

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3841—2014

出口贝类中诺如病毒和星状病毒的快速
检测 反转录-环介导恒温核酸扩增
(RT-LAMP)法

Rapid detection of norovirus and astrovirus in shellfish for export—
Reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification method

2014-01-13 发布

2014-08-01 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。

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这些专利的责任。

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：中华人民共和国北京出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：魏海燕、曾静、马丹、张西萌、张蕾。

出口贝类中诺如病毒和星状病毒的快速 检测 反转录-环介导恒温核酸扩增 (RT-LAMP)法

1 范围

本标准规定了贝类中诺如病毒和星状病毒的反转录-环介导恒温核酸扩增(RT-LAMP)快速检测方法。

本标准适用于贝类中诺如病毒和星状病毒的快速检测。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

SN/T 1635 贝类中诺沃克病毒检测方法 普通 RT-PCR 方法和实时荧光 RT-PCR 方法

SN/T 2519 贝类中星状病毒检测方法 普通 PCR 和实时荧光 PCR 方法

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

3.1 Betaine:甜菜碱。

3.2 *Bst* 酶;*Bst* DNA polymerase(large fragment),*Bst* DNA 聚合酶(大片段)。

3.3 dNTP:deoxyribonucleoside triphosphate,脱氧核苷三磷酸。

3.4 LAMP:loop-mediated isothermal amplification,环介导恒温扩增。

3.5 RNA:Ribonucleic acid,核糖核酸。

4 技术概要

利用 GPTT 法(Glycine-PEG-Trizol-oligo dT)或纳米磁珠法提取贝类样品中的病毒 RNA;分别选取星状病毒衣壳蛋白编码基因(ORF2)5'端、G I 型和 G II 型诺如病毒 ORF1 与 ORF2 接头处的高度保守序列,设计 5 条~6 条 RT-LAMP 引物,特异性识别病毒 RNA 上的 7 个~8 个独立区域,在具有链置换作用的 *Bst* 酶、AMV 反转录酶作用下,于等温条件(63 ℃或 65 ℃)保温 60 min,即可一步实现对病毒 RNA 的高效扩增。扩增反应产生大量副产物(焦磷酸镁)形成乳白色沉淀,在反应管中加入 SYBR Green I 荧光染料,阳极反应呈荧光绿色,而阴性反应为荧光橙色。

5 试剂和材料

除有特殊说明外,所有实验用试剂均为分析纯;实验用水符合 GB/T 6682 中一级水的要求。

5.1 引物:RT-LAMP 扩增引物序列见表 1,引物设计示意图参见附录 A。

表 1 RT-LAMP 扩增引物

病毒名称	引物名称	序列(5'-3')
星状病毒	外侧上游引物(Ast-F3)	GCAGGTAAGTGTGAGGTCA
	外侧下游引物(Ast-B3)	GGTTTTGGTCCTGTGACACC
	内侧上游引物(Ast-FIP)	CTGCTCTGTCCC GCCCTCTAATGGCCGCAACAGGAGTA
	内侧下游引物(Ast-BIP)	AGGACTAGAAGACAGCCCGGATGACAATGTTACGGACACGT
	环状上游引物(Ast-LF)	TTGTGAGCGGGCCCTTG
	环状下游引物(Ast-LB)	CGCGGCAAACATCAATCTTCTCA
G I 型诺如病毒	外侧上游引物(G I -F3)	TCTACATTCTGGGTGGCA
	外侧下游引物(G I -B3)	CCCAGCTACTGGTTCATTG
	内侧上游引物(G I -FIP)	AGGAGATCGCGATCCCCTGTCCCATGTTCCGCTGGATGC
	内侧下游引物(G I -BIP)	GCGTCTAAGGACGCCCCAACGGCTCAGCTGTATTTGCCT
	环状上游引物(G I -LF)	ACATGCTCAGATCATGGAAGC
G II 型诺如病毒	外侧上游引物(G II -F3)	GCCCCAACCATGAAGACC
	外侧下游引物(G II -B3)	ACGTGCTCAGATCCGAGAA
	内侧上游引物(G II -FIP)	GAATGCTGGGCCGTGGAGTGTGATACCACACTCCCAGAGG
	内侧下游引物(G II -BIP)	TGCAGAGTTGAAGGAAGGTGGCCCATCTGAACATCGGCTCTT
	环状上游引物(G II -LF)	CCATCAAAGACATCAATTGTATGGG
注: RT-LAMP 引物的设计分别参照 1 型星状病毒 Pune/063681/India 毒株的衣壳蛋白编码基因(ORF2)5'端核酸高度保守序列(accession No. JF327666)、G I 型和 G II 型诺如病毒 ORF1 与 ORF2 接头处高度保守序列(G I 型诺如病毒 accession No. U04469, G II 型诺如病毒 accession No.X86557)。		

