



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3567.11—2017

---

## 交叉引物恒温扩增检测方法 第 11 部分：志贺菌

Detection method of crossing priming isothermal amplification—  
Part 11: Shigella

2017-07-21 发布

2018-03-01 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 3567《交叉引物恒温扩增检测方法》分为 11 个部分：

- 第 1 部分：通用技术规程；
- 第 2 部分：霍乱弧菌；
- 第 3 部分：大肠杆菌 O157:H7；
- 第 4 部分：黄热病毒；
- 第 5 部分：沙门菌属；
- 第 6 部分：结核分枝杆菌；
- 第 7 部分：肠道病毒 71 型；
- 第 8 部分：疟原虫；
- 第 9 部分：鼠疫耶尔森菌；
- 第 10 部分：炭疽芽孢杆菌；
- 第 11 部分：志贺菌。

本部分为 SN/T 3567 的第 11 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：中华人民共和国天津出入境检验检疫局、中华人民共和国河北出入境检验检疫局、中华人民共和国广东出入境检验检疫局、杭州优思达生物技术有限公司。

本部分主要起草人：王馨、沈军、朱俊贤、原静、李浩辰、祁军、胡林、龙其敏。



## 交叉引物恒温扩增检测方法

### 第 11 部分:志贺菌

#### 1 范围

SN/T 3567 的本部分规定了国境口岸志贺菌属交叉引物恒温扩增法检测的对象、检测程序及检测结果的报告。

本部分适用于志贺菌属筛查检测,以及对国境口岸出入境人员感染志贺菌属的实验室检测。

#### 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 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

WS 287—2008 细菌性和阿米巴性痢疾诊断标准

人间传染的病原微生物名录(卫生部 2006)

#### 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

##### 3.1

**交叉引物恒温扩增技术** **crossing priming isothermal amplification; CPA**

一种核酸恒温扩增技术,CPA 恒温扩增体系中除包含具有链置换功能的 DNA 聚合酶(DNA Polymerase)外,还主要包括交叉引物、剥离引物和检测引物。这些寡聚核苷酸链能依靠该 DNA 聚合酶的高活性的链置换特性,使脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic Acid, DNA)的循环扩增能不断的实现。

##### 3.2

**交叉引物** **crossing primer**

用于交叉扩增的主要引物,其中正向引物的 5' 末端序列与反向引物的杂交序列相同,而反向引物的 5' 末端序列与正向引物的杂交序列相同,因此在扩增过程中这两条引物互相引入对方的杂交序列,增加引物的杂交位点,促进扩增反应。

##### 3.3

**剥离引物** **bumper primer**

位于交叉扩增引物后方的短链引物,其作用是在链置换 DNA 聚合酶的作用下,将扩增引物的延伸链从模板上剥离。

##### 3.4

**检测引物** **detection primer**

一对位于交叉引物内侧的短链引物,需要用半抗原或荧光素标记,其作用是使扩增产物带有该标记,以用于检测。



### 3.5

#### Bst DNA 聚合酶 Bst DNA polymerase

嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)DNA 聚合酶的部分片段,保留了其 5'→3'DNA 聚合酶活性,但是去除了 5'→3'核酸外切酶活性。Bst DNA 聚合酶最主要的特性是具有超强的链置换功能(Strand Displacement)。

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

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

dATP:脱氧腺苷三磷酸(deoxyadenosine triphosphate)

dTTP:脱氧胸苷三磷酸(deoxythymidine triphosphate)

dCTP:脱氧胞苷三磷酸(deoxycytidine triphosphate)

dGTP:脱氧鸟苷三磷酸(deoxyguanosine triphosphate)

## 5 生物安全措施

为了保护实验室人员的安全,按照 GB 19489 和原卫生部颁布的《人间传染的病原微生物名录》(2006)的规定,应由具备相关资格的工作人员进行实验操作。所有废弃物也应按照 GB 19489 中的有关规定执行。

