



中华人民共和国国家标准

GB/T 46668—2025

动物和动物产品沙门氏菌检测方法

Detection methods for *Salmonella* in animal and animal products

2025-10-31 发布

2026-05-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言 III

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 缩略语 1

5 试剂和材料 1

6 仪器设备 2

7 生物安全要求 2

8 检测程序 3

9 样品采集 3

 9.1 养殖场 3

 9.2 屠宰场 4

 9.3 环境样品 5

 9.4 样品运输和临时存放 5

10 分离培养..... 5

 10.1 样品处理及预增菌 5

 10.2 分离纯化 6

 10.3 结果判定 6

11 沙门氏菌的检测..... 7

 11.1 生化鉴定 7

 11.2 血清学鉴定 7

 11.3 PCR 检测 7

 11.4 荧光定量 PCR 检测 8

12 结果与报告..... 9

附录 A（规范性） 培养基与试剂的配制 10

 A.1 缓冲蛋白胨水(BPW) 10

 A.2 RV R10 培养基 10

 A.3 MSRV 培养基 10

 A.4 XLT4 培养基 10

 A.5 0.5×TAE 电泳缓冲液 11

 A.6 1.2%琼脂糖凝胶 11

附录 B（资料性） 沙门氏菌的菌落特征 12

附录 C（资料性） 沙门氏菌 PCR 检测 13

附录 D（资料性） 沙门氏菌实时荧光定量 PCR 检测 14

 D.1 待测样品模板的制备..... 14

 D.2 阳性对照和阴性对照样品模板的制备..... 14

 D.3 标准品模板和标准曲线的制备..... 14



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。

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/TC 181)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。



动物和动物产品沙门氏菌检测方法

1 范围

本文件描述了畜禽和畜禽产品及其生产环境中沙门氏菌的检测方法,包括试剂和材料、仪器设备、生物安全要求、检测程序、样品采集、分离培养以及沙门氏菌的检测、结果与报告等。

本文件适用于畜禽、畜禽产品及其生产环境中沙门氏菌的检测。

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(包括所有的修改单)适用于本文件。

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

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

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。

BPW:缓冲蛋白胨水(Buffered Peptone Water)

CFU:菌落形成单位(Colony-Forming Unit)

DNA:脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic Acid)

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

MSRV:改良半固体 RV 培养基(Modified Semi-Solid Rappaport-Vassiliadis Medium Base)

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

RT-qPCR:实时荧光定量 PCR(Real Time Quantitative PCR)

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

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

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

5 试剂和材料

5.1 缓冲蛋白胨水(BPW),按照附录 A 中 A.1 配制。

5.2 RV R10 培养基,按照 A.2 配制。

5.3 MSRV 培养基,按照 A.3 配制。



- 5.4 XLT4 培养基,按照 A.4 配制。
- 5.5 0.5×TAE 电泳缓冲液,按照 A.5 配制。
- 5.6 1.2%琼脂糖凝胶,按照 A.6 配制。
- 5.7 蒸馏水:符合 GB/T 6682 中二级水的要求。
- 5.8 无核酸酶水(ddH₂O):符合 GB/T 6682 中一级水要求,不含 DNA 酶和 RNA 酶的去离子水。
- 5.9 PCR Master Mix。
- 5.10 RT-qPCR Master Mix。
- 5.11 细菌 DNA 提取试剂盒。
- 5.12 核酸染料。
- 5.13 Marker:介于 100 bp~2 000 bp 的 DNA 分子质量标准。
- 5.14 10×DNA 凝胶加样缓冲液。
- 5.15 大肠杆菌标准株(ATCC 25922)。
- 5.16 鼠伤寒沙门氏菌标准株(ATCC 19585)。

6 仪器设备

- 6.1 冰箱(2℃~8℃)。
- 6.2 恒温培养箱(37℃±1℃、42℃±1℃)。
- 6.3 高压灭菌锅。
- 6.4 恒温摇床(180 r/min、37℃±1℃)。
- 6.5 无菌采样袋(120 mm×180 mm、450 mm×550 mm)。
- 6.6 无菌培养皿(直径 90 mm)。
- 6.7 无菌接种环(10 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(10 μL、10 μL、200 μL、1 000 μL)及配套吸头。
- 6.14 离心机。
- 6.15 离心管(1.5 mL、10 mL、100 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(200 μL)。
- 6.20 RT-qPCR 管(200 μL)。
- 6.21 凝胶成像仪。
- 6.22 二级生物安全柜。

