

T/CASME

中国中小商业企业协会团体标准

T/CASME XXX—2023

熟肉制品中单核细胞增生李斯特氏菌 快速检测技术规范

Technical specification for rapid detection of *Listeria monocytogenes*
in cooked meat products

(征求意见稿)

2023 - XX - XX 发布

2023 - XX - XX 实施

中国中小商业企业协会 发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 第一法 环介导恒温核酸扩增法	1
4.1 原理	1
4.2 试剂与材料	1
4.3 仪器与设备	2
4.4 检测程序	2
4.5 检测步骤	3
4.6 质量控制	4
4.7 结果判定与表述	4
4.8 废弃物处理	4
5 第二法 PCR-试纸条法	5
5.1 原理	5
5.2 引物与试剂	5
5.3 仪器与设备	5
5.4 检测步骤	5
5.5 质量控制	7
5.6 结果判定与表述	7
5.7 废弃物处理	7
6 检测过程中防止交叉污染的措施	7
附录 A (资料性) 单核细胞增生李斯特氏菌 <i>virR</i> 基因特异序列	8
附录 B (资料性) 单核细胞增生李斯特氏菌 LAMP 检测试剂盒	9
B.1 LAMP 检测试剂盒组成	9
B.2 注意事项	9
附录 C (资料性) 靶基因序列	10

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。

本文件由溧阳市市场综合检验检测中心提出。

本文件由中国中小商业企业协会归口。

本文件起草单位：溧阳市市场综合检验检测中心、东北农业大学、湖北小胡鸭酱卤食品研究院有限公司……

本文件主要起草人：……

熟肉制品中单核细胞增生李斯特氏菌快速检测技术规范

1 范围

本文件规定了熟肉制品中单核细胞增生李斯特氏菌快速检测的环介导恒温核酸扩增法及PCR-试纸条法。

本文件适用于熟肉制品中单核细胞增生李斯特氏菌的定性检测。

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 4789.30—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—2008 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 27403—2008 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

GB/T 42233 快速检测 术语与定义

3 术语和定义

GB/T 42233界定的术语和定义适用于本文件。

4 第一法 环介导恒温核酸扩增法

4.1 原理

利用环介导恒温扩增（LAMP）技术进行单核细胞增生李斯特氏菌的筛选检测。根据单核细胞增生李斯特氏菌特有的*virR*基因序列（参见附录A）设计一套特异性引物，特异性识别靶序列上的六个独立区域。利用*Bst* DNA聚合酶启动循环链置换反应，在单核细胞增生李斯特氏菌*virR*特异基因序列启动互补链合成，在同一链上互补序列周而复始形成很多类似花椰菜结构的茎环DNA混合物。当发生扩增反应时，反应体系中添加的染色剂（SYBR Green I）能以嵌入方式结合到扩增出来的DNA混合物小沟处，随着双链DNA的增加，SYBR Green I染料荧光信号随之增强，通过荧光定量聚合酶链式反应仪（荧光定量PCR仪）实时监测产物扩增情况，从而达到检测目的基因是否得到扩增。根据Ct值以及是否有“S”型扩增曲线判定结果。

4.2 试剂与材料

4.2.1 引物

PCR反应使用的引物应符合表1的规定。

表1 PCR 反应使用的引物

引物名称	引物序列 (5' →3')	片段长度
F3	GTCTTTTAAGTGGAGTAAACCTT	216 bp
B3	ACAAGACTTCACCAATCCA	
FIP	CCTGTGCCAAAGCATTTTTACATTTTTAGGCAAGTCATCTTCTTCG	
BIP	TAAGTVTCTTTGCAATTGACCGACTTTTACGTGTACACAGAAAAGCG	

