

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4283.2—2015

国境口岸微孔板基因芯片检测方法 第2部分：结核分枝杆菌及 *katG* 和 *rpoB* 耐药变异基因

Test method of microplate gene chip at frontier port—
Part 2: *Mycobacterium tuberculosis* and drug resistant
mutations of *katG* and *rpoB* genes

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

SN/T 4283《国境口岸微孔板基因芯片检测方法》为系列标准,分为六个部分:

- 第1部分:通用技术规程;
- 第2部分:结核分枝杆菌及 katG 和 rpoB 耐药变异基因;
- 第3部分:7种呼吸道病毒;
- 第4部分:肠道病毒及肠道病毒 71 型、柯萨奇病毒 A16 型;
- 第5部分:肺炎支原体、肺炎衣原体及嗜肺军团菌;
- 第6部分:12种食源性致病菌。

本部分为 SN/T 4283 的第2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:中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、深圳市检验检疫科学研究院、深圳市南山区慢性病防治院、珠海精标仪器有限公司。

本部分主要起草人:刘春晓、杨燕秋、张涛、张树平、刘君、顾大勇、史蕾、赵纯中、何建安、徐云庆、李永进。

国境口岸微孔板基因芯片检测方法

第2部分:结核分枝杆菌及 *katG* 和 *rpoB* 耐药变异基因

1 范围

SN/T 4283 的本部分规定了国境口岸结核分枝杆菌及 *katG* 和 *rpoB* 耐药变异基因的微孔板基因芯片检测方法。

本部分适用于在国境口岸实验室采用微孔板基因芯片技术对结核分枝杆菌及 *katG* 和 *rpoB* 两个耐药变异基因进行检测。

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 1262 国境口岸结核病检验规程

SN/T 2752.4—2011 卫生检疫人员的自我防护规范 第4部分:实验室人员

SN/T 3312 结核分枝杆菌 γ -干扰素体外检测方法

SN/T 4283.1 国境口岸微孔板芯片检测方法 第1部分:通用技术规程

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

SN/T 4283.1 和 SN/T 1262、SN/T 3312 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

耐药变异基因 *drug resistant mutations*

由于发生碱基的插入、缺失、置换等而导致耐药产生的基因。耐药基因变异是结核分枝杆菌产生耐药性的主要机制。

3.2

***katG* 基因** *katG gene*

过氧化氢酶-过氧化物酶(catalase-peoxidase)的编码基因。

3.3

***rpoB* 基因** *rpoB gene*

结核杆菌 DNA 依赖 RNA 聚合酶(DNA-dependent RNA polymerase, DPRP) β 亚单位的编码基因。

4 缩略语

SN/T 4283.1 界定的以及下列缩略语适用于本文件。

KatG:过氧化氢酶-过氧化物酶(catalase-peroxidase)

rpoB:RNA 聚合酶 β 亚单位(RNA polymerase beta-subunit)

MTB:结核分枝杆菌(*mycobacterium tuberculosis*)

WT:野生型(wild type)

5 生物安全防护要求

5.1 实验室应遵循 GB 19489 和 WS 233 对应的生物安全要求。

5.2 实验人员的防护遵循 SN/T 2752.4—2011 的要求。

6 主要设备和试剂

6.1 主要设备:基因芯片点样仪、芯片杂交仪、芯片清洗显色仪、生物芯片全自动扫描判读仪、PCR 仪、生物安全柜、离心机、移液器、恒温水浴锅等。

6.2 主要试剂:结核分枝杆菌及 katG 和 rpoB 耐药变异基因微孔板芯片检测试剂盒或自行设置结核分枝杆菌及 katG 和 rpoB 耐药变异基因微孔板芯片检测试剂(相关引物及探针序列参见附录 A)。