7 生物安全要求

样品采集、样品处理及检测过程所涉及的试验操作,应遵守 GB 19489 的有关规定。

8 检测程序

沙门氏菌检测程序见图 1。

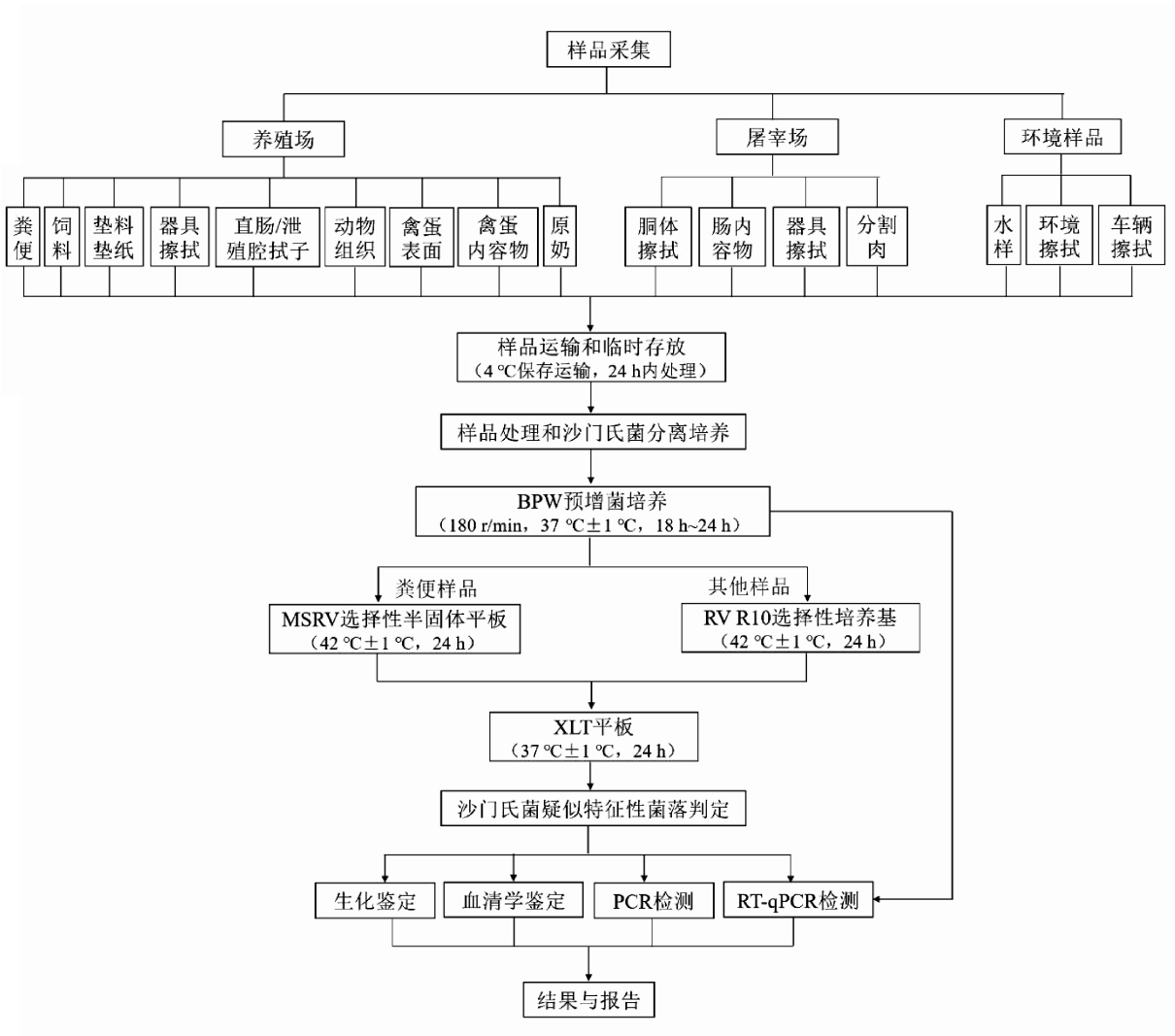


图 1 沙门氏菌检测程序



9 样品采集

9.1 养殖场

9.1.1 动物粪便样品

使用无菌取样勺采集新鲜粪便约 25 g,置于无菌采样袋内密封保存并做好标记。

9.1.2 饲料样品

使用无菌取样勺随机分散采集饲料,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

使用无菌取样勺随机分散采集垫料,每份约 25 g,置于无菌采样袋内密封保存并做好标记。

9.1.4 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。

9.1.5 养殖器具擦拭样品

分别使用 3 个~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,采样面积不少于 100 cm²。将不同养殖器具的擦拭样分类置于无菌采样袋内或含有运送培养基的采样管中密封保存并做好标记。

9.1.6 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 3 cm~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或含有运送培养基的采样管中密封保存并做好标记。

9.1.7 动物组织样品

对于疑似感染沙门氏菌的畜禽进行剖检,采集肝、脾等脏器(肿大或有坏死点部位),每份约 100 g,放入无菌采样袋密封并做好标记。

9.1.8 禽蛋表面擦拭样品

用无菌 BPW 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或含有运送培养基的采样管中密封保存并做好标记。

9.1.9 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。

9.1.10 牛奶样品

使用 100 mL 无菌离心管采集牛奶样品,一般每个样品采集 50 mL,密封保存并做好标记。

9.2 屠宰场

9.2.1 动物胴体擦拭样品

用无菌 BPW 浸润的棉球在动物胴体表面擦拭。家畜等大型动物在不同胴体部位擦拭约 100 cm² 的区域,家禽等小型动物可以擦拭整个胴体表面,然后将棉球置于无菌采样袋内或含有运送培养基的采样管中密封保存并做好标记。

9.2.2 肠内容物样品

用无菌棉签收集约 5 g 小肠(回肠段)内容物,折断手柄后将棉签头部置于无菌采样袋内或含有运

送培养基的采样管中密封保存并做好标记。

9.2.3 屠宰器具擦拭样品

分别使用 3 个~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 $50\text{ cm}^2 \sim 100\text{ cm}^2$ (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或含有运送培养基的采样管中密封保存并做好标记。

