



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4525.9—2016

## 出口食品中致病菌的分子分型 MLST 方法 第 9 部分：单核细胞增生李斯特氏菌

Multilocus sequence typing detection method for pathogens in export food—  
Part 9: *Listeria monocytogenes*

2016-06-28 发布

2017-02-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布  
国家质量监督检验检疫总局



## 前 言

SN/T 4525《出口食品中致病菌的分子分型 MLST 方法》共分 10 个部分：

- 第 1 部分：沙门氏菌；
- 第 2 部分：金黄色葡萄球菌；
- 第 3 部分：副溶血性弧菌；
- 第 4 部分：霍乱弧菌；
- 第 5 部分：克罗诺杆菌；
- 第 6 部分：化脓链球菌；
- 第 7 部分：空肠弯曲菌；
- 第 8 部分：致泻性大肠埃希氏菌；
- 第 9 部分：单核细胞增生李斯特氏菌；
- 第 10 部分：小肠结肠炎耶尔森氏菌。

本部分为 SN/T 4525 的第 9 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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这些专利的责任。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位：中华人民共和国广东出入境检验检疫局、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局、广州市番禺质量技术监督检测所。

本部分主要起草人：刘二龙、袁慕云、邓建英、幸芳、许龙岩、吕英姿、蒋原、薛峰、邵景东、陈碧玲。

## 出口食品中致病菌的分子分型 MLST 方法

### 第 9 部分:单核细胞增生李斯特氏菌

#### 1 范围

SN/T 4525 的本部分规定了出口食品中单核细胞增生李斯特氏菌分子分型 MLST 检测方法。  
本部分适用于出口食品中单核细胞增生李斯特氏菌的分子分型检测。

#### 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—2010 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 术语和定义、缩略语

##### 3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

###### 3.1.1

**管家基因** **house-keeping genes**

所有细胞中均要表达的一类基因,其产物是对维持细胞基本生命活动所必需的,其基因序列高度保守并且在大多数情况下持续表达。又称看家基因,持家基因。

###### 3.1.2

**TaqDNA 聚合酶** ***Thermus aquaticus* DNA polymerase**

从 *Thermus aquaticus* 细菌中提取的耐热 DNA 聚合酶。

##### 3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

dNTP:脱氧核糖核苷三磷酸(deoxy-ribonucleoside triphosphate)

EDTA:乙二胺四乙酸(Ethylene Diamine Tetraacetic Acid)

MLST:多位点序列分型(multilocus sequence typing)

ST:序列型(Sequence Type)

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

#### 4 原理

MLST 是通过测定多个管家基因中长度约为 470 bp 核心片段的核苷酸序列,对其组合进行索引编

号,不同的菌株对应不同的序列型,从而揭示菌株间等位基因的多样性。MLST 分型中多个管家基因的序列分析比较在实验过程的操作性与结果的可靠性之间取得了平衡,且结果准确,所得数据在不同的实验室间具有良好的可比性。

## 5 试剂和材料

除有特殊说明外,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 提取液:50 mmol/L Tris-HCl(pH8.0),100 mmol/L EDTA(pH8.0),100 mmol/L NaCl,1%SDS。

5.2 酚:三氯甲烷:异戊醇(25:24:1)。

5.3 异丙醇。

5.4 75%乙醇。

5.5 TE 溶液(pH8.0):10 mmol/L Tris-HCl(pH8.0),1 mmol/L EDTA(pH8.0),高压灭菌。

5.6 高保真 *Taq* DNA 聚合酶。

5.7 dNTP:dATP、dTTP、dCTP、dGTP。

5.8 引物:扩增引物和测序引物序列见表 A.2。

5.9 5×PCR 缓冲液:100 mmol/L Tris-HCl(pH 8.4),100 mmol/L 氯化钾,7.5 mmol/L 氯化镁。

5.10 琼脂糖。

5.11 EB 核酸染色剂。

5.12 分子量标记:100 bp~2 000 bp DNA marker。

5.13 5×TBE 电泳缓冲液:445 mmol/L Tris,445 mmol/L 硼酸,10 mmol/L EDTA(pH8.0)。使用时稀释为 0.5×TBE 电泳缓冲液。

