

团 体 标 准

T / CIFST 017—2023

葡萄球菌肠毒素测定 ELISA试剂盒法

Detection of staphylococcal enterotoxins—
ELISA kits method

2023-12-22 发布

2023-12-22 实施

中国食品科学技术学会 发布

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。

本文件由中国食品科学技术学会提出并归口。

本文件起草单位：北京市疾病预防控制中心、中国疾病预防控制中心营养与健康所、澳优乳业（中国）有限公司、北京三元食品股份有限公司、拜发分析系统销售（北京）有限公司。

本文件主要起草人：王迪、崔霞、张鹏航、陈倩、牛然、周钧、刘倩、陈历俊、刘继超、贺丽丽、葛丽花、廖冰君。

葡萄球菌肠毒素测定 ELISA 试剂盒法

1 范围

本文件规定了食品及金黄色葡萄球菌培养液中葡萄球菌肠毒素测定的酶联免疫吸附 ELISA 试剂盒方法。

本文件适用于食品及金黄色葡萄球菌培养液中葡萄球菌肠毒素及其分型的定性测定。

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 4789.10 食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验

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 方法原理

样品中游离的葡萄球菌肠毒素(抗原)与微孔中包被的抗体特异性结合,形成抗原抗体复合物。将与抗体结合的物质充分洗去,用酶标记物进行标记,在酶反应底物/发色剂的作用下,微孔中的液体由无色变为蓝色。反应结束后,加入终止液终止反应,这时微孔中的液体由蓝色变为黄色。使用酶标仪 $[(450\text{ nm}\pm 10\text{ nm})/(620\text{ nm}\pm 10\text{ nm})]$ 测量微孔溶液的吸光度,样品中葡萄球菌肠毒素含量与吸光度成正比。

4 设备和材料

- 4.1 葡萄球菌肠毒素检测试剂盒 RIDASCREEN® SET Total(见附录 A)。
- 4.2 葡萄球菌肠毒素分型检测试剂盒 RIDASCREEN® SET A、B、C、D、E(见附录 B)。
- 4.3 酶标仪: $(450\text{ nm}\pm 10\text{ nm})/(620\text{ nm}\pm 10\text{ nm})$ 。
- 4.4 分析天平:感量 0.01 g。
- 4.5 均质器/振荡器。
- 4.6 培养箱: $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 4.7 冷冻离心机: $\geq 3\ 500\text{ r/min}$, $\leq 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 4.8 离心管 50 mL:玻璃或聚丙烯材质。
- 4.9 单道移液器: $20\ \mu\text{L}\sim 200\ \mu\text{L}$, $100\ \mu\text{L}\sim 1\ 000\ \mu\text{L}$ 。
- 4.10 八道移液器: $30\ \mu\text{L}\sim 300\ \mu\text{L}$ 。
- 4.11 冰箱:冷藏 $5\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$,冷冻 $\leq -18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 4.12 pH 计: $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下精度为 0.01。
- 4.13 无菌滤膜: $0.22\ \mu\text{m}$ 。

4.14 无菌注射器:10 mL。

5 试剂和培养基

5.1 实验用水:符合 GB/T 6682 规定的三级水要求。

5.2 PBS 缓冲液:8.70 g NaCl、0.55 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、2.85 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,用水定容至 1 L,调 pH 至 7.4。

5.3 1×洗涤缓冲液:按照 1:10 比例稀释 10×洗涤缓冲液浓缩液。稀释后的 1×洗涤缓冲液可在 2℃~8℃ 保存 1 周。若 10×洗涤缓冲液浓缩液稀释前有结晶,需在 37℃ 水浴锅中加热至完全溶解后再配置。

5.4 正庚烷:分析纯。

5.5 脑心浸液培养基(BHI):10.0 g 胰蛋白胨、2.0 g 葡萄糖、5.0 g 牛心粉、5.0 g 氯化钠、2.5 g 磷酸氢二钠($12\text{H}_2\text{O}$),用水定容至 1 L,加热煮沸至完全溶解,分装试管,121℃ 高压灭菌 15 min 备用。

