

DBS13

河北省地方标准

DBS13/008—2017

食品安全地方标准
肉及肉制品中沙门氏菌环介导等温扩增
(LAMP) 检测方法

2017-11-08 发布

2018-02-01 实施

河北省卫生和计划生育委员会 发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009规定的格式编写。
本标准由河北省卫生和计划生育委员会归口。
本标准于2017年11月8日首次发布。

食品安全地方标准

肉及肉制品中沙门氏菌环介导等温扩增（LAMP）检测方法

1 范围

本标准规定了肉及肉制品中沙门氏菌环介导等温扩增（Loop-mediated isothermal amplification，LAMP）检测方法。

本标准适用于肉及肉制品中沙门氏菌的快速筛选检测。

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 4789.1 食品安全国家标准 食品微生物学检测 总则

GB 4789.4 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验

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 原理

根据沙门氏菌属特有的靶序列 *invA* 基因设计的两对特殊的内、外引物和一对环引物，特异性识别靶序列上的六个独立区域，利用 *Bst* DNA 聚合酶（*Bst* DNA polymerase）启动循环链置换反应，在 *invA* 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；加入 SYBR Green I 染料，即可通过颜色变化观察判定结果。

叠氮溴化丙锭(propidium monoazide, PMA)染料能够嵌入细胞外 DNA 或者穿过非活性菌受损的细胞膜进入细胞进而嵌入其 DNA 内，但被阻隔在活性菌的完整细胞膜之外。嵌入非活性菌 DNA 的 PMA 染料能够在强光照下通过叠氮基团与 DNA 进一步形成牢固的共价结合，使其不能在后续 LAMP 反应中扩增，因而可在 LAMP 反应中消除来自于非活性菌的 DNA 对 LAMP 检测结果的影响。

4 仪器和设备

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

- 4.1 冰箱：2℃~5℃，-20℃；
- 4.2 恒温培养箱：36℃±1℃，42℃±1℃；
- 4.3 均质器；
- 4.4 振荡器；
- 4.5 电子天平：感量 0.1 g；
- 4.6 二级生物安全柜；
- 4.7 高速台式离心机：5 000 r/min~16 000 r/min；
- 4.8 水浴锅或加热模块：63℃±1℃，80℃±1℃；
- 4.9 微量移液器（0.1 μL~2.5 μL；0.5 μL~10 μL；20 μL~200 μL；100 μL~1000 μL）和吸头；

- 4.10 无菌透明离心管：1.5 mL；
 4.11 PCR反应管（透明）；
 4.12 水浴振荡器：220 r/min，37 °C±1 °C；
 4.13 卤素灯：500 W。

5 试剂和材料

除有特殊说明外，实验所用试剂均为分析纯或符合生化试剂标准；实验用水应符合 GB/T 6682 中一级水的要求。

- 5.1 缓冲蛋白胨水（BPW），见GB 4789.4中A.1。
 5.2 四硫磺酸钠煌绿（TTB）增菌液，见GB 4789.4中A.2。
 5.3 亚硒酸胱氨酸（SC）增菌液，见GB 4789.4中A.3。
 5.4 引物：根据沙门氏菌属特有的靶序列*invA*基因设计一套特异性引物，见表1。

表1 特异性引物序列

引物种类	引物名称	核苷酸序列
外引物1	F3	5'-CGGCCCCGATTTTCTCTGG-3'
外引物2	B3	5'-CGGCAATAGCGTCACCTT-3'
内引物1	FIP	5'-GCGCGGCATCCGCATCAATA-TGCCCGGTAAACAGATGAGT-3'
内引物2	BIP	5'-GCGAACGGCGAAGCGTACTG-TCGCACCGTCAAAGGAAC-3'
环引物1	LF	5'-GGCCTTCAAATCGGCATCAAT-3'
环引物2	LB	5'-GAAAGGGAAAGCCAGCTTTACG-3'

- 5.5 10×*Bst* DNA聚合酶缓冲液。
 5.6 100 mmol/L MgSO₄。
 5.7 10 mmol/L dNTPs（dATP、dTTP、dCTP、dGTP）。
 5.8 *Bst* DNA聚合酶。
 5.9 无菌去离子水。
 5.10 PMA 染料，20 mM（1 mg PMA添加98 μL无菌去离子水制成溶液保存）。
 5.11 SYBR Green I 染料，1 000×（取1 μL 10 000×SYBR Green I染料，添加9 μL无菌去离子水）。
 5.12 本标准用做阳性对照的菌株为鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028 标准菌株。