5.14 质控菌株:单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC19115 或等效菌株。

## 6 仪器和设备

6.1 离心机。

6.2 天平:量程 2 kg,感量 0.1 g。

6.3 pH 计。

6.4 涡旋振荡器。

6.5 PCR 仪。

6.6 电泳仪。

6.7 凝胶成像仪。

6.8 生物安全柜。

6.9 水浴锅。

6.10 核酸蛋白分析仪。

6.11 基因测序仪

6.12 移液器:0.1 μL~2.5 μL、2 μL~20 μL、20 μL~200 μL、100 μL~1 000 μL。

## 7 操作流程

多位点序列分子分型的操作流程见图 1。



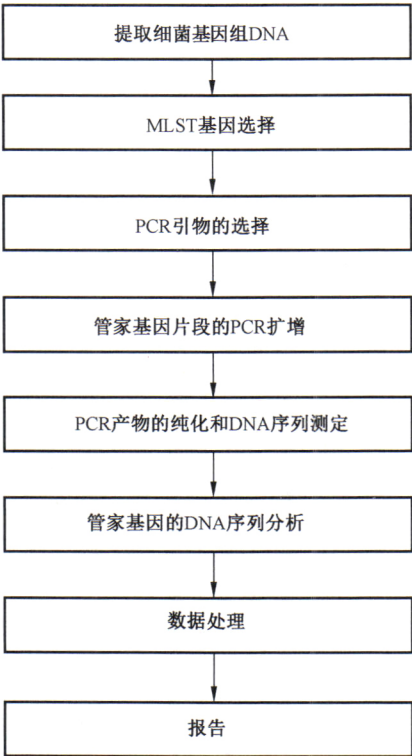


图 1 多位点序列分型(MLST)操作流程

8 检测步骤

8.1 细菌基因组 DNA 提取

将经过 GB 4789.30—2010 的方法鉴定为单核细胞增生李斯特氏菌的菌株提取其基因组 DNA：取增菌培养后的待测菌液 1 mL，加到 1.5 mL 离心管中，8 000 r/min 离心 3 min，弃去上清；加入 750 μL DNA 提取液，65 ℃ 温浴 30 min，加酚：三氯甲烷：异戊醇(25：24：1)500 μL，振荡混匀，13 000 r/min 离心 5 min，吸取 500 μL 上清液与 400 μL 的异丙醇充分混合，13 000 r/min 离心 5 min，75%乙醇冲洗沉淀一次，13 000 r/min 离心 5 min，弃去上清，沉淀干燥后溶于 30 μL TE 溶液中，立即用于检测或短期保存于－20 ℃。

注：也可使用其他经验证的 DNA 提取方法或等效的商品化细菌 DNA 提取试剂盒，按照其使用说明操作。

8.2 DNA 浓度和纯度的测定

样品中提取的 DNA 的纯度和浓度用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计测定，分别检测 260 nm 和 280 nm 处的吸光值  $A_{260}$  和  $A_{280}$ 。

DNA 的浓度按式(1)计算：

$$c = A \times N \times \frac{500}{1\,000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- $c$ ——DNA 浓度，单位为微克每毫升(μg/mL)；
- $A$ ——260 nm 处的吸光值；
- $N$ ——核酸稀释倍数。

DNA 的纯度按  $A_{260}/A_{280}$  计算,当  $A_{260}/A_{280}$  比值在 1.7~1.9 之间时,适宜于 PCR 扩增。

### 8.3 MLST 基因选择

按表 A.1 所示,选择单核细胞增生李斯特氏菌的 7 个管家基因进行 MLST 分析。

### 8.4 PCR 扩增引物和测序引物的选择

按表 A.2 合成单核细胞增生李斯特氏菌 7 个管家基因对应的 PCR 扩增引物和测序引物。其中对于种系Ⅲ的单核细胞增生李斯特氏菌,在用引物 lhkAoF 和 lhkAoR 扩增 lhkA 基因失败时,可采用 lhkA-F3 和 lhkA-R2 进行扩增;引物稀释为 10  $\mu\text{mol/L}$  工作液备用。

