

ICS 11.220
B 41



中华人民共和国国家标准

GB/T 21674—2008

猪圆环病毒聚合酶链反应试验方法

Detecting porcine circovirus with polymerase chain reaction

2008-04-09 发布

2008-06-01 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：农业部兽医诊断中心。

本标准主要起草人：田克恭、王宏伟、孙明、王传彬、陈西钊。

引 言

猪圆环病毒依据其致病性和基因组差异分为无致病性的猪圆环病毒 I 型 (porcine circovirus type1, PCV-1) 和有致病性的猪圆环病毒 II 型 (porcine circovirus type2, PCV-2)。PCV-2 是引发仔猪断奶后多系统衰弱综合征 (post-weaning multisystem wasting syndrome, PMWS) 的主要病原。该病主要以患畜生长迟缓、进行性消瘦和多系统病理损伤为特征, 给世界各国主要养猪地区的规模化养猪业造成了一定的经济损失。

猪圆环病毒聚合酶链反应试验方法

1 范围

本标准规定了猪圆环病毒(PCV)聚合酶链反应(PCR)检测方法的技术要求。

本标准适用于猪血清和组织中的猪圆环病毒检测,以及其 I 型(PCV-1)和 II 型(PCV-2)的鉴别。

2 实验室生物安全要求

试验操作应在生物安全 II 级(BSL-2 级)以上的实验室进行。

3 实验材料、仪器设备和试剂

3.1 实验材料

眼科剪、眼科镊、称量纸、10 mL 一次性注射器、1.5 mL 灭菌离心管、0.2 mL 薄壁 PCR 管、琼脂糖、500 mL 量筒、500 mL 锥形瓶、吸头(10 μ L、200 μ L、1 000 μ L)、灭菌双蒸水。

3.2 仪器设备

分析天平、高速离心机、真空干燥器、PCR 扩增仪、电泳仪、电泳槽、紫外凝胶成像仪(或紫外分析仪)、液氮罐或 -70°C 冰箱、微波炉、组织研磨器、 -20°C 冰箱、水浴锅、可调移液器(最大量程为 2 μ L、20 μ L、200 μ L、1 000 μ L)。

3.3 试剂

本标准所用试剂,除特殊标注外,均为分析纯。

- 3.3.1 消化液(见第 A.1 章)。
- 3.3.2 2%蛋白酶 K 溶液(见第 A.2 章)。
- 3.3.3 酚-三氯甲烷-异戊醇混合液(见第 A.3 章)。
- 3.3.4 2.5 mmol/L dNTP(见第 A.4 章)。
- 3.3.5 10 pmol/ μ L PCV 引物(见第 A.5 章)。
- 3.3.6 0.5 U/ μ L Taq DNA 聚合酶(见第 A.6 章)。
- 3.3.7 10 倍 PCR 缓冲液(见第 A.7 章)。
- 3.3.8 溴化乙锭(EB)溶液(见第 A.8 章)。
- 3.3.9 电泳缓冲液(50 倍)(见第 A.9 章)。
- 3.3.10 1%琼脂糖凝胶(见第 A.10 章)。
- 3.3.11 上样缓冲液(见第 A.11 章)。
- 3.3.12 异丙醇。
- 3.3.13 75%乙醇(见第 A.12 章)。
- 3.3.14 15 mmol/L 氯化镁(见第 A.13 章)。
- 3.3.15 灭菌双蒸水(见第 A.14 章)。
- 3.3.16 电泳缓冲液(1 倍)(见第 A.15 章)。

4 操作程序

4.1 样品的采集与处理

4.1.1 样品的采集:濒死猪、扑杀的成年猪和流产胎儿取肺脏和淋巴结;幼龄猪取心脏;待检活猪,用注射器取血 2 mL~4 mL,立即送往实验室。

4.1.2 样品的处理:每份样品分别处理

4.1.2.1 组织样品处理:取待检病料约 0.2 g 置研磨器中剪碎并研磨,加入 2 mL 消化液(3.3.1)继续研磨。取已研磨好的待检病料上清 100 μ L,置 1.5 mL 灭菌离心管中,再加入 500 μ L 消化液(3.3.1)和 10 μ L 2%蛋白酶 K 溶液(3.3.2),混匀后,置 55 $^{\circ}$ C 水浴中 4 h~16 h。

4.1.2.2 血清样品处理:待血液凝固后,取上清放于离心管中,4 $^{\circ}$ C 8 000 g 离心 5 min,取上清 100 μ L,置 1.5 mL 灭菌离心管中,加入 500 μ L 消化液(3.3.1)和 10 μ L 2%蛋白酶 K 溶液(3.3.2),混匀,置 55 $^{\circ}$ C 水浴中 4 h~16 h。

