

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4799—2017

动物结核病病原菌检测方法 变性高效液相色谱法

Detection of tuberculosis pathogenic organisms of animals—
DHPLC method

2017-07-21 发布

2018-03-01 实施



中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
动物结核病病原菌检测方法
变性高效液相色谱法

SN/T 4799—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

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

*

书号: 155066·2-33414 定价 16.00 元

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：中华人民共和国广东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：刘志玲、陈茹、王莹、吴晓薇、朱道中、段燕喻、林志雄。

动物结核病病原菌检测方法 变性高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了结核分枝杆菌复合群、结核分枝杆菌、牛分枝杆菌多重 PCR 联合变性高效液相色谱(mPCR-DHPLC)检测方法的技术要求和操作规范。

本标准适用于快速检测细菌培养物、动物组织、血样、痰液等临床样品中结核分枝杆菌复合群、结核分枝杆菌、牛分枝杆菌。

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

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DHPLC:变性高效液相色谱(denaturing high-performance liquid chromatography)。

dNTP:脱氧核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate)。

PBS:磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution)。

mPCR:多重聚合酶链式反应(multiplex-polymerase chain reaction)。

TEAA:三乙基铵醋酸盐。

4 概述

人与动物结核病涉及多种病原菌或病原菌复合群。结核分枝杆菌复合群(Mycobacterium tuberculosis complex, MTC)是感染人与哺乳动物的结核病原菌,包括结核分枝杆菌和牛分枝杆菌、非洲分枝杆菌和田鼠分枝杆菌。其中,主要感染人与家畜并致病的是结核分枝杆菌和牛分枝杆菌。与 MTC 相对应的是种类繁多的各种非结核分枝杆菌(NTM)。NTM 感染患者的临床症状及病理变化与 MTC 引起的结核病极为相似,但多数 NTM 对抗结核药物有天然耐药性。此外,NTM 感染可造成结核菌素皮内变态反应或血清学检测假阳性。采用多重 PCR 联合变性高效液相色谱检测的方法可同步区分结核分枝杆菌复合群与非结核分枝杆菌复合群,并鉴别结核分枝杆菌与牛分枝杆菌

mPCR 反应的原理、操作过程与普通 PCR 相同。在同一 PCR 反应体系里加入多对特异性引物,对多个 DNA 模板或同一模版不同区域扩增出多个目的 DNA 片段。DHPLC 分析技术是利用液相色谱技术,在高压闭合液相流路中,将 DNA 样品自动注入并在缓冲液携带下流过 DNA 分离柱,DNA 片段分子中带负电荷的磷酸根基团与 TEAA 分子中带正电荷的氨基发生静电作用相互吸引,同时 TEAA 分子中的三个乙基与固定相 C₁₈ 表面的烷基发生疏水作用力而相互吸引,通过流动相中的乙腈的梯度洗脱将不同大小的 DNA 片段分离。由紫外或荧光检测被分离的 DNA 样品。根据 DNA 扩增片段长

度大小,不同分子量的特异扩增产物在特定位置呈现吸收峰,从而对结核分枝杆菌复合群、结核分枝杆菌和牛分枝杆菌进行快速检测。

5 材料与试剂

5.1 仪器与耗材

- 5.1.1 变性高效液相色谱分析仪。
- 5.1.2 核酸扩增仪。
- 5.1.3 II级生物安全柜。
- 5.1.4 接种棒。
- 5.1.5 恒温水浴锅(室温至 100 ℃)。
- 5.1.6 离心机。
- 5.1.7 微量可调移液器和灭菌吸头:10 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL。
- 5.1.8 天平。
- 5.1.9 PCR 光学反应管。

5.2 试剂

- 5.2.1 试剂级别:除另有规定,所用化学试剂均为分析纯。
- 5.2.2 检测用引物:见表 1。

表 1 分枝杆菌 PCR-DHPLC 检测扩增引物序列

目标菌类	目标基因	核酸序列(5'—3')	产物大小
结核分枝杆菌复合群	IS6110	上游引物:CCAACAAGAAGGCGTACTC	165 bp
		下游引物:TTGATCGTCTCGGCTAGTG	
结核分枝杆菌复合群	IS1081	上游引物:CGATGAGCGGTCCAATC	380 bp
		下游引物:GACGCGGCCTGCCT	
结核分枝杆菌	MTss127	上游引物:AAGCGATTCTGCGACATATTC	213 bp
		下游引物:GTGAACGGAAGCGGATTTC	
牛分枝杆菌	MBss229	上游引物:TCTTGGAGTGGCTACAAC	241 bp
		下游引物:GCGAACAGATTCAGCATGG	

