



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3306.8—2017

---

## 国境口岸环介导恒温扩增(LAMP)检测方法 第 8 部分:基孔肯雅病毒

Loop-mediated isothermal amplification detection method at frontier port—  
Part 8: Chikungunya virus

2017-05-12 发布

2017-12-01 实施

---

中 华 人 民 共 和 国 发 布  
国家质量监督检验检疫总局

## 前 言

SN/T 3306《国境口岸环介导恒温扩增(LAMP)检测方法》分为 14 个部分:

- 第 1 部分:鼠疫杆菌;
- 第 2 部分:产毒素霍乱弧菌;
- 第 3 部分:志贺氏菌;
- 第 4 部分:嗜肺军团菌;
- 第 5 部分:布鲁氏菌;
- 第 6 部分:黄热病毒;
- 第 7 部分:猴痘病毒;
- 第 8 部分:基孔肯雅病毒;
- 第 9 部分:结核分枝杆菌;
- 第 10 部分:炭疽芽孢杆菌;
- 第 11 部分:副溶血性弧菌;
- 第 12 部分:空肠弯曲菌;
- 第 13 部分:疟原虫;
- 第 14 部分:大肠杆菌 0157:H7。

本部分为 SN/T 3306 的第 8 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位:中华人民共和国广东出入境检验检疫局、广东国际旅行卫生保健中心中华人民共和国汕头出入境检验检疫局。

本部分主要起草人:李小波、李燕、朱俊贤、张显光、郑夔、师永霞、黄吉城、戴俊、苏锦坤。

# 国境口岸环介导恒温扩增(LAMP)检测方法

## 第 8 部分:基孔肯雅病毒

### 1 范围

SN/T 3306 的本部分规定了国境口岸入出境人员感染及口岸蚊媒携带基孔肯雅病毒环介导恒温扩增(LAMP)法核酸检验规程,包括样本采集、处理、检验程序、方法,结果判定及报告。

本部分适用于入出境口岸人员感染及蚊媒携带基孔肯雅病毒的实验室快速检验。

### 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(包括所有的修改版)适用于本文件。

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

SN/T 2300—2009 国境口岸蚊类携带基孔肯雅病毒的检测方法

SN/T 3560—2013 国境口岸黄热病毒、登革病毒、基孔肯雅病毒、西尼罗病毒的多重实时荧光 RT-PCR 检测方法

人间传染的病原微生物名录[卫科教发(2006)15 号]

### 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

#### 3.1

**基孔肯雅病毒** *chikungunya virus*

一种属于披膜病毒科甲病毒属,基因组为单股正链 RNA 的病毒,病毒颗粒呈球形,有包膜,平均直径 42 nm,相对分子质量为  $4.3 \times 10^8$ ,沉降系数为 46 S。该病毒感染人可引起基孔肯雅热,主要临床表现为发热、关节疼痛、皮疹和轻度出血等。

#### 3.2

**环介导恒温扩增检测方法** *loop-mediated isothermal amplification detection method*

一种新的恒温核酸扩增方法,其特点是针对靶基因的 6 个区域设计 4 种特异引物,利用一种链置换 DNA 聚合酶在等温条件(63 °C 左右)保温 30 min~60 min,即可完成核酸扩增反应。与常规 PCR 相比,不需要模板的热变性、温度循环、电泳及紫外观察等过程。

### 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

LAMP:环介导恒温扩增(Loop-mediated isothermal amplification)

F3: LAMP 反应正向外引物(Forward outer primer)

B3: LAMP 反应反向外引物(Backward outer primer)

FIP: LAMP 反应正向内引物(Forward inner primer)

BIP: LAMP 反应反向内引物(Backward inner primer)

5 仪器和设备

仪器和设备如下

- 生物安全柜；
- 高压灭菌器；
- 普通冰箱；
- 水浴锅或金属浴；
- 冷冻离心机(带密封的离心安全杯)。

6 试剂和引物

6.1 试剂

需要如下试剂：

- 市售商品化核酸提取试剂如 QIAGEN 公司的 RNA 提取试剂盒<sup>1)</sup>；
- Bst DNA 聚合酶；
- 市售商品化 LAMP 专用反应试剂 RM<sup>2)</sup>；
- 市售商品化逆转录试剂如 PrimeScript™ RT reagent kit 逆转录试剂盒<sup>3)</sup>；
- 灭菌双蒸水。

