



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3393—2012

---

## 国境口岸五种生物恐怖病原菌 快速筛查方法 多重引物悬浮芯片法

Rapid simultaneous screen method of five bio-terrorism bacteria at frontier port—  
Gene suspension array with multiple primers on genus level

2012-12-12 发布

2013-07-01 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

本标准按照 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。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国重庆出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：韩辉、杨宇、杨永莉、王静、文海燕、赵婷婷、王旺。

# 国境口岸五种生物恐怖病原菌 快速筛查方法 多重引物悬浮芯片法

## 1 范围

本标准规定了国境口岸可疑粉末状样品中炭疽芽胞杆菌、鼠疫耶尔森菌、布鲁菌、土拉弗朗西斯菌和类鼻疽伯克霍尔德菌基因悬浮芯片的检测方法。

本标准适用于国境口岸可疑粉末状样品中炭疽芽胞杆菌、鼠疫耶尔森菌、布鲁菌、土拉弗朗西斯菌和类鼻疽伯克霍尔德菌五种重要生物恐怖相关细菌的多重检测。

## 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 19489 实验室 生物安全通用要求

SN/T 1552 国境口岸生物因子恐怖事件监测规程

WS 233 微生物和生物医学实验室生物安全通用准则

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**生物恐怖病原菌** **bio-terrorism bacteria**

可用于生物恐怖袭击的危害人体健康的病原细菌,主要包括炭疽芽胞杆菌、鼠疫耶尔森菌、布鲁菌、土拉弗朗西斯菌和类鼻疽伯克霍尔德菌等,其特点是感染剂量低、毒性高、致病性强,感染后潜伏期短、发病率高;传染性强,可通过不同途径感染人体;其在外环境中稳定性好,易于生产、保存、包装、运输和释放。

### 3.2

**基因悬浮芯片** **gene suspension array**

也称液相基因芯片,是利用带编码的微球体作为载体,流式细胞仪作为检测平台,对核酸等生物分子进行大规模测定的一种生物芯片技术。

## 4 生物安全防护要求

4.1 排查前做好个人防护。防护方法和标准见 SN/T 1552。

4.2 实验室应遵循 GB 19489 和 WS 233 对生物安全Ⅱ级(BSL-2)实验室的生物安全要求。

4.3 使用过的实验用品应遵照 GB 19489 的要求,对废弃物应进行无害化处理。

## 5 主要设备与试剂

### 5.1 主要设备

悬浮芯片系统(Bio-Plex)<sup>1)</sup>、显微镜(10×~100×)、离心机、PCR 仪、生物安全柜、移液器(0.5 μL~1 000 μL)、核酸蛋白检测仪、真空泵、抽滤装置、旋涡混合仪、恒温振荡器、细胞计数器。

### 5.2 主要试剂

羧基化编码微球、氯化四甲铵(TMAC)、2[*N*-吗啉]乙磺酸(2[*N*-Morpholino]ethanesulfonic acid, MES)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐[*N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*'-ethylcarbodiimide, EDC]、碳化二亚胺、十二烷基硫酸钠(SDS)、*N*-月桂酰肌氨酸钠(Sarkosyl)、链亲和素-藻红蛋白(SA-PE)、蛋白酶 K、乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、NaCl、无水乙醇、70%乙醇、Tris 饱和酚、溴代十六烷基三甲胺(CTAB)、三氯甲烷、异戊醇、Tween-20、DNA 提取试剂盒。

相关缓冲溶液配制见附录 A。

## 6 检测方法

### 6.1 样品采集

依 SN/T 1552 执行。

### 6.2 细菌 DNA 提取

6.2.1 取 0.1 g 可疑粉末状样品加 500 μL PBS, 10 000 g 离心 3 min; 取上清液于一新的离心管中 12 000 g 离心 1 min, 弃去上清液, 沉淀用 PBS 洗涤 3 次后, 向每管样本中加入 500 μL TE 用吸管反复吸打混匀, 使沉淀重悬, 加入 30 μL 10% SDS 和 4 μL (20 mg/mL) 蛋白酶 K, 混匀于 37 °C 温育 2 h。

6.2.2 加入 100 μL 5 mol/L NaCl, 充分混匀, 加入 80 μL CTAB/NaCl (5% 质量浓度) 混匀于 65 °C 温育 10 min。

