

# 团 体 标 准

T/ GDFCA XXXX—2025

## 食品中致病菌快速检测方法 荧光 PCR 法

Rapid Detection Methods for Foodborne Pathogenic Bacteria  
- Fluorescence PCR Method

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

2025 - XX - XX 发布

2025 - XX - XX 实施

广东省食品流通协会 发布

# 目 次

前 言 .....	II
1 范围 .....	3
2 规范性引用文件 .....	3
3 术语和定义 .....	3
4 缩略语 .....	4
5 测定原理 .....	4
6 试剂耗材 .....	4
7 仪器设备 .....	5
8 检验流程 .....	6
9 样品前处理 .....	7
10 反应步骤 .....	8
11 结果分析 .....	9
12 附录 .....	10
附录 A（技术性） 细菌快速核酸提取试剂盒（离心柱法） .....	10
附录 B（技术性） 沙门氏菌核酸检测试剂盒（冻干 PCR-荧光探针法） .....	11
附录 C（技术性） 目标菌引物和探针对照 .....	12
参 考 文 献 .....	13

## 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专利的责任。

本文件由广东省食品流通协会提出并归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

# 食品中致病菌快速检测方法 荧光 PCR 法

## 1 范围

本文件规定了食品中沙门氏菌、志贺氏菌、副溶血性弧菌、小肠结肠耶尔森氏菌、空肠弯曲菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌、肠出血性大肠埃希氏菌 O157:H7、创伤弧菌、霍乱弧菌、铜绿假单胞菌的荧光 PCR 定性检测方法，包括方法的原理、试剂和耗材、仪器和设备、试样的制备、分析步骤、验证要求等内容。

本文件适用于食品中沙门氏菌 (*Salmonella spp.*)、志贺氏菌 (*Shigella spp.*)、副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、小肠结肠耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*)、空肠弯曲菌 (*Campylobacter jejuni*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、单核细胞增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*)、肠出血性大肠埃希氏菌 O157:H7 (*Escherichia coli* O157:H7)、创伤弧菌 (*vibrio vulnificus*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的荧光 PCR 快速定性检测。

## 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 4789.4 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验
- GB 4789.5 食品安全国家标准 食品微生物学检验 志贺氏菌检验
- GB 4789.7 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 4789.8 食品安全国家标准 食品微生物学检验 小肠结肠炎耶尔森氏菌检验
- GB 4789.9 食品安全国家标准 食品微生物学检验 空肠弯曲菌检验
- 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 4789.28 食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求
- 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 4789.36 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 4789.44 食品安全国家标准 食品微生物学检验 创伤弧菌检验
- GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- SN/T 1022 进出口食品中霍乱弧菌检验方法
- SN/T 1870 出口食品中食源性致病菌检测方法 实时荧光PCR法
- SN/T 2099 进出口食品中绿脓杆菌检测方法
- SN/T 2775 商品化食品检测试剂盒评价方法

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

荧光 PCR 法 (Fluorescence PCR Method)

利用荧光标记的探针，通过聚合酶链式反应（PCR）扩增目标基因片段并实时检测荧光信号的检测方法。

### 3.2

#### CT 值（Cycle Threshold）

荧光信号达到设定阈值时的循环数，用于判断目标菌的存在。

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DNA: 脱氧核糖核酸(DeoxyriboNucleic Acid)

