

团 体 标 准

T/JPMA 033—2025

鹦鹉热衣原体环介导等温扩增（LAMP）检测方法

Rapid Detection of Chlamydia psittaci Using Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method

2025 - 06 - 24 发布

2025 - 07 - 01 实施

江苏省预防医学会 发布

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 缩略语	1
5 原理	1
6 环境与设施	1
7 试剂与材料	1
8 仪器与设备	2
9 操作步骤	2
10 质量控制	3
11 生物安全	3



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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由常州市疾病预防控制中心提出。

本文件由江苏省预防医学会归口。

本文件起草单位：常州市疾病预防控制中心、江苏国际旅行卫生保健中心常州分中心、常州市先趋医疗科技有限公司。

本文件主要起草人：王凤鸣、毛旭建、蒋靖怡、许健、董昕、屠博文、唐宏兵、李翠霞、陈巧玲、江锦宜、李琼、姚萍、龚丽。



鸚鵡热衣原体环介导等温扩增（LAMP）检测方法

1 范围

本文件规定了鸚鵡热衣原体环介导等温扩增（LAMP）检测方法的环境与设施、试剂与材料、仪器与设备、操作步骤、质量控制、生物安全的要求。

本文件适用于人体呼吸道标本（咽/鼻拭子、痰液或肺泡灌洗液等）的鸚鵡热衣原体病原学检测。

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

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

环介导等温扩增 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

针对靶基因的6个区域设计4-6条特定引物，通过链置换活性的*Bst* DNA聚合酶，在等温条件（65 °C左右）反应数十分钟，完成对靶核酸进行特定扩增的一种核酸等温扩增技术。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic acid)

PCR: 聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction)

qPCR: 实时荧光定量PCR (Quantitative Real-time PCR)

dNTP: 脱氧核糖核苷三磷酸 (deoxy-ribonucleoside triphosphate)

LAMP: 环介导等温扩增 (Loop-mediated isothermal amplification)

Bst: 嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*)

5 原理

本方法基于鸚鵡热衣原体保守基因*CPSIT_0429*设计内外引物和环引物，识别靶序列上的7个独立区域。利用*Bst* DNA聚合酶启动循环链置换反应，合成互补链，形成具有多个环状结构的茎-环状DNA混合物。伴随着大量质子的释放，体系内的pH值逐渐下降，使溶液颜色从粉红色变为黄色。通过观察颜色变化判断检测结果。

6 环境与设施

灭活标本可在生物安全一级实验室开展检测，非灭活标本应在生物安全二级实验室内开展检测。

7 试剂与材料

- 7.1 鸚鵡热衣原体 DNA 阳性质控品：含有鸚鵡热衣原体 *CPSIT_0429* 基因全长序列的重组质粒，质粒浓度应不低于 1×10^5 aM。
- 7.2 LAMP 显色法预混液：主要成分包含 *Bst*2.0 DNA 聚合酶、dNTP、可视化的酚红指示剂 (pH6.6-8.2) 和缓冲液，可使用同等功效的商品化试剂。
- 7.3 反应管：0.2 mL 透明色 PCR 管。
- 7.4 DNA 提取试剂盒。
- 7.5 无菌双蒸水。
- 7.6 引物信息见表 1， -20 °C 条件下保存。

表1 引物信息

引物名称	引物序列 (5' -3')	靶基因 ^a
外引物1 (F3)	GAGTTGTAGAGTCTATTCGGA	鸚鵡热衣原体 <i>CPSIT_0429</i> 基因
外引物2 (B3)	ACTACTGCTATAGCTGTGTT	
内引物1 (FIP)	CTCTCAACAAGTACGAGACTAAATGATATCTTCAAGCGTGTAAGG	
内引物2 (BIP)	GGAATGGGTTCCATTTTCGATTAACATTGCAATTCATAAGCACCG	
环引物 (LB)	GGAGTTGCTTTTGCATAGAGATT	
^a 鸚鵡热衣原体 <i>CPSIT_0429</i> 靶基因序列 (ACCESSION: NC_017287) atgacaacttctatacctgcatcgcgatagaagtaacccatcgataaacctatagtaacttcaaacacacagactccagaatctcttaaaaagatag ataagctaacaatcctctcgattatcaccatagtggtcacaacggtatgtactgctgctggtataattagtgctactgtaactggcattgctggttt gttcgcactacctgtagcgccatactacttgctatagctgtgttaattgcaattcataagcaccgtttagtaagaactctctatgaaaagcaa cctccgagtttaatcgaaatggaacccattccctcttcaacaactagcgagactaaagaaagtaagaatcctaaccttacacgcttgaagatatca tcggaatagactctacaactccaagaaagatcagctcttgatgatgacagatctggaatag		

8 仪器与设备

- 8.1 超净工作台。
- 8.2 二级生物安全柜。
- 8.3 微量移液器：量程 0.5 μ L~10 μ L、5 μ L~50 μ L、20 μ L~200 μ L。
- 8.4 水浴锅或金属浴：温度范围 40 °C~100 °C，控温精度 ± 0.5 °C。
- 8.5 计时器。
- 8.6 全自动核酸提取仪。
- 8.7 微型离心机。
- 8.8 高压灭菌器。

9 操作步骤

9.1 标本的采集、转运与保存

采集人员呼吸道标本送检（咽/鼻拭子、痰液或肺泡灌洗液）。采集的标本应置入细菌采样管内，拧紧管口。标本转运过程中应置于 2~8 °C 保温容器转运。所采集的标本应尽早送至实验室进行病原检测，如 48 小时内无法检测的标本应放置于 -70 °C 或以下保存，但应避免反复冻融。

9.2 核酸提取

使用细菌基因组提取试剂盒手工法提取或采用全自动核酸提取仪提取 DNA，操作方法按试剂盒说明书进行。

9.3 LAMP 检测

9.3.1 反应体系

每次实验均应设置阴性对照和阳性对照。

在超净工作台中按表2配置LAMP反应体系。

表2 LAMP 反应体系

组分	加样量 (μL)	工作终浓度 (μmol/L)
2×LAMP显色法预混液	12.5	
内引物1 (FIP)	4	1.6
内引物2 (BIP)	4	1.6
外引物1 (F3)	0.5	0.2
外引物2 (B3)	0.5	0.2
环引物 (LB)	1	0.4
DNA模板	2	
无菌双蒸水	0.5	

注1：阴性对照试验：以DNA提取液替代DNA模板，且该对照全程参与核酸提取过程。
注2：阳性对照试验：以鸚鵡热衣原体DNA阳性质控品作为DNA模板，且该质控品全程参与核酸提取过程。

9.3.2 反应过程

整个反应体系在水浴锅或金属浴中65 °C扩增25min，反应结束后立即进行结果判读。

9.3.3 结果判定和报告

9.3.3.1 阳性：标本反应液中变为黄色，报告为鸚鵡热衣原体 LAMP 检测初筛阳性。

9.3.3.2 阴性：标本反应液中未见颜色变化，报告为鸚鵡热衣原体 LAMP 检测初筛阴性。

9.3.3.3 LAMP 检测初筛阳性，为了进一步确证，应对标本做 qPCR 鉴定。

10 质量控制

反应结果应同时符合以下条件：阴性对照反应液未见颜色变化，阳性对照反应液应变为黄色。否则试验结果无效。

11 生物安全

严格按照GB 19489中的规定，开展实验室相关活动。