



中华人民共和国国家标准

GB/T 27531—2011

病毒性脑病和视网膜病病原逆转录-聚合 酶链式反应(RT-PCR)检测方法

Protocol of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)
for the pathogen of viral encephalopathy and retinopathy

2011-11-21 发布

2012-03-01 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:中华人民共和国深圳出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:刘荭、卢体康、何俊强、史秀杰、郑晓聪、贾鹏、叶奕优、杨锦舜。

病毒性脑病和视网膜病病原逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测方法

1 范围

本标准规定了病毒性脑病和视网膜病(viral encephalopathy and retinopathy, VER)病原分离和逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测方法。

本标准适用于 VER 病原的流行病学调查、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

GB/T 18088 出入境动物检疫采样

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CPE:细胞病变(cytopathic effect)

CTAB:十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyl trimethyl ammonium bromide)

DEPC:焦碳酸乙二酯(diethylpyrocarbonate)

EB:溴化乙锭(ethidium bromide)

EDTA:乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid)

HEPES:羟乙基呱嗪乙磺酸[4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-erhanesulfonic acid]

RNA:核糖核酸(ribonucleic acid)

RNasin:核酸酶抑制剂(ribonuclease inhibitor)

VER:病毒性脑病和视网膜病(viral encephalopathy and retinopathy)

4 试剂和材料

4.1 水:符合 GB/T 6682 中一级水的规格,用 DEPC 处理以除掉 RNA 酶。

4.2 VERV 病毒参考株。

4.3 胰酶-EDTA 混合消化液(见附录 A 中 A.1)。

4.4 L-15 培养液(见附录 A 中 A.2)。

4.5 SSN-1 细胞系:用 L-15 培养液 25 °C 培养。

4.6 E-11 细胞系:用 L-15 培养液 25 °C 培养。

4.7 AMV 逆转录酶:20 U/ μ L, -20 °C 保存,不要反复冻融或温度剧烈变化。

4.8 RNasin:20 U/ μ L, -20 °C 保存,不要反复冻融或温度剧烈变化。

4.9 胰蛋白酶。

- 4.10 Taq 酶: -20 °C 保存, 不要反复冻融或温度剧烈变化。
- 4.11 dNTP: 含 dCTP、dGTP、dATP、dTTP 各 10 mmol/L。
- 4.12 引物: 用于 RT-PCR 反应的引物浓度为 40 μmol/L。其序列如下:
VERV-F: 5'-CGTGTTCAGTCATGTGTGCT-3'
VERV-R: 5'-CGAGTCAACACGGGTGAAGA-3'
- 4.13 乙醇: 分析纯, 使用前预冷到 -20 °C。
- 4.14 氯仿: 分析纯。
- 4.15 矿物油: 要求无 DNA 酶和 RNA 酶, 用于无热盖的 PCR 扩增仪。
- 4.16 分子量标准。

5 器材和设备

- 5.1 96 孔细胞培养板。
- 5.2 倒置显微镜。
- 5.3 恒温培养箱。
- 5.4 普通冰箱和超低温冰箱。
- 5.5 组织研磨器(研磨器处理参见附录 B)。
- 5.6 离心机和离心管(离心管处理参见附录 B)。
- 5.7 PCR 扩增仪。
- 5.8 水平电泳仪。
- 5.9 微量移液器及吸头(吸头处理参见附录 B)。
- 5.10 紫外照射仪或凝胶成像仪。
- 5.11 制冰机。

6 VERV 的分离

6.1 采样

待检测鱼, 体长小于 4 cm 的鱼苗取整条鱼, 体长 4 cm~6 cm 的鱼苗取头部和内脏(包括肾), 体长大于 6 cm 的鱼取脑、眼、脾和肾。按 GB/T 18088 的标准采样。