采用无 DNA 酶、无 RNA 酶水将每条引物(序列见表 1)配制成 100 μmol/L 储存液,置-20 ℃或更低温度冻存;使用时取适量配制成 10 μmol/L 工作液,避免多次冻融。

- 5.2.3 0.01 mol/L PBS(pH7.6):配方见附录 A 中 A.1。
- 5.2.4 柠檬酸钠缓冲液:配方见 A.2。
- 5.2.5 0.5 mol/L EDTA(pH8.0):配方见 A.3。
- 5.2.6 柠檬酸钠-磷酸缓冲液:配方见 A.4。
- 5.2.7 4% 氢氧化钠溶液:配方见 A.5。
- 5.2.8 Triton X-100。
- 5.2.9 DNA 提取液:含 100 mmol/L Tris-HCl(pH8.0),0.01% Triton X-100,20 μg/μL 蛋白酶 K。
- 5.2.10 灭菌双蒸水。

- 5.2.11 三氯甲烷。
- 5.2.12 dNTPs: dATP、dTTP、dCTP 和 dGTP。
- 5.2.13 Taq DNA 聚合酶。
- 5.2.14 DHPLC 缓冲液:配方见 A.6。

6 生物安全要求

采样、样品处理及检测过程所涉及的实验操作,应遵守 GB 19489 的有关规定。

7 样品采集与前处理

7.1 培养物

直接取液体培养基培养的菌液;对于在固体培养基上生长的菌落,用接种棒挑取适量(取用量达到肉眼可见,菌团大小不超过接种环)菌样,放到 1 mL 0.01 mol/L pH7.6 PBS 中,振荡混匀形成悬浮菌液。

取 1 mL 菌液样品,15 000×g 离心 10 min,弃上清,加 1 mL 0.01 mol/L pH 7.6 PBS,充分振荡混匀,15 000×g 离心 10 min;弃上清,收集沉淀物,按 8.1 进行核酸提取,或置-20℃贮存备用。

7.2 全血、血清

用无菌注射器或真空采血管,无菌自动静脉采血。将血液直接滴入抗凝剂中,并立即连续摇动,充分混合。抗凝剂采用柠檬酸钠缓冲液,或 0.5 mol/L EDTA。每 6 mL 血液加 1 mL 抗凝剂。条件允许时,建议优先采集全血,以更有利于富集菌体。

取 1 mL~2 mL 全血样品,15 000×g 离心 10 min,弃上清;加等体积灭菌双蒸水充分振荡,15 000×g 离心 10 min;弃上清,若红细胞裂解不完全,需采用灭菌双蒸水重复洗涤;收集沉淀物,按 8.1 进行核酸提取,或置-20℃贮存备用。

血清样品处理方法同 7.1。

7.3 痰液

动物痰液采集:动物咯痰极少,宜在清晨采集,用橡胶管自口腔伸入至气管内,外接注射器吸取痰液。亦可取咳出的痰块。

在痰液样品中加入 2~4 倍体积 4% 氢氧化钠溶液,振荡混匀,室温放置 30 min,间或振荡混匀,使其充分液化(无明显固状物并且吸出时无拖丝现象即为液化完全;若液化不完全,可适当再加入少量 4% 氢氧化钠溶液直至液化完全);15 000×g 离心 10 min;弃上清,加 1 mL 0.01 mol/L pH 7.6 PBS,充分振荡混匀,15 000×g 离心 10 min,弃上清,重复本步骤 1 次;收集沉淀物,按 8.1 进行核酸提取,或置-20℃贮存备用。

7.4 组织器官

采集动物下颌、咽后、支气管、肺(特别是肺门及肺门淋巴结)、纵隔和肠系膜淋巴结,以及病变组织器官如肝、脾、肺等。

取适量组织样品(剔除脂肪、被膜),剪碎,按 1:5 的比例加入柠檬酸钠-磷酸缓冲液(例,1 g 组织样品,加入 5 mL 缓冲液),充分研磨;加等量 4% 氢氧化钠溶液,继续研磨 5 min~10 min,使组织液化;移入离心管,充分振荡,75℃水浴 0.5 h~1 h;取上清(避免吸取粗渣),15 000×g 离心 10 min;弃上清,加等量 0.01 mol/L pH 7.6 PBS,振荡混匀,使沉淀充分悬浮,15 000×g 离心 10 min,弃上清,重复本步

骤 1 次;收集沉淀物,按 8.1 进行核酸提取,或置-20℃贮存备用。

注:可采用其他经验证有效的样品处理方法。

8 操作方法

8.1 核酸提取

在上述已完成前处理的样品(沉淀物)中加入 50 μL~100 μL DNA 提取液,充分振荡混匀,56℃水浴 30 min,98℃~100℃加热 10 min,瞬时离心使液滴聚集管底,加等体积三氯甲烷,振荡混匀,12 000×g 离心 5 min,取上清,直接用于 PCR 或贮存于-80℃备用。