5.2 AMV 反转录酶:10 U/ μ L。

5.3 dNTP:10 mmol/L。

5.4 *Bst* 酶:8 U/ μ L。

5.5 10 \times ThermoPol 缓冲液:含 200 mmol/L Tris-HCl(pH 8.8)、100 mmol/L(NH₄)₂SO₄、100 mmol/L KCl、20 mmol/L MgSO₄、1% Triton X-100。

5.6 MgSO₄:50 mmol/L。

5.7 甜菜碱:5 mol/L。

5.8 显色液:浓度为 1 000 \times SYBR Green I。

5.9 阳性对照:G I 型诺如病毒/G II 型诺如病毒/星状病毒阳性样本由具备相关资质的实验室提供,添加于已知的阴性贝类样品中,制成阳性质控样品;也可选用含扩增目的基因的体外转录 RNA 分子(经荧光 RT-PCR 验证,紫外分光光度计进行定量后,稀释成 100 拷贝/ μ L,分装成小份冻存于-80 $^{\circ}$ C,避免反复冻融,保存期限可达一年)作为 RT-LAMP 扩增时的阳性对照,病毒目的基因序列参见附录 A。

6 仪器和设备

6.1 移液器:量程分别为 0.5 μ L~10 μ L、10 μ L~100 μ L、100 μ L~1 000 μ L。

- 6.2 高速台式离心机:最大相对离心力不低于 7 000g。
- 6.3 水浴锅或加热模块:63 ℃和 80 ℃,温度偏差不超过±1 ℃。
- 6.4 计时器。
- 6.5 无 RNase PCR 管:200 μL。
- 6.6 无 RNase 移液器吸头:10 μL、100 μL 和 1 000 μL。