### 8.5 管家基因片段的 PCR 扩增

反应体系体积为 50  $\mu\text{L}$ :5 $\times$ PCR 缓冲液 10  $\mu\text{L}$ 、dNTP(2.5 mmol/L)4  $\mu\text{L}$ 、上、下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 1  $\mu\text{L}$ 、Taq DNA 聚合酶(5 U/ $\mu\text{L}$ )0.5  $\mu\text{L}$ 、模板 DNA 1.5  $\mu\text{L}$ 、水 32  $\mu\text{L}$ 。

abcZ、cat、dapE、dat 和 ldh 基因的反应条件为:98  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s,52  $^{\circ}\text{C}$  退火 12 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,35 个循环,72  $^{\circ}\text{C}$  充分延伸 10 min,4  $^{\circ}\text{C}$  保存反应产物。

lhkA 基因的反应条件为:98  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s,52  $^{\circ}\text{C}$  退火 18 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,35 个循环,72  $^{\circ}\text{C}$  充分延伸 10 min,4  $^{\circ}\text{C}$  保存反应产物。

bglA 基因的反应条件为:98  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s,45  $^{\circ}\text{C}$  退火 15 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,35 个循环,72  $^{\circ}\text{C}$  充分延伸 10 min,4  $^{\circ}\text{C}$  保存反应产物。

注:PCR 反应参数和体系可根据不同公司的基因扩增仪和 DNA 聚合酶进行适当的调整。

将 PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色后紫外光下成像观察,条带单一且明亮的样品进行 PCR 产物纯化与 DNA 序列测定。

### 8.6 DNA 序列测定

采用表 A.2 中的测序引物用基因测序仪对管家基因的 DNA 序列进行双向测序。也可请有同等能力的公司测序。

### 8.7 结果报告

将单核细胞增生李斯特氏菌株的 7 个管家基因双向测序结果用软件(如 DNASTar 等)拼接和剪裁成标准序列,上传至 MLST 网站(<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Lmono.html>)进行在线数据分析,获得分离菌株等位基因信息,确定分离株的序列型(Sequence Type,ST)。在确定 STs 的基础上应有 MEGA4 或其他软件对单增李斯特菌菌株进行聚类分析,构建系统遗传进化树(参见附录 B)。

## 9 生物安全措施和防污染措施

### 9.1 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检测单核细胞增生李斯特氏菌,所有培养物和废弃物应按照 GB 19489 中的有关规定执行。

### 9.2 防污染措施

防止污染措施应符合 GB/T 27403 的规定。

附 录 A  
(规范性附录)

单核细胞增生李斯特氏菌多位点序列分型的管家基因及引物序列

表 A.1 单核细胞增生李斯特氏菌管家基因

基因	片段	管家基因序列对应 GeneBank 中的登记号	管家基因名称
abcZ	537	AY158265-AY158276	ABC 转运蛋白基因(ABC transporter)
bglA	399	AY158286-AY158295	$\beta$ 葡糖苷酶(beta glucosidase)
cat	486	AY158249-AY158264	过氧化氢酶(catalase)
dapE	462	AY158303-AY158316	丁二酰二氨基庚琥珀酰酶(succinyl diaminopimelate desuccinylase)
dat	471	AY158277-AY158284	D-氨基酸转氨酶(D-amino acid aminotransferase)
ldh	453	AY160115-AY160122	L-乳酸脱氢酶(L-lactate dehydrogenase)
lhkA	480	AY158296-AY158302	组氨酸激酶(histidine kinase)

表 A.2 单核细胞增生李斯特氏菌管家基因的扩增引物序列和测序引物序列

引物类别	引物名称	引物序列(5'→3')
扩增引物	abcZoF(Forward)	GTTTTCCCAAGTCACGACGTTGTATCGCTGCTGCCACTTTTATCCA
	abcZoR(Reverse)	TTGTGAGCGGATAACAATTTCTCAAGGTCGCCGTTTAGAG
	bglAoF(Forward)	GTTTTCCCAAGTCACGACGTTGTAGCCGACTTTTATGGGGTGGAG
	bglAoR(Reverse)	TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGATTAAATACGGTGCGGACATA
	catoF(Forward)	GTTTTCCCAAGTCACGACGTTGTAATTGGCGCATTTTGATAGAGA
	catoR(Reverse)	TTGTGAGCGGATAACAATTTTCAGATTGACGATTCTGCTTTTG
	dapEoF(Forward)	GTTTTCCCAAGTCACGACGTTGTACGACTAATGGGCATGAAGAACAAG
	dapEoR(Reverse)	TTGTGAGCGGATAACAATTTTCATCGAACTATGGGCATTTTACC
	datoF(Forward)	GTTTTCCCAAGTCACGACGTTGTAGAAAGAGAAGATGCCACAGTTGA
	datoR(Reverse)	TTGTGAGCGGATAACAATTTCTGCGTCCATAATACACCATCTTT
	ldhoF(Forward)	GTTTTCCCAAGTCACGACGTTGTAGTATGATTGACATAGATAAAGA
	ldhoR(Reverse)	TTGTGAGCGGATAACAATTTCTATAAATGTCGTTTCATACCAT
	lhkAoF(Forward)	GTTTTCCCAAGTCACGACGTTGTAAGAATGCCAACGACGAAACC
	lhkAoR(Reverse)	TTGTGAGCGGATAACAATTTCTGGGAAACATCAGCAATAAAC
	对于种系Ⅲ的单核细胞增生李斯特氏菌,在用引物 lhkAoF 和 lhkAoR 扩增 lhkA 基因失败时可采用引物 lhkA-F3 和 lhkA-R2	
	lhkA-F3	GCAAGTTTTGAATACGTATCAGCG
	lhkA-R2	TACGCATTTTCATGAGAAACATCAG



