



中华人民共和国国家标准

GB/T 36871—2018

猪传染性胃肠炎病毒、猪流行性腹泻病毒和 猪轮状病毒多重 RT-PCR 检测方法

Multiplex RT-PCR to detect porcine transmissible gastroenteritis virus,
porcine epidemic diarrhea virus and porcine rotavirus

2018-09-17 发布

2019-04-01 实施

国家市场监督管理总局
中国国家标准化管理委员会 发布

订单号: 0100191211052067 防伪编号: 2019-1211-0353-0256-8021 购买单位: 全国动物卫生标准化技术委员会

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

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农村部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:华中农业大学、中国动物卫生与流行病学中心。

本标准主要起草人:何启盖、库旭钢、张坤、陈芳洲、范盛先、孟宪荣、陈品、姜雯、陈焕春。

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

订单号: 0100191211052067 防伪编号: 2019-1211-0353-0256-8021 购买单位: 全国动物卫生标准化技术委员会

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

猪传染性胃肠炎病毒、猪流行性腹泻病毒和猪轮状病毒多重 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了猪传染性胃肠炎病毒(porcine transmissible gastroenteritis virus, TGEV)、猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)和猪轮状病毒(porcine rotavirus, PoRV)的多重 RT-PCR 检测方法。

本标准适用于猪传染性胃肠炎病毒、猪流行性腹泻病毒和猪轮状病毒的核酸检测。

2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

TGEV:猪传染性胃肠炎病毒(porcine transmissible gastroenteritis virus)

PEDV:猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus)

PoRV:猪轮状病毒(porcine rotavirus)

RT-PCR:逆转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction)

PBS:磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline)

TAE:电泳缓冲液(tris-acetate-ethylene diamine tetraacetic acid buffer)

TCID₅₀:半数细胞感染量(median tissue culture infective dose)

RNA:核糖核酸(ribonucleic acid)

DEPC:焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate)

3 试剂和仪器设备

除另有规定外,所用试剂均为分析纯。提取 RNA 所用试剂应使用无 RNA 酶的容器分装。

3.1 仪器

3.1.1 生物安全柜。

3.1.2 高速冷冻离心机。

3.1.3 组织匀浆器或研钵。

3.1.4 PCR 仪。

3.1.5 水平电泳槽。

3.1.6 凝胶成像系统。

3.1.7 紫外透射仪。

3.1.8 2℃~8℃冰箱。

3.1.9 -20℃冰箱。

3.1.10 单道微量移液器(0.5 μL~10 μL、10 μL~50 μL、20 μL~200 μL、100 μL~1 000 μL 等规格)。

3.2 试剂

3.2.1 氯仿,常温保存。

- 3.2.2 PBS(见附录 A),常温保存。
- 3.2.3 1×TAE(见附录 A),常温保存。
- 3.2.4 Trizol,4℃~8℃保存。
- 3.2.5 异丙醇,4℃~8℃保存。
- 3.2.6 DNA 分子量标准,4℃~8℃保存。
- 3.2.7 DEPC 处理水(见附录 A),4℃~8℃保存。
- 3.2.8 阳性对照(PEDV、TGEV 和 PoRV 分别经 Vero 细胞、PK-15 细胞和 MA-104 细胞传代,病毒含量分别为 25 TCID₅₀/mL,50 TCID₅₀/mL,50 TCID₅₀/mL),-20℃保存。
- 3.2.9 阴性对照(Vero 细胞、PK-15 细胞和 MA-104 细胞悬液),-20℃保存。
- 3.2.10 RNA 反转试剂盒,-20℃保存。
- 3.2.11 多重 RT-PCR 方法中使用的各种引物对(见附录 B)。引物干粉及稀释引物保存于-20℃。

