



T/CAIA

中国分析测试协会标准

T/CAIA/SH008-2017

食品金黄色葡萄球菌实时荧光核酸恒温扩增 检测（SAT）方法

Real-Time Simultaneous Amplification and Testing (SAT)
method for detecting *S. aureus* in foods

2017-07-20 发布

2017-10-01 实施

中国分析测试协会发布

前言

本标准按照 GB/T 1.1-2009 规则起草。

本标准由中国分析测试协会标准化委员会提出并归口。

本标准起草单位：上海交通大学公共卫生学院、中国科学院上海生命科学研究院、上海仁度生物科技有限公司。

本标准的附录 A、附录 B 为资料性附录，附录 C 为规范性附录。

本标准主要起草人：王慧、邱红玲、储瑞蔼、张常娥、于明辉。

本标准首次发布。

食品金黄色葡萄球菌实时荧光 核酸恒温扩增检测（SAT）方法

1 范围

本标准规定了食品中金黄色葡萄球菌（*S.aureus*）的 SAT 检验技术方法。
本标准适用于肉制品（熟肉制品、即食生肉制品），水产制品（熟制水产品、即食生制水产品、即食藻类制品），乳与乳制品（乳及液态乳制品、半固态乳制品、固态乳制品）中金黄色葡萄球菌的检验。

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，其最新版本适用于本部分。

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 4789.1 食品安全国家标准食品微生物学检验总则

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

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

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准

恒温扩增实时荧光检测技术（Simultaneous Amplification and Testing，**SAT**）：指 RNA 恒温扩增实时荧光检测技术。

4 SAT 原理

在同一温度下，以细菌 RNA 为起始模板，通过 M-MLV 反转录酶产生靶标 RNA 的一个双链 DNA，然

后利用 T7 RNA 多聚酶以该 DNA 为模板产生多个 (100~1000) RNA 拷贝; 每个 RNA 拷贝数再从反转录开始进入下一个扩增循环; 同时, 带有荧光标记的优化探针和这些 RNA 拷贝特异结合后, 打开茎环结构, 从而产生荧光, 根据实时荧光信号的出现时间和强度, 结合阳性对照和阴性对照即可对检测结果进行判定。

5 材料和设备

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外, 其它设备如下:

- 5.1 实时荧光恒温检测系统。
- 5.2 台式离心机。
- 5.3 恒温培养箱: $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。
- 5.4 振荡器。
- 5.5 冰箱 ($2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 和 -20°C 或 -80°C)。
- 5.6 均质器。
- 5.7 电子天平 (感量 0.1 g)。
- 5.8 微量可调移液器及配套无 DNA/RNA 酶吸头 ($10\mu\text{L}$ 、 $100\mu\text{L}$ 、 $1000\mu\text{L}$)。
- 5.9 无 DNA/RNA 酶离心管 (0.5 mL 、 1.5 mL 、 2.0 mL)
- 5.10 水浴槽
- 5.11 恒温混匀仪
- 5.12 制冰机
- 5.13 干热恒温器
- 5.14 分光光度计
- 5.15 比色皿

6 试剂

除特别说明外, 所用试剂均为分析纯, 实验用水为按照 GB/T 6682 规定的一级水, 溶解 RNA 实验用水必须为无 RNA 酶污染一级水, 所用试剂均用无 DNA/RNA 酶污染的容器分装。