7 检测流程

7.1 样品核酸的提取

7.1.1 痰液等标本 DNA 的提取如下:吸取痰液干酪样或脓性黏液部分(或胸水、肺泡灌洗液、浑浊的脑脊液离心后取沉淀物)2 mL 于无菌尖底离心管内,加入等量临用前新鲜配制的消化液(4% NaOH 50 mL+2.94%柠檬酸钠 50 mL+N-乙酰-L 半胱氨酸 0.5 g,充分溶解混匀),置涡旋混均器上混匀 15 s~20 s,室温静置 15 min,使之充分液化至清亮。加入无菌 pH 6.8 PBS 缓冲液至 20 mL,混匀,3 000 g 离心 15 min,弃去上清液。于沉淀中提取样品 DNA,可参照 SN/T 4283.1。

7.1.2 培养的菌落样品 DNA 可直接提取,参照 SN/T 4283.1。

7.2 PCR 扩增反应

7.2.1 可使用试剂盒附带的试剂按说明书要求配置 PCR 反应体系,或自行配置 25 μ L PCR 反应体系:10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L,dNTPs(各 5 μ mol/L)2 μ L,MgCl₂(25 mmol/L)2 μ L,所有上下游引物(含 PCR 阳性对照)(各 5 μ mol/L)混合液 2 μ L,Taq DNA 聚合酶 0.25 μ L,模板核酸 5 μ L(含阳性对照核酸 1 μ L,主要为细菌基因组 DNA),ddH₂O 11.25 μ L;振荡混匀,并轻微离心。

7.2.2 将上述 PCR 反应管放入 PCR 仪,设定 PCR 反应程序:首先 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min;然后 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min,4 $^{\circ}$ C 保存备用;若需长期使用请置于-20 $^{\circ}$ C 保存。

7.3 微孔板基因芯片杂交反应

7.3.1 开启芯片杂交仪,并设置芯片杂交仪预加热至 50 $^{\circ}$ C。

7.3.2 按试验要求准备所需的微孔板基因芯片,并准确、清晰标记。将杂交反应液平衡至室温,轻轻摇动混合均匀后,分别取 100 μ L 加入微孔板各检测孔中;在桌面轻轻平行晃动微孔板,使各孔中的杂交反应液均匀覆盖于芯片检测表面并且无气泡产生,如有气泡可以用洁净的细针或加样枪头去除。

7.3.3 取样品 PCR 产物 10 μL 于 PCR 仪中 95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min,待 PCR 仪降温至 4 $^{\circ}\text{C}$ 后取出并立即置于冰上备用。

7.3.4 取上述已变性处理的 PCR 产物 10 μL 加入芯片的对应检测孔中,贴上杂交反应盘胶膜,置于芯片杂交仪中 45 $^{\circ}\text{C}$,振荡反应 1 h。

7.4 微孔板基因芯片显色反应

7.4.1 杂交反应结束后,取出微孔板芯片将微孔内的液体用力甩出倒空,每孔加入洗涤液 200 μL ,在桌面轻轻平行晃动微孔板 20 s(以反应孔内液体不溢出为限),然后用力甩干反应孔中液体,重复上述动作 2 遍,最后一次在液体倒掉后将芯片置于擦手纸上轻拍数次,以去除残留液体。

7.4.2 于各反应孔中加入 100 μL 显色检测液,室温静置反应 20 min 后,用力甩干反应孔中液体。然后加入 200 μL 洗涤液,静置 1 min,甩干孔中液体,重复上述动作 2 遍,最后一次在液体倒掉后将芯片置于擦手纸上轻拍数次,以去除残留液体。

7.4.3 于各反应孔中加入 100 μL 显色液,室温避光反应 8 min 后,用力甩干孔中液体。ddH₂O 冲洗芯片内部,于擦手纸上轻拍数次,以去除残留之液体,置于 50 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱或室温干燥。

注:配置芯片清洗显色仪的可使用仪器自带程序,按照操作说明书实施 7.4 的步骤和流程。

7.5 微孔板基因芯片结果检测

将显色反应后的芯片放入生物芯片全自动扫描判读仪内,扫描获得杂交结果图。运行设定的图像分析软件,选择结核分枝杆菌及 katG 和 rpoB 耐药变异基因芯片结果分析程序,依据芯片探针设置模式(参见附录 B),对扫描获得的杂交结果进行自动化的数据分析判定,获得检测结果。

