



中华人民共和国国家标准

GB/T 27621—2011

马鼻肺炎病毒 PCR 检测方法

Protocol of PCR for equine rhinopneumonitis virus

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

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:新疆农业大学。

本标准主要起草人:冉多良、单文鲁、马伟、王传锋、张伟。

马鼻肺炎病毒 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了马鼻肺炎病毒的 PCR 检测方法。

本标准适用于马匹的流通和进出境检疫实施马鼻肺炎的现场检疫和后续监管工作。一步法 PCR 检测技术适用于实验室细胞毒样品检测；巢式 PCR 检测技术适用于临床疑似样品及细胞毒样品检测。

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。

EHV: equine rhinopneumonitis, 马传染性鼻肺炎。

RNA: ribonucleic acid, 核糖核酸。

CPE: cytopathic effect, 细胞病变。

EB: ethidium bromide, 溴化乙锭。

EDTA: ethylene diaminetetraacetic acid, 乙二胺四乙酸。

SDS: sodium dodecyl sulfate, 十二烷基磺酸钠。

BHK-21: baby hamster kidney cell, 仓鼠幼肾细胞。

PBS: phosphate buffer sodium, 磷酸盐缓冲液。

4 试剂和材料(试剂不经注明,均为分析纯)

4.1 水:符合 GB/T 6682 中一级水的规格。

4.2 RNA 酶 A。

4.3 酚-三氯甲烷。

4.4 2%琼脂糖凝胶:见 A. 1。

4.5 溴化乙锭(10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$):见 A. 2。

4.6 DNA 聚合酶(5 U/ μL)。

4.7 50×TAE 电泳缓冲液(pH 8.5):见 A. 3。

4.8 10×PCR Buffer (plus Mg^{2+})。

4.9 2.5 mmol/mL dNTP。

4.10 蛋白酶 K(20 mg/mL)。

4.11 BHK-21 细胞。

4.12 含 2% 犊牛血清的 MEM 维持液。

- 4.13 0.3 mol/L 乙酸钠。
- 4.14 0.01 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.2):见 A.4。
- 4.15 SDS。
- 4.16 10×TE 缓冲液(pH 8.0):见 A.5。
- 4.17 无水乙醇。
- 4.18 70%乙醇。
- 4.19 Tris 饱和酚(pH 8.0)。
- 4.20 分子质量标准 DL2000。

5 器材和设备

- 5.1 低温冷冻高速离心机。
- 5.2 倒置显微镜。
- 5.3 CO₂ 恒温培养箱。
- 5.4 普通冰箱和超低温冰箱。
- 5.5 组织研磨器。
- 5.6 1.5 mL 离心管。
- 5.7 PCR 扩增仪。
- 5.8 水平电泳槽。
- 5.9 微量移液器及吸头。
- 5.10 紫外照射仪或凝胶成像仪。

6 EHV 的分离

6.1 采样

取马流产胎儿病料的肺、脾或淋巴组织,疑似病驹呼吸系统的鼻咽拭子 3 根。

6.2 样品处理

组织样品 2 g 与 2 mL 0.01 mol/L PBS 缓冲液置于组织研磨器中研磨匀浆,反复冻融 3 次;鼻咽拭子 3 根在 2 mL 0.01 mol/L PBS 缓冲液中洗脱,反复冻融 3 次,离心取上清。

6.3 病毒增殖

将毒种接种到单层的 BHK-21 细胞上,37 °C 吸附 1 h,加适量含 2% 的犊牛血清的 MEM 维持液,CO₂ 恒温培养箱 37 °C 静置培养,利用倒置显微镜逐日观察 CPE,48 h 后当 CPE 达 85% 以上时收毒,冻存于-70 °C 冰箱备用。

7 EHV 的 PCR 检测

7.1 样品处理

组织样品 2 g 与 2 mL 0.01 mol/L PBS 缓冲液研磨匀浆,反复冻融 3 次;鼻咽拭子 3 根在 2 mL 0.01 mol/L PBS 缓冲液中洗脱,反复冻融 3 次,离心取上清。

