

ICS 11.220

B

团 体 标 准

T/CVMA XXXXX—XXXX

# 病原核酸检测 纳米孔测序法

Detection Of Pathogenic Nucleic acid Nanopore sequencing Method

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中 国 兽 医 协 会 发 布

## 前 言

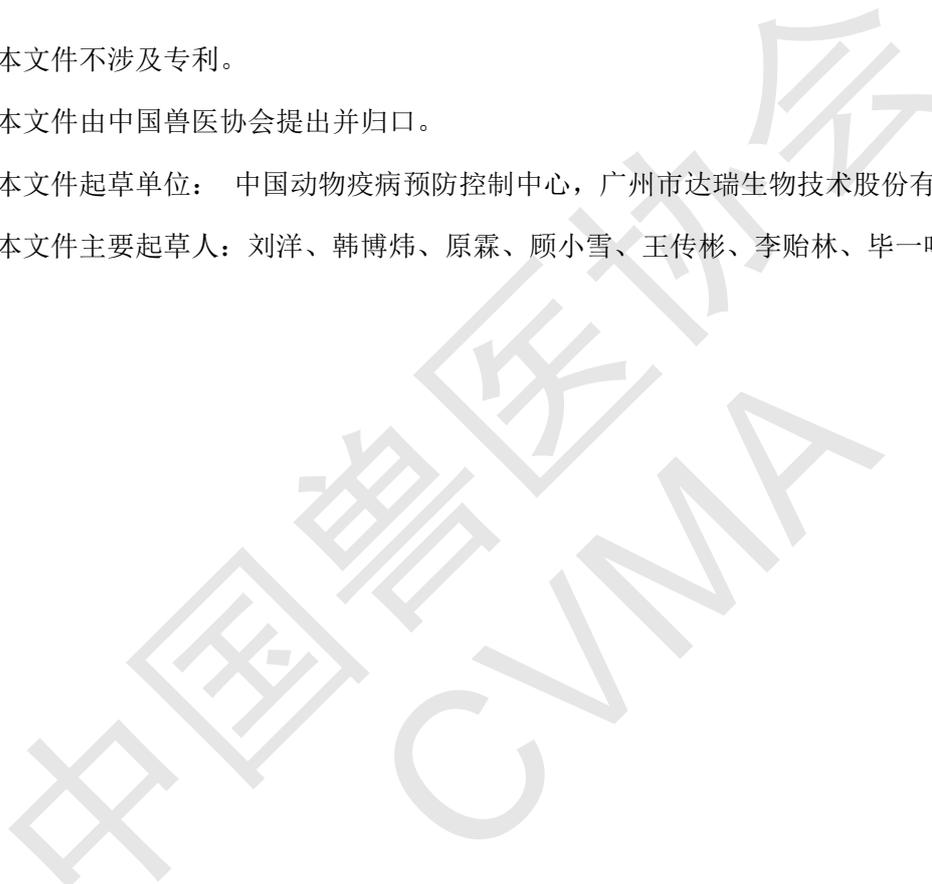
本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件不涉及专利。

本文件由中国兽医协会提出并归口。

本文件起草单位：中国动物疫病预防控制中心，广州市达瑞生物技术股份有限公司

本文件主要起草人：刘洋、韩博炜、原霖、顾小雪、王传彬、李贻林、毕一鸣、陈玲玲、王艺睿



# 病原核酸检测 纳米孔测序法

## 1 范围

本文件规定了基于纳米孔测序的病原核酸检测方法的试剂、仪器与耗材、操作步骤、结果分析和实验室生物安全要求等内容。

本文件适用于各级各类兽医实验室开展基于纳米孔测序的病原核酸检测。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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

GB/T20001.4-2015 标准编写规则 第4部分：试验方法标准

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

NY/T 1948 兽医实验室生物安全要求通则

GB/T30989-2014 高通量基因测序技术规程

## 3 术语和定义

### 3.1 序列数 Reads

匹配到目的微生物的序列数。数值越高表示样本中检测到该微生物的可信度越高。

### 3.2 测序深度 Depth

样本中某个指定的核苷酸被检测到的次数。数值越大表示样本中检测到的该微生物的可信度越高。

### 3.3 覆盖度 Coverage

检测到某微生物的序列覆盖到该微生物全基因组的比值。覆盖度越高表示检测到某微生物的序列覆盖到该微生物全基因组的比值越高。

### 3.4 微生物丰度 Abundance

该微生物在整个样品中检测到的相同类型微生物中所占比重。丰度越高表示其在相同类型微生物中所占比例越高。

## 4 原理

三代纳米孔测序技术（Nanopore）平台是最新一代的单分子实时测序平台，其核心的技术原理是将多个纳米孔蛋白固定在电阻膜上，在膜两侧施加不同的电压产生电压差，DNA链在马达蛋白的牵引下，解螺旋通过纳米孔蛋白。由于DNA属于生物大分子，不同碱基本身带有不同电荷，因此通过纳米孔时会引起电阻膜上电流的变化，根据电流变化的频谱，应用模式识别算法得到碱基序列。

