

T/WSWXH

新疆维吾尔自治区微生物学会团体标准

T/WSWXH -2025

草莓尖孢镰刀菌环介导等温扩增（LAMP） 快速检测规程

Regulation for rapid detection of strawberry Fusarium oxysporum by Loop-mediated
isothermal amplification (LAMP)

（征求意见稿）

2025 - XX - XX 发布

2025 - XX - XX 实施

新疆维吾尔自治区微生物学会 发布

目 次

前言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 原理.....	1
5 仪器和设备.....	2
6 试剂和材料.....	2
7 实验步骤.....	2
8 结果观察.....	3
9 结果判定和表述.....	3
附录 A（资料性附录）尖孢镰刀菌 IGS 靶基因序列.....	4
附录 B（资料性附录）尖孢镰刀菌 IGS 基因 LAMP 引物序列.....	5
附录 C（资料性附录）草莓病原菌培养特征.....	6
附录 D（资料性附录）草莓病原菌培养特征尖孢镰刀菌 LAMP 检测的反应体系.....	7
附录 E（资料性附录）LAMP 检测结果.....	8

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由新疆生产建设兵团第十二师农业科学研究所提出。

本文件由新疆维吾尔自治区微生物学会归口。

本文件起草单位：新疆生产建设兵团第十二师农业科学研究所。

本文件主要起草人：史芳芳 王雷 李明 陈烨华 包慧芳 王海琪 冯娇 李梓嫣 郑剑超 梁武军。

草莓尖孢镰刀菌环介导等温扩增（LAMP） 快速检测规程

1 范围

本标准规定了草莓中尖孢镰刀菌环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification,LAMP)快速检测规程。

本标准适用于草莓病株中尖孢镰刀菌的快速检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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。

T/WSWXH 002-2022 新疆主要果树和防护林腐烂病菌检测技术规程

WS 233-2002 微生物和生物医学实验室生物安全通用准则

SN/T 3767.27-2014 出口食品中转基因成分环介导等温扩增（LAMP）检测方法

SNT 2965-2011 植物病原真菌分子生物学检测规范

GB/T 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法

DB22/T 1820-2013 粮食中串珠镰刀菌的PCR检测

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP): 一种新型、快捷方便、灵敏度极高且廉价的核酸扩增方法。它依靠一种具有链置换活性的DNA聚合酶与2对特殊设计的引物，在等温条件下即可高效快速地完成扩增反应。

4 原理

根据尖孢镰刀菌特有的rDNA基因间隔区IGS（intergenic spacer）序列（附录A）设计特有的两对内外引物和一条环引物，即内引物（FIP和BIP）、外引物（F3和B3）和环引物Loop组成，特异性识别靶序列上的五个独立区域，利用IGS基因设计的LAMP引物具有特异性，能够特异性识别草莓尖孢镰刀菌，而不能识别其它镰刀菌株。

5 仪器和设备

试验用部分仪器和设备符合SN/T 3767.27-2014的要求，除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其它设备和耗材如下：冰箱、恒温培养箱、振荡器、电子天平、高速离心机、水浴锅、PCR扩增仪、微量移液、PCR反应管。

6 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 6682-2008中一级水的要求。培养基制备按照T/WSWXH 002-2022中的规定执行，试剂按照WS 233-2002和SN/T 3767.27-2014中规定执行。

主要试剂：SYBR GreenI 染料、PDA培养基、甜菜碱、MgSO₄（50 mmol/L）、Bst DNA 聚合酶（Bst DNA polymerase）、10×Bst DNA聚合酶缓冲液、无菌去离子水、dNTPs（10 mmol/L）、LAMP引物（见附录B）。

材料：本标准用做阳性菌株为尖孢镰刀菌菌株，阴性菌株为非尖孢镰刀菌的其它病原菌菌株。

7 实验步骤

7.1 样品的制备和模板DNA获得

7.1.1 病原菌基因组DNA的提取：样品病原菌(附录C)的制备规范按照SNT 2965-2011中执行，挑取PDA平板培养的适量（2.0 mg）病原菌菌丝，采用病原菌DNA提取试剂盒提取病原真菌基因组DNA，-20℃保存备用。

7.1.2 土壤基因组DNA提取：PD液体培养基培养病原菌，待2~3天产孢，将经血球计数板计数后的 5×10^7 个分生孢子与1 g 灭菌后的营养土混合，用土壤基因组DNA快速抽提试剂盒提取含病原菌分生孢子的土壤基因组DNA，未接孢子的灭菌营养土DNA作为空白对照。

7.1.3 发病草莓植株组织DNA的提取：将消毒后的由镰刀菌引起的枯萎病草莓病株叶片(50~100 mg)置于液氮中充分研磨，并转移至1.5mL的离心管中，用植物基因组DNA提取试剂盒提取植物病株基因组DNA，用本方法提取健康草莓植株组织DNA作为空白对照。

