

非洲猪瘟病毒等温扩增快速检测方法

Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) for Rapid Detection for African Swine Fever Virus

2020 - 04 - 30 发布

2020 - 05 - 30 实施

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由辽宁省农业农村厅提出并归口管理。

本标准起草单位：辽宁省农业发展服务中心、中国科学院微生物研究所、洛阳莱普生信息科技有限公司、辽宁佰瑞生物科技有限公司。

本标准主要起草人：杨作丰、周晨阳、李秀梅、王宏燕、杨利敏、董娜、刘文军、张皓淳、姚伟、刘洋、刘近、吴洪涛、任雪建、赵培、李蓉、章春燕、吕园园、陈腾。

本标准发布实施后，任何单位和个人如有问题和意见建议，均可以通过来电和来函等方式进行反馈，我们将及时答复并认真处理，根据实际情况依法进行评估及复审。

归口管理部门通讯地址：辽宁省农业农村厅(沈阳市和平区太原北街2号)，联系电话：024-23447862；

标准起草单位通讯地址：辽宁省动物及产品检疫中心（沈阳市沈河区万柳塘路105号甲），联系电话：024-24229579。

非洲猪瘟病毒等温扩增快速检测方法

1 范围

本标准规定了非洲猪瘟病毒等温扩增快速检测方法的技术要求。

本标准适用于非洲猪瘟疫病的诊断、监测及流行病学调查，适用于猪血液、脾脏、淋巴结、肾脏等组织样品中非洲猪瘟病毒核酸的快速检测。

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，仅所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 19489 实验室 生物安全通用要求

3 原理

非洲猪瘟病毒是一种DNA病毒，该检测方法利用6条特异性引物和具有链置换能力的DNA聚合酶，在等温环境下1 h内完成扩增，用于非洲猪瘟病毒的核酸检测。

4 仪器和器材

4.1 高速台式冷冻离心机（离心范围0~20000 r/min）

4.2 冰箱：4℃±1℃冰箱，-20℃±1℃冰箱，-7℃±1℃冰箱

4.3 恒温 LAMP 扩增仪（型号：Gene-8C）

4.4 离心管：15 ml 离心管、1.5 ml 离心管和 0.2 ml PCR 专用离心管

4.5 微量移液器：1000 μl，200 μl，100 μl，50 μl，20 μl，10 μl，2 μl

5 试剂和引物

5.1 样品处理剂

5.2 ASFV-R-Mix

5.3 Bst enzyme

5.4 D-I 矿物油

5.5 阳性对照

5.6 阴性对照

注：本技术规范中使用的试剂，除另有说明外，所有实验使用的试剂等级均为不含DNA或DNase的分析纯或生化试剂；所有试剂均用无菌的容器分装。

6 操作步骤

6.1 样品的采集、前处理、存放与运输

6.1.1 采样注意事项

采集样品及样品前处理过程中应戴一次性手套，样本间不得交叉污染。

6.1.2 采样工具

15 ml离心管和1.5 ml离心管经 121 ± 1 °C高压灭菌20 min；剪刀、镊子经160 °C干热灭菌2 h，无菌管（真空采血管）。

6.1.3 组织病料的采集与前处理

采集疑似非洲猪瘟病毒感染猪的肺脏、肝脏、肾脏、脾脏等组织样品，用无菌的剪刀和镊子剪取待检样品约10 g于组织匀浆器或研钵中充分匀浆或研磨，加入0.3 ml~0.5 ml组织悬液混匀，60 °C，30 min灭活后，将悬液转入无菌Eppendorf管中，4 °C条件下5000 r/min离心10 min，编号备用。

6.1.4 全血及血清样品的采集与前处理

使用含有抗凝血剂（EDTA-紫色盖）的无菌管（真空采血管）从耳静脉或前腔静脉采集血液3 ml~5 ml，60 °C，30 min灭活后，可直接检测；若检测血清，可静置全血样本待血清析出后，直接吸取至无菌Eppendorf管中，60 °C，30 min灭活后，编号备用。

6.1.5 存放与运输

采集或处理的样品在2~8 °C条件下保存应不超过24 h；若需长期保存，应放置-70 °C冰箱，但应避免反复冻融（冻融不超过3次）。采集的样品密封后，采用保温壶或保温桶加冰密封，在8 h之内运送到实验室检测。按照《兽医实验室生物安全技术管理规范》进行样品的生物安全标识。

