



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3741.2—2013

国境口岸鼠类携带病原体检测方法 第2部分:土拉弗朗西斯菌 PCR 检测方法

Detection for pathogens of rodents at frontier ports—
Part 2: Detection for *Francisella tularensis*

2013-11-06 发布

2014-06-01 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 3741《国境口岸鼠类携带病原体检测方法》共分为 2 部分：

——第 1 部分：致病性钩端螺旋体 PCR 检测方法；

——第 2 部分：土拉弗朗西斯菌 PCR 检测方法。

本部分为 SN/T 3741 的第 2 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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：中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国云南出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：孙肖红、刘丽娟、侯中生、刘键、罗忠鑫、杨学兵、胡克林、杨宇、胡孔新、王静。

国境口岸鼠类携带病原体检测方法

第2部分：土拉弗朗西斯菌 PCR 检测方法

1 范围

SN/T 3741 的本部分规定了国境口岸鼠类样本采集、处理方法、土拉弗朗西斯菌 PCR 检测的方法和结果判定。

本部分适用于国境口岸鼠类携带病原体检测。

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

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

鼠类 rodent

与鼠传疾病有关的鼠形动物（包括啮齿目、兔形目和食虫目动物）。

3.2

土拉弗朗西斯菌 *Francisella tularensis*

属于弗朗西斯菌属（*Francisella*），是引起的土拉弗朗西斯菌病（*Tularemia*）的病原体。土拉弗朗西斯菌病是一种人兽共患急性传染病，在多种野生动物中流行，人和动物通过接触染疫的动物或感染的水、气溶胶以及吸血昆虫（蜱、蚊、虻）叮咬而感染和传播。野兔是土拉弗朗西斯菌病的主要宿主，人类常因捕猎或接触野兔而受到感染，所以本病又被称为“野兔热”。由于微量土拉弗朗西斯菌即可引起感染，故可以作为生物武器使用，因此备受重视。

4 要求

鼠类携带病原体检测应在生物安全 2 级以上实验室（BSL-2）内进行。实验室应遵循 GB 19489 对生物安全 2 级及以上实验室的生物安全要求。

5 实验仪器设备

主要仪器如下：

- 高速台式冷冻离心机；
- 组织研磨仪；
- 生物安全柜；

- 电泳仪;
- 凝胶成像系统;
- PCR 仪;
- 微量加样器(10 μL 、20 μL 、100 μL 、200 μL 、1 000 μL);
- 冰箱(2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 和-20 $^{\circ}\text{C}$ ~-80 $^{\circ}\text{C}$)。

6 主要试剂

- 6.1 核酸提取试剂:组织 DNA 提取试剂使用天根公司 TIANamp Genomic DNA kit¹⁾。
- 6.2 PCR 试剂:dNTP、10 \times PCR 缓冲液、*Taq* 酶使用 TAKARA 公司产品¹⁾。
- 6.3 引物:上游引物 Fop1 序列(5'-3'); AGGTTCAGCTACAGCATCTATCGC,下游引物 Fop5 序列(5'-3');TACCCCTCTGCCATTAGCACC,扩增产物为 550 bp。
- 6.4 氧化锆颗粒(直径 3 mm)。
- 6.5 RPM 1640 培养液。

7 PCR 检测

7.1 样本 DNA 的提取

按照附录 A 进行。

7.2 反应体系的配制

在 200 μL 的 PCR 反应管中,依次加入下列试剂:灭菌双蒸水 14.35 μL 、10 \times PCR 缓冲液 2 μL 、dNTP(2.5 mmol/L)0.5 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ 上游引物 0.5 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ 下游引物 0.5 μL 、(5 U/ μL)*Taq* 酶 0.15 μL 、模板 DNA 2 μL ,总体积为 20 μL 。设立阴性对照、阳性对照和空白对照。将配制完成的反应体系瞬时离心,放入 PCR 仪。

7.3 反应条件

PCR 反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 预变性,94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,35 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

7.4 结果判定

取 5 μL PCR 产物进行 2%琼脂糖电泳,依下列标准判断:

在阴性对照、空白对照未出现条带,阳性对照出现 550 bp 的扩增条带条件下,如待测样品未出现相应大小的扩增条带,则可报告该样品未检出土拉弗朗西斯菌基因片段;如待测样品出现 550 bp 扩增条带则可判定该样品检出土拉弗朗西斯菌基因片段。

如果阴性对照、空白对照出现条带和(或)阳性对照未出现预期大小的扩增条带,本次待测样品的结果无效,应重新检测,并排除污染因素。

1) 由指定单位提供,给出这一信息是为了本标准的使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同效果,则可使用这些等效产品。