6 检测程序

检测程序参见图1。

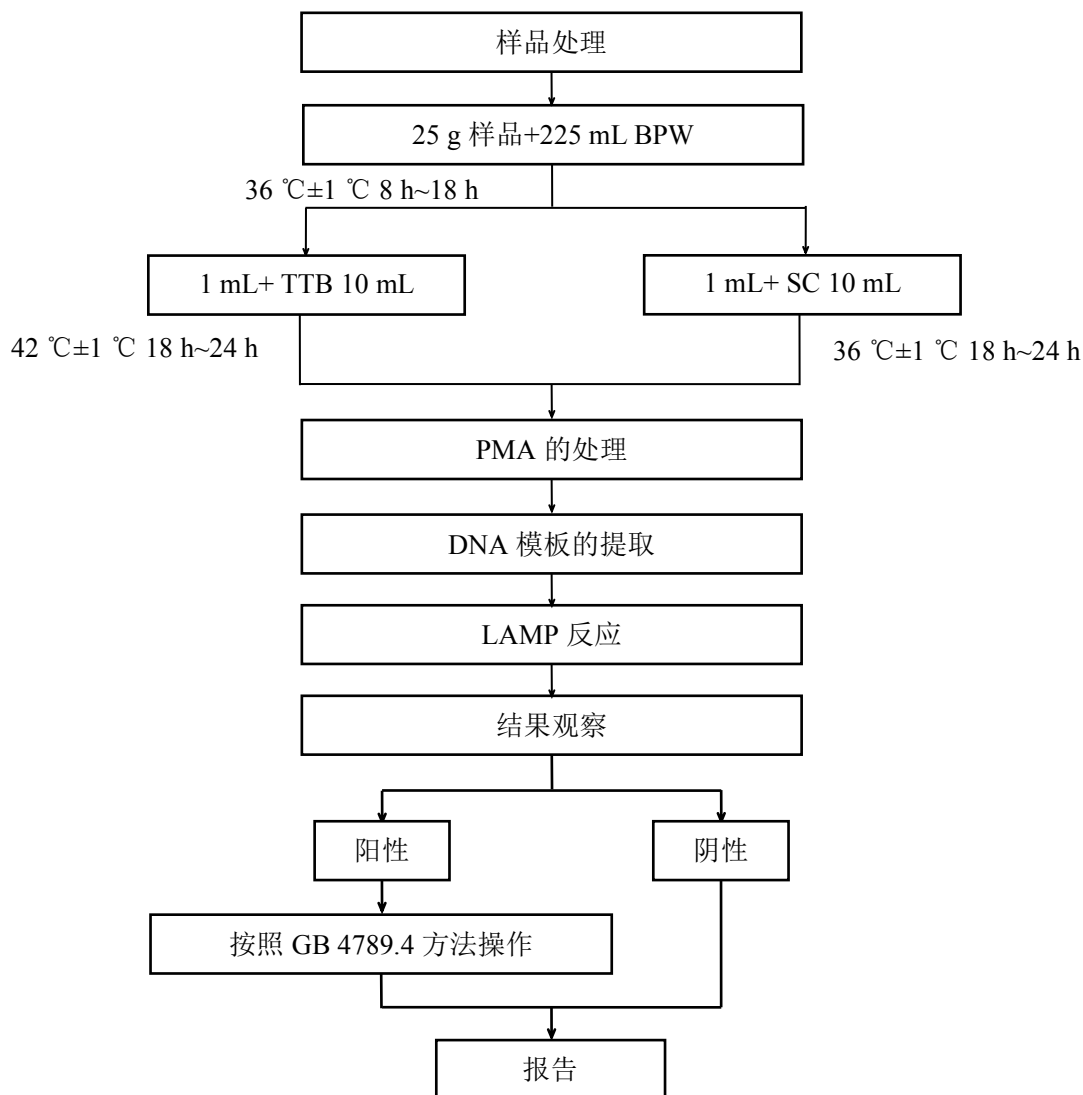


图 1 检验程序

7 操作步骤

7.1 前增菌

按GB 4789.4中5.1操作。

7.2 增菌

按GB 4789.4中5.2操作。

7.3 PMA的处理

吸取增菌后的1 mL SC和1 mL TTB分别加入1.5 mL无菌透明离心管中，各加入100 μ L PMA溶液，220 r/min振荡，37 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C避光保温10 min。然后将离心管进行冰浴，同时置于500 W卤素灯正下方，相距10 cm~15 cm，曝光10 min。

