

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 5224—2019

出口食品中单核细胞增生 李斯特菌检验方法 ——实时荧光 PCR 内标法

Detection of *Listeria monocytogenes* in food for export—Real-time PCR with
internal amplification control method

2019-12-27 发布

2020-07-01 实施

中华人民共和国海关总署

发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则进行起草。

本标准由中华人民共和国海关总署提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国杭州海关、上海交通大学、中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人：李可、施春雷、王娉、史贤明、方莹、张晓峰、崔妍。

出口食品中单核细胞增生李斯特菌检验方法

—实时荧光 PCR 内标法

1 范围

本标准规定了出口食品中单核细胞增生李斯特菌的实时荧光 PCR 内标方法。
本标准适用于出口食品中单核细胞增生李斯特菌的快速检测。

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 4789.30-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验

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

GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

3 定义、术语和缩略语

下列定义、术语和缩略语适用于本文件。

3.1 定义和术语

3.1.1 扩增内标 internal amplification control, IAC

扩增内标（ ）是指添加到 PCR 反应体系中用以指示假阴性现象的一段人工构建 DNA 序列或者是一段致病菌的看家基因序列。主要原理是：在荧光定量 PCR 中使用与目的基因相似的扩增内标，它的两端引物结合序列与目的基因完全一致，但具有不同的探针结合序列，使之不能与目的基因的探针结合，只能与内标探针结合。将扩增内标添加到 PCR 反应体系中，使之与目标基因序列共同进行扩增，如果在反应体系中存在一些抑制因素，则扩增内标和目标序列的扩增都将受到抑制，从而达到指示 PCR 反应假阴性的目的。

3.1.2 C_t 值 cycle threshold C_t

每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

3.2 缩略语

PCR (polymerase chain reaction)：聚合酶链反应。

DNA (deoxyribonucleic acid)：脱氧核糖核酸。

FAM (6-carboxyfluorescein)：6-羧基荧光素。

HEX (6-hexachlorofluorescein)：6-羧基-2', 4', 4', 5', 7, 7'-六氯荧光素琥珀酰亚胺酯。

4 方法提要

荧光 PCR 反应体系中，预先加入能同时扩增目标片段和扩增内标的引物，以及目标菌探针、内标检测探针以及内标质粒，然后将样品 DNA 加入 PCR 反应液中进行两步法荧光 PCR 反应，在扩增内标质粒与样品 DNA 的共同扩增中如果存在抑制现象，扩增内标的 PCR 扩增也将被抑制，从而达到对样品的荧光 PCR 检测过程进行假阴性监控目的。