4.2.2 试剂材料

4.2.2.1 除另有说明外，试验用试剂均为分析纯，试验用水应为 GB/T 6682—2008 规定的一级水。

4.2.2.2 试验用试剂材料如下：

- 脑心浸液肉汤（BHI）；
- DNA 提取试剂：细菌基因组 DNA 提取试剂盒；
- Bst*DNA 聚合酶：酶浓度 8 U/ μ L；
- dNTPs：dATP、dTTP、dCTP、dGTP，每种核苷酸浓度 10 mmol/L；
- 10×ThermoPol 缓冲液：0.2 mol/L Tris HCl，0.1 mol/L 氯化钾，0.1 mol/L 硫酸铵，20 mol/L 硫酸镁，1%TritonX-100；
- 硫酸镁：50 mmol/L；
- 甜菜碱：5 mol/L；
- 显色液：SYBR Green I 荧光染料，0.1 mmol/L；
- 阳性对照：单核细胞增生李斯特氏菌标准菌株或等效标准菌株；
- 无菌玻璃器皿（90 mm 培养皿、500 mL 三角瓶、1 mL 移液管、涂布棒）；
- 1000 mL 无菌均质袋；
- 1.5 mL 塑料离心管，200 μ L PCR 反应管；
- 也可采用等效的单核细胞增生李斯特氏菌 LAMP 检测试剂盒，按试剂盒说明书进行操作，试剂盒的要求参见附录 B。

4.3 仪器与设备

试验用仪器与设备如下：

- 恒温培养箱：36 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C；
- 移液器：0.5 μ L~10 μ L、10 μ L~100 μ L、100 μ L~1 000 μ L；
- 高速台式离心机： \geq 13 000 r/min；
- 金属浴：100 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C；
- 计时器；
- 荧光定量 PCR 仪。

4.4 检测程序

检测程序见图1。

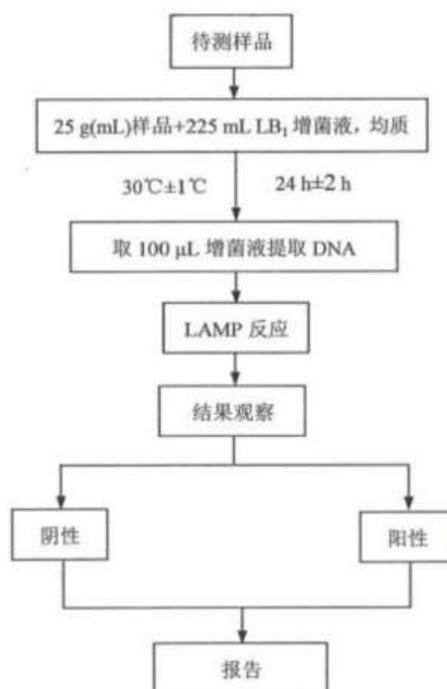


图1 单核细胞增生李斯特氏菌 LAMP 快速检测程序

4.5 检测步骤

4.5.1 样品制备与增菌培养

按GB 4789.30—2016中5.1进行。单核细胞增生李斯特氏菌标准菌株直接接种到BHI培养基中，36℃±1℃培养18 h~24 h，做阳性对照。

4.5.2 模板 DNA 制备

4.5.2.1 取增菌液 100 μL 于 1.5 mL 无菌离心管中涡旋震荡混匀，100℃±1℃热浴 5 min~10 min，3 000 r/min 离心 3 min，上清液即为模板 DNA。若不能当天检测，应吸取上清液于无菌离心管中于-20℃以下保存备用。

4.5.2.2 也可用细菌基因组提取试剂盒提取单核细胞增生李斯特氏菌 DNA，按照说明书进行操作。

4.5.3 环介导恒温核酸扩增

4.5.3.1 扩增试剂准备

应在试剂配制区进行，在低温条件下进行体系配制。样品测试25 μL反应体系配制见表2。

表2 反应体系

组份	工作液浓度	加样量	反应体系终浓度
ThermoPol缓冲液	10×	2.5 μL	1×
外引物 (F3)	20 μmmol/L	0.25 μL	0.2 μmmol/L
外引物 (B3)	20 μmmol/L	0.25 μL	0.2 μmmol/L
内引物 (FIP)	20 μmmol/L	1.0 μL	0.8 μmmol/L

