



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3306.9—2017

国境口岸环介导恒温扩增(LAMP) 检测方法

第9部分:结核分枝杆菌

Loop-mediated isothermal amplification detection method at frontier port—
Part 9: *Mycobacterium tuberculosis*

2017-05-12 发布

2017-12-01 实施

中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

SN/T 3306《国境口岸环介导恒温扩增(LAMP)检测方法》分为 14 个部分：

- 第 1 部分：鼠疫杆菌；
- 第 2 部分：产毒素霍乱弧菌；
- 第 3 部分：志贺氏菌；
- 第 4 部分：嗜肺军团菌；
- 第 5 部分：布鲁氏菌；
- 第 6 部分：黄热病毒；
- 第 7 部分：猴痘病毒；
- 第 8 部分：基孔肯雅病毒；
- 第 9 部分：结核分枝杆菌；
- 第 10 部分：炭疽芽孢杆菌；
- 第 11 部分：副溶血性弧菌；
- 第 12 部分：空肠弯曲菌；
- 第 13 部分：疟原虫；
- 第 14 部分：大肠杆菌 0157 : H7。

本部分为 SN/T 3306 的第 9 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。

本部分起草单位：天津国际旅行卫生保健中心、河北国际旅行卫生保健中心唐山分中心、黑龙江国际旅行卫生保健中心、中华人民共和国山东出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：左锋、滑娜、鞠文东、邵柏、赵辉、潘娟、祁军。

国境口岸环介导恒温扩增(LAMP)
检测方法
第 9 部分:结核分枝杆菌

1 范围

SN/T 3306 的本部分规定了国境口岸检测疑似传染病的痰样本中结核分枝杆菌的环介导恒温核酸扩增(LAMP)法。

本部分适用于国境口岸结核分枝杆菌的筛选检测。

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 6682 分析实验室用水规程和试验方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

WS/T 230—2002 临床诊断中聚合酶链反应(PCR)技术的应用

WS 288 肺结核诊断标准

(卫科教发(2006)15 号)《人间传染的病原微生物名录》

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

Betaine:甜菜碱。

Bst 酶:*Bst* DNA 聚合酶(大片段)[*Bst* DNA polymerase (large fragment)]

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

dNTP:脱氧核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate)

EDTA:乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid)

LAMP:环介导恒温扩增(loop-mediated isothermal amplification)

Triton X-100:聚乙二醇辛基苯基醚

4 生物安全措施及防污染措施

实验操作及处理按照 GB 19489 和《人间传染的病原微生物名录》的规定,由具备相关资质的工作人员进行。

防止污染措施应符合 WS/T 230 的规定。

5 技术概要

根据结核分枝杆菌的特异性毒力基因序列设计特异性内外引物及环状引物各一对,共 6 条引物,特

异性识别靶序列上的 *gvrB* 基因,利用 *Bst* 酶启动循环链置换反应,在特异性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,即可通过反应液中的浑浊程度判定结果。亦可通过加入显色液,通过颜色变化观察判定结果。

6 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。

6.1 引物。

根据结核分枝杆菌特有的靶序列基因设计一套特异性引物,包括外引物 1,外引物 2,内引物 1,内引物 2 和环状引物 1,环状引物 2。

外引物 1(F3,5'-3'):GCCTGACCATCAACCTCAC

外引物 2(B3,5'-3'):CAGTGGTTTCGAAAACAGC

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

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

环状引物 1(LF,5'-3'):TTGATCTCGACTTCGAGCC

环状引物 2(LB,5'-3'):CCTCAAGCAAGGGGCG

6.2 DNA 提取液:含 20 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)、2 mmol/L EDTA 和 1.2% Triton X-100。

6.3 dNTP: 10 mmol/L。

6.4 *Bst* DNA 聚合酶:8 U/ μ L。

6.5 10 × ThermoPol 缓冲液:含 200 mmol/L Tris-HCl(pH 8.8)、100 mmol/L $(NH_4)_2SO_4$ 、100 mmol/L KCl、20 mmol/L $MgSO_4$ 、1% Triton X-100。

6.6 $MgCl_2$: 25 mmol/L。

6.7 甜菜碱:5 mol/L。

6.8 显色液:浓度为 1 000 × SYBR Green 1。

6.9 阳性对照:可溯源的标准菌株,或含目的片段的 DNA 亦可。

7 仪器和设备

7.1 移液器:量程 0.1 μ L~2 μ L,量程 10 μ L~100 μ L,量程 100 μ L~1 000 μ L。

7.2 高速台式离心机: $\geq 7\ 000\ g$ 。

7.3 水浴锅或加热模块:65 $^{\circ}C \pm 1\ ^{\circ}C$ 和 100 $^{\circ}C \pm 1\ ^{\circ}C$ 。

