

# 团体标准

T/AHFS 006-2024

## 食品中单核细胞增生李斯特氏菌和金黄色葡萄球菌的快速检测（聚合酶螺旋反应法，PSR）

Rapid method for the detection of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in foods  
(polymerase spiral reaction, PSR)

2024-09-19 发布

2024-10-19 实施

安徽省食品科学技术学会 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。

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这些专利的责任。

本文件由安徽国泰众信检测技术有限公司提出。

本文件由安徽省食品科学技术学会归口管理。

本文件起草单位：安徽国泰众信检测技术有限公司、南京财经大学、浙江省质量科学研究院、安徽省食品药品检验研究院、马鞍山市食品药品检验和药品不良反应监测中心。

本文件主要起草人：陈洪周、陆颖健、李琦、张莫然、庞心怡、孙静、李向菲、黄嘉明、姚杰、张媛、曹品品、段佳丽、吴鹏、安虹、汪强、王兆明。



# 食品中单核细胞增生李斯特氏菌和金黄色葡萄球菌的快速检测（聚合酶螺旋反应法，PSR）

## 1 范围

本文件规定了食品中单核细胞增生李斯特氏菌（*Listeria monocytogenes*）和金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）的聚合酶螺旋反应（PSR）快速检测方法。

本文件适用于食品中单核细胞增生李斯特氏菌和金黄色葡萄球菌的快速检测。

## 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（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 4789.30 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 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 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1 聚合酶螺旋反应（Polymerase spiral reaction, PSR）

聚合酶螺旋反应，简称PSR，是一种新型恒温核酸扩增技术。利用2~4条特异性引物和具有链置换活性的*Bst* DNA聚合酶，可在恒温条件下完成对靶基因的快速扩增。因具有引物设计简单、扩增效率高且不需昂贵设备等优点而取得良好的应用效果。其体系内包含：Tris-HCl、硫酸铵、氯化钾、硫酸镁、Tween 20、甜菜碱、dNTP、*Bst* DNA聚合酶及特异性的两对引物。检测体积25 μL，45 min内完成检测，适用于现场检测。

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件：

DNA：脱氧核糖核苷酸（deoxyribonucleic acid）

dNTP：脱氧核苷酸三磷酸（deoxyribonucleoside triphosphate）

Tris：三羟甲基氨基甲烷[tris(hydroxymethyl)aminomethane]

HNB：羟基萘酚蓝（hydroxynaphthol blue）

## 5 原理

待测目标经增菌并提取DNA后，在聚合酶螺旋反应体系内加入1 μL-2 μL（20 ng-100 ng）DNA，在恒温65℃下反应30-60 min即可完成扩增。基本扩增原理为：在高浓度甜菜碱的作用下，诱导DNA单链和双链之间处于动态平衡。此外，利用*Bst* DNA 5'→3'聚合酶活性和链置换活性不断使新合成的产物变

性。随后，允许引物与目标片段结合，便于完成核酸扩增。与其他恒温核酸扩增系统相比，PSR引物设计较为简单且为单酶系统，以此提高反应稳定性来简化过程。可使用实时荧光和琼脂糖凝胶电泳验证检测结果。该法也可以与羟基萘酚蓝等颜色指示剂联用，从而完成肉眼对扩增结果的判读。羟基萘酚蓝是一种金属离子指示剂，可与反应体系当中的镁离子结合而成紫罗兰色，当核酸大量合成时，从dNTPs析出的焦磷酸根离子与反应缓冲液中的镁离子结合，生成焦磷酸镁，失去镁离子的羟基萘酚蓝就变成了天蓝色。

## 6 仪器与设备

- 6.1 冰箱：冷藏温度（2°C-4°C）、冷冻温度（-20°C）。
- 6.2 培养箱：36°C±1°C。
- 6.3 微型涡旋仪。
- 6.4 超净工作台。
- 6.5 超微量分光光度计。
- 6.6 金属浴加热器（37°C）。
- 6.7 水平电泳仪。
- 6.8 全自动化学发光图像分析系统。
- 6.9 实时荧光定量PCR仪。
- 6.10 微量移液器：0.5 μL-10 μL、0.1 μL-2.5 μL、10 μL-100 μL。