8 结果报告

检测结果报告可分为以下几种模式:

- 如未检出 MTB,则报告为“微孔板基因芯片检测方法:MTB 阴性”。
- 如检出 MTB,且全部的突变位点检测结果均为阴性,则报告为“微孔板基因芯片检测方法:MTB(katG315 野生型;rpoB511/513 野生型;rpoB516 野生型;rpoB522 野生型;rpoB526 野生型;rpoB531 野生型)”。
- 如检出 MTB,且 katG 相关的突变位点检测结果为阴性,而 rpoB 相关的某个或多个突变位点检测结果为阳性,则报告为“微孔板基因芯片检测方法:MTB[katG315 野生型;rpoB $\times\times\times$ 突变($***\rightarrow###$);或/和 rpoB $\times\times\times$ 突变($***\rightarrow###$)]”。
- 如检出 MTB,且 rpoB 相关的突变位点检测结果为阴性,而 katG 相关的某个或多个突变位点检测结果为阳性,则报告为“微孔板基因芯片检测方法:MTB[katG315 突变($***\rightarrow###$);或/和 katG315 突变($***\rightarrow###$);rpoB511/513 野生型;rpoB516 野生型;rpoB522 野生型;rpoB526 野生型;rpoB531 野生型]”。
- 如检出 MTB,且 katG 和 rpoB 相关的某个或多个突变位点检测结果为阳性,则报告为“微孔板基因芯片检测方法:MTB[katG315 突变($***\rightarrow###$);或/和 katG315 突变($***\rightarrow###$);rpoB $\times\times\times$ 野生型;或/和 rpoB $\times\times\times$ 野生型;rpoB $\times\times\times$ 突变($***\rightarrow###$);或/和 rpoB $\times\times\times$ 突变($***\rightarrow###$)]”。

注:本章出现的 rpoB $\times\times\times$ 突变($***\rightarrow###$)中的 $\times\times\times$ 指代氨基酸位置,如 511,513 或 516 等; $***\rightarrow###$ 指代碱基的突变情况,如 CAC \rightarrow GAC 或 TCG \rightarrow TTG 等。

SN/T 4283.2—2015

9 阳性结果的处置

9.1 检测结果为阳性的样品应做进一步确诊。

9.2 确诊为阳性结果后应按规定程序向相应部门报告。

附 录 A
(资料性附录)

结核分枝杆菌及 katG 和 rpoB 耐药变异基因微孔板芯片检测相关的引物及探针

A.1 结核分枝杆菌及 katG 和 rpoB 耐药变异基因微孔板芯片检测相关的引物如表 A.1 所示。

表 A.1 结核分枝杆菌及 katG 和 rpoB 耐药变异基因微孔板芯片检测相关的引物

引物名称	引物序列
katG	F: TGGAAGAGCTCGTATGGCACC GGAACC
	R: GCTCTCCGTCAGCTCCC ACTCGTAGCC
rpoB	F: CGTGGAGGCGATCACACCGCAGACGT
	R: GACCTCCAGCCCGGCACGCTCACGT
MT	F: CCGCAAAGTGTGGCTAACCC
	R: GAGCGTAGGCGTCGGTGACA
PCR 阳性对照 (16S rRNA)	F: AAAACTCAAATGAATTGACGG
	R: GTACAAGGCCCGGGAACGTATT CACCGT
注 1: F 表示上游引物, R 表示下游引物。 注 2: 引物 5' 端生物素修饰。	

