



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4824—2017

牛羊赤羽病病毒环介导等温扩增 检测方法

Detection method for Akabane virus of bovine and ovine by LAMP

2017-07-21 发布

2018-03-01 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

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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：中华人民共和国广东出入境检验检疫局、华南农业大学。

本标准主要起草人：鱼海琼、蔡先全、程珏益、贾坤、赵吟、王莹、田纯见、陈芳、陈茹、林志雄。

牛羊赤羽病病毒环介导等温扩增 检测方法

1 范围

本标准规定了牛、羊赤羽病病毒环介导等温扩增检测方法。
本标准适用于牛、羊赤羽病病毒核酸现场快速初筛检测。

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/T 18088 出入境动物检疫采样

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

AKAV 赤羽病病毒(Akabane virus)

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

4 赤羽病概况

赤羽病病毒为单股 RNA 病毒,属布尼病毒科布尼病毒属,由其引发的赤羽病概况参见附录 A。

5 试剂

- 5.1 RNA 抽提试剂盒。
- 5.2 Bst DNA 聚合酶。
- 5.3 Betaine 甜菜碱。
- 5.4 0.01 mol/L PBS 缓冲液(见附录 B)。
- 5.5 10×Thermopol 缓冲液。
- 5.6 100 mmol/L MgSO₄。
- 5.7 10 mmol/L dNTP。
- 5.8 5×AMV Buffer 及 AMV RTase。
- 5.9 AKAV 细胞培养物(灭活)。
- 5.10 内引物(FIP+BIP)。
- 5.11 外引物(F3+B3)。
- 5.12 RNasin。

6 设备与材料

- 6.1 冷冻离心机。
- 6.2 恒温水浴箱。
- 6.3 生物安全柜。
- 6.4 移液器。

7 原理

根据 AKAV 特异性 S 基因 6 个特异区域设计两对引物,在具有链置换活性的 Bst DNA 聚合酶的作用下,由 4 条引物识别靶序列上的 6 个特定区域(参见 C.1),在 63℃ 左右对核酸进行等温扩增。扩增产物加入染料后阳性孔会出现肉眼可见的绿色。

8 操作步骤

8.1 引物序列

参见 C.2。

8.2 样品的采集与前处理

8.2.1 总则

采样参照 GB/T 18088 进行。采样过程中样品不得交叉污染,采样及样品前处理过程中须戴手套,在具备相应生物安全条件的区域内按照生物安全要求进行操作。

8.2.2 死胎或组织样品

用无菌的剪刀和镊子剪取待检样品 1.0 g 于研钵中或超声裂解仪器中充分研磨裂解,再加 5.0 mL PBS 混匀,然后将组织悬液转入无菌 1.5 mL 离心管中,离心取上清,编号备用。

8.2.3 血液

用无菌注射器直接吸取 200 μL~500 μL 血液至无菌 1.5 mL 离心管中,抗凝,编号备用。

8.2.4 存放与运送

采集或处理的样品在 2℃~8℃ 条件下保存不超过 24 h;若需长期保存,须放置-70℃ 冰箱,但应避免反复冻融。采集的样品密封后,冷链运送到实验室。

8.3 扩增试剂准备与配制

8.3.1 核酸提取

移取 200 μL 正常细胞培养物作为阴性对照,移取等量 DEPC 水作为空白对照。将 200 μL 处理好的待检样品移至 1.5 mL 离心管中。最后移取经过灭活处理的 AKAV 细胞培养液至另外的 1.5 mL 离心管中作为阳性对照,按照核酸提取试剂盒要求提取病毒 RNA。

8.3.2 cDNA 模板的制备

将 8.3.1 中提取的 RNA 按照表 1 所列反转录体系加入各成分,总体积为 20 μL ,混匀后置于 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h,反应产物置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存或立即进行扩增。

表 1 反转录体系

试剂	体积(浓度)
5 \times AMV Buffer	4 μL
dNTPs	2 μL (10 pmol/ μL)
随机引物	1 μL (30 pmol/ μL)
RNasin	1 μL (20U)
提取的 RNA	11.5 μL
AMV RTase	1 μL (5U)