7.4 计时器。

8 检测程序

结核分枝杆菌 LAMP 检测程序见图 1。

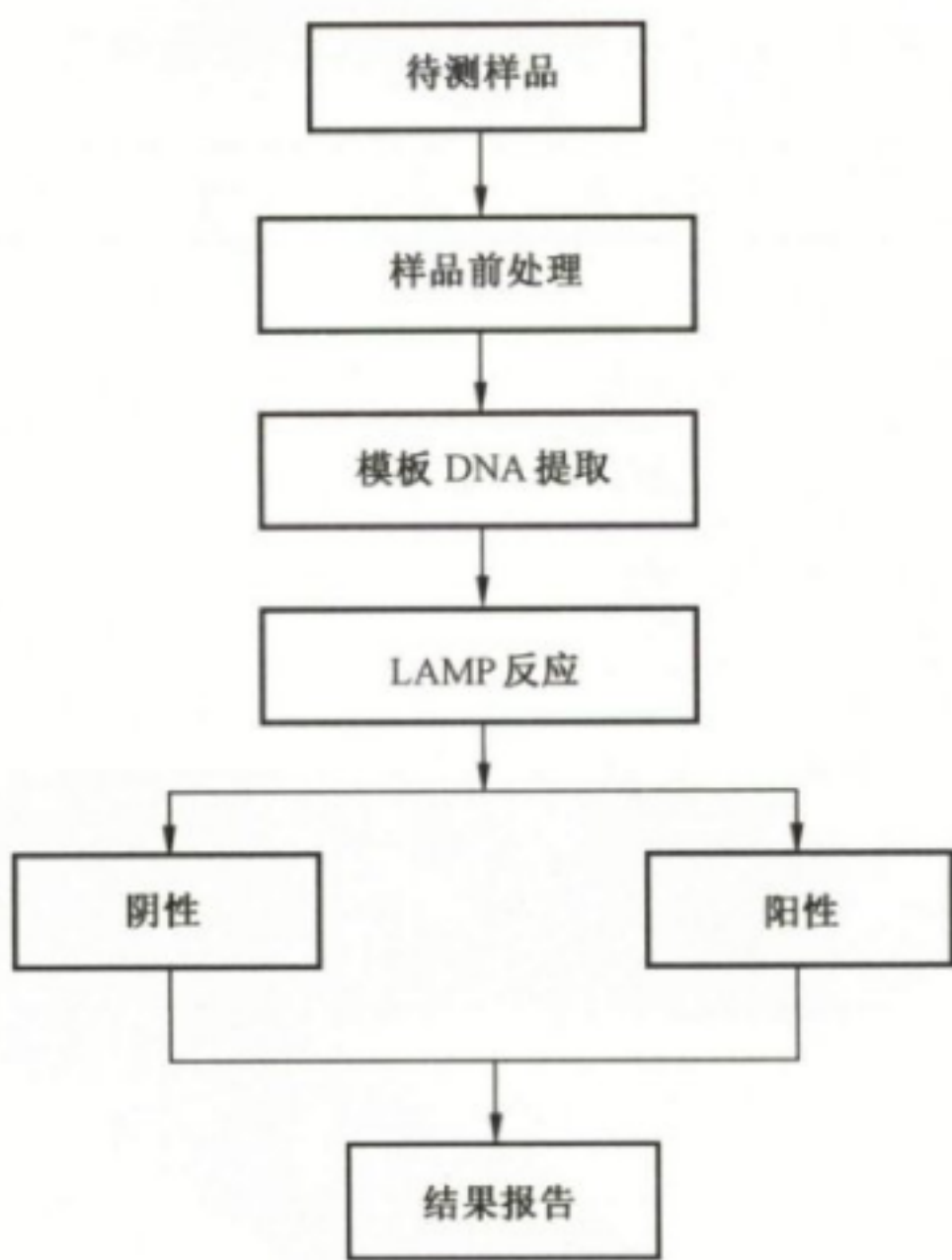


图 1 结核分枝杆菌 LAMP 检测程序

9 操作步骤

9.1 样本前处理

- 9.1.1 痰液样本的收集制备按照附录 A(痰液标本采集、保存及送样要求)。
- 9.1.2 痰液样本液化:取约 5 ml 痰液中加入 1 倍~2 倍体积的 4% NaOH 溶液,涡旋振荡器振荡混匀,室温下放置 20 min~30 min,使其充分液化(无明显固状物且吸出时无拖丝现象,若未达到完全液化可适当加入少量 4% 的 NaOH 溶液直至液化完全)。
- 9.1.3 痰液样本洗涤:取 1 mL 液化后痰液至 1.5 mL 离心管,14 000 g 离心 10 min,尽可能完全倾倒入上清液,倾倒后剩余的少量液体需要用移液器吸净(注意不要碰触到沉淀物);沉淀用 1 mL 生理盐水(0.9% w/v NaCl)悬浮,同上离心条件洗涤 2 次。保留沉淀物,备用。

