

ICS 11.220
B 41
备案号: 58554-2018

DB21

辽宁省地方标准

DB21/T 2871—2017

口蹄疫病毒 RT-LAMP 检测方法

RT-LAMP detection method of the foot and mouth disease virus

辽宁省地方标准全文公开
DB21

2017 - 11 - 16 发布

2017 - 12 - 16 实施

辽宁省质量技术监督局 发布

目 次

| | |
|------------------------------|----|
| 前言 | 2 |
| 1 范围 | 33 |
| 2 规范性引用文件 | 3 |
| 3 RT-LAMP | 3 |
| 3.1 材料与试剂 | 3 |
| 3.1.1 仪器与器材 | 3 |
| 3.1.2 试剂 | 3 |
| 3.2 抽样 | 3 |
| 3.3 操作方法 | 4 |
| 3.3.1 样品的处理 | 4 |
| 3.3.2 检测 | 5 |
| 3.4 结果判定 | 5 |
| 3.4.1 结果分析条件设定 | 5 |
| 3.4.2 质控标准 | 5 |
| 3.4.3 结果描述及判定 | 6 |
| 附录 A (规范性附录) DEPC 水配方 | 7 |
| 附录 B (规范性附录) 磷酸盐缓冲盐水配方 | 8 |

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准的附录A为资料性附录。

本标准由辽宁省畜牧兽医局提出。

本标准由辽宁省畜牧兽医局归口。

本标准负责起草单位：辽宁省动物疫病预防控制中心，辽宁省动物医学研究院。

本标准主要起草人：李井春，曹东，杨本勇，关淼，王宏燕，李蓉，段亚良，李晓楠，刘莹，孙世宇，王竹。



口蹄疫病毒 RT-LAMP 检测方法

1 范围

本标准规定了口蹄疫病毒 RT-LAMP 检测的操作方法。
本标准适用于动物及其产品中口蹄疫病毒的快速筛查。

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/T 22915 口蹄疫病毒荧光RT-PCR检测方法

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 RT-LAMP

3.1 材料与试剂

3.1.1 仪器与器材

时浊度分析仪或水浴锅，计时器，高速台式冷冻离心机，离心速度达 12 000 rpm/min 以上，台式离心机，离心速度达 3 000 rpm/min 以上，混匀器，冰箱，微量可调移液器，含 10 μ L、100 μ L、1 000 μ L 量程及配套带滤芯吸头，1.5 mL Eppendorf 管。

3.1.2 试剂

除特别说明外，本标准所用试剂均为分析纯，所有分装试剂均用无 RNA 酶污染的容器盛装，容器用 DEPC 水处理后高压灭菌，DEPC 水配制方法见附录 A。

病毒总 RNA 提取试剂 Trizol；氯仿：-20℃ 预冷；异丙醇：-20℃ 预冷；PBS：配制方法见附录 B，无菌条件下加入青霉素、链霉素各 10 000 IU/mL；75%乙醇：用新开启的无水乙醇和 DEPC 水配制，符合 GB/T 6682-2008 要求，-20℃ 预冷；灭菌生理盐水；DEPC 水及 ddH₂O；RT-LAMP 检测试剂盒；目视检测试剂盒；

阴性、阳性对照：阳性对照使用兰州兽医研究所液相抗体检测试剂盒的 O 型、AsiaI 型和 A 型口蹄疫病毒抗原对照，阴性对照使用 DEPC 水。

引物：根据下载 FMDV 保守基因区域，设计合成 RT-LAMP 引物，序列见表 1。

3.2 抽样 按 GB/T 22915 方法进行

3.2.1 采样工具

应配备下列采样工具：棉拭子、剪刀、镊子、注射器、1.5 mL Eppendorf 管、研钵，以上工具必须经 21±2℃，15 min 高压灭菌并烘干。

3.2.2 样品采集

3.2.2.1 采集的样品主要为水泡皮、水泡液、血液、口腔分泌物和组织，采集后立即冷藏送检或置于含抗生素 PBS 的灭菌管内低温保藏，编号并作好记录。

表 1 RT-LAMP 引物及序列

| 引物种类 | 引物名称 | 引物序列 |
|------|------|--|
| 外引物 | F3 | 5' -GGAAGTGGGTTTACAAACCTG-3' |
| | B3 | 5' -CGCAGGTAAAGTGATCTGTAGC-3' |
| 内引物 | FIP | 5' -CTGCCACGGAGATCAACTTCTCTGACCCTCGAGGCTATCCTCT-3' |
| | BIP | 5' -CTCGCCGTCCACTCTGGACCTTGAATCTCAAAGAGGCCCTG-3' |

3.2.2.2 水泡液及水泡皮：用 75% 的酒精轻轻消毒水泡表皮，去掉污物后用灭菌生理盐水擦去酒精，然后用注射器穿刺水泡吸取水泡液，置于含抗生素 PBS 的灭菌管内。水泡液采取后，将水泡皮剪下，放入含抗生素 PBS 管内。编号，冷藏或送检。

