



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1486—2016
代替 SN/T 1486—2004

输入性蚊类携带的黄热病毒检测方法

Detection of yellow fever virus in imported mosquitoes

2016-03-09 发布

2016-10-01 实施

中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 SN/T 1486—2004《输入性蚊类携带的黄热病毒检测方法》。

本标准与 SN/T 1486—2004 相比主要技术变化如下：

- 修改了“1 标准的范围”；
- 修改和增加了“2 规范性引用文件”；
- 增加了术语和定义“RT-PCR 反应”、“荧光 RT-PCR 反应”；
- 增加了“4 缩略语”；
- 修改和增加了“5 实验室生物安全要求”；将“5 实验室生物安全要求”调整为“6 生物安全措施”，并修改了表述内容；
- 修改了结构和表述：划分了层次，分为“主要仪器和设备”、“主要试剂”、“检验程序”；将“6.1.1 器材”调整为“7 仪器和设备”，并修改了表述方式和内容；将“6.1.2 常用试剂”调整为“8 主要试剂”，并修改了表述方式和内容；
- 修改了内容和方法：将“6.2 操作方法”调整为“9 检验程序”，并修改了表述；增加 9.3“荧光 RT-PCR 检测方法”；删除“病毒分离与酶联免疫吸附试验检测方法”；
- 修改并增加了结果判定的细节：修改了“RT-PCR 方法结果的判定”的表述；增加了“荧光 RT-PCR 方法结果的判定”；
- 增加了废弃物处理；
- 删除了附录 A。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国宁波出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：张升、周冬根、吴薇、郑剑宁、杨天赐、崔科军、胡群。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

- SN/T 1486—2004。

输入性蚊类携带的黄热病毒检测方法

1 范围

本标准规定了国境口岸输入性蚊类携带黄热病毒的检测对象、生物安全措施、仪器和设备、主要试剂、检验程序、阳性结果处置和废弃物的处理。

本标准适用于输入性蚊类体内携带黄热病毒的实验室检验。口岸发现的蚊类携带黄热病毒检测可参考本标准执行。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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

WS 233 微生物和生物医学实验室生物安全通用准则

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

输入性蚊类 imported mosquitoes

通过入境交通工具、集装箱、货物、行李及邮包等携带入境的蚊类。

3.2

黄热病毒 yellow fever virus

属于黄病毒科(*Flaviviridae*)黄病毒属(*Flavivirus*)单股正链 RNA 病毒,与同属的登革热病毒等有交叉免疫反应。病毒颗粒为直径 37 nm~50 nm 的球形,外有脂蛋白包膜,包膜表面有刺突。基因组大小约为 11 kb,只含有一个长的开放阅读框架。

3.3

逆转录聚合酶链式反应 reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)

将 RNA 的逆转录(RT)和 cDNA 的聚合酶链式扩增(PCR)相结合的技术。本标准采用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)。在 RT-PCR 中,首先以 RNA 为模板,利用下游特异性引物,在依赖 RNA 的 DNA 聚合酶(逆转录酶)的作用下转录合成互补 DNA(cDNA),该步称作“逆转录”;随后,再以 cDNA 为模板,利用上游和下游特异性引物,在 DNA 聚合酶的作用下进行 PCR 循环扩增;最终使 RNA 分子的某个特定区域(目的片段)被扩增达几百万倍。

3.4

荧光 RT-PCR 反应 fluorescence RT-PCR

实时荧光 RT-PCR 方法有多种,本标准采用的是 TaqMan 水解探针法,其原理是在常规 RT-PCR 的基础上,加入一条特异性的荧光探针。该探针为一段寡核苷酸,两端分别标记一个报告基团和一个淬灭荧光基团。探针完整时,报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收;PCR 扩增时,利用 Taq 酶的 5'→

3'外切酶活性将探针酶切降解,使报告荧光基团和淬灭基团分离,从而荧光监测系统可以接收到荧光信号,即扩增一条 DNA 链,就有一个荧光分子形成,实现荧光信号的积累与 PCR 产物形成完全同步。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

bp base pair:碱基对。

FAM 6-carboxy-fluorescein:6-羧基-荧光素,一种荧光报告基团。

BHQ1 Black Hole Quencher-1:一种荧光淬灭基团。

5 检测对象

主要检测的输入性对象包括:伊蚊属埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)和非洲伊蚊(*Aedes africanus*),及可能携带黄热病毒的外来输入性蚊种等。

