

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2754.12—2011

出口食品中致病菌环介导恒温
扩增(LAMP)检测方法
第 12 部分:溶藻弧菌

Loop-mediated isothermal amplification detection method for pathogens
in export food—Part 12: *Vibrio alginolyticus*

2011-02-25 发布

2011-07-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

SN/T 2754《出口食品中致病菌环介导恒温扩增(LAMP)检测方法》共分为 15 个部分：

- 第 1 部分：金黄色葡萄球菌；
- 第 2 部分：大肠杆菌 O157；
- 第 3 部分：志贺氏菌；
- 第 4 部分：单核细胞增生李斯特菌；
- 第 5 部分：副溶血性弧菌；
- 第 6 部分：小肠结肠炎耶尔森氏菌；
- 第 7 部分：空肠弯曲菌；
- 第 8 部分：肺炎克雷伯氏菌；
- 第 9 部分：溶血性链球菌；
- 第 10 部分：产气荚膜梭菌；
- 第 11 部分：产霍乱毒素的霍乱弧菌；
- 第 12 部分：溶藻弧菌；
- 第 13 部分：创伤弧菌；
- 第 14 部分：假结核耶尔森氏菌；
- 第 15 部分：阪崎肠杆菌。

本部分为 SN/T 2754 的第 12 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：中华人民共和国北京出入境检验检疫局、中华人民共和国广东出入境检验检疫局、中华人民共和国湖北出入境检验检疫局、中华人民共和国珠海出入境检验检疫局、中华人民共和国天津出入境检验检疫局、中华人民共和国江苏盐城出入境检验检疫局、中华人民共和国重庆出入境检验检疫局、广州华峰生物科技有限公司。

本部分主要起草人：魏海燕、曾静、李志勇、曾宪东、冯家望、郑文杰、徐帮兴、易敏英、谭志、曹以诚、高东微。

出口食品中致病菌环介导恒温 扩增(LAMP)检测方法

第 12 部分:溶藻弧菌

1 范围

SN/T 2754 的本部分规定了检测出口食品中溶藻弧菌的环介导恒温核酸扩增(LAMP)法。本部分适用于出口食品中溶藻弧菌的筛选检测。

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/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

NMKL No. 156 食品中致病性弧菌的检测和计数

3 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溶藻弧菌,所有培养物和废弃物应按照 GB 19489 中的有关规定执行。

4 防污染措施

防止污染措施应符合 GB/T 27403 的规定。

5 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

Betaine:甜菜碱

Bst 酶[*Bst* DNA polymerase(large fragment)];*Bst*/DNA 聚合酶(大片段)

CT(cholera toxin):霍乱毒素

DNA(deoxyribonucleic acid):脱氧核糖核酸

dNTP(deoxyribonucleoside triphosphate):脱氧核苷三磷酸

EDTA(ethylenediamine tetraacetic acid):乙二胺四乙酸

LAMP(loop-mediated isothermal amplification):环介导恒温扩增

Triton X-100:聚乙二醇辛基苯基醚

6 技术概要

根据溶藻弧菌胶原酶基因序列(参见附录 A)设计特异性内引物、外引物各一对和一条环状引物,特异性识别靶序列上的 7 个独立区域。利用 *Bst* 酶启动循环链置换反应,在胶原酶基因序列启动瓦补链合成,在同一链上互补序列周而复始形成有很多环的花椰菜结构的茎-环 DNA 混合物;从 dNTP 析出的焦磷酸根离子与反应溶液中的 Mg^{2+} 结合,产生副产物(焦磷酸镁)形成乳白色沉淀,加入显色液,即可通过颜色变化观察判定结果。

