|  |  |
| --- | --- |
| ICS | 11.220 |
| CCS | |  | | --- | | D:\000000部门项目\09标准化插件开发\程序源代码\StandardEditor_ShanDongKeXieYuan\团标首页面字母T.pngD:\000000部门项目\09标准化插件开发\程序源代码\StandardEditor_ShanDongKeXieYuan\团标首页面字母T后面的反斜杠.png GXAS |   B 41 |

团体标准

T/GX XXXX—XXXX

鸡传染性支气管炎病毒荧光重组酶介导

等温扩增检测方法

Fluorescent recombinase-aided amplification method for detection of

avian infectious bronchitis virus

（本草案完成时间：2023年10月25日）

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

广西标准化协会  发布

1. 前言

本文件参照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

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。

本文件由广西兽医协会提出归口并宣贯。

本文件起草单位：广西大学、广西璞缔恩葳生物技术有限公司、广西祝氏农牧有限责任公司、广西参皇养殖集团有限公司、广西鸿光农牧有限公司、南宁市良凤农牧有限责任公司、广西金陵农牧集团有限公司、广西富凤农牧集团有限公司、广西园丰牧业集团股份有限公司、广西贵港市港丰农牧有限公司。

本文件主要起草人：磨美兰、张桃妮、唐金文、张愉、陈基明、韦天超、黄腾、黄鉴妮、陈秋英、何晓霞、梁星雪、黄湘华、胡艳、黄玉敏、李和鸣、杨福剑、唐雪梅、陈莹、张宗尧、黄建烨、甘业仙、蒋维维、林铁昌、黄超、覃俊江、卢静、苏保华、黎卓炎。

鸡传染性支气管炎病毒荧光重组酶介导等温扩增检测方法

* 1. 范围

本文件制定了鸡传染性支气管炎病毒荧光重组酶介导等温扩增检测方法的推荐性团体标准，包括原理、试验条件、试剂与材料、仪器设备、样品采集和处理、重组酶介导等温扩增方法操作步骤和结果判定。

本文件主要用于鸡传染性支气管炎病毒的核酸检测、鸡传染性支气管炎病毒感染的诊断和流行病学调查。

* 1. 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 23197-2022 鸡传染性支气管炎诊断技术

GB 19489-2008 实验室 生物安全通用要求

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

* 1. 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

IBV：鸡传染性支气管炎病毒（Avian infectious bronchitis virus）

AIV: 禽流感病毒（Avian influenza virus）

aMPV: 禽偏肺病毒（Avian metapneumovirus ）

NDV：新城疫病毒（Newcastle disease virus）

ILTV：禽传染性喉气管炎病毒（Avian infectious laryngo-tracheitis virus）

MDV：马立克氏病毒（Marek’s disease virus ）

IBDV：传染性法氏囊病毒（Infectious bursal disease virus ）

RAA：荧光型重组酶介导等温扩增（Recombinase-aided amplification）

* 1. 原理

重组酶介导等温扩增方法（RAA）是在现有体外核酸扩增原理的基础上发展起来的恒温体外快速扩增核酸技术。RAA法利用重组酶、单链结合蛋白和DNA聚合酶代替了传统PCR的热循环解链过程。在37-42℃恒温下, 该重组酶可与引物DNA紧密结合, 形成酶和引物的聚合体, 当引物在模板DNA上匹配到与之完全互补的序列时, 单链DNA结合蛋白会使得模板DNA解开双链, 之后在DNA聚合酶的协助下, 形成新的DNA互补链。荧光型RAA基于RAA上添加了特异性探针，探针中含有一个四氢呋喃残基，两侧的T碱基分别用荧光团和猝灭剂标记，并在探针的3’端连接一个阻断基团（c3间隔区）。当探针同靶序列结构形成双链DNA，大肠杆菌核酸内切酶识别到探针上的四氢呋喃修饰位点，从而进行剪切四氢呋喃，释放荧光基团，检测到荧光信号。因此，随着持续的扩增，扩增产物的积累促进荧光信号也相应的增强并且也得到了实时监测。