5 试剂

除另有特殊说明外，所有实验用试剂均为分析纯，实验用水符合 GB/ T 6682 中一级水的要求。所有试剂均用无 DNA 酶污染的容器分装。

5.1 DNA 提取试剂：DNA 提取液：20 mmol / L Tris-HCl，2 mmol / L EDTA，1.2% Triton X-100 (pH 8.0)，也可使用商业化的 DNA 提取试剂。

5.2 Taq DNA 聚合酶。

5.3 dNTP 混合液。

5.4 10× PCR 缓冲液：200 mmol/ L Tris-HCl (pH 8.4)，200mmol/ L KCl，15 mmol/ L MgCl₂。

5.5 引物和探针：见附录 A。

5.6 内标质粒：参见附录 B。

6 主要仪器和设备

6.1 恒温水浴锅或加热套装置：100℃。

6.2 恒温培养箱：36℃ ± 1℃，30℃ ± 1℃。

6.3 离心机：最大转速 13 000 r/ min 以上。

6.4 天平：感量 0.1 g。

6.5 冰箱：-20℃ ~4℃。

6.6 均质器。

6.7 可调移液器：1 μL-1000 μL。

6.8 荧光 PCR 仪。

7 检验程序

食品中单核细胞增生李斯特菌的扩增内标荧光 PCR 检测流程见图 1。

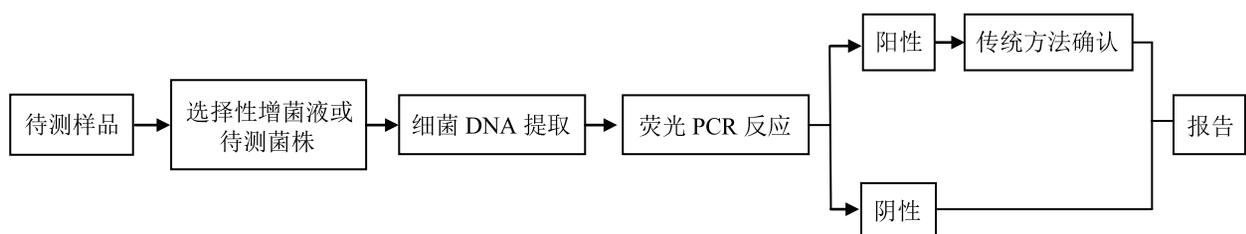


图 1 食品中单核细胞增生李斯特菌检验程序

8 操作步骤

8.1 样品制备、增菌培养

按照 GB 4789.30-2016 中第一法进行样品制备和增菌（两次增菌）。

8.2 细菌模板 DNA 的制备

取 8.1 中培养的二次增菌液 1 mL，加到 1.5 mL 无菌离心管中，8 000 r / min 离心 5 min，吸弃上清液；加入 50 μ L DNA 提取液（使用前室温解冻并充分混匀，快速吸取），混匀后沸水浴 10 min，置冰上 10 min；12000 r / min 离心 5 min，取上清保存于 -20℃ 备用以待检测。

也可采用等效的商品化 DNA 提取试剂盒并按其说明制备模板 DNA。

8.3 荧光 PCR 检测

8.3.1 荧光 PCR 反应体系

荧光 PCR 反应所用引物和探针见附录 A，PCR 反应体系见表 1。也可采用商品化的 PCR 扩增体系。每个 DNA 样品做 2 个平行管。加样时应使样品 DNA 溶液完全落入反应液中，不要粘附于壁上，加样后尽快盖紧管盖。

表 1 PCR 反应体系

组分	工作液浓度	加样量 μ L	终浓度
10 \times PCR 缓冲液	-	2	-
dNTP Mixture (10 mmol / L)	10 μ mol / L	1.6	-
引物 (上游)	10 μ mol / L	0.4	200 nmol / L
引物 (下游)	10 μ mol / L	0.4	200 nmol / L
单核细胞增生李斯特菌探针	10 μ mol / L	0.6	300 nmol / L
内标质粒探针	10 μ mol / L	0.6	300 nmol / L
<i>Taq</i> DNA 聚合酶	5 U / μ L	0.4	0.1 U / μ L
DNA 模板	-	1	-
内标质粒	-	1	-
去离子水	-	补至 20	-

8.3.2 阳性对照、阴性对照和空白对照设置

检测过程中分别设阳性对照、阴性对照和空白对照。阳性对照采用含有检测序列的 DNA（或质粒）和 IAC 片段同时作为荧光 PCR 反应的模板，阴性对照采用含 IAC 片段的质粒作为荧光 PCR 反应的模板，空白对照用无菌水作为荧光 PCR 反应的模板。

8.3.3 荧光 PCR 反应程序

荧光 PCR 反应循环参数为 95℃ 4 min；95℃ 5 s，65℃ 20 s，45 个循环。信号采集设为 FAM、HEX 荧光素（FAM 荧光素代表样品中单核细胞增生李斯特菌信号，HEX 荧光素代表扩增内标信号）。

注：因不同 PCR 仪的性能差异，可通过条件优化适当调整 PCR 循环的退火温度及时间。

9 荧光阈值的确定

PCR 反应完成后应设定荧光阈值以分析样品的 C_t 值，以 PCR 反应的前 3 个 ~15 个循环的荧光信号作为基线信号（噪音），荧光阈值理论上定义为基线信号的标准偏差的 10 倍，在实际应用中可以根据仪器基线信号进行人工调整，设定原则是以阈值线刚好超过正常阴性对照样品扩增曲线（无规则的噪音线）的最高点，且不出现 C_t 值为准。

10 结果及判断

10.1 质控标准

质控标准如下：

- 空白对照：FAM 荧光素和 HEX 荧光素均无扩增曲线， $C_t \geq 40.0$ ；
 - 阴性对照：FAM 荧光素无扩增曲线， $C_t \geq 40.0$ ；HEX 荧光素出现典型的扩增曲线， C_t 值应 <35.0 ；
 - 阳性对照：FAM 荧光素出现典型的扩增曲线， C_t 值应 <35.0 ；
- 否则，实验视为无效。

10.2 结果判断

按如下内容进行结果判断：

- C_t 值（FAM） ≥ 40.0 ，可判定样品结果为阴性，可直接报告未检出相应致病菌；
- C_t 值（FAM） ≤ 35.0 ，可判定该样品结果为阳性；
- C_t 值（FAM） >35.0 ，而 <40 ，建议样本重做，再次扩增后的结果 C_t 值如果仍小于 40，并有典型的扩增曲线，且对照结果均正常，则可判定该基因为阳性。