7 检测程序

水产品中 G I 型诺如病毒/G II 型诺如病毒/星状病毒 RT-LAMP 检测程序见图 1。

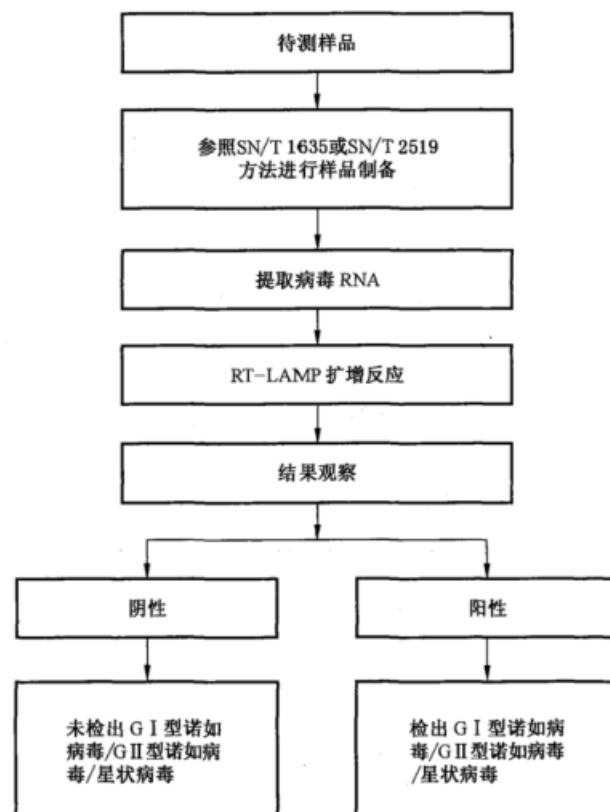


图 1 水产品中 G I 型诺如病毒/G II 型诺如病毒/星状病毒 RT-LAMP 检测程序

8 操作步骤

8.1 样品制备、病毒 RNA 的提取

分别参照 SN/T 1635 和 SN/T 2519 的方法进行诺如病毒和星状病毒样品制备与病毒 RNA 的提取。阳性质控样品与待测样品进行同样处理。

8.2 RT-LAMP 扩增

8.2.1 反应体系

按照表 2 配制 G I 型和 G II 型诺如病毒的反应体系;按照表 3 配制星状病毒的反应体系。分别以 G I 型诺如病毒、G II 型诺如病毒和星状病毒 RNA 作为阳性对照,以不含有 G I 型诺如病毒 G II 型诺如

病毒/星状病毒的贝类 RNA 作为阴性对照,以水代替模板作为空白对照,每个反应体系设置两个平行,反应体系浓度可做适当调整。

表 2 G I 型和 G II 型诺如病毒 RT-LAMP 反应体系

组 分	工作液浓度	加样量 μL	反应体系终浓度
ThermoPol 缓冲液	10×	2.5	1×
外侧上游引物(F3)	10 $\mu\text{mol/L}$	0.5	0.2 $\mu\text{mol/L}$
外侧下游引物(B3)	10 $\mu\text{mol/L}$	0.5	0.2 $\mu\text{mol/L}$
内侧上游引物(FIP)	50 $\mu\text{mol/L}$	1.0	2.0 $\mu\text{mol/L}$
内侧下游引物(BIP)	50 $\mu\text{mol/L}$	1.0	2.0 $\mu\text{mol/L}$
环状上游引物(LF)	50 $\mu\text{mol/L}$	0.4	0.8 $\mu\text{mol/L}$
dNTP	10 mmol/L	3.5	1.8 $\mu\text{mol/L}$
甜菜碱	5 mol/L	4	0.8 mol/L
MgSO ₄	50 mmol/L	3	6 mmol/L
<i>Bst</i> DNA 聚合酶	8 U/ μL	1	0.32 U/ μL
AMV 反转录酶	10 U/ μL	0.5	0.2 U/ μL
RNA 模板	—	5	—
去离子水	—	2.1	—

表 3 星状病毒 RT-LAMP 反应体系

组 分	工作液浓度	加样量 μL	反应体系终浓度
ThermoPol 缓冲液	10×	2.5	1×
外侧上游引物(F3)	10 $\mu\text{mol/L}$	0.5	0.2 $\mu\text{mol/L}$
外侧下游引物(B3)	10 $\mu\text{mol/L}$	0.5	0.2 $\mu\text{mol/L}$
内侧上游引物(FIP)	50 $\mu\text{mol/L}$	0.8	1.6 $\mu\text{mol/L}$
内侧下游引物(BIP)	50 $\mu\text{mol/L}$	0.8	1.6 $\mu\text{mol/L}$
环状上游引物(LF)	50 $\mu\text{mol/L}$	0.4	0.8 $\mu\text{mol/L}$
环状下游引物(LB)	50 $\mu\text{mol/L}$	0.4	0.8 $\mu\text{mol/L}$
dNTP	10 mmol/L	3.5	1.8 $\mu\text{mol/L}$
甜菜碱	5 mol/L	4	0.8 mol/L
MgSO ₄	50 mmol/L	3	6 mmol/L
<i>Bst</i> DNA 聚合酶	8 U/ μL	1	0.32 U/ μL
AMV 反转录酶	10 U/ μL	0.5	0.2 U/ μL
RNA 模板	—	5	—
去离子水	—	2.1	—

