

# SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3567.2—2015

---

## 交叉引物恒温扩增检测方法 第2部分：霍乱弧菌

Detection method of crossing priming isothermal amplification—  
Part 2: *Vibrio cholerae*

2015-12-04 发布

2016-07-01 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

SN/T 3567《交叉引物恒温扩增检测方法》分为以下几个部分：

- 第 1 部分：通用技术规程；
- 第 2 部分：霍乱弧菌；
- 第 3 部分：大肠杆菌 O157:H7；
- 第 4 部分：黄热病毒；
- 第 5 部分：沙门菌属；
- 第 6 部分：结核分枝杆菌；

.....

本部分为 SN/T 3567 的第 2 部分。

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：中华人民共和国天津出入境检验检疫局、中华人民共和国广东出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：祁军、李燕、王树祥、王馨、胡林。

## 交叉引物恒温扩增检测方法 第2部分：霍乱弧菌

### 1 范围

SN/T 3567 的本部分规定了在国境口岸利用交叉引物恒温扩增法检测霍乱弧菌的生物安全措施、检测对象、试剂和材料、仪器设备及检测程序。

本部分适用于在国境口岸对 O1 群霍乱弧菌菌株和 O139 群霍乱弧菌菌株的筛选检测。

### 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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

SN/T 1022 进出口食品中霍乱弧菌检验方法

SN/T 1239 国境口岸霍乱检验规程

SN/T 3567.1 交叉引物恒温扩增检测方法 第1部分：通用技术规程

WS 289 霍乱诊断标准

人间传染的病原微生物名录(2006)

### 3 术语、定义和缩略语

#### 3.1 术语和定义

SN/T 3567.1 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

##### 3.1.1

**霍乱弧菌** *Vibrio cholerae*: VC

引起霍乱的病原体。其主要致病血清群为 O1 群及 O139 群。霍乱是一种烈性肠道传染病，其发病急、传染性强、病死率高，属于检疫传染病。

#### 3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

dTTP 脱氧胸苷三磷酸(deoxythymidine triphosphate)

dCTP 脱氧胞苷三磷酸(deoxycytidine triphosphate)

dGTP 脱氧鸟苷三磷酸(deoxyguanosine triphosphate)

PBS 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline)

### 4 生物安全措施

实验操作及处理按照 GB 19489 和《人间传染的病原微生物名录》(2006)的规定，由具备相关资格

的工作人员进行。

## 5 检测对象

5.1 疑似霍乱弧菌的待检菌株。

5.2 霍乱感染病例或疑似霍乱感染者的排泄物、呕吐物及其增菌液。

## 6 试剂和材料

除另有规定外,所使用的试剂为分析纯或生化试剂,包括:

——按照 GB/T 6682 规定的一级水。

——DNA 提取液:5% Chelex 水溶液。

——10 × ThermoPol 缓冲液。

——10 mmol/L dNTPs 溶液: dATP, dTTP, dCTP, dGTP 各 2.5 mol/L。

——Bst DNA 聚合酶: 8 U/ $\mu$ L。

——甜菜碱溶液:5 mol/L。

——硫酸镁溶液:1 mol/L。

——引物:交叉扩增引物、剥离引物和检测引物。

## 7 仪器设备

所用仪器设备如下:

——任何恒温装置,如:水浴锅、金属浴或普通 PCR 仪。

——微量移液器:量程范围为 0.5  $\mu$ L~10  $\mu$ L、10  $\mu$ L~100  $\mu$ L、100  $\mu$ L~1 000  $\mu$ L。

——计时器。

——超净工作台。

——生物安全柜。

——消毒灭菌锅。

——高速台式离心机(最高离心力 12 000g 以上)。

——台式离心机(最高离心力 2 000g 以上)。

——涡旋振荡器。

——低温冰箱、冷冻冷藏冰箱。

## 8 检测程序

### 8.1 样本标识

样本应进行唯一性标识。

### 8.2 样本采集、细菌增菌及分离鉴定

按照 WS 289、SN/T 1239 和 SN/T 1022 执行。

### 8.3 样本前处理

#### 8.3.1 疑似霍乱弧菌的待检菌株

##### 8.3.1.1 培养基上纯培养物

用无菌接种环挑取 1/4~1 个菌落,混悬于 100  $\mu\text{L}$  灭菌或无菌双蒸水或纯水中。

##### 8.3.1.2 LB 或碱性蛋白胨水的处理纯培养物

取纯培养的 1 mL 加到 1.5 mL 离心管中,以 14 000g 离心 2 min 集菌,弃去上清液,用 1 mL 生理盐水或 pH7.4 PBS 洗涤沉淀物,悬浮,4 000g 离心 5 min,弃去上清液。

