

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2841—2015

猪传染性胃肠炎病毒RT-nPCR检测方法

Method of detecting transmissible gastroenteritis virus by RT-nPCR

2015-10-09 发布

2015-12-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会归口(SAC/TC 181)。

本标准起草单位：中国动物卫生与流行病学中心、东北农业大学、河南农业大学、河南牧业经济学院。

本标准起草人：邵卫星、魏荣、李晓成、李一经、黄耀华、魏战勇、徐耀辉、吴发兴、张志、刘爽、董亚琴、孙映雪、李卫华、王树双、黄保续。

猪传染性胃肠炎病毒 RT - nPCR 检测方法

1 范围

本标准规定了检测猪传染性胃肠炎病毒 RT - nPCR 方法的技术要求。

本标准适用于检测疑似感染猪传染性胃肠炎病毒的猪的新鲜粪便、小肠组织及肠内容物和细胞培养物中的猪传染性胃肠炎病毒的核酸,可作为猪传染性胃肠炎的辅助诊断方法和细胞培养物中猪传染性胃肠炎病毒的鉴定。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法。

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件:

AMV:禽成髓细胞瘤病毒 avian myeloblastosis virus

RT - nPCR:反转录—巢式聚合酶链式反应 reverse transcriptase - nested polymerase chain reaction

RNA:核糖核酸 ribonucleic acid

DEPC:焦碳酸二乙酯 diethylpyrocarbonate

PBS:磷酸盐缓冲液(配方见附录 A.1) phosphate - buffered saline buffer

Taq 酶:Taq DNA 聚合酶 Taq DNA polymerase

dNTPs:脱氧核糖核苷三磷酸 deoxyribonucleoside triphosphates

bp:碱基对 base pair

4 试剂

除另有规定外,所用生化试剂均为分析纯,水为符合 GB/T 6682 的灭菌双蒸水或超纯水。提取 RNA 所用试剂均须使用无 RNA 酶水配制,分装的容器需无 RNA 酶。

- 4.1 磷酸盐缓冲液:配方见附录 A.1。
- 4.2 RNA 提取试剂:Trizol LS。
- 4.3 氯仿(警告:危险)。
- 4.4 异丙醇。
- 4.5 75%的乙醇。
- 4.6 DNA 分子量标准:DL2 000。
- 4.7 AMV 反转录酶及反应缓冲液。
- 4.8 dNTPs Mixture。
- 4.9 RNA 酶抑制剂(40 U/ μ L)。
- 4.10 rTaq mix。
- 4.11 反转录及 PCR 扩增引物:见附录 B。

- 4.12 无 RNA 酶超纯水。
- 4.13 1.5%琼脂糖:配方见 A.3。
- 4.14 电泳缓冲液(TAE):配方见 A.4。
- 4.15 样品处理液:配方见 A.2。
- 4.16 阳性样品:参见 C.1。
- 4.17 阴性样品:参见 C.2。

5 仪器设备

- 5.1 高速冷冻离心机:要求最大离心力在 12 000 ×g 以上。
- 5.2 PCR 扩增仪。
- 5.3 核酸电泳仪和水平电泳槽。
- 5.4 恒温水浴锅。
- 5.5 2℃~8℃ 冰箱和-18℃冰箱。
- 5.6 微量加样器(0.5 μL~10 μL, 2 μL~20 μL, 20 μL~200 μL, 100 μL~1 000 μL)。
- 5.7 组织研磨器或研钵。
- 5.8 凝胶成像系统(或紫外透射仪)。

6 样品的采集、运输和处理

6.1 样品采集和运输

宜采集腹泻急性期的小肠或新鲜粪便。采集小肠(5 cm~10 cm)或新鲜粪便(5 g~10 g),置于样品密封袋中,在低温保存箱中送实验室,应确保样品到实验室时附带的冰袋未完全融化,如不能及时检测,应将样品置于低于-18℃冰箱中保存。

6.2 样品处理

6.2.1 小肠样品

取 1 cm~3 cm 小肠组织,用剪刀剪碎,加入 10 mL 的 PBS。用组织研磨器研磨后反复冻融 3 次,经 12 000 r/min 离心 5 min,取上清备用。