7.2 核酸抽提

取适当病料或细胞毒 0.5 mL,加入 RNA 酶 A 至终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min;加入 20mg/mL 蛋白酶 K 至终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,SDS 终浓度为 0.5%。在 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴内反应 60 min 至反应物清亮,期间不断轻摇溶液。加等体积 TE 饱和酚,轻摇 20 min,12 000 r/min 离心 7 min;取水相加等体积酚-三氯甲烷(1:1),轻摇 20 min,12 000 r/min 离心 7 min;取水相加等体积三氯甲烷,轻摇 15 min,12 000 r/min 离心 7 min;收集水相。在上述水相中加入 2.5 倍体积预冷的无水乙醇和终浓度为 0.3 mol/L 乙酸钠,-20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 20 min。12 000 r/min 离心 10 min,使核酸沉淀,弃去上清液。立刻加入 70%乙醇,将沉淀漂洗 2 次,以去除残留的盐类。倾去乙醇,倒置在滤纸上干燥,然后加 0.5 mL TE(pH 8.0),于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内过夜溶解 DNA。37 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 20 min 或抽真空干燥;最后加 10 μL 水溶解后,作为 PCR 模板。

7.3 以引物 F、引物 F1c 和引物 F4c(参见 B.1)为条件的体系

含 1.5 mmol/L MgCl_2 的 10 \times PCR Buffer 5 μL ;2.5 mmol/L 的 dNTP 4 μL ;引物 F、引物 F1c 和引物 F4c(参见 B.1)各 1 μL ;模板 DNA 1 μL ;DNA 聚合酶 0.5 μL ;加双蒸水至 50 μL ,然后将上述成分混合均匀。在 PCR 扩增仪上进行扩增,PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min,30 次如下循环:94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,56 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。

取 10 μL PCR 扩增产物,加 2 μL 6 \times 加样缓冲液,在含有溴化乙锭的 2%琼脂糖凝胶上电泳 30 min,在紫外照射仪或凝胶成像仪上观察产物荧光带位置,以 DNA 2000 Marker 作分子质量标准比较;EHV-1 会出现 311 bp 的 DNA 片段,EHV-4 会出现 468 bp 的 DNA 片段。空白对照在 311 bp 和 468 bp 没有核酸带(参见附录 C)。

7.4 巢式 PCR 扩增方法

7.4.1 以引物 Fz 和引物 Fc[参见 B.2a)]为条件的体系如下:

- 含 1.5 mmol/L MgCl_2 的 10 \times PCR Buffer 5 μL ;2.5 mmol/L 的 dNTP 4 μL ;引物 Fz 和引物 Fc[参见 B.2a)]各 1 μL ;模板 DNA 1 μL ;2.5U DNA 聚合酶 0.5 μL ;加双蒸水至 50 μL ,混合均匀,瞬时离心后,放入 PCR 仪中。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min,25 次循环(94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,51 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min),取出 PCR 反应产物;
- 取 10 μL PCR 扩增产物,加 2 μL 6 \times 加样缓冲液,在含有溴化乙锭的 2%琼脂糖凝胶上电泳 30 min,在紫外照射仪或凝胶成像仪上观察产物荧光带位置,以 DNA 2000 Marker 作分子质量标准比较(标准 EHV-1 和 EHV-4 会出现 747 bp 的 DNA 片段,空白对照在 747 bp 没有 DNA 片段,参见图 D.1)。

7.4.2 巢式 PCR 第二次反应:待扩增病毒 DNA 为 100 倍稀释的一次扩增 PCR 产物作为二次扩增模板。以引物 F1 和引物 F1c[参见 B.2b)]为条件的体系如下:

- 含 1.5 mmol/L MgCl_2 的 10 \times PCR Buffer 5 μL ;2.5 mmol/L 的 dNTP 4 μL ;引物 F1 和引物 F1c[参见 B.2b)]各 1 μL ;模板 DNA 1 μL ;2.5U DNA 聚合酶 0.5 μL ;加双蒸水至 50 μL 。然后,将以上各成分混合均匀放入 PCR 仪中。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min,25 次循环(94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,45 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min);
- 取 10 μL PCR 扩增产物,加 2 μL 6 \times 加样缓冲液,在含有溴化乙锭的 2%琼脂糖凝胶上电泳 30 min,在紫外照射仪或凝胶成像仪上观察产物荧光带位置,以 DNA 2000 Marker 作分子质量标准比较(标准 EHV-1 出现 404 bp 的 DNA 片段,空白对照在 404 bp 没有 DNA 片段,参见图 D.2)。