3.2.2.3 口腔分泌物和咽拭子：用拭子采取口腔分泌物，也可用食道探杯刮取咽喉液体，放入含抗生素 PBS 的灭菌管内。编号，冷藏或送检。

3.2.2.4 血液：用真空采血管或无菌注射器直接采取至无菌的 Eppendorf 管内，编号，冷藏或送检。

3.2.2.5 肌肉或组织脏器：无菌采集待检样品，装入一次性塑料袋或其他灭菌容器，编号，冷藏或送检。

3.2.3 样品贮存

样品采集后，放入密闭的塑料袋内，一个采样点的样品，放一个塑料袋，在保温箱中加冰、密封，送实验室。

3.2.4 样品制备

3.2.4.1 水泡液、血液和口腔分泌物

样品在混匀器上充分混合后，用高压灭菌镊子将拭子中的液体挤出，室温放置 30 min，取上清液转入无菌的 1.5 mL Eppendorf 管中，编号备用。

3.2.4.2 水泡皮、肌肉或组织脏器

取待检样品 2.0 g 于洁净、灭菌并烘干的研钵中充分研磨，加 10 mL PBS 混匀，4℃，3 000 rpm/min 离心 15 min，取上清液转入无菌的 1.5 mL Eppendorf 管中，编号备用。

3.2.5 样品存放

制备的样品在 2℃~8℃ 条件下保存应不超过 24 h，若需长期保存应置 -70℃ 以下，但应避免反复冻融，冻融不超过 3 次。

3.3 操作方法

3.3.1 样品的处理

按 GB/T 22915 进行，在样品制备区进行。

- 3.3.1.1 取 n 个灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管，其中 n 为被检样品、阳性对照与阴性对照的和，编号。
- 3.3.1.2 每管加入 600 μ L 裂解液，分别加入被检样品、阴性对照、阳性对照各 200 μ L，一份样品换一个吸头，再加入 200 μ L 氯仿，混匀器上振荡混匀 5s，不能过于强烈，以免产生乳化层，也可以用手颠倒混匀。于 4 $^{\circ}$ C、12 000 rpm/min 离心 15 min。
- 3.3.1.3 取与 3.3.1.1 相同数量灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管，加入 -20 $^{\circ}$ C 预冷的异丙醇 500 μ L，做标记。
- 3.3.1.4 于 4 $^{\circ}$ C、12 000 rpm/min 离心 15 min，小心倒去上清，倒置于吸水纸上，沾干液体，不同样品须在吸水纸不同地方沾干；加入 1 000 μ L 75% 乙醇，颠倒洗涤。
- 3.3.1.5 于 4 $^{\circ}$ C、12 000 rpm/min 离心 10 min，小心倒去上清，倒置于吸水纸上，尽量沾干液体，不同样品须在吸水纸不同地方沾干。
- 3.3.1.6 4 000 rpm/min 离心 10 s，将管壁上的残余液体甩到管底部，用微量加样器将其吸干，一份样本换一个吸头，吸头不要碰到有沉淀一面，室温干燥 3 min，不能过于干燥，以免 RNA 不溶。
- 3.3.1.7 加入 11 μ L DEPC 水，轻轻混匀，溶解管壁上的 RNA，2 000 rpm/min 离心 5s，冰上保存备用。提取的 RNA 须在 2 h 内进行 RT-LAMP 反应；若需长期保存须放置 -70 $^{\circ}$ C 冰箱。

3.3.2 检测

3.3.2.1 RT-LAMP 反应，总体积 25 μ L。

| | |
|-------------------|--------------|
| 2 \times Buffer | 12.5 μ L |
| FIP (50mM) | 1.2 μ L |
| BIP (50mM) | 1.2 μ L |
| E3 (10mM) | 0.5 μ L |
| B3 (10mM) | 0.5 μ L |
| 目视检测试剂 | 1.0 μ L |
| 酶溶液 | 1.0 μ L |
| RNA | 5 μ L |
| DEPC 水 | 2.1 μ L |

离心后的 PCR 管放入 RT-LAMP 浊度分析仪内，或置于已调好温度的水浴锅内，记录样本摆放顺序。

反应条件设置：

第一阶段，63 $^{\circ}$ C/60 min；

第二阶段，80 $^{\circ}$ C/5 min。

3.4 结果判定

3.4.1 结果分析条件设定

试验结束后，根据收集的荧光曲线和反应液颜色变化或在紫外光下观察是否发出绿色荧光进行结果判定。

3.4.2 质控标准

- 3.4.2.1 阴性对照无扩增曲线，且反应后液体为橙色；在紫外光下未见绿色荧光发出。
- 3.4.2.2 阳性对照出现典型的扩增曲线，且反应后液体为绿色；在紫外光下可见绿色荧光发出。否则，此次实验视为无效。
- 3.4.3 结果描述及判定
 - 3.4.3.1 阴性：无扩增曲线，且反应后液体为橙色；在紫外光下未见绿色荧光发出。
 - 3.4.3.2 阳性：出现典型的扩增曲线，且反应后液体为绿色；在紫外光下可见绿色荧光发出。



附录 A
(规范性附录)
DEPC 水配方

A.1 DEPC 原液

可向相关公司购买。

A.2 B 液

去离子水或蒸馏水。

A.3 0.1%DEPC 水的配制

A 液 1mL。

B 液 999 mL。

总体积 1 000 mL。

混匀, 103 kPa 高压蒸汽灭菌 30 min。



附 录 B
(规范性附录)
磷酸盐缓冲盐水配方

以下所用试剂均为分析纯。

B.1 A液

0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液。

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 27.6 g, 溶于蒸馏水中, 最后稀释至 1 000 mL。

B.2 B液

0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液。

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53.6 g, (或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.6 g 或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 35.6 g) 加蒸馏水溶解, 最后稀释至 1 000 mL。

B.3 0.01 mol/L、pH7.2 磷酸盐缓冲盐水的配制

0.2 mol/L A液 14 mL。

0.2 mol/L B液 36 mL。

加 NaCl 8.5 g。

用蒸馏水稀释至 1 000 mL。

辽宁省地方标准全文公开
DB21