6.2 样品处理

6.2.1 组织处理

用组织研磨器制备组织匀浆, 按 1:10 的最终稀释度用 L-15 培养液稀释, 稀释液中含有 1 000 IU/mL 青霉素和 1 000 μg/mL 链霉素, 于 15 °C 下孵育 2 h~4 h 或 4 °C 下孵育 6 h~24 h。7 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液。

6.2.2 病毒分离

细胞传代使用胰酶-EDTA 混合消化液。对 1:10 的组织匀浆上清液再作两次 10 倍稀释, 然后将 1:10、1:100、1:1 000 的 3 个稀释度的上清液以适当体积分别接种到两个生长约 24 h SSN-1 或 E-11 细胞单层的 96 孔板中, 每孔的细胞单层最多接种 100 μL 稀释液。15 °C~20 °C 吸附 0.5 h~1 h 后, 加入 L-15 细胞培养液。两个 96 孔板分别置于 20 °C 和 25 °C 培养。设 2 个阳性对照(接种 VERV 标准株)和 1 个空白对照(未接种病毒的细胞)。

阳性对照和待测样品都接种细胞后,7 d内每天用倒置显微镜检查。如果接种了被检匀浆上清稀释液的细胞培养中出现细胞病变(CPE),应立即进行鉴定。如果除阳性对照细胞外,没有CPE出现,则在培养7 d后还要用敏感细胞进行盲传。传代时,将接种了组织匀浆上清稀释液的细胞单层培养物冻融一次,以7 000 r/min、4 ℃离心15 min,收集上清液。将上清液接种到新鲜细胞单层,培养7 d。每天用倒置显微镜检查。

如果阳性对照也未出现CPE,则应换用SSN-1或E-11细胞和待测样品重新进行病毒学检查。

7 VERV的RT-PCR检测

7.1 样品处理

将450 μL细胞病变悬液冻融后,放入1.5 mL的塑料离心管,再加入450 μL CTAB溶液(见附录A中A.3)并混匀,25 ℃作用2 h。

7.2 核酸抽提

在含有样品的塑料离心管中加入600 μL抽提液1(见附录A中A.4),用力混合至少30 s。12 000 r/min离心5 min,小心取上层水相(约800 μL)。再加入700 μL抽提液2(见附录A中A.5),用力混合至少30 s。12 000 r/min离心5 min,小心取上层水相(约600 μL)。再加入-20 ℃预冷的1.5倍以上体积的无水乙醇,倒置数次混匀后,-20 ℃ 8 h以上沉淀核酸。12 000 r/min离心30 min,小心倒去上清液,倒置于吸水纸上,吸干液体。37 ℃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 变性和退火

在PCR管中加入10 μL模板和5 μL引物(VERV-F和VERV-R各2.5 μL),置于70 ℃反应5 min。立即冰浴,低速离心约5 s,使液体集中在底部。

7.4 cDNA合成

在上述反应管中继续加入dNTP 2 μL、5倍逆转录酶缓冲液5 μL、RNA抑制剂1 μL、逆转录酶1 μL、无菌蒸馏水1.5 μL,低速离心后,覆盖50 μL矿物油。

将PCR管置于PCR扩增仪。42 ℃ 60 min反应制备模板的cDNA。反应结束后,70 ℃ 10 min灭活逆转录酶,立即冰浴。

7.5 PCR扩增

在上述反应管中再继续加入Taq酶1 μL,dNTP 1 μL,反向引物和正向引物各1 μL,25 mmol/L的MgCl₂(见附录A中A.6)10 μL、10倍Taq酶缓冲液(见附录A中A.7)10 μL、加水到总体积100 μL。

混匀后低速离心,让矿物油在上层。再将反应管置于PCR扩增仪。先94 ℃ 4 min,再开始35次循环(核酸变性94 ℃ 1 min、引物退火58 ℃ 1 min、延伸72 ℃ 1 min),然后72 ℃下延伸10 min,最后4 ℃保温。