6.2.3 加入 700 μL Tris 饱和酚, 混匀 12 000 g 离心 8 min, 将上清液转入一个新离心管中。

6.2.4 在上清液中加入 700 μL Tris 饱和酚, 混匀 12 000 g 离心 8 min, 将上清液转入一个新离心管中。

6.2.5 在上清液中加入 700 μL 三氯甲烷/异戊醇 (24/1, 体积比), 混匀 12 000 g 离心 8 min, 将上清液转入一个新离心管中。

6.2.6 重复 6.2.5。

6.2.7 在上清液中加入 1 mL 无水乙醇, 来回颠倒 4~5 次, 置于 -20 °C 静置 30 min, 15 600 g 离心 20 min, 离心后弃上清液。

6.2.8 沉淀中加入 400 μL 70% 乙醇, 颠倒 4~5 次, 12 000 g 离心 1 min, 弃上清液, 将离心管置于灭菌的滤纸上, 使乙醇挥发完。

6.2.9 最后将沉淀溶于 50 μL TE 中, -20 °C 保存备用。

注: 本标准推荐上述核酸提取方法, 也可以使用其他效果相同提取 DNA 试剂盒。

1) 由美国伯乐公司提供的产品的商品名。给出这一信息是为了方便本标准的使用者, 并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果, 则可使用这些等效的产品。



### 6.3 PCR 扩增

扩增引物序列见附录 B 中 B.1, 下游引物 5' 端生物素修饰, 反应体系见附录 B.2 为 30  $\mu$ L。反应条件为预变性 94  $^{\circ}$ C 10 min, 32 个循环 (94  $^{\circ}$ C 30 s, 58  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 40 s), 延伸 72  $^{\circ}$ C 10 min, 4  $^{\circ}$ C 保存。同时应设置阳性对照、本底对照以水代替样品模板 DNA。

注: 本文件以 takara 公司 PCR 反应体系为例, 也可以使用等效的 PCR 试剂。

### 6.4 探针与羧化微球的偶联

6.4.1 探针 (序列见 B.3) 的 5' 端连上 20 个 poly(T), 氨基化修饰, 与羧基化微球偶联。将氨基化修饰的寡核苷酸探针重悬于超纯水中使其终浓度为 1 mmol/L。

6.4.2 将 1 mL 包装中的小球振荡 30 s, 超声 30 s, 至将小球打散。

6.4.3 取 100  $\mu$ L 小球至 1.5 mL 离心管, 14 000 g 离心 4 min, 小心吸出上清液。

6.4.4 微球重悬于 50  $\mu$ L pH4.5 的 0.1 mol/L MES 中, 振荡 20 s, 超声 20 s。

6.4.5 用超纯水将 6.4.1 的寡核苷酸探针 10 倍稀释, 取 2  $\mu$ L 10 倍稀释的探针加于 6.4.4 的小球悬浮液中, 振荡混匀。

6.4.6 向 6.4.5 的离心管中加入 2.5  $\mu$ L 新鲜配制的 10 mg/mL 的 EDC 溶液, 振荡混匀。置旋涡混匀仪上, 室温 (18  $^{\circ}$ C ~ 25  $^{\circ}$ C) 避光孵育 30 min。