3.3 耗材

- 3.3.1 Eppendorf(EP)管。
- 3.3.2 PCR 管。
- 3.3.3 吸头。

3.4 实验室分区

检测实验室要有相应的生物安全设施和不同功能分区,如样品处理区、核酸提取区、核酸电泳区、结果观察区。各功能区要有专用的试剂和实验材料,不可交叉使用。

4 样品的采集、处理、存放及运输

4.1 样品采集和处理

4.1.1 生物安全及采样要求

4.1.1.1 生物安全要求

样品采集及处理过程中应带一次性手套、口罩、防护帽,个人防护参见 NY/T 541。

4.1.1.2 采样要求

应采集出现腹泻症状 12 h~24 h 内猪的粪便、肛门拭子样品或剖检猪的小肠;母猪可采集乳汁(初乳最佳)。采集母猪乳汁前要对乳房外表消毒;采集病变小肠时,先结扎拟采集肠道区域两端后,再剪取该组织(防止肠内容物流出),将其全部放入样品袋内。每个样品要单独采集和分装,避免交叉污染。样品避免接触甲醛或高温,以免降低检出率。

4.1.2 粪便样品

用洁净的药匙和其他物品,刮取适量新鲜粪便,放置于 EP 管或其他洁净容器中。

4.1.3 肛门拭子样品

4.1.3.1 采集方法

将灭菌的医用棉签插入肛门(以棉签棉花部分全部插入肛门为准),同一方向转动 3 次,确保充分获取粪便。

4.1.3.2 样品处理

将肛门拭子放在盛有 0.8 mL 灭菌 PBS 的无菌 EP 管中,涡旋或振荡 10 min,反复冻融 2 次,4 ℃ 条件下 $14\ 600\times g$ 离心 10 min,取上清转入新的 EP 管中,编号备用。

4.1.4 肠道样品

4.1.4.1 采集方法

选择充血、出血、肠壁变薄、含多量水样粪便等病变明显的小肠组织。提取模板前,用无菌剪刀剪取约 $0.5\text{ cm}\times 0.5\text{ cm}$,作为待检样品。

4.1.4.2 样品处理

加入 0.8 mL~1.0 mL 的 PBS 混匀,组织匀浆器或研钵中充分匀浆或研磨,将组织混悬液转入无菌 EP 管中,反复冻融 2 次,4 ℃ 条件下 $14\ 600\times g$ 离心 10 min,取上清转入新的无菌 EP 管中,编号备用。

4.1.5 母猪乳汁

4.1.5.1 采集方法

用无菌 EP 管收集母猪产后乳汁 2.0 mL~3.0 mL。

4.1.5.2 样品处理

将乳汁转移到无菌 EP 管中,反复冻融 2 次,4 ℃ 条件下 $14\ 600\times g$ 离心 10 min,取上清转入新的 EP 管中,编号备用。

4.2 存放与运输

采集的样品与冰块或干冰一起放入保温壶或保温箱,密封,在保温壶和保温箱外喷洒来苏尔或季铵盐类消毒液,尽快送到实验室检测。采集或处理的样品在 4 ℃~8 ℃ 条件下保存应不超过 24 h;若需长期保存,应放置于-80 ℃ 冰箱,避免反复冻融。

5 操作方法

5.1 样品 RNA 的制备(Trizol 法或 RNA 提取试剂盒)

5.1.1 取 1.5 mL 灭菌 EP 管,分别加入待检样品、阴性对照样品、阳性对照样品各 200 μL ,加入 1 mL Trizol 溶液,剧烈振荡,静置 5 min。

5.1.2 加入 200 μL 氯仿,振荡,冰上静置 7 min。

5.1.3 4 ℃ 下, $14\ 600\times g$ 离心 10 min,取上清 600 μL ,加入等体积异丙醇混匀后,冰上静置 10 min。4 ℃ 下, $14\ 600\times g$ 离心 7 min,弃上清,加入 800 μL 75% 的冷乙醇; $9\ 800\times g$ 离心 5 min。

5.1.4 弃上清,自然干燥 5 min,加入 20 μL DEPC 处理水溶解沉淀,即为 RNA 模板。

注:可使用商品化的 RNA 提取试剂盒,按其操作步骤提取 RNA。

5.2 反转录(cDNA 的合成)

配制反转录反应体系,每管加入 5.1.4 中制备的 RNA 模板 16 μL 和 4 μL 5 \times RNA 反转录反应混合液(含 Buffer、dNTP、M-MLV、RNA 酶抑制剂、通用反转录引物等),37 ℃ 水浴 15 min 或置于 PCR 仪中 37 ℃ 15 min,反应结束后,经 85 ℃ 15 s 灭活反转录酶,即为 cDNA,直接用于 PCR 扩增或-20 ℃