PCR: 聚合酶链反应（Polymerase Chain Reaction）

dNTP: 脱氧核苷三磷酸（Deoxy-ribonucleoside triphosphate）

dATP: 脱氧腺苷三磷酸（Deoxyadenosine Triphosphate）

dGTP: 脱氧鸟苷三磷酸（Deoxyadenosine triphosphate）

dCTP: 去氧胞苷二磷酸（Deoxycytidine diphosphate）

dTTP: 脱氧胸苷三磷酸（Deoxythymidine triphosphate）

dUTP: 脱氧尿苷三磷酸（Deoxyuridine triphosphate）

Tris: 三（羟甲基）氨基甲烷（Tris(hydroxymethyl)aminomethane）

Taq酶: Taq聚合酶（Taqpolymerase）

UNG酶: 尿嘧啶-N-糖基化酶（Uracil-N-Glycosylase）

## 5 测定原理

本荧光PCR检测技术是一种基于聚合酶链式反应（PCR）并结合Taqman荧光标记探针的分子生物学方法。选取目标菌属的特异性基因序列设计引物和具有荧光基团标记的寡核苷酸探针。通过生物富集、DNA模板制备、DNA变性、引物退火、DNA延伸、荧光信号检测、CT值分析实现对目标菌特异性片段定性检测的过程。PCR每进行一次循环会产生一定的荧光信号，荧光信号的强度与PCR产物的量成正比关系，当荧光信号强度达到或超过设定阈值时，确定CT值，表示该DNA模板有特异性基因序列，以此可判定样品中目标菌的检出与否。

## 6 试剂耗材

除非另有规定，所用试剂均采用分析纯。检测用水符合GB/T 6682中一级水的规格要求。培养基和生化试剂的质量符合GB 4789.28的规定要求。

### 6.1 细菌基因组DNA提取试剂盒

### 6.2 沙门氏菌检测试剂盒（冻干型PCR-荧光探针法）

### 6.3 志贺氏菌检测试剂盒（冻干型PCR-荧光探针法）

### 6.4 副溶血性弧菌检测试剂盒（冻干型PCR-荧光探针法）

### 6.5 小肠结肠耶尔森氏菌检测试剂盒（冻干型PCR-荧光探针法）

### 6.6 空肠弯曲菌检测试剂盒（冻干型PCR-荧光探针法）

### 6.7 金黄色葡萄球菌检测试剂盒（冻干型PCR-荧光探针法）

### 6.8 单核细胞增生李斯特氏菌检测试剂盒（冻干型PCR-荧光探针法）

### 6.9 肠出血性大肠埃希氏菌 O157:H7检测试剂盒（冻干型PCR-荧光探针法）

- 6.10 创伤弧菌检测试剂盒（冻干型PCR-荧光探针法）
- 6.11 霍乱弧菌检测试剂盒（冻干型PCR-荧光探针法）
- 6.12 铜绿假单胞菌检测试剂盒（冻干型PCR-荧光探针法）
- 6.13 缓冲蛋白胨水（BPW）
- 6.14 志贺氏菌增菌肉汤-新生霉素
- 6.15 3%氯化钠碱性蛋白胨水
- 6.16 改良磷酸盐缓冲液
- 6.17 Bolton 肉汤（Bolton broth）
- 6.18 7.5%氯化钠肉汤
- 6.19 李氏增菌肉汤 LB(LB1 ,LB2 )
- 6.20 改良EC肉汤（mEC+n）
- 6.21 蛋白胨-氯化钠-纤维二糖-多粘菌素E（PNCC）增菌液
- 6.22 碱性蛋白胨水（APW）
- 6.23 SCDLP增菌液
- 6.24 无菌双蒸水（ddH<sub>2</sub>O）/超纯水
- 6.25 溶菌酶：10-20 mg/mL
- 6.26 细胞裂解液：SDS溶液（1-2%（w/v））
- 6.27 Tris-EDTA缓冲液：Tris-HCl（10-50 mM（pH 8.0））、EDTA（1 mM）
- 6.28 异丙醇：分析纯
- 6.29 无水乙醇：分析纯
- 6.30 引物和探针：针对目标基因序列设计的特异性引物和荧光标记探针
- 6.31 Taq酶：耐高温的Taq DNA聚合酶，用于DNA扩增
- 6.32 dNTPs：脱氧核苷三磷酸混合物，作为PCR反应的原料
- 6.33 阳性对照：已知含有目标基因序列的样品，用于验证检测系统的有效性
- 6.34 阴性对照：不含目标基因序列的样品，用于排除假阳性结果

