



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3567.9—2017

交叉引物恒温扩增检测方法 第9部分：鼠疫耶尔森菌

Detection method of crossing priming isothermal amplification—
Part 9: *Yersinia pestis*

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 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、杭州优思达生物技术有限公司。

本部分主要起草人：王馨、关淳、兰景、李浩辰、祁军、胡林、尤其敏。

交叉引物恒温扩增检测方法

第9部分:鼠疫耶尔森菌

1 范围

SN/T 3567 的本部分规定了国境口岸鼠疫耶尔森菌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。

本部分适用于鼠疫耶尔森菌筛查检测,以及对国境口岸出入境人员感染鼠疫耶尔森菌的实验室检测。

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

SN/T 1280—2014 国境口岸鼠疫检验规程

WS 279—2008 鼠疫诊断标准

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)中的有关规定,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 鼠疫耶尔森菌菌株。

6.2 急热待查疑似感染鼠疫病人的淋巴结穿刺液、痰液、组织液等。

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(NH₄)₂SO₄、100 mmol/L KCl、20 mmol/L MgSO₄、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 MgSO₄ 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 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

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 μL ~2 μL ;0.5 μL ~10 μL ;10 μL ~100 μL ;100 μL ~1 000 μL 。

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 鼠疫耶尔森菌交叉引物恒温扩增法检测程序

9.1 样品采集

按照 SN/T 1280—2014 附录 D 中要求执行。

9.2 细菌 DNA 提取的样本前处理

将待测样品按 WS 279—2008 中附录 C 聚合酶链式反应(PCR)检测鼠疫耶尔森菌特异性基因所述标本处理方法进行样品处理。

9.3 模板 DNA 提取

9.3.1 沸水浴法

在处理后的样本沉淀采用如下方法制备模板 DNA:沉淀中加入 80 μL DNA 提取液,混匀后沸水浴 10 min;于 7 000 g 离心 2 min,上清液即为模板 DNA;取上清液置 -20 ℃ 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

用于检测鼠疫耶尔森菌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、阴性对照和空白对照,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鼠疫耶尔森菌的参考反应体系见表 1。