7 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。

7.1 引物:根据溶藻弧菌属特有的靶序列设计一套特异性引物,包括外引物 1,外引物 2,内引物 1,内引物 2 和环状引物。

外引物扩增片段长度:215 bp。

外引物 1(F3,5'-3'):CAGCACGCGTACTTACCG

外引物 2(B3,5'-3'):TCAGCACCGATTGATGACG

内引物 1(FIP,5'-3'):TTGCGCATATACCAGTGCTGGGTTTTCAAGTGACCCAGTGGCTTAC

内引物 2(BIP,5'-3'):TGGGCAGTGGAACGAGCAATTTTTTTCCTCAGAGCAAATCGCCTA

环状引物(LB,5'-3'):AACCAAACAGACCTTGCCGA

7.2 DNA 提取液:含 20 mmol/L Tris-HCl(pH8.0)、2 mmol/L EDTA 和 1.2% TritonX-100。

7.3 dNTP:10 mmol/L。

7.4 *Bst* 酶:8 U/ μ L。

7.5 10×ThermoPol 缓冲液:含 200 mmol/L Tris-HCl(pH8.8)、100 mmol/L 硫酸铵、100 mmol/L 氯化钾、20 mmol/L 硫酸镁、1% Triton X-100。

7.6 硫酸镁:50 mmol/L。

7.7 甜菜碱:5 mol/L。

7.8 显色液:SYBR Green I 荧光染料,1 000×。

7.9 阳性对照:溶藻弧菌标准菌株,或含目的片段的 DNA 亦可。

7.10 1.5 mL 塑料离心管。

8 仪器和设备

8.1 移液器:量程 0.5 μ L~10 μ L;量程 10 μ L~100 μ L;量程 100 μ L~1 000 μ L。

8.2 高速台式离心机: $\geq 7\ 000g$ 。

8.3 水浴锅或加热模块:65 $^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ 和 100 $^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ 。

8.4 计时器。

9 检测程序

食品中溶藻弧菌 LAMP 检测程序见图 1。

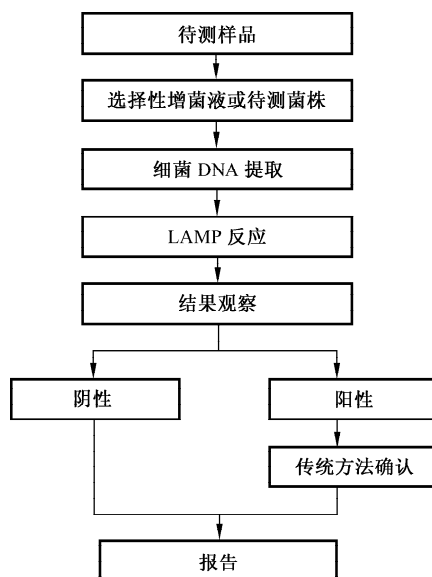


图 1 食品中溶藻弧菌 LAMP 检测程序

10 操作步骤

10.1 样品制备、增菌培养

参照 NMKL No. 156 进行样品制备和增菌。

10.2 细菌模板 DNA 的制备¹⁾

10.2.1 增菌液模板 DNA 的制备

对于 10.1 获得的增菌液,采用如下方法制备模板 DNA:

- 直接取增菌液 1 mL 加到 1.5 mL 无菌离心管中,7 000g 离心 2 min,尽量吸弃上清液;
- 加入 50 μ L DNA 提取液,混匀后沸水浴 10 min,置冰上 10 min;
- 于 7 000g 离心 2 min,上清液即为模板 DNA;取上清液置 -20 $^{\circ}$ C 可保存 6 个月备用。

