

ICS

CCS 点击此处添加 CCS 号

# T/GBAS

粤港澳大湾区标准促进会团体标准

T/GBAS 2204—2021

## 食源性致病菌快速检测方法

Rapid detection methods for foodborne pathogens

(征求意见稿)

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

广东省粤港澳大湾区标准促进会

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。

本文件由广东省粤港澳大湾区标准促进会提出并归口。

本文件起草单位：广东产品质量监督检验研究院、广东省科学院生物与医药工程研究所。（港澳参与机构待定）

本文件主要起草人：

粤港澳大湾区高品质食品标准  
(征求意见稿)



# 食源性致病菌快速检测方法

## 1 范围

本标准规定了粤港澳大湾区高品质食品中沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、阪崎克罗诺杆菌、单核细胞增生李斯特氏菌、大肠埃希氏菌O157:H7、副溶血性弧菌、创伤弧菌及饮用水中铜绿假单胞菌、粪链球菌、产气荚膜梭菌的多重PCR快速检测方法。

本标准适用于粤港澳大湾区高品质食品中沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、阪崎克罗诺杆菌、单核细胞增生李斯特氏菌、大肠埃希氏菌O157:H7、副溶血性弧菌、创伤弧菌及饮用水中铜绿假单胞菌、粪链球菌、产气荚膜梭菌的快速检测。

## 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 4789.4-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验；  
GB 4789.7-2013 食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验；  
GB 4789.10-2016 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 4789.30-2016 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 4789.36-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 检验；  
GB 4789.40-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)检验；  
GB 4789.44-2020 食品安全国家标准 食品微生物学检验 创伤弧菌检验；  
GB 8538-2016 食品安全国家标准 饮用天然矿泉水检验方法

## 3 术语和定义

多重聚合酶链式反应（MPCR） Multiplex Polymerase Chain Reaction

又称多重引物PCR或复合PCR，它是在同一PCR反应体系里加上两对以上引物，同时扩增出多个核酸片段的 PCR 反应，其反应原理是模板基因序列先经高温变性成为单链，在DNA聚合酶作用和适宜的反应条件下，根据模板序列设计两条引物分别与模板DNA两条链上相应的一段互补序列发生退火而相互结合，接着在 DNA 聚合酶的作用下以四种脱氧核糖核酸（dNTP）为底物，使引物得以延伸，然后不断重复变性、退火和延伸这一循环，使欲扩增的基因片段以几何倍数扩增。

## 4 试剂与材料

除另有规定外，试剂为分析纯或生化纯。实验用水应符合GB/T 6682中一级水的规格。所有试剂均用无DNA酶污染的容器分装。

4.1 Taq DNA聚合酶

4.2 dNTP: dATP、dTTP、dCTP、dGTP

4.3 DNA提取试剂: 称取0.1g chelex 100 粉末，加入100ml灭菌蒸馏水中，摇匀即可。也可使用商业化的DNA提取试剂盒。

4.4 10×PCR缓冲液: 200 mmol/L Tris-HCl(pH 8.4), 200 mmol/L KCl, 15 mmol/L MgCl<sub>2</sub>

4.5 引物序列见附录1

4.6琼脂糖

4.7 GelRed或GelGreen核酸染色剂

4.8 分子量标记: 100 bp DNA ladder

4.9 5×TBE电泳缓冲液：Tris 54g，硼酸 27.5g，0.5 mmol/L EDTA (pH 8.0) 20ml，加蒸馏水至1 000 ml，使用时稀释为0.5×TBE电泳缓冲液

4.10 6×加样缓冲液

## 5 仪器和设备

### 5.1 PCR 仪

5.2 离心机：最大转速不小于 13 000 r/min

5.3 紫外凝胶成像仪

5.4 电泳仪：包括电源、电泳槽、制胶槽（长度>10 cm）和梳子

5.5 微量移液器：10μL、100μL、200μL、1000μL

5.6 恒温水浴锅：100℃

5.7 恒温培养箱：36℃±1℃，42℃±1℃

5.8 天平：感量 0.1 g、0.01 g

## 6 检测步骤

### 6.1 样品制备、增菌培养和分离

沙门氏菌的样品制备、增菌培养和分离步骤按照GB 4789.4-2016进行。

金黄色葡萄球菌的样品制备、增菌培养和分离步骤按照GB 4789.10-2016进行。

阪崎克罗诺杆菌的样品制备、增菌培养和分离步骤按照GB 4789.40-2016

单核细胞增生李斯特氏菌的样品制备、增菌培养和分离步骤按照GB 4789.30-2016进行。

大肠埃希氏菌O157:H7/NM的样品制备、增菌培养和分离步骤按照GB 4789.36-2016进行。

副溶血性弧菌的样品制备、增菌培养和分离步骤按照GB 4789.7-2013进行。

创伤弧菌的样品制备、增菌培养和分离步骤按照GB 4789.44-2020进行。

铜绿假单胞菌、粪链球菌、产气荚膜梭菌的样品制备、增菌培养和分离步骤按照GB 8538-2016进行。

适宜的条件下，保留一份增菌液以备PCR结果阳性时，采用国标方法进行验证。

### 6.2 模板 DNA 的制备

#### 6.2.1 增菌液模板 DNA 制备

取5.1中培养的相应致病菌增菌液（需二次培养的则取二次增菌液）1ml，加到1.5ml 无菌离心管中，6 000 r/min离心5 min，完全去除上清；加入30μL DNA提取液，混匀后沸水浴10min，12 000 r/min离心15min，取上清保存于-20℃备用以待检测，也可使用商业化的DNA提取试剂盒并按期说明制备模板DNA。

