



中华人民共和国国家标准

GB/T 27644—2011

禽疱疹病毒 2 型荧光 PCR 检测方法

Protocol of real-time PCR for detecting Gallid Hepers Virus 2

2011-12-30 发布

2012-04-01 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

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
禽 痘 疹 病 毒 2 型 荧 光 PCR 检 测 方 法
GB/T 27644—2011

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100013)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址 www.spc.net.cn

总编室:(010)64275323 发行中心:(010)51780235

读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 17 千字
2012年3月第一版 2012年3月第一次印刷

*

书号: 155066·1-44332 定价: 16.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 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：中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、扬州大学、河南农业大学。

本标准主要起草人：詹爱军、刘文博、王新卫、卢体康、花群义、陈书琨、秦智锋、陈兵、高小博。

禽疱疹病毒 2 型荧光 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了禽疱疹病毒 2 型荧光 PCR 检测的操作方法。
本标准适用于禽疱疹病毒 2 型的鉴定及其流行病学调查、诊断、检疫和监测。

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。

Ct 值:每个反应管内的荧光信号量达到设定的阈值时所经历的循环数。

DNA:deoxyribonucleic acid 脱氧核糖核酸。

dNTP:deoxy-ribonucleoside triphosphate 三磷酸脱氧核糖核苷。含有 dCTP、dGTP、dATP、dTTP 四种脱氧核糖核苷。

EDTA:ethylene diaminetetraacetic acid 乙二胺四乙酸。

GHV 2:Gallid HepersVirus 2 禽疱疹病毒 2 型(马立克氏病病毒血清 1 型)。

MD:Marek's Disease 马立克氏病。

PBS:phosphate balanced solution 磷酸盐缓冲生理盐水。

PCR:polymerase chain reaction 聚合酶链式反应。

Real-time PCR:Real-time polymerase chain reaction 实时荧光聚合酶链反应。

Taq 酶:Thermus aquaticus polymerase 耐热 DNA 聚合酶。

4 试剂

4.1 试剂级别:除另有规定,本方法试验用水应符合 GB/T 6682 规定的二级水,所用化学试剂均为分析纯。

4.2 禽疱疹病毒 2 型荧光 PCR 检测试剂盒,−20℃保存,组成及使用注意事项参见附录 A。

4.3 引物和探针序列(产物长度 142 bp)

上游引物:5' CCACCACCTCCCATCTGTAC 3'

下游引物:5' GACAAGGCTGAGCGTAAACC 3'

TaqMan 探针:5' ACACGGCTCGGTAACAGGACACAATG 3',其 5'端和 3'端分别标记 FAM 和 BHQ(或 Tamra 或 Eclipse)。

4.4 1%肝素钠,配制方法见 B.1,4℃保存。

4.5 三氯甲烷,常温保存。

- 4.6 异丙醇,使用前预冷至 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 4.7 无水乙醇。
- 4.8 75%乙醇,采用无水乙醇和灭菌双蒸水配制,使用前预冷至 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 4.9 0.01 mol/L PBS, pH7.2, 配制方法见 B.2。

5 器材和设备

- 5.1 无菌注射器,1 mL,5 mL,10 mL,25 mL,100 mL。
- 5.2 一次性无菌塑料袋。
- 5.3 1.5 mL 无 DNA 酶和 RNA 酶的 Eppendorf 管。
- 5.4 0.2 mL 无 DNA 酶和 RNA 酶的 PCR 薄壁管、八联管或 96 孔板。
- 5.5 荧光 PCR 检测仪。
- 5.6 高速台式冷冻离心机,可控温至 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、离心速度可达 $12\ 000g$ 以上。
- 5.7 振荡器。
- 5.8 研钵。
- 5.9 普通冰箱和超低温冰箱:规格 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 5.10 微量移液器, $0\ \mu\text{L}\sim 2\ \mu\text{L}$ 、 $1\ \mu\text{L}\sim 10\ \mu\text{L}$ 、 $10\ \mu\text{L}\sim 100\ \mu\text{L}$ 、 $20\ \mu\text{L}\sim 200\ \mu\text{L}$ 、 $100\ \mu\text{L}\sim 1\ 000\ \mu\text{L}$,并配备与移液器匹配的无 DNA 酶和 RNA 酶的吸头。

6 样品的采集和处理

6.1 样品的采集

6.1.1 全血

用预先加入 1% 肝素钠的无菌注射器直接吸取全血至无菌 Eppendorf 管中,盖上管盖并编号。

6.1.2 羽毛和组织脏器

取待检羽毛(从根部挤出少量羽髓)、肝脏、肾脏和脾脏样品装入一次性塑料袋或其他灭菌容器,编号,送实验室。

6.2 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,放一个塑料袋),于保温箱中加冰、密封,送实验室。