## 7 试剂与材料

### 7.1 质控菌株

表1 质控菌株

序号	菌株名称	拉丁文	菌株编号	备注
1	单核细胞增生李斯特氏菌	<i>Listeria monocytogenes</i>	CICC 21635	阳性菌株
2	金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	CICC21600	阳性菌株
3	大肠杆菌 O157:H7	<i>Escherichia coli</i>	CICC 21530	阴性菌株
4	蜡样芽孢杆菌	<i>Bacillus cereus</i>	CMCC 63301	阴性菌株
5	肠炎沙门氏菌	<i>Salmonella enteritidis</i>	CICC 21482	阴性菌株
6	鼠伤寒沙门氏菌	<i>Salmonella typhimurium</i>	CICC 21483	阴性菌株
7	福氏志贺菌	<i>Shigella flexneri</i>	CMCC 51571	阴性菌株
8	副溶血性弧菌	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CICC 21528	阴性菌株
9	创伤弧菌	<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 27562	阴性菌株

### 7.2 聚合酶螺旋反应试剂（-20°C保存）

Isothermal buffer（10×，200 mM Tris-HCl，500 mM 氯化钾，100 mM 硫酸铵，20 mM 硫酸镁和 1% Tween 20）；硫酸镁（100 mM，RG）；dNTP（10 mM）；甜菜碱（5 M，RG）；*Bst* 2.0 WarmStart® DNA 聚合酶（8,000 U/mL）；Evegreen（20×）；羟基萘酚蓝指示剂（3 mM）。