6 检测程序

葡萄球菌肠毒素检测程序见图 1。

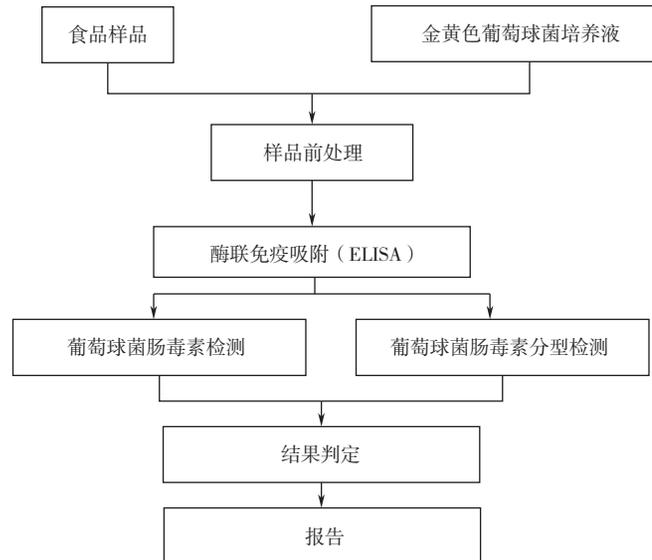


图 1 葡萄球菌肠毒素检测程序

7 操作步骤

7.1 样品前处理

7.1.1 食品样品

7.1.1.1 液态样品(如生鲜乳、巴氏杀菌乳、调制乳、饮料等)

充分混匀待检样品,吸取样品 10 mL~25 mL,3 500 r/min 10℃ 离心 10 min,完全去除脂肪层,取上清液进行检测,并将待检样品的 pH 控制在 7.0 ± 0.5 范围内。

7.1.1.2 粉状样品(如婴幼儿配方粉、乳粉、调制乳粉、食品原料等)

充分混匀待检样品,称取 10 g~25 g 进行均质之后称取 1 g 加入 10 mL 无菌蒸馏水,漩涡混匀,3 500 r/min 10 ℃离心 10 min,完全去除脂肪层,取上清液进行检测(结果以溶解后的液体计),并将待检样品的 pH 控制在 7.0 ± 0.5 范围内。

7.1.1.3 脂肪含量小于 40% 的样品(如米、面及其制品,豆制品等)

充分混匀待检样品,称取 10 g~25 g 均质后按每克样品加入 1.5 mL PBS 缓冲液的比例(例如 10 g 样品+15 mL PBS 缓冲液),振荡混合 15 min,3 500 r/min 10 ℃离心 10 min,完全去除脂肪层,取上清液进行检测。

7.1.1.4 脂肪含量大于等于 40% 的样品(如肉制品等)

充分混匀待检样品,称取 10 g~25 g 均质后按每克样品加入 1.5 mL PBS 缓冲液的比例(例如 10 g 样品+15 mL PBS 缓冲液),振荡混合 15 min,3 500 r/min 10 ℃离心 10 min,取一定量上清液移至另一个离心管中,加入与所取上清液相同体积的正庚烷,充分混合 5 min,3 500 r/min 10 ℃离心 10 min,完全去除上层庚烷层,取下层清液进行检测。

7.1.2 金黄色葡萄球菌培养液

将纯培养的待测金黄色葡萄球菌接种于脑心浸液培养基(BHI)过夜培养。取 1.5 mL~2 mL 培养液置于离心管中,3 500 r/min 10 ℃离心 5 min,将上清液用无菌注射器和无菌滤膜过滤除菌,取滤液进行检测。

7.2 葡萄球菌肠毒素检测

7.2.1 将预先包被有葡萄球菌肠毒素特异性抗体的微孔条(见附录 A)插入微孔板架(见附录 A),标记样品液、阴性质控液(见附录 A)和阳性质控液(见附录 A)的位置。

7.2.2 在相应的微孔中分别加入 100 μ L 处理好的样品液、阴性质控液及阳性质控液。盖上微孔板,35 ℃~37 ℃孵育 1 h。

7.2.3 取出微孔板,倒去微孔中的液体,每个微孔加入 300 μ L 1 \times 洗涤缓冲液洗涤,混合静置后倒去洗涤液,拍干微孔板(力度适中)。重复上述步骤 5 次(可由自动洗板机完成)。