9.2.4 分割肉样品

对屠宰后体积较大的分割肉,用无菌棉签转动擦拭生肉样品的表面(面积不少于 100 cm^2),折断手柄后将棉签头部置于无菌采样袋内或含有运送培养基的采样管中密封保存并做好标记。对屠宰后体积较小的分割肉(面积小于 100 cm^2),可直接采集生肉块样品,每份约 100 g,放入无菌采样袋密封保存并做好标记。

9.3 环境样品

9.3.1 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。

9.3.2 环境擦拭样品

包括地面、墙壁的样品,使用 3 个~4 个无菌 BPW 浸润的棉球反复擦拭约 1 m^2 的区域 3 次~4 次,置于无菌采样袋内或含有运送培养基的采样管中密封保存并做好标记。

9.3.3 车辆擦拭样品

使用 3 个~4 个无菌 BPW 浸泡过的棉球分别反复擦拭动物或动物产品运输车辆车厢内侧和底部 3 次~4 次,擦拭面积约 1 m^2 ,置于无菌采样袋内或含有运送培养基的采样管中密封保存并做好标记。

9.4 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 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中低温保存,并在 48 h 内进行处理。

10 分离培养

10.1 样品处理及预增菌

10.1.1 擦拭样品

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(如样品保存在采样管中,取出后置于无菌采样袋中),一般 40 mL 左右,将采样袋密封后置于恒温摇床中, $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 条件下培养 18 h~24 h。

10.1.2 垫纸样品

使用 3 个~4 个无菌 BPW 浸泡过的棉球于采集的垫纸样品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并密封。将采样袋置于恒温摇床中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 条件下培养 18 h~24 h。

10.1.3 分割肉块样品

在无菌条件下,将肉块样品称重后取 25 g 置于无菌均质杯(已按每 25 g 样品加入 225 mL 无菌 BPW)中进行均质,8 000 r/min~10 000 r/min 均质 1 min~2 min,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,置于无菌采样袋中加入 225 mL 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, $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 条件下培养 18 h~24 h。