注：细菌基因组DNA提取试剂盒组成参照附录A；冻干型PCR-荧光探针法试剂盒组成参照附录B。

## 7 仪器设备

除微生物和分子生物实验室常规设备外，其他设备和材料如下：

- 7.1 冰箱：2 °C~8 °C、-20 °C
- 7.2 恒温培养箱：26 °C±1 °C、30 °C±1 °C、36 °C±1 °C、37 °C±1 °C、42 °C±1 °C
- 7.3 恒温培养箱/恒温水浴锅：41.5 °C±1 °C
- 7.4 厌氧培养装置：41.5 °C±1 °C
- 7.5 微需氧培养装置：提供微需氧条件（5%氧气、10%二氧化碳和85%氮气）
- 7.6 均质器
- 7.7 振荡器
- 7.8 无菌锥形瓶：容量500 mL
- 7.9 无菌培养皿：直径90 mm
- 7.10 无菌均质杯或均质袋：容量500 mL
- 7.11 超净工作台
- 7.12 生物安全柜
- 7.13 天平：感量0.1 g

- 7.14 荧光定量PCR仪
- 7.15 离心机/冷冻离心机:  $\geq 10\ 000$  rpm
- 7.16 移液器及无菌吸头:  $100\ \mu\text{L}\sim 1000\ \mu\text{L}$ 、 $20\ \mu\text{L}\sim 200\ \mu\text{L}$ 、 $10\ \mu\text{L}\sim 100\ \mu\text{L}$ 、 $1\ \mu\text{L}\sim 10\ \mu\text{L}$
- 7.17 PCR管或微孔板
- 7.18 恒温水浴锅/沙浴锅:  $100\ ^\circ\text{C}$
- 7.19 微孔板离心机
- 7.20 涡旋混匀器
- 7.21 pH计或pH比色管或精密pH试纸