A.2 结核分枝杆菌及 katG 和 rpoB 耐药变异基因微孔板芯片检测相关的探针如表 A.2 所示。

表 A.2 结核分枝杆菌及 katG 和 rpoB 耐药变异基因微孔板芯片检测相关的探针

基因名称	探针名称	氨基酸位置	氨基酸替代类型	碱基替代	探针序列
katG	WT	315	Ser(WT)	AGC	GCGATCACC AG CGGCATCGA
	T1	315	Ser→Thr1	AGC→ACC	GCGATCACC ACC GGCATCGA
	T2	315	Ser→Thr2	AGC→ACA	CGATCACC AC AGGCATCGAG
rpoB	WT1	511	Leu(WT)	CTG	GCCAG CT GAGCCAATTCATG
		513	Gln(WT)	CAA	
	WT2	516	Asp(WT)	GAC	CAATTCATGG ACC AGAACAAC
	Mut1	516	Asp→Val	GAC→GTC	CAATTCATGG TCC AGAACAAC
	WT3	522	Ser(WT)	TCG	ACCCGCTGT TCG GGGTGACC
	WT4	526	His(WT)	CAC	GGGTTGACCC ACA AGCGCCG
	Mut2A	526	His→Tyr	CAC→TAC	GGGTTGACCT TACA AGCGCCG
	Mut2B	526	His→Asp	CAC→GAC	GGGTTGACCG ACA AGCGCCG
	WT5	531	Ser(WT)	TCG	CGCCGACTGT TCG GCGCTGGG
	Mut3	531	Ser→Leu	TCG→TTG	GCCGACTGT TTG GCGCTGGG
IS6110	MTB				CACCTATGTGTCGACCTGGGCAG

SN/T 4283.2—2015

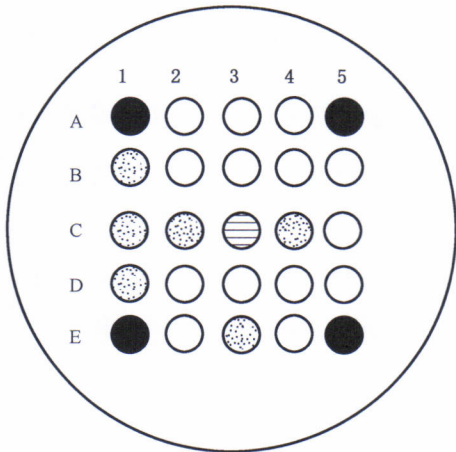
表 A.2 (续)

基因名称	探针名称	氨基酸位置	氨基酸替代类型	碱基替代	探针序列
PCR 阳性对照					GTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATG
杂交阳性对照					ATGAAGCAYGTCAGGGCARTGGATACCTCG
阴性对照					TCCTCCAATTTGTCCGGTTATCGCT
注 1：探针 5'端 20 个 poly(T)的修饰。					
注 2：杂交阳性探针的配对杂交片段为 5'端生物素修饰的 CGAGGTATCCAYGCCCTGACRTGCTTCAT。					

附 录 B
(资料性附录)

结核分枝杆菌及 katG 和 rpoB 耐药变异基因微孔板芯片检测探针设置模式

结核分枝杆菌及 katG 和 rpoB 耐药变异基因微孔板芯片检测探针设置模式如图 B.1 所示。



注：A1,A5,E1,E5:杂交阳性对照探针点;B1,C1,C2,C4,D1,E3:阴性对照探针点;C3:PCR 阳性对照探针点;A2: MTB;B2: WT,katG315 野生型;D2: T1,表示 katG315 突变型(AGC→ACC);E2: T2,表示 katG315 突变型(AGC→ACA);A3: WT1,表示 rpoB511/513 野生型;A4: WT2,表示 rpoB516 野生型;B3: WT3,表示 rpoB522 野生型;B4: WT4,表示 rpoB526 野生型;B5: WT5,表示 rpoB531 野生型;D3: Mut1,表示 rpoB516 突变型(GAC→GTC);D4: Mut2A,表示 rpoB526 突变型(CAC→TAC);E4: Mut2B,表示 rpoB526 突变型(CAC→GAC);D5: Mut3,表示 rpoB531 突变型(TCG→TTG)。

图 B.1 结核分枝杆菌及 katG 和 rpoB 耐药变异基因微孔板芯片检测探针设置模式图