#### 6.2.2 可疑菌落模板 DNA 制备

5.1中分离到的可疑菌落，加入30μL DNA提取液，再按照5.2.1步骤制备模板DNA以待检测。

### 6.3 多重 PCR 扩增

#### 6.3.1 多重 PCR 扩增体系

10×PCR缓冲液2.5μL，引物对0.2-1μM，dNTPs 0.2mM，DNA聚合酶1.25U，无菌水补足至25μL。多重PCR组合见附录2。可选用含有PCR缓冲液、dNTP和Tag酶等成分的多重PCR预混液进行多重PCR扩增。

#### 6.3.2 多重 PCR 反应参数

94℃预变性5min，30个循环：94℃变性1 min，58℃退火30s，72℃延伸30s；72℃延伸10min后4℃保存。



### 6.3.3 质控

检测过程中分别设置阳性对照、阴性对照、空白对照。阳性对照为扩增片段的阳性克隆分子DNA或阳性菌株DNA，阴性对照为大肠杆菌ATCC25922或非O157大肠杆菌菌株DNA，空白对照为无菌水。

### 6.3.4 多重 PCR 扩增产物电泳检测

用 $0.5 \times$  TBE缓冲液配制1.5%琼脂糖电泳凝胶并趁凝胶未凝固时加入核酸染色剂制胶。在电泳槽中加入电泳缓冲液，使液面没过凝胶2-3mm。将适量的多重PCR扩增产物分别和相应的 $6 \times$ 加样缓冲液混合，点样，其中一孔加入100 bp DNA ladder。4V/cm恒压，电泳20-30 min，紫外凝胶成像仪下观察电泳结果，拍照并记录结果。

## 7 结果及判读

### 7.1 PCR 扩增产物电泳检测结果

各致病菌PCR扩增产物大小见附录1。

### 7.2 结果判读

#### 7.2.1 对照结果

阳性对照出现预期大小的扩增条带。

阴性对照未出现预期大小的扩增条带。

空白对照未出现预期大小的扩增条带。

以上指标有一项不符合均视为此次实验无效。

#### 7.2.2 结果判定

待测样品出现对应目标菌预期大小的扩增条带，则判定样品为该种目标菌可疑阳性，可疑阳性样品用GB 4789与GB 4789.13进行确证，最终结果以国标检测结果为准。

待测样品未出现预期大小的扩增条带，为阴性结果。

## 8 废弃物处理和防止污染的措施

### 8.1 检测过程中的废弃物，收集后高压处理。

### 8.2 检测过程中防止交叉污染的措施可按照GB/T 27403-2008中附录D的规定执行。

附录1  
(规范性附录)

致病菌多重PCR检测所用引物及其扩增产物大小

致病菌名称	引物序列(5'to3')	产物大小
沙门氏菌	CCGCATCCCCTGAATTTAC	116
	CTGTGCATTAATACCCGCTG	
金黄色葡萄球菌	TACAGGACGATTTATTGCCAG	396
	GTTCCCGATTCTTATCTACAGC	
阪崎克罗诺杆菌	GATGGCAACAATACGTTTCGAC	507
	AACAGCAAACGGGATATTGA	
单核细胞增生李斯特氏菌	GCTTAATAACCCCTGACCG	260
	AATCCCAATCTTCCTAACCAC	
大肠埃希氏菌 O157:H7/NM	CGGAACAAAACCATGTGCA	450
	CCATTCCACCTTCACCTGT	
副溶血性弧菌	TCCCCAATTTCCAATCGTCT	400
	GAAGATTACCCGCTTGCTGTG	
创伤弧菌	CTCCTGACGCCAAAATTGTCC	868
	CAGCCGTTAACCGAACCAC	
产气荚膜梭菌	GCTGGGACATCAACTAAAGTC	463
	CGCTATCAACGGCAGTAAC	
铜绿假单胞菌	TGGAAGGCGGACTGATGT	106
	CCTCGTAATGCGGGAATG	
粪链球菌	GGGCATTTTTCTTTCGGGATTA	602
	CCGCTTGCCTCGCCTTCTA	



附录2  
(规范性附录)  
致病菌多重PCR检测体系

致病菌名称	10×PCR 缓冲液 (μL)	dNTPs (mM)	DNA 聚合酶 (U)	引物对浓度 (μM)
沙门氏菌、金黄色葡萄球菌	2.5	0.2	1.25	沙门氏菌: 0.4
				金黄色葡萄球菌: 0.8
单核细胞增生李斯特氏菌、大肠埃希氏菌 O157	2.5	0.2	1.25	单核细胞增生李斯特氏菌: 0.2
				大肠埃希氏菌 O157:H7: 0.2
副溶血性弧菌、创伤弧菌	2.5	0.2	1.25	副溶血性弧菌: 0.8
				创伤弧菌: 0.2
铜绿假单胞菌、粪链球菌	2.5	0.2	1.25	铜绿假单胞菌: 0.8
				粪链球菌: 0.4
阪崎克罗诺杆菌	2.5	0.2	1.25	0.2
产气荚膜梭菌	2.5	0.2	1.25	0.2