

细菌耐药基因 bla_{NDM} 常见亚型的环介导等温 扩增检测技术

Loop-mediated isothermal amplification detection technique for common subtypes of
bacterial resistance gene bla_{NDM}

地方标准信息服务平台

2020 - 06 - 08 发布

2020 - 07 - 08 实施

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由山东省畜牧兽医局提出并组织实施。

本标准由山东省畜牧业标准化技术委员会归口。

本标准主要起草单位：山东省农业科学院畜牧兽医研究所、山东润达检测技术有限公司。

本标准主要起草人：齐静、刘玉庆、杜以军、李璐璐、胡明、骆延波、张庆、张印、赵效南、任金瑞、刘军伟、王怀中、陶海英。

地方标准信息服务平台

细菌耐药基因 *bla*_{NDM} 常见亚型的环介导等温扩增检测技术

1 范围

本标准规定了细菌耐药基因 *bla*_{NDM} 常见亚型 (*bla*_{NDM-1}、*bla*_{NDM-4}、*bla*_{NDM-5} 和 *bla*_{NDM-9}) 的环介导等温扩增 LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 检测技术的操作步骤。

本标准适用于实验室及临床样本的细菌耐药基因 *bla*_{NDM} 常见亚型 (*bla*_{NDM-1}、*bla*_{NDM-4}、*bla*_{NDM-5} 和 *bla*_{NDM-9}) 的快速可视化检测, 其他几个亚型的检测可以参考使用。

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, 仅所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/T 16489 水质 硫化物的测定 亚甲基蓝分光光度法

3 试验原理

本标准所应用的试验原理为: 根据序列保守区域设计一对外引物、一对内引物和一对环引物特异性识别靶序列上六个独立区域, 在 *Bst* DNA 聚合酶的作用下引起自循环链置换反应, 大量合成目标 DNA 的同时伴随有副产物焦磷酸镁白色沉淀产生, 可以实现恒温扩增和快速检测, 结果通过肉眼即可判定。

4 试剂或材料

除非特别规定所用试剂均用分析纯水: 符合国标 GB/T 6682 一级水的规定。

- 4.1 *Bst* DNA 聚合酶。
- 4.2 0.5×TBE 缓冲液: 配制见附录 A. 2。
- 4.3 2 % 琼脂糖电泳液: 配制见附录 A. 3。
- 4.4 无毒核酸染料。
- 4.5 DNA Marker 2000。
- 4.6 商品化的细菌基因组 DNA 提取试剂盒。
- 4.7 引物: *bla*_{NDM} 基因几个国内常见亚型的 LAMP 检测引物如下:
 - 外引物 F3: 5' -GGCCACACCAGTGACAAT-3' ;
 - 外引物 B3: 5' -GCGGAATGGTCATCAGCAT-3' ;
 - 内引物 FIP: 5' -ACTTGGCCTTGCTGTCCTTGATGTTGGGATCGACGGCAC-3' ;
 - 内引物 BIP: 5' -CGCTCGGCAATCTCGGTGATGCTGGCCTTGGGGAACGC-3' ;
 - 环引物 LF: 5' -GCTGTAGCGAAAACACCG-3' ;
 - 环引物 LB: 5' -ACACTGAGCACTACGCCG-3' 。

5 仪器设备

- 5.1 微量移液器：10 μL、20 μL、100 μL、1 000 μL。
- 5.2 低温高速离心机：离心力 20 000 g。
- 5.3 电热恒温水浴锅。
- 5.4 稳流稳压电泳仪。
- 5.5 水平电泳槽。
- 5.6 凝胶成像系统。
- 5.7 电子分析天平：精度 0.001 g。

6 试验步骤

6.1 样品

在生物安全柜中，将采集的样品（如人或动物的肛拭子、鼻拭子或肝脏、脾脏、脑等不同脏器组织等）无菌划线特异性筛选培养基或哥伦比亚血琼脂培养基，置37℃培养箱过夜培养12 h~18 h，获得细菌单菌落，经二次纯化后，挑取单菌落于BHI营养肉汤中过夜培养12 h~18 h，用于提取细菌基因组DNA。

6.2 DNA 的提取

收集过夜培养的待检细菌菌液1 mL（菌液浓度的OD₆₀₀值大于1.0）到1.5 mL的EP管中，12 000 g离心2 min，彻底弃上清，取沉淀用商品化的细菌基因组DNA提取试剂盒提取细菌基因组总DNA，最后溶于50 μL灭菌水中，测定DNA的浓度，-20℃保存备用。

6.3 反应体系

反应体系见表1。

表1 环介导等温扩增 LAMP 反应体系

1	2×等温缓冲液(RM)	12.5 μL
2	外引物 B3/F3(100 μM)	0.1 μL×2
3	内引物 BIP/FIP(100 μM)	0.4 μL×2
4	环引物 LF/LB (100 μM)	0.2 μL×2
5	<i>Bst</i> DNA 聚合酶	1.0 μL
6	细菌基因组 DNA	2.0 μL
7	灭菌水	8.1 μL

其中：2×等温反应缓冲液RM[含有40 mM pH为8.8的Tris-HCl、20 mM KCl、16 mM MgSO₄、20 mM (NH₄)₂SO₄、0.2wt% Tween20、1.6 M甜菜碱、2.8 mM dNTP]。