注:可采用经验证的商品化核酸提取试剂盒或其他经验证有效的核酸提取纯化方法。

8.2 mPCR 扩增

采用 50 μL 反应体系,反应液中含 dNTPs 0.2 mmol/L,IS6110、IS1081、MTss127、MBss229 上下游引物每条各 0.2 μmmol/L,Mg²⁺ 1.0 mmol/L,1 unit Taq 酶,模版 DNA 5 μL。扩增循环条件为:94℃预变性 2 min;94℃变性 15 s,62℃退火 15 s,68℃延伸 15 s,进行 40 个循环;72℃延伸 1 min。

8.3 DHPLC 分析

将装有 PCR 产物的反应管放置在 DHPLC 金属板的微孔中。登录 DHPLC 分析系统,在非变性分析条件下,采用双链 DNA 多片段(double-stranded multiple fragment)分析模式,设定方法分析 100 bp~430 bp 片段;清洗模式采用 active;清洗持续时间 0.5 min,平衡持续时间 0.9 min;流速 0.9 mL/min。温度设定 50℃;样品进样量设为 5 μL~10 μL,同一组分析采用同样的进样量。分析速度为每 100 bp 需 2.5 min,每个样品约 13.4 min。分析过程流动相梯度参数由 Navigator software 分析软件控制设定,具体参数见表 2。

8.4 质控对照设置

检测过程中应分别设阳性对照和阴性对照。阳性对照为结核分枝杆菌、牛分枝杆菌菌株 DNA 或扩增片段的阳性克隆质粒 DNA,阴性对照为非目标致病菌 DNA 或双蒸水。

表 2 DHPLC 流动相参数

梯度名称	时间/min	A 液百分率	B 液百分率
进样	0	55.0	45.0
100 bp	0.5	50.2	49.8
183 bp	2.6	43.7	56.3
266 bp	4.7	40.3	59.7
349 bp	6.7	38.3	61.7
432 bp	8.8	36.8	63.2
清洗开始	8.9	0.0	0.0
清洗结束	9.4	0.0	0.0
平衡开始	9.5	55.0	45.0
平衡结束	10.4	55.0	45.0

9 结果及判定

9.1 质控标准(参考附录 B)

9.1.1 阴性对照:无特异吸收峰出现。

9.1.2 阳性对照:结核分枝杆菌菌株 DNA 可扩增出结核分枝杆菌复合群 IS6110 目标基因 165 bp 片段、IS1081 目标基因 380 bp 片段及结核分枝杆菌 MTss127 目标基因 213 bp 片段的产物;牛分枝杆菌菌株 DNA 可扩增出结核分枝杆菌复合群 IS6110 目标基因 165 bp 片段、IS1081 目标基因 380 bp 片段及牛分枝杆菌 MBss229 目标基因 241 bp 片段的产物。DHPLC 分析出现相应片段大小的 PCR 产物吸收峰,且峰吸收值大于 2 mV。

9.1.3 不符合上述对照质控标准的视为无效。

9.2 检测结果判定

9.2.1 阴性:检测样品无典型 PCR 产物阳性吸收峰出现,可判定为结核分枝杆菌复合群、结核分枝杆菌、牛分枝杆菌阴性。

9.2.2 结核分枝杆菌复合群阳性:检测样品出现 165 bp 和/或 380 bp 典型的 PCR 产物阳性吸收峰,且吸收峰值大于 2 mV 时,可判定该样品结果为结核分枝杆菌复合群阳性。

9.2.3 结核分枝杆菌阳性:检测样品出现 213 bp 典型的 PCR 产物阳性吸收峰,且吸收峰值大于 2 mV 时,可判定该样品结果为结核分枝杆菌阳性。结核分枝杆菌阳性同时还应出现 165 bp 和/或 380 bp 产物吸收峰,但也可能由于样品模板浓度或具体反应效果等原因不出现,这些情况不影响判定。

9.2.4 牛分枝杆菌阳性:检测样品出现 241 bp 典型的 PCR 产物阳性吸收峰,且吸收峰值大于 2 mV 时,可判定该样品结果为牛分枝杆菌阳性。牛分枝杆菌阳性同时还应出现 165 bp 和/或 380 bp 产物吸收峰,但也可能由于样品模板浓度或具体反应效果等原因不出现,这些情况不影响判定。

9.2.5 可疑结果:检测样品出现典型的 PCR 产物阳性吸收峰,但吸收峰值小于 2 mV 时,建议对样品重做。重做结果峰吸收值仍小于 2 mV 则判为阴性,否则判为可疑,应重新采集样品进行检测。