10.2.2 可疑菌落模板 DNA 的制备

对于 10.1 分离到的可疑菌落,可直接挑取可疑菌落,再按照 10.2.1 b) 步骤制备模板 DNA 以待检测。

10.3 环介导恒温核酸扩增

10.3.1 反应体系

溶藻弧菌 LAMP 反应体系见表 1。

1) 采用下述方法,也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。

表 1 溶藻弧菌 LAMP 反应体系

组 分	工作液浓度	加 样 量 μL	反应体系终浓度
ThermoPol 缓冲液	10×	2.5	1×
外侧上游引物(F3)	10 $\mu\text{mol/L}$	0.5	0.2 $\mu\text{mol/L}$
外侧下游引物(B3)	10 $\mu\text{mol/L}$	0.5	0.2 $\mu\text{mol/L}$
内侧上游引物(FIP)	50 $\mu\text{mol/L}$	0.8	1.6 $\mu\text{mol/L}$
内侧下游引物(BIP)	50 $\mu\text{mol/L}$	0.8	1.6 $\mu\text{mol/L}$
环状下游引物(LB)	50 $\mu\text{mol/L}$	0.4	0.8 $\mu\text{mol/L}$
dNTPs	10 mmol/L	3.5	1.8 $\mu\text{mol/L}$
甜菜碱	5 mol/L	6	1.2 mol/L
硫酸镁	50 mmol/L	3	6 mmol/L
<i>Bst</i> DNA 聚合酶	8 U/ μL	1	0.32 U/ μL
DNA 模板	—	3	—
去离子水	—	3	—

10.3.2 反应过程

10.3.2.1 按表 1 所述配制反应体系。

10.3.2.2 于 65 °C 恒温扩增 60 min, 80 °C 2min 使酶失活, 反应即结束。

10.3.3 空白对照、阴性对照、阳性对照设置

每次反应应设置阴性对照、空白对照和阳性对照。

空白对照以水代替 DNA 模板。

阴性对照以 DNA 提取液代替 DNA 模板。

阳性对照制备: 将溶藻弧菌标准菌株接种于 3% 氧化钠碱性蛋白胨水 (APW) 中 36 °C \pm 1 °C 培养 18 h~24 h, 用无菌生理盐水稀释至约 10^6 CFU/mL~ 10^8 CFU/mL (约麦氏浊度 0.4), 按 10.2.1 提取模板 DNA 作为 LAMP 反应的模板。

10.4 结果观察

在上述反应管中加入 2 μL 显色液, 轻轻混匀并在黑色背景下观察。

10.5 结果判定和报告

在空白对照和阴性对照反应管液体为橙色, 阳性对照反应管液体呈绿色的条件下:

a) 待检样品反应管液体呈绿色, 该样品结果为溶藻弧菌初筛阳性, 对样品的增菌液或可疑纯菌落进一步按 NMKL No. 156 中操作步骤进行确认后报告结果;

b) 待检样品反应管液体呈橙色, 则可报告溶藻弧菌检验结果为阴性。

若与上述条件不符, 则本次检测结果无效, 应更换试剂按本方法重新检测。

附录 A
(资料性附录)

溶藻弧菌胶原酶基因序列(部分)及 LAMP 引物设计示意图(accession no. DQ097161)

641 TGCAGCACGC GTACTTACCG CAAGTGACCC AGTGGCTTAC ACGTTGGAAT GATCAATACG
F3→ F2→

701 CCCAGCACTG GTATATGCGC AATGCGGTTA ATGGTGTTTT CACTATTTTG TTTGGTGGGC
GGGTCGTGAC CATATACGCG TT B1c→
←F1c

761 AGTGGAACGA GCAATTTGTG CAAATAATTG GTAACCAAAC AGACCTTGCC GAAGCTTTAG
LB→ ATC

821 GCGATTTTGC TCTGAGGGCG TCATCAATCG GTGCTGAAGA TGAGTTTATG GCCGCGAATG
CGCTAAAACG AGACTCC GC AGTAGTTAGC CACGACT
←B2 ←B3

F3(5'-3'): CAGCACGCGTACTTACCG

B3(5'-3'): TCAGCACCGATTGATGACG

FIP(F1c+F2 5'-3'): TTGCGCATATACCAGTGCTGGGTTTTCAAGTGACCCAGTGGCTTAC

BIP(B1c+B2 5'-3'): TGGGCAGTGGAACGAGCAATTTTTTTCCTCAGAGCAAAAATCGCCTA

LB(5'-3'): AACCAAACAGACCTTGCCGA

注: 下划线标注序列为溶藻弧菌 LAMP 引物设计所选取的 7 个区域, 黑色字体为 LAMP 引物所用到的序列。F3 和 B3 分别是外侧上游引物和外侧下游引物; FIP 和 BIP 分别是内侧上游引物和内侧下游引物; LB 是环状下游引物。