6.4.7 重复 6.4.6。

6.4.8 反应结束后, 将 6.4.7 的离心管 14 000 g 离心 4 min, 小心吸弃上清液。

6.4.9 加入 1 mL 0.02% Tween-20, 14 000 g 离心 4 min, 小心吸弃上清液。

6.4.10 加入 1 mL 0.1% SDS, 14 000 g 离心 4 min, 吸弃上清液。

6.4.11 加入 100  $\mu$ L pH8.0 TE 缓冲溶液, 振荡 10 s, 超声 10 s, 使微球重悬。

6.4.12 用细胞计数器计数后 4  $^{\circ}$ C 保存备用。

### 6.5 偶联微球的质控

6.5.1 合成与探针互补的寡核苷酸链, 寡核苷酸链 5' 端生物素标记。

6.5.2 用旋涡混合仪充分振荡已经偶联好的编码微球。

6.5.3 吸取适量微球, 用 1.5  $\times$  TMAC 缓冲溶液稀释至 3 500 个/33  $\mu$ L, 置于 0.2 mL 离心管中。

6.5.4 稀释与探针互补的寡核苷酸链至 0.1  $\mu$ mol/L。

6.5.5 向各管中加入 1  $\mu$ L 上述寡核苷酸溶液以及 16  $\mu$ L TE 溶液使其终体积为 50  $\mu$ L, 吹打混匀。

6.5.6 95  $^{\circ}$ C 变性 10 min。

6.5.7 55  $^{\circ}$ C 杂交 15 min。

6.5.8 转移至滤板抽滤去掉未结合的核苷酸链。

6.5.9 再向各孔加 75  $\mu$ L 含 4 ng SA-PE 的 1  $\times$  TMAC 缓冲溶液, 室温 (18  $^{\circ}$ C ~ 25  $^{\circ}$ C) 避光孵育 10 min, 抽滤去掉未结合的 SA-PE。

6.5.10 再向各孔加入 75  $\mu$ L  $\times$  TMAC 缓冲溶液, 振荡使微球重悬。

6.5.11 反应结束后上机检测。

6.5.12 结果判定: 偶联的微球的 MFI 值大于 2 000 则说明包被成功, 可用于以下实验。

### 6.6 杂交

6.6.1 取偶联探针的微球各 3 500 个混于 33  $\mu$ L 1.5  $\times$  TMAC 缓冲溶液中, 置于 0.2 mL 离心管中。

6.6.2 向各管中加 5  $\mu$ L ~ 17  $\mu$ L 检测样品模板的 PCR 产物使其终体积为 50  $\mu$ L, 吹打混匀。

6.6.3 95  $^{\circ}$ C 变性 10 min, 55  $^{\circ}$ C 杂交 15 min, 转移至滤板抽滤去掉未结合的 PCR 产物及其液体。

6.6.4 向各孔加 75  $\mu\text{L}$  4 ng/ $\mu\text{L}$  SA-PE 的 1 $\times$ TMAC 缓冲溶液,室温避光孵育 10 min,抽滤去掉未结合的 SA-PE 及其液体。

6.6.5 向各孔加入 75  $\mu\text{L}$  1 $\times$ TMAC 缓冲溶液,振荡使微球重悬。

## 6.7 检测

按操作说明上机检测,同时以 PCR 本底对照进行杂交检测做为检测本底,仪器输出的数据是相应反应体系内一种编号微球群的荧光强度中位值(Median Fluorescence Intensity,MFI),亦即读取的这种编号的微球群(100 个或以上)的每个微球信号强度的统计平均值。通过悬浮芯片系统读取各孔荧光值(MFI)以及本底对照荧光值(Background MFI,BFI),分析处理数据。

## 6.8 结果判定

6.8.1 待检样品荧光值大于本底对照荧光值 3 倍时,结果判为阳性,即检测出有相应细菌。

6.8.2 待检样品荧光值小于本底对照荧光值 3 倍时,结果判为阴性,即没有检测出相应细菌。

附 录 A  
(规范性附录)  
培养基、溶液配制

**A.1 PCR 反应液**

*Taq* HS, dNTP Mixture, 10×PCR 缓冲液,  $Mg^{2+}$ 。

**A.2 1.5×TMAC 缓冲溶液**

4.5 mol/L TMAC, 0.15% Sarkosyl, 75 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 6 mmol/L EDTA pH8.0。

**A.3 1×TMAC 缓冲溶液**

3 mol/L TMAC, 0.1% Sarkosyl, 50 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 4 mmol/L EDTA pH8.0。

**A.4 PBS(pH7.4)**

NaCl 137 mmol/L; KCl 2.7 mmol/L;  $Na_2HPO_4$  10 mmol/L;  $KH_2PO_4$  2 mmol/L。用 800 mL 蒸馏水溶解 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g  $Na_2HPO_4$  和 0.24 g  $KH_2PO_4$ 。用 HCl 调节溶液的 pH 值至 7.4, 加水至 1 L。分装后在 121 °C 高压灭菌 20 min, 或过滤除菌, 保存于室温。

