



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

/ 2754.1—2011

出口食品中致病菌环介导恒温 扩增()检测方法 第 1 部分:金黄敲齿德橐

前 言

S /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 O1

出口食品中致病菌环介导恒温 扩增(LAMP)检测方法 第1部分:金黄色葡萄球菌

1 范围

SN/T 2754的本部分规定了检测出口食品中金黄色葡萄球菌的环介导恒温核酸扩增(LAMP)法。
本部分适用于出口食品中金黄色葡萄球菌的筛选检测。

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 4789.10 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验

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/

6 技术概要

根

9 检测程序

食品中金黄色葡萄球菌 检测程序见图

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

金黄色葡萄球菌 LAMP 反应体系见表 1。

表 1 金黄色葡萄球菌 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×
外引物 1(F3)	10 µmol/L	0.5	0.2 µmol/L
外引物 2(B3)	10 µmol/L	0.5	0.2 µmol/L
内引物 1(FIP)	40 µmol/L	1.0	1.6 µmol/L
内引物 2(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
硫酸镁	150 mmol/L	1	8 mmol/L
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 °C 扩增 60 min。

10.3.3 空白对照、阴性对照、阳性对照设置

每次反应必须设置阴性对照、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 DNA 提取液代替模板 DNA。也可使用金黄色葡萄球菌 LAMP 检测试剂盒中的阴性对照。

阳性对照制备:将金黄色葡萄球菌标准菌株接种于营养肉汤中 36 °C ±1 °C 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 10.2.1 提取 —

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:

- 待检样品反应管液体呈绿色,该样品结果为金黄色葡萄球菌初筛阳性,对样品的增菌液或可疑纯菌落进一步按 / 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金黄色葡萄球菌检验结果为阴性。

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

金黄色葡萄球菌 *femA* 基因序列

A.1 金黄色葡萄球菌 *femA* 基因序列 accession no. AF144661

1 atgaagttta caaattttaac agctaaagag ttggtgcct ttacagatag catgccatac
61 agtcatttca cgcaaactgt tggccactat gaggtaaagc ttgctgaagg ttatgaaaca
121 catttagtgg gaataaagaa caataataac gaggtcattg cagcttgctt acttactgct
181 gtacctgtta tgaaagtgtt caagtatttt tattcaaate gcggtccagt gatcgattat
241 gaaaatcaag aactcgtaca ctttttcttt aatgaattat caaaatatgt taaaaacat
301 cgttgtctat acctacatat cgatccatat ttaccatate aatacttgaa tcatgatggc
361 gagatgag

附 录 B

(资料性附录)

金黄色葡萄球菌 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;
- 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。
