



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4276—2015

---

## 国境口岸鼠疫耶尔森菌荧光 PCR 检测方法

Detection of *Yersinia pestis* in rodents by real-time  
PCR method at frontier port

2015-05-26 发布

2016-01-01 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。

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：中华人民共和国北京出入境检验检疫局、北京市海淀区疾病预防控制中心、中华人民共和国福建出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：田洁、陆琳、郭惠琳、何斌、刘艳华、任彤、赵静、黄恩炯。

# 国境口岸鼠疫耶尔森菌荧光 PCR 检测方法

## 1 范围

本标准规定了国境口岸鼠疫耶尔森菌荧光 PCR 检测方法的检测对象,标本的采集、处理、检测程序。

本标准适用于国境口岸鼠疫耶尔森菌的荧光 PCR 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

GB/T 28940 病媒生物感染病原体采样规程 鼠类

GB/T 28942 病媒生物感染病原体采样规程 蚤

SN/T 1240 国境口岸鼠类监测规程

SN/T 1292 国境口岸蚤类监测规程

WS 279 鼠疫诊断标准

人间传染的病原微生物名录(卫生部)

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**鼠疫耶尔森菌** *Yersinia pestis*

俗称鼠疫杆菌,为革兰阴性短粗杆菌,菌体两端钝圆且浓染,亦易被苯胺染料着色,大小为 $(0.5\ \mu\text{m}\sim 1.0\ \mu\text{m})\times(1.0\ \mu\text{m}\sim 2.0\ \mu\text{m})$ 。一般分散存在,偶尔成双或呈短链排列,无鞭毛,不形成芽胞。鼠疫耶尔森菌是鼠疫的病原菌,鼠疫是一种人兽共患的自然疫源性烈性传染病,人类鼠疫多为疫鼠的跳蚤叮咬而感染,是我国法定的甲类传染病。鼠疫传染性强,病死率高,易酿成大流行。鼠疫耶尔森菌主要累及皮肤和淋巴结,其次为败血症、肺炎、脑膜炎。

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

PCR:聚合酶链式反应(polymerase chain reaction)

Ct 值:循环阈值,每个反应管的荧光信号达到设定阈值时所经历的循环数(cycle threshold)

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

PBS 缓冲液

含 0.5% 吐温-20 的 pH7.4 的磷酸盐缓冲液。

生理盐水

0.9% 的氯化钠水溶液。

## 5 实验室生物安全要求

按照《人间传染的病原微生物名录》规定,本方法中鼠疫耶尔森菌荧光 PCR 检测应在 GB 19489 规定的生物安全 II 级(BSL-2)实验室内进行。

## 6 检测对象

6.1 国境口岸疑似鼠疫耶尔森菌感染者的临床样品。

6.2 国境口岸可能携带鼠疫耶尔森菌的医学媒介生物样品。

6.3 国境口岸疑似鼠疫耶尔森菌污染的环境样品。

## 7 主要仪器设备

本方法使用的主要仪器如下:

- 实时荧光 PCR 仪;
- 二级生物安全柜;
- 高压灭菌器;
- $-70^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱(或液氮罐);
- 普通冰箱;
- 高速台式冷冻离心机(最高转速 13 800 g 以上);
- 微量可调移液器(10  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$ 、1 000  $\mu\text{L}$ )及配套的一次性带滤芯吸头;
- 水浴锅;
- 组织研磨器。

## 8 试剂

本方法使用的主要试剂如下:

- 无菌生理盐水或三蒸水;
- Premix Ex Taq<sup>TM</sup>(Probe qPCR)<sup>1)</sup>;
- 引物;
- 阳性对照;
- 阴性对照;
- 探针。

1) 给出这一信息是为了方便本标准使用者,并不表示只认可该产品。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用等效产品。

## 9 检测程序

### 9.1 样本采集

9.1.1 鼠类样品的采集、运输和保存按照 GB/T 28940、SN/T 1240 操作；蚤类样品的采集按照 GB/T 28942、SN/T 1292 操作。

9.1.2 临床样品的采集按照 WS 279 操作。

9.1.3 环境样品按无菌技术操作，取适量置于无菌容器中密封保存。

9.1.4 在采集过程中做好个人防护。

### 9.2 样品检测

#### 9.2.1 核酸提取

##### 9.2.1.1 煮沸法提取核酸

9.2.1.1.1 以无菌方法称取 0.2 g 粉碎的固体环境样品，加入 1 mL 的无菌去离子水，充分振荡，2 000 r/min 离心 4 min，收集上清液，将上清液 8 000 r/min 离心 5 min，收集沉淀；沉淀中加入 0.1 mL 无菌去离子水，沸水中加热 5 min；8 000 r/min 离心 3 min，上清液作为 PCR 扩增的模板。