6.3 样品处理

6.3.1 全血

$3\ 000g$ 离心 30 min,取棕黄色层转入无菌的 1.5 mL Eppendorf 管中,加入 $500\ \mu\text{L}$ PBS 洗涤, $3\ 000g$ 离心 15 min,弃上清,编号备用。

6.3.2 羽毛或组织脏器

取待检样品 2.0 g 加入 2 mL pH7.2 的 0.01 mol/L PBS 于洁净、灭菌并烘干的研钵中充分研磨,分装编号备用。

6.4 样本存放

制备的样本在 2℃~8℃ 条件下保存应不超过 24 h, 若需长期保存应置 -70℃ 以下, 但应避免反复冻融(冻融不超过 3 次), 淋巴细胞样品在 2℃~8℃ 条件下保存。

7 核酸提取及荧光 PCR 检测

7.1 注意事项

实验室注意事项见附录 C。

7.2 核酸提取

- 7.2.1 取 n 个灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管(n 为被检样品之和), 编号。
- 7.2.2 每管加入 250 μ L DNA 提取液(参见附录 A), 然后分别加入被检样本各 250 μ L, 一份样本换用一个吸头, 再加入 10 μ L 蛋白酶 K(1 mg/mL), 混匀器上振荡混匀, 56℃ 消化 2 h, 加入等体积的三氯甲烷, 混匀, 15 000g 离心 15 min。
- 7.2.3 取与 7.2.1 相同数量灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管, 吸取 7.2.2 各管中的上清液转移至相应的管中, 不能吸出中间层, 然后再分别加入等体积的 -20℃ 预冷的异丙醇, 颠倒混匀。
- 7.2.4 15 000g 离心 15 min, 小心倒去上清, 倒置于吸水纸上, 沾干液体; 加入 800 μ L 75% 乙醇, 颠倒洗涤。
- 7.2.5 15 000g 离心 10 min, 小心倒去上清, 倒置于吸水纸上, 尽量沾干液体。
- 7.2.6 5 000g 离心 10 s, 小心倒去上清, 将管壁上的残余液体甩到管底部, 用微量加样器将其吸干, 室温干燥 5 min~10 min。
- 7.2.7 加入 10 μ L 灭菌双蒸水, 溶解管壁上的 DNA, 6 000g 离心 5 s, 4℃ 保存备用。若需长期保存须放置 -80℃ 冰箱。

7.3 扩增检测

7.3.1 扩增试剂准备

在反应混合物配制区进行。

取出 MDV PCR 反应液(参见附录 A), 在室温下融化后, 1 000g 离心 5 s, 每个 PCR 反应按表 1 配制 PCR 反应混合液(需配制反应液数量=样本个数+阴性对照+阳性对照):

表 1

试剂	MDV PCR 反应液	Taq 酶
用量	21.75 μ L	0.25 μ L

将以上 PCR 反应试剂按使用量吸取到一个离心管中, 充分混匀, 然后在每个 PCR 管中分装 22 μ L, 转移至样本处理区。

7.3.2 加样

在已分装有 PCR 反应混合液的 PCR 管中分别加入已提取好的核酸 3 μ L, 盖上管盖, 将 PCR 管放入荧光 PCR 检测仪内, 记录样本放置顺序。

7.3.3 PCR 扩增检测

在扩增检测区进行。

7.3.4 反应条件设定

第一步:50 °C 2 min,95 °C 5 min;

第二步:95 °C 5 s,60 °C 45 s,40 个循环;

60 °C时设置采集荧光。

7.3.5 荧光素设定

Report Dye 设定为 FAM,Quench Dye 设定为 BHQ(或 Tamra 或 Eclipse);Reference dye 设定为自带校正荧光 ROX,如使用其他品牌仪器应设为空白或自带校正。

8 条件设定及结果判定

8.1 条件设定

禽疱疹病毒 2 型阳性对照和阴性对照质控标准:阳性对照有 S 型 PCR 扩增曲线,而且 Ct 值 \leq 35;阴性对照无 S 型 PCR 扩增曲线,而且 Ct 值显示为无。否则此次实验结果无效。

8.2 结果判定及描述

8.2.1 Ct 值 \leq 35 的样本为阳性,表明禽疱疹病毒 2 型核酸阳性。Ct 值显示为无的样本为阴性样本,表明禽疱疹病毒 2 型核酸阴性。

8.2.2 对于 $35 < \text{Ct 值} \leq 40$ 的样本建议对样品进行复检。若复检后,Ct 值 \leq 35,判为禽疱疹病毒 2 型核酸阳性,否则判为阴性。

附录 A
(资料性附录)
试剂盒的组成及使用说明

A.1 试剂盒组成

每个试剂盒可做 48 个检测,包括以下成分:

GHV 2 PCR 反应液	1.1 mL×1 管
Taq 酶	12.5 μ L×1 管
阴性对照	1.0 mL×1 管
阳性对照	1.0 mL×1 管
双蒸水	1 mL×1 管
DNA 提取液	12.5 mL×1 管

