

T/SNLT

石河子农产品流通协会团体标准

T/SNLT XXXX—2026

原料乳中 bla0XA、QnrA、QnrB 三种耐药基因 RPA-LFD 检测技术规范

（征求意见稿）

（本草案完成时间：2026.04.03）

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

目 次

| | |
|--|----|
| 前言 | II |
| 1 范围 | 1 |
| 2 规范性引用文件 | 1 |
| 3 术语和定义 | 1 |
| 4 实验室条件 | 2 |
| 4.1 基本要求 | 2 |
| 4.2 实验室功能 | 2 |
| 4.3 生物安全管理 | 2 |
| 5 仪器设备与试剂 | 2 |
| 5.1 仪器设备 | 2 |
| 5.2 实验用材料 | 2 |
| 6 鉴定 bla _{OXA} 、QnrA、QnrB 引物及探针说明 | 2 |
| 6.1 扩增引物及探针信息 | 2 |
| 6.2 引物及探针使用说明 | 3 |
| 6.3 质控质粒 | 3 |
| 7 试验方法步骤 | 3 |
| 7.1 样品准备 | 3 |
| 7.2 模板制备 | 3 |
| 7.3 试验方法步骤 | 3 |
| 8 试验结果的判定 | 5 |
| 8.1 阳性 | 5 |
| 8.2 阴性 | 5 |
| 8.3 失效 | 5 |
| 9 废弃物处理 | 5 |
| 9.1 灭菌 | 5 |
| 9.2 废弃化学品处理 | 5 |
| 10 人员防护措施与生物安全 | 5 |

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。

本文件由石河子大学提出并归口。

本文件起草单位：石河子大学，新疆生产建设兵团第八师畜牧水产发展服务中心，新疆察布查尔县农业农村局，石河子市北野镇金色牧源牧业有限公司。

本文件主要起草人：周霞，魏增科，方婷，程淳耀，吴洁，樊泰山，许家珞，罗志洁，郝宝峰，李跃，李文雪，张辉，郭嘉，孙志华，王震，周军。

原料乳中 blaOXA、QnrA、QnrB 三种耐药基因 RPA-LFD 检测技术规范

1 范围

本文件规定了原料乳中blaOXA、QnrA、QnrB三重耐药基因的重组酶聚合酶扩增结合侧向流动免疫试纸条等温检测（RPA-LFD）的术语与定义及实验室条件、仪器设备和试剂、检测blaOXA、QnrA、QnrB引物说明、试验方法步骤、试验结果的判定、废弃物处理、人员防护措施与生物安全等。

本文件适用于原料乳中blaOXA、QnrA、QnrB三重耐药基因重组酶聚合酶扩增结合侧向流动免疫试纸条等温检测。

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/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法
- GB/T 31190 实验室废弃化学品收集技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

耐药基因 *blaOXA*

blaOXA是编码OXA型β-内酰胺酶的耐药基因，核心功能是介导细菌对β-内酰胺类抗生素产生耐药性。主要作用机制是水解β-内酰胺类抗生素的β-内酰胺环，破坏药物结构使其失效。常见于革兰氏阴性菌，尤其在鲍曼不动杆菌、大肠杆菌、肺炎克雷伯菌等临床常见致病菌中高频出现。

3.2

耐药基因 *QnrA*

QnrA 是介导细菌对喹诺酮类抗生素产生耐药性的关键耐药基因，核心功能是保护细菌DNA旋转酶，削弱药物杀菌作用。属于Qnr家族（还包括QnrB、QnrC等），是最早被发现的喹诺酮耐药决定因子之一。作用机制独特，不破坏药物结构，而是与细菌DNA旋转酶结合，阻止喹诺酮类药物与靶点结合。主要存在于革兰氏阴性菌，常见于大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、志贺菌等肠道杆菌，也可见于铜绿假单胞菌等非发酵菌。

3.3

耐药基因 *QnrB*

QnrB是Qnr家族中分布最广泛的喹诺酮类耐药基因，核心功能是保护细菌DNA旋转酶和拓扑异构酶IV，降低喹诺酮类药物的杀菌效果。属于质粒介导的喹诺酮耐药基因，与QnrA同源性较高，但在临床菌株中检出率更高。作用机制与QnrA一致，通过结合细菌的DNA旋转酶和拓扑异构酶IV，阻止喹诺酮类药物与靶点结合。主要存在于革兰氏阴性菌，尤其在肺炎克雷伯菌、大肠杆菌、肠杆菌属等肠道杆菌中常见，也可在鲍曼不动杆菌中检出。