6 生物安全措施

- 6.1 检测工作中的个人防护参照 GB 19489。
- 6.2 实验室应符合 GB 19489 和 WS 233 对生物安全 2 级(BSL-2)实验室的生物安全要求。
- 6.3 使用过的实验用品应遵照 GB 19489 对废弃物的处理要求进行无害化处理。

7 仪器和设备

本方法使用的主要仪器如下:

- 超净工作台;
- Ⅱ级生物安全柜;
- 全自动核酸提取仪;
- 实时荧光定量 PCR 仪;
- PCR 热循环仪;
- 恒温孵育仪;
- 普通台式离心机;
- 高速冷冻离心机(离心力可达 20 000×g);
- 电泳仪;
- 凝胶成像分析系统;
- 体视显微镜;
- 高压灭菌锅;
- 冰箱:4℃、-20℃和-70℃;
- 可调式微量加样器(10 μL、100 μL、1 000 μL)及配套带滤芯吸头。

8 主要试剂

本方法使用的主要试剂如下:

- RT-PCR 通用试剂:QIAGEN OneStep RT-PCR Kit 试剂盒¹⁾;
- 荧光 RT-PCR 通用试剂:QuantiTect Probe RT-PCR Kit 试剂盒¹⁾;
- 病毒 RNA 提取试剂:QIAamp Viral RNA kit 试剂盒¹⁾;
- 10× TBE 电泳缓冲液;
- 无 RNA 酶的 DEPC 水;
- GoldenView 核酸染料:使用浓度为 5 μL/100 mL;
- 引物和探针:针对黄热病毒核苷酸高度保守区进行设计,引物和探针序列见表 1。

表 1 黄热病毒 RT-PCR/荧光 RT-PCR 检测的引物和探针

引物/探针名称	序列(5'→3')	靶标基因	扩增片段大小
YFV-FP1	CAATAAATGCTGTTGC	NS 5	349
YFV-RP1	TTCTCCATCTCCTGAA		
YFV-FP2	TACAACATGATGGGAAAGCGAGAGAAAAA	NS 5	106
YFV-RP2	GTGTCCCAGCCGGCGGTGTCATCAGC		
YFV-probe	FAM-TCAGAGACCTGGCTGCAATGGATGGT-BHQ1		

9 检验程序

9.1 样品收集与处理

9.1.1 样品收集

通过勾舀法、光诱捕法以及人工摘除法等方法,重点检测入境交通工具、集装箱、货物、行李及邮包等是否携带有黄热病重要传播媒介蚊幼、成蚊、卵粒,然后将采集好的标本放入专门的采样包中,尽可能快地送至有检验资质的实验室中。

9.1.2 样品处理

首先通过体视显微镜完成有关截获的标本分类鉴定,按 30 只~50 只一份,装入 2 mL 螺口塑料血清管内,旋紧管盖,分类编号;如果蚊虫数量不足 30 只,则可将采自同一地点的蚊虫或卵粒等作为一份。整个操作过程尽可能让标本处于低温状态,然后将标本置于-70℃以下超低温冰箱保存待检。

9.1.3 病毒核酸提取方法

将-70℃冰箱中保存好的蚊虫标本,按不同的分类编号倒入研磨器或 1.5 mL Eppendorf 离心管中,加入适量的液氮,用塑料研磨棒反复研磨至组织碎片基本消失,或用组织细胞破碎仪进行处理。然后加入 600 μL β-巯基乙醇裂解缓冲液进行充分反应,根据 QIAamp Viral RNA kit 病毒 RNA 提取试剂盒进行或其他等效方法提取核酸,实际操作时按试剂盒说明书进行。提取好的 RNA 核酸液置于-70℃冰箱中保存,以备 RT-PCR 或实时荧光 RT-PCR 检测所需。

1) 给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的认可和推荐。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效产品。

9.1.4 阳性对照、阴性对照和空白对照设置

检测过程中分别设阳性对照、阴性对照和空白对照。阳性对照为根据黄热病毒核苷酸序列通过基因合成、载体构建和体外转录合成的 RNA,阴性对照可选择其他种类病毒的核酸样本,空白对照用无菌水作为 RT-PCR 和荧光 RT-PCR 反应的模板。

9.2 RT-PCR 检测方法

9.2.1 反应液的准备

RT-PCR 反应体系采用以下参数:5× one step RT-PCR Buffer 8 μL;引物 YFV-FP1(40 μmol/L)和 YFV-RP1(40 μmol/L)各 0.5 μL;RNase inhibitor 0.5 μL;dNTP 混合物 2 μL;one-step RT-PCR Enzyme Mix(含逆转录酶和 Taq DNA 聚合酶)1.0 μL;RNA 模板 5.0 μL;加水补足至 40 μL。

