



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

牛地方流行性白血病毒检测鉴定方法 —PCR 方法

Method of Detection and Identification of Bovine Leukemia Virus

—PCR Method

(送审稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准代替SN/T 1917-2007 《牛地方流行性白血病聚合酶链反应操作规程》。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：略。

本标准主要起草人：略

引 言

牛白血病根据流行病学和病原的不同可分为地方流行型和散发型,其中牛地方流行性白血病是由牛白血病病毒所引起的以淋巴细胞持续性增生为特征的一种具有传染性的肿瘤性疾病,是影响世界养牛业发展的重要传染病之一。该病被世界动物卫生组织列为必报动物疫病,在我国《一、二、三类动物疫病病种名录》中列为二类动物疫病,在《中华人民共和国进境动物检疫疫病名录》中列为二类传染病。

本标准修改采用世界动物卫生组织2012版《陆生动物疾病诊断试验和疫苗手册》第2.4.11章B.1.b),除编辑性修改外,主要技术变化如下:

- 增加了“生物安全要求和防止交叉污染措施”(见7);
- 增加了抗凝血的处理方法(见8.1.1);
- 增加了细胞培养物的处理方法(见8.1.3);
- 增加内对照核酸参考序列(附录B.3)。

牛地方流行性白血病病毒检测鉴定方法—PCR 方法

1 范围

本标准规定了牛地方流行性白血病病毒聚合酶链反应检测方法的技术要求和操作规范。

本标准适用于快速检测牛血液样品、其它组织样品以及病毒分离培养物中牛地方流行性白血病病毒核酸。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

3 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

BLV: 牛白血病病毒 (Bovine Leukemia Virus)

bp: 碱基对 (base pair)

CPE: 细胞病变效应 (cytopathic effect)

dNTP: 脱氧核糖核苷三磷酸 (deoxyribonucleoside triphosphate)

EDTA: 乙二胺四乙酸 (ethylene diaminetetraacetic acid)

PCR: 聚合酶链反应 (Polymerase chain reaction)

Taq 酶: *Taq* DNA 聚合酶 (*Taq* DNA polymerase)

TBE: Tris-borate-EDTA 缓冲液 (Tris-borate-EDTA buffer)

Tris: 三(羟甲基)氨基甲烷 (tris (hydroxymethyl) aminomethane)

4 原理

牛地方流行性白血病是由牛白血病病毒 (BLV) 引起的疾病，牛在任何年龄段均可感染，病毒以前病毒的形式整合于宿主细胞DNA，存在于血液淋巴细胞和肿瘤细胞中。病毒也能在各种体液包括鼻液、气管液、唾液和牛奶等细胞成分中发现。从抗凝全血样品中分离的外周血淋巴细胞和血沉棕黄层、冷冻的全血以及肿瘤组织均可用于提取病毒核酸。先用一对外侧引物扩增BLV gp51基因的一个大片段，再用一对内侧引物以大片段为模板进行第二次扩增，琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物，以确定样品是否含有BLV。

5 仪器

5.1 微量可调移液器。

5.2 超净工作台或通风橱。

5.3 高压灭菌锅。

- 5.4 高速离心机。
- 5.5 冰箱。
- 5.6 旋涡混合器。
- 5.7 PCR 扩增仪。
- 5.8 电泳仪。
- 5.9 凝胶成像系统。

6 试剂

除另有说明，分析中所用试剂均为分析纯，水应符合 GB/T 6682 一级水要求。

- 6.1 淋巴细胞分离液。
- 6.2 PBS溶液、10×PCR缓冲液、电泳缓冲液和10×加样缓冲液：见附录A。
- 6.3 引物：见附录A.3。
- 6.4 *Taq*酶：5 U/μL，-20 °C 保存，避免反复冻融或温度剧烈变化。
- 6.5 dNTP：dATP、dGTP、dTTP、dCTP各2.5 mmol/L。
- 6.6 氯化镁（MgCl₂）：25 mmol/L。
- 6.7 DNA分子量标准（50 bp~1000 bp）。
- 6.8 内对照：参考附录B.3。
- 6.9 琼脂糖（电泳纯）。
- 6.10 溴化乙锭（EB），或等效物质。

注1：溴化乙锭有致癌作用，使用时须佩戴手套，使用后按安全规定处置。

7 生物安全要求和防止交叉污染措施

采样、样品处理及检测过程中所涉及的操作，应遵守GB 19489的有关规定。

8 试验方法

8.1 样品处理

8.1.1 抗凝血的处理

取淋巴细胞分离液轻轻加到等量的抗凝血中，不要摇动打乱液层，2 000 r/min离心20 min，离心后分成多层，最上层是血浆层，中间层是分离液，最下层是红细胞，在血浆层与分离液之间是一层较致密的白色层，为淋巴细胞层，用毛细吸管插入并吸取该层放入另一离心管中，以PBS洗涤后备用，若暂时不做进一步处理，可冷冻保存。

