

中华人民共和国国家标准

GB/T 27517—2011

鉴别猪繁殖与呼吸综合征病毒高致病性 与经典毒株复合 RT-PCR 方法

A multiplex RT-PCR method to differentiate the highly
pathogenic and classical porcine reproductive and
respiratory syndrome virus

2011-11-21 发布

2012-03-01 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。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位：河南省动物疫病预防控制中心。

本标准主要起草人：吴志明、闫若潜、张志凌、张健、荆汝顶、刘光辉、赵明军、曹杰伟、钱勇、程俊贞、赵雪丽、张盼。

鉴别猪繁殖与呼吸综合征病毒高致病性 与经典毒株复合 RT-PCR 方法

1 范围

本标准规定了检测以基因组非结构蛋白 Nsp2 编码区缺失 30 个氨基酸为特征的猪繁殖与呼吸综合征病毒高致病性毒株与非缺失 30 个氨基酸的猪繁殖与呼吸综合征病毒经典毒株复合 RT-PCR 鉴别诊断方法。

本标准适用于疑似猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)感染猪血清及临床病料等样品中的病毒核酸检测。

2 试剂和仪器设备

除另有规定外,所用生化试剂均为分析纯。提取 RNA 所用试剂均应使用无 RNA 酶的容器进行分装。

2.1 试剂

2.1.1 拭子悬液(见附录 A),组织悬液(见附录 A),以上试剂常温保存。

2.1.2 阿氏液(见附录 A),裂解液(TriZol),1×TAE 核酸电泳缓冲液(见附录 A),氯仿,0.01 mol/L (pH7.2)的 PBS(见附录 A),DEPC 处理水(见附录 A),以上试剂 4℃保存。

2.1.3 异丙醇,75%乙醇,DNA 分子量标准,6×电泳上样缓冲液,以上试剂-20℃保存。

2.1.4 阳性对照、阴性对照(见附录 A)。

2.1.5 复合 RT-PCR 扩增用上、下游引物序列参见附录 B。

2.1.6 鉴别猪繁殖与呼吸综合征病毒高致病性与经典毒株复合 RT-PCR 反应体系组成、说明及使用注意事项参见附录 C。

2.2 仪器设备

PCR 扩增仪,高速冷冻离心机(离心力在 12 000g 以上),核酸电泳仪和水平电泳槽,恒温水浴锅,2℃~8℃冰箱,-20℃冰箱,单道微量移液器(0.5 μL~10 μL;2 μL~20 μL;20 μL~200 μL;100 μL~1 000 μL),组织匀浆器或研钵,凝胶成像系统(或紫外透射仪),真空干燥器(非必备)。

3 样品的采集、处理、存放及运输

3.1 样品采集及处理过程的注意事项

采样过程中样本不得交叉污染,采样及样品处理过程中应戴一次性手套、口罩、帽子。

3.2 样品的采集及处理

3.2.1 拭子样品

3.2.1.1 鼻腔拭子:采样时要将棉拭子深入鼻腔来回刮 3~5 次,取鼻腔分泌物。

3.2.1.2 肛门拭子:将棉拭子深入肛门转一圈沾取粪便。

3.2.1.3 将鼻腔拭子和肛门拭子一起放入盛有 1.0 mL 拭子悬液的 Eppendorf 管中,然后将拭子悬液转入无菌 Eppendorf 管中,4 °C 条件下 5 000 r/min 离心 10 min,取上清转入新的无菌 Eppendorf 管中,编号备用。

3.2.2 组织样品

组织样品采集时应采取有明显病变的淋巴结、扁桃体、肺脏、脾脏、肾脏、胸腺等组织样品。用无菌的剪刀和镊子剪取待检样品 0.5 g 左右于组织匀浆器或研钵中充分匀浆或研磨,再加 0.3 mL~0.5 mL PBS 混匀,然后将组织悬液转入无菌 Eppendorf 管中,4 °C 条件下 5 000 r/min 离心 10 min,取上清转入新的无菌 Eppendorf 管中,编号备用。

