



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3306.7—2016

国境口岸环介导恒温扩增(LAMP)检测方法 第7部分:猴痘病毒

Loop-mediated isothermal amplification detection method at frontier port—
Part 7: Monkeypox virus

2016-06-28 发布

2017-02-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

仅供OKAYB10内部学习使用

前 言

SN/T 3306《国境口岸环介导恒温扩增(LAMP)检测方法》共分为 7 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。

本部分为 SN/T 3306 的第 7 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。

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

国境口岸环介导恒温扩增(LAMP)检测方法

第7部分:猴痘病毒

1 范围

SN/T 3306 的本部分规定了国境口岸猴痘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动物携带猴痘病毒的筛选检测。

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 2097 出入境人员猴痘检验规程

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。

Bst:嗜热脂肪芽胞杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

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)

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

Triton X-100:聚乙二醇对异辛基苯基醚[Polyethylene Glycol Mono(*p*-1, 1, 3, 3-tetramethyl butyl) phenyl Ether]

4 生物安全要求

所有有关猴痘病毒的实验室操作应按照规定执行:

- 猴痘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;
- 猴痘病毒未经培养的感染材料的操作在生物安全三级(BSL-3)实验室内进行;
- 猴痘病毒灭活材料的操作在生物安全二级(BSL-2)实验室内进行;
- 猴痘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;
- 猴痘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 疑似感染猴痘病毒的出入境人员。
- 5.2 疑似携带猴痘病毒的出入境动物。

6 技术概要

根据猴痘病毒基因保守序列设计两对内、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,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:位于猴痘病毒基因组 48 332 bp~48 780 bp(参见附录 A),组成如下:

- 外引物 1(F3):5'-CATTGATTTTTCGCGGGATA-3';
- 外引物 2(B3):5'-TCCATCTCCTCCAGAATCTCC-3';
- 内引物 1(FIP):5'-GTTGGTCTACGACAATGGATGCTCATCAGAATCTGTAGGCCGTGT-3';
- 内引物 2(BIP):5'-TCCTTAGTCCAATGTTTTTAATAACCGAAAAATTTCTACGATCTATATTGACGAG-3';
- 环引物(LP):5'-CGTTCTGACACAGAGATTGTGTG-3'。

——*Bst* DNA 聚合酶:酶浓度 8 U/ μ L;

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

——DNA 提取试剂盒;

——Tris-HCl:500 mmol/L;

—— $MgSO_4$:8 mmol/L;

——甜菜碱:8 mmol/L;

—— $(NH_4)_2SO_4$:100 mmol/L;

——KCl:500 mmol/L;

——Triton X-100:10%。

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;

——普通台式离心机;

——高速台式离心机: $\geq 10\,000\ g$;

——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

猴痘病毒 LAMP 检测程序见图 1。

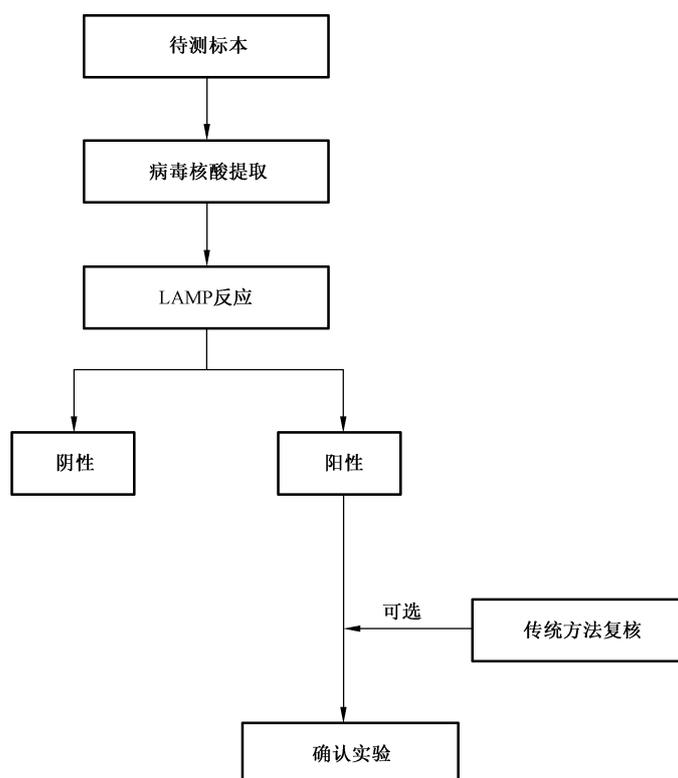


图 1 猴痘病毒 LAMP 检测程序

10 操作步骤

10.1 标本的采集与保存

10.1.1 全血采集:采集疑似病人或疑似携带动物的抗凝全血 5 mL, 2℃~8℃ 运输保存, 长期保存需离心 500 g 10 min 分离血浆冷冻于-70℃ 冰箱。