附 录 A
(规范性附录)
试剂的配制

A.1 0.01 mol/L PBS (pH7.6)

先配制 A 液、B 液

A 液(0.2 mol/L NaH_2PO_4 溶液):称取一水合磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)27.6 g,或二水合磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)31.2 g,溶于蒸馏水中,定容至 1 L。

B 液(0.2 mol/L Na_2HPO_4 溶液):称取十二水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)71.6 g,或二水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)35.6 g,溶于蒸馏水中,定容至 1 L。

称取 17 g 氯化钠,用适量蒸馏水溶解,量取 13 mL A 液和 87 mL B 液,混合,用蒸馏水定容至 2 L。

A.2 柠檬酸钠缓冲液

柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 5.3 g

柠檬酸钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 15 g

葡萄糖($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 16.2 g

称取上述试剂,溶解于蒸馏水,定容至 1 L,混匀。采用 $(121 \pm 2)^\circ\text{C}/0.1\text{ MPa}$,15 min 高压灭菌后贮存于 4°C 。

A.3 0.5 mol/L EDTA (pH8.0)

称取 186.1 g EDTA,加入 800 mL 蒸馏水中,磁力搅拌器上剧烈搅拌,用氢氧化钠(NaOH)调 pH 至 8.0,定容至 1 L,分装,采用 $(121 \pm 2)^\circ\text{C}/0.1\text{ MPa}$,15 min 高压灭菌后贮存于 4°C 。

A.4 柠檬酸钠-磷酸缓冲液

先配制 pH6.8 磷酸缓冲液。

A 液(0.2 mol/L 磷酸二氢钠溶液):称取磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)15.61 g,加双蒸水溶解,定容至 500 mL。

B 液(0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液):称取磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)35.82 g,加双蒸水溶解,定容至 500 mL。

分别量取 51 mL A 液、49 mL B 液,混合即成 100 mL pH6.8 磷酸缓冲液。

称取 2.84 g 柠檬酸钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),加入 100 mL pH6.8 磷酸缓冲液中,充分溶解。采用 $(121 \pm 2)^\circ\text{C}/0.1\text{ MPa}$,15 min 高压灭菌后贮存于 4°C 。

A.5 4% 氢氧化钠溶液

称取 8 g 氢氧化钠,加入 200 mL 双蒸水,充分溶解。室温贮存。

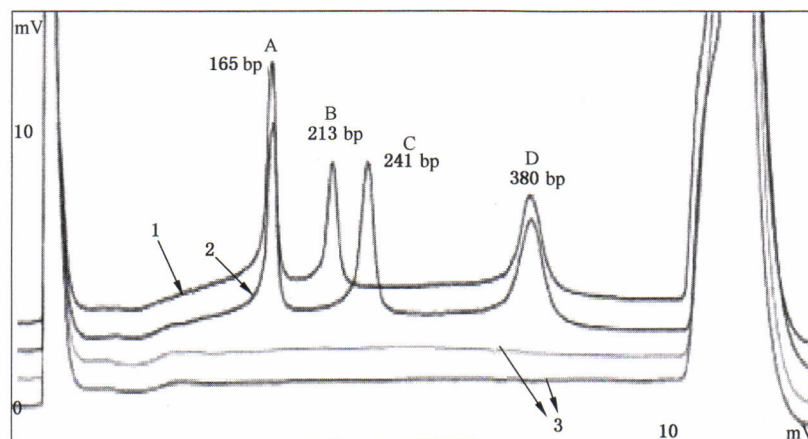
A.6 DHPLC 缓冲液

A 液:50 mL TEAA 和 250 μ L 乙腈混合,加双蒸水定容至 1 000 mL;B 液:50 mL TEAA 和 250 mL 乙腈混合,加双蒸水定容至 1 000 mL;D 液:750 mL 乙腈和 250 mL 双蒸水混合。

附录 B
(资料性附录)

动物结核病原菌 mPCR-DHPLC 检测图谱

动物结核病原菌 mPCR-DHPLC 检测图谱见图 B.1。



说明：

1——结核分枝杆菌阳性对照；

2——牛分枝杆菌阳性对照；

3——阴性对照；

峰 A——结核分枝杆菌复合群 IS6110 吸收峰；

峰 B——结核分枝杆菌 MTss127 吸收峰；

峰 C——牛分枝杆菌 MBss229 吸收峰；

峰 D——结核分枝杆菌复合群 IS1081 吸收峰。

图 B.1 动物结核病原菌 mPCR-DHPLC 检测图谱



SN/T 4799—2017

书号:155066 • 2-33414

定价: 16.00 元