9.2.2 反应条件

RT-PCR 反应条件:50 ℃ 反转录 30 min;95 ℃ 预变性 15 min;94 ℃ 变性 30 s,56 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 60 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min;4 ℃ 保温。因不同 PCR 仪器的性能差异,可根据条件优化适当调整 PCR 退火温度和时间。

9.2.3 琼脂糖凝胶电泳

用 0.5×TBE 电泳缓冲液配制 2.0%(质量分数)的琼脂糖凝胶(含 GoldenView 或其他等效核酸染料)。将琼脂糖凝胶放入水平电泳槽,使电泳缓冲液刚好淹没胶面。取 9 μL RT-PCR 扩增产物和 1 μL 上样缓冲液混匀后加入糖凝胶的样品孔。在电泳时设立 DNA 分子量标准作对照,使用 100 bp DNA 分子量标准。按 8 V/cm 的电压条件电泳约 30 min~40 min。采用凝胶成像系统观察核酸条带并判断结果。

9.3 荧光 RT-PCR 检测方法

9.3.1 反应液的准备

荧光 RT-PCR 反应体系采用以下参数:2× QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix(含 dNTP 和 Mg²⁺ 等)12.5 μL;引物 YFV-FP2(12.5 μmol/L)和 YFV-RP2(12.5 μmol/L)各 0.5 μL;探针 YFV-Probe(20 μmol/L)0.25 μL;QuantiTect RT Mix(含逆转录酶和 Taq DNA 聚合酶)0.5 μL;RNA 模板 5.0 μL;加水补足至 25 μL。

9.3.2 反应条件

荧光 RT-PCR 反应条件:50 ℃ 反转录 30 min;95 ℃ 预变性 15 min;94 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 退火延伸 60 s 40 个循环,在 60 ℃ 收集荧光。因不同 PCR 仪器的性能差异,可根据条件优化适当调整 PCR 退火温度和时间。

9.4 检测结果判定

9.4.1 RT-PCR 方法结果的判定

当阳性对照出现目的片段条带,而阴性对照和空白对照没有任何核酸条带出现时才可对样本进行结果判定及报告,否则视为实验失败,需重新实验。

本方法检验结果判定及报告如下:

- 检测样品出现 349 bp 条带时,报告“检出黄热病毒(RT-PCR 法)”。
- 检测样品未出现 349 bp 条带时,报告“未检出黄热病毒(RT-PCR 法)”。

9.4.2 荧光 RT-PCR 方法结果的判定

在荧光 RT-PCR 实验中,若阳性对照有明显的荧光增幅现象,且 Ct 值在预期的范围之内(≤ 32);阴性对照和空白对照无荧光增幅现象,则表明反应体系运行正常,可以进行结果判定,否则,实验视为无效,需重新实验。

当同时进行的阳性、阴性和空白对照实验结果正常,本方法检验结果判定及报告如下:

- 检测样品有明显的荧光增幅曲线,且 Ct 值 ≤ 35 时,判为阳性,报告“检出黄热病毒(荧光 RT-PCR 法)”。
- 检测样品荧光增幅曲线的 Ct 值介于 35 和 40 之间时,应重新进行荧光 RT-PCR 检测。若重新检测的 Ct 值仍介于 35 和 40 之间,且曲线有明显的对数增长期,判为阳性,报告“检出黄热病毒(荧光 RT-PCR 法)”；否则判为阴性,报告“未检出黄热病毒(荧光 RT-PCR 法)”。
- 检测样品无荧光增幅现象,判为阴性,报告“未检出黄热病毒(荧光 RT-PCR 法)”。

10 阳性结果处置

采用 RT-PCR 法或荧光 RT-PCR 法进行检测,出现阳性结果的相应标本应送有资质的实验室做复检或鉴定。确定阳性结果后应立即向送检或送样单位报告。

11 废弃物的处理

检验过程中的废弃物,收集后进行高压蒸汽灭菌处理或采用 0.5% 的次氯酸钠溶液浸泡 30 min 以上等其他等效的处理方法。

参 考 文 献

- [1] 方美玉等.虫媒传染病.北京:科学出版社,2005:158-165.
 - [2] Chao,D.Y.et al.Development of multiplex real-time reverse transcriptase PCR assays for detecting eight medically important flaviviruses in mosquitoes.J.Clin Microbiol,2007:584-589.
-