* 1. 试验条件

进行本实验的IBV、AIV、aMPV、NDV、 ILTV、 MDV、 IBDV以及疑似IBV感染的144份病料检测时，样品的收集与处理，核酸的提取等，均按照GB19489-2008执行。

* 1. 试剂和材料
     1. 引物和探针序列

引物和探针序列见附录A.1。

* + 1. DNA/RNA抽提试剂盒

商品化试剂盒。

* + 1. HiFiScript cDNA Synthesis 试剂盒

将RNA反转录为cDNA，置于-20℃保存。

* + 1. IBV M基因与pMD™18-T Vector

将M基因与pMD™18-T Vector连接，构建标准质粒。

* + 1. 基础型核酸扩增试剂（RAA法）

商品化试剂盒，包含A Buffer和B Buffer。

* + 1. 荧光型核酸扩增试剂（RAA法）

商品化试剂盒，包含A Buffer和B Buffer。

* + 1. DL500 DNA Marker

商品化试剂。

* + 1. 琼脂糖

商品化试剂。

* + 1. LB液体/固体培养基

氯化钠 1 g

酵母提取物 0.5 g

蛋白胨 1 g

琼脂粉（固体培养基） 1.5 g

将上述试剂按次序溶于100 mL去离子水中，充分溶解，高压消毒灭菌101 kPa、121℃、30 min，于4℃冰箱保存备用。

* 1. 仪器设备

Genchek等温荧光检测仪；天平：称量范围0 g-500 g，读数精确度0.01 g；低温离心机；迷你涡旋震荡器；微量可调移液器（0.5 μL～2 μL、1 μL～10 μL、10 μL～100 μL、100 μL～1000 μL 各1支）及配套一次性移液器吸头；灭菌1.5 mL、200μL离心管；冰箱；37℃摇床；37℃培养箱。

* 1. 样品的采集和处理

鸡只肾脏、气管、肛拭子、咽拭子等样品的采集与处理按照GB/T 23197-2022和 NY/T 541执行。

* 1. 操作步骤
     1. 病毒RNA/DNA的抽提

根据RNA/DNA试剂盒提取要求，抽提IBV、AIV、aMPV、NDV、 ILTV、 MDV、 IBDV以及疑似IBV感染的144份病料的DNA/RNA，并将RNA反转录至cDNA后，置于-20℃保存。

* + 1. 标准质粒的构建以及引物和探针的设计

将NCBI收录的代表性的IBV M基因序列进行比对分析后，将M基因片段与表达载体pMD™18-T进行16℃低温连接，转化至DH-5α感受态细胞，冰浴30 min，42℃热激90 s迅速放回冰上静置3 min。加800 μL不含抗生素的LB培养基，37℃，200 rpm 复苏3 h，之后涂布至含氨苄霉素抗性的LB平板，37℃培养12 h-16 h后挑取单菌落接种至含氨苄霉素抗性的液体LB培养基中培养3 h后，进行菌液PCR鉴定，阳性结果送往生物公司进行测序。之后将测序符合预期的菌液以1:100的比例接种于新鲜的含100 μg/mL氨苄霉素的LB液体培养基中，37℃培养12-16 h，之后抽提标准质粒保存于-20℃备用。三对引物和一对探针均设计在M基因的保守区域。

* + 1. 引物的筛选

将设计的三对引物按照基础型RAA反应试剂盒说明书进行反应，将反应产物在1.2%的琼脂糖凝胶上进行电泳，选择条带单一，无引物二聚体，特异性好，扩增目的片段较短的引物1作为最佳引物（引物筛选电泳图见附录A.2）。

基础型RAA反应体系(50 μL)：

反应干粉 1管

A Buffer 41.5 μL

上游引物(10 μM) 2.0 μL

下游引物(10 μM) 2.0 μL

模板 2.0 μL

B Buffer 2.5 μL

* + 1. 荧光型RAA反应体系的建立

使用IBV重组标准质粒作为模板按照RAA荧光型反应试剂盒说明书推荐的50 μL体系配制荧光 RAA反应体系。在5-20分钟内实时检测阴阳性样品扩增情况。结果发现5分钟内可完成荧光信号的采集，5-20分钟可完成样品的检测；阴性样品无荧光信号且无扩增曲线，阳性样品存在较强的荧光信号且出现明显的扩增曲线（见附录B.1）。