表 A.2(续)

引物类别	引物名称	引物序列(5'→3')
测序引物	abcZoF(Forward)	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA
	abcZoR(Reverse)	TTGTGAGCGGATAACAATTT
	bglAoF(Forward)	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA
	bglAoR(Reverse)	TTGTGAGCGGATAACAATTT
	catoF(Forward)	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA
	catoR(Reverse)	TTGTGAGCGGATAACAATTT
	dapEoF(Forward)	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA
	dapEoR(Reverse)	TTGTGAGCGGATAACAATTT
	datoF(Forward)	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA
	datoR(Reverse)	TTGTGAGCGGATAACAATTT
	ldhoF(Forward)	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA
	ldhoR(Reverse)	TTGTGAGCGGATAACAATTT
	lhkAoF(Forward)	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA
	lhkAoR(Reverse)	TTGTGAGCGGATAACAATTT
	lhkA-F3	GCAAGTTTTGAATACGTATCAGCG
	lhkA-R2	TACGCATTTTCATGAGAAACATCAG

附 录 B  
(资料性附录)  
系统遗传进化树的构建

将所得到的部分单核细胞增生李斯特氏菌 7 个管家基因核酸扩增片段 DNA 序列进行 MLST 分析,获得菌株所对应的等位基因图谱,确定单核细胞增生李斯特氏菌分离株的序列型(ST)。在确定 ST 的基础上应用 MEGA4 或其他相关软件绘制的系统遗传进化树,图 B.1 为部分单核细胞增生李斯特氏菌进行 MLST 分析后,应用 MEGA4 绘制的系统遗传进化树图。

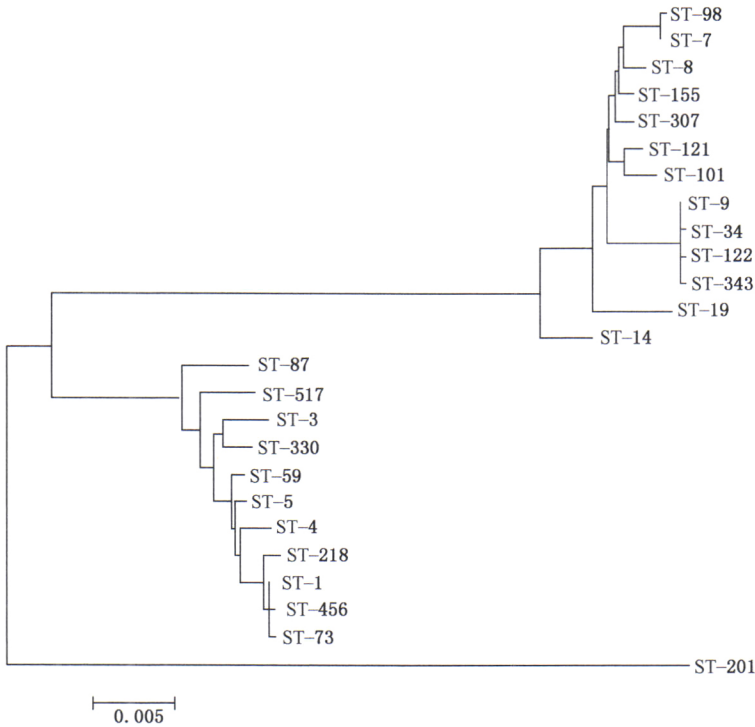


图 B.1 部分单核细胞增生李斯特氏菌分离株遗传进化树图