- 6.1 7.5%氯化钠肉汤: 见附录 A 中 A.1。
- 6.2 10%氯化钠胰酪胨大豆肉汤: 见附录 A 中 A.2。

6.3 无菌生理盐水：见附录 A 中 A.3。

6.4 金黄色葡萄球菌 SAT 实验相关引物和探针：

上游引物：扩增金黄色葡萄球菌种属特异性基因的转录产物 RNA 的上游引物（序列见附录 B 中 B. 1.1）。

下游引物：扩增金黄色葡萄球菌种属特异性基因的转录产物 RNA 的下游引物，包含 T7 启动子识别位点（序列见附录 B 中 B. 1.1）。

金黄色葡萄球菌特异性探针：探针的 5'端标记荧光报告基团 FAM，3'端标记荧光淬灭基团 DABCYL（序列见附录 B 中 B. 1.1）。

内质控 RNA（IC-RNA），体外转录成 RNA，加入到每个反应体系中（序列见附录 B 中 B. 1.1）。

内质控探针：探针的 5'端标记荧光报告基团 HEX，3'端标记荧光淬灭基团 DABCYL，识别内质控 RNA 上的特定序列（序列见附录 B 中 B. 1.1）。

6.5 阳性质控品：由有资质的权威机构提供金黄色葡萄球菌标准菌株，-80℃冰箱保存。（来源和编号见附录 B. 1.1）

6.6 SAT 反应液（成分见附录 B. 1.1）

6.7 SAT 酶液（含 M-MLV 反转录酶、T7 RNA 多聚酶等成分，见附录 B.1.1）

6.8 氯仿

6.9 异丙醇

6.10 无水乙醇

6.11 RNA 提取试剂盒

6.12 溶菌酶

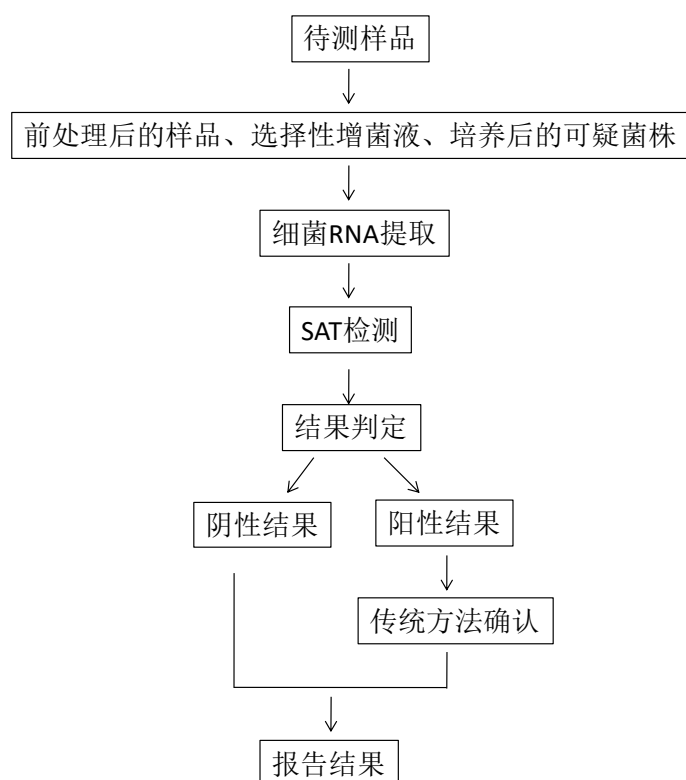
6.13 Trizol 溶液

7 实验室安全防护

实验室结构和设施、安全操作规程、安全设备及个体防护应符合 GB 19489 中二级生物安全防护实验的

要求。

8 检测流程



9 样本的采集、保存和运送

9.1 样品采集

食品样品的采集按照 GB 4789.1 要求执行。

9.2 样本的保存

样品采集后应尽早检测，如需保存，非冷冻样品采集后应立即置 7℃~10℃冰箱保存，冷冻样品置于 -20℃冰箱保存。

10 实验室检测

实验室质量控制应按 GB/T 27403 和 GB/T 27405 进行。SAT 检测质量控制见附录 C。

10.1 样品前处理

10.1.1 实验室收到样品后，应尽可能及早检验，若不能及时检验，应采取必要的措施保持样品的原有

状态；冷冻样品应在 45 °C 以下不超过 15 min 或在 2°C~5°C 不超过 18 h 解冻。

10.1.2 固体样品以无菌操作取样品 25 g，若需要增菌培养，加入 225 mL 7.5 % 氯化钠肉汤或 10 % 氯化钠胰酪胨大豆肉汤，若不需要增菌培养，则加入 225 mL 无菌生理盐水。8000~10000 r/min 均质 1~2 min，或放入盛有 225 mL 7.5 % 氯化钠肉汤或 10 % 氯化钠胰酪胨大豆肉汤的无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打 1~2 min，制备成 1:10 的样品匀液。