#### 8.3.2 粪便和呕吐物

直接从粪便和呕吐物样本中提取模板时,可取水样粪便或呕吐物约 200  $\mu\text{L}$  或 200 mg,加入 1 mL pH7.4 PBS 混匀,300g 离心 5 min,收集上清液于 1.5 mL 离心管中,6 000g 离心 5 min,弃去上清液,保留沉淀。

### 8.4 模板 DNA 提取

#### 8.4.1 加热煮沸法提取

取 40  $\mu\text{L}$  经前处理的样本,向其中加入 DNA 提取液 40  $\mu\text{L}$ ,振荡混匀。混匀后,将其于 95  $^{\circ}\text{C}$ ~100  $^{\circ}\text{C}$  煮沸 10 min,室温冷却,14 000g 离心 5 min,上清液即可作为扩增模板。上清液转移至 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。

#### 8.4.2 试剂盒提取

按适用于细菌基因组提取的试剂盒说明书操作。

### 8.5 交叉引物恒温扩增

#### 8.5.1 扩增引物

用于检测霍乱弧菌的交叉引物恒温扩增引物序列参见附录 A。

#### 8.5.2 阳性对照和空白对照设置

实验过程中需要分别设阳性对照和空白对照,阳性对照采用含检测序列的质粒 DNA 作为交叉引物恒温扩增模板,空白对照则采用无菌水作为交叉引物恒温扩增模板。

#### 8.5.3 扩增反应体系

使用封闭式一次性核酸检测装置(含核酸检测试纸条)检测 CPA 扩增产物时,交叉引物恒温扩增参考反应体系见表 1。

表 1 霍乱弧菌交叉引物恒温扩增检测体系

试剂名称	储备液浓度	20 $\mu\text{L}$ 体系加样量
10 $\times$ ThermoPol 缓冲液	—	2 $\mu\text{L}$
10 mmol/L dNTPs	10 mmol/L	0.8 $\mu\text{L}$
剥离引物 F 和 R	20 $\mu\text{mol/L}$	各 0.1 $\mu\text{L}$
交叉扩增引物 F 和 R	20 $\mu\text{mol/L}$	各 0.2 $\mu\text{L}$
检测引物 F 和 R	20 $\mu\text{mol/L}$	各 0.2 $\mu\text{L}$
MgSO <sub>4</sub>	100 mmol/L	0.6 $\mu\text{L}$
甜菜碱	5 mol/L	2 $\mu\text{L}$
Bst DNA 聚合酶	8 U/ $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
模板	50 ng/ $\mu\text{L}$	4 $\mu\text{L}$
ddH <sub>2</sub> O	—	补足反应体系至 20 $\mu\text{L}$

#### 8.5.4 扩增反应程序

将配制好的扩增反应液 PCR 管置于恒温仪器上,63  $^{\circ}\text{C}$  温浴 60 min。

#### 8.5.5 扩增产物检测

具体检测步骤按照 SN/T 3567.1 执行。

#### 8.5.6 结果判定

8.5.6.1 根据封闭式一次性核酸检测装置(含核酸测试纸条)的显色,直接读取检测结果。

8.5.6.2 仅在质控区 C 出现一条红线,判断为检测结果阴性;出现两条红线,一条检测线,一条质控线,且将检测线强度与色卡进行对照,如强度小于 L4 判断为检测结果阴性,表示样品中无霍乱弧菌 O1 群及 O139 群核酸或核酸拷贝数低于试剂盒最低检测限。

8.5.6.3 出现两条红线,一条检测线,一条质控线,将检测线强度与色卡进行对照,如强度中大于或等于 L4,判断为检测结果阳性,表示样品中含有霍乱弧菌 O1 群及 O139 群核酸。

附 录 A

(资料性附录)

霍乱弧菌交叉引物恒温扩增法检测的引物序列

A.1 剥离引物

VCCF3 5-GCAAATGATGATAAGTTATATCG

VCCB3 5-GACCAGACAATATAGTTTGACC

A.2 交叉引物

VCCPF 5-TCTGTCCTCTTGGCATAAGACGGCAGATTCTAGACCTCCTG

VCCPR 5-GAGTTCCTCTTGCATGATC

A.3 检测引物

VCDR5F 5-FITC-TATTCATTTGAGTACCTCGG

VCDR5B 5-BIOTIN-CACCTGACTGCTTTATTTC

---