7.2 DNA浓度测定

参照DB22/T 1820-2013执行。

7.3 空白对照、阴性对照、阳性对照设置

试样检测过程应同时设置阴性对照、阳性对照和空白对照。阴性对照为非尖孢镰刀菌菌株DNA；空白对照设为以无菌去离子水替代DNA模板；阳性对照为尖孢镰刀菌，根据试验条件，选择7.1步骤中的方法之一提取基因组DNA作为模板。

7.4 环介导等温扩增检测

7.4.1 LAMP反应体系的配制

LAMP反应体系(25 μ L)包括:内引物FIP和BIP、外引物F3和B3、环引物LB，MgSO₄、脱氧核糖核苷酸(dNTPs)、甜菜碱、DNA模板、10 $\times$ Bst DNA Buffer、Bst DNA聚合酶，DNA(10 ng ~ 10 ng $\times$ 10⁻⁵)，无菌去离子水补足体系。反应体系见附录D。

7.4.2 反应条件

可根据实验条件选择水浴锅或者PCR扩增仪，在65 $^{\circ}$ C恒温条件下,采用优化的LAMP体系扩增45min。

8 结果观察

反应结束后，将反应管取出加入0.5 μ L SYBR GreenI（1000 $\times$ ）染料显色剂观察显色。

9 结果判定和表述

9.1 空白对照管和阴性对照管反应液呈橙色，阳性对照管反应液呈绿色，检测条件成立，反之本次实验无效（见附录E）。

9.2 样品反应管中液体呈橙色，被检植株未检出尖孢镰刀菌；样品反应管中液体呈绿色，说明被检植株中尖孢镰刀菌确认为阳性（见附录E）。

附 录 A

(资料性)

尖孢镰刀菌 IGS 靶基因序列

GCGGAATGGGAAGTCGATTCTCGGCTGGCGGATCTGACACTGTCGAAACGAGATGCGAGTGGTG
TAGGGTAGGCTAGTTTCGTCCTCGCCAGGTTGCGATTTGGACGAGATATGTGGTCTAGGGTATGC
TCTAGGGTAAGTAGAATTCGAGTTTCGTCGCCGACAGTTTTCTGTGGGTGTATGGTAGGTACAGG
GTAGGCAAATCTCTCTCCGGCCGGTACTTGTCTGGTGGTCTGAGTCGATTTTTTTGTTTTGCCAT
ACTATTGAATTTTTCGCGAAATTCAAAAGTGGCTCGGGAGTCCCGCCTGGCGTGCGTCCGACTCGA
ACATCGTCGGTGTACATATGAGAGGGAGTAATCCGGCCCCGGCCGGGGCCCATCGCGAGCTGCCG
GGTAGGTAAAAGTAAAAAAGTTGTTAAGAGGCGCGGTGTCGGCGTGCTTGTATTTGCGGGAGAG
AATTATCTGGAGGTGCTGGGTAGCCGGAAGACTTGGACGGATCTGGCCCCGGAATGGGTCTGG
GCCTGGATTCTGGTGTGGTGTAGGATAAGCGTAGATAGATGAGTGGTCTAGGGTAGATACAGGG
TAGCCAGAAGTCTGGTATATAGTATGGGGGTGTAGGGTAGGTCTGGACACCGTTTTTCCACTTCGC
CCTTCCCTTTACTCGAGGGAGGACGATCTTGGCTGGGATGGAGGTGTAGGGTAGGCTTAATTTAC
GATTACATGATCTGTGTCACTCTAGGGTAGGTGAAAATCCCATATATATCTGATCACATTTGGTG
AAGAGGTGGTTTGGCTGGTGAGATGGACAAAAGTGCAATGTAGAATTATATGTGATTTTGCAA
AGTGGGTGTGAAATTGGGAAATCGGTTTTCCCGCACAGATGAGAGCATGTTTGAGGTGCCATGA
GATGCACCTCTCCGAGACGACCTCAACGGTACCACCGATGGGTTGGTCGGGCTCCTGTGCGGCCG
TCCAGGGCGGGATATGT

附 录 B

(资料性)