10.1.3 液体样品以无菌操作取样品 25 mL，若需要增菌培养，加入 225 mL 7.5 % 氯化钠肉汤或 10 % 氯化钠胰酪胨大豆肉汤的无菌锥形瓶(瓶内可预置适当数量的无菌玻璃珠)中，振荡混匀；若不需要增菌培养，则直接取样品进行测试。

10.2 增菌（可选择）

将上述需要增菌的 1:10 样品匀液(7.5 % 氯化钠肉汤或 10 % 氯化钠胰酪胨大豆肉汤)于 36°C ± 1°C 培养 18 h~24 h；不需要增菌的样品，直接取 1:10 样品匀液上清液或样品原液备用。

10.3 样品 RNA 提取

10.3.1 样品处理

在样品制备区进行，为确保检测结果的准确性，在进行实际样品检测时，应设立阳性对照、阴性对照试验；然后提取实际样品、阳性对照样品和阴性对照样品中的 RNA。

10.3.2 提取方法

Trizol 法提取 RNA

(1) 取 1 mL 样品至 1.5 mL 离心管中，10,000 r/min 离心 1min，彻底弃掉培养基，加入 100 μL (3mg/mL) 溶菌酶（或用溶葡萄球菌酶酶解），37°C 悬浮细菌酶解 5 min -10 min。

(2) 立即加入 1 mL Trizol 溶液，盖紧管盖，激烈震荡 15s，冰上静置 5min，12,000 r/min 离心 10min，取上层无色水相转入新的 1.5 mL 离心管中；

(3) 每管加入 200 μL 的氯仿，盖紧管盖，激烈震荡 15s，冰上静置 5min，12,000 r/min 2°C~8°C 离心 10min，小心吸取上层水相，转入新的 1.5mL 离心管，定量；

(4) 加入等体积的氯仿盖紧管盖，激烈震荡 15s，冰上静置 5min，12,000 r/min 2°C~8°C 离心 10min，小心吸取上层水相，转入新的 1.5mL 离心管。

(5) 加入 500 μL -20°C 预冷的异丙醇，轻轻颠倒混匀； 12,000 r/min $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 离心 10min，小心吸去上清；

(6) 加入 500 μL -20°C 预冷的 75% 的乙醇（使用无 RNA 酶的灭菌水配制），并轻柔颠倒，洗涤沉淀；12,000 r/min $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 离心 5min,小心吸去上清；微离，吸去剩余乙醇，室温干燥 5 min；

(7) 加入 20 μL 无 RNA 酶水溶解 RNA。

(8) 利用分光光度计测定样品 OD₂₆₀，以 1 个 OD 相当于 40mg/L RNA 浓度来计算 RNA 浓度。

注：RNA 提取可采用上述方法，也可使用等效的商业化 RNA 提取试剂盒和 RNA 纯化磁珠等，并按其说明提取制备模板 RNA。

10.4 扩增检测液配制

在 PCR 反应管中按表 1 依次加入反应试剂，混匀。也可采用经验证的、等效的 SAT 检测反应试剂盒，见附录 B。

表 1 扩增检测液配制

加入试剂成分	工作液浓度	加样量/ μL
SAT 反应液	1 ×	28 μL
上游引物	10 μM	0.25 μL
下游引物	10 μM	0.25 μL
金黄色葡萄球菌特异性探针	10 μM	0.25 μL
内质控探针	10 μM	0.25 μL
内质控 RNA	-	0.5 μL
RNA 样品	-	2 μL

10.5 恒温扩增检测

10.5.1 设定荧光检测仪器反应条件为：42℃ 1min，共 60 个循环，荧光通道设定为 F1（FAM）和 F2（HEX 或波长相近的其他染料，如：VIC），荧光信号每分钟收集 1 次，反应体系为 40μL。

10.5.2 移取 30μL 上述提取后扩增检测液转移至微量反应管中，放置在干热恒温器上 60℃ 保温 10min，然后 42℃ 保温 5min。快速加入提前预热至 42℃ 的 SAT 酶液 10μL（含 2000U MMLV 逆转录酶和 2000U T7 RNA 多聚酶）于每个反应管中，1200rpm 离心 15s 混匀。