10.1.2 水疱液和脓疱液采集:采用一次性注射器吸取 0.2 mL 无菌生理盐水, 从疱膜中注入, 来回吸取 2 次~3 次, 吸取内溶液, 装入留样管中, 2℃~8℃ 运输保存, 长期保存需冷冻于-70℃ 冰箱。

10.1.3 皮疹、皮痂采集:取皮疹上盖或者皮痂, 装入留样管中, 密封 2℃~8℃ 运输保存, 长期保存需冷冻于-70℃ 冰箱。

10.2 核酸提取

核酸提取按 SN/T 2097 操作, 也可使用等效市售 DNA 提取试剂盒。

10.3 LAMP 检测

10.3.1 反应体系

待测标本的反应体系见表 1, 也可使用市售等效猴痘病毒 LAMP 试剂盒。

表 1 猴痘病毒 LAMP 反应体系

组分	工作液浓度	加样量	反应体系终浓度
引物 F3	10 $\mu\text{mol/L}$	0.1 μL	0.04 $\mu\text{mol/L}$
引物 B3	10 $\mu\text{mol/L}$	0.1 μL	0.04 $\mu\text{mol/L}$
引物 FIP	50 $\mu\text{mol/L}$	0.4 μL	0.8 $\mu\text{mol/L}$
引物 BIP	50 $\mu\text{mol/L}$	0.4 μL	0.8 $\mu\text{mol/L}$
引物 LP	50 $\mu\text{mol/L}$	0.4 μL	0.8 $\mu\text{mol/L}$
BstDNA 聚合酶	8 U/ μL	1 μL	0.32 U/ μL
甜菜碱	8 mmol/L	2.5 μL	0.8 mmol/L
dNTP	10 mmol/L	2 μL	0.8 mmol/L
Tris-HCl	500 mmol/L	1 μL	20 mmol/L
KCl	500 mmol/L	0.5 μL	10 mmol/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	100 mmol/L	2.5 μL	8 mmol/L
Triton X-100	10 %	0.25 μL	0.10 %
MgSO_4	100 mmol/L	1.7 μL	6.8 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		
ddH ₂ O	补足至 25 μL		

10.3.2 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 DNA 模板；
- 阴性对照：以 DNA 提取液替代 DNA 模板；
- 阳性对照：含靶序列的核酸作为 DNA 模板。

10.3.3 反应过程

10.3.3.1 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。

10.3.3.2 63 $^{\circ}\text{C}$ 扩增 60 min。

10.4 结果观察

离心 1 200 g , 3 min, 观察白色沉淀产生。

10.5 结果判定和报告

10.5.1 LAMP 反应的质量控制

反应结果应同时符合以下两个条件，否则试验结果无效，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。

10.5.2 LAMP 反应的结果判断和报告

10.5.2.1 阳性:待检标本反应管离心后可见白色沉淀,报告为猴痘病毒 LAMP 检测阳性。

10.5.2.2 阴性:待检标本反应管离心后未见白色沉淀,报告为猴痘病毒 LAMP 检测阴性。

10.5.2.3 LAMP 检测阳性,说明从该待测标本中检测到目的基因片段,提示可能有猴痘病毒存在,如需确认应对该样品做进一步的分离或测序鉴定。

附 录 A
(资料性附录)
猴痘病毒靶基因序列

猴痘病毒基因序列(Accession no:HQ857563.1,位置:48 332 bp~48 780 bp):

48301 tcattgattt ttcgcgggat acatcatcta ttatagcadc agcatcagaa tctgtaggcc
48361 gtgtatcagc atccattgic gtagaccaac gaggaggagt atcgtcggaa ctgtacacca
48421 tagtactacg ttgaagatca tacagagcct tattaacttc tcgcttctcc atattaagtt
48481 gtttagttag ttgtgcagta gctccttagt ccaatgtttt taataaccgc acacaatctc
48541 tgtgtcagaa cgctcgtcaa tatagatcgt agaaatttt tagagagAAC taacacaact
48601 agcaataaaa ctgatcttat ttatcattt ttttattcat catcctctgg tggttcgtcg
48661 ttctatcga atgtagctct gattaaccgc tcatttatag gtgatgctgg ttctggagat
48721 tctggaggag atggattatt atccggaaga atctctgtta ttccttggt ttcatgtatc