表2 反应体系（续）

组份	工作液浓度	加样量	反应体系终浓度
内引物（BIP）	20 $\mu\text{mol/L}$	1.0 μL	0.8 $\mu\text{mol/L}$
dNTPs	10 $\mu\text{mol/L}$	4.0 μL	1.6 $\mu\text{mol/L}$
硫酸镁	50 $\mu\text{mol/L}$	100 μL	2.0 $\mu\text{mol/L}$
甜菜碱	5 $\mu\text{mol/L}$	4.0 μL	0.8 $\mu\text{mol/L}$
<i>Bst</i> DNA聚合酶	8 U/ μL	0.5 μL	0.16 U/ μL
显色液	0.01mmol/L	0.5 μL	-
DNA模板	-	2 μL	-
去离子水	-	8 μL	-

4.5.3.2 加样

在样品制备区进行。在各设定的PCR反应管中加入制备好的模板DNA溶液2 μL ，盖紧管盖，离心5 s~10 s。

4.5.3.3 反应过程

在扩增区进行。将4.5.3.2中离心后的PCR反应管放入荧光定量PCR检测系统内，记录样本摆放顺序。63 $^{\circ}\text{C}$ 恒温扩增45 min，反应程序为：63 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s，以45 s作为一个循环，每个循环从16 s~60 s收集荧光信号，总计45个循环。检测结束后，根据扩增曲线和起峰时间判定结果。

4.5.3.4 对照设置

每次扩增反应应设置阴性对照、空白对照和阳性对照。空白对照以无菌水替代DNA模板。阴性对照以提取非目标菌DNA代替模板DNA。阳性对照制备按4.5.1、4.5.2进行。

4.6 质量控制

以下条件有一条不满足时，试验视为无效：

- 空白对照曲线为直线，无“S”型扩增曲线；
- 阴性对照曲线为直线或轻微斜线，无“S”型扩增曲线；
- 阳性对照呈“S”型扩增曲线。

4.7 结果判定与表述

4.7.1 结果判定

空白对照、阴性对照以及阳性对照实验结果正常。待检样品若有“S”型扩增曲线，则判断样品检测结果为阳性；若无“S”型扩增曲线，或呈一条直线或倾斜的直线，且检测出峰时间为0，判断样品检测结果为阴性。

4.7.2 结果表述

结果表述为：每25 g样品中检出或未检出单核细胞增生李斯特氏菌。

4.8 废弃物处理

检测过程中的废弃物，应收集后经紫外照射30 min后，于121 $^{\circ}\text{C}$ ，30 min高压灭菌。

5 第二法 PCR-试纸条法

5.1 原理

对样品中单核细胞增生李斯氏菌进行增菌培养后提取DNA，采用上游和下游引物分别经地高辛和异硫氰酸盐标记的单核胞增生李斯氏菌的特异性检测引物进行PCR扩增。检测用试纸条上含有金标记的抗异硫氰酸盐的抗体，可与PCR产物上的异硫氰酸盐标记分子结合，在检测线位置上有抗地高辛抗体，可与PCR产物上的地高辛标记分子结合，从而显色。如模板未扩增，则无PCR产物与地高辛抗体及FITC抗体结合，从而不能在检测线（T线）位置显示颜色。

5.2 引物与试剂

5.2.1 引物

扩增引物见表3，靶基因序列参见附录C。

表3 扩增引物

引物序列（5' →3'）	5' 标记物	靶基因	片段长度
F: AACCTATCCAGGTGCTC	地高辛	<i>hlyA</i>	520 bp
R: CGCCACACTTGAGATAT	异硫氰酸盐		

5.2.2 试剂

5.2.2.1 除另有说明外，试验用试剂为分析纯或生化试剂，试验用水应为 GB/T 6682—2008 规定的一级水。

5.2.2.2 试验用试剂材料如下：

- DNA 提取液：20 mmol/L Tris-HCl、2 mmol/L EDTA、1.2% Triton X-100（pH8.0）；
- 2×PCR 预混液；
- PCR 引物；
- 试纸条：通过采购的原料试剂自行组装（参见 SN/T 5439.7—2022 附录 B），或用等效的商品化试纸条；
- 展开液：10 mmol/L Tris、1% BSA、1%（体积分数）Tween20、0.05 mol/L NaOH，或采用等效的商品化产品。