9.2.1.1.2 以无菌方法吸取液体环境样品（如：水、饮料等）3 mL，12 000 r/min 离心 2 min，去上清液，收集沉淀；加入 0.1 mL 无菌去离子水，沸水中加热 5 min；8 000 r/min 离心 3 min，上清液作为 PCR 扩增的模板。

9.2.1.1.3 以无菌方法将 0.1 mL 血液或体液样品置微型离心管中，沸水中加热 5 min；8 000 r/min 离心 3 min，上清液作为 PCR 扩增的模板。

9.2.1.1.4 以无菌方法取人类或鼠类组织样品 0.025 g，用 0.1 mL 无菌生理盐水或三蒸水研磨；将经过鉴定的适量的蚤加 0.1 mL 无菌生理盐水或三蒸水研磨，将制得的组织匀浆液转移至离心管中，沸水中加热 5 min；8 000 r/min 离心 3 min，上清液作为 PCR 扩增的模板。

##### 9.2.1.2 商品化 DNA 提取试剂盒提取核酸

用商品的 DNA 提取试剂盒处理标本，具体操作参见该试剂盒说明书。

#### 9.2.2 荧光 PCR

##### 9.2.2.1 引物和目的基因

本方法使用的引物探针如下：

——上游引物 Cafl-F：5'-AGGTAAACGGTGAGAACCTTG TG-3'，位置为 365 bp-387 bp；

——下游引物 Cafl-R：5'-CAATTGAGCGAACAAGAAATCC-3'，位置为 420 bp-442 bp；

——探针 Cafl-T：Fam-ATGACGTCGTCTTGGCTACGGGCA-Tamra，位置为 392 bp-415 bp。

##### 9.2.2.2 反应体系

反应体系设置为 20  $\mu$ L，组成见表 1：

SN/T 4276—2015

表 1 Taqman 实时荧光 PCR 反应体系

组 分		使 用 量
PCR 反应液	Premix Ex Taq(Probe qPCR)(2×)	10.0 μL
	PCR Forward Primer(10 μmol/L)	0.5 μL
	PCR Reverse Primer(10 μmol/L)	0.5 μL
	TaqMan Probe	1.0 μL
DNA 模板		5.0 μL
反应体系为 20.0 μL,不足的用灭菌蒸馏水补齐		

9.2.2.3 扩增程序

将加好样的 PCR 反应管分别转移到荧光 PCR 检测仪上进行扩增反应。程序设置为以 ABI 7300 全自动荧光定量 PCR 仪为例说明,将荧光信号设置为:Reporter Dye:FAM,Quencher Dye:TAMRA,选择 ROX 荧光信号校正。扩增程序为 94 ℃×5 min;95 ℃×5 s,60 ℃×30 s,循环 40 次。由于不同的荧光定量 PCR 仪性能有差异,应按照实际机型进行反应程序设置,没有 ROX 荧光通道的荧光定量 PCR 仪,不进行 ROX 的设置。

9.2.2.4 基线和对照

根据使用不同的荧光定量 PCR 仪设定好基线,设定的一般原则以阈值线刚好超过正常阴性对照扩增曲线的最高点,也可根据仪器噪音情况调整。

阳性对照为鼠疫耶尔森菌基因组 DNA 或含鼠疫耶尔森菌目的基因的质粒;阴性对照为不含鼠疫耶尔森菌的样品。

9.3 结果判定

9.3.1 质量控制

反应结果应同时符合以下 2 个条件:阴性对照无扩增曲线;阳性对照 Ct 值≤35 并有明显扩增曲线。否则实验视为无效。

9.3.2 结果报告

- 当同时进行的阳性、阴性和空白对照实验结果正常,本方法检验结果判定如下:
- 检测样品有明显的荧光增幅曲线,且 Ct 值≤35 时,判为阳性。
  - 检测样品荧光增幅曲线的 Ct 值在 35 和 40 之间时,建议采用浓缩方式处理核酸样本,再重新进行实时荧光 PCR 检测。若重新检测的 Ct 值有明显的减少趋势,且曲线有明显的对数增长期,判为阳性,否则判为阴性。此类样本建议用其他方法进一步验证。
  - 检测样品无荧光增幅现象,判为阴性。