8.4 扩增加样

记录样本摆放顺序,按表 2 所示体系加样,最后加对应浓度的引物和模板。按照空白对照、阴性对照、被检样品、阳性对照的顺序依次加样。也可直接选取商品化 LAMP 反应试剂盒,按照试剂盒要求添加各项组分(包括染料)及设置反应条件。

表 2 LAMP 反应体系

RT-LAMP 反应液组分	体积(反应)/ μL
10 \times Thermopol Buffer	2.5
dNTP(10 mmol/L)	2.5
MgSO ₄ (100 mmol/L)	2
FIP+BIP(40 $\mu\text{mol/L}$)	0.5
F3+B3(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.5
Betaine	4
BstDNA 聚合酶	1
cDNA 模板或样品	1
ddH ₂ O	11
总体积	25

8.5 加入染料

轻轻混匀离心管中的反应液,给每个反应管中加入 1 μL SYBR GreenI 染料。

8.6 LAMP 扩增

将离心管放入 63 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅扩增 60 min。

8.7 结果

8.7.1 结果判定的条件

LAMP 阳性对照有绿色颜色变化产生,阴性和空白对照无绿色颜色出现时方可判定被检样品的结果。

8.7.2 结果判定

8.7.2.1 LAMP 产物管中呈现绿色颜色变化,表明样品中 AKAV 核酸初筛阳性,可采用其他方法进一步确认。

8.7.2.2 LAMP 产物管不呈现绿色颜色变化,表明样品中 AKAV 核酸初筛阴性。

附 录 A
(资料性附录)
疫病概况

A.1 病原

赤羽病(Akabane disease)由赤羽病病毒(Akabane virus,AKAV)引起。该病毒属布尼病毒科布尼病毒属,为单股 RNA 病毒,病毒呈球形,直径为 90 nm~100 nm,有囊膜。囊膜上有糖蛋白组成的 5 nm~10 nm 的纤突。该病毒不耐热,对乙醚和三氯甲烷敏感。0.1%的 β 丙内酯在 4 ℃下于 3d 内将其灭活。病毒于 pH6.0~10.0 之间稳定,易被脂溶剂、紫外线和去垢剂等灭活, Mg^{2+} 不能提高其抵抗力。赤羽病病毒能在仓鼠肾细胞、HmLu-1、Vero、PK-15、BHK-21、RK-13 等细胞上生长,其中能引起 HmLu-1、Vero 和 BHK-21 细胞明显的细胞病变。

A.2 临床症状和流行病学

赤羽病是牛、羊的多型性急性传染病,又称阿卡斑病,该病以流产、早产、死胎、畸形胎和木乃伊胎等为特征,有些新生幼仔还会发生关节弯曲和积水性无脑综合症。该病是一种重要的虫媒病毒病,也是出入境口岸牛、羊检疫的重要外来病之一。该病于 20 世纪 30 年代即在澳大利亚的牛、绵羊、山羊群中流行,随后在日本亦有报道。1959 年首次在日本群馬县阿卡斑村的骚扰伊蚊和三带喙库蚊体内分离到一株病毒。