5.3 仪器与设备

试验用仪器与设备如下：

- 离心机：离心力≥12 000 g；
- 微量移液器：100 μL~1 000 μL、20 μL~200 μL、0.5 μL~10 μL；
- PCR 仪；
- 恒温水浴锅：100 °C±1 °C；
- 天平：感量 0.01 g；
- pH 计。
- 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。

5.4 检测步骤

5.4.1 样品制备与增菌培

按GB 4789.30—2016中5.1进行。

5.4.2 模板 DNA 制备

5.4.2.1 增菌液模板 DNA 制备

5.4.2.1.1 对于 5.4.1 获得的增菌液，按以下步骤制备模板 DNA：

- a) 吸取增菌液 1 mL 于 1.5 mL 无菌离心管中，12 000 g 离心 3 min，弃去上清液；
- b) 加入 1 mL 0.85% 无菌生理盐水溶解沉淀，12 000 g 离心 3 min，弃去上清液；
- c) 加入 1 00 μL DNA 提取液混匀后沸水浴 10 min，置冰上冷却；
- d) 12 000 g 离心 2 min，上清液即为模板 DNA。

5.4.2.1.2 也可采用等效的商品化核酸提取试剂盒并按其说明提取核酸。

5.4.2.2 可疑菌落模板 DNA 制备

5.4.2.2.1 对于 5.4.1 分离到的可疑菌落，可直接挑取可疑菌落，再按 5.4.2.1.1 c) 步骤制备模板 DNA 以待检测。

5.4.2.2.2 也可采用等效的商品化核酸提取试剂盒并按其说明提取核酸。

5.4.3 DNA 浓度测定

取 5 μL DNA 溶液加双蒸水稀至 1 mL，使用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计分别检测 260 nm 和 280 nm 处的吸光值 A_{260} 和 A_{280} ，按式 (1) 计算 DNA 浓度。当 A_{260}/A_{280} 比值在 1.7~1.9 之间时，宜使用 PCR 扩增。

$$c = A \times N \times \frac{50}{1000} \dots \dots \dots (1)$$

式中：

- c——DNA 浓度，单位为纳克每微升 (ng/μL)；
 A——260 nm 或 280 nm 处的吸光值；
 N——核酸稀释倍数。

5.4.4 PCR 扩增

5.4.4.1 PCR 反应体系

样品测试 25 μL PCR 反应体系见表 4。

表 4 PCR 反应体系

组分	总体积, μL
2×PCR 预混液	1.25
上游引物 (10 mol/L)	0.25
下游引物 (10 mol/L)	0.25
DNA 模板 ^a	5
无菌水	7

^a DNA 模板的浓度应在 10 pg/μL~10 ng/μL 之间。

5.4.4.2 反应程序

94 ℃预变性5 min; 94 ℃变性30 s, 58 ℃退火30 s, 72 ℃延伸1 min, 35个循环后进入72 ℃, 7 min; 4 ℃保存。

5.4.4.3 试纸条检测

取6 μL PCR产物, 加入54 μL上样稀释液, 混匀后垂直缓慢滴加于试条样品垫中, 3 min观察结果。

5.4.4.4 对照设置

每次扩增反应应设置阴性对照、空白对照和阳性对照。空白对照以无菌水替代DNA模板。阴性对照以提取非单核细胞增生李斯特氏菌DNA模板代替模板DNA。阳性对照制备按5.4.1、5.4.2进行。

5.5 质量控制

以下条件有一条不满足时, 试验视为无效:

- 空白对照质控线变红, 检测线未变红;
- 阴性对照质控线变红, 检测线未变红;
- 阳性对照质控线变红, 检测线变红。

5.6 结果判定与表述

5.6.1 结果判定

5.6.1.1 试纸条质控线变红色且检测线变红色, PCR 扩增产物为可疑阳性。可疑阳性产物经测序进行确证。

5.6.1.2 试纸条质控线变红色, 检测线不变色, PCR 扩增产物为阴性。

5.6.2 结果表述

5.6.2.1 PCR 产物试纸条检测为可疑阳性, 同时测序结果正确者, 继续按照传统方法进行分离, 若分离到该菌, 则判为含单核细胞增生李斯特氏菌, 表述为检出单核细胞增生李斯特氏菌。

5.6.2.2 PCR 产物试纸条检测为阴性, 判为不含有单核细胞增生李斯特氏菌, 表述为未检出单核细胞增生李斯特氏菌。

5.7 废弃物处理

检测过程的废弃物, 应收集后于焚烧炉中焚烧处理。

6 检测过程中防止交叉污染的措施

按GB/T 27403—2008中附录D执行。

附录 A

(资料性)

单核细胞增生李斯特氏菌 *virR* 基因特异序列

单核细胞增生李斯特氏菌 *virR* 基因特异序列见图A. 1。

```
1 ttttcttga accaagaagc tacaagactt caccaatcca tacgtgtaca cagaaaagcg  
61 ctgattgctt tttacttta tcatgcaagt ggaacgctg gtcaattgca aagagactta  
121 aaactagcct gtgccaagc attttacat tataaaacca aaacggctaa ttatatatta  
181 atcgaacaag atgacttgcc taccacgtt caaaaagggt tactccactt aaaagacgaa  
241 ccagaaaaat taaat
```

图A. 1 单核细胞增生李斯特氏菌 *virR* 基因特异序列

附录 B

(资料性)

单核细胞增生李斯特氏菌 LAMP 检测试剂盒

B.1 LAMP 检测试剂盒组成

LAMP检测试剂盒组成见表B.1。

表B.1 LAMP 检测试剂盒组成

组分	规格, μL	数量, 支
反应液	550	1
<i>Bst</i> DNA聚合酶	30	1
密封液	500	1
阳性对照	20	1
阴性对照	20	1
注: 每个试剂盒可做24个25 μL 反应。		

B.2 注意事项

- B.2.1 LAMP检测试剂盒应于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存。
- B.2.2 反应液中含有反应所需的dNTP混合液、引物、缓冲液、核酸染料等, 反应液应避光保存。
- B.2.3 反复冻融可能降低试剂盒灵敏度, 应按检测频次将反应液以适当体积分管保存。
- B.2.4 应按说明书要求进行操作, 试样配制和加样应在冰上进行。

附录 C
(资料性)
靶基因序列

单核细胞增生李斯特氏菌的基因扩增靶标参考序列 (gennbank号: NC_003210.1:205819-207408)
见图C.1。

```
AACCTATCCAGGTGCTCTCGTAAAAGCGAATTCGGAATTAGTAGAAAATCAACCAGATGT  
TCTCCCTGTAAAACGTGATTCATTAACACTCAGCATTGATTTGCCAGGTATGACTAATCA  
AGACAATAAAAATCGTTGTAAAAAATGCCACTAAATCAAACGTTAACAACGCAGTAAATAC  
ATTAGTGGAAGATGGAATGAAAAATATGCTCAAGCTTATCCAAATGTAAGTGCAAAAA  
TTGATTATGATGACGAAATGGCTTACAGTGAATCACAATTAATTGCGAAATTTGGTACAG  
CATTTAAAGCTGTAAATAATAGCTTGAATGTAAACTTCGGCGCAATCAGTGAAGGGAAAA  
TGCAAGAAGAAGTCATTAGTTTTAAACAAATTTACTATAACGTGAATGTTAATGAACCT  
ACAAGACCTTCCAGATTTTTTCGGCAAAGCTGTTACTAAAGAGCAGTTGCAAGCGCTTGA  
GTGAATGCAGAAAATCCTCCTGCATATATCTCAAGTGTGGCG
```

图C.1 靶基因序列

参 考 文 献

- [1] SN/T 5439.7—2022 出口食品中食源性致病菌快速检测方法 PCR-试纸条法 第7部分：单核细胞增生李斯特氏菌
-