7.4.3 以引物 F4 和引物 F4c[参见 B. 2c)]为条件的体系如下:

- 含 1.5 mmol/L MgCl₂ 的 10×PCR Buffer 5 μL; 2.5 mmol/L 的 dNTP 4 μL; 引物 F4 和引物 F4c[参见 B. 2c)]各 1 μL; 模板 DNA 1 μL; 2.5U DNA 聚合酶 0.5 μL; 加双蒸水至 50 μL, 然后将以上各成分混合均匀放入 PCR 仪中。PCR 反应程序为 94 °C 预变性 4 min, 25 次循环 (94 °C 变性 1 min, 56 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 最后 72 °C 延伸 7 min);
- 取 10 μL PCR 扩增产物, 加 2 μL 6×加样缓冲液, 在含有溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶上电泳 30 min, 在紫外照射仪或凝胶成像仪上观察产物荧光带位置, 以 DNA 2000 Marker 作分子质量标准比较 (标准 EHV-1 出现 334 bp 的 DNA 片段, 空白对照在 334 bp 没有 DNA 片段, 参见图 D. 3)。

7.4.4 以引物 F 和引物 F1c、F4c[参见 B. 2d)]为条件的体系如下:

- 含 1.5 mmol/L MgCl₂ 的 10×PCR Buffer 5 μL; 2.5 mmol/L 的 dNTP 4 μL; 引物 F、引物 F1c 和引物 F4c[参见 B. 2d)]各 1 μL; 模板 DNA 1 μL; 2.5U DNA 聚合酶 0.5 μL; 加双蒸水至 50 μL, 然后将以上各成分混合均匀放入 PCR 仪中。反应程序为 94 °C 预变性 4 min, 25 次循环 (94 °C 变性 1 min, 50 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 最后 72 °C 延伸 7 min);
- 取 10 μL PCR 扩增产物, 加 2 μL 6×加样缓冲液, 在含有溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶上电泳 30 min, 在紫外照射仪或凝胶成像仪上观察产物荧光带位置, 以 DNA 2000 Marker 作分子质量标准比较 (在 311 bp 位置上有核酸带, 判定为 EHV-1 型阳性样品; 在 468 bp 位置上有核酸带, 判定为 EHV-4 型阳性样品; 在 311 bp 和 468 bp 位置上都有核酸带, 可判为 EHV-1 和 EHV-4 型混合感染, 参见图 D. 4)。

7.5 设立对照

7.5.1 在 7.1 中的样品处理过程中必须设立阳性样品对照、阴性样品对照、空白对照。

7.5.2 取含有已知 EHV 的病毒标准株的组织悬液作为阳性对照。

7.5.3 采用未接种病毒的正常 BHK-21 细胞抽提核酸作为阴性对照。

7.5.4 取等体积的水代替模板作为空白对照。

7.6 琼脂糖电泳

用 TAE 电泳缓冲液配制 2% 的琼脂糖 (含 1 μg/mL EB) 平板。将平板放入水平电泳槽, 使电泳缓冲液刚好淹没胶面。将 6 μL PCR 扩增产物和 2 μL 溴酚蓝指示剂溶液混匀后加入孔内。在电泳时使用核酸分子质量标准参照物作对照。5 V/cm 电泳约 0.5 h, 当溴酚蓝到达琼脂糖凝胶的底部时停止。

7.7 结果判定

7.7.1 一步法 PCR 扩增结果判定如下 (以 DNA 2000 Marker 作分子质量标准比较):

- a) EHV-1 会出现 311 bp 的 DNA 片段, EHV-4 会出现 468 bp 的 DNA 片段。空白对照在 311 bp 和 468 bp 没有核酸带。对照成立才能进行判定。
- b) 在 311 bp 位置上有核酸带, 判定为 EHV-1 型阳性样品; 若在 311 bp 位置上无核酸带, 判定为 EHV-1 型阴性样品。在 468 bp 位置上有核酸带, 判定为 EHV-4 型阳性样品; 若在 468 bp 位置上无核酸带, 判定为 EHV-4 型阴性样品。