10.1.4 水和原奶等液体样品

先用普通无菌双层滤纸或纱布预过滤处理,然后用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 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, $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 条件下培养 18 h~24 h。

10.1.5 其他样品

粪便、饲料、垫料等样品称重后,置于无菌采样袋中按每 25 g 样品加入 225 mL 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, $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 条件下培养 18 h~24 h。

10.2 分离纯化

10.2.1 粪便样品

经 BPW 增菌培养后,吸取 300 μL 增菌液,涂布于 MSRV 半固体改良培养基平板(含终浓度 10 mg/L 的新生霉素), $42\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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, $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。

10.2.2 其他样品

吸取 1 mL 增菌液,加入 9 mL RV R10 培养基中, $42\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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, $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。

注:也能选用 GB 4789.4 中规定的分离琼脂平板进行分离培养。

10.3 结果判定

观察各个平板上生长的菌落,是否符合沙门氏菌的菌落特征。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(见附录 B 中图 B.1);其他沙门氏菌多呈黑色透明晕环的细小菌落(见图 B.2)。

11 沙门氏菌的检测

11.1 生化鉴定

按 GB 4789.4 的规定执行。

11.2 血清学鉴定

按 GB 4789.4 的规定执行。

11.3 PCR 检测

11.3.1 PCR 扩增模板制备

吸取样品经 BPW 增菌培养后的液体 1 mL,12 000 r/min 离心 5 min,用移液枪缓慢吸掉上清液(尽量避免吸取菌体沉淀),沉淀用 1 mL 无菌去离子水离心洗涤 1 次,用无菌去离子水重悬沉淀至 200 μL;或者挑选 XLT4 平板疑似沙门氏菌菌落(每个样本至少同时选择 3 个菌落)重悬至 200 μL 无菌去离子水中。

煮沸法(沸水浴 10 min,12 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液)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。

11.3.2 PCR 扩增体系

PCR 引物序列见表 1,PCR 反应体系为:2×PCR Master Mix 12.5 μL,上游引物 *stn1* 和下游引物 *stn2*(2.5 μmol/L)各 1.0 μL,模板 DNA 2.0 μL,无菌去离子水 8.5 μL。分别采用沙门氏菌标准株基因组 DNA、大肠杆菌标准株基因组 DNA、灭菌去离子水作为阳性、阴性和空白对照。PCR 反应程序:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 1 min,55 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1 min,25 个循环;72 ℃ 延伸 10 min,反应结束后立即电泳,或将扩增产物置于 4 ℃ 保存。

表 1 沙门氏菌 PCR 检测的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>stn1</i>	5'-CTTTGGTCGTAAAATAAGGCG-3'	260 bp
	<i>stn2</i>	5'-TGCCCAAAGCAGAGAGATTC-3'	

11.3.3 PCR 产物检测

取 10 μL 的 PCR 产物,于 1.2% 琼脂糖凝胶中,130 V 电压电泳 45 min,在凝胶成像仪中观察结果并拍照。

11.3.4 质量控制

如阳性对照扩增出 260 bp 左右的片段同时阴性对照和空白对照均未扩增出 260 bp 左右的片段,则 PCR 反应判定为有效;如阳性对照未扩增出 260 bp 左右的片段,或者阴性对照和空白对照任一扩增出 260 bp 左右的片段,则反应无效。

11.3.5 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,如样品扩增出 260 bp 左右的条带,则判定样品为阳性;如样品未出现 260 bp 左右的条带,则样品判定为阴性,如附录 C 中图 C.1 所示。

11.4 荧光定量 PCR 检测

11.4.1 RT-qPCR 扩增模板制备

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,也可使用未增菌或增菌处理后的样品模板进行定性检测。未增菌处理样品以水样等液体样品为主,增菌处理样品为经 BPW 增菌培养后的液体或分离纯化的疑似沙门氏菌菌落,处理方法见附录 D 中 D.1,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。沙门氏菌标准株和大肠杆菌标准株基因组 DNA 模板的制备方法见 D.2。

