

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3327—2012

猪瘟病毒逆转录环介导等温 核酸扩增检测方法

Quarantine protocol for classic swine fever virus by loop-mediated
isothermal amplification

2012-12-12 发布

2013-07-01 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。

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：中华人民共和国上海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：李健、熊炜、张强、蒋静、邱璐、王巧全、黄忠荣、胡永强。

猪瘟病毒逆转录环介导等温 核酸扩增检测方法

1 范围

本标准规定了猪瘟病毒逆转录环介导等温核酸扩增检测的操作方法。
本标准适用于猪瘟病毒的快速筛查。

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 18088 出入境动物检疫采样

GB 19489—2008 实验室 生物安全通用要求

3 概述

猪瘟(classical swine fever,CSF),是由猪瘟病毒(classical swine fever virus,CSFV)引起的一种急性、热性、高度接触性传染病,对猪养殖业危害极为严重。CSFV 基因型为单股正链 RNA,基因组长约 123 kb,仅含有一个大的开放性阅读框架(ORF)。本标准利用环介导等温核酸扩增技术在恒温条件下快速、高效、特异地扩增位于猪瘟病毒 5'端非编码区(5'-UTR)的靶序列,从而达到快速检测的目的。

4 试剂和材料

4.1 *Bst* DNA 聚合酶(大片段):酶浓度为 8 U/ μ L, -20°C 保存,避免反复冻融。

4.2 10 倍 ThermoPol 聚合酶浓缩缓冲液: -20°C 保存。

4.3 硫酸镁溶液(MgSO_4):浓度为 25 mmol/L, -20°C 保存。

4.4 AMV 逆转录酶:逆转录酶浓度为 5 U/ μ L, -20°C 保存,避免反复冻融。

4.5 甜菜碱溶液(Betaine):浓度为 5 mol/L, -20°C 保存,避免反复冻融。

4.6 dNTPs:含 dATP、dGTP、dCTP、dTTP 各 10 mmol/L, -20°C 保存。

4.7 LAMP 引物:引物配成浓度 25 μ mol/L, -20°C 保存备用。其序列如下:

——正向外引物(CSFV-F3):5'-AGC-TCC-CTG-GGT-GGT-CTA-3';

——反向外引物(CSFV-B3):5'-CCT-AAT-AGT-GGG-CCT-CTG-CA-3';

——正向内引物(CSFV-FIP):5'-GCC-CTC-GTC-CAC-ATA-GCA-TCT-CAG-TAC-AGG-ACA-GTC-GTC-AGT-3';

——反向内引物(CSFV-BIP):5'-GCC-CAA-GAC-ACA-CCT-TAA-CCC-TTC-AGG-TCG-TAC-TCC-CAT-CAC-3';

——正向环引物(CSFV-LF):5'-GGG-CTT-CTG-CTC-ACG-TCG-3';

——反向环引物(CSFV-LB):5'-GGT-CGC-TAG-GGT-GAA-ATC-3'。

4.8 SYBR Green I 荧光染料溶液: -20°C 保存。