

耐药基因及元件的实时荧光定量检测操作规程

1. 目的

通过实时荧光聚合酶链式反应（real-time PCR）检测样本 DNA 和菌株 DNA 中是否存在本课题监测网络涉及的耐药基因及元件。

2. 适用范围

本 SOP 适用于可能携带此类耐药基因及元件的菌株 DNA 或各种来源样本 DNA 的检测。本法使用引物探针为本实验室自行设计，供各课题组参考，也可使用文献引物探针或自行设计

3. 依据

扩增基因	引物名称	序列（5' -3' ）	扩增片段长度 (bp)	T _m (℃)
<i>bla_{NDM}</i>	<i>bla_{NDM}</i> -F	GCC CGC TCA AGG TAT TTT ACC	63	58
	<i>bla_{NDM}</i> -R	CGA TCC CAA CGG TGA TAT TGT		
	<i>bla_{NDM}</i> -P	FAM-CCG GCC ACA CCA GT-MGB		
<i>bla_{KPC}</i>	<i>bla_{KPC}</i> -F	AAC CAT TCG CTA AAC TCG AAC AG	138	59
	<i>bla_{KPC}</i> -R	AAT GAG CTG CAC AGT GGG AAG		
	<i>bla_{KPC}</i> -P	FAM-ACT TTG GCG GCT CC-MGB		
<i>mcr-1</i>	<i>mcr-1</i> -F	TCG GCT TTG TGC TGA CGA T	102	58
	<i>mcr-1</i> -R	AAA TCA ACA CAG GCT TTA GCA CAT A		
	<i>mcr-1</i> -P	FAM-CTG TCG TGC TCT TTG-MGB		
<i>armA</i>	<i>armA</i> -F	TCA AAA ACC TAT ACT TTA TCG TCG TCT T	162	56
	<i>armA</i> -R	TAT TTT AGA TTT TGG TTG TGG CTT CA		
	<i>armA</i> -P	FAM-AAC TTC CCA ATA ATG CTA C-MGB		
<i>int1</i>	<i>int1</i> -F	GGC AAC YTT GGG CAG CA	148	62
	<i>int1</i> -R	CTG AAG CCA GGG CAG ATC C		
	<i>int1</i> -P	HEX-TTC GGT CTC CAC GCA TCG		

		TCA GG-MGB		
ISCR1	ISCR1-F	TAA CCG AAG CAC CAT GTA ATT		
		GA		
	ISCR1-R	CCT CAG CCA TCG CAT CG	128	56
	ISCR1-P	FAM-TCG TCT TCG CCC TCT TCC		
		AGT GTC A-MGB		

4. 仪器

AppliedBiosystems™QuantStudio™6（AppliedBiosystems™QuantStudio™5、AppliedBiosystems™7500 等）、Bio-Rad（CFX96Touch）、ROCHE（LightCycler480 II、LightCycler96）、天隆科技（Gentier 96E、Gentier 48S）、博日科技（FQD-96C）等实时荧光定量 PCR 仪、小型 EP 管离心机、小型八连排管离心机、移液器。

5. 材料

试剂：Premix Ex Taq™(Probe qPCR)、去离子水、基因特异性引物探针、基因阳性对照品。

耗材：1.5ml EP 管、200 微升枪头、10 微升枪头、0.2 ml PCR 八连排管及配套盖子或 96 孔板及盖板膜。

6. 操作程序

6.1 试剂配制

6.1.1 基因特异性引物探针

用一定量的 TE 缓冲液将干粉状引物稀释成 100 μM 的贮存液，于-20℃长期保存。将引物贮存液于冰上融化，取一定量用灭菌去离子水稀释成 10 μM 的工作液，于 4℃备用或-20℃长期保存。

6.1.2 TE 缓冲液

用去离子水配制含有 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)和 1 mM EDTA (pH 8.0)的溶液,

高温高压灭菌。

6.2 检测流程

6.2.1 PCR 反应体系配制：

DNA Template 50-100 ng，基因特异性引物各 0.5 μ M，探针 0.25 μ M，Premix Ex Taq™(Probe qPCR，2 $\times$)各 10 μ l，用灭菌去离子水补至 20 μ l 并混匀。

6.2.2 反应程序：

反应条件采用两步法 qPCR 扩增：95℃3min（预变性时间取决于 Premix Ex Taq™，请参照说明书设定）；95℃ 5s，Tm℃ 20s，40 个循环（Tm℃代表不同目的基因 qPCR 法的 DNA 解链温度）。

6.3 检测结果的判定

6.3.1 对照品的质量控制

阳性对照品 Ct 值 $\leq$ 32，阴性对照 undet，否则结果无效。

6.3.2 结果解释

对照品质量控制无误，结果判断如下：

若检测通道 Ct/Cq 值 $\leq$ 38，且扩增曲线呈典型的 S 型，则目的基因检测阳性；

若检测通道 Ct/Cq 值 $>$ 38，或无数值，则目的基因检测阴性。

7. 清场

7.1处理废弃物品：将锐器盒、包装垃圾等放置指定地点，由专人运送到高压消毒间，进行高压消毒。

7.2工作区的消毒：用 75%的酒精或 10%次氯酸对工作台面和仪器进行消毒处理。

7.3关闭仪器设备并填写使用记录。

8. 记录

8.1 所有实验的原始记录存档。

8.2 原始记录应包括试剂来源、批号和有效期。

8.3 原始记录应有检测人和复核人签名。

9. 注意事项

9.1 进行 real-time PCR 检测,需严格遵循PCR四个分区操作,由于 real-time PCR 全自动产物分析的特点,三四区合并,试剂(体系)配置区、样品处理区、核酸扩增与产物分析区,各区不得混用,检验人员进入工作区后必须严格按照单一放向进行。

9.2 在操作过程中,应使用不含荧光物质的一次性手套、一次性移液器吸头(带滤芯)。

9.3 在试剂准备和标本处理时应使用超净工作台、生物安全柜或防污染罩,以防环境污染。

9.4 根据荧光见光分解的特质,试剂盒避光保存,建议实验过程中尽量避光。为避免影响荧光信号检测,管壁及管盖上禁止做任何标记。