荧光型RAA反应体系(50 μL)：

反应干粉 1管

A Buffer 25.0 μL

上游引物(10 μM) 2.0 μL

下游引物(10 μM) 2.0 μL

探针(10 μM) 0.6 μL

模板 2.0 μL

DNase-Free Water 15.9 μL

B Buffer 2.5 μL

* + 1. 荧光型RAA反应引物浓度的优化

摸索反映的最佳引物浓度，结果发现，扩增效率随着引物浓度的增加而提高，考虑到成本，选择最合适的引物浓度10.0 μM（见附录B.2）。

* + 1. 荧光型RAA反应探针浓度的优化

摸索最佳的荧光探针浓度，结果发现，RAA反应的荧光峰值随着探针浓度的增加而提高。综合考虑，荀泽最经济合理的探针浓度13.0 μM（见附录B.3）。

* + 1. 荧光型RAA反应的特异性试验

使用优化好的反应条件，同时检测IBV、AIV、aMPV、NDV、ILTV、MDV、IBDV，验证方法的特异性，发现该方法仅针对IBV，与其他常见禽类病原无交叉反应（见附录B.4）。

* + 1. 荧光型RAA反应的灵敏性试验

分别向50 µL荧光RAA反应体系中加入104 copies/µL、103 copies/µL、102copies/µL、101 copies/µL 和100 copies/µL的IBV的阳性质粒样品（2 µL）。使用Genchek荧光检测仪设置反应体系并且选择荧光通道“FAM”进行荧光RAA反应，测试荧光RAA反应的灵敏性。结果发现，最低拷贝数为101 copies/µL（见附录B.5）。

* + 1. 荧光型RAA反应的重复性试验

在同一时间段和不同时间段使用标准质粒配置荧光RAA反应体系进行反应，重复3次。试验结果均有荧光信号，说明该方法重复性良好。

* + 1. 临床应用

使用建立的方法检测肛拭子、咽拭子、肾脏、气管共144份样品，同时使用荧光定量PCR进行平行检测，结果发现两种方法的符合率为100％。

* 1. 结果判定

在检测的20分钟内，阴性对照样品无荧光信号且无扩增曲线成立的条件下，待检样本存在荧光值且有明显的扩增曲线时，判读为阳性，反之判读为阴性。

* 1. 生物安全措施

生物安全措施按照GB 19489-2008 的规定执行。

* 1. 废弃物处理和防止污染的措施

试验过程中注意做好个人的安全防护工作，废弃物应做好无害化处理。

1. （资料性）

荧光RAA引物、探针设计及引物筛选

* 1. 荧光RAA方法引物和探针序列

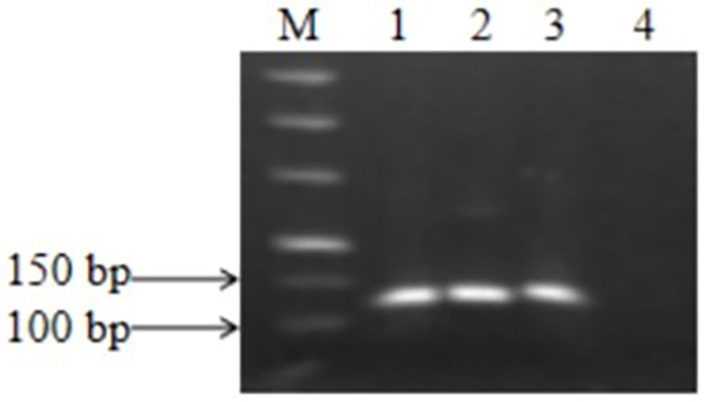
见图A.1。

表A.1 荧光RAA方法引物和探针序列

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Primer/Probe | Sequences (5′-3′) | Gene  Location | Amplicon size (bp) |
| Primer 1 | F1: GTTCAATACTCCTAACTAATGGTCAACAAT | 377-495 | 119 |
| R1: CTTAGCAAGCCACTGACCTTCACAATAAAG |
| Primer 2 | F2: GGTTCAATACTCCTAACTAATGGTCAAC | 376-498 | 123 |
| R2: ACACTTAGCAAGCCACTGACCTTCACAATA |
| Primer 3 | F3: GCCGTAGGTTCAATACTCCTAACTAATGG | 370-501 | 132 |
| R3: TTCACACTTAGCAAGCCACTGACCTTCACA |
| IBV-P | TAATGGTCAACAATGTAATTTTGC/i6FAMdT/  [THF]/iBHQ1dT/AGAGAGTGTGCCAA-C3 Spacer | 394-434 | 41 |