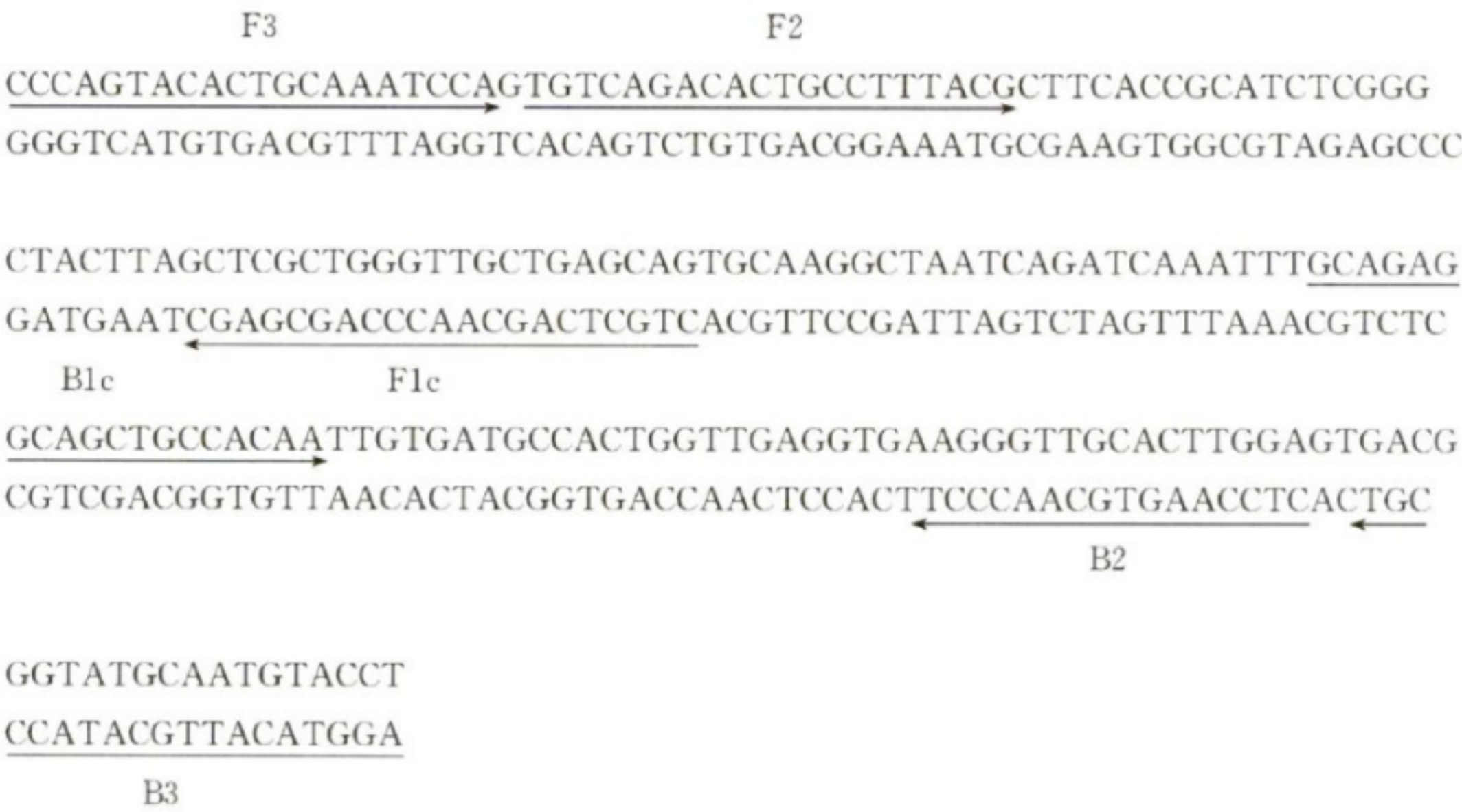
附 录 B
(规范性附录)
试 剂 配 制

磷酸盐缓冲液(PBS 0.01 mol/L,pH7.2):

磷酸二氢钾 0.20 g,碳酸氢钠 1.15 g,氯化钠 8.00 g,氯化钾 0.20 g,双蒸水加至 1 000 mL,(121±2)℃,15 min 高压灭菌冷却后,无菌条件下加入青霉素、链霉素各 10 000 IU/mL,2℃~8℃保存备用。

附 录 C
(资料性附录)
参 考 序 列

C.1 LAMP 扩增位点示意及扩增序列



C.2 LAMP 引物序列

引物 Primer	序列 Sequence(5'-3')
F3	CCCAGTACACTGCAAATCCA
B3	AGGTACATTGCATACCCGTC
FIP(F1c-F2)	CTGCTCAGCAACCCAGCGAGTGTCTCAGACACTGCCTTTACG
BIP(B1c-B2)	GCAGAGGCAGCTGCCACAATACTCCAGGTGCAACCCTT