



中华人民共和国国家标准

GB/T 27634—2011

传染性囊病病毒核酸检测方法

Protocol of nucleic acid detection for infectious bursal disease
(gumboro disease) 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 发布
中国国家标准化管理委员会



前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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、深圳市检验检疫科学研究院、华南农业大学、中华人民共和国珠海出入境检验检疫局、北京盈九思科技有限公司。

本标准主要起草人：秦智锋、孙洁、卢体康、花群义、陈书琨、吕建强、杨素、方兴旺、曾少灵、詹爱军、毕英佐、陈兵、阮周曦、朱玉兰。

传染性囊病病毒核酸检测方法

1 范围

本标准规定了传染性囊病病毒 RT-PCR 检测方法和实时荧光 RT-PCR 检测方法的技术要求和操作规范。

本标准适用于传染性囊病病毒感染的快速诊断。

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

GB/T 18088 出入境动物检疫采样

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文件。

Ct 值:荧光信号量达到设定的阈值时所经历的循环数。

IBD:infectious bursal disease,传染性囊病。

IBDV:infectious bursal disease virus,传染性囊病病毒。

SPF:specific pathogen free,无特定病原体。

4 材料与试剂

4.1 仪器与耗材

4.1.1 核酸电泳仪。

4.1.2 凝胶成像仪。

4.1.3 冷冻离心机(最高离心力达 15 000g 以上)。

4.1.4 混匀器。

4.1.5 冰箱(2℃~8℃,-20℃,-80℃)。

4.1.6 微量可调移液器(10 μL,100 μL,1 000 μL)。

4.1.7 微量带滤芯吸嘴(10 μL,100 μL,1 000 μL)。

4.1.8 灭菌研钵。

4.1.9 离心管。

4.1.10 PCR 光学反应管。

4.1.11 PCR 仪。

4.1.12 实时荧光 PCR 仪。

4.2 试剂

- 4.2.1 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。
- 4.2.2 引物与探针:采用无 DNA 酶、无 RNA 酶水将每条引物与探针配制成 100 $\mu\text{mol/L}$ 储存液,置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或更低温度冻存;使用时取适量配制成 10 $\mu\text{mol/L}$ 工作液,避免多次冻融。
- 4.2.3 灭菌双蒸水。
- 4.2.4 三氯甲烷。
- 4.2.5 异丙醇。
- 4.2.6 无水乙醇。
- 4.2.7 75%乙醇:用新开启的灭菌双蒸水配制, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷。
- 4.2.8 DL2000 DNA Marker。
- 4.2.9 一步法 RT-PCR 检测试剂盒。
- 4.2.10 一步法实时荧光 RT-PCR 检测试剂盒。

5 生物安全要求

- 5.1 采样、样品处理及检测过程所涉及的实验操作,应遵守 GB 19489 的有关规定。
- 5.2 IBDV 核酸检测方法的实验室规范(参见附录 A)。

6 样品的采集

- 6.1 按照 GB/T 18088 的要求进行样品的采集。
- 6.2 样品包括各种病料、用于 IBDV 监测和检测的禽组织、IBDV 的细胞培养液、IBDV 接种鸡胚的尿囊液等。

7 核酸抽提

7.1 酚三氯甲烷抽提法

- 7.1.1 取灭菌的 1.5 mL 离心管,做好标识。
- 7.1.2 每管加入 600 μL 裂解液,分别加入被检样本、阴性对照(SPF 鸡的法氏囊组织 PBS 研磨上清液)、阳性对照(标准的 IBDV 毒株)各 200 μL ,再加入 200 μL 三氯甲烷,混匀器上振荡混匀 5 s,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 12 000g 离心 15 min。
- 7.1.3 取无 RNA 酶的 1.5 mL 离心管,加入 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷 400 μL 异丙醇,吸取本标准 7.1.2 各管中的上清液转移至相应的管中,避免吸出中间层,颠倒混匀。
- 7.1.4 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 12 000g 离心 15 min,弃上清,倒置于吸水纸上,沾干液体;加入 600 μL 75%预冷乙醇,洗涤。
- 7.1.5 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 12 000g 离心 10 min,弃上清,倒置于吸水纸上,沾干液体。
- 7.1.6 10 000g 离心 10 s,用微量加样器将其吸干,室温干燥 5 min~10 min。
- 7.1.7 加入 15 μL 无核酸降解酶的水,溶解管底的 RNA,5 000g 离心 5 s,冰上保存备用。若需长期保存应放置 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

