

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2754.14—2011

出口食品中致病菌环介导 恒温扩增(LAMP)检测方法 第14部分:假结核耶尔森氏菌

Loop-mediated isothermal amplification detection method for pathogens
in export food—Part 14: *Yersinia pseudotuberculosis*

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 14 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:中华人民共和国天津出入境检验检疫局、中华人民共和国山东出入境检验检疫局、中华人民共和国广东出入境检验检疫局、中华人民共和国江门出入境检验检疫局、广州华峰生物科技有限公司。

本部分主要起草人:郑文杰、张宏伟、张霞、刘伟、侯丽萍、王志强、蔡国瑞、张海英、李正义、孙慈惠、易敏英、李志勇、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 14 部分:假结核耶尔森氏菌

1 范围

SN/T 2754 的本部分规定了检测出口食品中假结核耶尔森氏菌的环介导恒温核酸扩增(LAMP)法。

本部分适用于出口食品中假结核耶尔森氏菌的筛选检测。

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 4789.8 食品卫生微生物学检验 小肠结肠炎耶尔森氏菌检测方法

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 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假结核耶尔森氏菌,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:甘氨酸三甲内盐

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

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):环介导恒温核酸扩增

Triton X-100:聚乙二醇辛基苯基醚

6 技术概要

根据假结核耶尔森氏菌属特有的靶序列 *inv* 基因序列(参见附录 A)设计的内、外引物及环状引物各一对,特异性识别靶序列上的八个独立区域,利用 *Bst* 酶启动循环链置换反应,在 *inv* 基因序列启动互补链合成,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:根据假结核耶尔森氏菌特有的靶序列 *inv* 基因序列设计一套特异性引物,包括外引物 1,外引物 2 和内引物 1,内引物 2 及环状上游引物和环状下游引物。

外引物扩增片段长度:230 bp。

外引物 1(F3,5'-3'):CTCGTCGCGTGATTTCTTCC

外引物 2(B3,5'-3'):GATCTACCCCGACAGTGAGT

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

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

环状上游引物(LF,5'-3'):CATTCGCGCGCAAATCC

环状下游引物(LB,5'-3'):GCAACGCAACCCTTATGC

7.2 *Bst* DNA 聚合酶。

7.3 dNTP:dATP、dTTP、dCTP、dGTP。

7.4 DNA 提取试剂:细菌基因组 DNA 提取试剂盒。

7.5 TE 缓冲液:10 mmol/L Tris-HCl(pH8.0)、1 mmol/L EDTA(pH8.0)。

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

7.7 硫酸镁:10 mmol/L。

7.8 显色液:SYBR Green I 荧光染料,1 000×。

7.9 阳性对照:假结核耶尔森氏菌标准菌株,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:63 $^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ 和 100 $^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ 。

8.4 计时器。

9 检测程序

食品中假结核耶尔森氏菌 LAMP 检测程序见图 1。

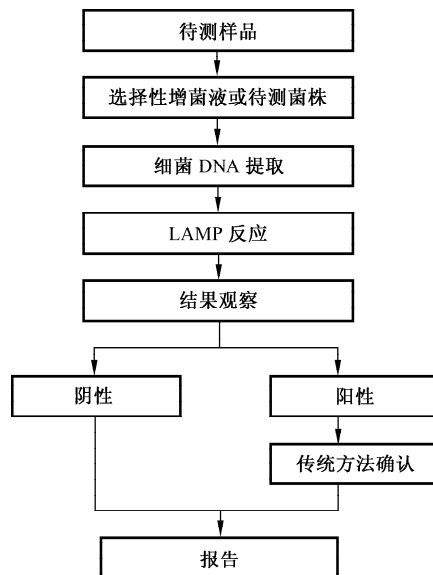


图 1 食品中假结核耶尔森氏菌 LAMP 检测程序

10 操作步骤

10.1 样品制备及增菌培养

按照 GB/T 4789.8 的方法进行样品制备和增菌。

10.2 模板 DNA 提取

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:

- 直接取该增菌液 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 80 μ L DNA 提取液,混匀后沸水浴 10 min,置冰上 10 min;
- 7 000g 离心 2 min,上清液即为模板 DNA;取上清液置 -20°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 10.2.1b) 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

假结核耶尔森氏菌 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 假结核耶尔森氏菌 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×	5.0	1×
外侧上游引物(F3)	10 $\mu\text{mol/L}$	1.0	0.2 $\mu\text{mol/L}$
外侧下游引物(B3)	10 $\mu\text{mol/L}$	1.0	0.2 $\mu\text{mol/L}$
内侧上游引物(FIP)	20 $\mu\text{mol/L}$	4.0	1.6 $\mu\text{mol/L}$
内侧下游引物(BIP)	20 $\mu\text{mol/L}$	4.0	1.6 $\mu\text{mol/L}$
环状上游引物(LF)	20 $\mu\text{mol/L}$	2.0	0.8 $\mu\text{mol/L}$
环状下游引物(LB)	20 $\mu\text{mol/L}$	2.0	0.8 $\mu\text{mol/L}$
dNTPs	10 mmol/L	2.0	0.4 mmol/L
硫酸镁	10 mmol/L	1.0	0.2 mmol/L
<i>Bst</i> DNA 聚合酶	8 U/ μL	2.0	0.32 U/ μL
DNA 模板	—	2.0	—
去离子水	—	24	—

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 63 °C 恒温扩增 60 min。

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。

空白对照设为以水替代 DNA 模板。

阴性对照以 TE 缓冲液代替模板 DNA。

阳性对照制备:将假结核耶尔森氏菌标准菌株接种于营养肉汤中 36 °C ±1 °C 培养过夜,用无菌生理盐水稀释至约 10⁶ CFU/mL~10⁸ 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 1 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,该样品结果为假结核耶尔森氏菌初筛阳性,对样品的增菌液或可疑纯菌落进一步按 GB/T 4789.8 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假结核耶尔森氏菌检验结果为阴性。

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)
假结核耶尔森氏菌靶基因序列

A.1 假结核耶尔森氏菌靶基因序列(accession no. M17448.1)

1141 attgaccgg ccacaaccac cgtatcggtc ttggtgccga ggectggacc gattatttac
 1201 agttggetgc caatgggtat tttgcctca atggatggca **ctcgtcgcgt gatttccg**
 1261 **actataaaga gcgccagcc actggggggg atttgcgcgc gaatgcttat ttacctgac**
 1321 **tcccacaact gggggggaag ttgatgtatg agcaatacac cggtgagcgt gttgctttat**
 1381 **ttggtaaaga taatctgcaa cgcaaccctt atgccgtgac tgccgggatc aattacacc**
 1441 **ccgtgcctct actcactgtc ggggtagatc** agcgtatggg gaaaagcagt aagcatgaaa
 1501 cacagtggaa ctccaaatg aactatcgcc tgggcgagag ttttcagtgc caacttagcc

注：阴影所示部分为假结核耶尔森氏菌靶基因序列。

A.2 组成引物中碱基构成

F3: CTCGTCGCGTGATTTCTCC

B3: GATCTACCCCGACAGTGAGT

$\xleftarrow{\text{F1c}} \quad \xrightarrow{\text{F2}}$
 FIP: CCAGTTGTGGGAGTGCAGGTA ACTATAAAGAGCGCCCAGCC

$\xrightarrow{\text{B1c}} \quad \xleftarrow{\text{B2}}$
 BIP: CACCGGTGAGCGTGTTGCTTT GTGTAATTGATCCCGGCAGT

LF: CATTGCGCGCAAATCC

LB: GCAACGCAACCCTTATGC