* 1. 荧光RAA方法引物筛选

见图A.2。

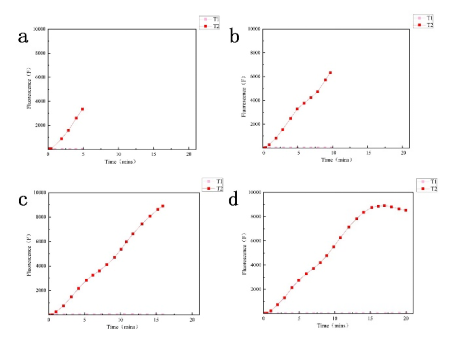


1. DNA分子量标准；1. Primer1; 2. Primer2; 3. Primer 3; 4. 阴性对照.

图A.2 荧光RAA方法引物筛选图

1. （规范性）  
   荧光RAA反应条件的优化
   1. 荧光RAA方法的建立

见图B.1。



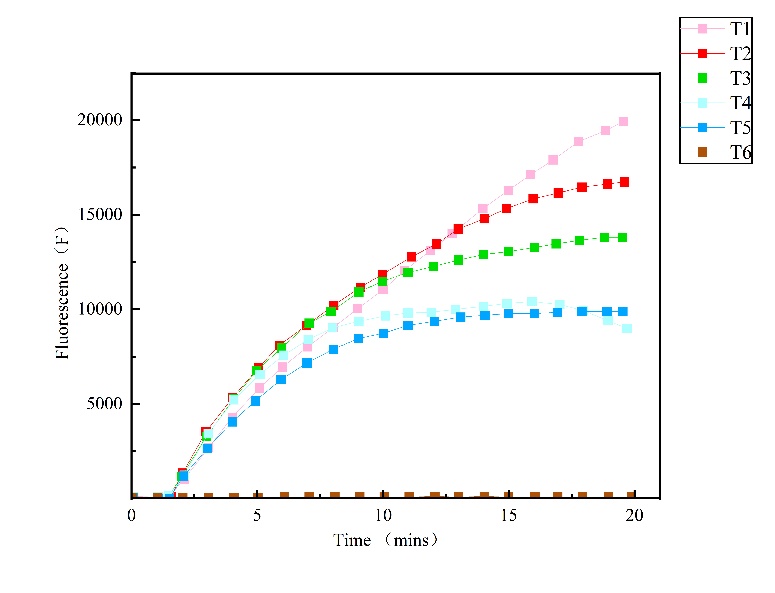
T1: 阴性对照; T2: 阳性对照.

荧光RAA在5分钟、10分钟、15分钟和20分钟的荧光曲线如图a、 b、 c和 d所示.

图B.1 5-20 min内荧光RAA扩增曲线图

* 1. 荧光RAA方法引物浓度的摸索

见图B.2。

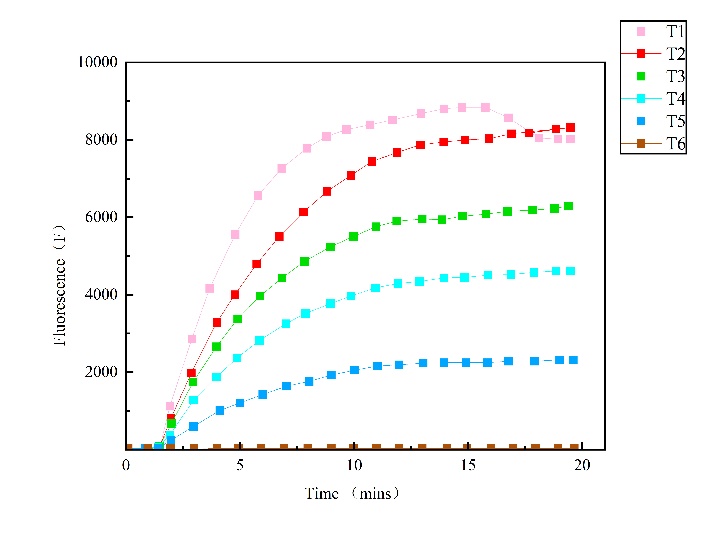


T1: 12.5 μM; T2: 10.0 μM; T3: 7.5 μM; T4: 5.0 μM; T5: 2.5 μM; T6: 阴性对照.

