



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3306.11—2017

国境口岸环介导恒温扩增 (LAMP)检测方法 第 11 部分:副溶血性弧菌

Loop-mediated isothermal amplification detection method
at frontier port—Part 11: *Vibrio parahaemolyticus*

2017-05-12 发布

2017-12-01 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 3306《国境口岸环介导恒温扩增(LAMP)检测方法》分为 14 个部分：

- 第 1 部分：鼠疫杆菌；
- 第 2 部分：产毒素霍乱弧菌；
- 第 3 部分：志贺氏菌；
- 第 4 部分：嗜肺军团菌；
- 第 5 部分：布鲁氏菌；
- 第 6 部分：黄热病毒；
- 第 7 部分：猴痘病毒；
- 第 8 部分：基孔肯雅病毒；
- 第 9 部分：结核分枝杆菌；
- 第 10 部分：炭疽芽孢杆菌；
- 第 11 部分：副溶血性弧菌；
- 第 12 部分：空肠弯曲菌；
- 第 13 部分：疟原虫；
- 第 14 部分：大肠杆菌 0157:H7。

本部分为 SN/T 3306 的第 11 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、中华人民共和国北京出入境检验检疫局、中华人民共和国河北出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：李智慧、王飞、闫冀焕、潘娟、柴宏森、祁军。

国境口岸环介导恒温扩增 (LAMP)检测方法 第 11 部分:副溶血性弧菌

1 范围

SN/T 3306 的本部分规定了在国境口岸利用环介导恒温核酸扩增(LAMP)法检测副溶血性弧菌的检测对象、检测程序及检测结果的报告。

本部分适用于国境口岸副溶血性弧菌菌株的筛选检测。

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 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/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

WS/T 230 临床诊断中聚合酶链反应(PCR)技术的应用

WS 271 感染性腹泻诊断标准

人间传染的病原微生物名录(卫科教发[2006]15号)

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

Betaine:甜菜碱。

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

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

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

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

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

Triton X-100:聚乙二醇辛基苯基醚

4 生物安全及防污染措施

实验生物安全要求、操作及处理按照 GB 19489 和《人间传染的病原微生物名录》的规定执行,由通过生物安全培训并具备资质的工作人员进行。防止污染措施应符合 WS/T 230 的规定。

5 技术概要

根据副溶血性弧菌的特异性毒力基因序列设计特异性内外引物及环状引物各一对,共三对引物,特

异性识别靶序列上的 M36437 基因,利用 Bst 酶启动循环链置换反应,在特异性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,即可通过反应液中的浑浊程度判定结果。亦可加入显色液,通过观察颜色变化判定结果。

6 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。

6.1 引物。

根据副溶血性弧菌特有的靶序列基因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 1,环状引物 2。

外引物 1(F3,5'-3'):AGCTACTCGAAAGATGATCC

外引物 2(B3,5'-3'):GGTTGTATGAGAAGCGATTG

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

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

环状引物 1(LF,5'-3'):ACCAGTAGCCGTCAATG

环状引物 2(LB,5'-3'):TTAGATTTGGCGAACGAGA

6.2 DNA 提取液:含 20 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)、2 mmol/L EDTA 和 1.2% Triton X-100。

6.3 dNTPs:每种核苷酸浓度 10 mmol/L。

6.4 Bst DNA 聚合酶:8 U/ μ L。

6.5 10 × ThermoPol 缓冲液:含 200 mmol/L Tris-HCl(pH 8.8)、100 mmol/L $(NH_4)_2SO_4$ 、100 mmol/L KCl、20 mmol/L $MgSO_4$ 、1% Triton X-100。