10.5.3 将微量反应管迅速放置荧光检测仪器内，立即启动反应程序。

11 结果判定

11.1 阈值设定

以阈值线刚好超过阴性对照扩增曲线的最高点来设置荧光信号阈值，并扣除仪器噪声。11.2 对照检测结果分析

阳性对照出现典型扩增曲线，且 dt 值 ≤ 55，而阴性对照无典型扩增曲线，且荧光信号低于设定阈值，表明反应体系工作正常。否则，重新检测。

11.3 样品检测结果判定

检测结束后，在反应体系工作正常的前提下，根据样品的扩增曲线和 dt 值判定结果，判定情况说明见表 2。

表 2 金黄色葡萄球菌实时荧光核酸扩增检测结果判定情况

反应类别	F1 通道 (FAM)	F2 通道 (HEX 或波长相近的其他染料，如：VIC)	结果判定
1	+	+	<p>(1) dt 值 ≤ 55，表明“样品中检出金黄色葡萄球菌，检出结果为阳性”；</p> <p>(2) 若 55 < dt 值 < 60，应重复实验，如重复检测结果 dt 值 < 60，则表明样品中检出金黄色葡萄球菌，检出结果为阳性；如重复</p>

			<p>检测结果 dt 值≥ 60，表明样品中未检出金黄色葡萄球菌，检出结果为阴性。</p> <p>对筛检结果为阳性的样品，对样品的增菌液或可疑菌落进一步按 GB 4789.10 中的操作步骤进行确认后报告结果。</p>
2	—	+	dt 无数值或 ≥ 60 ，则表明样品中未检出金黄色葡萄球菌，检出结果为阴性。
3	—	—	反应失败。样品中可能存在反应抑制物，或样品比较粘稠，油脂含量高等原因影响 RNA 提取，建议将样品稀释后重新检测。

10.3 报告

根据表 2 进行结果判定，报告“每 25g (mL) 样品中检出或未检出金黄色葡萄球菌”。

附录 A 培养基和试剂

(资料性附录)

A.1 7.5%氯化钠肉汤

A.1.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	5.0 g
氯化钠	75 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.4

A.1.2 制法

将上述成分加热溶解，调节 pH，分装，每瓶 225 mL，121 °C 高压灭菌 15 min。

A.2 10%氯化钠胰酪胨大豆肉汤

A.2.1 成分

胰酪胨（或胰蛋白胨）	17.0 g
植物蛋白胨（或大豆蛋白胨）	3.0 g
氯化钠	100.0 g
磷酸氢二钾	2.5 g
丙酮酸钠	10.0 g
葡萄糖	2.5 g
蒸馏水	1 000 mL

pH 7.3±0.2

A.2.1 制法

将上述成分混合，加热，轻轻搅拌并溶解，调节 pH，分装，每瓶 225 mL，121 °C 高压灭菌 15 min。

A.3 生理盐水

A.3.1 成分

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.3.2 制法：称取8.5g氯化钠溶于1000mL蒸馏水中，121 °C 高压灭菌15 min。

附录 B

(资料性附录)

食品中金黄色葡萄球菌实时荧光核酸扩增检测试剂盒(SA-SAT)的组成、使用方法和注意事项

检测试剂盒组成及分类由指定单位提供,仅供参考,使用时,可根据所使用产品说明进行操作。

B.1 试剂盒组成

试剂盒有试剂 A 和试剂 B 组成,用于样本的提取及扩增检测。

试剂 A

组成成分	主要成分
裂解液	去垢剂
核酸提取液	捕获探针和磁性颗粒
洗涤液	SDS

试剂 B

组成成分	主要成分
反应液	dNTPs、NTPs
SAT 酶液	反转录酶, T7 聚合酶
检测液	引物、荧光探针
阳性对照	SA. RNA
内标	SA. IC RNA
阴性对照	生理盐水

B. 1.1 试剂盒各成分的组成

金黄色葡萄球菌 SAT 实验相关引物和探针序列:

上游引物:5'-CACTCTATACGGAGTTAC-3'

下游引物:5'-AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGACAGGATTATTACCTTCTTTGATTCATCTTTC-3'