附 录 A
(规范性附录)
鼠类脏器标本采集、处理方法

A.1 鼠类标本采集

A.1.1 取材范围

在口岸地区本底调查或监测范围内捕获的鼠类或在该范围内收集的自毙鼠类。

A.1.2 取材方法

A.1.2.1 将获得全部应检鼠类分类、编号登记,单只装入鼠袋内,活鼠麻醉或处死后,分拣体表寄生虫,并分类鉴定,然后解剖采样。

A.1.2.2 自毙、染病萎靡鼠类,按照常规方法解剖后,取肝脏、脾脏,装入 2 mL 细胞冻存管中,尽快送检或低温保存。

A.2 检测用鼠脏器的处理方法

A.2.1 土拉弗朗西斯菌检测的样品处理

A.2.1.1 组织样品的研磨

分别取 10 mg 脾脏、30 mg 肝脏,用生理盐水洗一次,置 2 mL 的圆底离心管中,加入 3 颗直径 3 mm 的氧化锆颗粒,再加入 0.5 mL 的 RPM 1640 培养液,用组织研磨仪 4 000 次/min 振荡 60 s,直至无肉眼可见的组织块,即为组织匀浆液。

A.2.1.2 组织 DNA 提取方法一

使用天根生物公司血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)²⁾。

A.2.1.2.1 将组织匀浆液 4 ℃ 10 000g 离心 1 min,弃尽上清液。

A.2.1.2.2 加 200 μL GA 缓冲液,充分振荡 15 s,室温放置 10 min。

A.2.1.2.3 加入 40 μL RNaseA(10 mg/mL),振荡 15 s,室温放置 5 min。

A.2.1.2.4 加 20 μL Protease K,颠倒混匀,56 ℃ 水浴 3 h。

A.2.1.2.5 加 200 μL GB 缓冲液,颠倒混匀,70 ℃ 水浴 10 min。

A.2.1.2.6 加 200 μL 无水乙醇,充分振荡 15 s,将全部液移入柱子中,12 000g,短暂离心 30 s。

A.2.1.2.7 弃废液,加 500 μL GD 缓冲液,12 000g 离心 30 s。

A.2.1.2.8 弃废液,加 700 μL PW 缓冲液,12 000g 离心 30 s。

A.2.1.2.9 弃废液,加 500 μL PW 缓冲液,12 000g 离心 30 s。

A.2.1.2.10 弃废液,12 000g 离心 2 min。

A.2.1.2.11 将离心柱放入新套管中,室温放置 5 min。

A.2.1.2.12 向吸附膜的中间部位悬空滴加 50 μL 洗脱缓冲液,室温放置 2 min。

2) 由指定单位提供,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,则可使用这些等效产品。

SN/T 3741.2—2013

A.2.1.2.13 12 000g 离心 2 min。收集液即为 DNA。

A.2.1.3 组织 DNA 提取方法二

使用 Qiagen 公司的 DNeasy Blood & Tissue Kit³⁾。

A.2.1.3.1 将质量不超过 25 mg 的组织剪成碎块,置于 1.5 mL 离心管中,加 180 μ L ATL。

A.2.1.3.2 加 20 μ L 蛋白酶 K,旋涡振荡混匀,56 $^{\circ}$ C 孵育(孵育过程中不时振荡以分散样品)至组织完全裂解。

A.2.1.3.3 旋涡振荡 15 s。加 200 μ L 缓冲液 AL,旋涡振荡混匀,加 200 μ L 乙醇(96%~100%),旋涡振荡混匀。

A.2.1.3.4 将得到的混合物转移至 DNeasy Mini spin column(置于 2 mL collection tube 中),6 000g 离心 1 min,弃掉滤液和 collection tube。

A.2.1.3.5 将 DNeasy Mini spin column 置于另一新 collection tube 中,加 500 μ L 缓冲液 AW1,6 000g 离心 1 min,弃掉滤液和 collection tube。

A.2.1.3.6 将 DNeasy Mini spin column 置于另一新 collection tube 中,加 500 μ L 缓冲液 AW2,20 000g 离心 3 min,弃掉滤液和 collection tube。

A.2.1.3.7 将 DNeasy Mini spin column 置于另一干净的 1.5 mL 或 2 mL 离心管,取 200 μ L 缓冲液 AE 直接加到 DNeasy membrane 中,室温下孵育 1 min,6 000g 离心 1 min 以洗脱 DNA。

3) 由指定单位提供,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,则可使用这些等效产品。