11.4.2 RT-qPCR 扩增体系

RT-qPCR 引物和探针序列见表 2,其中 *stn* 引物序列与普通 PCR 相同,两者可通用。RT-qPCR 反应体系为:2×PCR Master Mix 12.5 μL,上游引物 *stn*1 和下游引物 *stn*2(10 μmol/L)各 0.5 μL,荧光探针(3 μmol/L)1.0 μL,ROX Reference Dye 0.5 μL,模板 DNA 2.0 μL,无菌去离子水 8.0 μL。分别以沙门氏菌标准株基因组 DNA、大肠杆菌标准株基因组 DNA、灭菌去离子水作为阳性、阴性和空白对照。在荧光定量 PCR 仪中设置如下反应程序进行扩增:95 ℃ 预变性 10 s;95 ℃ 10 s,60 ℃ 34 s,40 个循环。反应结束后,对获得的信号数据进行处理。

表 2 沙门氏菌 RT-qPCR 检测的引物和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
<i>stn</i>	荧光探针	5'-FAM-CCTTTCCCCGCTATCGGTAAC-BHQ1-3'	260 bp
	<i>stn</i> 1	5'-CTTTGGTTCGTAATAAGGCG-3'	
	<i>stn</i> 2	5'-TGCCCAAAGCAGAGAGATTTC-3'	

11.4.3 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,通过 10 倍梯度稀释制备一定浓度梯度的 DNA 模板,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(见 D.3),用于样品中沙门氏菌量的估算。

11.4.4 质量控制

以下条件有一条不满足时,试验视为无效,需重新进行试验:

- 空白对照:无荧光对数增长,相应的 Ct 值>40.0 或无 Ct 值;
- 阴性对照:无荧光对数增长,相应的 Ct 值>40.0 或无 Ct 值;
- 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;
- 标准曲线:标准品扩增获得的标准曲线,各参数应与本文件提供的接近。

11.4.5 结果判定

11.4.5.1 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≤36 判定为阳性,36<Ct≤40 判定为可疑。可疑样品需重复检测或结合其他检测方法判定结果。

11.4.5.2 定量检测

通过标准品的扩增获得标准曲线(见图 D.1 和图 D.2),将待测样品的 C_t 值代入该标准曲线即可获得样品中细菌的数量。

12 结果与报告

对 10.3 中分离培养后的疑似菌落进一步进行生化试验、PCR 检测或荧光定量 PCR 检测等任一方法的检测,如为阳性结果,报告样品中检出沙门氏菌;或者对 10.1 中预增菌液进行 PCR 检测或荧光定量 PCR 检测,如为阳性结果,报告样品中检出沙门氏菌。检出的沙门氏菌经血清学鉴定后,可报告样品中检出具体的沙门氏菌血清型。

附 录 A
(规范性)
培养基与试剂的配制

A.1 缓冲蛋白胨水(BPW)

配制 BPW 所需试剂如下:

- 10.0 g 的胰蛋白胨;
- 5.0 g 的氯化钠(NaCl);
- 9.0 g 的磷酸氢二钠(Na_2HPO_4);
- 1.5 g 的磷酸二氢钾(KH_2PO_4);
- 0.25 g 的硫酸亚铁(FeSO_4)。

溶剂加蒸馏水溶解至 1 000 mL,使用 1 mol/L NaOH 或 HCl 溶液调节 pH 为 7.2 ± 0.2 ,121 °C 高压灭菌 15 min,室温保存备用。

A.2 RV R10 培养基

配制 RV R10 培养基所需试剂如下:

- 4.54 g 的酪蛋白胨;
- 7.3 g 的氯化钠(NaCl);
- 1.45 g 的磷酸二氢钾(KH_2PO_4);
- 13.4 g 的无水氯化镁(MgCl_2);
- 0.036 g 的孔雀绿草酸盐。

溶剂加热溶于 1 000 mL 蒸馏水中,使用 1 mol/L NaOH 或 HCl 溶液调节 pH 为 5.1 ± 0.2 ,分装于试管中,115 °C 高压灭菌 15 min,室温保存备用。

A.3 MSRV 培养基

配制 MSRV 培养基所需试剂如下:

