

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2754.10—2011

出口食品中致病菌环介导恒温 扩增(LAMP)检测方法 第 10 部分:产气荚膜梭菌

Loop-mediated isothermal amplification detection method for pathogens
in export food—Part 10: *Clostridium perfringens*

2011-02-25 发布

2011-07-01 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 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 10 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:中华人民共和国珠海出入境检验检疫局、中华人民共和国盐城出入境检验检疫局、中华人民共和国广东出入境检验检疫局、广州华峰生物科技有限公司。

本部分主要起草人:游淑珠、王小玉、冯家望、邝筱珊、徐帮兴、李志勇、曹以诚、杜正平、成晓维、杨一帆、王志强、陈洵、高东微。

出口食品中致病菌环介导恒温 扩增(LAMP)检测方法 第 10 部分:产气荚膜梭菌

1 范围

SN/T 2754 的本部分规定了检测出口食品中产气荚膜梭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气荚膜梭菌的筛选检测。

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 4789.13 食品微生物学检验 产气荚膜梭菌检验

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 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产气荚膜梭菌,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)

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

根据产气荚膜梭菌特有的靶序列 16SrRNA 基因(参见附录 A)设计的两对特殊的内、外引物,特异

性识别靶序列上的六个独立区域,利用 *Bst* 酶启动循环链置换反应,在 16SrRNA 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:根据产气荚膜梭菌特有的靶序列 16SrRNA 基因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。

外引物扩增片段长度:207 bp。

外引物 1(F3,5'-3'):AACCTTCATCACTCACGCG

外引物 2(B3,5'-3'):GCAATCCGCTATGAGATGGA

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

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

7.2 DNA 提取试剂。

7.2.1 TE 缓冲液:10 mmol/L Tris-Cl pH 8.0;1 mmol/L EDTA。

7.2.2 50 mg/mL 溶菌酶溶液。

7.2.3 20 mg/mL 蛋白酶 K 溶液。

7.2.4 10% SDS。

7.2.5 5 mol/L 氯化钠。

7.2.6 CTAB/NaCl 溶液:0.7 mol/L NaCl;10% CTAB。

7.2.7 三氯甲烷/异戊醇(24:1)。

7.2.8 Tris 饱和酚。

7.2.9 3 mol/L 乙酸钠(pH6.0)。

7.2.10 无水乙醇。

7.2.11 70%乙醇。

7.2.12 RNase A。

7.3 10× ThermoPol 缓冲液含:0.2 mol/L Tris-HCl,0.1 mol/L 氯化钾,0.1 mol/L 硫酸铵,20 mmol/L 硫酸镁,1% Triton X-100。

7.4 dNTPs:每种核苷酸浓度 10 mmol/L。

7.5 甜菜碱:浓度 5 mol/L。

7.6 硫酸镁($MgSO_4$):浓度 150 mmol/L。

7.7 *Bst* DNA 聚合酶:酶浓度 8 U/ μ L。

7.8 显色液:SYBR Green I 荧光染料,1 000×。

7.9 阳性对照:产气荚膜梭菌标准菌株,或含目的片段的 DNA 亦可。

7.10 产气荚膜梭菌 LAMP 检测试剂盒¹⁾,可选,参照试剂盒说明书操作。试剂盒组成及使用注意事项参见附录 B。

7.11 1.5 mL 塑料离心管。

1) 由广州华峰生物科技有限公司提供,给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效产品。

8 仪器和设备

- 8.1 移液器:量程 $0.5\ \mu\text{L}\sim 10\ \mu\text{L}$;量程 $10\ \mu\text{L}\sim 100\ \mu\text{L}$;量程 $100\ \mu\text{L}\sim 1\ 000\ \mu\text{L}$ 。
 8.2 高速台式离心机: $\geq 7\ 000g$
 8.3 水浴锅或加热模块: $65\ ^\circ\text{C}\pm 1\ ^\circ\text{C}$ 和 $100\ ^\circ\text{C}\pm 1\ ^\circ\text{C}$ 。
 8.4 计时器。