### 7.3 其他试剂

细菌DNA提取试剂盒，包括细菌DNA提取试剂、溶菌酶、RNase和蛋白酶K。

## 8 检测程序

食品中单核细胞增生李斯特氏菌和金黄色葡萄球菌的PSR快速检测程序，见图1。

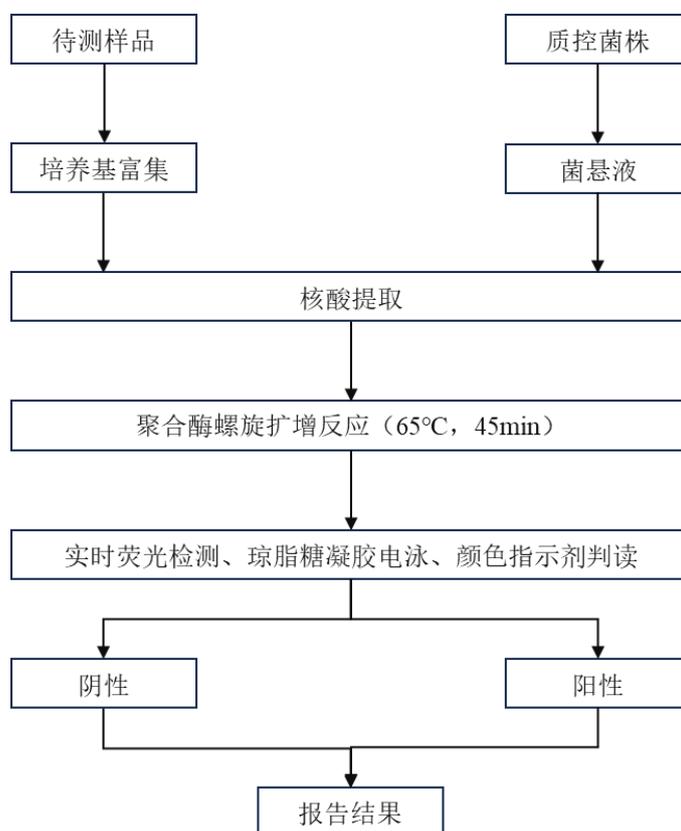


图1 食品中单核细胞增生李斯特氏菌和金黄色葡萄球菌的PSR快速检测程序图

## 9 操作步骤

### 9.1 样品制备、增菌培养

#### 9.1.1 方法一 质控菌株检测

将质控菌株富集为菌悬液并直接提取核酸，核酸浓度为20 ng/μL-100 ng/μL。

#### 9.1.2 方法二 样品中致病菌的检测

参照国标GB 4789.30取样方法，取25 g (mL) 待测样品，并将其置于盛有225 mL的共增菌培养基（附录B）的锥形瓶中，在36°C±1°C，180 rpm条件下培养8 h-18 h。

### 9.2 核酸提取

9.2.1 提取前应使用 180 μL 浓度为 20 mg/mL 溶菌酶，在 37°C条件下对菌液进行破壁处理 30 min。

9.2.2 利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒，将上述菌液中的 DNA 进行提取。具体操作步骤参考试剂盒说明书进行。

9.2.3 提取后的 DNA 使用超微量分光光度计测量模板浓度与纯度。

### 9.3 恒温扩增

#### 9.3.1 恒温扩增体系见表 2

下述恒温扩增体系组分储存于-20℃，使用前置于冰浴中溶解混匀。（主要引物Ft、Bt与加速引物IF、IB可提前以2:1的比例混合使用。）

若待测目标菌种为单核细胞增生李斯特氏菌，使用目标基因*hlyA*对应的主要引物（Ft、Bt）和加速引物（IF、IB）；若待测目标菌种为金黄色葡萄球菌，使用目标基因*nuc*对应的主要引物（Ft、Bt）和加速引物（IF、IB）（附录A.2）。反应体系其余试剂和浓度不变。

表2 恒温扩增体系

添加顺序	组分及工作浓度	终浓度	添加量
1	Isothermal buffer (10×)	1×	2.5 μL
2	甜菜碱 (5 M)	1.2 M	6 μL
3	dNTP (10 mM)	2 mM	5 μL
4	MgSO <sub>4</sub> (100 mM)	6 mM	1.5 μL
5	Ft 和 Bt (50 μM)	各 0.64 μM	各 0.25 μL
6	IF 和 IB (50 μM)	各 0.32 μM	各 0.125 μL
7	<i>Bst</i> 2.0 WarmStart® DNA 聚合酶 (8,000 U/mL)	320 U/mL	1 μL
8	DNA	-	2 μL
9	H <sub>2</sub> O	-	补齐至 25 μL
10	EveGreen (20×) / HNB (3 mM)	-	1 μL

#### 9.3.2 扩增程序

65℃金属浴反应45 min，再在85℃下反应2 min（使酶灭活），即可完成扩增反应。

### 9.4 目标菌种检测

#### 9.4.1 实时荧光检测

使用实时荧光定量PCR仪检测荧光信号。

(a) 自反应开始每隔60 s收集一次荧光信号，该阶段循环45次，即反应45 min（循环阶段）；

(b) 循环阶段结束后，升温至85℃，反应2 min（使酶灭活阶段）

在三个平行中任意一个反应孔有S型扩增曲线则判定为阳性，即该样本中含有对应检测项目的核酸；没有扩增曲线则判定为阴性，即该样本不含有对应检测项目的核酸。

#### 9.4.2 琼脂糖凝胶电泳检测

将扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测。1%琼脂糖凝胶配置方法：称取0.4 g琼脂糖，并用40 mL的1×TAE缓冲液将其溶解于锥形瓶中。将锥形瓶置于微波炉中加热30 s，重复三次，直到琼脂糖完全融解。加入4 μL 4S Green Plus 无毒核酸染料，轻晃溶液使核酸染料与琼脂糖混合均匀，随后倒入安装好的制胶板中，插入样品梳，等待琼脂糖凝胶凝固后待用。对应泳道产生阶梯状条带则为阳性，即该样本中含有对应检测项目的核酸；泳道内无阶梯状条带产生则为阴性，即该样本不含有对应检测项目的核酸。

