



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3306.6—2016

国境口岸环介导恒温扩增(LAMP) 检测方法 第6部分:黄热病毒

Loop-mediated isothermal amplification detection method at frontier port—
Part 6: Yellow fever virus

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

SN/T 3306《国境口岸环介导恒温扩增(LAMP)检测方法》共分为 6 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。

本部分为 SN/T 3306 的第 6 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:中华人民共和国浙江出入境检验检疫局、浙江省疾病预防控制中心。

本部分主要起草人:吕沁风、吴忠华、郑伟、罗鹏、徐琦、何蕾、李莉、周健青、沈若川、李禾、张严峻、陈寅、李洪波。

国境口岸环介导恒温扩增(LAMP) 检测方法 第6部分:黄热病毒

1 范围

SN/T 3306 的本部分规定了国境口岸黄热病毒环介导恒温扩增检测方法。
本部分适用于国境口岸出入境人员或医学媒介生物携带黄热病毒的筛选检测。

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。

SN/T 1243 国境口岸黄热病检验规程

SN/T 1486 输入性蚊类携带的黄热病毒检测方法

WS/T 230 临床诊断中聚合酶链反应(PCR)技术的应用

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

AMV:鸟类骨髓母细胞瘤病毒(Avian myelocytoma virus)

dNTP:脱氧核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate)

EDTA:乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid)

LAMP:环介导恒温核酸扩增(loop mediated isothermal amplification)

RNA:核糖核酸(ribonucleic acid)

Tris-HCl:三羟甲基氨基甲烷盐酸盐[tris(hydroxymethyl)aminomethane-HCl]

4 生物安全要求

所有有关黄热病毒的实验室操作应按照规定执行:

- 黄热病毒病毒培养或动物感染实验在生物安全三级(BSL-3 或 ABSL-3)实验室内进行;
- 黄热病毒未经培养的感染材料的操作或灭活材料的操作在生物安全二级(BSL-2)实验室内进行;
- 黄热病毒相关的无感染性的材料操作在生物安全一级(BSL-1)实验室内进行;
- 黄热病毒感染性材料运输包装分类为 A 类,UN 编号为 UN2814。

5 对象

- 5.1 疑似感染黄热病毒出入境人员。
- 5.2 疑似携带黄热病毒的医学媒介生物。

6 技术概要

根据黄热病毒 E 基因保守序列设计内、外引物,识别靶序列上的六个独立区域,利用 *Bst* DNA 聚合酶启动循环链置换反应,在 E 基因序列启动互补链合成,在同一链上互补序列周而复始形成有很多环的花椰菜结构的茎-环 DNA 混合物;从 dNTPs 析出的焦磷酸根离子与反应溶液中的 Mg^{2+} 结合,产生副产物(焦磷酸镁)形成乳白色沉淀,离心,即可通过白色沉淀是否产生观察判定结果。

7 试剂

在实验过程中需要以下试剂:

——引物:位于黄热病毒 E 基因内(见附录 A),组成如下:

- 外引物 1(F3):5'-TGGGAGAGGAGATTCACGT-3';
- 外引物 2(B3):5'-TCAAGCCGCCAAATAGCC-3';
- 内引物 1(FIP):5'-CCACGCCTTTCATGGTCTGAGTTTACCAGTGGCACAAAGAGG-3';
- 内引物 2(BIP):5'-AGACACCGCCTGGGATTTYAGGCAGAGCCAAACACCGTATG-3'。

——*Bst* DNA 聚合酶:8 U/ μ L。

——dNTPs: dATP、dGTP、dTTP、dCTP 各 10 mmol/L。

——RNA 提取试剂盒。

——Tris-HCl:500 mmol/L。

——AMV 逆转录酶:10 U/ μ L。

—— $MgSO_4$:8 mmol/L。

——甜菜碱:8 mmol/L。

—— $(NH_4)_2SO_4$:100 mmol/L。

——KCl:500 mmol/L。

——Tween-20:10%。

——RNase 抑制剂:40 U/ μ L。

8 仪器设备

在实验过程中需要以下仪器设备:

- 移液器:量程 0.1 μ L~2.5 μ L,量程 1 μ L~10 μ L,量程 10 μ L~100 μ L,量程 100 μ L~1 000 μ L;
- 高速台式离心机: $\geq 10\ 000\ g$;
- 普通台式离心机;
- 水浴锅或加热模块;
- $-70\ ^\circ\text{C}$ 超低温冰箱;
- 计时器。