## 6 检测对象

6.1 痢疾志贺菌、福氏志贺菌、鲍氏志贺菌和宋内志贺菌菌株。

6.2 疑似感染志贺菌属病人粪便标本。

## 7 试剂和材料

7.1 除另有规定外,所使用的试剂为分析纯或生化试剂,水为按照 GB/T 6682 规定的一级水。

7.2 DNA 提取试剂:5% Chelex 水溶液或细菌基因组 DNA 提取试剂盒。

7.3 10×ThermoPol 缓冲液:200 mmol/L Tris-HCl(pH 8.8)、100 mmol/L(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、100 mmol/L KCl、20 mmol/L MgSO<sub>4</sub>、1% Triton X-100。

7.4 10 mmol/L dNTPs 溶液:dATP、dTTP、dCTP、dGTP 各 2.5 mmol/L。

7.5 Bst DNA 聚合酶:8 U/μL。

7.6 甜菜碱溶液:5 mol/L。

7.7 MgSO<sub>4</sub> 溶液:100 mmol/L。

7.8 阳性对照:含有目的片段的质粒 DNA。

7.9 阴性对照:DNA 提取试剂。

7.10 TE 缓冲液(pH 7.4):0.1 mol/L Tris-HCl(pH 7.2)20 mL 加入 0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)4.0 mL,用超纯水定容至 200 mL。高压灭菌后 4℃保存。

7.11 2%琼脂糖凝胶。

7.12 Goldview:0.5 μg/μL。

7.13 DNA 分子标记物。



7.14 引物:交叉扩增引物、剥离引物和检测引物。参见附录 A。

7.15 封闭式一次性核酸检测装置(含核酸检测试纸条):使用方法参见附录 B。

## 8 仪器设备

8.1 任何恒温装置,如:水浴锅、金属浴或普通 PCR 仪。

8.2 微量移液器:量程范围为 0.1  $\mu\text{L}$ ~2  $\mu\text{L}$ ;0.5  $\mu\text{L}$ ~10  $\mu\text{L}$ ;10  $\mu\text{L}$ ~100  $\mu\text{L}$ ;100  $\mu\text{L}$ ~1 000  $\mu\text{L}$ 。

8.3 计时器。

8.4 超净工作台。

8.5 生物安全柜。

8.6 消毒灭菌锅。

8.7 高速台式离心机(最高离心力 12 000  $g$  以上)。

8.8 台式离心机(最高离心力 2 000  $g$  以上)。

8.9 涡旋振荡器。

8.10 低温冰箱、冷冻冷藏冰箱。

8.11 紫外凝胶电泳图像分析系统。

## 9 志贺菌交叉引物恒温扩增法检测程序

### 9.1 样品采集和处理

按照 WS 287—2008 执行。

### 9.2 细菌 DNA 提取的样本前处理

按照 WS 287—2008 执行。

### 9.3 模板 DNA 提取

#### 9.3.1 煮沸法

取处理后的标本液 1 mL 加到 1.5 mL 无菌离心管中,7 000  $g$  离心 2 min,尽量吸弃上清液,加入 80  $\mu\text{L}$  DNA 提取液,混匀后沸水浴 10 min,置冰上 10 min,7 000  $g$  离心 2 min,上清液即为模板 DNA,取上清液置  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用,可存 6 个月。

#### 9.3.2 试剂盒提取

按适用于细菌基因组提取的试剂盒说明书操作。

### 9.4 交叉引物恒温扩增

#### 9.4.1 交叉引物恒温扩增引物

用于检测志贺菌属的交叉引物恒温扩增引物序列参见附录 A。

#### 9.4.2 阳性对照、阴性对照和空白对照设置

实验过程中需要分别设阳性对照和空白对照,阳性对照采用含检测序列的质粒 DNA 作为交叉引物恒温扩增模板;阴性对照采用 DNA 提取液作为交叉引物恒温扩增模板;空白对照则采用无菌水作为交叉引物恒温扩增模板。