6.6 $MgSO_4$ 溶液:25 mmol/L。

6.7 甜菜碱:5 mol/L。

6.8 显色液:浓度为 1 000 × SYBR Green I。

6.9 阳性对照:可溯源的标准菌株,或含目的片段的 DNA 亦可。

6.10 3%氯化钠碱性蛋白胨水。

6.11 0.2 mL、1.5 mL 和 10 mL 塑料离心管。

6.12 吸头,配套移液器使用。

6.13 无菌匀质袋(带滤网)。

7 仪器和设备

7.1 移液器:量程 0.1 μ L~2 μ L,0.5 μ L~10 μ L,量程 10 μ L~100 μ L,量程 100 μ L~1 000 μ L。

7.2 高速台式离心机: $\geq 7\ 000\ g$ 。

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

7.4 恒温培养箱:36 $^{\circ}C \pm 1\ ^{\circ}C$ 和 42 $^{\circ}C \pm 1\ ^{\circ}C$ 。

7.5 拍打式匀质器。

7.6 计时器。

8 检测程序

副溶血性弧菌 LAMP 检测程序见图 1。

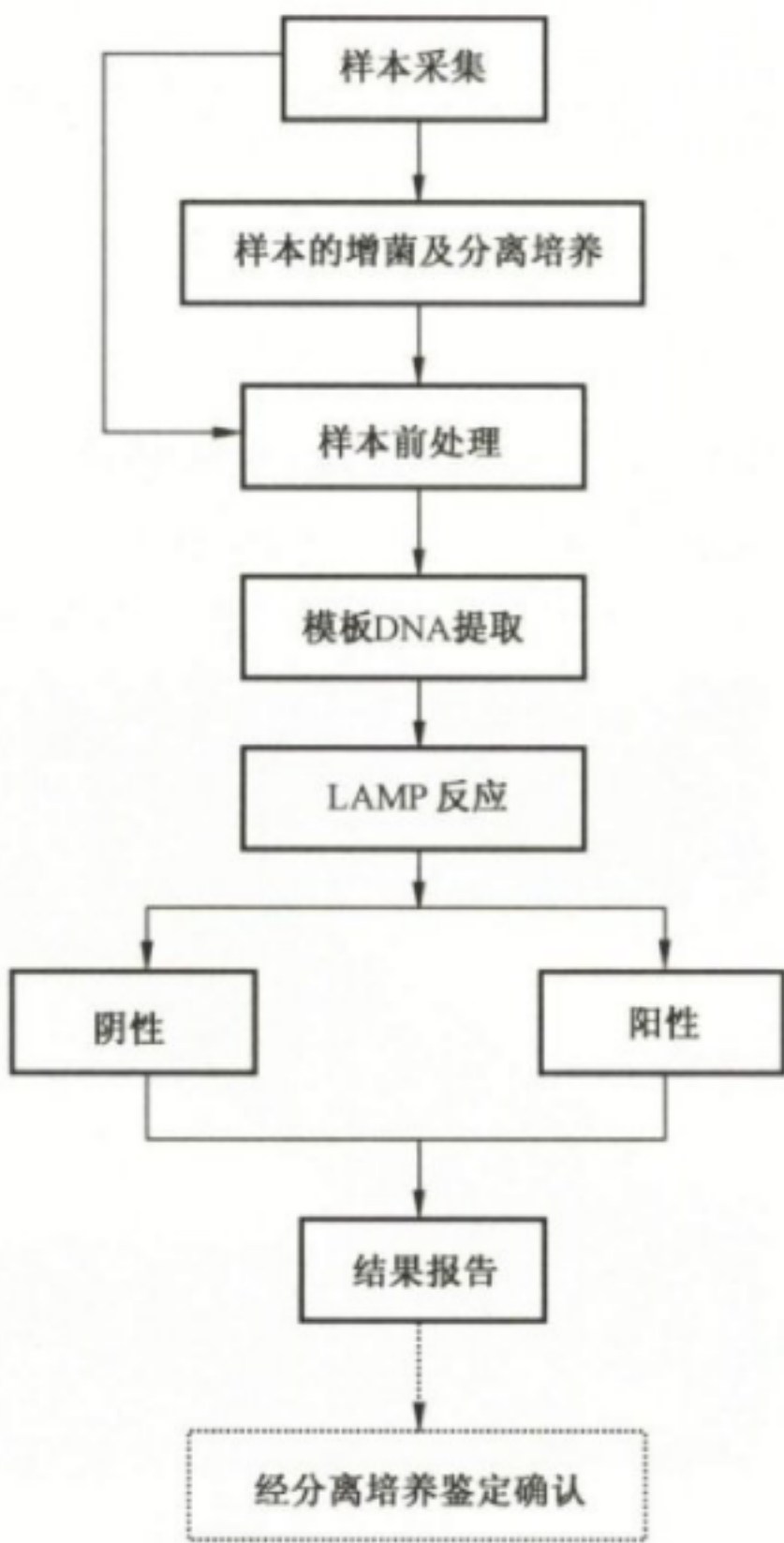


图 1 副溶血性弧菌 LAMP 检测程序

9 操作步骤

9.1 样本采集、细菌增菌及分离培养

按照 GB/T 4789.7、WS 271 执行。

9.2 样本前处理

9.2.1 粪便样本的前处理

选取黄豆大小的成形便，每份标本湿重约 4 g，收集在无菌塑料袋中，4℃冰箱保存。预处理时每份粪便标本放置于装有 6 mL PBS(0.05 mol/L, pH 7.4)的离心管中，振荡混匀 5 min~10 min 后，500 g 离心 5 min，收集上清，此步骤重复 3 次。然后上清液 4 000 g 离心 10 min，收集沉淀，沉淀重悬于 1 mL 双蒸水(ddH₂O)中，7 000 g 离心 5 min，收集沉淀。将沉淀溶于 200 μL(−20℃)预冷的无水乙醇中，振荡混匀后，7 000 g 离心 2 min，弃上清，此步骤重复 3 次，最终保留沉淀备用。水样便无需前处理，可直接用于后续 DNA 提取。

9.2.2 食物标本的前处理

取可疑食物约 25 g 放入盛有 225 mL 3%氯化钠碱性蛋白胨水的有滤网的无菌匀质袋中，用拍击式匀质器匀质约 1 min~2 min，将滤液于 36℃±1℃培养 8 h~18 h 增菌。取该增菌液 1 mL 加到 1.5 mL 无菌离心管中，7 000 g 离心 2 min 保存沉淀备用。

9.2.3 可疑菌落的前处理

分离培养后得到的可疑菌落直接用于提取 DNA 模板,无需前处理。

9.3 模板 DNA 的提取