对于阳性结果，应对样品的二次增菌液或可疑纯菌落进一步按 GB 4789.30 中第一法操作步骤进行确认后报告结果。

11 生物安全和防污染措施

11.1 生物安全措施

为了保护实验室人员的安全，应由具备资格的工作人员进行操作，所有培养物和废弃物应参照 GB 19489 中的有关规定。

11.2 防污染措施

防污染措施应符合 GB/T 27403 的规定。

附 录 A
(规范性附录)
荧光 PCR 所用引物和探针

A.1 单核细胞增生李斯特菌检测所用引物、探针和内标序列检测探针见表 A.1，单核细胞增生李斯特菌探针 5' 端为 FAM 标记，3' 端为 ECLIPCE 标记，内标序列探针 5' 端为 HEX 标记，3' 端为 ECLIPCE 标记。

表 A.1 单核细胞增生李斯特菌检测所用引物和探针

单核细胞增生李斯特菌引物	上游引物：5'-CATGGCACCACCAGCATC-3'
	下游引物：5'-CATCCGCGTGTTCCTTTTCG-3'
单核细胞增生李斯特菌探针	5'-FAM-CCGCCTGCAAGTGCTAAGACGCCA - ECLIPCE-3'
内标探针	5'-HEX-ATAGGAGCACTCGCCGCCACATC - ECLIPCE-3'

附录 B
(资料性附录)
内标质粒的制备

B.1 备样

人工合成一段 65 bp 的 IAC 序列 (5'-CATGGCACCACCAGCATCTATAGGAGCACTCGCCGCCACATCATCGAAAAGAAACACGCGGATG-3'), 将此片段连接至 pMD 19-T、pMD 18-T 等质粒载体上备用。具体制备过程如下。

B.2 扩增内标序列与载体连接

取 3 μL 合成 IAC 片段与 pMD 19-T、pMD 18-T 等质粒载体 (T/A-type PCR cloning vector) 在 0.5 ml 离心管中进行连接, 反应体系为:

Ligation Solution I	5 μL
pMD18-T 载体 (30 ng/ μL)	1 μL
PCR 产物	3 μL
H_2O	1 μL
总体积	10 μL

16 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 8 h, 将连接后的质粒转化感受态大肠杆菌。

B.3 感受态细胞的制备

B.3.1 以无菌接种环取保存的 E.coli TG1 菌株于 LB 琼脂平板划线, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养。

B.3.2 挑取 LB 琼脂平板上的大肠杆菌 TG1 单菌落, 接入 5 mL LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 12 h。

B.3.3 按 1% 接种量将大肠杆菌过夜培养物转入 50 mL LB 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养至 OD600 值约为 0.6, 置于冰中冷却 10 min。

B.3.4 在 4 $^{\circ}\text{C}$, 6000 r/min 条件下离心 5 min, 倒去上清液, 将细胞重悬于预冷的 10 mL 0.1M CaCl_2 中, 在冰上放置 20 min 以上。

B.3.5 在 4 $^{\circ}\text{C}$, 6000 r/min 条件下离心 5 min, 去上清, 细胞重新悬浮于 2 mL 预冷的含有 15% 甘油的 0.1 M CaCl_2 中, 分装成 100 μL 的小份, 于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存或直接用于转化。

B.4 连接产物的转化

制备抗性平皿, 在装有约 100 μL 感受态细胞的 1.5 mL 离心管中加入连接产物 10 μL , 轻轻混匀于冰上放置 30 min 后, 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中热击 90 s, 热击后迅速置于冰上冷却 2 min。向管中加入 400 μL LB 液。培养基 (不含 Amp), 37 $^{\circ}\text{C}$ 200 r/min -220 r/min 振荡培养 1 h, 取 100 μL 菌液涂布合适的抗性平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16 h -18 h, 观察单菌落的出现。如进行蓝/白斑筛选, 则于转化前约 2 h 在 LB 平板上避光涂布 40 μL X-gal (20 mg/mL) 和 80 μL IPTG (10 mg/mL), 正放平皿于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中, 使 X-gal 和 IPTG 充分吸入琼脂中, 然后如上用菌液涂布平板。

B.5 阳性转化子的筛选

用灭过菌的牙签挑取转化的单菌落, 点种于相应的氨苄抗性平板后将牙签上菌体加入含 PCR 反

应液的 PCR 管中并编号，经相应检测引物的 PCR 扩增后，在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳，根据电泳结果在氨苄抗性平板相应编号处挑选所需的阳性克隆，并进行进一步的测序验证。

B.6 质粒的提取

挑取平板上经 PCR 筛选为阳性克隆的单菌落，接种 50 mL 含氨苄青霉素的 LB 培养液内，37℃ 180 r/min 振荡培养过夜后提取菌液质粒。