金黄色葡萄球菌特异性探针: 5'-CACGGAAAGGACGACACCGUG-3', 5'端标记荧光报告基团 FAM, 3'端标记荧光淬灭基团 DABCYL。

内标 RNA (SA.IC-RNA), 体外转录成 RNA, 加入到每个反应体系中。序列为:

5' -GUACCCGGAGGAAGAGAAAUAUUCGAUUCCCUUAGUAGCGGCGAGCGAAACGGGAAGA
 GCCCAAACCAACAAGCUUGCUUGUUGGGGUUGUAGGACACUCUAUACGGAGUUACUAAUUCGGCA
 CGUGGUUAGACGAAUCAUCUGGAAAGAUGAAUCAAAAGAAGGUAUAAUCCUGUAGUCGAAAUG
 UUGUCUCUCUUGAGUGGAUCCUGAGUACGACGGAGCACGUGAAAUCCGUCGGAAUCUGGGAGG
 ACCAUCUCCUAAGGCUAAAACUCUCUAGUGACCGAUAGUGAACAGUACCGUGAGGGAAAGGUG
 AAAAGCACCCCGGAAGGGGAGUGAAAUAGA-3'

内质控探针:5' - CCAGAUAAUUCGGCACGUGGUCUGG-3' ,5'端标记荧光报告基团 HEX,3'
 端标记荧光淬灭基团 DABCYL。

裂解液: 50mM Tris (pH7.0), 0.1% (V/V) SDS, 1% (V/V) Tri ton X-100, 0.1%(V/V) NP-40。

核酸提取液: HEPES 50~400mM, EDTA 40~200mM, LiCl 400~2000mM, 0.25μM 捕获探针和
 250mg/mL 磁珠。

洗涤液: HEPES 5~50mM, NaCl 150mM, 1%SDS, EDTA 1-10mM。

反应液: Tris 30mM, MgCl₂ 10 mM, dNTPs 4mM, NTPs 8mM, PVP40 5%, KCl 25mM, 5%(v/v)
 甘油的溶液。

检测液: 含有 0.25 μM 上游引物, 0.25 μM 下游引物, 0.16 μM 金黄色葡萄球菌特异性探针和 0.16 μM
 内质控探针。

SAT酶液: 含有1200U M-MLV 反转录酶、1200U T7 RNA 聚合酶, 10mM HEPES,pH7.5, 20 mM
 N-acetyl-L-cysteine(N- 乙酰-L- 半胱氨酸), 0.4 mM zinc acetate (乙酸锌)、30 mM trehalose (海藻糖)、
 100 mM Tris-HClpH 8.0, 200mM KCl, 0.1mM EDTA, 0.8% (v/v)Triton X-100 和40% (v/v) glycerol
 (丙三醇);

内标: 含内标RNA(SA. IC RNA) 稀释物

阳性对照: 金黄色葡萄球菌的体外转录RNA 稀释物

阴性对照: 不含有金黄色葡萄球菌序列或不含有金黄色葡萄球菌的溶液

阳性质控品: 金葡菌标准菌株编号 ATCC25923。

B.2 试剂盒使用方法

B.2.1 样品前处理

B.2.1.1 实验室收到样品后, 应尽可能及早检验, 若不能及时检验, 应采取必要的措施保持样品的原
 有状态; 冷冻样品应在 45 °C 以下不超过 15 min 或在 2°C~5°C 不超过 18 h 解冻。

B.2.1.2 固体样品以无菌操作取样品 25 g，若需要增菌培养，加入 225 mL 7.5 %氯化钠肉汤或 10 %氯化钠胰酪胨大豆肉汤，若不需要增菌培养，则加入 225 mL 无菌生理盐水。8000 ~10000 r/min 均质 1 ~2 min，或放入盛有 225 mL 7.5 %氯化钠肉汤或 10 %氯化钠胰酪胨大豆肉汤的无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打 1~2 min，制备成 1:10 的样品匀液。

B.2.1.3 液体样品以无菌操作取样品 25 mL，若需要增菌培养，加入 225 mL 7.5 %氯化钠肉汤或 10 %氯化钠胰酪胨大豆肉汤的无菌锥形瓶(瓶内可预置适当数量的无菌玻璃珠)中，振荡混匀；若不需要增菌培养，则直接取样品进行测试。