图B.2荧光RAA方法引物浓度摸索图

* 1. 荧光RAA方法探针浓度的摸索

见图B.3。

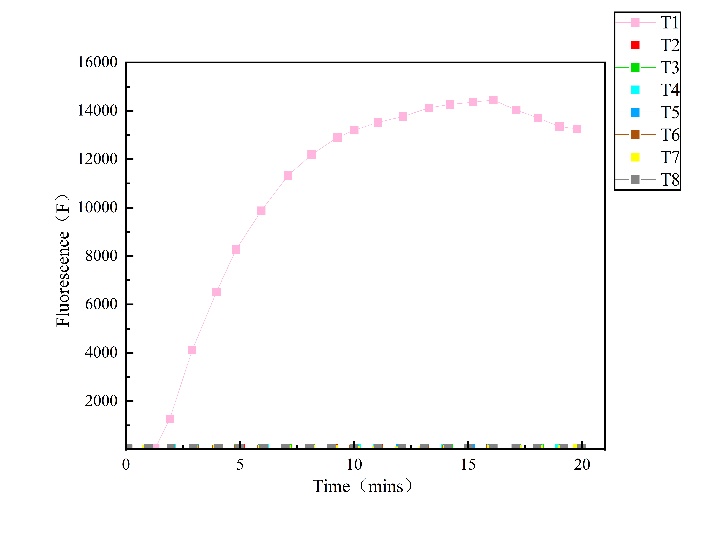


T1: 16.0 μM; T2: 13.0 μM; T3: 10.0 μM; T4: 6.0 μM; T5: 3.0 μM; T6: 阴性对照.

图B.3荧光RAA方法探针浓度摸索图

* 1. 荧光RAA方法特异性试验

见图B.4。

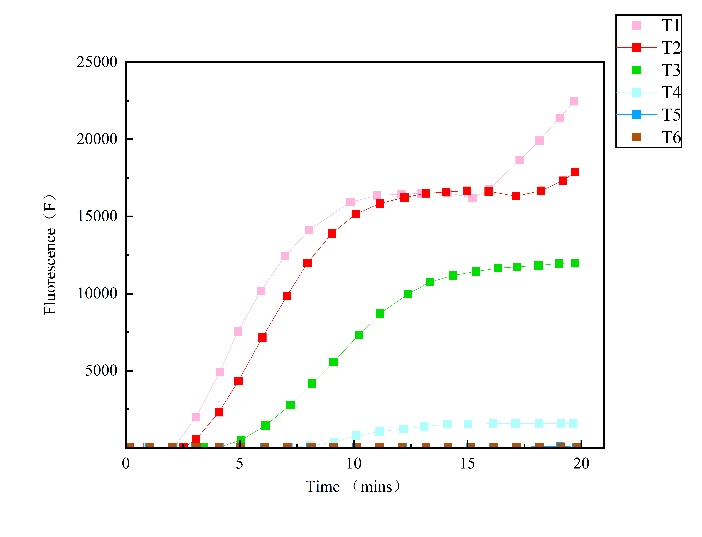


T1: IBV; T2: AIV; T3: aMPV;T4: NDV; T5: ILTV; T6: MDV; T7: IBDV; T8: 阴性对照.

图B.4 荧光RAA方法特异性试验图

* 1. 荧光RAA方法灵敏性试验

见图B.5。



T1: 104 copies/μL; T2: 103 copies/μL; T3: 102 copies/μL; T4: 101 copies/μL;

T5: 100 copies/μL; T6: 阴性对照.

图B.5荧光RAA方法灵敏性试验图