### 9.4.3 羟基萘酚蓝颜色指示剂

在反应体系中加入1  $\mu\text{L}$ 羟基萘酚蓝颜色指示剂，3 min中内反应管内反应液为蓝色则为阳性；反应管内反应液为紫色则为阴性。

### 9.5 实验对照

检测过程中分别设三个空白对照、阴性对照、阳性对照。空白对照以灭菌水替代DNA模板；阴性对照为非目标菌DNA提取物或试剂盒内的阴性对照；阳性对照为目标菌DNA模板。

## 10 质量控制

以下条件有一条不满足时，实验视为无效：

(a) 空白对照：反应时间45 min内，实时荧光法无荧光信号检出；凝胶电泳法无阶梯状条；指示剂法反应液呈紫色。

(b) 阴性对照：反应时间45 min内，实时荧光法无荧光信号检出；凝胶电泳法无阶梯状条；指示剂法反应液呈紫色。

(c) 阳性对照：反应时间45 min内，实时荧光法出现荧光扩增曲线；凝胶电泳法出现阶梯状条；指示剂法反应液呈蓝色。

## 11 结果表述

11.1 结果为阴性，表述为“未检出单核细胞增生李斯特氏菌/金黄色葡萄球菌核酸”。

11.2 结果为阳性，表述为“单核细胞增生李斯特氏菌/金黄色葡萄球菌初筛阳性”，阳性样本按 GB 4789.10 或 GB 4789.30 进行确证并报告结果。

## 12 生物安全措施

12.1 实验室设备、设施要求及废弃物处理应符合 GB 19489 的规定。

12.2 聚合酶螺旋扩增技术的核酸扩增与检测工作应由具备生物实验操作经验人员承担。

12.3 检测过程中防止交叉污染的措施应按照 GB/T 27403 的规定执行。

## 附录 A

(规范性)

## 聚合酶螺旋扩增反应试剂组分和存放条件

## A.1 细菌 DNA 提取试剂盒与聚合酶螺旋扩增反应试剂盒组分及存放条件

表 A.1 细菌 DNA 提取试剂盒组分及存放条件

序号	名称	存放条件
1	细菌DNA提取试剂盒	常温
2	溶菌酶	-20℃
3	RNase	-20℃
4	蛋白酶K	-20℃

表 A.2 聚合酶螺旋扩增反应试剂盒成分及存放条件

序号	名称	存放条件	备注
1	荧光恒温扩增预混液	-20℃	Isothermal buffer、甜菜碱、dNTP、MgSO <sub>4</sub> 等
2	阳性对照	-20℃	目标致病菌对应的模板DNA
3	阴性对照	-20℃	非目标致病菌对应的模板DNA
4	空白对照	-20℃	灭菌去离子水
5	颜色指示剂	4℃	羟基萘酚蓝

## A.2 聚合酶螺旋扩增所使用的引物固定体系与引物序列

表A.3聚合酶螺旋扩增所使用的引物混合固定体系

组分	保存浓度	存放条件	终浓度	添加量
Ft主要引物	50 μM	-20℃	0.64 μM	0.25 μL
Bt主要引物	50 μM	-20℃	0.64 μM	0.25 μL
IF加速引物	50 μM	-20℃	0.32 μM	0.125 μL
IB加速引物	50 μM	-20℃	0.32 μM	0.125 μL