冻存备用。

5.3 多重 PCR 扩增

PCR 扩增体系配制如下。引物工作浓度均为 $10 \mu\text{mol/L}$ 。各种试剂添加完后充分混匀,瞬时离心,使反应液全部集中于管底。

试剂	体积(μL)
2×PCR 扩增 MIX	12.5
PEDV P1/P2	各 0.2
TGEV P3/P4	各 0.4
PoRV P5/P6	各 1.0
灭菌双蒸水	5.3
cDNA	4.0
共计	25.0

PCR 扩增条件: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min 后, $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 50 s, $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min, 35 个循环, 最后 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。扩增反应结束后取出产物置于 $4 \text{ }^\circ\text{C} \sim 8 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

5.4 扩增产物的电泳检测

5.4.1 称取适量琼脂糖配置浓度为 1.5% 的琼脂糖溶液, 充分溶化后按 1 : 10 000 加入溴化乙锭或新型核酸染料(溴化乙锭替代物), 倒入胶槽制备凝胶板。

5.4.2 在电泳槽中加入 $1 \times \text{TAE}$, 使液面没过凝胶。取 $8 \mu\text{L}$ 扩增产物加到各凝胶孔; 取 $5 \mu\text{L}$ DNA 分子量标准物(DL2000 Marker)加到另一凝胶孔中。

5.4.3 电泳, 待染料移行到凝胶 4/5 距离, 停止电泳。

5.4.4 将电泳好的凝胶放到紫外透射仪或凝胶成像系统上观察, 判定结果并做好记录。

6 结果判定

6.1 试验成立条件

含 PEDV、TGEV 和 PoRV 阳性对照材料, PCR 扩增产物电泳后, 同时出现大小约为 663 bp、528 bp 和 333 bp 的特异性条带, 阴性对照材料无任何扩增产物(见图 C.1), 则试验结果成立; 缺少任何一条扩增产物或大小不符, 则试验不成立。

6.2 结果判定

6.2.1 检测结果分类

在试验成立的前提下, 被检样品中可出现 PEDV、TGEV 和 PoRV 等 3 种病原的三重感染、二重感染、单独感染(阳性)和均不感染(阴性)的结果。

6.2.2 阳性结果

6.2.2.1 三重感染

出现大小约为 663 bp、528 bp 和 333 bp 的 3 条特异性条带, 判定为 PEDV、TGEV 和 PoRV 三重感染阳性(必要时基因测序, 序列参见附录 D)。

6.2.2.2 二重感染

出现大小约为 663 bp 和 528 bp 的特异性条带,判定为 PEDV 和 TGEV 二重感染阳性;出现大小约为 663 bp 和 333 bp 的特异性条带,判定为 PEDV 和 PoRV 二重感染阳性;出现大小约为 528 bp 和 333 bp 特异性条带,判定为 TGEV 和 PoRV 二重感染阳性。

6.2.2.3 单独感染

仅出现大小约为 663 bp 或 528 bp 或 333 bp 的特异性条带,判定为 PEDV 或 TGEV 或 PoRV 单独感染阳性。

6.2.3 阴性结果

未出现大小约为 663 bp、528 bp 和 333 bp 的特异性条带,判定为 PEDV、TGEV 和 PoRV 均不感染(阴性)。

全国动物卫生标准化技术委员会

附录 A
(规范性附录)
试验试剂和溶液的配制

A.1 0.01 mol/L(pH 7.2)PBS

NaCl	8.0 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	2.9 g
KCl	0.2 g

加蒸馏水至 1 000 mL,调 pH 值至 7.2~7.4,121 °C 高压灭菌 30 min,冷却后室温保存备用。

A.2 1×TAE

Tris 碱	24.2 g
冰乙酸	5.7 mL
0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)	10.0 mL

加蒸馏水至 100 mL,使用时用蒸馏水作 50 倍稀释,即为 1×TAE。

A.3 DEPC 处理水

用 0.1% DEPC 处理后的蒸馏水,经 121 °C 30 min 高压灭菌,或直接购买无 RNA 酶的无菌水。

附 录 B
(规范性附录)