## 5 试剂

5.1 核酸提取试剂盒。

5.2 第一链合成试剂盒

5.3 第二链合成试剂盒

5.4 Agencourt AMPure XP 磁珠

5.5 三代纳米孔测序试剂盒

## 6 仪器与耗材

6.1 生物安全柜

6.2 PCR 仪

6.3 Qubit 核酸定量仪

6.4 Nanodrop 微量紫外分光光度计

6.5 涡旋振荡仪

6.6 研钵或组织研磨仪

6.7 1.5mL 低核酸吸附性离心管（无核酸酶）

6.8 纳米孔测序仪及配套测序芯片

6.9 P1000 移液器及配套枪头

6.10 P200 移液器及配套枪头

6.11 P10 移液器及配套枪头

## 7 操作步骤

### 7.1 样品采集及运输

按照NY/T 541执行。

### 7.2 核酸提取

按照所选取的核酸提取试剂盒说明书进行提取。

### 7.3 双链 DNA 制备

#### 7.3.1 第一链cDNA合成

7.3.1.1 在冰上放置的0.2ml PCR管中制备如下反应体系

组分	体积 (μL)
7.2 步骤提取的核酸	5
First Strand Synthesis Reaction Buffer	4
Random Primers	1
反应体系总量	10

7.3.1.2 反应液配制后，低速震荡5秒，使溶液混匀，离心机低速离心数秒，使管壁和盖子上无明显液滴。

7.3.1.3 将反应管放置在PCR仪上，94℃ 5min，反应后立即放置在冰上。

7.3.1.4 在冰上放置的 0.2ml PCR 管中制备如下反应体系

组分	体积 (μL)
----	---------

7.3.1.1 步骤反应液	10
First Strand Synthesis Reaction Buffer	8
First Strand Synthesis Enzyme Mix	2
反应体系总量	20

7.3.1.5 反应液配制后，低速震荡5秒，使溶液混匀，离心机低速离心数秒，使管壁和盖子上无明显液滴。

7.3.1.6 将上述PCR管放置在PCR仪上进行反应：25℃，10min；42℃，50min；70℃，15min；4℃，Hold。热盖温度大于80℃。

### 7.3.2 第二链cDNA合成

7.3.2.1 在冰上放置的0.2ml PCR管中制备如下反应体系

组分	体积 (μL)
7.3.1.6 产物	20
Nuclease-Free Water	50
Second Strand Synthesis Reaction Buffer	8
Second Strand Synthesis Enzyme Mix	2
反应体系总量	80

7.3.2.2 反应液配制后，低速震荡5秒，使溶液混匀，离心机低速离心数秒，使管壁和盖子上无明显液滴。

7.3.2.3 将上述PCR管放置在PCR仪上，16℃，60min，合成第二链。

### 7.3.3 核酸纯化

7.3.3.1 纯化前30min从冰箱中取出Agencourt AMPure XP磁珠，震荡重悬，室温平衡。

7.3.3.2 将反应产物短暂离心后按顺序排列在双面板上，按1: 1.8体积加入144μL XP磁珠，震荡混匀，速离心甩掉管壁和盖子上的液滴使磁珠均匀分散在溶液中，室温反应5min。

7.3.3.3 将1.5mL低吸附离心管按顺序插入磁力架的管孔里，放置3min至溶液澄清后，弃去液体，注意不要吸到磁珠，EP管留在磁力架上。

7.3.3.4 吸取200 $\mu$ L 新鲜配制的70%乙醇于EP管，期间轻轻旋动EP管，使磁珠在管壁上移动。弃去溶液，注意不要吸到磁珠。

7.3.3.5 重复上一步步骤。

7.3.3.6 快速离心数十秒，让管壁液体甩到管底。将EP管放回磁力架上，待磁珠吸附全后，用P10枪头吸去管底液体，注意不要吸到磁珠。

7.3.3.7 室温晾干1min，让残留乙醇蒸发。

7.3.3.8 吸取10 $\mu$ L 无核酸酶水洗脱：从有磁珠一侧加入，将磁珠冲入管底；低速震荡将磁珠混匀，瞬时离心去除管壁液滴，室温放置5min。

7.3.3.9 将1.5mL低吸附离心管按顺序插入磁力架，放置1min待磁珠吸附完全，取新的1.5ml低吸附离心管，按顺序编号，溶液变澄清后，转移溶液至新的1.5mL低吸附离心管中。

