



中华人民共和国国家标准

GB/T 22917—2008

猪水泡病病毒荧光 RT-PCR 检测方法

Protocol of fluorogenic RT-PCR for swine vesicular disease virus

2008-12-31 发布

2009-05-01 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

本标准参考了世界动物卫生组织(OIE)《陆生动物诊断试验和疫苗手册(哺乳动物、禽鸟与蜜蜂)》(第5版)。

本标准的附录A为规范性附录。

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归口。

本标准起草单位:中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、中华人民共和国云南出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:花群义、卢体康、吕建强、阮周曦、杨云庆、周晓黎、杨素、董俊、陈书琨。

猪水泡病病毒荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了猪水泡病病毒荧光 RT-PCR 检测的操作方法。
本标准适用于动物及其产品中猪水泡病病毒的检测。

2 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

2.1 荧光 RT-PCR

荧光反转录-聚合酶链反应。

2.2 Ct 值

每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

2.3 RNA

核糖核酸。

2.4 DEPC

焦碳酸磷酯。

2.5 PBS

磷酸盐缓冲盐水,配方见附录 A。

2.6 Taq 酶

Taq DNA 聚合酶。

2.7 SVDV

猪水泡病病毒。

3 原理

根据猪水泡病病毒的基因特定序列,合成一对特异性引物和一条特异性的荧光双标记探针。引物和探针通过严格的设计和筛选,涵盖已报道的所有猪水泡病病毒的毒株。荧光探针的 5' 端标记 FAM 荧光素,3' 端标记 TAMRA 荧光素,它在近距离内能吸收 5' 端报告荧光基团发出的荧光信号。扩增时,由于 Taq 酶的 5'→3' 的外切活性,在延伸到荧光探针时,将其切断,两基团分离,淬灭作用消失,荧光信号产生。因此,可以通过检测荧光信号对核酸模板进行检测。

4 材料与试剂

4.1 仪器与器材

4.1.1 荧光 RT-PCR 检测仪。

4.1.2 高速台式冷冻离心机(离心速度 12 000 r/min 以上)。

4.1.3 台式离心机或手掌式离心机(离心速度 3 000 r/min)。

4.1.4 混匀器。

4.1.5 冰箱(2℃~8℃和-20℃两种)。

4.1.6 微量可调移液器(5 μL,10 μL,100 μL,1 000 μL)及配套带滤芯吸头。

4.1.7 1.5 mL、0.5 mL 硅化 Eppendorf 管:将 Eppendorf 管和滴头浸泡于含有 0.1% DEPC 的三蒸水中过夜,121℃±2℃ 高压灭菌 15 min,40℃ 烘干备用。市售 Eppendorf 管和滴头已经硅化,可直接

使用。

4.1.8 0.2 mL 透明薄壁 PCR 管。

4.1.9 6×6 孔或 5×8 孔冰盒。

4.1.10 水浴锅:0 °C~100 °C。

4.1.11 旋涡振荡器。

4.2 试剂

4.2.1 本标准所用试剂均为分析纯,所有试剂均用无 RNA 酶污染的容器(用 DEPC 水处理后高压灭菌)分装。

4.2.2 三氯甲烷。

4.2.3 异丙醇:−20 °C 预冷。

4.2.4 PBS:配制方法见附录 A。

4.2.5 75%乙醇:用新开启的无水乙醇和 DEPC 水配制,−20 °C 预冷。

4.2.6 裂解液:配制方法见附录 A。

4.2.7 酚(分析纯)。

4.2.8 无水乙醇(分析纯)。

4.2.9 AMV 反转录酶(5 U/μL):−20 °C 保存,不要反复冻融或温度剧烈变化。

4.2.10 dNTPs:含 dCTP、dGTP、dATP、dTTP 各 10 mmol/L。

4.2.11 RNA 酶抑制剂(RNasin,40 U/μL):−20 °C 保存,不要反复冻融或温度剧烈变化。

4.2.12 Taq DNA 聚合酶(5 U/μL):−20 °C 保存,不要反复冻融或温度剧烈变化。

4.2.13 反转录和 PCR 缓冲液(5×):配制方法见附录 A。

4.2.14 氯化镁(20 mmol/L)。

4.2.15 引物(15 μmol/L):上游引物 5'-GGCAACGCAATACAGCATGTT-3',下游引物 5'-GCCG-TATGTCCCTTCTGATGT-3'。

4.2.16 荧光双标记探针(10 μmol/L):(FAM)5'-TATGACGGGTGGCCAGCCTT-3'(TAMRA)。

4.2.17 DEPC 处理:按 0.1% 加入 DEPC,摇匀,室温静置过夜,121 °C±2 °C 高压灭菌 20 min,冷却备用。

5 抽样

5.1 采样工具

5.1.1 下列采样工具应经 121 °C±2 °C,15 min 高压灭菌并烘干。

5.1.2 棉拭子。

5.1.3 剪刀、镊子。

5.1.4 注射器。

5.1.5 1.5 mL Eppendorf 管。

5.1.6 研钵。

5.1.7 真空采血管。

5.1.8 记号笔。

5.1.9 低温保藏箱或冰盒。

5.2 样品采集

5.2.1 采集的样品主要是口腔、蹄冠上的水泡上皮组织、水泡液、血液、口腔分泌物和组织。采集后立即冷藏送检或置于含抗生素的 PBS 缓冲液中 4 °C 环境下保藏。编号并作好记录。