猪传染性胃肠炎病毒、猪流行性腹泻病毒和猪轮状病毒多重 RT-PCR 引物序列

猪传染性胃肠炎病毒、猪流行性腹泻病毒和猪轮状病毒多重 RT-PCR 引物序列见表 B.1。

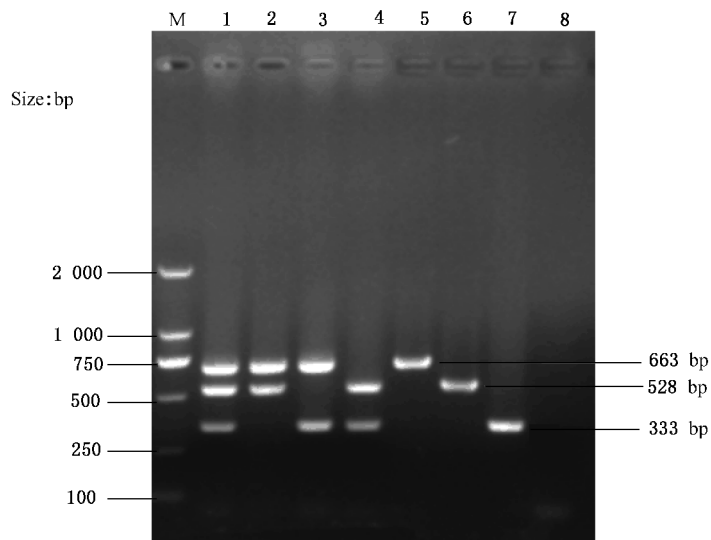
表 B.1 猪传染性胃肠炎病毒、猪流行性腹泻病毒和猪轮状病毒多重 RT-PCR 引物扩增序列

引物名称	引物序列	扩增片段大小	参考毒株序列
PEDV P1	5'-TTC GGT TCT ATT CCC GTT GAT G-3'	PEDV M 基因 (663 bp)	AY 974335
PEDV P2	5'-CCC ATG AAG CAC TTT CTC ACT ATC-3'		
TGEV P3	5'-TTA CAA ACT CGC TAT CGC ATG G-3'	TGEV N 基因 (528 bp)	DQ 443743
TGEV P4	5'-TCT TGT CAC ATC ACC TTT ACC TGC-3'		
PoRV P5	5'-CCC CGG TAT TGA ATA TAC CAC AGT-3'	PoRV VP7 基因 (333 bp)	DQ 786577
PoRV P6	5'-TTT CTG TTG GCC ACC CTT TAG T-3'		

附录 C
(规范性附录)

猪传染性胃肠炎病毒、猪流行性腹泻病毒和猪轮状病毒多重 RT-PCR 扩增结果电泳图

猪传染性胃肠炎病毒、猪流行性腹泻病毒和猪轮状病毒多重 RT-PCR 扩增结果电泳图见图 C.1。



说明：

- M —— DNA 分子量标准 (DL2000 Marker)；
- 1 —— PEDV + TGEV + PoRV；
- 2 —— PEDV + TGEV；
- 3 —— PEDV + PoRV；
- 4 —— TGEV + PoRV；
- 5 —— PEDV；
- 6 —— TGEV；
- 7 —— PoRV；
- 8 —— 阴性对照。

图 C.1 猪传染性胃肠炎病毒、猪流行性腹泻病毒和猪轮状病毒多重 RT-PCR 扩增结果电泳图

附录 D
(资料性附录)

猪传染性胃肠炎病毒、猪流行性腹泻病毒和猪轮状病毒多重 RT-PCR 扩增序列

D.1 猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)RT-PCR 目的 N 基因扩增序列如下：

ACAAACTCGCTATCGCATGGTGAAGGGCCAACGTAAAGAGCTTCCTGAAAGGTGGTTCTTC
TACTACTTAGGTACTGGACCTCATGCAGATGCCAAATTTAAAGATAAATTAGATGGAGTT
GTCTGGGTTGCCAAGGATGGTGCCATGAACAAACCAACCACGCTTGGTAGTCGTGGTGCTA
ATAATGAATCCAAAGCTTTGAAATTCGATGGTAAAGTGCCAGGCGAATTTCAACTTGAAG
TTAATCAATCAAGAGACAATTCAAGGTCACGCTCTCAATCTAGATCTCGGTCTAGAAATA
GATCTCAATCTAGAGGCAGGCAACAATTCAATAACAAGAAGGATGACAGTGTAGAACAAG
CTGTTCTTGCCGCACTTAAAAAGTTAGGTGTTGACACAGAAAAACAACAGCAACGCTCTCG
TTCTAAATCTAAAGAACGTAGTAACTCTAAGACAAGAGATACTACACCTAAGAATGAAAA
CAAACACACCTGGAAGAGAAGTGCAGGTAAGGTGATGTGACAAGA