7.2 其他核酸抽提法

核酸提取可以采用等效 RNA 提取试剂及方法,如采用自动化核酸抽提工作站来抽提核酸。

8 RT-PCR 检测

8.1 引物

8.1.1 针对 A 片段 VP2 基因的引物

上游 U3:5'-TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT-GCA-TGC-GGT-ATG-TGA-GGC-TTG-GTG-AC-3'

下游 L3:5'-CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC-GAA-TTC-GAT-CCT-GTT-GCC-ACT-CTT-TC-3'

8.1.2 针对 B 片段 VP1 基因的引物

上游+290:5'-TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT-GAA-TTC-AGA-TTC-TGC-AGC-CAC-GGT-CTC-T-3'

下游-861:5'-CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC-CTG-CAG-TTG-ATG-ACT-TGA-GGT-TGA-TTT-TG-3'

8.1.3 引物组成的说明

8.1.3.1 通用引物 M13 或 R13(黑体部分)序列。M13 或 R13 序列为多数测序反应中的测序引物,便于对 PCR 扩增产物测序。

8.1.3.2 限制性内切酶位点(下划线部分)。限制性内切酶位点的引入,使得 IBDV 经 RT-PCR 扩增后的产物可用限制性内切酶 SphI(引物 U3)、EcoRI(引物 L3 和+290)、Pst I(引物-861)进行酶切后加入质粒中。引物 U3 和 L3 分别对应 Acc No X84034 毒株序列片段 A 的 657—676 和 1193—1212 位置,引物+226 和-793 分别对应 Acc No AF240687 毒株序列片段 B 中的 290—311 和 861—883 位置。

8.1.3.3 IBDV 特异性序列(斜体部分)。A 片段扩增产物为 604 bp,B 片段扩增产物为 642 bp,引物扩增片段适合进行 IBDV 分子分析和分子流行病学研究。

8.2 反应液的配制

按照商业化的一步法 RT-PCR 试剂盒推荐说明书,进行 IBDV RT-PCR 反应液的配制(参见附录 B)。将配制的每个 PCR 反应试剂充分混匀,瞬时离心后转移至样本处理区。

8.3 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 5 μ L,混匀后瞬时离心,将 PCR 管放入 PCR 检测仪内,记录样本放置顺序。

8.4 PCR 扩增检测

8.4.1 在扩增检测区进行。

8.4.2 PCR 反应条件为:

第一步:反转录 50 $^{\circ}$ C 45 min;

第二步:94 $^{\circ}$ C 5 min(如果为热启动一步法 RT-PCR 试剂盒,则需要 95 $^{\circ}$ C 15 min);

第三步:94 $^{\circ}$ C 30 s,54 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 1 min 30 s,5 个循环;

第四步:94 $^{\circ}$ C 30 s,64 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 1 min 30 s,30 个循环;

第五步:72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

8.5 上样和电泳

配制凝胶(见附录 C)。将样品的扩增产物按编号加入对应的 1% 琼脂糖凝胶的各孔中,其中一个上样孔中加入标准阳性对照扩增产物,一个上样孔中加入标准阴性对照扩增产物。在凝胶的边孔中加入标准分子质量的 DNA Marker。将凝胶在 80 V 恒定电压下电泳 60 min。将凝胶置紫外灯或凝胶成像仪中进行检查。