3.2.3 血清或抗凝血

用无菌注射器自耳静脉或前腔静脉采集血液 3 mL~5 mL,待血清析出后直接吸取至无菌 Eppendorf 管中,编号备用;用无菌注射器先吸入抗凝剂(阿氏液)2 mL~3 mL,再自耳静脉或前腔静脉采集等量血液,快速混匀后转入无菌 Eppendorf 管中,编号备用。

3.3 存放与运送

采集或处理的样品在 2 °C~8 °C 条件下保存应不超过 24 h;若需长期保存,应放置-70 °C 冰箱,但应避免反复冻融。采集的样品密封后,采用保温壶或保温桶加冰密封,尽快运送到实验室。

4 操作方法

4.1 样品 RNA 的制备

4.1.1 取 1.5 mL 灭菌 Eppendorf 管,每管加入 300 μ L 裂解液,然后分别加入待测样品、阴性对照样品、阳性对照样品各 100 μ L,吸头反复吸打混匀(一份样品换用一个吸头);再加入 100 μ L 氯仿,充分颠倒混匀(不宜过于强烈);于 4 °C 条件下,12 000 r/min 离心 15 min。

4.1.2 吸取离心后各管中的上清液 150 μ L 转移至新的 1.5 mL 灭菌 Eppendorf 管中(注意不要吸出中间层),加入 150 μ L -20 °C 预冷的异丙醇,颠倒混匀,室温放置 15 min。

4.1.3 4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 15 min(Eppendorf 管开口保持朝离心机转轴方向放置)。轻轻倒去上清,倒置于吸水纸上,吸干液体,不同样品应置于吸水纸不同地方沾干。加入 1 mL 75%乙醇,轻轻颠倒洗涤。

4.1.4 4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 5 min(Eppendorf 管开口保持朝离心机转轴方向放置)。轻轻倒去上清液,倒置于吸水纸上,吸干液体,不同样品应在吸水纸不同地方吸干。

4.1.5 4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 30 s,将管壁上的残余液体甩到管底部,用微量加样器尽量将其吸干,一份样本换用一个吸头,吸头不要碰到有沉淀一面,真空抽干 3 min~5 min 或室温干燥 10 min。不宜过于干燥,以免 RNA 不易溶解。

4.1.6 加入 11 μ L DEPC 处理水,轻轻混匀,溶解管壁上的 RNA,2 000 r/min 离心 5 s,冰上保存备用。提取的 RNA 应在 2 h 内进行 RT-PCR 扩增或放置于-70 °C 冰箱备用。

4.2 反转录(cDNA 的合成)

配制反转录反应体系(参见附录 C),向每管中加入 4.1.6 中相应 RNA 10 μ L,37 °C 水浴 1 h 或置于 PCR 仪中 37 °C 1 h,反应结束后,70 °C 15 min 灭活反转录酶,直接用于下面的 PCR 扩增或-20 °C 冻存备用。

4.3 复合 PCR 扩增

配制复合 PCR 反应体系(参见附录 C),在室温下融化后,瞬时离心使液体全部聚集在管底部,向每管中加入 4.2 中相应 cDNA 4 μL ,经充分混匀后瞬时离心使液体全部聚集于管底,加入 25 μL 的石蜡油覆盖液面(若 PCR 仪具有热盖加热功能时 PCR 反应管中也可不加石蜡油,但推荐采用加石蜡油的方法)。

PCR 扩增条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min 后,94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,59 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s 共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。扩增反应结束后取出放置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 。

4.4 PCR 扩增产物的电泳检测

称取 1.2 g 琼脂糖加入 100 mL 核酸电泳缓冲液中加热,充分溶化后稍放凉,加入适量的溴化乙锭(终浓度 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$),倒入胶槽制备凝胶板。在电泳槽中加入 1 \times TAE 核酸电泳缓冲液,使液面刚刚没过凝胶。取 5 μL ~10 μL PCR 扩增产物分别和 1 μL ~2 μL 6 \times 电泳上样缓冲液混合后,分别加样到各凝胶孔,取 5 μL DNA 分子量标准加到一凝胶孔中。5 V/cm 恒压下电泳 30 min 左右。将电泳好的凝胶放到紫外透射仪或凝胶成像系统上观察结果,进行判定并做好试验记录。