8.1.2 肿瘤或其他组织的处理

将肿瘤或其他组织剪碎，加入PBS均质成10%匀浆液，1000 r/min离心5 min，取上清备用。

8.1.3 细胞培养物的处理

取接种样品后出现CPE或可疑的细胞培养物500 μL，经2 000 r/min离心10 min，弃上清，取沉淀备用。

8.2 核酸提取

分离的淋巴细胞、肿瘤或其它组织匀浆液，以及其它样本，如血沉棕黄层、全血等，检测实验室可根据样本特点选择合适的核酸提取方法，也可用商品化的试剂或试剂盒提取核酸。商业化的试剂或试剂盒须经验证评估之后使用。必要时，对提取的核酸进行适当稀释。

8.3 套式 PCR 方法一

8.3.1 一次 PCR 反应体系

在 PCR 反应管中配制 PCR 反应体系：10×PCR 缓冲液 5 μL、MgCl₂ (25 mmol/L) 5 μL、dNTP (各 2.5 mmol/L) 4 μL、引物 BLV1A 和 BLV6A 各 1.5 μL、*Taq* 酶 0.25 μL、DNA 提取物 5 μL、内对照 1 μL，加水至总体积 50 μL。

8.3.2 一次 PCR 反应条件

反应在 PCR 扩增仪中进行，首先 94 °C 变性 45 s，60 °C 退火 60 s，72 °C 延伸 90 s，5 次循环，随后 94 °C 变性 45 s，55 °C 退火 60 s，72 °C 延伸 90 s，30 次循环，最后 72 °C 延伸 7 min。

8.3.3 二次 PCR 反应体系

在 PCR 反应管中配制 PCR 反应体系：10×PCR 缓冲液 5 μL、MgCl₂ (25 mmol/L) 5 μL、dNTP (各 2.5 mmol/L) 4 μL、引物 BLV3 和 BLV5 各 1.5 μL、*Taq* 酶 0.25 μL、一次 PCR 扩增产物 5 μL、加水至总体积 50 μL。

8.3.4 二次 PCR 反应条件

反应在 PCR 扩增仪中进行，首先 94 °C 变性 45 s，58 °C 退火 60 s，72 °C 延伸 90 s，5 次循环，随后 94 °C 变性 45 s，53 °C 退火 60 s，72 °C 延伸 90 s，30 次循环，最后 72 °C 延伸 7 min。

8.3.5 对照设置

每 5 份样品设置 1 个阳性对照和 1 个阴性对照（反应管内各加内对照 1 μL）。

8.4 套式 PCR 方法二

8.4.1 一次 PCR 反应体系

在 PCR 反应管中配制 PCR 反应体系：10×PCR 缓冲液 5 μL、MgCl₂ (25 mmol/L) 3 μL、dNTP (各 2.5 mmol/L) 1.5 μL、引物 BLV-env-1 和 BLV-env-2 各 1.25 μL、*Taq* 酶 0.25 μL、DNA 提取物 5 μL (～1 μg)、加水至总体积 50 μL。

8.4.2 一次 PCR 反应条件

反应在 PCR 扩增仪中进行，首先 94 °C 变性 2 min，然后 95 °C 30 s、58 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 1 min，30 次循环，最后 72 °C 延伸 4 min。

8.4.3 二次 PCR 反应体系

在 PCR 反应管中配制 PCR 反应体系：10×PCR 缓冲液 5 μL、MgCl₂ (25 mmol/L) 3 μL、dNTP (各 2.5 mmol/L) 1.5 μL、引物 BLV-env-3 和 BLV-env-4 各 1.25 μL、*Taq* 酶 0.25 μL、一次 PCR 扩增产物 3 μL、加水至总体积 50 μL。

8.4.4 二次 PCR 反应条件

反应在 PCR 扩增仪中进行，首先 94 °C 变性 2 min，然后 95 °C 30 s、58 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 1 min，30 次循环，最后 72 °C 延伸 4 min。

8.4.5 对照设置

每 5 份样品设置 1 个阳性对照和 1 个阴性对照。

8.5 琼脂糖凝胶电泳

用 TBE 电泳缓冲液配制 1~2% 的琼脂糖（含 0.5 μg/mL EB）凝胶。将 9 μL 二次 PCR 产物和 1 μL 加样缓冲液混匀后加入样品孔，90 mA 电泳 2 h。在电泳时设立 DNA 分子量标准作对照。凝胶成像系统观察电泳结果并记录。