7.7.2 巢式 PCR 结果判定如下 (以 DNA 2000 Marker 作分子质量标准比较):

- a) 一次 PCR 扩增结果: 标准 EHV-1/4 会出现 747 bp 的 DNA 片段。空白对照在 747 bp 没有 DNA 片段。二次 PCR 扩增结果: 标准 EHV-1 出现 311 bp 或 404 bp 的 DNA 片段。空白对照在 311 bp 或 404 bp 没有 DNA 片段。标准 EHV-4 出现 334 bp 或 468 bp 的 DNA 片段。空白对照在 334 bp 或 468 bp 没有 DNA 片段。两次结果对照成立才能进行判定。

- b) 若一次扩增后在 747 bp 位置上有核酸带,判定为阳性样品;无核酸带或条带的大小不在 747 bp 位置上,判为阴性样品。若二次扩增后在 311 bp 或 404 bp 位置上有核酸带,判为 EHV-1 型阳性样品;无核酸带或条带的大小不在 311 bp 或 404 bp 位置上,判定为非 EHV-1 型阳性样品。若二次扩增后在 334 bp 或 468 bp 位置上有核酸带,判为 EHV-4 型阳性样品;无核酸带或条带大小不在 334 bp 或 468 bp 位置上,判为非 EHV-4 型阳性样品。若二次扩增后在 311 bp 和 468 bp 位置上有两条核酸带,可判为 EHV-1/4 型混合感染。

附录 A
(规范性附录)
试剂的配制

A.1 2% 琼脂糖凝胶

琼脂糖	2 g
1×TAE 电泳缓冲液	100 mL

微波炉中完全融化,待冷至 50 °C 时,加溴化乙锭(EB)溶液 5 μL,摇匀,倒入电泳板上,凝固后取下梳子,备用。

A.2 溴化乙锭(EB)溶液(10 mg/mL)

溴化乙锭	1 g
灭菌双蒸水	100 mL

A.3 50×TAE 电泳缓冲液(pH 8.5)

羟基甲基氨基甲烷(Tris)	242 g
EDTA·2H ₂ O	37.2 g
冰乙酸	57.1 mL

灭菌双蒸水加至 1 000 mL,用时用灭菌双蒸水稀释使用。

A.4 0.01 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.2)

Na ₂ HPO ₄	1.42 g
KH ₂ PO ₄	0.27 g
NaCl	8 g
KCl	0.2g

灭菌双蒸水加至 1 000 mL,高压灭菌。

A.5 10×TE 缓冲液

1 mol/L tris-HCl Buffer	100 mL
0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)	20 mL

灭菌双蒸水加至 1 000 mL,高压灭菌。

附录 B
(资料性附录)
引物序列及其特性

B.1 一步法 PCR 引物

引物合成参照 GeneBank 中的 EHV-1 和 EHV-4 的部分 gB 基因序列,用 Primerpremier5.0 软件设计特异性引物,其浓度为 10 pmol/mL,序列如下:

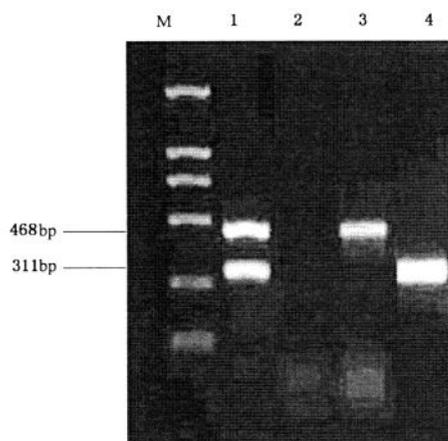
F:	5'GATGCCATGGAGGCACTACAC3'	EHV-1 和 EHV-4 共有
F1c:	5'CTCGACTTTCTTCTCTCGGTCC3'	EHV-1 特有
F4c:	5'TTGACACACAGTCCGTGAGT3'	EHV-4 特有