3.4

重组酶聚合酶扩增结合侧向流动免疫试纸条

重组酶聚合酶扩增结合侧向流动免疫试纸条（RPA-LFD）是一种将恒温核酸扩增技术与可视化免疫层析检测相结合的快速检测方法，广泛应用于病原体、耐药基因、转基因成分等目标核酸的现场快速筛查。

3.5

引物

应用化学方法合成1对与已知扩增目的基因片段两侧DNA序列互补的寡核苷酸，作为扩增引物。

3.6

探针

应用化学方法合成1条与已知扩增目的基因片段序列互补位于引物序列之间的寡核苷酸，并通过标记化学基团作为重组酶聚合酶扩增探针。

3.7

模板

来自原料乳待扩增的靶DNA。

4 实验室条件

4.1 基本要求

实验室须区分功能，分区独立设置。分级管理。

4.2 实验室功能

实验室应包括：准备室、缓冲间、无菌室、样品保存室等。

4.3 生物安全管理

实验室日常生物安全管理应符合GB 19489相关要求。

5 仪器设备与试剂

5.1 仪器设备

实验用仪器设备包含：

- 1) 灭菌的 1.5 mL 离心管、0.2 mL PCR 管及微量移液器 Tip 头；
- 2) PCR 仪或恒温水浴锅；
- 3) 微量离心机；
- 4) 可调微量移液器（10 μ L~1000 μ L）；
- 5) 微量蛋白核酸检测仪。

5.2 实验用材料

5.2.1 试剂要求

RPA恒温扩增反应干粉应在保质期内，并且置于-20℃保存；280 mM 醋酸镁溶液（MgOAc）等试剂为分析纯或生化试剂；RPA Buffer确保与RPA恒温扩增反应干粉相配套。1×PBS保证无菌。EDTA-Triton X-100 基础裂解液（Tris-HCl（pH 8.0）：20 mM；EDTA（pH 8.0）：5 mM；Triton X-100：1%；定容至100mL）确保浓度准确。

5.2.2 实验用水

实验用水为灭菌双蒸水。实验室用水规格和试验方法应符合GB/T 6682相关要求。

5.2.3 材料

三靶核酸检测试纸条（彩虹型）、阳性对照模板（含目标基因的质粒 DNA）阴性对照（非目标DNA）、0.2 mL PCR 管（RPA 反应管）、1.5 ml离心管、试纸条专用反应槽。

6 鉴定 blaOXA、QnrA、QnrB 引物及探针说明

6.1 扩增引物及探针信息

依据blaOXA、QnrA、QnrB基因分别设计上下2条引物及探针，引物及探针信息见表1。

表1 引物及探针对照表

| 引物及探针名称 | 序列及修饰 |
|---------|---|
| AF | Biotin-ACTGCTTTGGCATAGAGTTCAGGGAGTGCGA |
| AR | TGGCATTGCTCCAGTTGTTTTCAAACAGCTC |
| LF-A | TAMRA-TTTTCCCGGGCCCGCTTCTACAA-dSpacer-CAAGTCAGCCATAAGATGTACTTC-3'C3 |
| BF | Biotin-CCCCTTCTACAATCAAGTCAGCCATAA |
| BR | GTTTTCAAACAGCTCGCATTTTTCCAGG |
| LF-B | 6-FAM-TCGGCTTATATCTCAGGTTGdSpacer-AACCTGGCCTATACCAACTTGAGT-3'C3 |
| OXAF | Biotin-AGAAACAACGGATTAACAGAAGCATGGCTCG |
| OXAR | CATGTTCTCTATGGTGTCTATGGCTGAG |
| LF-OXA | Digoxin-AAAGTAGCTTAAAATTTCACA-dSpacer-GAAGAACAATTCAATTCCTGCGT-3'C3 |