9 检测程序

食品中产气荚膜梭菌 LAMP 检测程序见图 1。

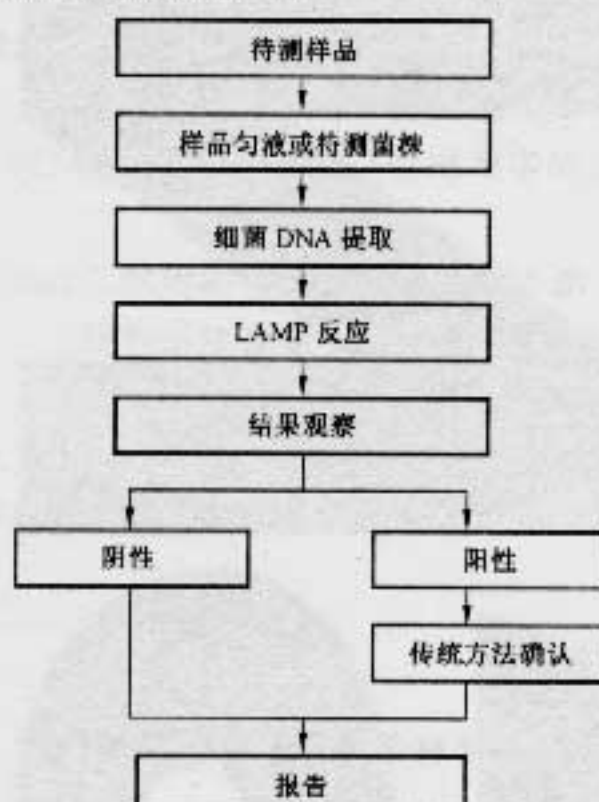


图 1 食品中产气荚膜梭菌 LAMP 检测程序

10 操作步骤²⁾

10.1 样品制备、增菌培养

按照 GB/T 4789.13 的方法制备样品匀液,获得可疑黑色菌落。

10.2 细菌模板 DNA 的制备³⁾

10.2.1 样品匀液模板 DNA 的制备

对于 10.1 获得的样品匀液,采用如下方法制备模板 DNA:

- 取样品匀液 $1.5\ \text{mL}$ 于 $2\ \text{mL}$ 离心管, $7\ 000g$ 离心 $2\ \text{min}$, 去上清液;
- 加入 $1\ \text{mL}$ TE 洗涤菌体一次, $7\ 000g$ 离心 $2\ \text{min}$, 去上清液;
- 加入 $500\ \mu\text{L}$ TE(pH8.0)充分振荡,重悬菌体;
- 往管中加入 $10\ \mu\text{L}\sim 15\ \mu\text{L}$ 溶菌酶溶液($50\ \text{mg/mL}$, $20\ 000\ \text{U/mg}$)至终浓度 $1\ \text{mg/mL}$,混匀,

2) 采用以下方法,也可使用产气荚膜梭菌 LAMP 检测试剂盒按照说明书操作。

3) 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。

- 37 ℃反应 2 h~3 h,并每 10 min 振荡一次;
- e) 加入 10 μL 蛋白酶 K(20 mg/mL),混匀,37 ℃反应 1 h;
 - f) 加入 52 μL 10%SDS 至终浓度 1%,混匀,37 ℃温浴 30 min;
 - g) 加入 100 μL 5 mol/L 氯化钠,80 μL CTAB/NaCl,混匀,65 ℃温浴 10 min;
 - h) 加入等体积三氯甲烷/异戊醇(24 : 1),充分混匀,7 000g 离心 5 min;
 - i) 小心移取上清液至 2 mL 离心管中,加入等体积酚/三氯甲烷/异戊醇(25 : 24 : 1),充分混匀,7 000g 离心 5 min;
 - j) 小心移取上清液至 2 mL 离心管中,加入 1/10 体积的 3 mol/L 乙酸钠(pH6.0)以及 2 倍体积的冰冻无水乙醇,混匀,观察是否有絮状沉淀,-20 ℃放置 30 min 或者更长时间;
 - k) 7 000g 4 ℃离心,10 min,去上清液;
 - l) 加入冰冻 70%乙醇洗涤沉淀,7 000g 4 ℃离心,10 min,去上清液;
 - m) 沉淀置通风橱风干(约 30 min),加入 200 μL TE(pH8.0)溶解沉淀;
 - n) 加入 20 μg RNase A,37 ℃反应 30 min;
 - o) 加入 400 μL TE(pH8.0)和等体积酚/三氯甲烷/异戊醇(25 : 24 : 1),充分混匀,7 000g 离心 5 min;
 - p) 小心移取上清液至 2 mL 离心管中,加入 1/10 体积的 3 mol/L 乙酸钠(pH6.0)和 2 倍体积的冰冻无水乙醇,混匀,-20 ℃放置 30 min 或者更长时间;
 - q) 7 000g 4 ℃离心,10 min,去上清液;
 - r) 加入冰冻 70%乙醇洗涤沉淀,7 000g 4 ℃离心 10 min,弃去上清液;
 - s) 沉淀置通风橱风干后,加入适量 TE(pH8.0)或者无菌水溶解,可立即使用或置-20 ℃存放 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

产气荚膜梭菌 LAMP 反应体系见表 1。

表 1 产气荚膜梭菌 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×
F3	10 μmol/L	0.5	0.2 μmol/L
B3	10 μmol/L	0.5	0.2 μmol/L
FIP	40 μmol/L	1.0	1.6 μmol/L
BIP	40 μmol/L	1.0	1.6 μmol/L
dNTPs	10 mmol/L	4	1.6 mmol/L
甜菜碱	5 mol/L	4	0.8 mol/L