B.2 巢氏 PCR 引物

引物合成参照 GeneBank 中的 EHV-1 和 EHV-4 的部分 gB 基因序列,用 Primerpremier5.0 软件设计特异性引物,其浓度为 10 pmol/mL,序列如下:

a) 巢式 PCR 第一次反应的引物		
Fz:	5'GGAAAGGATACAGCCATACGTC3'	EHV-1 和 EHV-4 共有
Fc:	5'GTATATCGAGTCTATGGCTTC3'	EHV-1 和 EHV-4 共有
b) 巢式 PCR 第二次反应扩增 EHV-1 的引物		
F1:	5'GAGGTGGAGCTTGATTTGTG3'	EHV-1 特有
F1c:	5'CTCGACTTTCTTCTCTCGGTCC3'	EHV-1 特有
c) 巢式 PCR 第二次反应扩增 EHV-4 的引物		
F4:	5'TCGGTCAGCTGCTCAGTTAG3'	EHV-4 特有
F4c:	5'TTGACACACAGTCCGTGAGT3'	EHV-4 特有
d) 巢式 PCR 第二次反应同时扩增 EHV-1 和 EHV-4 的引物		
F:	5'GATGCCATGGAGGCACTACAC3'	EHV-1 和 EHV-4 共有
F1c:	5'CTCGACTTTCTTCTCTCGGTCC3'	EHV-1 特有
F4c:	5'TTGACACACAGTCCGTGAGT3'	EHV-4 特有

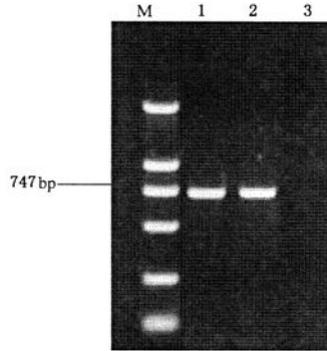
附录 C
(资料性附录)
一步法 PCR 反应结果



- M——DNA Marker(DL 2000);
- 1——标准 EHV-1 和标准 EHV-4 混合 DNA;
- 2——阴性对照;
- 3——标准 EHV-4 DNA;
- 4——标准 EHV-1 DNA。

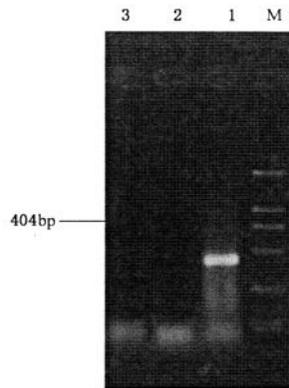
图 C.1 以 F/F1c-F4c 为引物的一步法 PCR 反应结果

附录 D
(资料性附录)
巢式法 PCR 反应结果



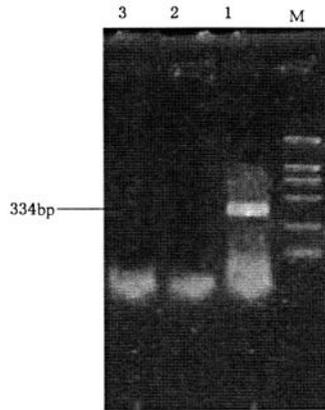
M——DNA Marker(DL 2000);
1——标准 EHV-1 DNA;
2——标准 EHV-4 DNA;
3——阴性对照。

图 D.1 以 Fz/Fc 为引物的第一次 PCR 反应结果



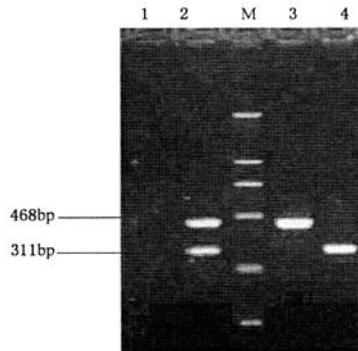
M——DNA Marker(DL 2000);
1——标准 EHV-1 DNA;
2——标准 EHV-4 DNA;
3——阴性对照。

图 D.2 以 F1/F1c 为引物的套式 PCR 反应结果



M——DNA Marker(DL 2000);
1——标准 EHV-4 DNA;
2——标准 EHV-1 DNA;
3——阴性对照。

图 D.3 以 F4/F4c 为引物的套式 PCR 反应结果



M——DNA Marker(DL 2000);
1——阴性对照;
2——标准 EHV-1 和标准 EHV-4 混合 DNA;
3——标准 EHV-4 DNA;
4——标准 EHV-1 DNA。

图 D.4 以 F/F1c-F4c 为引物的套式 PCR 反应结果