### 9.4.3 交叉引物恒温扩增反应体系

交叉引物恒温扩增反应检测志贺菌的参考反应体系见表 1。

表 1 志贺菌交叉引物恒温扩增反应体系

试剂名称	储备液浓度	20 $\mu\text{L}$ 体系加样量
10 $\times$ ThermoPol 缓冲液	—	2 $\mu\text{L}$
10 mmol/L dNTPs	10 mmol/L	0.8 $\mu\text{L}$
剥离引物 F 和 R	20 $\mu\text{mol/L}$	各 0.1 $\mu\text{L}$
交叉扩增引物 F 和 R	20 $\mu\text{mol/L}$	各 0.8 $\mu\text{L}$
检测引物 F 和 R	20 $\mu\text{mol/L}$	各 0.3 $\mu\text{L}$
MgSO <sub>4</sub>	100 mmol/L	0.8 $\mu\text{L}$
甜菜碱	5 mol/L	2 $\mu\text{L}$
Bst DNA 聚合酶	8 U/ $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
模板	50 ng/ $\mu\text{L}$	4 $\mu\text{L}$
ddH <sub>2</sub> O	—	补足反应体系至 20 $\mu\text{L}$

### 9.4.4 交叉引物恒温扩增反应程序

将配制好的扩增反应液 PCR 管置于恒温仪器上,63  $^{\circ}\text{C}$  温浴 60 min。

### 9.4.5 交叉引物恒温扩增产物检测

9.4.5.1 扩增产物经过 2% 琼脂糖凝胶电泳,在紫外凝胶电泳图像分析系统下观察分析扩增产物。

9.4.5.2 可使用但不限于通过封闭式一次性核酸检测装置(含核酸检测试纸条)检测交叉引物恒温扩增产物,该方法灵敏度较高,且可降低交叉污染的风险。具体操作步骤参见 B.1。

### 9.4.6 检测结果判定

9.4.6.1 电泳产生梯形条带判定为交叉引物恒温扩增检测阳性。

9.4.6.2 可使用封闭式一次性核酸检测装置方法的结果描述及判定参见 B.3。



附 录 A  
(资料性附录)  
志贺菌属 CPA 检测的引物序列

A.1 剥离引物

SHIF3 5-GTTCCTTGACCGCCTTTCC  
SHIR3 5-ATGCCTGATGGACCAGGAG

A.2 交叉引物

SHICPR 5-TTCGCTGTTGCTGCTGATGTCCATGTGAGCGCGACACG  
SHICPF 5-TCCATGTGAGCGCGACACGTTTCGCTGTTGCTGCTGATG

A.3 检测引物

SHIFITC 5-FITC-TTCGCTGTTGCTGCTGATG  
SHIBIOTIN 5-BIOTIN-CCACTGAGAGCTGTGAGG

## 附录 B

(资料性附录)

