

DB37

山 东 省 地 方 标 准

DB37/T 2794—2016

沙门氏菌（猪霍乱、鼠伤寒）环介导等温 扩增检测技术

Loop-mediated isothermal amplification
for *Salmonella typhimurium* and *Salmonella choleraesuis*

2016-07-29 发布

2016-08-29 实施

山东省质量技术监督局 发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由山东省农业科学院提出。

本标准由山东省畜牧业专业标准化技术委员会归口。

本标准主要起草单位：山东省农业科学院畜牧兽医研究所。

本标准主要起草人：黄保华、时建立、李俊、彭喆、刘畅、朱荣生、徐绍建、丛晓燕、杜以军、吴家强、孙文博。

山东省地方标准公开

沙门氏菌（猪霍乱、鼠伤寒）环介导等温扩增检测技术

1 范围

本标准规定了鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 和猪霍乱沙门氏菌 (*Salmonella choleraesuis*) 的环介导等温扩增 (LAMP) 检测技术的要求。

本标准适用于疑似污染鼠伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌的各种样品检测。

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，只所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 4789.4-2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验

3 材料

3.1 器材

3.1.1 微量移液器（最大量程分别为 10 μ L、20 μ L、100 μ L、1000 μ L）

3.1.2 20000g 低温高速离心机

3.1.3 电热恒温水槽

3.1.4 稳流稳压电泳仪

3.1.5 水平电泳槽

3.1.6 凝胶成像系统

3.1.7 紫外透射反射分析仪

3.1.8 电磁炉

3.1.9 烧杯（1000mL）

3.2 试剂

3.2.1 5mol/L Betaine 溶液：配制见附录 A.1

3.2.2 Bst DNA Polymerase (8U/ μ L)

3.2.3 SYBR Green I 核酸染料

3.2.4 0.5 \times TBE 缓冲液：配制见附录 A.2。

3.2.5 1%琼脂糖电泳液：配制见附录 A.3。

3.2.6 10 mg/mL 的溴化乙锭 (EB) 水溶液。

3.2.7 DNA Marker 2000。

3.2.8 超纯水：符合 GB/T 6682 要求。

3.3 引物

鼠伤寒沙门氏菌LAMP检测引物:

F3: 5' - CGATAATTCATCTCAATTTCTGG-3'

B3: 5' - CGTGAGATATCGTCCAAAAGG -3'

FIP: 5' - GCACTCCGGTTGTAAACCATTATTT-GTACTGAGGCTAATTCACCAC -3'

BIP: 5' - AGCGTAAAGCAACTCATTTTTGTT-GTTTGTTTTGTATGATACAGGC -3'

猪霍乱沙门氏菌LAMP检测引物:

F3: 5' - GGAGGAAGGTAGGGATGACG -3'

B3: 5' - CACTCCCATGGTGTGACG -3'

FIP: 5' - TCTCGGAGGTCGCTTCTCTTT-CCCTTACGACCAGGGCTA -3'

BIP: 5' - CGGATTGGAGTCTGCAACTCGA-GGAACGTATTCACCGTGGC -3'

4 方法

4.1 样品处理及 DNA 的提取

样品前处理及增菌按照GB 4789.4-2010中5.1、5.2操作。取1 mL增菌液放入1.5毫升EP管中，10 000 r/min离心2 min，去上清；加入灭菌生理盐水1 mL混匀，10000 r/min离心2 min，去上清；然后加灭菌双蒸水1 mL混匀，放入沸水浴中煮沸10min，取出后迅速放入冰袋中，冷却5min，12000rpm，离心3min，吸上清液作为DNA模板，并保存于-20℃备用。

4.2 环介导等温扩增（LAMP）操作流程

4.2.1 环介导等温扩增反应体系配制

按表1中1-8的循序配制。

表1 环介导等温扩增反应体系

1	10×ThermoPol	2.5 μL
2	dNTP 混合液 (10. mmol/L)	4.0 μL
3	B3/F3 (5 μmol/L)	0.15 μL×2
4	BIP/FIP (5 μmol/L)	1.5 μL×2
5	Beta-ine (5mmol/L)	3.0 μL
6	DNA	1.0 μL
7	Bst DNA Polymerase (8U/μL)	1 μL
8	超纯水	10.2 μL

4.2.2 LAMP 程序设定

每次 LAMP 均应设一个阴性对照（用超纯水作为模板），具体参数见表 2。

表2 LAMP 反应程序设定

	温度	时间
1	63℃	鼠伤寒沙门氏菌60min 猪霍乱沙门氏菌75min
2	80℃	5min

4.3 电泳操作

4.3.1 1%琼脂糖凝胶板的制备

称取0.6g琼脂糖，加入60mL 0.5×TBE缓冲液中，加热融化，温度降低后加入1%的EB，倒入电泳槽中，见附录A.3。

4.3.2 加样

将LAMP扩增产物5 μL与1 μL 6×Loading Buffer混合，点样于1%琼脂糖凝胶孔中，以DNA Marker作相对分子质量指示。每次电泳至少加1孔阳性对照的扩增产物作对照。

4.3.3 电泳

保持稳定电压80V，电泳20min，观察结果。

5 结果分析和判定

5.1 结果观察判定

电泳反应结束后，在阴性对照成立的情况下，出现瀑布样条带的沉道判为样品阳性（说明样品中含有鼠伤寒沙门氏菌或者猪霍乱沙门氏菌），不出现瀑布样条带的为阴性。

5.2 可视化结果

加入1 μL SYBR Green I 核酸染料，混匀（加深观察颜色），阳性反应管内液体变为黄色，阴性反应管不发生颜色变化，为橘红色。反应管置于紫外透射反射分析仪下，阳性反应管发出明亮的黄绿色荧光，阴性反应管不显现荧光。

5.3 特异性和灵敏度

特异性：扩增绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌、副猪嗜血杆菌、副鸡嗜血杆菌、巴氏杆菌、乳酸杆菌、大肠杆菌等细菌的DNA均为阴性。

灵敏度：鼠伤寒沙门氏菌DNA倍比稀释到106倍仍可检出，猪霍乱沙门氏菌DNA倍比稀释到108倍仍可检出。

附录 A
(规范性附录)
试剂的配制

A.1 5mol/L Betaine溶液

Betaine	1.4644g
灭菌超纯水	2.5mL

A.2 0.5×TBE缓冲液

Tris	108g
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	7.44g
硼酸	55g
灭菌超纯水	1L, 配成10×TBE缓冲液
取10×TBE缓冲液25mL, 加灭菌超纯水475mL, 制成0.5倍的工作液。	

A.3 1%琼脂糖电泳板

琼脂糖	0.6g
0.5×TBE缓冲液	60mL