9 检测程序

黄热病毒 LAMP 检测程序见图 1。

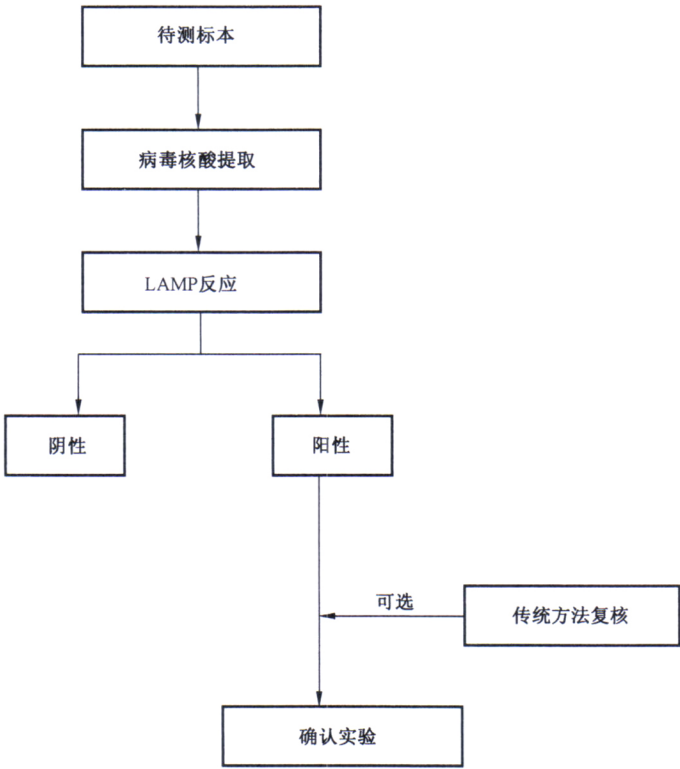


图 1 黄热病毒 LAMP 检测程序

10 操作步骤

10.1 标本的采集和 RNA 提取

标本采集和 RNA 提取按 SN/T 1243 或 SN/T 1486 操作,也可使用市售等效试剂盒。

10.2 LAMP 检测

10.2.1 反应体系

反应体系见表 1。

表 1 黄热病毒 LAMP 反应体系

| 组分 | 工作液浓度 | 加样量/ μL | 反应体系终浓度 |
|--------------------|---------------------------|--------------------|-----------------------------|
| 引物 F3 | 10 $\mu\text{mol/L}$ | 0.25 | 0.1 $\mu\text{mol/L}$ |
| 引物 B3 | 10 $\mu\text{mol/L}$ | 0.25 | 0.1 $\mu\text{mol/L}$ |
| 引物 FIP | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 0.4 | 0.8 $\mu\text{mol/L}$ |
| 引物 BIP | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 0.4 | 0.8 $\mu\text{mol/L}$ |
| <i>Bst</i> DNA 聚合酶 | 8 $\text{U}/\mu\text{L}$ | 1 | 0.32 $\text{U}/\mu\text{L}$ |
| AMV 逆转录酶 | 10 $\text{U}/\mu\text{L}$ | 1 | 0.4 $\text{U}/\mu\text{L}$ |

SN/T 3306.6—2016

表 1 (续)

| 组分 | 工作液浓度 | 加样量/ μL | 反应体系终浓度 |
|------------------------------|--|--------------------|----------------------|
| RNase 抑制剂 | 40 U/ μL | 0.5 | 0.8 U/ μL |
| dNTPs | 10 mmol/L | 3.5 | 1.4 mmol/L |
| Tris-HCl | 500 mmol/L | 1 | 20 mmol/L |
| KCl | 500 mmol/L | 0.5 | 10 mmol/L |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 100 mmol/L | 2 | 8 mmol/L |
| Tween-20 | 10% | 0.25 | 0.1% |
| MgSO_4 | 100 mmol/L | 2 | 8 mmol/L |
| 甜菜碱 | 8 mmol/L | 0.25 | 0.8 mmol/L |
| 模板/空白对照/阴性对照/阳性对照 | 模板根据提取的浓度可酌情加 1 μL ~5 μL ,其他对照加样量为 5 μL | | |
| 灭菌去离子水 | 补足至 25 μL | | |

10.2.2 空白对照、阴性对照和阳性对照的设置

每次实验均应设空白对照、阴性对照和阳性对照:

- 空白对照:以灭菌双蒸水替代核酸模板;
- 阴性对照:以核酸提取液替代核酸模板;
- 阳性对照:含靶序列的核酸作为核酸模板。

10.2.3 反应过程

10.2.3.1 按表 1 配制反应体系,在对应编号的反应管中加入制备的核酸提取液,盖紧管盖,瞬时离心 10 s。防污染方法和措施按 WS/T 230 操作。

10.2.3.2 63 $^{\circ}\text{C}$ 扩增 60 min。

10.3 结果观察

离心 1 200 g, 3 min, 观察白色沉淀产生。

10.4 结果判断和报告

10.4.1 LAMP 反应的质量控制

反应结果应同时符合以下两个条件,否则实验结果无效,应更换试剂重新检测:

- 空白对照和阴性对照反应管离心后未见白色沉淀;
- 阳性对照反应管离心后可见白色沉淀。

10.4.2 LAMP 反应的结果判断和报告

10.4.2.1 阳性:待检标本反应管离心后可见白色沉淀,报告为黄热病毒 LAMP 检测阳性。

10.4.2.2 阴性:待检标本反应管离心后未见白色沉淀,报告为黄热病毒 LAMP 检测阴性。

10.4.2.3 黄热病毒 LAMP 检测阳性,说明从该待测标本中检测到目的基因片段,提示可能有黄热病毒存在,如需确认应对该标本做进一步的分离鉴定,可按 SN/T 1243 进行确认。

附 录 A
(规范性附录)
黄热病毒靶基因序列

黄热病毒 E 基因序列 (Accession No: GQ379162.1, 位置: 2 107 bp~2 321 bp):

2101 tatcgttggg agaggagatt cacgtctcac ttaccagtgg cacaaagagg gaagctcaat
2161 aggaaagttg ttcactcaga ccatgaaagg cgtggaacgc ctggccgtca tgggagacgt
2221 cgctgggat ttcagctcgc ctggagggtt cttcacttcg gttgggaaag gaattcatac
2281 ggtgtttggc tctgccttc aggggctatt tggcggcttg aactggataa caaaggcat