6.2 引物及探针使用说明

引物及探针在使用时用灭菌双蒸水稀释成浓度为10 u mol/L再使用。

6.3 质控质粒

blaOXA-pMD-19-T-DH5 α 大肠杆菌、QnrA-pMD-19-T-DH5 α 大肠杆菌、QnrB-pMD-19-T-DH5 α 大肠杆菌，分别涂布LB平板，次日挑取单克隆菌落，无菌操作台内接种至20 mL LB液体培养基，摇床180 rpm/min培养12h，取5 mL菌液，提取IS900阳性质粒，用微量核浓度检测仪检测阳性质粒浓度。

7 试验方法步骤

7.1 样品准备

收集生鲜牛乳约10 mL~20 mL置于装有抑菌剂的灭菌的带盖塑料管中，离心富集菌体或-20 °C冷冻保存备用。

7.2 模板制备

按照EDTA -Triton X-100法提取各乳样DNA。EDTA -Triton X-100乳样DNA提取方法步骤如下：

- 1) 将生鲜乳混匀，以无菌操作准确吸1 mL，12000 r/min离心10 min，去上清。
- 2) 加1 mL EDTA(0.5 mol/L)，沉淀重悬，混匀，12000 r/min离心10 min，去上清。
- 3) 加1 mL Triton X-100(0.1%)，沉淀重悬，混匀，12000 r/min离心10 min，去上清。
- 4) 加1 mL 超纯水，沉淀重悬，混匀，14000 r/min离心10 min，去上清。
- 5) 准确加入50 μ L超纯水，沉淀重悬，混匀，隔水煮沸10 min。立即置于冰上，冷却5 min。12000 r/min离心5 min，取上清，即为DNA模板。

7.3 试验方法步骤

实验开始前，提前打开PCR仪或水浴锅，根据最佳温度39 °C作为反应温度、反应时间为30 min，提取三种阳性质粒为阳性对照，灭菌双蒸水为阴性对照，提取乳样DNA为检测模板，每个试管为一个反应体系，反应体系见表2。

表2 反应体系表

| 反应成分 | 添加量 |
|------|-----|
|------|-----|

| 反应成分 | 添加量 |
|----------|------------|
| 反应干粉 | 1 管 |
| A buffer | 25 μ L |

表 2 反应体系表（续）

| 反应成分 | 添加量 |
|-----------|-------------------|
| 上游引物 | 各 1 μL |
| 下游引物 | 各 1 μL |
| 探针 | 各 1 μL |
| 模板及无RNA酶水 | 8.0 μL |
| B buffer | 8.0 μL |

反应结束后，取出 PCR 仪或水浴锅中拿出试管，将反应后的产物稀释，并将其滴加至三靶标核酸检测试纸条，在10min内观察试纸条结果。

8 试验结果的判定

8.1 阳性

阳性判定分为以下情况：

- 试纸条出现一条蓝色条带,位于质控线（C 线）；
- 2 条红色条带，位于检测线（T 线）。
- 阳性结果表明样本中含有待检测的核酸片段，且其数量 \geq 试纸条的最低检出量。当目的核酸产物浓度较低时，试纸条 C 线显色呈蓝色，T 线呈淡红色，甚至浅粉色条带，该结果也应判定为阳性。
- 当目的核酸产物浓度较高时，试纸条 C 线显色呈红色，T 线呈红色，该结果也应判定为阳性。

8.2 阴性

阴性判定分为以下情况：

- 试纸条质控线（C 线）出现一条蓝色条带，检测线（T 线）没有条带。
- 阴性结果表明样本中不含目的核酸片段，或其数量低于试纸条的最低检出量。

8.3 失效

试纸条质控线（C线）和检测线（T线）均未出现条带，提示所用的试纸条或扩增试剂可能已经损坏、失效或操作有误。

9 废弃物处理

9.1 灭菌

试验过程中，产生的血液等废弃物，应经过高温高压灭菌或采取其它方式灭菌。

9.2 废弃化学品处理

有毒有害废弃化学品应存放于密闭容器中。并符合GB/T 31190相关要求。

10 人员防护措施与生物安全

试验人员进入实验室，须穿着工作服，并佩戴符合生物安全标准的手套、口罩、护目镜、头罩等。试验中，试验人员安全防护与预防交叉污染措施应符合GB 19489相关要求。