8.2.2 反应条件

8.2.2.1 星状病毒:63 °C 恒温扩增 60 min,80 °C 2 min 使酶失活,反应即结束。

8.2.2.2 G I 型/G II 型诺如病毒:65 °C 恒温扩增 60 min,80 °C 2 min 使酶失活,反应即结束。

8.3 结果观察

在上述反应管中加入 2 μL 显色液,轻轻混匀并在黑色背景下观察。阳性反应呈绿色,而阴性反应则保持 SYBR Green I 染料的橙色。

8.4 结果判定

在空白对照和阴性对照反应管液体为橙色,阳性对照反应管液体呈绿色的条件下:

- a) 待检样品反应管液体呈绿色,该样品结果为检出 G I 型诺如病毒/G II 型诺如病毒/星状病毒;
 - b) 待检样品反应管液体呈橙色,则可报告未检出 G I 型诺如病毒/G II 型诺如病毒/星状病毒。
- 若与上述条件不符,则本次检测结果无效,应更换试剂按本方法重新检测。

9 安全措施

实验室安全防护按 GB 19489 的规定执行。

10 防污染措施

检测过程中防污染措施按照 GB/T 27403 的规定执行。

附 录 A
(资料性附录)
RT-LAMP 引物设计示意图

A.1 星状病毒衣壳蛋白编码基因 5'端序列(部分)及引物设计示意图(accession No.JF327666)

```

      F3                               F2
4385 AAGCAGGTA ACTGTTGAGGTCAGTAACAATGGCCGCAACAGGAGT 4430
      LF                               F1
4431 AATCAAGGGCCCCGCTCACAATCTAGAGGGCGGGACAGAGCAGTTAA 4476
      B1                               LB
4477 AATCACAGTTAATTCAAAAAACAGGACTAGAAGACAGCCCCGGACGC 4522
      B2
4523 GGCAAACATCAATCTTCTCAACGTGTCCGTAACATTGTCAATAAGC 4568
      B3
4569 AACTCAGGAAACAAGGTGTCACAGGACCAAACC 4602
  
```

A.2 GⅡ型诺如病毒 ORF1 与 ORF2 接头处高度保守序列(部分)及引物设计示意图(accession No.U04469)

```

      F3                               F2
701 AAATCTACATTCTGCGGTGGCAGGCCATGTTCCGCTGGATGCGCTT 746
      LF                               F1
747 CATGATCTGAGCATGTGGACAGGGGATCGCGATCTCCTGCCCGAT 792
      B1
793 TATGTAAATGATGATGGCGTCTAAGGACGCCCCAAACAAACATGGAT 838
839 GGCACCAGTGGTGCCGGCCAGCTGGTACCAGAGGCAAATACAGCTG 884
      B2                               B3
885 AGCCTATTTCAATGGAACCAGTAGCTGGGGCTGCGACAGCAGCCGC 930
  
```

A.3 GⅢ型诺如病毒 ORF1 与 ORF2 接头处高度保守序列(部分)及引物设计示意图(accession No.X86557)

```

      F3                               F2
4828 GGGCCCCAACCATGAAGACCATCTGAAACAATGATACCACACTCC 4873
      LF
4874 CAGAGGCCCATACAATTGATGTCTTTGATGGGTGAGGCCGCACTCC 4919
      F1                               B1
4920 ACGGCCCAGCATTCTACAGCAAATCAGCAAACCTGGTCATTGCAG 4965
4966 GTTGAAGGAAGGTGGCATGGATTTTTACGTGCCAAGACAAGAGCCG 5011
      B2                               B3
5012 ATGTTTCAGATGGATGAGATTCTCGGATCTGAGCACGTGGGAGGGCG 5057
  
```