4.1.2.3 阳性对照处理:分别取 PCV-1 和 PCV-2 细胞培养液各 100 μ L,置 1.5 mL 灭菌离心管中,每管加入 500 μ L 消化液(3.3.1)和 10 μ L 2%蛋白酶 K 溶液(3.3.2),混匀,置 55 $^{\circ}$ C 水浴中 4 h~16 h。

4.1.2.4 阴性对照处理:取灭菌双蒸水 100 μ L,置 1.5 mL 灭菌离心管中,加入 500 μ L 消化液(3.3.1)和 10 μ L 2%蛋白酶 K 溶液(3.3.2),混匀,置 55 $^{\circ}$ C 水浴中 4 h~16 h。

4.2 DNA 模板的提取

4.2.1 取出已处理的待检样品及阴性、阳性对照样品,每管加入 600 μ L 酚-三氯甲烷-异戊醇混合液(3.3.3),用力颠倒 10 次混匀,13 000 g 离心 10 min。

4.2.2 取上清 500 μ L,置 1.5 mL 灭菌离心管中,加入等体积异丙醇(3.3.12),混匀,置液氮中 3 min 或 -70 $^{\circ}$ C 冰箱中 30 min,取出离心管,室温融化,4 $^{\circ}$ C 20 000 g 离心 15 min。

4.2.3 弃上清,沿离心管开口方向管壁缓缓滴入 1 mL -20 $^{\circ}$ C 预冷的 75%乙醇(3.3.13)溶液,轻轻旋转洗一次后倒掉,将离心管倒扣于吸水纸上 1 min,真空抽干 15 min。

4.2.4 取出离心管,用 50 μ L 灭菌双蒸水溶解沉淀,作为模板备用。

4.3 PCR 扩增

每管取灭菌双蒸水 8 μ L,2.5 mmol/L dNTP(3.3.4)、10 pmol/ μ L PCV 引物(3.3.5)、15 mmol/L 氯化镁(3.3.14)、10 倍 PCR 缓冲液(3.3.7)、6.5 U/ μ L Taq DNA 聚合酶(3.3.6)各 2 μ L,DNA 模板 2 μ L,混匀,作好标记,加入矿物油约 20 μ L 覆盖(有热盖的自动 DNA 热循环仪不用加矿物油)。扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 30 s,62 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,35 个循环后,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

4.4 电泳

将 PCR 扩增产物 5 μ L 与 3 μ L 上样缓冲液(3.3.11)混合,点样于 1%琼脂糖凝胶(3.3.10)孔中,琼脂糖凝胶板一侧点样,加入 100 bp Ladder Marker(分子质量标准物),以 5 V/cm 电压电泳 40 min,紫外凝胶成像仪下观察结果。

5 结果判定

当 PCV-1 阳性对照出现 652 bp 扩增带,PCV-2 阳性对照出现 1 154 bp 扩增带,阴性对照未出现目的带时,实验结果成立。被检样品出现 652 bp 扩增带为 PCV-1 阳性,出现 1 154 bp 扩增带为 PCV-2 阳性,未出现相应扩增带的样品判为阴性。

附录 A
(规范性附录)
试剂的配制

A.1 消化液

A.1.1 1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCL)(pH8.0)

| | |
|----------|------------|
| 三羟甲基氨基甲烷 | 12.11 g |
| 灭菌双蒸水 | 80 mL |
| 浓盐酸 | 调 pH 至 8.0 |
| 灭菌双蒸水 | 加至 100 mL |

A.1.2 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠(EDTA)溶液 (pH8.0)

| | |
|------------|------------|
| 二水乙二胺四乙酸二钠 | 18.61 g |
| 灭菌双蒸水 | 80 mL |
| 氢氧化钠 | 调 pH 至 8.0 |
| 灭菌双蒸水 | 加至 100 mL |

A.1.3 20%十二烷基硫酸钠(SDS)溶液 (pH7.2)

| | |
|---------|------------|
| 十二烷基硫酸钠 | 20 g |
| 灭菌双蒸水 | 80 mL |
| 浓盐酸 | 调 pH 至 7.2 |
| 灭菌双蒸水 | 加至 100 mL |

A.1.4 消化液

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| 1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCL)(pH8.0) | 2 mL |
| 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液(pH8.0) | 0.4 mL |
| 20%十二烷基硫酸钠溶液(pH7.2) | 5 mL |
| 5 mol/L 氯化钠 | 4 mL |
| 灭菌双蒸水 | 加至 200 mL |