5.2.2 水泡液及水泡皮:只有当水泡完整时才能采集到水泡液,用 75%酒精轻轻消毒水泡表皮,尽量去掉污物,用灭菌生理盐水擦去酒精,然后用无菌注射器穿刺水泡吸取水泡液,置于含抗生素的 PBS 缓

冲液灭菌瓶中。水泡液采取后,将水泡皮以无菌术剪下,放入含抗生素的 PBS 缓冲液中。

5.2.3 口腔分泌物和咽喉拭子:用拭子采取口腔分泌物或将拭子深入口腔内来回刮 3 次~5 次取分泌物,拭子一并放入盛有 1.0 mL 含抗生素的 PBS 缓冲液的 1.5 mL Eppendorf 管中。也可用食道探杯刮取咽喉液体,放入加有抗生素的 PBS 中。编号,冷藏送检或低温保藏。

5.2.4 血液:用真空采血管或无菌注射器直接采取至无菌 Eppendorf 管中,密封、编号后保存于 4 °C 环境中送检。

5.2.5 肌肉或组织脏器:无菌采集待检样品,装入一次性塑料袋或其他灭菌容器,编号,冷藏送检或低温保藏。

5.3 样品贮运

样品采集后,放入密闭的塑料袋内(一个采样点的样品,放入一个塑料袋内),于保温箱中加冰、密封,送实验室。

5.4 样品制备

5.4.1 水泡液、血液和口腔分泌物

样品在混匀器上充分混合后,用高压灭菌镊子将拭子中的液体挤出,室温放置 30 min,取上清液转入无菌的 1.5 mL Eppendorf 管中,编号备用。

5.4.2 水泡皮、肌肉或组织脏器

取待检样品 2.0 g 于洁净、灭菌并烘干的研钵中充分研磨,加 10 mL PBS 混匀,4 °C 下以 3 000 r/min 离心 15 min,取上清液转入无菌的 1.5 mL Eppendorf 管中,编号备用。

5.5 样本存放

制备的样本在 2 °C~8 °C 条件下保存应不超过 2 周,若需长期保存应置-70 °C 以下,但应避免反复冻融(冻融不超过 3 次)。

6 操作方法

6.1 实验室要求

猪水泡病病毒荧光 RT-PCR 检测的实验室分为三个相对独立的工作区域:样本制备区、反应混合物配制区和检测区,各工作区域应有明确标记,避免不同工作区域内的设备、物品混用;每一区域应有专用的仪器设备;进入各个工作区域应严格遵循单一方向顺序,即只能从样本制备区、扩增反应混合物配制区至检测区。

6.2 样本的处理

6.2.1 在样本制备区进行。样品中总 RNA 提取的试剂盒,有商品化试剂盒出售,也可自行配制。

6.2.2 取 n 个灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管,其中 n 为被检样品、阳性对照与阴性对照的数量之和,编号。

6.2.3 每管加入 600 μ L 裂解液,分别加入被检样本、阴性对照、阳性对照各 200 μ L,一份样本换用一个吸头,再加入 200 μ L 三氯甲烷,在混匀器上振荡混匀 15 s(不能过于强烈,以免产生乳化层,也可以用手颠倒混匀)。于 4 °C 以 12 000 r/min 离心 15 min。

6.2.4 取与 6.2.2 相同数量灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管,加入 500 μ L 异丙醇(-20 °C 预冷),做标记。吸取 6.2.3 各管中的上清液转移至相应的管中,上清液应至少吸取 500 μ L,不能吸出中间层,颠倒混匀。

6.2.5 于 4 °C、以 12 000 r/min 离心 15 min(Eppendorf 管开口保持朝离心机转轴方向放置),小心倒去上清液,倒置于吸水纸上,沾干液体(不同样品应在吸水纸不同地方沾干);加入 600 μ L 75%乙醇,颠倒洗涤。

6.2.6 于 4 °C、以 12 000 r/min 离心 10 min(Eppendorf 管开口保持朝离心机转轴方向放置),小心倒去上清液,倒置于吸水纸上,尽量沾干液体(不同样品应在吸水纸不同地方沾干)。

6.2.7 以 4 000 r/min 离心 10 s(Eppendorf 管开口保持朝离心机转轴方向放置),将管壁上的残余液体甩到管底部,小心倒去上清液,用微量加样器将其吸干,一份样本换一个吸头,吸头不要碰到有沉淀一面,室温干燥 3 min,不能过于干燥,以免 RNA 不溶。