7.6 设立对照

7.6.1 在7.2中的样品处理过程中应设立阳性样品对照、阴性样品对照、空白对照。

7.6.2 取含有已知VERV的病毒标准株的病鱼组织悬液作为阳性对照。

7.6.3 采用未接种病毒的正常SSN-1细胞抽提核酸作为阴性对照。

7.6.4 取等体积的水代替模板作为空白对照。

7.7 琼脂糖电泳

用 TBE(见附录 A 中 A.8)电泳缓冲液配制 1.5%的琼脂糖(含 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EB,见附录 A 中 A.9)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(见附录 A 中 A.10)混匀后加入孔内。在电泳时使用核酸分子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。

7.8 结果判定

7.8.1 用紫外照射仪或用凝胶成像仪观察扩增带并判断结果。如阳性对照出现一条 427 bp 的 DNA 片段,阴性对照和空白对照没有该扩增带,则表明反应体系正常。

7.8.2 待测样品电泳后在相应 427 bp DNA 位置上有带者,取 PCR 扩增产物进行测序,同参考序列(参见附录 C)进行比较,相似性达到 95%以上,则判定为阳性。

附录 A
(规范性附录)
试剂及其配制

A.1 胰酶-EDTA 混合消化液

氯化钠(NaCl,分析纯)	0.8 g
氯化钾(KCl,分析纯)	0.02 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄ ,分析纯)	0.02 g
磷酸氢二钾(K ₂ HPO ₄ ,分析纯)	0.115 g
乙二胺四乙酸(EDTA,分析纯)	0.02 g
胰酶(分析纯)	0.1 g
双蒸水	100 mL

过滤除菌后分装备用。

A.2 培养液

L-15 培养基,按说明书的要求配制,然后加入 10% 的胎牛血清,抽滤除菌,4 °C 保存。开放系统使用时,加入过滤除菌的 HEPES,使其在培养液中的终浓度为 0.02 mol/L。

A.3 CTAB 溶液

按 2%CTAB,1.4 mol/L NaCl,20.0 mmol/L EDTA,20.0 mol/L Tris-HCl pH7.5 配制。用前加巯基乙醇到终浓度为 0.25%。

A.4 抽提液 1

酚/氯仿/异戊醇,用 1.0 mol/L pH(7.9±0.2)Tris 饱和过的重蒸酚:氯仿:异戊醇按 25:24:1 的比例混合,密闭避光保存。

A.5 抽提液 2

氯仿/异戊醇,将氯仿和异戊醇按 24:1 的比例混合,密闭避光保存。

A.6 MgCl₂

25.0 mmol/L。

A.7 Taq 酶用 10 倍浓缩缓冲液

Tris-HCl 500.0 mmol/L pH8.8

GB/T 27531—2011

KCl	500.0 mmol/L
TritonX-100	1%

A.8 TBE 电泳缓冲液(5 倍浓缩液)

Tris	54.0 g
硼酸	27.5 g
EDTA	2.9 g
加水到	1 000.0 mL

用 5.0 mol/L 的 HCl 调 pH 到 8.0。

A.9 EB

用水配制成 10.0 mg/mL 的浓缩液。用时每 10.0 mL 电泳液或琼脂中加 1.0 μ L。

A.10 溴酚蓝指示剂溶液(6 倍上样缓冲液)

溴酚蓝 100 mg,加双蒸水 5 mL,在室温下过夜,待溶解后再称取蔗糖 25 g,加双蒸水溶解后移入溴酚蓝溶液中,摇匀后定容至 50 mL,加入 NaOH 溶液 1 滴,调至蓝色。

附 录 B

(资料性附录)

耗材去 RNA 酶的处理方法

本方法适用于本标准中所使用的研磨器、离心管和吸头。

使用前于 180 ℃干燥 8 h 以上,或用 0.1%DEPC 水浸泡处理。DEPC 处理时,先在 37 ℃浸泡 2 h,然后用灭菌水漂洗数次,于 100 ℃干烤 15 min,去除器皿上残余的 DEPC。