9.3.1 加热煮沸法

向前处理后得到的沉淀中加入 100 μL DNA 提取液;水样便直接取 100 μL 加入 100 μL DNA 提取液;可疑菌落直接挑取 1 个~2 个可疑菌落加入 80 μL DNA 提取液。之后将上述提取混合液其置于沸水浴 10 min,7 000 g 离心 2 min,收集上清作为扩增模板,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

9.3.2 试剂盒提取

按适用于细菌基因组提取的试剂盒说明书操作。

9.4 环介导恒温核酸扩增

9.4.1 反应体系

副溶血性弧菌的环介导引物恒温扩增反应体系见表 1。

表 1 副溶血性弧菌的环介导引物恒温扩增反应体系

试剂名称	储备液浓度	体系加样量 μL
10 \times ThermoPol 缓冲液	—	5.0
F3 引物	10 $\mu\text{mol/L}$	0.5
B3 引物	10 $\mu\text{mol/L}$	0.5
FIP 引物	40 $\mu\text{mol/L}$	0.8
BIP 引物	40 $\mu\text{mol/L}$	0.8
LF 引物	100 $\mu\text{mol/L}$	0.4
LB 引物	100 $\mu\text{mol/L}$	0.4
dNTPs	10 mmol/L	7.0
甜菜碱	5 mol/L	12
硫酸镁溶液	150 mmol/L	8.0
Bst DNA 聚合酶	8 U/ μL	1
模板	—	5
ddH ₂ O	—	8.6

9.4.2 反应过程

按照表 1 所述配制反应体系,上述组分加入后,轻柔混匀并短暂离心后加入 10 μL 的凡士林(密封液),最后将 1 μL 的显色液加入反应管顶端。盖上管盖后,置于 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温扩增 60 min,观察结果。

9.4.3 空白对照、阴性对照、阳性对照设置

每次反应应设置空白对照、阴性对照和阳性对照。
空白对照采用无菌水作为扩增模板。
阴性对照以 DNA 提取液代替 DNA 模板。
阳性对照以含检测序列的质粒 DNA 作为扩增模板。

9.5 结果观察

取出反应管,短暂离心使反应管盖中显色液进入反应体系,3 min 后根据管内反应液颜色变化,判断结果。

9.6 结果判定

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) 阳性结果:待检样品反应管液体呈绿色,则报告为 LAMP 检测阳性。如需通过分离培养鉴定对上述检测结果进行确认,可按 GB/T 4789.7、WS 271 执行。
- b) 阴性结果:待检样品反应管液体呈橙色,则报告 LAMP 检测阴性。