A.2 说明

A.2.1 GHV 2 PCR 反应液(1 \times):含 50 mmol/L KCl,10 mmol/L Tris-HCl(pH8.3),2.5 mmol/L MgCl₂,0.2 mmol/L dNTP mix,上、下游引物各 20 nmol/mL,探针 10 nmol/mL,1U Taq 酶,5%甘油。

A.2.2 DNA 提取液主要成分:20 mmol/L Tris-HCl(pH7.4),200 mmol/L EDTA,1% SDS。

A.3 使用时的注意事项

A.3.1 在检测过程中,应严防不同样品间的交叉污染。

A.3.2 反应液分装时应避免产生气泡,上机前检查各反应管是否盖紧,以免荧光物质泄露污染仪器。

附录 B
(规范性附录)
试剂的配制

B.1 1%肝素钠

称取肝素钠 1.0 g,溶于三蒸水中,定容至 100 mL,0.22 μm 过滤除菌,4 ℃保存。

B.2 磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L PBS,pH7.2)

先配制 A 液、B 液:

A 液 (0.2 mol/L NaH_2PO_4 溶液):

称取一水合磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)27.6 g,或二水合磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)31.2 g,溶于蒸馏水中,定容至 1 000 mL。

B 液 (0.2 mol/L Na_2HPO_4 溶液):

称取十二水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)71.6 g,或二水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)35.6 g,溶于蒸馏水中,定容至 1 000 mL。

称取 8.5 g 氯化钠,用适量蒸馏水溶解,量取 14 mL A 液和 B 液 36 mL,调节 pH 值至 7.2,用蒸馏水定容至 1 L。

附录 C

(规范性附录)

禽疱疹病毒 2 型荧光 PCR 检测方法的实验室规范

C.1 实验室设置要求

C.1.1 实验室分为三个相对独立的工作区域:样本制备区、PCR 反应混合物配制区和检测区,并且明确标识。

C.1.2 每一区域须有专用的仪器设备,并且明确标识。

C.1.3 进入各个工作区域严格遵循单一方向顺序,即只能从样本制备区、PCR 反应混合物配制区至检测区。

C.1.4 在不同的工作区域应使用不同颜色或有明显区别标志的工作服,工作服不能穿离各特定区域。

C.1.5 实验室清洁时应按 PCR 反应混合物配制区、样本制备区至检测区的顺序进行。

C.1.6 不同的实验区域应有其各自的清洁用具以防止交叉污染。

C.2 工作区域仪器设备配置

C.2.1 样本制备区仪器设备配置

2℃~8℃冰箱;−20℃冰箱,−80℃超低温冰箱;冰冻台式离心机($\geq 12\,000$ r/min);混匀器;微量加样器(0.5 μL~10 μL,5 μL~20 μL,20 μL~200 μL,200 μL~1 000 μL);可移动紫外灯。

C.2.2 PCR 反应混合物配制区仪器设备配置

2℃~8℃冰箱;−20℃冰箱;台式离心机($\geq 3\,000$ r/min);混匀器;微量加样器(0.5 μL~10 μL,5 μL~20 μL,20 μL~200 μL,200 μL~1 000 μL);可移动紫外灯。

C.2.3 检测区仪器设备配置

荧光 PCR 仪;可移动紫外灯;打印机。

C.3 各工作区域功能及注意事项

C.3.1 样本制备区

C.3.1.1 标本的保存,核酸提取、贮存及其加入至扩增反应管在样本制备区进行。

C.3.1.2 可在本区内设立正压条件以避免邻近区的气溶胶进入本区造成污染。

C.3.1.3 用过的加样器吸头应放入专门的消毒(例如含次氯酸钠溶液)容器内。实验室桌椅表面每次工作后都要清洁,实验材料(原始样本、提取过程中样本与试剂的混合液等)如出现外溅,应作清洁处理并作出记录。

C.3.1.4 对实验台适当的紫外照射(254 nm 波长,与工作台面近距离)可以帮助灭活病毒和消除核酸的污染。工作后通过移动紫外线灯管来确保对实验台面的充分照射。

C.3.2 PCR 反应混合物配制区

C.3.2.1 试剂的分装和反应混合液的制备在本区进行。

GB/T 27644—2011

C.3.2.2 在整个本区的实验操作过程中,操作者应戴手套。工作结束后应立即对工作区进行清洁。本工作区的实验台表面应可耐受诸如次氯酸钠等的化学物质的消毒清洁作用。

C.3.3 检测区

C.3.3.1 在本区进行荧光 PCR 检测。

C.3.3.2 PCR 扩增产物不能在本实验室开盖,PCR 管应抛弃在远离本实验室的垃圾箱中。

C.3.3.3 实验完成后采用紫外灯对实验室进行充分照射。



GB/T 27644-2011

版权专有 侵权必究

*

书号:155066·1-44332

定价: 16.00 元