B.2.2 增菌（可选择）

将上述需要增菌的 1:10 样品匀液(7.5 %氯化钠肉汤或 10 %氯化钠胰酪胨大豆肉汤)于 36℃ ±1℃ 培养 18 h~24 h；不需要增菌的样品，直接取 1:10 样品匀液上清液或样品原液备用。

B.2.3 样品 RNA 提取

B.2.3.1 样品处理

在样品制备区进行，为确保检测结果的准确性，在进行实际样品检测时，应设立阳性对照、阴性对照试验。与样品一起同时提取对照试验中 RNA，RNA 提取体系见表 1。从 SA-SAT 提取试剂 A、SAT 检测试剂 B（参见附录 B）中取出相应试剂，放置常温，充分混匀，按照试剂盒的说明书加入相应试剂和待测样品。

样品处理步骤：分别加入表 B1 中所列的 200μL 样品、阴阳性对照至核酸提取液管中（离心管或深孔板）→每管中依次加入，200μL 裂解液、100μL 核酸提取液、10μL 内标，60℃保温 5min，然后室温放置 10min。

表 B1 SA-SAT 提取体系

加入试剂成分	制备方法	每个反应管中加入体积
内标	取 0.4mL 裂解液，加入 10μL 内标，混匀备用。	10μL
核酸提取液	使用前混匀	100μL
裂解液	直接使用	200μL

检测样本	A、阳性对照：取 0.2mL 生理盐水，加入 10 μ L 阳性对照品，混匀备用。 B、阴性对照：取 0.2mL 生理盐水，加入 10 μ L 阴性对照品，混匀备用。 C、食品样本：增菌后培养液或 1:10 生理盐水稀释液，或样品原液。	200 μ L
洗涤液	直接使用	每次 700 μ L(仪器提取)、1mL(手工提取)
扩增检测液 (扩增体系用于磁珠洗脱，后期直接带着磁珠进行反应)	按照 40 μ L 反应液+2.5 μ L 检测液比例直接混合，振荡混匀，3000rpm 离心 10s 备用。	40 μ L

B.2.3.2 提取方法

B.2.3.2.1 仪器提取

样品处理过程中，将样品及试剂加入到 96 孔深孔板中，同时将对应的孔中加入 700 μ L 洗涤液（2 次以上洗涤），每个检测液孔中加入 40 μ L 扩增检测液。按照磁珠吸附核酸→第 1 次洗涤→第 2 次洗涤→释放磁珠至扩增检测液中的步骤，设置好仪器程序，进行提取。

B.2.3.2.2 手工提取

将样品处理管（离心管）放置于磁力架上，静止 5min，待磁珠吸附于管壁后，用移液器吸干管盖和管中的气泡和液体，保留磁珠；加入洗涤液 2 次，每次加入 1mL 洗涤液震荡后，重复前面操作；将样品管移离磁力架，每管中加入 40 μ L 扩增检测液，震荡混匀，完成提取过程。

B.2.4 恒温扩增检测

B.2.4.1 设定荧光检测仪器反应条件为：42 $^{\circ}$ C 1min，共 60 个循环，荧光通道设定为 F1（FAM）和 F2（HEX 或波长相近的其他染料，如：VIC），荧光信号每分钟收集 1 次，反应体系为 40 μ L。

B.2.4.2 移取 30 μ L 上述提取后扩增检测液转移至微量反应管中，放置在干热恒温器上 60 $^{\circ}$ C 保温 10min，然后 42 $^{\circ}$ C 保温 5min。快速加入提前预热至 42 $^{\circ}$ C 的 SAT 酶液 10 μ L 于每个反应管中，1200r/min 混匀。