D.2 猪流行性腹泻病毒(PEDV)RT-PCR 目的 M 基因扩增序列如下：

TTCTATTCCCGTTGATGAGGTGATTCAACACCTTAGAACTGGAATTCACATGGAATAT
CATACTGACGATACTACTTGTAGTGCTTCAGTATGGCCATTACAAGTACTCTGTGATCTTG
TATGGTGTAAAGATGGCTATTCTATGGATACTTTGGCCTCTTGTGTTGGCACTGTCACTCT
TTGACGCATGGGCTAGCTTTCAGGTCAACTGGGTCTTTTTTCGCTTTCAGCATCCTTATGGC
TTGCATCACTCTTATGCTGTGGATAATGTACTTTGTCAATAGCATTTCGGTTGTGGCGCAGG
ACACATTCTTGGTGGTCCTTCAATCCTGAAACAGACGCGCTTCTCACTACTTCTGTGATGG
GCCGACAGGTCTGCATTCCAGTGCTTGGAGCACCAACTGGTGTAAACGCTAACACTCCTTAG
TGGTACATTGCTTGTAGAGGGCTATAAGGTTGCTACTGGCGTACAGGTAAGTCAATTACC
TAATTTTCGTCACAGTCGCCAAGGCCACTACAACAATTGTCTACGGACGTGTTGGTCGTTCA
GTCAATGCTTCATCTGGCACTGGTTGGGCTTTCTATGTACGGTCAAAACACGGCGACTACT
CAGCTGTGAGTAATCCGAGTGCAGTTCTCACAGATAGTGAGAAAGTGCTTCAT


D.3 猪轮状病毒(PoRV)RT-PCR 目的 VP7 基因扩增序列如下：

GGTATTGAATATACCACAGTTTTAACCTTTTTGATATCAGTTGTATTATTGAATTACATA
CTTAAATCATTAAACCAGAATAATGGACTTCATCATTTACAGATTTCTTCTCATTATAGTT
ATACTGTCACCATTTCTTAAACGCACAAAATTATGGAATAAACCTTCCAATTACTGGATCA
ATGGATACTCCATATGCGAACTCGACACAAGAAGAAGTGTTCCTAACATCAACTTTATGC
TTATACTATCCAAGTGAAGCTGCGACACAAATAAATGACAATTCGTGGAAAGATACACTT
TCTCAGCTATTTTTAACTAAAGGGTGGCCAACAG

订单号: 0100191211052067 防伪编号: 2019-1211-0353-0256-8021 购买单位: 全国动物卫生标准化技术委员会

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

 **版权声明**

中国标准在线服务网(www.spc.org.cn)是中国标准出版社委托北京标科网络技术有限公司负责运营销售正版标准资源的网络服务平台,本网站所有标准资源均已获得国内外相关版权方的合法授权。未经授权,严禁任何单位、组织及个人对标准文本进行复制、发行、销售、传播和翻译出版等违法行为。版权所有,违者必究!

中国标准在线服务网
<http://www.spc.org.cn>

标准号: GB/T 36871-2018
购买者: 全国动物卫生标准化技术委员会
订单号: 0100191211052067
防伪号: 2019-1211-0353-0256-8021
时 间: 2019-12-11
定 价: 24元



GB/T 36871-2018

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
猪传染性胃肠炎病毒、猪流行性腹泻病毒和
猪轮状病毒多重 RT-PCR 检测方法

GB/T 36871—2018

*

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(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址: www.spc.org.cn

服务热线: 400-168-0010

2018年9月第一版

*

书号: 155066·1-61291

版权专有 侵权必究