### 封闭式一次性核酸检测装置(含核酸检测试纸条)

#### B.1 操作步骤及操作示意图

**B.1.1** 将扩增后的反应管(不可开盖,以避免污染)放入封闭式一次性核酸检测装置(含核酸检测试纸条)的固定盒(内芯)中,合上固定盒后将其装入装置外盒。

**B.1.2** 按手柄至检测装置于关闭状态(听见清脆的“咔嚓”声)。

**B.1.3** 将检测装置放置在操作台上,请通过阅读窗判读结果。15 min~30 min 为最佳判读时间,但不应超过 2 h。

**B.1.4** 记录检测结果,丢弃检测装置在安全处。

**B.1.5** 操作示意图见图 B.1。

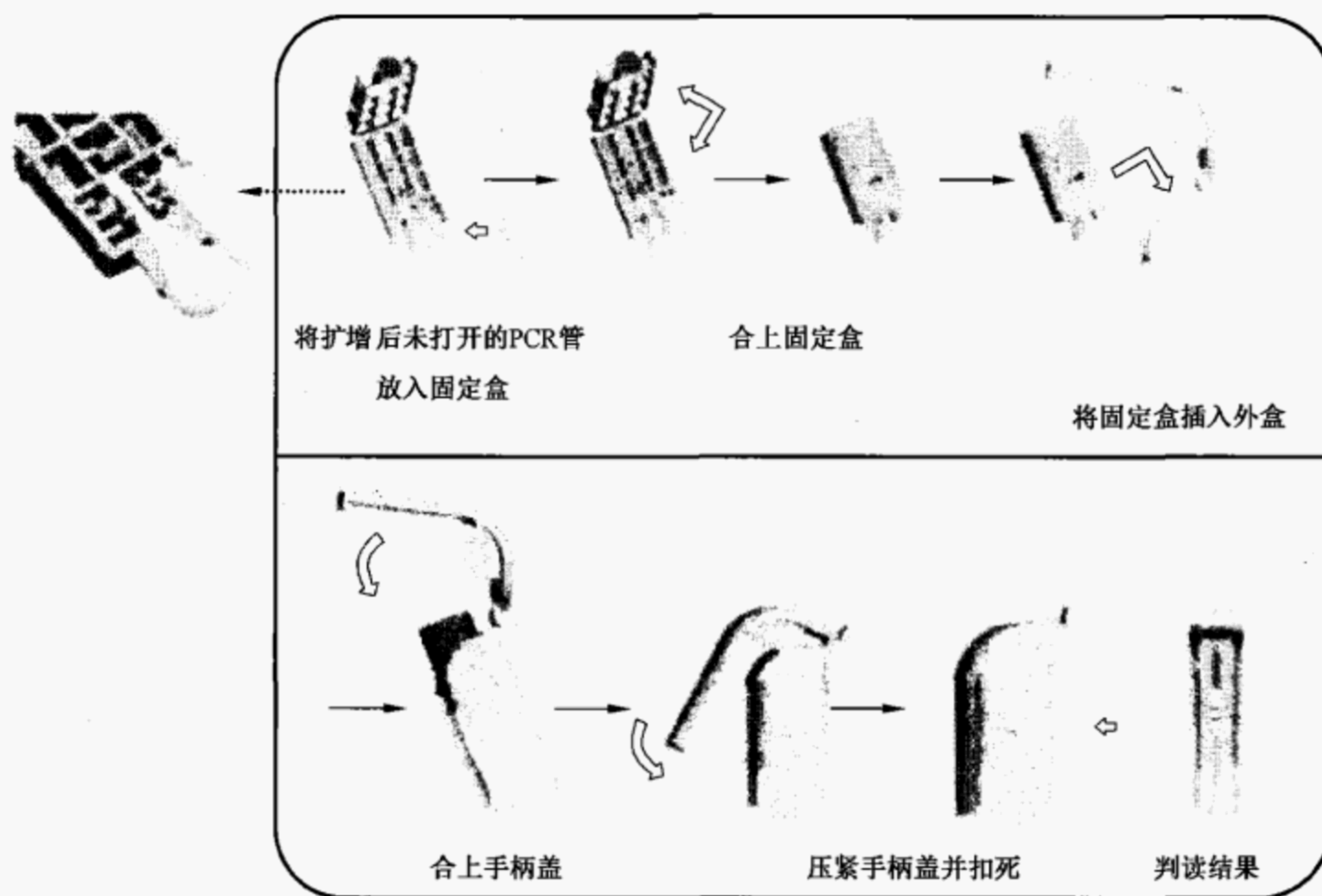


图 B.1

#### B.2 质控方法

**B.2.1** 阴性对照仅出现一条红线(在质控区 C)。

**B.2.2** 阳性对照出现两条红线:一条位于检测区(T),另一条位于质控区(C)。

**B.2.3** 每个测试样本至少出现一条质控线,有或无检测线。



B.3 结果描述及判定

B.3.1 仅在质控区 C 出现一条红线,表示样品中无待测病原体;或其拷贝数低于该检测试剂的最低检测限。

B.3.2 出现两条红线,一条检测线,一条质控线,表示样品中存在待测病原体或基因。将检测线强度与色卡进行对照: $\geq L4$ ,为阳性; $<L4$  为阴性。