A.2 2%蛋白酶 K 溶液

| | |
|------------|-----------|
| 蛋白酶 K(分析纯) | 5 g |
| 灭菌双蒸水 | 加至 250 mL |

A.3 酚-三氯甲烷-异戊醇混合液

| | |
|------|-------|
| 碱性酚 | 25 mL |
| 三氯甲烷 | 24 mL |
| 异戊醇 | 1 mL |

A.4 2.5 mmol/L dNTP

| | |
|------------------|----------------|
| dATP(100 mmol/L) | 20 μ L |
| dTTP(100 mmol/L) | 20 μ L |
| dGTP(100 mmol/L) | 20 μ L |
| dCTP(100 mmol/L) | 20 μ L |
| 灭菌双蒸水 | 加至 800 μ L |

A.5 10 pmol/ μ L PCV 引物

引物序列:

P₁: 5'-CCGCGGGCTGGCTGAACTT-3'

P₂: 5'-CTCGGCTATGCGCTCCAAAATG-3'

P₃: 5'-ACCCCGCCACCGCTACC-3'

上游引物 P₁ (2 OD₂₆₀) 加入 375.4 μ L 灭菌双蒸水溶解, 下游引物 P₂ (2 OD₂₆₀) 加入 326.6 μ L 灭菌双蒸水溶解, 下游引物 P₃ (2 OD₂₆₀) 加入 401.9 μ L 灭菌双蒸水溶解, 分别取 P₁、P₂、P₃ 溶液各 300 μ L, 混匀即为 10 pmol/ μ L PCV 引物。

A.6 0.5 U/ μ L Taq DNA 聚合酶

| | |
|-----------------|---------------|
| 5 U Taq DNA 聚合酶 | 1 μ L |
| 灭菌双蒸水 | 加至 10 μ L |
| 现用现配。 | |

A.7 10 倍 PCR 缓冲液

A.7.1 1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCL)(pH9.0)

| | |
|---------------|------------|
| 羟基甲基氨基甲烷(分析纯) | 15.8 g |
| 灭菌双蒸水 | 80 mL |
| 浓盐酸(分析纯) | 调 pH 至 9.0 |
| 灭菌双蒸水 | 加至 100 mL |

A.7.2 10 倍 PCR 缓冲液

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| 1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCL)(pH9.0) | 1 mL |
| 氯化钾(分析纯) | 0.373 g |
| 曲拉通 X-100(分析纯) | 0.1 mL |
| 灭菌双蒸水 | 加至 100 mL |

A.8 溴化乙锭(EB)溶液

| | |
|-------|----------|
| 溴化乙锭 | 0.2 g |
| 灭菌双蒸水 | 加至 20 mL |

A.9 电泳缓冲液(50 倍)

A.9.1 0.5 mol/L 乙二铵四乙酸二钠(EDTA)溶液(pH8.0)

| | |
|-----------------|------------|
| 二水乙二铵四乙酸二钠(分析纯) | 18.61 g |
| 灭菌双蒸水 | 80 mL |
| 氢氧化钠 | 调 pH 至 8.0 |
| 灭菌双蒸水 | 加至 100 mL |

A.9.2 TAE(三羟甲基氨基甲烷-乙酸)电泳缓冲液(50 倍)

| | |
|-----------------------------|-------------|
| 羟基甲基氨基甲烷(Tris)(分析纯) | 242 g |
| 冰乙酸 | 57.1 mL |
| 0.5 mol/L 乙二铵四乙酸二钠溶液(pH8.0) | 100 mL |
| 灭菌双蒸水 | 加至 1 000 mL |
| 用时用灭菌双蒸水稀释使用。 | |

A. 10 1%琼脂糖凝胶

| | |
|-----------------|--------|
| 琼脂糖(电泳级) | 2 g |
| TAE 电泳缓冲液(50 倍) | 4 mL |
| 灭菌双蒸水 | 196 mL |

微波炉中完全融化,加溴化乙锭(EB)溶液 20 μ L。

A. 11 上样缓冲液

溴酚蓝 0.2 g,加双蒸水 10 mL 过夜溶解。50 g 蔗糖加入 50 mL 水溶解后,移入已溶解的溴酚蓝溶液中,摇匀定容至 100 mL。

A. 12 75%乙醇

| | |
|-----------------|--------|
| 无水乙醇(100%)(分析纯) | 750 mL |
| 灭菌双蒸水 | 250 mL |

A. 13 15 mmol/L 氯化镁

| | |
|----------|---------|
| 氯化镁(分析纯) | 0.143 g |
| 灭菌双蒸水 | 100 mL |

A. 14 灭菌双蒸水

1 000 mL 双蒸水(电阻 \geq 18.2 Ω),放于高压锅中,121 $^{\circ}$ C 高压 20 min 后取出备用。

A. 15 电泳缓冲液(1 倍)

| | |
|-------------|--------|
| 电泳缓冲液(50 倍) | 10 mL |
| 灭菌双蒸水 | 490 mL |