6.2 样品 DNA 的提取

取10 μl前处理过的样本加入无菌1.5 ml离心管，加入10 μl样品处理剂，混匀，94 °C裂解2 min，瞬时离心，上清即为扩增模板。

6.3 核酸扩增

6.3.1 吸取22 μl ASFV-R-Mix 和1 μl Bst enzyme 加入同一个PCR管，吸取2 μl步骤6.2处理的核酸扩增模板加至PCR管，混匀，设置阴阳性对照；

6.3.2 吸取10 μl D-I 矿物油轻轻加至PCR管液面，切勿震荡混匀；

6.3.3 插入到恒温扩增仪反应槽中；

6.3.4 设置恒温扩增仪器反应条件为：65 °C反应12 min，荧光采集周期20 s。

7 试验成立条件与结果判定

7.1 试验成立条件

使用前用阴、阳性对照进行该检测方法评价，若阳性对照CT值 ≤ 40 ，阴性对照CT值 > 40 ，则检测结果有效。

7.2 结果判定

若CT值 ≤ 40 ，样品应判定为非洲猪瘟病毒核酸阳性；若CT值 > 40 ，样品应判定为非洲猪瘟病毒核酸阴性

8 实验室生物安全要求

按照GB19489 实验室生物安全通用要求执行。

附录 A

(规范性附录)

试剂配制

A.1 样品处理剂的制备

量取80 ml PBS (0.01 mol/L, pH值7.4), 加入10 μ l NP40 (乙基苯基聚乙二醇), 无菌纯化水定容至100 ml, 定量分装, 500 μ l/管, -20 $^{\circ}$ C保存。

A.2 ASFV-R-Mix的制备

A.2.1 引物合成

根据非洲猪瘟病毒p72基因片段的保守结构域设计3对引物, 包括1对内引物 (FIP与BIP)、1对外引物 (F3与B3) 和1对环引物 (LF与LB), 均由上海生工生物工程股份有限公司合成, 序列为:

FIP: 5'-TAACGCCACTATGCAGCCACGGAAGAGCTGAATCTCTATCCT-3'
 BIP: 5'-CAACATGTGCGAACTTGTGCCACATACCTGGAACGTCTCC-3'
 F3: 5'-ATAGGTAATGCGATCGGATACA-3'
 B3: 5'-CCAACAATAACCGCCACGC-3'
 LF: 5'-TCGCCACGCAAAGATAAGC-3'
 LB: 5'-AGCCTCGGTGTTGATGCGGATT-3'

A.2.2 引物混合物的制备

取3对引物 (FIP、BIP、F3、B3、LF和LB) 干粉, 按引物说明书分别加入适量无菌纯化水, 溶解混匀, 得到各引物溶液, 置-20 $^{\circ}$ C保存。

A.2.3 ASFV-R-Mix的配制

称取2.4 g Tris, 0.37 g氯化钾, 0.12 g硫酸镁, 100 μ l吐温-20, 7.029 g甜菜碱, 溶于80 ml纯化水, 依次加入终浓度为1.4 mmol/L dNTPs溶液、0.2 μ mol/L外引物溶液、1.6 μ mol/L内引物溶液、0.8 μ mol/L环引物溶液, 加入无菌纯化水定容至100 ml, 经过0.22 μ m滤器过滤除菌, 分装至2 ml蓝盖可立冻存管中, 1.1 ml/管, -20 $^{\circ}$ C保存。

A.3 Bst enzyme的制备

用于制备本试剂盒的Bst enzyme为商品化DNA聚合酶, 按使用说明书用纯化水稀释至 4×10^6 /L, 分装至0.5 ml白盖可立冻存管中, 100/ μ l管, -20 $^{\circ}$ C保存。

A.4 D-I矿物油

用于制备本试剂盒的D-I矿物油为商品化矿物油, 分装至2 ml黄盖可立冻存管中, 500 μ l/管, -20 $^{\circ}$ C保存。

A.5 阳性对照

采用核酸蛋白质分析仪测定阳性质控品浓度, 计算质粒拷贝数, 用纯化水将其稀释为 10^3 拷贝/ μ l, 分装至0.5 ml红盖可立冻存管中, 100 μ l/管, -20 $^{\circ}$ C保存。

A.6 阴性对照

取纯化水, 分装至0.5 ml绿盖可立冻存管中, 100 μ l/管, -20 $^{\circ}$ C保存。