6.2 LAMP 检测的引物

引物组合序列如下：

- F3:5'-CGCCCTCTTTAACGGACATG-3'
- B3:5'-AATTCGGCGCTGGCTAAG-3'
- FIP:5'-TGCCTTTCTTGCTGGCTGCATA-TACCAGCCTGCACCCATT-3'
- BIP:5'-AGTGTGCGGTGCATTGATGA-TGCAGCTGAGAATTCCCTTC-3'

7 样本采集

7.1 人血液样本采集按 SN/T 3560—2013 相关内容进行。

7.2 蚊虫样本采集按 SN/T 2300—2009 相关内容进行。

8 样本处理

8.1 血样样本处理按 SN/T 3560—2013 相关内容进行。

8.2 蚊虫样本处理按 SN/T 2300—2009 相关内容进行。

8.3 RNA 提取按照试剂盒说明书进行。

9 LAMP 检测

9.1 cDNA 模板制备

cDNA 制备利用 PrimeScript™ RT reagent kit 逆转录试剂盒进行,40 μL cDNA 合成反应体系

1),2),3) 由指定单位提供,给出这一信息是为了方便本部分的使用者,并不表示对该产品的认可。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。

如下：

——5×buffer	8 μL；
——Enzyme Mix	2 μL；
——Oligo dT primer	2 μL；
——Random 6mers	8 μL；
——RNA	20 μL。

9.2 LAMP 反应体系

构建 25 μL 的 LAMP 反应体系：

——反应液 RM	12.5 μL；
——引物混合物 PM	1 μL(其中 FIP 反应终浓度 1.6 μmol/L,BIP 1.6 μmol/L,F3 0.2 μmol/L,B3 0.2 μmol/L)；
——BstDNA 聚合酶	1 μL；
——eDNA	2 μL；
——灭菌双蒸水	8.5 μL。

9.3 One-step RT-LAMP 反应体系

构建 25 μL 的 One-step RT-LAMP 反应体系：

——反应液 RM	12.5 μL；
——引物混合物 PM	1 μL(其中 FIP 反应终浓度 1.6 μmol/L,BIP 1.6 μmol/L,F3 0.2 μmol/L,B3 0.2 μmol/L)；
——Bst DNA 聚合酶	0.8 μL；
——AMV 逆转录酶	0.2 μL；
——RNA	2 μL；
——灭菌双蒸水	8.5 μL。

9.4 反应程序

上述组分加入后,轻柔混匀并短暂离心后加入 10 μL 的凡士林(密封液),最后将 1 μL 的 SYBR GREENI(显色液)加入反应管顶盖。盖上管盖后,置于 63 ℃ 的水浴锅或金属浴进行反应,反应 60 min。LAMP 及 One-step RT-LAMP 反应均应用该反应条件。

10 结果判断

取出反应管,短暂离心使反应管顶盖中的显色液进入反应体系,3 min 后根据管内反应液颜色变化判断实验结果。若反应液呈绿色,则检测结果为阳性;若呈橙色,则为阴性。

11 结果报告

- 11.1 检测结果为阳性则报告为标本 LAMP 检测阳性。
- 11.2 检测结果为阴性则报告为标本 LAMP 检测阴性。

## 12 生物安全措施

实验室生物安全要求按照附录 A 执行。

**附 录 A**  
**(规范性附录)**  
**实验室生物安全要求**

中华人民共和国卫计委发布的《人间传染的病原微生物名录》(2006)规定,基孔肯雅病毒危害程度分类为第二类,所有有关基孔肯雅病毒的实验室操作应按照以下规定执行:

- a) 基孔肯雅病毒培养和动物感染实验须在生物安全三级(BSL-3)实验室内进行。
  - b) 未经培养的基孔肯雅病毒感染性材料的操作须在生物安全二级(BSL-2)实验室内进行。
  - c) 基孔肯雅病毒相关的灭活材料和无感染性材料操作可在生物安全一级(BSL-1)实验室内进行。
  - d) 基孔肯雅病毒感染性材料运输包装分类为 A 类,UN 编号为 UN2814。
  - e) 其他要求按 GB 19489 进行。
-