- 4.6 g 的胰蛋白胨;
- 4.6 g 的酸水解酪蛋白;
- 7.3 g 的氯化钠(NaCl);
- 1.5 g 的磷酸二氢钾(KH_2PO_4);
- 10.9 g 的无水氯化镁(MgCl_2);
- 0.04 g 的孔雀绿草酸盐;
- 2.7 g 的琼脂。

溶剂加热溶于 1 000 mL 蒸馏水中,使用 1 mol/L NaOH 或 HCl 溶液调节 pH 为 5.2 ± 0.2 ,煮沸 1 min,无需高压灭菌,冷至 50 °C 左右时,加入 10 mg 新生霉素,混匀,倾入无菌平皿中,室温保存备用。

A.4 XLT4 培养基

配制 XLT4 培养基所需试剂如下:

- 3.75 g 的木糖;
- 1.6 g 的蛋白胨;
- 5.0 g 的 L-赖氨酸;

- 7.5 g 的乳糖；
- 7.5 g 的蔗糖；
- 5.0 g 的氯化钠；
- 3.0 g 的酵母膏粉；
- 0.08 g 的酚红；
- 6.8 g 的硫代硫酸钠；
- 0.8 g 的柠檬酸铁铵；
- 18.0 g 的琼脂。

溶剂加蒸馏水溶解至 1 000 mL,使用 1 mol/L NaOH 或 HCl 溶液调节 pH 为 7.4 ± 0.2 ,搅拌加热煮沸至完全溶解,冷却至 45 ℃,添加 4.61 mL 商品化 XLT4 配套添加剂(7-乙基-2-甲基-4-十一烷基硫酸钠),倾入无菌平皿中,室温保存备用。

A.5 0.5×TAE 电泳缓冲液

242.0 g Tris 和 18.612 g EDTA 溶于 800 mL 的去离子水中,充分搅拌溶解,加入 57.1 mL 冰乙酸,用 5mol/L 的 NaOH 将 pH 调节至 8.3,加去离子水定容至 1 000 mL,即配成 50×TAE 电泳缓冲母液。使用时,取 10 mL 母液溶于 990 mL 去离子水中混匀,即为 0.5×TAE 电泳缓冲液工作液。

A.6 1.2%琼脂糖凝胶

1.2 g 琼脂糖加入 100mL 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。

附录 B

(资料性)

沙门氏菌的菌落特征

疑似鸡白痢沙门氏菌/鸡伤寒沙门氏菌在 XLT4 平板的菌落特征见图 B.1,疑似其他血清型沙门氏菌的菌落特征见图 B.2。

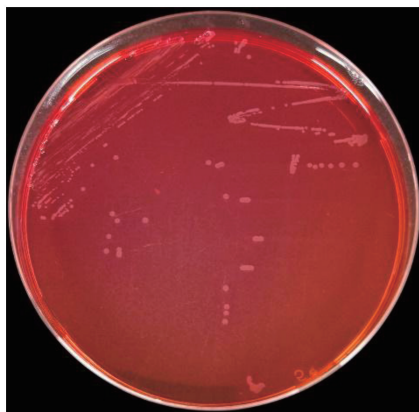


图 B.1 疑似鸡白痢沙门氏菌/鸡伤寒沙门氏菌的菌落特征

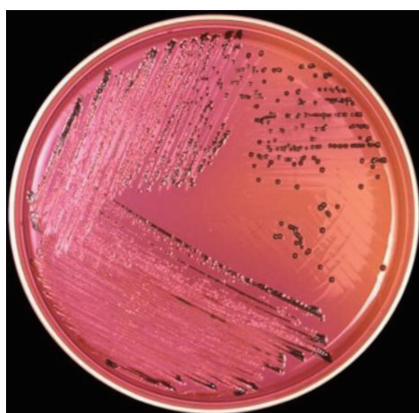
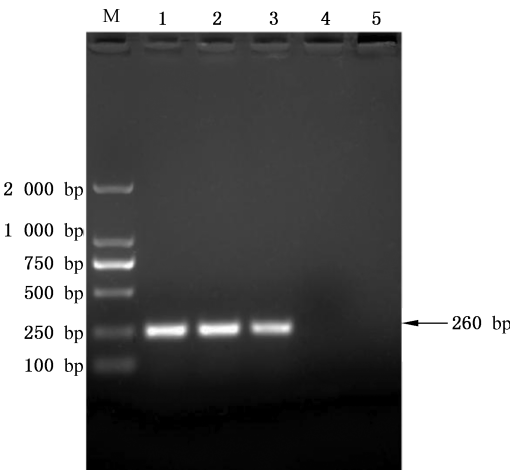