7.2.4 洗板后,每个微孔加入 100 μ L 酶标记物 1 溶液(见附录 A),盖上微孔板,35 ℃~37 ℃孵育 1 h。

7.2.5 取出微孔板,进行第 2 次洗板(按照 7.2.3 操作)。

7.2.6 洗板后,每个微孔加入 100 μ L 酶标记物 2 溶液(见附录 A),盖上微孔板,35 ℃~37 ℃孵育 30 min。

7.2.7 取出微孔板,进行第 3 次洗板(按照 7.2.3 操作)。

7.2.8 洗板后,每个微孔加入 100 μ L 底物/发色剂(见附录 A),水平方向轻摇微孔板使微孔中的液体充分混合,盖上微孔板,35 ℃~37 ℃避光孵育 15 min。

7.2.9 取出微孔板,每个微孔加入 100 μ L 终止液,水平方向轻摇微孔板使微孔中的液体充分混合,30 min 之内读取(450 nm \pm 10 nm)/(620 nm \pm 10 nm)波长下吸光度(OD)。

7.3 葡萄球菌肠毒素分型检测

7.3.1 将预先包被有抗体的微孔板条(见附录 B)按照 A—H 的方向插入微孔板架(见附录 B),每一件待测样品使用一条微孔板条。

7.3.2 在微孔板条 A~G 孔中各加入 100 μ L 处理好的样品液,在 H 孔加入 100 μ L 阳性质控液(见附录 B),轻轻混匀后,盖上微孔板,35 ℃~37 ℃孵育 1 h。

7.3.3 取出微孔板,倒去微孔中的液体,每个微孔加入 300 μ L 1 \times 洗涤缓冲液洗涤,混合静置后倒去洗涤液,拍干微孔板(力度适中)。重复上述步骤 5 次(可由自动洗板机完成)。

7.3.4 洗板后,每个微孔加入 100 μ L 酶标记物 1 溶液(见附录 B),盖上微孔板,35 ℃~37 ℃孵育 1 h。

7.3.5 取出微孔板,进行第2次洗板(按照7.3.3操作)。

7.3.6 洗板后,每个微孔加入100 μL 酶标记物2溶液(见附录B),盖上微孔板,35 $^{\circ}\text{C}$ ~37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min。

7.3.7 取出微孔板,进行第3次洗板(按照7.3.3操作)。

7.3.8 洗板后,每个微孔加入100 μL 底物/发色剂(见附录B),水平方向轻摇微孔板使微孔中的液体充分混合,盖上微孔板,35 $^{\circ}\text{C}$ ~37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育15 min。

7.3.9 取出微孔板,每个微孔加入100 μL 终止液,水平方向轻摇微孔板使微孔中的液体充分混合,30 min之内读取(450 nm \pm 10 nm)/(620 nm \pm 10 nm)波长下吸光度(OD)。

8 结果与报告

8.1 检测有效性判定

阳性质控孔的吸光度(OD)应 \geq 1.0,阴性质控孔的吸光度(OD)应 \leq 0.2,如果不能同时满足以上要求,检测结果无效。

8.2 检出限

8.2.1 食品样品:液态样品及溶解后的粉状样品0.25 ng/mL,其他样品0.375 ng/g(mL)。

8.2.2 金黄色葡萄球菌培养液0.25 ng/mL。

8.3 临界值计算

8.3.1 葡萄球菌肠毒素检测:临界值=阴性质控孔的吸光度(OD)+0.15。

8.3.2 葡萄球菌肠毒素分型检测:临界值=[F孔吸光度(OD)+G孔吸光度(OD)]/2+0.15。

8.4 结果判定及报告

8.4.1 葡萄球菌肠毒素检测

若结果显示样品吸光度(OD) $<$ 临界值,报告未检出葡萄球菌肠毒素。若结果显示样品吸光度(OD) \geq 临界值,报告检出葡萄球菌肠毒素。

8.4.2 葡萄球菌肠毒素分型检测

若结果显示样品吸光度(OD) $<$ 临界值,报告未检出某型葡萄球菌肠毒素。若结果显示样品吸光度(OD) \geq 临界值,报告检出某型葡萄球菌肠毒素。

9 质量控制

9.1 实验前应确认试剂盒有效期,如阳性质控孔的吸光度(OD) $<$ 1.0或底物/发色剂在使用前颜色变蓝则表明试剂已失效,不得使用。

9.2 若检测结果的吸光度(OD)超出仪器读值的线性范围,则需要用PBS缓冲液稀释培养物上清液,重新检测。

9.3 当葡萄球菌肠毒素分型检测同时检出两种或两种以上肠毒素时,按附录C对检测结果进行修正。

9.4 金黄色葡萄球菌培养液前处理(除离心操作外)、葡萄球菌肠毒素定性及分型检测等实验操作应在生物安全柜中进行。

9.5 在称量、均质样品和葡萄球菌肠毒素检测三个实验阶段分别佩戴新的一次性乳胶手套。

10 生物安全

按照 GB 19489 处理实验废弃物。

附 录 A

(规范性)