6.2.2 粪便样品

取 0.5 g~1.0 g 新鲜粪便,加入 800 μL 样品处理液。反复冻融 3 次,经 12 000 r/min 离心 5 min,取上清备用。

6.2.3 细胞培养物样品

取细胞培养物 300 μL~500 μL,无需任何处理,备用。

7 RNA 的提取

下列方法任选其一。在提取 RNA 时,应设立阳性对照样品和阴性对照样品,按同样的方法提取 RNA。RNA 的提取宜在无 RNA 污染的外排式生物安全柜中进行。

- a) Trizol 法。按照生产厂家提供的操作说明进行,步骤如下:取 250 μL 上清作为待提取样品。加入 750 μL Trizol,振荡混匀后,室温放置 5 min。加入氯仿 250 μL,振荡混匀后,室温放置 5 min~15 min,4℃ 12 000 r/min 离心 15 min。取上层水相 400 μL~500 μL,加入等体积的异丙醇,混匀,-20℃放置 2 h 以上或-80℃放置 0.5 h,4℃ 12 000 r/min 离心 10 min。去上清,缓缓加入 75%乙醇(用 DEPC 水配制)1.0 mL 洗涤,4℃ 12 000 r/min 离心 5 min。去上清,室温干燥 20 min,加入 DEPC 水 20 μL,使充分溶解。

b) 选择市售商品化 RNA 提取试剂盒,按照试剂盒说明进行 RNA 的提取。

8 RT-nPCR 程序*

8.1 反转录(RT)

8.1.1 RT 反应体系(20 μ L 体系)

参见附录 D.1。

8.1.2 RT 反应程序

室温放置 5 min,42 $^{\circ}$ C 水浴 1 h,70 $^{\circ}$ C 15 min,冰浴 5 min。取出后可以直接进行 PCR,或者放于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。试验中,同时设立阳性对照和阴性对照。

8.2 第一轮 PCR 扩增

8.2.1 PCR 体系(20 μ L 体系)

参见 D.2。

8.2.2 PCR 程序

94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后进入 PCR 循环,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,20 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min,结束反应。同时,设阳性对照和阴性对照。

8.3 第二轮 PCR 扩增

8.3.1 PCR 体系(20.0 μ L 体系)

参见 D.3。

8.3.2 PCR 程序

95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后进入 PCR 循环,94 $^{\circ}$ C 变性 20 s,60 $^{\circ}$ C 退火 15 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s,30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min,结束反应。

9 电泳

9.1 制备 1.5%琼脂糖凝胶板。

9.2 取第二轮 PCR 扩增产物 5.0 μ L,加入琼脂糖凝胶板的加样孔中,同时加入 DNA 分子量标准作对照。

9.3 盖好电泳仪盖子,插好电极,电压为 10 V/cm~20 V/cm,时间为 30 min。

9.4 用紫外凝胶成像系统对图片拍照、存档。

9.5 与 DNA 分子量标准进行比较,判断 PCR 片段大小。

10 结果判定

10.1 试验成立的条件

阳性对照有 210 bp 的特异扩增条带,阴性对照没有相应条带,否则试验不成立。

10.2 样品检测结果判定

在阳性对照、阴性对照都成立的前提下,若检测样品有 210 bp 的条带,则判定该样品中猪传染性胃肠炎病毒阳性;若检测样品没有 210 bp 的条带,则判定该样品中猪传染性胃肠炎病毒为阴性(参见附录 E)。在需要的情况下,可对扩增的条带进行回收,克隆到 T 载体,进行测序,所得序列与 GenBank 上的猪传染性胃肠炎病毒 S 基因的序列进行同源性比较,以进一步验证 PCR 检测结果。

* 可以将反转录和第一轮 PCR 扩增合并在一个管中进行反应,即所谓的反转录和 PCR 一步法。反应体系可按试剂生产商提供的进行;反转录条件可按试剂生产商提供的进行,但 PCR 条件宜根据 8.2.2 PCR 程序进行。

附 录 A
(规范性附录)
溶液的配制

A.1 PBS液(0.01 mol/L PBS, pH 7.4)

磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.20 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.90 g
氯化钠(NaCl)	8.00 g
氯化钾(KCl)	0.20 g
蒸馏水	加至 1 000.00 mL

溶解后,调节 pH 至 7.4,保存于 4℃ 备用。

A.2 样品处理液(200 mL)

氯化钠(NaCl)	1.6 g
氯化钾(KCl)	0.04 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	0.288 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.048 g
乙二胺四乙酸二钠($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	3.722 4 g

加去离子水定容至 200 mL, 121℃ 灭菌 25 min 后备用。

A.3 1.5% 琼脂糖凝胶

琼脂糖	1.5 g
1×TAE 电泳缓冲液	加至 100 mL

微波炉中完全融化,待冷至 50℃~60℃ 时,加溴化乙锭(EB)溶液或其他替代染料 5 μL ,摇匀,倒入电泳板上,凝固后取下梳子,备用。

A.4 电泳缓冲液

50×TAE 核酸电泳缓冲液 (250 mL):

Tris	60.5 g
冰醋酸	14.3 mL
乙二胺四乙酸二钠($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	9.3 g

加去离子水定容至 250 mL, 4℃ 保存备用。电泳时,用蒸馏水稀释 50 倍使用。

附录 B
(规范性附录)

检测猪传染性胃肠炎病毒 RT-nPCR 方法的引物序列

检测猪传染性胃肠炎病毒 RT-nPCR 方法的引物序列见表 B. 1。

表 B. 1

引物名称	引物浓度	引物序列
F1	10 pmol/μL	5'-GGGTAAGTTGCTCATTAGAAATAATGG-3'
R1	10 pmol/μL	5'-CTTCTCAAAGCTAGGGACTG-3'
F2	10 pmol/μL	5'-GCAGGTAAACCATAAGTTCCTA-3'
R2	10 pmol/μL	5'-GGTCTACAAGCGTGCCAGCG-3'
注:第一轮 PCR 扩增片段大小为 1 006 bp;第二轮 PCR 扩增片段大小为 210 bp。		

附 录 C

(资料性附录)

猪传染性胃肠炎病毒阳性样品和阴性样品的制备

C.1 阳性样品制备

取 TGEV 细胞毒,用 100 mL 的 PBS 稀释至 1 个 TCID₅₀,向其中加入不含 TGEV 的猪新鲜粪便 10 g,摇匀,分装,0.5 mL/管,备用。

C.2 阴性样品制备

用 PBS 按 10 : 1 的比例稀释不含 TGEVV 的猪新鲜粪便,摇匀,分装,0.5 mL/管,备用。

附录 D
(资料性附录)
反转录和 PCR 扩增体系

D.1 反转录体系

RNA 模板	2.0 μL
反转录引物 R1(见附录 B)	1.5 μL
dNTPs(2.5 mmol/L)	8.0 μL
RNA 酶抑制剂(40 U/ μL)	0.5 μL
5 \times 反应缓冲液	4.0 μL
AMV 反转录酶(5 U/ μL)	1.0 μL
无 RNA 酶水	3.0 μL
总体积(Total)	20.0 μL

D.2 第一轮 PCR 体系

cDNA(反转录产物)	3.0 μL
rTaq mix	10.0 μL
上游引物 F1(见附录 B)	1.0 μL
下游引物 R1(见附录 B)	1.0 μL
DEPC 水	5.0 μL
总体积(Total)	20.0 μL

D.3 第二轮 PCR 体系

DNA (第一轮 PCR 产物)	1.0 μL
rTaq mix	10.0 μL
上游引物 F2(见附录 B)	1.0 μL
下游引物 R2(见附录 B)	1.0 μL
DEPC 水	5.0 μL
总体积(Total)	20.0 μL

附录 E
(资料性附录)

样品中猪传染性胃肠炎病毒核酸阳性电泳例图

样品中猪传染性胃肠炎病毒核酸阳性电泳例图见图 E.1。



说明：
M——DNA Marker(1 000 bp Ladder)；
1——阳性对照；
2——阳性样品；
3——阴性样品；
4——阴性对照。

图 E.1 样品中猪传染性胃肠炎病毒核酸阳性电泳例图