9 结果判断

9.1 套式 PCR 方法一

9.1.1 阳性结果

阳性对照出现预期大小的条带（341 bp），阴性对照未出现预期大小条带，样品出现 341 bp 大小条带且内对照出现 144 bp 条带，可判断为阳性结果。

9.1.2 阴性结果

阳性对照出现预期大小的条带（341 bp），阴性对照未出现预期大小的条带，样品无预期大小条带且内对照出现 144 bp 条带，可判断为阴性结果。

9.1.3 可疑结果

如果阳性对照未出现预期大小条带，或者阴性对照出现预期大小条带，或者内对照未出现预期大小条带，可判断为可疑结果。可疑结果需重新进行检测。

注 2：对于阳性对照和样品反应管，当反应管中 BLV 拷贝数远高于内对照拷贝数时，仅出现 341 bp 大小条带，无 144 bp 大小条带；当反应管中 BLV 拷贝数与内对照拷贝数相当时，同时出现 341 bp 和 144 bp 两条带；当反应管中无 BLV 或 BLV 拷贝数远低于内对照拷贝数时，仅出现 144 bp 大小条带。

9.2 套式 PCR 方法二

9.2.1 阳性结果

阳性对照出现预期大小的条带（444 bp），阴性对照未出现预期大小条带，而样品出现 444bp 大小的条带，可判断为阳性结果。

9.2.2 阴性结果

阳性对照出现预期大小的条带（444 bp），阴性对照未出现预期大小条带，而样品未出现 444bp 大小的条带，可判断为阴性结果。

9.2.3 可疑结果

阳性对照未出现预期大小条带，或者阴性对照出现预期大小条带，可判断为可疑结果。可疑结果需

重新进行检测。

10 阳性结果的确证

上述两种方法的二次 PCR 阳性产物须用其他方法进行确认，如测序或限制性酶切（RFLP）分析等。

附录 A

(规范性附录)

试剂配制

A.1 PBS 溶液 (pH7.2)

氯化钠 (NaCl) 8.5 g, 氯化钾 (KCl) 0.2 g, 磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 2.85 g, 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 0.27 g, 调 pH 至 7.2, 用蒸馏水定容至 1 000 mL, 采用 $121\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}/0.1\text{ Mpa}$, 15 min 高压灭菌后贮存于室温。

A.2 淋巴细胞分离液 (Ficoll-Paque 溶液)

取 9% 聚蔗糖 (分子量 400 000) 24 份与 33.9% 泛影葡胺 10 份混匀, 过滤除菌或 $121\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}/0.1\text{ Mpa}$, 高压灭菌 15 min, 分装于棕色瓶中, 置于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存, 一般可保存三个月。也可使用商品化的 Ficoll-Paque 淋巴细胞分离液。

A.3 引物

BLV1A、BLV6A、BLV3 和 BLV5 配制成 $10\text{ }\mu\text{mol/mL}$, BLV-env-1、BLV-env-2、BLV-env-3、BLV-env-4 配制成 $20\text{ }\mu\text{mol/mL}$ 。引物序列如下表:

表1 PCR扩增引物

编号	引物序列	产物大小
BLV1A	5'-CTT TGT GTG CCA AGT CTC CCA GAT ACA-3'	440 bp
BLV6A	5'-CCA ACA TAT AGC ACA GTC TGG GAA GGC-3'	
BLV3	5'-CTG TAA ATG GCT ATC CTA AGA TCT ACT GGC-3'	341 bp
BLV5	5'-GAC AGA GGG AAC CCA GTC ACT GTT CAA CTG-3'	
BLV-env-1	5'-TCT GTG CCA AGT CTC CCA GAT A-3'	598 bp
BLV-env-2	5'-AAC AAC AAC CTC TGG GAA GGG-3'	
BLV-env-3	5'-CCC ACA AGG GCG GCG CCG GTT T-3'	444 bp
BLV-env-4	5'-GCG AGG CCG GGT CCA GAG CTG G-3'	

A.4 $10\times$ PCR 缓冲液 (不含 MgCl_2)

氯化钾 (KCl) 100 mmol/L , 硫酸铵 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 160 mmol/L , 硫酸镁 MgSO_4 20 mmol/L , Tris-HCl (pH8.8) 200 mmol/L , 1% Triton X-100, 牛血清白蛋白 (BSA) 1 mg/mL 。

A.5 电泳缓冲液 ($10\times$ TBE)