B.2.4.3 将微量反应管迅速放置荧光检测仪器内，立即启动反应程序。

B.2.5 结果判定

B.2.5.1 阈值设定

以阈值线刚好超过正常阴性对照扩增曲线的最高点为荧光信号阈值，并扣除仪器噪声。

B.2.5.2 对照检测结果分析

阳性对照出现典型扩增曲线，且 dt 值 ≥ 55 ，而阴性对照无典型扩增曲线，且荧光信号低于设定阈值，表明反应体系工作正常。否则，重新检测。

B.2.5.3 样品检测结果判定

检测结束后，在反应体系工作正常的前提下，根据样品的扩增曲线和 dt 值判定结果，判定情况说明见表 B2。

表 B2 金黄色葡萄球菌实时荧光核酸扩增检测结果判定情况

反应类别	F1 通道 (FAM)	F2 通道 (HEX 或波长相近的其他染料, 如: VIC)	结果判定
1	+	+	<p>(1) dt 值≤ 55，表明“样品中检出金黄色葡萄球菌，检出结果为阳性”；</p> <p>(2) 若 $55 < dt$ 值< 60，应重复实验，如重复检测结果 dt 值< 60，则表明样品中检出金黄色葡萄球菌，检出结果为阳性；如重复检测结果 dt 值≥ 60，表明样品中未检出金黄色葡萄球菌，检出结果为阴性。</p> <p>对筛检结果为阳性的样品，对样品的增菌液或可疑菌落进一步按 GB 4789.10 操作步骤进行确认后报告结果。</p>
2	-	+	<p>dt 无数值或≥ 60，则表明样品中未检出金黄色葡萄球菌，检出结果为阴性。</p>

3	—	—	反应失败。样品中可能存在反应抑制物，或样品比较粘稠，油脂含量高等原因影响 RNA 提取，建议将样品稀释后重新检测。
---	---	---	---

B.2.5.4 报告

根据表 B 2 进行结果判定，报告“每 25g (mL) 样品中检出或未检出金黄色葡萄球菌”。

B.3 注意事项

B.3.1 注意试剂盒的保存，一般通用情况为：试剂 A 应保存于 2℃~30℃，试剂 B 应保存于-15℃~-35℃（检测液应避光保存），避免反复冻融。试剂 A 和试剂 B 在打开包装使用后可于 2℃~8℃存放一个月，试剂经冷藏可运输一周。使用时，注意试剂盒使用要在有效期内。

B.3.2 使用前应将所有试剂温度平衡至室温（18℃~26℃），充分混匀，洗涤液平衡后仍有白色絮状物沉淀，采用37℃水浴加热直至澄清。试剂B内各试剂在充分融解后，稍作离心，SAT酶使用前要离心，并预热至42℃。

B.3.3 操作过程中注意防止RNA酶对RNA 的降解作用，所有使用的器皿、加样器均为专用，离心管、吸头等一次性耗材应为灭菌不含RNA酶产品，操作人员应戴无粉手套、口罩，穿好工作服进行试验操作。

B.3.4 提取时，如果磁珠吸附过程中，有个别磁珠难以吸附至管壁，则应适当延长吸附时间。

B.3.5 SAT酶液加入反应管后，要立即启动反应，荧光检测反应需要马上开始。

B.3.6 反应结束后，应将微量反应管取出浸泡于10% 84消毒液中，取微量反应管时，严禁打开反应管（防止污染反应区域）。试验结束后，用10% 84消毒液清洁工作区域及用具，最后用清水擦拭干净。

附录 C

(规范性附录)

SAT 检测质量控制要求

C.1 应用临界弱阳性对照进行实验室质控

为了防止出现漏检（假阴性）的情况，SAT 检测实验室应定期应用临界弱阳性对照进行室内质量控制。

C.1.1 临界弱阳对照的制备

取生理盐水和裂解液按照 1:1 混合作为稀释液，将试剂盒提供阳性对照品稀释 100 倍即为临界弱阳性对照。

C.1.2 临界弱阳性对照的使用方法

取 200 μL 生理盐水，加入 10 μL 临界弱阳性对照，混匀备用；核酸提取及检测同阳性对照品处理过程。

C.2 质量控制

所设置阳性对照、临界弱阳性对照和阴性对照的 dt 值应满足以下条件，否则，实验视为无效，需重新进行。

1) 阳性对照、临界弱阳性对照：F1 通道：阳性对照 $dt \leq$ 临界弱阳性对照 $dt \leq 55$ ，F2 通道：有或者无数值。

2) 阴性对照：F1 通道：dt 无数值或为 60，同时 F2 通道： $dt \leq 55$ 。