5 结果判定

5.1 试验结果成立条件

猪繁殖与呼吸综合征病毒高致病性与经典毒株阳性对照的 PCR 扩增产物,经电泳后分别在 400 bp 和 264 bp 位置出现特异性条带,同时阴性对照的 PCR 扩增产物电泳后没有任何条带(参见附录 D),则试验结果成立;否则结果不成立。

5.2 阳性判定

在试验结果成立的前提下,如果样品的 PCR 产物电泳后在 400 bp 和 264 bp 的位置上同时出现特异性条带,判定为猪繁殖与呼吸综合征病毒高致病性与经典毒株核酸检测双阳性;若 400 bp 位置出现特异条带而 264 bp 位置无特异条带,判定为猪繁殖与呼吸综合征病毒高致病性毒株核酸检测阳性;若 264 bp 位置出现特异条带而 400 bp 位置无特异条带,判定为猪繁殖与呼吸综合征病毒经典毒株核酸检测阳性。

5.3 阴性判定

在试验结果成立的前提下,如果 400 bp 和 264 bp 位置均未出现特异性条带,判定为猪繁殖与呼吸综合征病毒高致病性与经典毒株核酸检测阴性。

附录 A
(规范性附录)
试剂的配制

A.1 拭子悬液

在 0.01 mol/L PBS 液中添加以上所有的抗生素,浓度提高 5 倍;加入抗生素后调 pH 值至 7.2~7.4。

A.2 组织悬液

在 0.01 mol/L PBS 液中添加青霉素(2 000 IU/mL),链霉素(2 mg/mL)、庆大霉素(50 µg/mL)和制霉菌素(1 000 IU/mL)。

A.3 阿氏液

葡萄糖 2.05 g,柠檬酸钠 0.8 g,柠檬酸 0.055 g,氯化钠 0.42 g,加蒸馏水至 100 mL,溶解后调 pH 值至 6.1,69 kPa 15 min 高压灭菌,4 °C 保存备用。

A.4 1×TAE 核酸电泳缓冲液

Tris 碱,24.2 g;冰乙酸,5.71 mL;0.5 mol/L EDTA(pH8.0),10 mL;加蒸馏水至 100 mL,使用时用蒸馏水作 50 倍稀释,即为 1×TAE 核酸电泳缓冲液。

A.5 0.01 mol/L(pH7.2)的磷酸盐缓冲液(PBS)

A.5.1 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,先用适量蒸馏水溶解,最后用蒸馏水稀释至 1 000 mL。

A.5.2 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)先用适量蒸馏水溶解,最后用蒸馏水稀释至 1 000 mL。

A.5.3 0.01 mol/L PBS 的配制:A 液 14 mL,B 液 36 mL,加氯化钠(NaCl)8.5 g,最后用蒸馏水稀释至 1 000 mL;121 °C,15 min 高压灭菌,4 °C 保存备用。

A.6 DEPC 处理水

用 0.1% DEPC 处理后的蒸馏水,经 121 °C 15 min 高压处理,用于溶解 RNA。

A.7 阳性对照

经 Marc-145 细胞传代培养的第 8 代 PRRSV 高致病性和经典毒株灭活细胞毒。

A.8 阴性对照

Marc-145 细胞液。

附 录 B
(资料性附录)

鉴别猪繁殖与呼吸综合征病毒高致病性与经典毒株复合 RT-PCR 方法所用引物

表 B.1 鉴别猪繁殖与呼吸综合征病毒高致病性与经典毒株复合 RT-PCR 方法所用引物

引物名称	引物浓度	引物序列	扩增片段大小
PCR 扩增上游引物 P1	20 pmol/ μ L	5'-GGTTCGGAAGAAACTGTCGG-3'	P1/P3 引物对扩增片段 400 bp;
PCR 扩增上游引物 P2	20 pmol/ μ L	5'-AGCAGGTGGAAGAAGCGAATC-3'	
PCR 扩增共用下游引物 P3	20 pmol/ μ L	5'-GAGCTGAGTATTTTGGGCGTG-3'	264 bp