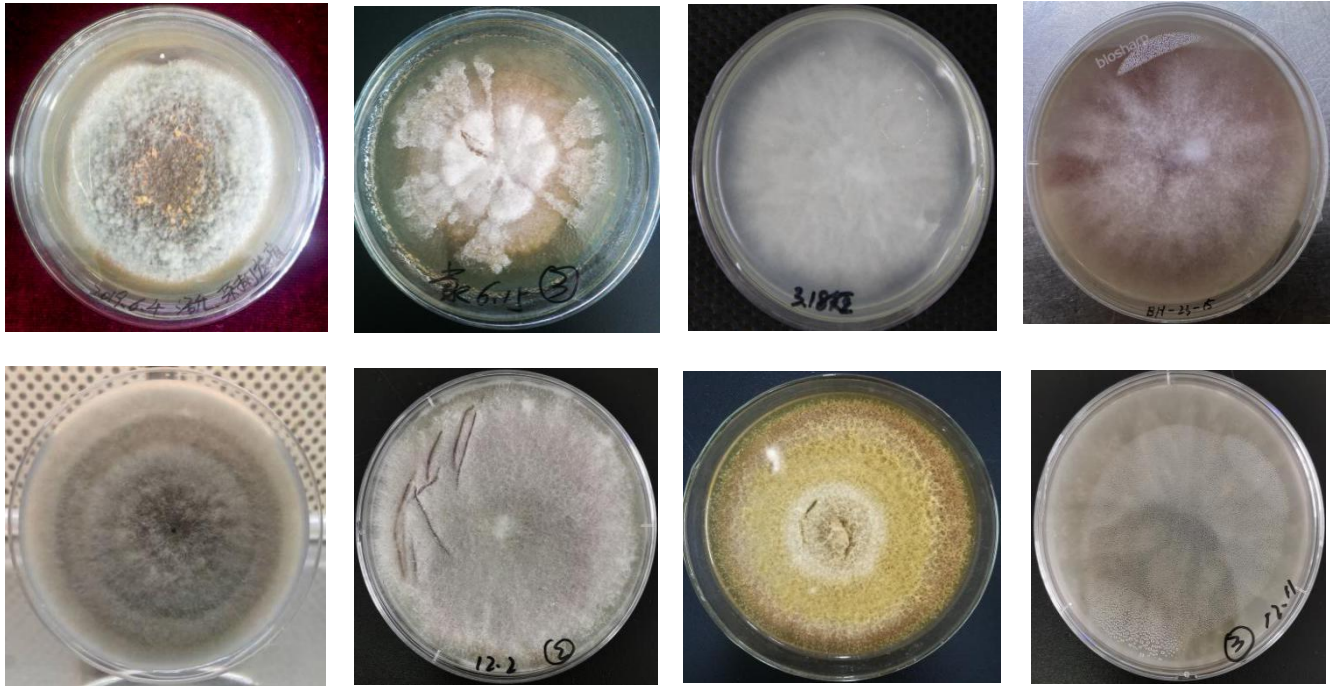
尖孢镰刀菌 IGS 基因 LAMP 引物序列

引物名称	序列(5'-3')	序列长度 (bp)
FIP	GCAACCTGGCGAGGACGAAACACTGTCGAAACGAGATGCG	40
BIP	AATTCGAGTTTCGTCGCCGACAGCCGGAGAGAGATTTGCCTA	42
F3	GCGGAATGGGAAGTCGATTC	20
B3	TCACGACCACCAGACAAGT	19
LB	GTTTTCTGTGGGTGTATGGTAGGTA	25

附录 C

(资料性附录)

草莓病原菌培养特征



第一排从左至右依次为：茶炭疽菌，丛赤壳菌，恶疫霉菌，尖孢镰刀菌

第二排从左至右依次为：链格孢菌，轮纹镰孢菌，土赤壳菌，钟器腐霉菌

附录 D

(资料性附录)

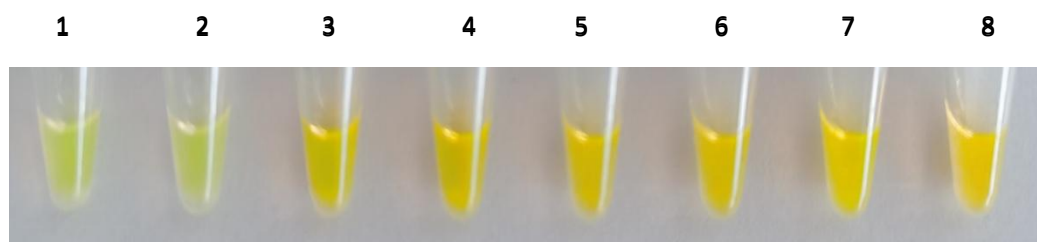
尖孢镰刀菌 LAMP 检测的反应体系

试剂	终浓度	体积 (μL)
10×Bst DNA Buffer	1×	2.5
50 mmol/L MgSO ₄	8 mmol/L	4
5 mol/L甜菜碱	0.8 mol/L	4
10 mmol/L dNTPs	1.4 mmol/L	3.5
40 μmol/L FIP (内引物1)	1.6	1
40 μmol/L BIP (内引物 2)	1.6	1
20 μmol/L F3 (外引物 1)	0.2	0.25
20 μmol/L B3 (外引物 2)	0.2	0.25
40 μmol/L LB (环引物)	0.8	0.5
8 U/μL Bst DNA 聚合酶	0.32 U/μL	1
DNA模板	10 ng ~10 ng×10 ⁻⁵	1
无菌去离子水	-	6

附录 E

(资料性附录)

LAMP 检测结果



1-3 分别为：阳性对照，待检植株，空白对照；

4-8 为阴性对照，分别为：草莓腐皮镰刀菌、禾谷镰刀菌、恶疫霉菌、鹰嘴豆枯萎镰刀菌，腐皮镰刀菌。