表 A.4 聚合酶螺旋扩增反应所使用的引物序列

物种	目标基因	引物名称	序列5'-3'
金黄色葡萄球菌	<i>nuc</i>	Ft	CCTCTTTGCGTATTGCCCTTGCTGGCATATGTATGGCAATC
		Bt	TTCCCGTTATGCGTTTCTCCTACGCCATTATCTGTTTGTA
		IF	CGAAACATTACTGATAGCCATCCC
		IB	GTCTAAGTAGCTCAGCAAATGC
单核细胞增生李斯特氏菌	<i>hlyA</i>	Ft	TTTTACAGGGAGAACATCTATTTTCGAGCCTAACCTATCC
		Bt	TCTACAAGAGGGACATTTTTACC GTTTGATTTAGTGGCATT
		IF	GCTTTTACGAGAGCACC
		IB	GCCAGGTATGACTAATCAAGAC

### A.3 聚合酶螺旋扩增的目标靶序列

金黄色葡萄球菌阳性菌株*nuc*靶标序列如下：

```
ATGACAGAATACTTATTAAGTGCTGGCATATGTATGGCAATCGTTTCAATATTACTTATAGGGAT
GGCTATCAGTAATGTTTCGAAAGGGCAATACGCAAAGAGGTTTTTCTATTTTCGCTACTAGTTGTTT
AGTGTTAACTTTAGTTGTAGTTTCAAGTCTAAGTAGCTCAGCAAATGCATCACAAACAGATAATG
GCGTAAATAGAAGTGGTTCTGAAGATCCAACAGTATATAGTGCAACTTCAACTAAAAAATTACAT
AAAGAACCTGCGACATTAATTAAGCGATTGATGGTGATACGGTTAAATTAATGTACAAAGGTC
AACCAATGACATTCAGACTATTATTGGTTGATACACCTGAAACAAAGCATCCTAAAAAAGGTGTA
GAGAAATATGGTCCTGAAGCAAGTGCATTTACGAAAAAAATGGTAGAAAATGCAAAGAAAATTG
AAGTCGAGTTTGACAAAGGTCAAAGAACTGATAAATATGGACGTGGCTTAGCGTATATTTATGCT
GATGGAAAAATGGTAAACGAAGCTTTAGTTCGTCAAGGCTTGGCTAAAGTTGCTTATGTTTATAA
ACCTAACAAATACACATGAACAACCTTTTAAGAAAAAGTGAAGCACAAAGCAAAAAAAGAGAAATT
AAATATTTGGAGCGAAGACAACGCTGATTCAGGTCAATAA
```