7.3.3.10 对纯化后的核酸进行Qubit定量。

#### 7.3.4 文库预处理

7.3.4.1 在室温下融化测序反应试剂FRA、测序引物RAP，用移液器吹打混匀、瞬时离心，冰上备用。

7.3.4.2 准备新的0.2mL的PCR管中，加入7.5 $\mu$ L文库（总量为400ng以内）、2.5 $\mu$ L测序反应试剂FRA，手指轻弹管壁混匀，瞬时离心。

7.3.4.3 将上述离心管置于PCR仪中，运行如下程序：30 $^{\circ}$ C孵育1min，80 $^{\circ}$ C孵育1min，立即将离心管置于冰上，备用。

7.3.4.4 取1 $\mu$ L的测序引物RAP 加入到7.3.4.3的离心管中，手指轻弹管壁混匀、瞬时离心，室温静置5min。

#### 7.3.5 芯片预处理

7.3.5.1 在室温下融化冲洗缓冲液FB、冲洗引发剂FLT，涡旋振荡混匀、瞬时离心，冰上备用。

7.3.5.2 将30 $\mu$ L冲洗引发剂FLT加到一支冲洗缓冲液FB的离心管中，涡旋振荡混匀，配制成引发混合液。

7.3.5.3 将芯片放入芯片支架中固定，然后顺时针滑动芯片的清洗口盖子，将1000 $\mu$ L的移液器调至200 $\mu$ L，枪尖轻轻插入清洗口，垂直于芯片的平面保持住，转动移液器转轮直至刻度显示为220~230 $\mu$ L，或看到小容量缓冲液进入移液器吸头。注意：吸取缓冲液时必须小心！吸取体积超过20~30 $\mu$ L可能对其造成损害。

7.3.5.4 在芯片清洗口中加入800 $\mu$ L的步骤7.3.5.2准备的引发混合液，加入过程中避免产生气泡。

7.3.5.5 室温静置5min，打开芯片进样孔盖子。

7.3.5.6 在芯片清洗口再加入200 $\mu$ L步骤7.3.5.2准备的引发混合液，加入过程中避免引入气泡。

### 7.3.6 上样

7.3.6.1 在室温下融化测序缓冲液SQB、磁珠LB、无核酸酶水，用移液器吹打混匀、瞬时离心，冰上备用，取新的1.5mL离心管，按照下表配制：

组分	体积 ( $\mu$ L)
测序缓冲液 (SQB)	34
磁珠 (LB)	25.5
无核酸酶水	4.5
预处理后的文库	11
总体积	75

7.3.6.2 磁珠LB容易沉淀，需在上样前，移液器轻轻吹打、混合步骤7.3.6.1的混合液，避免剧烈吹打。

7.3.6.3 利用移液器，通过芯片进样口以逐滴方式将75 $\mu$ L上样混合液加到芯片中。

7.3.6.4 关闭芯片进样口和芯片清洗口。

### 7.3.7 测序

将芯片载入至纳米孔测序仪及配套的计算机进行测序，严格按照基因测序仪操作说明进行。测序时间可依据当次所获得的数据量进行调整。

## 7.4 三代纳米孔测序的对照

在进行三代纳米孔实验之前，应采用Lambda DNA进行Lambda标准对照试验，以评估本实验室的纳米孔测序工作流程。

## 8 结果分析

通过生物信息学分析软件，对获得的数据进行分析，得到病原微生物核酸的序列数、测序深度、覆盖度、微生物丰度等参数。对待测样本中检测到病原存在序列数 $\geq 1$ 时，分析为阳性，可进一步进行微生物丰度、与已有参考序列相比的覆盖度以及测序深度等参数的分析；对待测样本中检测到病原存在序列数=0时，分析为阴性。阳性及阴性结果均可采用所得数据通过 Blast 进行进一步确证。

## 9 实验室生物安全要求

检测过程及实验室废弃物处置应遵守 GB 19489、NY/T 1948 等生物安全管理相关要求。

中国兽医协会  
CVMA

参 考 文 献

- [1] 宏基因组分析和诊断技术在急危重症感染应用的专家共识. 中华急诊医学杂志, 2019,02:151-155
- [2] 宏基因组学测序技术在中重症感染中的临床应用专家共识(第一版). 中华危重病急救医学, 2020,05:531-536
- 

中国兽医协会  
CVMA