表 1 (续)

组分	工作液浓度	加样量 μL	反应体系终浓度
硫酸镁	150 mmol/L	1	8 mmol/L
<i>Bst</i> DNA 聚合酶	8 U/μL	0.5	0.16 U/μL
DNA 模板	—	2.5	—
去离子水	—	7.5	—

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 65 ℃ 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。

空白对照以水替代 DNA 模板。

阴性对照以提取空白代替模板 DNA。也可使用产气荚膜梭菌 LAMP 检测试剂盒中的阴性对照。

阳性对照制备：将产气荚膜梭菌标准菌株接种于液体硫乙醇酸盐培养基营养肉汤中 36 ℃ ± 1 ℃ 培养 18 h ~ 24 h，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 提取模板 DNA 作为 LAMP 反应的模板。也可使用产气荚膜梭菌 LAMP 检测试剂盒中的阳性对照。

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。

建议使用 LAMP 试剂盒专用反应管，将反应液和显色液一次性加入，DNA 扩增反应后可不必开盖即可观察结果。

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，该样品结果为产气荚膜梭菌初筛阳性，对样品匀液或可疑纯菌落进一步按 GB/T 4789.13 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产气荚膜梭菌检验结果为阴性。
- 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)

产气荚膜梭菌 16SrRNA 基因序列

A.1 产气荚膜梭菌 16SrRNA 基因序列(accession no. GQ911558.1)

```

1   agtttgatcc tggetcagga tgaacgctgg cggcgtgctt aacacatgca agtcgagcga
61  tgaagtttcc ttgggaaay ggattagcgg cggacgggtg agtaacacgt gggtaaccrg
121 cctcatagag tggaatagcc ttccgaaagg aagattaata cgcataayg ttgaaagatg
181 gcatcatcat tyaaccaaag gacgaatcgg ctatgagatg gacccgcggc gcaltageta
241 ctiggttggg taacggccta ccagggcga cgaicgtage cgaactgaga gggtagatgg
301 ccacattggg actgagacac ggccagact ctacgggag gcagcagigg ggaatatggc
361 acaatggggg aaacctgat gcagcaacgc cgggtgattg atraagttt tcggatcgta
421 aagctctgtc ttgggggaag ataatgacgg taccgaagga ggaagccaag gctaactacg
481 tgccagcagc cgcggtaata cgtagggtgc gagegttate cggatttact gggcgtaaag
541 ggagcgtagg cggatgatta agtgggatgt gaaatacccg ggetcaactt gggtagetgca
601 tcccaaacig gttatctaga gtgcaggaga ggagagtgga attcctagtg tagcggtgaa
661 atgcgtagag attaggaaga acaccagtgg cgaaggcgac tetctggact gtaactgacg
721 ctgaggetcg aaagcgtggg gagcaaacag gattagatac cctggtagtc c

```

注：阴影所示部分为 16SrRNA 基因序列。

A.2 组成引物中碱基构成

C.P-16S-1-F3 (5'-3') : GCAATCCGCTATGAGATGGA

C.P-16S-1-B3 (5'-3') : AACCTTCATCACTCACGCG

F1C		F2
	C.P-16S-1-FIP (5'-3') : CAGGTCGGCTACGCATCGTCTTTTCGGCGCATTAGCTAGTTGG	
B1C		B2
	C.P-16S-1-BIP (5'-3') : TGATCGGCCACATTGGGACTGATTTTGGTTTCCCCCATTGTGCA	

注：其中阴影部分 TTTT 为连接序列。

附录 B

(资料性附录)

产气荚膜梭菌 LAMP 检测试剂盒

B.1 试剂盒组成

每个试剂盒(20 T/kit,每个反应体系体积为 25 μL)包括以下成分:

- DNA 提取液;
- 反应液;
- Bst* 酶;
- 显色液;
- 稳定液;
- 阳性对照;
- 阴性对照。

B.2 说明

B.2.1 试剂盒内各试剂使用前,充分融化后稍离心。

B.2.2 试剂盒内的阳性对照应视为具有污染性物质,应注意避免污染其他样品和反应试剂,导致错误检验结果。

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
出口食品中致病菌环介导恒温
扩增(LAMP)检测方法
第 10 部分:产气荚膜梭菌
SN/T 2754.10—2011

*

中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街 16 号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523945 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 15 千字
2011 年 6 月第一版 2011 年 6 月第一次印刷
印数 1—1 600

*

书号:155066·2-22026 定价 16.00 元



SN/T 2754.10-2011