## 8 检验流程

食品样品经过取样、均质等制备方法,按照目标菌增菌方法富集,提取DNA模板后,依据预定的荧光PCR反应体系,经荧光信号采集后判定结果。

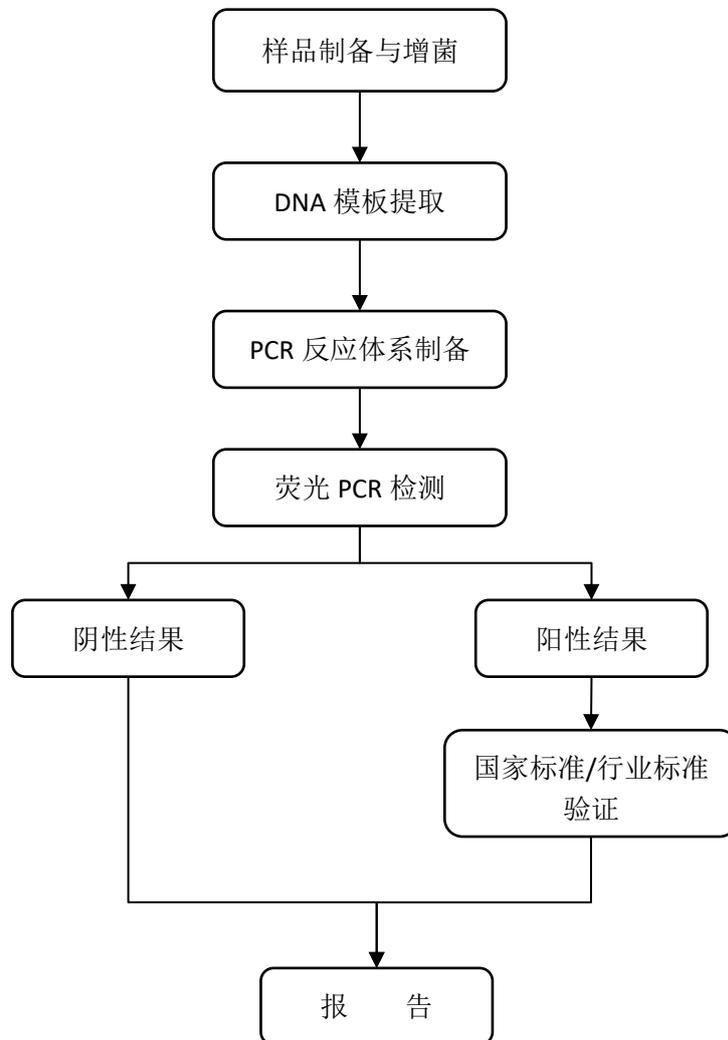


图1 快速荧光PCR检验流程

## 9 样品前处理

### 9.1 样品制备与增菌

按检验类别选择适当的样品制备与增菌方法。

检验类别	样品制备方法
沙门氏菌	按GB 4789.4的规定进行
志贺氏菌	按GB 4789.5的规定进行
副溶血性弧菌	按GB 4789.7的规定进行
小肠结肠耶尔森氏菌	按GB 4789.8的规定进行
空肠弯曲菌	按GB 4789.7的规定进行
金黄色葡萄球菌	按GB 4789.10的规定进行
单核细胞增生李斯特氏菌	按GB 4789.30的规定进行
肠出血性大肠埃希氏菌O157	按GB 4789.36的规定进行
创伤弧菌	按GB 4789.44的规定进行
霍乱弧菌	按SN/T 1022的规定进行
铜绿假单胞菌	按SN/T 2099的规定进行

### 9.2 DNA 模板提取

对于 9.1 中获得的增菌液，采用如下方法制备 DNA 模板。剩余增菌液放置 2 ℃~8 ℃保存以备再次验证。

#### 9.2.1 方法一 通用提取法

a) 在距离增菌液的液面下 1 cm 处吸取 1 mL，置于 1.5 mL 离心管中，9000 r/min 离心 3 min，弃去上清液。

b) 向沉淀中加入 1 mL 无菌生理盐水/无菌超纯水将其悬浮并充分清洗后，9000 r/min 离心 3min，弃去上清液。

c) 按 b) 步骤反复清洗沉淀 2 次~3 次，弃去最后一遍上清液。

d) 加入 1 mL 无菌超纯水，100 ℃煮沸 10 min，继而 12000 r/min 离心 5 min，保留上清液用于 PCR 分析。

e) 若不能及时分析，可放置-20 ℃保存，最长不超过 6 个月。

#### 9.2.2 方法二 试剂盒提取法

可使用等效的商品化的 DNA 提取试剂盒，并按其说明提取制备模板 DNA（附录 A）。

### 9.3 荧光 PCR 反应体系制备

试剂名称	浓度	添加量 (μL)
PCR 缓冲液	10×	2.5
MgCl <sub>2</sub>	25 mmol/L	3.0
dNTP	10 mmol/L each	0.5

引物 (F)	10 $\mu\text{mmol/L}$	0.5
引物 (R)	10 $\mu\text{mmol/L}$	0.5
<i>Taq</i> 聚合酶	5 U/ $\mu\text{L}$	0.5
<i>UNG</i> 酶	1 U/ $\mu\text{L}$	0.25
探针	10 $\mu\text{mmol/L}$	0.5
DNA 模板	10 $\mu\text{g/mL}$ ~100 $\mu\text{g/mL}$	2.0
超纯水	/	14.75
总体积	/	25

建议使用等效商品化的荧光 PCR 检测试剂盒（附录 B），按照产品指导说明进行操作。  
目标引物和探针等试剂（见附录 C）

## 10 反应步骤

### 10.1 荧光 PCR 反应条件

开启检测设备，参考下列扩增程序设置参数，件根据不同基因扩增仪器型号的不同进行适当的调整。

阶段	循环步骤	温度	时间	循环数
1	去污染	50 $^{\circ}\text{C}$	2 min	1
	预变性	95 $^{\circ}\text{C}$	1min~5 min	1
2	热变性	95 $^{\circ}\text{C}$	5 s~10 s	40
	退火/延伸	60 $^{\circ}\text{C}$	30 s（荧光采集）（FAM通道 检测荧光）	