6.4 扩增

检测*bla*_{NDM}基因的LAMP反应体系，包括若干个装有反应液的LAMP反应管（25 μL/管），在每个LAMP反应管内设置LAMP反应体系，详见表1。每次LAMP反应均应设置1管为阳性对照，加入1.0 μL含有细菌*bla*_{NDM-1}基因的洛菲不动杆菌基因组DNA（300 ng/μL）；设置1管为阴性对照，加入1.0 μL的灭菌水取代细菌基因组DNA。

将上述LAMP反应管轻轻混匀后，置恒温水浴锅中进行扩增，如果选择荧光目视检测，可以选择在表1步骤5之后每个LAMP反应管中添加1.0 μL钙黄绿素，相应地整个25 μL体系中减少1.0 μL灭菌水，再加入相应地细菌基因组DNA，轻轻混匀后，置恒温水浴锅中进行扩增，具体参数见表2。

表2 LAMP 反应程序设定

步骤	温度	时间	功能
1	65 ℃	40 min	恒温扩增
2	80 ℃	5 min	灭活酶处理

试验过程注意事项：

LAMP反应产物极易产生气溶胶污染，是LAMP研究中首要避免的因素之一。控制气溶胶污染的解决方法为：1、对核酸提取和扩增进行严格分区，2、反应全程禁止开启反应管。3、配置LAMP反应体系尽量在冰上进行，操作Bst DNA聚合酶时不能用涡旋振荡器过激搅拌，避免酶的失活，应该使用轻轻弹击反应管或颠倒混匀的方式进行，操作过程尽量避免产生气泡。

7 结果分析和判定

7.1 感官结果分析和判定

7.1.1 反应结束后，观察反应管内液体的颜色和状态，如果底部出现与阳性对照一样的白色沉淀为阳性结果（参见附录B：图1A泳道1所示），如果不出现白色沉淀为阴性结果（参见附录B：图1A泳道2）。

7.1.2 如果在扩增反应前，每个反应管中加入1.0 μL钙黄绿素，反应结束后扩增产物变为与阳性对照一样的绿色为阳性结果（参见附录B：图1A泳道3），橙色的为阴性结果（参见附录B：图1A泳道4）。

7.2 电泳结果分析和判定

7.2.1 2 %琼脂糖凝胶板的制备（参见附录A.3）

称取2.0 g琼脂糖，加入100 mL 0.5×TBE缓冲液（参见附录A.2）中，加热融化，温度降低至55 ℃后加入1 %的无毒核酸染料，倒入电泳槽中冷却待用。

7.2.2 加样

将LAMP扩增产物5 μL与1 μL 6×Loading Buffer混合，点样于2 %琼脂糖凝胶孔中，以DNA Marker 2000作相对分子质量指示。每次电泳至少加1孔阳性和1孔阴性的扩增产物作对照。

7.2.3 电泳及结果判定

保持稳定电压80 V，电泳20 min，电泳反应结束后，在阳性和阴性对照成立的情况下，出现瀑布样条带的泳道判为阳性，说明待测样品中含有超级细菌*bla_{NDM}*基因（参见附录B：图1B泳道1和3），不出现瀑布样条带的为阴性（参见附录B：图1B泳道2和4）。

附 录 A
(规范性附录)
试剂的配制

A.1 10×TBE缓冲液

三羟甲基氨基甲烷 (Tris)	108 g
乙二胺四乙酸 (Na ₂ EDTA·2H ₂ O)	7.44 g
硼酸 (Boric acid)	55 g
灭菌水	1 L
pH调至8.3	

A.2 0.5×TBE缓冲液

取10×TBE缓冲液25 mL，加灭菌水475 mL，制成0.5×TBE的工作液。

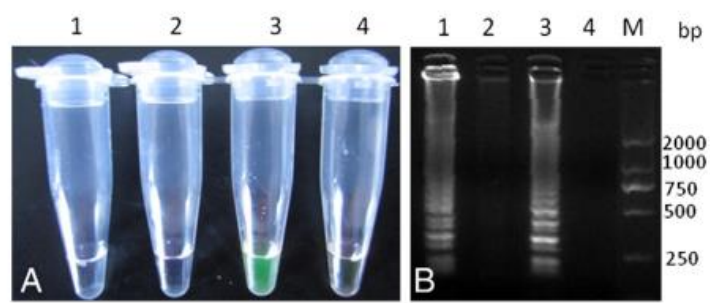
A.3 2 %琼脂糖电泳液

琼脂糖	2.0 g
0.5×TBE缓冲液	100 mL

地方标准信息服务平台

附 录 B
(资料性附录)

LAMP 反应管阳性和阴性扩增产物可视化和电泳结果



说明:

A——泳道1代表扩增产物中出现底部的白色沉淀，阳性；泳道2代表扩增产物中无白色沉淀，阴性；泳道3代表扩增产物中液体呈绿色，阳性；泳道4代表扩增产物中液体呈橙色，阴性；

B——泳道1和3代表扩增产物呈瀑布样条带，阳性；泳道2和4代表扩增产物无特异性条带，阴性。

图B. 1 LAMP 反应管阳性和阴性扩增产物可视化和电泳结果

地方标准信息服务平台