

碳青霉烯酶基因分子检测操作规程

1. 目的

通过链式聚合酶反应（PCR）检测样本 DNA 中是否存在重要的碳青霉烯耐药基因：*bla*_{KPC}、*bla*_{NDM}、*bla*_{VIM}、*bla*_{IMP}、*bla*_{OXA-48}。

2. 范围

本 SOP 适用于可能携带碳青霉烯耐药基因的革兰氏阴性菌（肠杆菌科细菌、铜绿假单胞菌、不动杆菌等）DNA，或各种来源样本 DNA 的检测。

3. 依据

Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011, 70(1):119-123.

基因名称	上游引物 (5'→3')	下游引物 (5'→3')	片段长度 (bp)
<i>bla</i> _{KPC}	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	798
<i>bla</i> _{NDM}	GGTTTGGCGATCTGGTTTTC	CGGAATGGCTCATCACGATC	621
<i>bla</i> _{VIM}	GATGGTGTTTGGTCGCATA	CGAATGCGCAGCACCAG	390
<i>bla</i> _{IMP}	GGAATAGAGTGGCTTAAY ¹ TCT C	GGTTTAAY ¹ AAAACAACCACC	232
<i>bla</i> _{OXA-48}	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	CATCAAGTTCAACCCAACCG	438

1. Y = C or T

4. 仪器

SensoQuest GmbH 梯度 PCR 仪、GE 电泳仪、BioRad 凝胶成像分析系统、Eppendorf 移液器。

5. 材料

试剂：2×Taq DNA 聚合酶 mix、去离子水、基因特异性引物、核酸染料、DNA ladder、琼脂糖粉、TAE 缓冲液、TE 缓冲液。

耗材：水平电泳槽、琼脂糖凝胶板槽、枪头、量筒、锥形瓶或广口瓶、0.2 ml PCR 管及配套盖子。

6. 操作程序

6.1 试剂配制

6.1.1 基因特异性引物

用一定量的 TE 缓冲液将干粉状引物稀释成 $100\ \mu\text{M}$ 的贮存液，于 -20°C 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 $10\ \mu\text{M}$ 的工作液，于 4°C 备用或 -20°C 长期保存。

6.1.2 TAE 缓冲液

用去离子水配制含有 $40\ \text{mM}$ Tris - HCl ($\text{pH } 8.3$), $2\ \text{mM}$ 醋酸, $1\ \text{mM}$ EDTA 的溶液。

6.1.3 TE 缓冲液

用去离子水配制含有 $10\ \text{mM}$ Tris-HCl ($\text{pH } 8.0$) 和 $1\ \text{mM}$ EDTA ($\text{pH } 8.0$) 的溶液, 高温高压灭菌。

6.2 检测流程

6.2.1 PCR 反应体系:

DNA 模板 $50\text{-}100\ \text{ng}$, 基因特异性引物各 $0.2\ \mu\text{M}$, $2\times\text{Taq DNA 聚合酶 mix}$ $25\ \mu\text{l}$, 用灭菌去离子水补至 $50\ \mu\text{l}$ 并混匀。

6.2.2 反应程序:

94°C 预变性 $5\ \text{min}$; 之后经过 35 扩增循环, 每个循环为 94°C 变性 $30\ \text{s}$, 52°C (退火温度根据引物 T_m 值而定) 退火 $30\ \text{s}$, 72°C 延伸适当时间 (DNA 聚合酶的扩增效率是 $1\ \text{kb}/\text{min}$, 时间根据扩增片段长度而定); 最后 72°C 充分延伸 $10\ \text{min}$ 。

PCR 产物于 4°C 保存, 以备后续检测。

6.2.3 电泳:

称取 2 g 琼脂糖粉，量取 100 ml TAE 缓冲液至锥形瓶或广口瓶中，高温加热至完全溶解。待温度降至约 50℃，按比例加入核酸染料，充分混匀后将琼脂糖凝胶溶液注入板槽，插入齿梳，室温凝固。

取下齿梳，将琼脂糖凝胶脱离板槽，放入水平电泳槽，点样孔一侧位于电泳槽负极。向电泳槽中加入 TAE 缓冲液使液面高度于凝胶上部。

取 6 μ l PCR 产物（必要时请填加阳性对照和空白对照）和 3 μ l DNA ladder 分别加入琼脂糖凝胶电泳孔中，调整电压 100V，经 2%琼脂糖凝胶电泳约 1 小时。

6.2.4 PCR 扩增条带检测：

用凝胶成像分析系统对 PCR 扩增产物成像，保存图像。

6.3 检测结果判定

根据阳性对照和 DNA ladder 判断样本 DNA 中是否扩增出目的基因片段；根据空白对照推断扩增片段的特异性。

7. 清场

7.1 处理废弃物品：将锐器盒、不用的培养基平板放置指定地点，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%的酒精对工作台面进行消毒处理。

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。