葡萄球菌肠毒素检测试剂盒

A.1 试剂盒组成

葡萄球菌肠毒素检测试剂盒 RIDASCREEN® SET Total 包括:

- A.1.1 预包被葡萄球菌肠毒素多价抗体的可拆分微孔板:8×12 孔;
- A.1.2 阳性质控液:2 mL/瓶×1 瓶;
- A.1.3 阴性质控液:2 mL/瓶×1 瓶;
- A.1.4 10×洗涤缓冲液浓缩液:100 mL/瓶×1 瓶;
- A.1.5 酶标记物 1 溶液:11 mL/瓶×1 瓶;
- A.1.6 酶标记物 2 溶液:11 mL/瓶×1 瓶;
- A.1.7 底物/发色剂:13 mL/瓶×1 瓶;
- A.1.8 终止液:14 mL/瓶×1 瓶。

A.2 试剂盒保存及使用

- A.2.1 试剂盒于 2℃~8℃ 黑暗处避光保存,使用前回复至室温(20℃~25℃);使用完尽快放回 2℃~8℃,不可冷冻。未使用的微孔板孔,必须与袋中的干燥剂一起,重新放入铝箔封口袋中并封好,2℃~8℃ 保存。
- A.2.2 不同批号试剂盒中组分不得混用。
- A.2.3 超过有效期的试剂盒不得使用。

附 录 B

(规范性)

葡萄球菌肠毒素分型检测试剂盒

B.1 试剂盒组成

葡萄球菌肠毒素分型检测试剂盒 RIDASCREEN® SET A、B、C、D、E 包括：

B.1.1 可拆分微孔板(8×12孔)：A~E孔预包被葡萄球菌肠毒素 A、B、C、D、E型特异性抗体，H孔预包被葡萄球菌肠毒素多价抗体，F和G孔预包被非葡萄球菌肠毒素的特异性抗体；

B.1.2 阳性质控液：2 mL/瓶×1瓶；

B.1.3 10×洗涤缓冲液浓缩液：100 mL/瓶×1瓶；

B.1.4 酶标记物 1 溶液：11 mL/瓶×1瓶；

B.1.5 酶标记物 2 溶液：11 mL/瓶×1瓶；

B.1.6 底物/发色剂：13 mL/瓶×1瓶；

B.1.7 终止液：14 mL/瓶×1瓶。

B.2 试剂盒保存及使用

B.2.1 试剂盒于 2℃~8℃ 黑暗处避光保存，使用前回复至室温(20℃~25℃)；使用完尽快放回 2℃~8℃，不可冷冻。未使用的微孔板孔，必须与袋中的干燥剂一起，重新放入铝箔封口袋中并封好，2℃~8℃保存。

B.2.2 不同批号试剂盒中组分不得混用。

B.2.3 超过有效期的试剂盒不得使用。

附 录 C

(规范性)

葡萄球菌肠毒素分型检测结果修正方法

C.1 单型别葡萄球菌肠毒素吸光度(OD)

单型别葡萄球菌肠毒素吸光度(OD)应该介于 1.0 到 2.5 之间。当 $OD > 2.5$ 时,需使用 PBS 缓冲液稀释检测样品,并重新进行检测,使其吸光度(OD)介于 1.0 到 2.5 之间。

C.2 A/E 孔或 B/C 孔吸光度(OD)均 < 2.5

当吸光度(OD)较低孔的吸光度(OD) \leq 吸光度(OD)较高孔的吸光度(OD)的 50% 时,报告为样品中含有吸光度(OD)较高的孔的某型葡萄球菌肠毒素。当吸光度(OD)较低孔的吸光度(OD) $>$ 吸光度(OD)较高孔的吸光度(OD)的 50% 时,报告为样品中含有两种型别的葡萄球菌肠毒素。