7.4 DNA模板的制备

根据实验室实际情况，可采用方法一或方法二制备DNA模板：

a) 方法一(热裂解法):从7.3中PMA处理过的SC和TTB增菌液中各取1 mL分别放入另一1.5 mL 无菌透明离心管中, 10 000 r/min离心2 min, 弃上清; 加入灭菌生理盐水1 mL混匀, 10 000 r/min离心2 min, 弃上清; 然后加无菌去离子水100 μ L混匀, 置100 $^{\circ}$ C煮沸5 min, 10 000 r/min离心2 min, 取上清即为DNA模板, 放置-20 $^{\circ}$ C保存, 备用。

b) 方法二(试剂盒法): 7.3中PMA处理过的SC和TTB增菌液分别参照商品化试剂盒产品操作程序提取DNA模板。

7.5 LAMP反应

7.5.1 反应体系配制: 分别采用7.4中SC和TTB增菌液提取的DNA模板, 将沙门氏菌LAMP检测的反应体系中各试剂依次添加到PCR反应管中。反应体系中各试剂的量可根据具体情况或不同的反应总体积进行相应调整。反应体系见表2。

表2 沙门氏菌LAMP检测的反应体系

试剂	终浓度	体积(μ L)
10 \times Bst DNA 聚合酶缓冲液	1 \times	2.5
100 mmol/L MgSO ₄	6.0 mmol/L	1.5
10 mmol/L dNTP 混合物	1.2 mmol/L	3.0
10 μ mol/L FIP (内引物 1)	1.8 μ mol/L	4.5
10 μ mol/L BIP (内引物 2)	1.8 μ mol/L	4.5
10 μ mol/L F3 (外引物 1)	0.1 μ mol/L	0.25
10 μ mol/L B3 (外引物 2)	0.1 μ mol/L	0.25
10 μ mol/L LF (环引物 1)	1.0 μ mol/L	2.5
10 μ mol/L LB (环引物 2)	1.0 μ mol/L	2.5
8000 U/mL Bst DNA 聚合酶	640 U/mL	2.0
DNA 模板	—	1.0
无菌去离子水	—	0.5

7.5.2 反应程序: 将反应管中的反应体系混匀, 置于63 $^{\circ}$ C扩增40 min, 再置于80 $^{\circ}$ C保温10 min, 终止反应。

7.5.3 对照: 检验过程中分别设阳性对照、阴性对照和空白对照。以鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028 纯培养物提取的DNA模板为阳性对照, 以非沙门氏菌纯培养物提取的DNA模板为阴性对照, 以无菌去离子水代替DNA模板为空白对照。

7.6 结果观察

LAMP反应结束后, 应于2 min内在反应管加入1 000 \times SYBR Green I染料1 μ L, 轻轻混匀, 立即观察颜色变化。

8 结果判定和报告

在空白对照和阴性对照反应管液体显示为橙色, 阳性对照反应管液体显示为黄绿色的条件下:

8.1 阳性: 若SC或TTB任一增菌液的反应结果显示为黄绿色, 则判定25 g样品中沙门氏菌初筛结果为阳性, 应按照GB 4789.4方法继续进行5.3分离、5.4生化试验和5.5血清学鉴定, 必要时进行5.6血清学分型, 综合生化试验和血清学鉴定的结果, 报告25g样品中检出或未检出沙门氏菌, 根据血清学分型试验结果判定沙门氏菌的血清型。

8.2 阴性: 若SC和TTB增菌液的反应结果显示均为橙色, 则判定结果为阴性, 可直接报告25 g样品中未检出沙门氏菌。

注: LAMP 实验环境条件和过程控制应参照 GB/T27403《实验室质量控制规范 食品分子生物学检测》规定执行。