附录 C

(资料性附录)

鉴别猪繁殖与呼吸综合征病毒高致病性与经典毒株复合 RT-PCR 反应体系组成、说明及使用时注意事项

C.1 试剂盒组成

表 C.1 试剂盒组成

组成成分	数量
反转录反应体系	20 管(10 μL /管)
PCR 反应体系	20 管(21 μL /管)
阳性对照	500 μL
阴性对照	500 μL
裂解液	6.5 mL
氯仿	2.5 mL
异丙醇	4 mL
75%乙醇	15 mL
DEPC 处理水	2 mL
50 倍 TAE 电泳缓冲液	40 mL
溴化乙锭溶液	40 μL
上样缓冲液	120 μL
石蜡油	1.5 mL

C.2 说明

C.2.1 反转录反应体系成分: M-MLV 5 \times Reaction buffer(含 Mg^{2+}), 4 μL ; 2.5 mmol/L dNTPs, 4 μL ; M-MLV, 0.5 μL ; RNA 酶抑制剂, 0.5 μL ; 共用反转录引物(P3, 也是复合 PCR 共用下游引物) 1 μL ; 总体积 10 μL 。

C.2.2 复合 PCR 反应体系成分: 10 \times PCR 缓冲液(含 Mg^{2+}), 2.5 μL ; 2.5 mmol/L dNTPs, 2 μL ; P1, 0.5 μL ; P2, 0.5 μL ; P3, 1 μL ; ExTaq DNA 聚合酶, 0.5 μL (2.5 U); 灭菌双蒸水, 14.0 μL ; 总体积为 21 μL 。

C.2.3 裂解液的主要成分是 TriZol, 为 RNA 提取试剂, 外观为粉红色, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

C.2.4 反转录反应体系中含猪繁殖与呼吸综合征病毒高致病性与经典毒株共用反转录引物、反转录酶及各种离子。

C.2.5 PCR 反应体系中含猪繁殖与呼吸综合征病毒高致病性与经典毒株特异性引物对、ExTaq 酶及各种离子。

C.3 使用时的注意事项

C.3.1 由于阳性样品中模板浓度相对较高,注意检测过程中不得交叉污染。

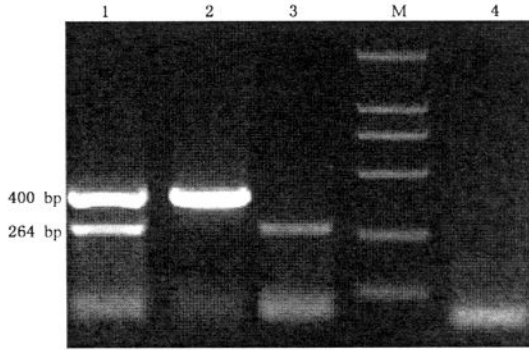
C.3.2 注意防止试剂盒组分受污染。试剂盒之间的成分勿混用。

C.3.3 请按照说明书要求分别在 4℃、-20℃保存不同的试剂,试剂盒有效期为 6 个月。使用时在室温下融化,暂放置于冰上,使用后立即放回。

C.3.4 反转录反应体系与 PCR 反应体系应避免反复冻融,在使用前应瞬时离心,以保证反应液集中在管底。

附录 D
(资料性附录)

猪繁殖与呼吸综合征病毒高致病性与经典毒株复合 RT-PCR 产物电泳图



- M—DNA 分子量标准(DL2000 Marker);
1—PRRSV 高致病性和经典毒株混合物阳性对照;
2—PRRSV 高致病性毒株阳性对照;
3—PRRSV 经典毒株阳性对照;
4—阴性对照。

图 D.1 猪繁殖与呼吸综合征病毒高致病性与经典毒株复合 RT-PCR 产物电泳图