建议使用等效商品化的荧光 PCR 检测试剂盒，按照产品指导说明进行操作。

### 10.2 对照设置

空白对照：反应体系中的DNA模板用超纯水代替。

阴性对照：DNA模板采用不含扩增片段的菌株DNA模板。

阳性对照：DNA模板为阳性目标菌克隆分子DNA或者阳性菌株提取的DNA。

## 11 结果分析

### 11.1 有效性判定

空白对照：无扩增曲线或CT值 $\geq 40$ ；

阴性对照：无扩增曲线或CT值 $\geq 40$ ；

阳性对照：典型扩增曲线且CT值 $< 30$ 。

### 11.2 结果判定

样品CT值 $\leq 35$ ，且有典型的扩增曲线，则判定结果为阳性；

样品 $35 < \text{CT值} < 40$ ，应重做样品再次验证，若CT值仍保持小于40，且有典型的扩增曲线，则判定结果为阳性，否则判定结果为阴性；

样品CT值 $\geq 40$ ，判定结果为阴性。

### 11.3 阳性结果验证及报告

确定初步检验结果为阳性的，对样品的增菌液或可疑菌落进一步按照国标方法或行业标准方法操作步骤进行确认后报告结果。

结果报告方式为：检出或未检出/25 g (25 mL)。

## 12 附录

## 附录 A（技术性） 细菌快速核酸提取试剂盒（离心柱法）

## 附录A.1 原理

采用离心柱法，利用高盐条件下离心柱吸附核酸，低盐条件下释放核酸的原理，对细菌纯培养物中的细菌进行核酸提取。

## 附录A.2 成分及储存要求

组成	储存要求
裂解液L	避光常温保存
漂洗液	常温保存
洗脱液	常温保存
吸附柱(含收集管)	2-8°C保存

## 附录A.3 操作方法

## 附录A.3.1.样品前处理

参照国标或其它行业标准进行前增菌处理。

## 附录A.3.2.模板制备

- 1) 混合增菌液：取100ul菌液至裂解液L管中，盖盖，摇匀（生物安全柜或超净工作台中操作），室温放置5-10分钟；
- 2) 吸附核酸：离心5~10秒，将离心管中溶液全部转移至离心柱（下接收集管）中，12000 rpm离心1 min，弃去收集管中的滤液，装回吸附柱；
- 3) 洗涤：在吸附柱中加入500μL漂洗液，12000 rpm离心1 min，弃去收集管中的滤液，装回吸附柱。重复上述步骤两次；
- 4) 干燥：12000 rpm离心2 min，弃去收集管，将吸附柱转移至新的1.5mL离心管中打开吸附柱管盖，室温晾干2min。
- 5) 洗脱：加入50μL的洗脱液至吸附柱膜中央，静置3 min 后12000 rpm离心1 min，弃去吸附柱，
- 6) 所得液体即为提取的核酸基因组，作为扩增模板，纯化的核酸即可进行后续实验或-20°C(更低温度)长期保存。

注：以“康泽睿检”细菌核酸提取试剂盒系列品牌为例。

## 附录 B（技术性） 沙门氏菌核酸检测试剂盒（冻干 PCR-荧光探针法）

## 附录B.1 原理

基于荧光定量PCR原理设计，针对食品中的沙门氏菌特异DNA片段进行特异性扩增检测，并通过实时荧光曲线判断是否含有沙门氏菌。

## 附录B.2 成分及储存条件

组分	储存要求
沙门氏菌-核酸检测试剂	常温存放 / 开袋后密封冷藏保存
沙门氏菌-阳性对照	常温存放 / 复溶后冷冻保存
纯水	常温存放

## 附录B.3 操作方法

## 附录B.3.1 试剂准备)

取出核酸检测试剂铝箔袋，沿撕开口打开铝箔袋取出试剂（可根据样品数量取所需试剂管），将冻干粉轻甩到管底部后置于离心管架上，根据待扩增样本名称/编号进行标识，取用数量=阴性对照1+待测样本N+阳性对照1。

## 附录B.3.2 添加模板（模板添加区，放置于冰盒中进行）

打开管盖，加入15 μL待测样本DNA模板（阴性对照加入15 μL纯水、阳性对照加入15 μL复溶后的阳性对照溶液），盖上管盖，涡旋振荡或轻弹混匀后瞬时离心，让反应液离心到管底，立即进行PCR扩增反应。