图 B.2 疑似其他血清型沙门氏菌(此处以鼠伤寒沙门氏菌为例)的菌落特征

附 录 C
(资料性)
沙门氏菌 PCR 检测

沙门氏菌 PCR 扩增反应结果的凝胶电泳鉴定示例图见图 C.1。



标引序号说明：

- M ——DNA 分子质量标准 DL2000；
- 1 ——阳性对照；
- 2~3 ——不同阳性样品；
- 4 ——阴性对照；
- 5 ——空白对照。

图 C.1 沙门氏菌 PCR 扩增结果

附 录 D

(资料性)

沙门氏菌实时荧光定量 PCR 检测

D.1 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,用 1 mL 无菌去离子水重悬洗涤 1 次,12 000 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),或直接挑取分离纯化后的疑似沙门氏菌菌落(定性检测);用无菌去离子水重悬沉淀或菌落至 200 μ L;沸水浴 10 min,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液即为待测样品 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。

D.2 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标准株、大肠杆菌标准株菌液各 1 mL 置于 1.5 mL 离心管中,同 11.3.1 普通 PCR 方法制备阳性对照和阴性对照样品基因组 DNA 模板。

D.3 标准品模板和标准曲线的制备

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 1×10^6 CFU/mL、 1×10^5 CFU/mL、 1×10^4 CFU/mL、 1×10^3 CFU/mL、 1×10^2 CFU/mL,分别取 1 mL 菌液置于 1.5 mL 离心管中,12 000 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 μ L,沸水浴 10 min 后 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液即为标准品 DNA 模板。通过不同浓度标准品的扩增(见图 D.1),获得反映 Ct 值随细菌数变化的标准曲线 $C_t = -3.602x + 36.409$,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 $R^2 = 0.993$ (见图 D.2)。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。

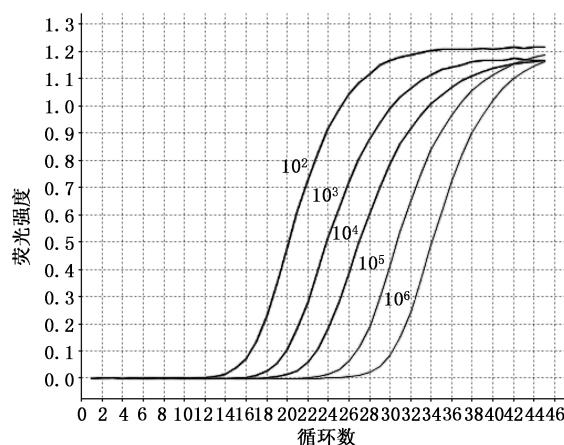


图 D.1 沙门氏菌 RT-qPCR 标准品的扩增曲线

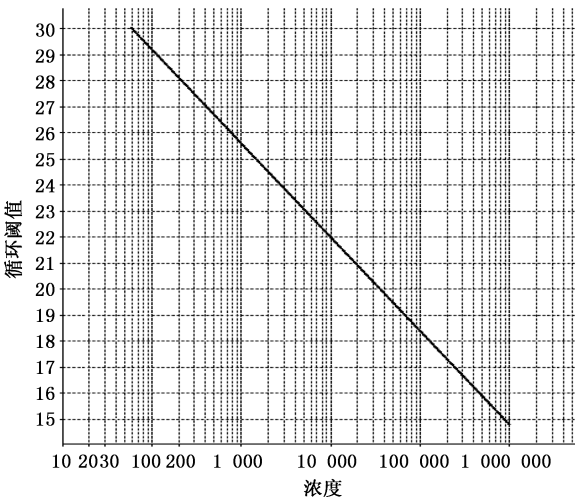


图 D.2 沙门氏菌 RT-qPCR 标准品扩增的标准曲线