8.6 结果判定

8.6.1 阳性

出现一条分子质量为 604 bp 条带,与阳性对照 PCR 产物同步迁移的大小相同条带,判为 IBDV 片段 A 核酸阳性。出现一条分子质量为 642 bp 条带,与阳性对照 PCR 产物同步迁移的大小相同条带,判为 IBDV 片段 B 核酸阳性。片段 A 和片段 B 同时出现核酸阳性,可以判定 IBDV 阳性。

8.6.2 阴性

片段 A 和片段 B 同时出现核酸阴性,IBDV 判为阴性。

8.6.3 可疑

在片段 A 和片段 B 的核酸检测中,只出现其中一个片段为阳性,另一个片段为阴性,则判定为 IBDV 可疑。结果可疑应进行实时荧光 RT-PCR 检测,或重复进行 RT-PCR 检测,出现 A 和 B 两个片段中任何一个片段判定为阳性,否则判定为阴性。

9 实时荧光 RT-PCR 检测

9.1 引物和探针

9.1.1 针对 A 片段 VP2 基因的引物

上游引物:5' TTCATACGGAGCCTTCTGAT 3';

下游引物:5' ACAATTAGCCCTGACCCT 3'。

9.1.2 TaqMan 探针:5' FAM-CAACCGGACCGGCGTCCATTC-BHQ 3',其 5' 端和 3' 端分别标记 FAM 和 BHQ。

9.2 扩增检测

9.2.1 扩增试剂准备

在反应混合物配制区进行。按照商业化的一步法实时荧光 RT-PCR(real time RT-PCR)试剂盒推荐说明书,进行 IBDV real time RT-PCR 反应液的配制(参见附录 D)。将配制的每个 PCR 反应试剂充分混匀,瞬时离心后转移至样本处理区。

9.2.2 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 5 μ L,混匀后瞬时离心,将 PCR 管放入荧光 PCR 检测仪内,记录样本放置顺序。

9.2.3 PCR 扩增检测(扩增检测区)

9.2.3.1 反应条件设定

第一步:反转录 45 $^{\circ}$ C 30 min;

第二步:热启动 95 °C 15 min(不同的生产厂家推荐的时间不同,应根据说明书进行);

第三步:95 °C 15 s,60 °C 45 s,40 个循环,60 °C 时设置采集荧光。

9.2.3.2 荧光素设定

报告荧光(report dye)设定为 FAM(或按探针实际标记的荧光基团设定),淬灭荧光(quencher dye)设定为 None,校准荧光(reference dye)设定为 None。可根据不同品牌仪器说明等效设置参数。

9.3 分析条件设定和结果判定

9.3.1 阈值设定

综合分析仪器给出的各项结果,基线(baseline)以仪器给出的默认值作为参考,阈值(threshold)设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照样品扩增曲线的最高点为准,具体还需根据仪器噪声情况进行调整,选择 FAM 通道进行分析。

9.3.2 质控

阴性对照应无 Ct 值,阳性对照的 Ct 值应 ≤ 30 ,且呈现 S 型典型扩增曲线。二者均成立才可判定试验成立,否则试验无效。

9.3.3 荧光 PCR 结果分析及判定

9.3.3.1 阳性反应结果判定

在试验成立条件下,检测结果呈现 Ct 值 ≤ 35 、且扩增曲线有明显的对数增长期,判为荧光 PCR 阳性反应,表明 IBDV 核酸阳性。

9.3.3.2 阴性反应结果判定

检测结果呈现无 Ct 值、无扩增曲线或反应曲线无明显对数增长期,判为荧光 PCR 阴性反应,表明 IBDV 核酸阴性。

9.3.3.3 可疑反应结果判定

检测结果 $35 < \text{Ct 值} \leq 40$,判为可疑样品。对于可疑样品,先看扩增曲线。如果扩增曲线为对数扩增曲线,则为可疑阳性,否则判为阴性。

9.3.3.4 可疑样品处理

对于可疑阳性样品,应重新抽提核酸,再次进行 IBDV real time RT-PCR 检测。如果重复检测的 Ct 值 < 40 ,且曲线有明显的对数增长期,判为阳性反应,表明 IBDV 核酸阳性。否则判为荧光 PCR 阴性反应。