B.3.3 无效在质控区 C 无红色线条出现。表明核酸检测试纸条失效或一次性核酸检测装置损坏,检测无效。

B.4 检测结果判读示意图

检测结果判读示意图见图 B.2。

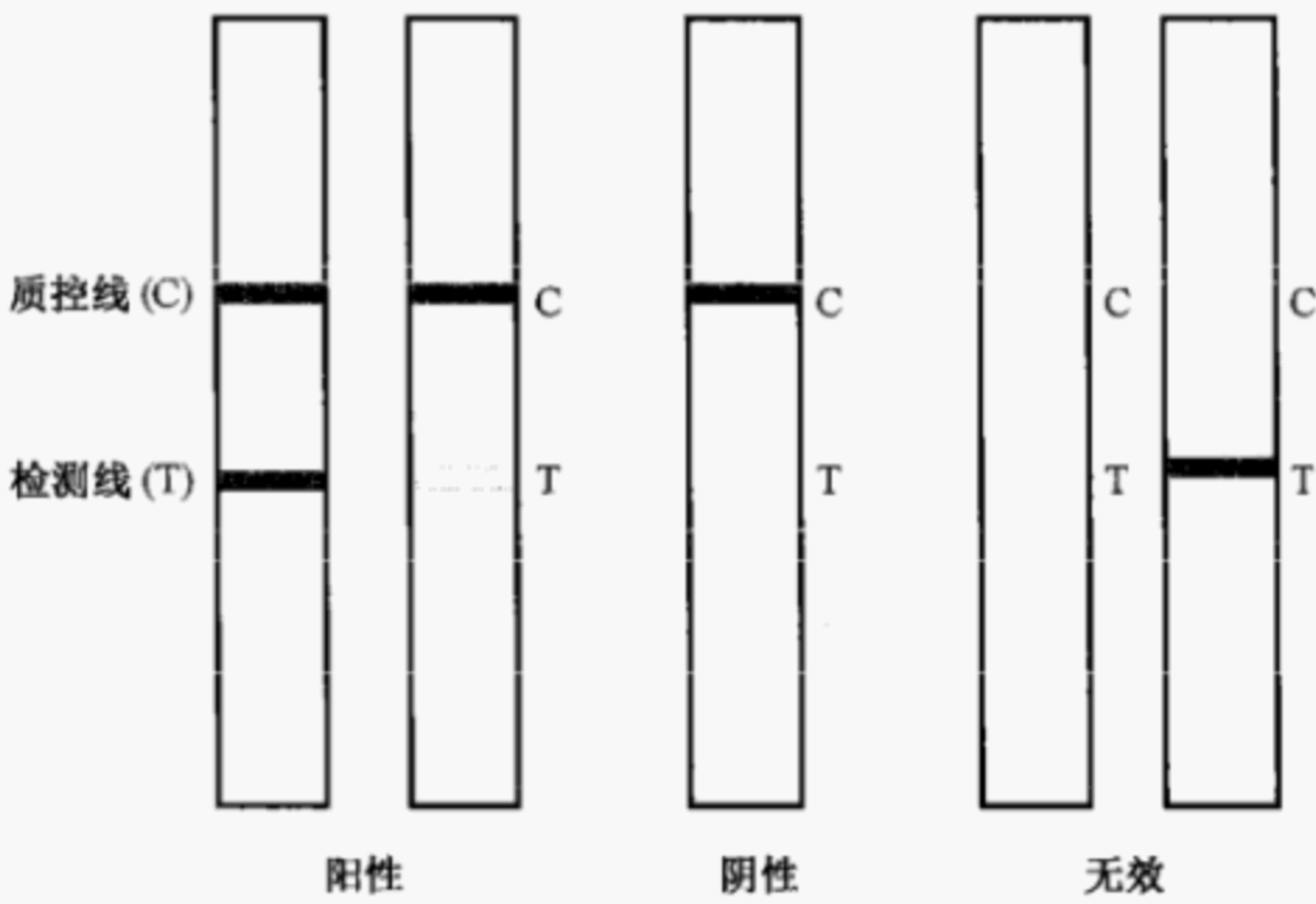


图 B.2

中华人民共和国出入境检验检疫  
行 业 标 准  
交叉引物恒温扩增检测方法  
第 11 部分:志贺菌  
SN/T 3567.11—2017

\*

中国标准出版社出版  
北京市朝阳区和平里西街甲 2 号(100029)  
北京市西城区三里河北街 16 号(100045)  
总编室:(010)68533533

网址 [www.spc.net.cn](http://www.spc.net.cn)

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 16 千字  
2018 年 6 月第一版 2018 年 6 月第一次印刷  
印数 1—500

\*

书号: 155066 · 2-33369 定价 16.00 元



SN/T 3567.11—2017