

# SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2754.11—2011

---

出口食品中致病菌环介导恒温  
扩增(LAMP)检测方法  
第 11 部分:产霍乱毒素的霍乱弧菌

Loop-mediated isothermal amplification detection method for pathogens  
in export food—Part 11:Cholera toxin-producing *Vibrio cholerae*

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 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、中华人民共和国珠海出入境检验检疫局、中华人民共和国福建出入境检验检疫局、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、中华人民共和国吉林出入境检验检疫局、广州华峰生物科技有限公司。

本部分主要起草人:曾静、魏海燕、张西萌、王志强、冯家望、李志勇、郑晶、郑文杰、徐帮兴、易敏英、罗雁非、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 11 部分:产霍乱毒素的霍乱弧菌

### 1 范围

SN/T 2754 的本部分规定了检测出口食品中产霍乱毒素霍乱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产霍乱毒素的霍乱弧菌的筛选检测。

### 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

SN/T 1022 出口食品中霍乱弧菌检验方法

### 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霍乱弧菌,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

*ctx* A(cholera toxin subunit A gene):霍乱毒素 A 亚单位基因

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

根据霍乱弧菌属特有的靶序列 *ctx A* 基因(参见附录 A)设计特异性内引物、外引物和环状引物各一对,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 *ctx A* 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:根据霍乱弧菌属特有的靶序列 *ctx A* 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。

外引物扩增片段长度:242 bp。

外引物 1(F3,5'-3'):GCAAATGATGATAAGTTATATCGG

外引物 2(B3,5'-3'):GMCCAGACAATATAGTTTGACC

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

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

环状引物 1(LF,5'-3'):CACCTGACTGCTTTATTTCA

环状引物 2(LB,5'-3'):AACTCAGACGGGATTTGTTAGG

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

7.3 dNTP:10 mmol/L。

7.4 *Bst* 酶:8 U/ $\mu$ 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:霍乱弧菌标准菌株,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  $\mu$ L~10  $\mu$ L;量程 10  $\mu$ L~100  $\mu$ L;量程 100  $\mu$ L~1 000  $\mu$ 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

食品中产霍乱毒素的霍乱弧菌 LAMP 检测程序见图 1。

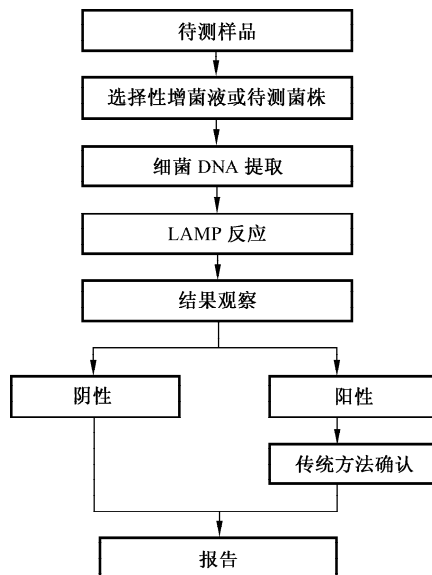


图 1 食品中产霍乱毒素的霍乱弧菌 LAMP 检测程序

## 10 操作步骤

### 10.1 样品制备、增菌培养

按照 SN/T 1022 中方法进行样品制备和增菌。

### 10.2 细菌模板 DNA 的制备<sup>1)</sup>

#### 10.2.1 增菌液模块 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:

- 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  $\mu$ 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 10.2.1b) 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

产霍乱毒素的霍乱弧菌 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 产霍乱毒素的霍乱弧菌 LAMP 反应体系

组 分	工作液浓度	加样量 $\mu\text{L}$	反应体系终浓度
ThermoPol 缓冲液	10 $\times$	2.5	1 $\times$
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 $\mu\text{mol/L}$
环状上游引物(LF)	50 $\mu\text{mol/L}$	0.4	0.8 $\mu\text{mol/L}$
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	4	0.8 mol/L
硫酸镁	50 mmol/L	3	6 mmol/L
<i>Bst</i> DNA 聚合酶	8 U/ $\mu\text{L}$	1	0.32 U/ $\mu\text{L}$
DNA 模板	—	3	—
去离子水	—	4.6	—

### 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 63 $^{\circ}\text{C}$  恒温扩增 90 min, 80 $^{\circ}\text{C}$  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: 将霍乱弧菌标准菌株接种于 3% 氯化钠碱性蛋白胨水 (APW) 中 36 $^{\circ}\text{C}$   $\pm$  1 $^{\circ}\text{C}$  培养 18 h~24 h, 用无菌生理盐水稀释至约 10<sup>6</sup> CFU/mL~10<sup>8</sup> 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  $\mu\text{L}$  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:

- 待检样品反应管液体呈绿色, 该样品结果为霍乱弧菌初筛阳性, 对样品的增菌液或可疑纯菌落进一步按 SN/T 1022 中操作步骤进行确认后报告结果;
  - 待检样品反应管液体呈橙色, 则可报告霍乱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)

产霍乱毒素的霍乱菌 *ctx A* 基因序列(部分)及引物设计示意图(accession no. K02679)

181 TCATTTTCAT ATGCAAATGA TGATAAGTTA TATCGGGCAG ATTCTAGACC TCCTGATGAA  
F3→ F2→ ACTT

241 ATAAAGCAGT CAGGTGGTCT TATGCCAAGA GGACAGAGTG AGTACTTTGA CCGAGGTACT  
TATTTTCGTCA GTCCACCAGA ATACGGTTCT CCTGTCT  
←LF ←F1c

301 CAAATGAATA TCAACCTTTA TGATCATGCA AGAGGAACTC AGACGGGATT TGTTAGGCAC  
B1c→ LB→

361 GATGATGGAT ATGTTTCCAC CTCAATTAGT TTGAGAAGTG CCCACTTAGT GGGTCAAAC  
AAGGTG GAGTTAATCAAAC CTC CCAGTTTGA  
←B2

421 ATATTGTCTG GTCATTCTAC TTATTATATA TATGTTATAG CCACTGCACC CAACATGTTT  
TATAACAGAC CAG  
←B3

F3(5'-3'):GCAAATGATGATAAGTTATATCGG

B3(5'-3'):GMCCAGACAATATAGTTTGACC

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

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

LF(5'-3'):CACCTGACTGCTTTATTTCA

LB(5'-3'):AACTCAGACGGGATTTGTTAGG

注：下划线标注序列为产霍乱毒素的霍乱弧菌 LAMP 引物设计所选取的 8 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；LF 和 LB 是环状上游引物和环状下游引物。