表 1 鼠疫耶尔森菌交叉引物恒温扩增反应体系

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

鼠疫耶尔森菌 CPA 检测的引物序列

A.1 剥离引物

YPF3 5-GTTAGGAATTATTACTTTCGGC

YPR3 5-TCCTAGACTGAATGAGAACC

A.2 交叉引物

YPCPR 5-AAGAGTATGGCGTGACTATCACCGAGACCATAACGCCA

YPCPF 5-CACCGAGACCATAACGCCAAAGAGTATGGCGTGACTAT

A.3 检测引物

YPFITC 5-FITC-AAGAGTATGGCGTGACTAT

YPBIOTIN 5-BIOTIN-TACCCGTTAGATGCTGC

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。

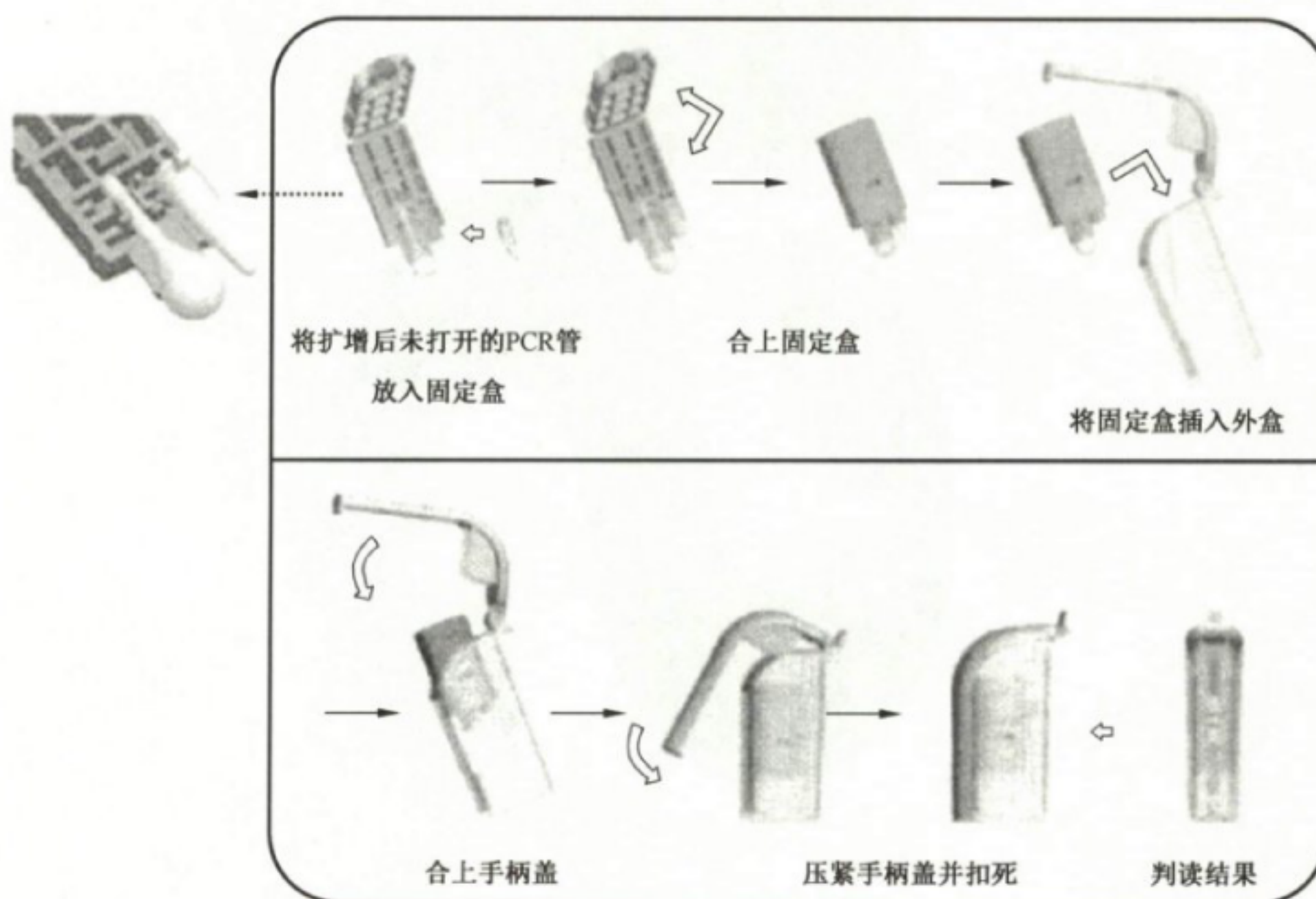


图 B.1

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。

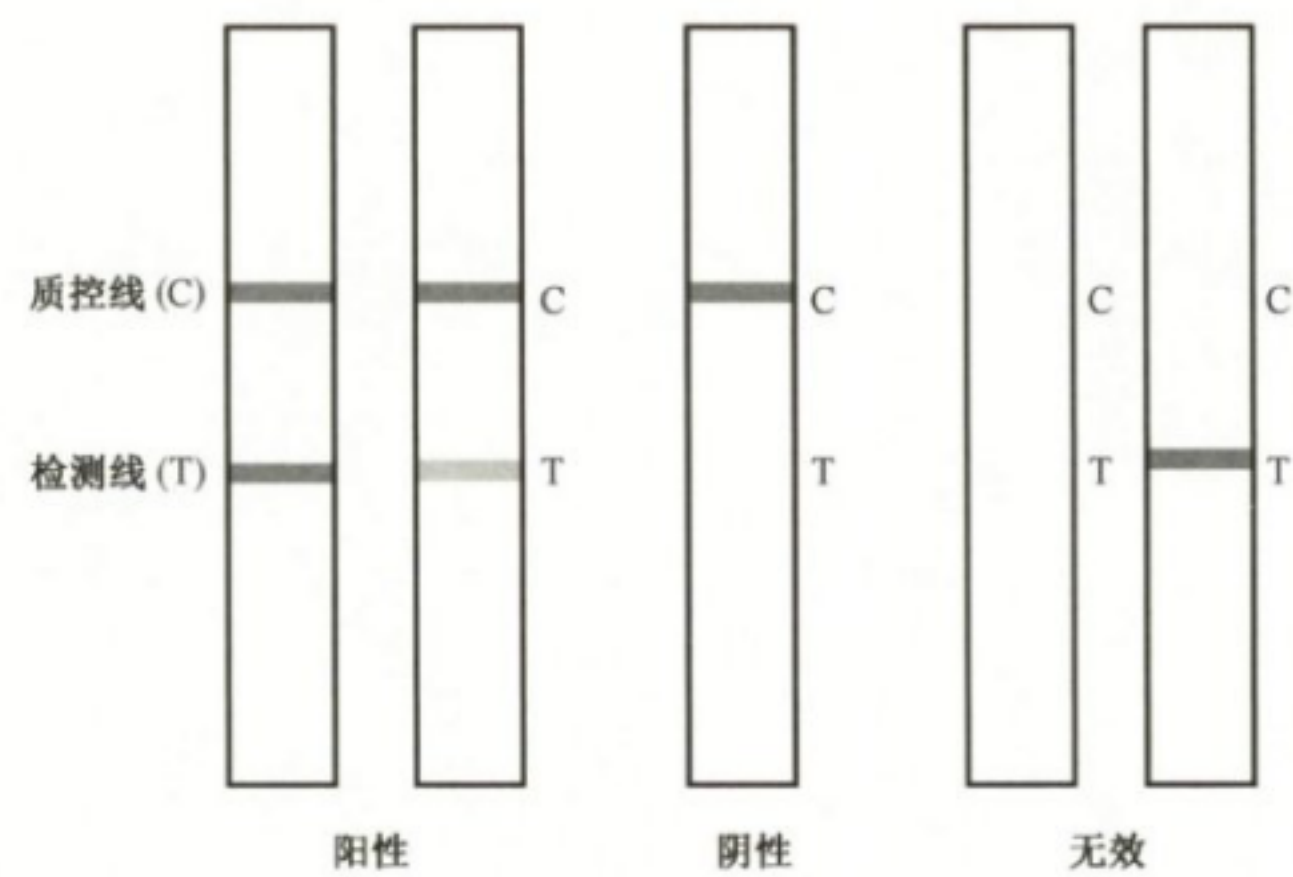


图 B.2