9.2 模板 DNA 的制备

- 9.2.1 参照 WS/T 230—2002 中 5.3 样本处理中的原则制备检测模板。可采用下述方法,也可使用等效的商品化 DNA 提取试剂盒,按照其说明提取制备模板。
- 9.2.2 阳性对照制备:合成结核分枝杆菌目的序列,制备克隆质粒。
- 9.2.3 前处理样本模板 DNA 的制备:将 9.1 处理后的样本离心管中加入 40 μ L DNA 提取液,震荡混匀或移液器吹打混匀。沸水浴 10 min,冷却至室温,7 000 g 离心 5 min,上清液做模板备用。避免将 DNA 提取液中的颗粒物质吸出。

9.3 环介导恒温扩增

9.3.1 反应体系

结核分枝杆菌 LAMP 反应体系见表 1。

表 1 结核分枝杆菌 LAMP 反应体系

组 分	工作液浓度	加样量/ μL	反应体系终浓度
10 \times ThermoPol 缓冲液	10 \times	5.0	1 \times
外侧上游引物(F3)	20 $\mu\text{mol/L}$	0.5	0.2 $\mu\text{mol/L}$
外侧下游引物(B3)	20 $\mu\text{mol/L}$	0.5	0.2 $\mu\text{mol/L}$
内侧上游引物(FIP)	100 $\mu\text{mol/L}$	0.8	1.6 $\mu\text{mol/L}$
内侧下游引物(BIP)	100 $\mu\text{mol/L}$	0.8	1.6 $\mu\text{mol/L}$
环状上游引物(LF)	100 $\mu\text{mol/L}$	0.4	0.8 $\mu\text{mol/L}$
环状下游引物(LB)	100 $\mu\text{mol/L}$	0.4	0.8 $\mu\text{mol/L}$
dNTPs	10 mmol/L	7.0	1.4 mmol/L
MgCl ₂	25 mmol/L	12	6.0 mmol/L
甜菜碱	5 mol/L	8.0	0.8 mol/L
Bst DNA 聚合酶	8 U/ μL	1	0.16 U/ μL
DNA 模板	—	5	—
去离子水	—	8.6	—

9.3.2 反应过程

按照表 1 所述配制反应体系,上述组分加入后,轻柔混匀并短暂离心后加入 10 μL 的凡士林(密封液),最后将 1 μL 的显色液加入反应管顶端。盖上管盖后,置于 65 $^{\circ}\text{C}$ 恒温扩增 60 min,观察结果。

9.3.3 空白对照、阴性对照、阳性对照设置

应包括以下几项:

- a) 每次反应应设置阴性对照、空白对照和阳性对照;
- b) 空白对照以无菌水代替 DNA 模板;
- c) 阴性对照以 DNA 提取液代替 DNA 模板。

9.4 结果观察

取出反应管,短暂离心使反应管盖中显色液进入反应体系,3 min 后根据管内反应液颜色变化,判断结果。

9.5 结果判定

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) 阳性结果:待检样品反应管液体呈绿色,报告为 LAMP 检测阳性。如需对阳性结果做进一步确认,按照 WS 288 执行。
- b) 阴性结果:待检样品反应管液体呈橙色,报告为 LAMP 检测阴性。

附录 A

(规范性附录)

痰液标本采集、保存及送样要求

A.1 采集要求

A.1.1 取样容器

可采用世界卫生组织推荐的国际通用螺旋盖痰瓶,或可用密封塑料盒收集痰标本。痰容器应标明患者姓名,编号,检查项目和容器序号。

A.1.2 样本类型

深呼吸后咳出的痰液。

A.1.3 样本采集

深吸气 2 次~3 次,每次用力呼出,从肺部深处咳出痰,将打开盖的痰盒靠近嘴边收集痰液,拧紧盒盖。

A.2 送样要求

1 h 内把标本送到实验室。每个标本应有明显标记,并附有相应的送检单。

A.3 标本的采集、保存、运送、储藏要求

分别把采集的标本放入洁净无菌的合适容器内,密封,做好标记。应注意以下几点:

- 如果刚吃过食物,应先用清水漱口再留取痰标本;
- 标本内不得加入任何有碍细菌生长的物质;
- 送检标本应 -4°C 冷藏保存;
- 冷冻标本应在 -20°C 以下保存,可长期保存待用。