单核细胞增生李斯特氏菌阳性菌株*hlyA*靶标序列如下：

```
ATGAAAAAATAATGCTAGTTTTTATTACACTTATATTAGTTAGTCTACCAATTGCGCAACAAAC
TGAAGCAAAGGATGCATCTGCATTCAATAAAGAAAATTCAATTTTCATCCATGGCACCACCAGCAT
CTCCGCCTGCAAGTCCTAAGACGCCAATCGAAAAGAAACACGCGGATGAAATCGATAAGTATAT
ACAAGGATTGGATTACAATAAAAACAATGTATTAGTATACCACGGAGATGCAGTGACAAATGTG
CCGCCAAGAAAAGGTTACAAAGATGGAAATGAATATATTGTTGTGGAGAAAAGAAGAAATCCA
TCAATCAAATAATGCAGACATTCAAGTTGTGAATGCAATTTTCGAGCCTAACCTATCCAGGTGCT
CTCGTAAAAGCGAATTCGGAATTAGTAGAAAATCAACCAGATGTTCTCCCTGTAACCGTGATTC
ATTAACACTCAGCATTGATTTGCCAGGTATGACTAATCAAGACAATAAAATAGTTGTAAAAAATG
CCACTAAATCAAACGTTAACAACGCAGTAAATACATTAGTGGAAAGATGGAATGAAAAATATGC
TCAAGCTTATCCAAATGTAAGTGCAAAAATTGATTATGATGACGAAATGGCTTACAGTGAATCAC
AATTAATTGCGAAATTTGGTACAGCATTAAAGCTGTAAATAATAGCTTGAATGTAAACTTCGGC
GCAATCAGTGAAGGGAAAATGCAAGAAGAAGTCATTAGTTTTAAACAAATTTACTATAACGTGA
ATGTTAATGAACCTACAAGACCTTCCAGATTTTTTCGGCAAAGCTGTTACTAAAGAGCAGTTGCAA
GCGCTTGGAGTGAATGCAGAAAATCCTCCTGCATATATCTCAAGTGTGGCGTATGGCCGTCAAGT
TTATTTGAAATTATCAACTAATTCCCATAGTACTAAAGTAAAAGCTGCTTTTGATGCTGCCGTAAG
CGGAAAATCTGTCTCAGGTGATGTAGAATAACAATATCATCAAAAATTCCTCCTTCAAAGCCG
TAATTTACGGAGGTTCCGCAAAAGATGAAGTTCAAATCATCGGCGGCAACCTCGGAGACTTACG
CGATATTTTGAAAAAAGGCGCTACTTTTAATCGAGAAACACCAGGAGTTCCCATTTGCTTATACAA
CAAACCTCCTAAAAGACAATGAATTAGCTGTTATTAAAAACAACCTCAGAATATATTGAAACAAC
TCAAAGCTTATACAGATGGAAAAATTAACATCGATCACTCTGGAGGATACGTTGCTCAATTCAA
CATTTCTTGGGATGAAGTAAATTATGATCCTGAAGGTAACGAAATTGTTCAACATAAAAACCTGGA
GCGAAAACAATAAAAGCAAGCTAGCTCATTTACATCGTCCATCTATTTGCCTGGTAAACGCGAGA
AATATTAATGTTTACGCTAAAGAAATGCACTGGTTAGCTTGGGAATGGTGGAGAACGGTAATTGA
TGACCGGAACTTACCACTTGTGAAAAATAGAAATATCTCCATCTGGGGCACCACGCTTTATCCGA
AATATAGTAATAAAGTAGATAATCCAATCGAATAA
```

## 附录 B

(规范性)

### 培养基及试剂

#### B.1 共增菌培养基

适用于金黄色葡萄球菌和单核细胞增生李斯特氏菌

##### B.1.1 成分

胰蛋白胨 17.0 g/L  
蛋白胨 5.0 g/L  
酵母粉 6.0 g/L  
磷酸二氢钾 1.4 g/L  
磷酸氢二钾 9.0 g/L  
大豆蛋白胨 16 g/L  
氯化钠 20 g/L  
葡萄糖 15.5 g/L  
丙酮酸钠 12 g/L  
亚碲酸钾 2.5 mg/L  
萘啶酮酸 2 mg/L

##### B.1.2 制法

将胰蛋白胨、蛋白胨、酵母粉、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、大豆蛋白胨、氯化钠加入 990 mL 蒸馏水中，加热溶解后冷却至室温，并用 NaOH 溶液调节 pH 至 7.2-7.4，随后 121°C 灭菌 20 min。

葡萄糖与丙酮酸钠配置成浓度为 300 g/L 的母液；亚碲酸钾配置成浓度为 1 g/L 的母液；萘啶酮酸加入 0.1 M 的 NaOH 溶液中，配置成浓度为 1 g/L 的母液，储存于棕色避光瓶中。上述促进剂与抑制剂通过 0.22 μm 滤膜除菌后，保存于 4°C 冰箱。在使用前按浓度比例（葡萄糖 15.5 g/L、丙酮酸钠 12 g/L、亚碲酸钾 2.5 mg/L、萘啶酮酸 2 mg/L）加入上述灭菌后的培养基中。

## 附录 C

(规范性)

### 聚合酶螺旋扩增的质量控制

#### C.1 聚合酶螺旋扩增反应的控制

##### C.1.1 阳性对照

用标准菌株提取的DNA作为阳性对照，以评价聚合酶螺旋扩增反应是否正常。

##### C.1.2 质量控制

阳性样品经恒温扩增后出现实时荧光扩增曲线；空白对照经恒温扩增后无实时荧光检测信号。

