCTTTTGT
CCCATGCGGACAACTTGACGCGCTGGACGAAGTATGCGCGCGTGAAAAAGAGGGCGACTCCATCGGCGGAAAGT
GACGGTGATGGCGAGCGCGTGCCGGCAGGGCTTGGCGAACCGTTTTTGACCGACTGGATGCGGACATCGCCATGCGC
TGATGAGCATCAATGCGGTGAAAGGCGTGGAGATCGGCGAAGGATTAACGTGGTGGCGCTGCGCGGCAGCCAGAATCGC
GATGAAATCACGGCGCAGGGT

B. 2 DnaN基因

ATGGAGATGGTCGCGCGCTTACGCTTCTCAGCCGCATGAGCCGGGCGCCACTACCGTGCCGGCGCGGAAATTTCTTTGA
TATCTGCCGCGCCTGCCGAGGGCGCGGAGATTGCCGTTTCAAGGCGATCGGATGCTGGTGCCTTCTGGCCGTA
GCCGCTTCTCGTGTCTACGCTGCTGCCGCCGATTTCCGAATCTTGACGACTGGCAAAGCGAAGTTGAATTTACGCTG
CCGAGGCCACGATGAAGCGCCTGATTGAAGCGACCCAGTTTTCGATGGCTCATCAGGATGTGCGCTACTACTTAAACGG
TATGCTGTTTGAACGGAAGGTAGCGAACTGCGCACTGTCGCGACCGACGGCCACCGCCTGGCGGTGTGCTCAATGCCG
TGAAAGCGTCTTACCAGCCACTCGGTGATTGTGCCGCTAAAGCGTGATTGAACTGATGCGTATGCTCGACGGCGGT
GAAAACCGCTGCGCGTGCGAG

B. 3 hemD基因

TTGCAACATCTCGCGCTGGTAACAACAAGCGTTGTTACGCCGCGAGTATGCCAGCGCATCGCTTCTTCCGCGCCATCGT
AATGTTTTCGCACATCGTTGATAACATTCACAAAACTGACTTCCGGTCCGCGAGCTGTCAGGGTTTTCGCCAGCAGTTCCG
CGGCCCATTTGCCACGAAAATCAGCGCGGTTTCCCCGAATATTTTGAATTCAGGTAATTGTAGCAAGGCTTCCGT
GATTTCCCGATCCAATGGATAACGAATATCGAACCCGCTAACGGTATGAAGGGCGAGCGCCGTGGTGGCGCAATCGCGA
AATAGCGCGGCGACGAGGCCAGTTTCCGCCATCCCGCTGGAGCTGGGCGTGAGCAAAGGCGACGGCGTGTGTGAAAGG
GCAAAAACCAGATCGTTTTCCGTCAGTGTGCG

B. 4 HisD基因

ATTGCGGGATGTCAGAACGTGGTTCTGTGCTCGCCGCCGCCATCGCTGATGAAATCCTCTATGCGGGCAACTGTGTGG
CGTGCAGGAAATCTTTAACGTCGGCGGCGCGCAGGCGATTGCCGCTTGGCCTTCGGCAGCGAGTCCGTACCGAAAAGTGG
ATAAAATTTTTGGCCCCGCAACGCCTTTGTAACCGAAGCAAACGTCAGGTCAGCCAACCGCTCGACGGCGCGGCTATC
GATATGCCAGCCGGCCGTCTGAAGTACTGGTGTATCGCCGACAGCGCGCAACACCGGATTTCTGTCGCTTCTGACCTGCT
CTCCCAGGCTGAGCACGGTCCGATTTCGCAGGTGATTCTGCTGACGCTGATGCTGACATTGCCGCAAGGTGGCGGAGG
CGGTAGAACGTCAACTGGCAGAACTGCCGCGCGGACACCGCCAGGCGCCCTGAGCGCCAGTCTGCTGATTGTGACC
AAAGATTTAGCGCAGTGCCTC

B. 5 PurE基因

AGCGACTGGGCTACCATGCAATTCGCCGCCGAAATTTTTGAAATCTGGATGTCCCGCACCATGTAGAAGTGGTTCCGC
CCATCGCACCCCGATAAACTGTTTACGCTTCGCCGAAACGGCGGAAGAGAACGGATATCAAGTGATTATTCGCCGGCGCG
GCGGCGGCGCACCTGCCGGAATGATTGCGGCAAAAACGCTGGTCCCGTACTCGGCGTCCGGTACAAAGCGCTGCG
CTAAGCGGCGTGGATAGCCTCTACTCCATTGTGCAGATGCCGCGCGCATTCCGGTGGGTACGCTGGCGATCGGTAAAGC
CGGTGCCGCTAACGCCCCCTGCTCGCCGCGCAGATTCTGGCGCAACACGACGCGGAACTGCATCAGCGCATTGCCGAC

B. 6 SucF基因

AAACGCTTCCTGAACGAACGACCGCCGCTGAAGGGCTGGAACGTTATCTGGGTGCCAAATCCCGGGTGCAGAAACGTTT
CTCGCTCGAGGGGGGAGATGCGCTGATACCCATGCTGAAAGAGATGGTTCGCCATGCGGGTAACAGCGGCACTCGCGAAG
TGGTGTGGGGATGGCGCACCGCGGTGCGCTGAACGTGCTGATCAACGTACTGGGTAAAAAACCAGGATCTGTTTCGAC
GAATTTGCCGGTAAGCATAAAGAACATCTGGGTACCGGCGACGTGAAGTATCACATGGGCTTCTCGTCAGATATCGAAAC
CGAAGGCGGTCTGGTTCACCTGGCGCTGGCGTTTAACCCATCGCATCTGGAAATTGTGAGCCCGGTGGTGTGGGCTCCG
TGC GCGCCCGTCTGGACAGACTGGACGAACCGAGCAGCAACAAAGTGTGCCGATCACTATTCACGGCGACCGCGGGT
ACCGGCCAGGGCGTGGTTCAG

B. 7 ThrA基因

GTGCTGGGCCGTAATGGTTCGACTATTCGCGCCCGTGTGGCCGCTGTTTACGCGCTGACTGCTGTGAAATCTGGAC
TGACGTCGATGGCGTGATACCTGTGACCCGCGCCAGGTGCCGACGCCAGGCTGCTGAAATCGATGTCCTACCAGGAAG
CGATGGAACCTCTTACTTCGGCGCCAAAGTTCTTACCCTCGCACCATTACGCCATCGCCCAGTTCAGATCCCCTGT
CTGATTAATAAATACCGGTAATCCGCAGGCGCCAGGAACGCTGATCGGCGGTCCAGCGACGATGATAACCTGCCGGTAA
AGGGATCTCTAACCTTAACAACATGGCGATGTTTAGCGTCTCCGGCCCGGAATGAAAGGATGATTGGGATGGCGGCGC
GTGTTTTTCGCCCATGTCTCGCGCCGGATCTCGGTGGTGCTATTACCAGTCCTCTCTGAGTACAGCATCAGCTTC
TGTGTGCCGAGAGTGACTGC