**A.5 TE 缓冲液**

10 mmol/L Tris-Cl pH7.5, 1 mmol/L EDTA pH8.0。

**A.6 CTAB/NaCl 溶液(5%质量浓度)**

2.5 g CTAB 溶于 50 mL 0.5 mol/L NaCl 溶液中, 加热到 65 °C 使之溶解, 然后至室温保存。



**附 录 B**  
(规范性附录)  
**引物及探针**

**B.1 五种生物恐怖细菌检测体系多重 PCR 引物序列**

炭疽芽胞杆菌(*Bacillus anthracis*)、鼠疫耶尔森菌(*Yersinia pestis*)、布鲁菌(*Brucella spp.*)、土拉弗朗西斯菌(*Francisella tularensis*)和类鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia pseudomallei*)五种细菌检测体系多重 PCR 引物序列见 B.1。

**表 B.1 五种生物恐怖细菌检测体系多重 PCR 引物序列**

细菌	引物	序列(5'-3')	靶基因	引物长度	产物大小(bp)
炭疽芽胞杆菌	Ba-1-F	TGGACGCATACGAGACATAAT	质粒 pOX2	21	430
	Ba-1-R	TGCTTTAGCGGTAGCAGAGG		20	
	Ba-2-F	TTTCATAATCATGGATTTCCCG	染色体	22	212
	Ba-2-R	TTACCCAACATCATCTTCGCA		21	
布鲁菌	Bru-F	TGGCTCGGTTGCCAATATCAA	BUSP31	21	223
	Bru-R	GCGCTTGCCTTTCAGGTCTG		20	
土拉弗朗西斯菌	Ft-F	GGGCAAATCTAGCAGGTCAAG	fopA	21	250
	Ft-R	GCTGTAGTCGCACCATTATCCT		22	
鼠疫耶尔森菌	Yp-F	ACTCAATGTTGTGACGAGGATG	染色体	22	220
	Yp-R	TTACTTCTAATGCCATCAGGTAGC		24	
类鼻疽伯克霍尔 德菌	Bp-F	CGATCTCGTCAAGGTGTCGG	染色体	20	150
	Bp-R	CCCCAGTTCATCTGATACTTGC		22	
注：各下游引物 5'端进行生物素修饰。					

**B.2 多重 PCR 体系**

多重 PCR 体系见表 B.2。

**表 B.2 多重 PCR 体系**

体系组成	加入量 $\mu\text{L}$	终浓度
10×PCR 缓冲液	3	1×
<i>Taq</i> HS	0.4	2U
dNTPs	0.6	200 $\mu\text{mol/L}$
MgCl <sub>2</sub>	—	1.5 mmol/L
Ba-1-F, Ba-1-R	0.3	100 nmol/L



表 B.2 (续)

体系组成	加入量 μL	终浓度
Ba-2-F, Ba-2-R	0.3	100 nmol/L
Yp-F, Yp-R	0.3	100 nmol/L
Ft-F, Ft-R	0.24	80 nmol/L
Bp-F, Bp-R	0.24	80 nmol/L
Bru-F, Bru-R	0.36	120 nmol/L
模板 DNA	2	—
ddH <sub>2</sub> O	Up to 30 μL	—

B.3 五因子多重检测体系探针序列

检测五种细菌的多重检测体系探针序列见表 B.3。

表 B.3 五因子多重检测体系探针序列

探针名称	探针位置	探针序列(5'-3')
Ba-1	bp415-437 of Bacillus anthracis str. A2012 plasmid pXO2 capB	GAAGAACGCAGGCTTAGATTGGT
Ba-2	bp742-764 of Bacillus anthracis str. 'Ames Ancestor' AE017334	CTCGCTTTCATCGCATTTCTCCC
Yp-2	bp 181-205 of Yersinia pestis CO92 YPO2091	AACAGTAAGCATCCAGTCGTTTCATA
Bru-2	bp842-864 of B. abortus BCSP31	TTACGCAGTCAGACGTTGCCTAT
Ft-2	bp989-1012 of Francisella tularensis ferredoxin (fdx)	TGCTGGTTTAAACATGGTTCTTTGG
Bp-2	bp209-231 of Burkholderia pseudomallei 1106a chromosome II	AGGTCAATTTCCCGAACAAGACT