附录 A

(资料性附录)

IBDV 核酸检测方法的实验室规范

A.1 实验室设置要求

A.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。

A.1.2 每一区域应有专用的仪器设备,并且明确标识。

A.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。

A.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。

A.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。

A.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。

A.2 工作区域仪器设备配置

A.2.1 样本制备区仪器设备配置

2℃~8℃冰箱;—20℃冰箱;冰冻台式离心机($\geq 12\ 000g$);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。

A.2.2 PCR 反应混合物配制区

2℃~8℃冰箱;—20℃冰箱;台式离心机($\geq 3\ 000g$);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。

A.2.3 检测区仪器设备配置

荧光 PCR 仪;可移动紫外灯;打印机。

A.3 各工作区域功能及注意事项

A.3.1 样本制备区

A.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。

A.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。

A.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。

A.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。

A.3.2 PCR 反应混合物配制区

A.3.2.1 试剂的分装和反应混合液的制备在本区进行。

A.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。

A.3.3 检测区

A.3.3.1 在本区进行荧光 PCR 检测。

A.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。

A.3.3.3 实验完成后采用紫外灯对实验室进行充分照射。



附 录 B
(资料性附录)

IBDV RT-PCR 反应液的配制

每份检测样品的 IBDV RT-PCR 体系(50 μL)如表 B.1。

表 B.1

组 分	体 积 μL
无核酸降解酶的水	20
10×One step RNA PCR Buffer	5
MgCl ₂ (25 mmol/L)	10
dNTP Mixture(各 10 mmol/L)	5
上游引物(20 $\mu\text{mol}/\text{mL}$)	1
下游引物(20 $\mu\text{mol}/\text{mL}$)	1
RNase Inhibitor(40 U/ μL)	1
AMV RTase XL(5 U/ μL)	1
AMV-Optimized Taq(5 U/ μL)	1
总体积	45

注：不同公司生产的 one step RT-PCR 试剂盒反应成分不同,体系不同,可根据相应的说明书进行修改。

附 录 C
(规范性附录)
电泳缓冲液的配制

C.1 琼脂糖凝胶的 TAE 缓冲液(50×)

三羟甲基氨基甲烷(Tris-base)	242 g
0.5 mol/L(pH8.0)乙二胺四乙酸($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	100 mL
冰乙酸	57.1 mL
蒸馏水	700 mL

待上述混合物完全溶解后,加蒸馏水至 1 000 mL,至 4 °C 冰箱中备用。

如配制 1% 的琼脂糖凝胶和用作电泳缓冲液,则用蒸馏水稀释 50 倍成 TAE 缓冲液。

C.2 1%琼脂糖凝胶板制备

取 0.5 g 琼脂糖加入 50 mL 1×TAE 缓冲液中,在微波炉中充分溶解后,冷却至 60 °C 后,加入 3 μL 10 mg/mL 溴化乙锭,倒入凝胶板中,插入梳子,待凝胶完全凝固后拔去梳子,备用。

附 录 D
(资料性附录)

IBDV real time RT-PCR 反应液的配制

每份检测样品的 IBDV real time RT-PCR 体系 (25 μL) 如表 D.1。

表 D.1

组 分	体 积 μL
2 \times RT-PCR Buffer	12.5
Enzyme Mix	1.0
上游引物 (10 $\mu\text{mol}/\text{mL}$)	1.0
下游引物 (10 $\mu\text{mol}/\text{mL}$)	1.0
TaqMan 探针 (5 $\mu\text{mol}/\text{mL}$)	1.0
无核酸降解酶的水	3.5
总体积	20
注：不同公司生产的 real time one step RT-PCR 试剂盒反应成分不同，体系不同，可根据相应的说明书进行修改。	

中华人民共和国
国家标准
传染性囊病病毒核酸检测方法
GB/T 27634—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 1 字数 21 千字
2012年3月第一版 2012年3月第一次印刷

*

书号: 155066·1-44348 定价 18.00 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



GB/T 27634-2011