54 g Tris, 硼酸 27.5 g, 20 mL 0.5 mol/L EDTA (pH8.0), 用蒸馏水定容至 1000 mL。

A.6 $10\times$ 加样缓冲液

含 0.25% 溴酚蓝和 40% 蔗糖的水溶液。

附录 B (资料性附录)

PCR 产物和内对照基因序列

B.1 套式PCR方法一扩增基因序列 (440 bp)

CTTTCTGTGCCAAGTCTCCCAGATACACCTTGGACTCTGTAAATGGCTATCCTAAGATCTACTGGCC
 CCCCCACAAGGGCGGCGCCGTTTGGAGCCAGGGCCATGGTCACATATGATTGCGAGCCCCGAT
 GCCCTTATGTGGGGCAGATCGGTTTCGACTGCCCCACTGGGACAATGCCTCCCAGGCTGATCAAG
 GATCCTTTTATGTCAATCATCAGATTTTATTCTGCATCTCAAACAATGTCATGGAATTTTCACTCTA
 ACCTGGGAGATATGGGGATATGATCCCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAGATCCCTGATCCCCCTCA
 ACCCGACTTTCCCAGTTGAACAGTGACTGGGTTCCTCTGTCAGATCATGGGCCCTGCTTTTAA
 TCAAACAGCACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGG

B.2 套式 PCR 方法二扩增基因序列 (598 bp)

TTCTGTGCCAAGTCTCCCAGATACACCTTGGACTCTGTAAATGGCTATCCTAAGATCTACTGGCCCC
 CCCACAAGGGCGGCGCCGTTTGGAGCCAGGGCCATGGTCACATATGATTGCGAGCCCCGATGC
 CCTTATGTGGGGCAGATCGGTTTCGACTGCCCCACTGGGACAATGCCTCCCAGGCTGATCAAGGA
 TCCTTTTATGTCAATCATCAGATTTTATTCTGCATCTCAAACAATGTCATGGAATTTTCACTCTAAC
 CTGGGAGATATGGGGATATGATCCCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAGATCCCTGATCCCCCTCAAC
 CCGACTTTCCCAGTTGAACAGTGACTGGGTTCCTCTGTCAGATCATGGGCCCTGCTTTTAAATC
 AAACAGCACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCCCTCCCTGGGCTCCCGAAA
 TATTAGTATATAACAAAACCATCTCCAGCTCTGGACCCGGCCTCGCCCTCCCGACGCCCAAATCTT
 CTGGGTCAACTCGTCCTCGTTTAAACACCACCCAAGGATGGCACCACCCTTCCCAGAGTTGTTGTT

B.3 套式 PCR 方法一内对照核酸序列

根据世界动物卫生组织 2012 版《陆生动物疾病诊断试验和疫苗手册》2.4.11 及其参考文献
 BALLAGI-PORDANY A. & BELAK S. (1996)设计内对照, 核酸序列如下。50 μL 反应体系内对照用量为
 5~50 个拷贝。

CTTTCTGTGCCAAGTCTCCCAGATACACCAGGCTTGTCTTAAACTCCTGACCTCAAGTGATCCACC
 CACCTCGGCCTCCCAAATGCTAGGATTATAGGCGTGAGCCACCGCACCTGGCCAATGGTTGTTTT
 TCAGGTCTTCTCTTGCTTGACTTCCCAGAGCCGAGAAAGGTGATTTCCAAGAAGCCACCTGGGCTA
 TCCTCTGTTCCCCGACCTCCCATCCTAGTCCAAGAGTCGATGATCTCCTGGCACCGGGCACCTTTG
 GCCACGTCAGGATTCCATGTCACTGACCCTATCCTCCCCTGGAAGAGATTGAACGTGTGATTGGCA
 GAAACCGGAGCCCCTGCATGCAAGACAGGAGCCACATGCCCTACACAGATGCTGTGGTGCACGAG
 GTCCAGAGATACCTTGACCTTCTCCCCACCAGCCTGCCCATGCAGTGACCTGTGACATTAAATTC
 AGAAACTATCTCATTCCCAAGGTAAGTTTGTCTCTCCTACACTGCAACTCCATGTTTTCGAAGTCCC
 CAAATTCATAGCCAAATTCTTGGACTCTGTAAATGGCTATCCTAAGATCTACTGGCCCATATTGCGA
 GCCCGATGCCCTTATGTGCCCGCAGATCGGTTTCGACTGCCCCACTGGGACAATGCCTCCCAGGC
 TGATCAACAGTTGAACAGTGACTGGGTTCCTCTGTCAGAT