## 附录B.3.3 扩增反应（扩增及产物分析区）

将反应管放入仪器中，设置样品、参数及荧光采集通道：FAM-沙门氏菌，反应体系设置为15μL，热盖设置为105℃，仪器设置完毕后启动程序。

## 附录B.3.4 基线和阈值设定

基线调整取3-15个循环的荧光信号，阈值线应超过阴性对照扩增曲线的最高点。

注：以“康泽睿检”PCR检测试剂盒系列品牌为例；其他荧光PCR检测试剂盒参照附录B内容。

附录 C (技术性) 目标菌引物和探针对照

目标菌	引物对和探针序列 (5'-3')
沙门氏菌 ( <i>Salmonella spp.</i> )	F: GCGGCGTTGGAGAGTGATA R: AGCAATGGAAAAAGCAGGATG P: FAM-CATTTCTTAAACGGCGGTGTCTTTCCCT-BHQ1
志贺氏菌 ( <i>Shigella spp.</i> )	F: CGCAATACCTCCGATTCC R: TCCGCAGAGGCACTGAGTT P: FAM-AACAGGTCGCTGCATGGCTGGAA-BHQ1
副溶血性弧菌 ( <i>Vibrio parahaemolyticus</i> )	F: GCGACCTTCTCTGAAATATTAATTGT R: CATTCGCGTGGCAAACATC P: FAM-CGCACAAGGCTCGACGGCTGA-BHQ1
小肠结肠耶尔森氏菌 ( <i>Yersinia enterocolitica</i> )	F: AAGAAGGCCTTCGGGTGTAA R: TTCTGCGAGTAACGTCATCACA P: FAM-ATTAACCTTTATGCCTTCCTCCTCGCTG-BHQ1
空肠弯曲菌 ( <i>Campylobacter jejuni</i> )	F: TTGGTATGGCTATAGGAACCTTATAGCT R: CACACCTGAAGTATGAAGTGGTCTAAGT P: FAM-ATGGCATATCCTAATTTA-MGB
金黄色葡萄球菌 ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	F: TTCTTCACGACTAAATAAACGCTCA R: GGTACTACTAAAGATTATCAAGACGGCT P: FAM-CAGAACACAATGTTCCGATGCAACGT-BHQ1
单核细胞增生李斯特氏菌 ( <i>Listeria monocytogenes</i> )	F: CTGAATCTCAAGCAAAACCTGGT R: CGCGACCGAAGCCAACTA P: FAM- ATACGATAACATCCACGGCTCTGGCTGG -BHQ1
肠出血性大肠埃希氏菌 O157:H7 ( <i>Escherichia coli</i> O157:H7)	F: TCCTCAGCTATAGGGTGCTTTTTG R: ATCGAAACAAGCCAGTTTTTTAC P: FAM- TATTTTTCCGAGTACATTGGCATCGTGTGG- BHQ1
创伤弧菌 ( <i>vibrio vulnificus</i> )	F: TGTTTATGGTGAGAACGGTGACA R: TTCTTTATCTAGGCCCAAACCTTG P: FAM- CCGTTAACCGAACCACCGCAA -BHQ1
霍乱弧菌 ( <i>Vibrio cholerae</i> )	F: GCTTTATTGTTTCGATGCGTTAAAC R: GATGCCAAAATTGTGCGTATCA P: FAM- TCTTGGGCAATCGCATCGGTTGA -BHQ1
铜绿假单胞菌 ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )	F: GCGACCGTCAGTTCAGGTAA R: ACGGATACCTCTCCCTACCG P: FAM- ACCAGGAAGGCTCGCGCACATC -BHQ1

注：引物（对）浓度10 μmol/L；探针浓度10 μmol/L

### 参 考 文 献

- [1] 吴静波,南文金,胡鸿惠,等.5种猪源消化道传播病原体荧光定量PCR检测方法的建立[J].中国兽医杂志,2024,60(03):18-26.
- [2] 闵红,蔡虎,孙瑶,等.药品中金黄色葡萄球菌实时荧光定量PCR精准快检[J].陕西师范大学学报(自然科学版),2024,52(05):113-121.
- [3] 李丹丹,徐义刚,王绥家,等.肠出血性大肠埃希菌O157:H7实时荧光定量PCR快速检测方法的建立[J].中国畜牧兽医,2014,41(07):81-84.
-