6.2.8 各管加入 11 μ L DEPC 水,轻轻混匀,溶解管壁上的 RNA,以 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 PCR 扩增;若需长期保存应放置于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内。

6.3 检测

6.3.1 荧光 RT-PCR 反应液的配制

在反应混合物配制区进行。设所需荧光 RT-PCR 检测总数为 $n(n=u+2+1)$,其中 u 为被检样品数、2 为阳性对照数、1 为阴性对照数,按表 1 配制反应体系混合液。配制在冰盒中进行。

表 1 反应体系混合液配制

序号	组 分	每管用量/ μ L	n 管总用量/ μ L
1	AMV 反转录酶(5 U/ μ L)	1	$n \times 1$
2	dNTPs(每种均为 10 mmol/L)	5	$n \times 5$
3	RNasin(40 U/ μ L)	1	$n \times 1$
4	<i>Taq</i> DNA 聚合酶(5 U/ μ L)	0.5	$n \times 0.5$
5	反转录和 PCR 缓冲液(5 \times)	10	$n \times 10$
6	氯化镁(25 mmol/L)	6	$n \times 6$
7	上游引物(15 μ mol/L)	1	$n \times 1$
8	下游引物(15 μ mol/L)	1	$n \times 1$
9	探针(10 μ mol/L)	1	$n \times 1$
10	DEPC 水	13.5	$n \times 13.5$

6.3.2 荧光 RT-PCR 反应液分装

将 6.3.1 中配制的荧光 RT-PCR 反应液充分混合均匀,按每管 40 μ L 分装于 0.2 mL 透明 PCR 管,将 PCR 管放于 96 孔板上,一定要按顺序记录好被检样品管、阳性对照管、阴性对照管。转移至样本处理区。

6.3.3 加样

在样本处理区进行。在各设定的 PCR 管中分别加入 6.2.8 中制备的 RNA 溶液 10 μ L,盖紧管盖,以 500 r/min 离心 30 s。转移至检测区。

6.3.4 荧光 RT-PCR 检测

6.3.4.1 在检测区进行。将 7.3.3 中离心后的 PCR 管放入荧光 RT-PCR 检测仪内,在 96 孔板内(表内)记录或填写被检样品(Unknown)、阳性对照(PC)、阴性对照(NTC)。设置探针:5'为 FAM,3'为 TAMAR。

6.3.4.2 循环条件设置:

- 第一阶段,反转录 42 $^{\circ}\text{C}$ /30 min;
- 第二阶段,预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ /3 min;
- 第三阶段,94 $^{\circ}\text{C}$ /20 s,60 $^{\circ}\text{C}$ /30 s,40 个循环。

试验检测结束后,保存结果,根据收集的荧光曲线和 C_t 值判定结果。

7 结果判定

7.1 结果分析和条件设定

直接读取检测结果。基线和阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整,以阈值线刚好超过正常阴

性样品扩增曲线的最高点为准。

7.2 质控标准

7.2.1 阴性对照无 C_t 值,并且无扩增曲线,一直为水平线。

7.2.2 阳性对照的 C_t 值应小于 30.0,并出现典型的扩增曲线,2 个阳性对照扩增曲线基本重合。否则,此次实验视为无效。

7.3 结果描述及判定

7.3.1 阴性

无 C_t 值并且无扩增曲线,表示样品中无猪水泡病病毒。

7.3.2 阳性

C_t 值小于等于 30.0,且出现典型的扩增曲线,表示样品中存在猪水泡病病毒。

7.3.3 有效原则

C_t 值在 30.0~38.0 的样本建议重做。重做结果无 C_t 值或者大于 30.0 为阴性,否则为阳性。

附 录 A
(规范性附录)
试剂的配制

A. 1 磷酸盐缓冲盐水(PBS)的配制

A. 1.1 A 液

0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液:磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)27.6 g,溶于蒸馏水中,最后稀释至 1 000 mL。

A. 1.2 B 液

0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液:磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)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),加蒸馏水溶解,最后稀释至 1 000 mL。

A. 1.3 0.01 mol/L、pH7.2 磷酸盐缓冲盐水(PBS)的配制

取 A 液 14 mL, B 液 36 mL,加氯化钠(NaCl)8.5 g,用蒸馏水稀释至 1 000 mL。经 $121\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ 15 min 高压灭菌,冷却后,无菌条件下按每毫升加入 1 000 IU 青霉素、1 000 μg 链霉素。

A. 2 裂解液

裂解液的主要成分为异硫氰酸胍和酚,为 RNA 提取试剂,外观为红色液体,于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存;可直接购买商品化的 Trizol 试剂。

A. 3 反转录和 PCR 缓冲液(5 \times)配制

A. 3.1 Tris-HCl:250 mmol/L,pH8.3。

A. 3.2 氯化钾:250 mmol/L。

A. 3.3 氯化镁:50 mmol/L。

A. 3.4 DTT:50 mmol/L。

A. 3.5 TritonX-100:1%。