



中华人民共和国国家标准

GB/T 35911—2018

伪狂犬病病毒荧光 PCR 检测方法

Real-time PCR method for detection of pseudorabies virus

2018-02-06 发布

2018-09-01 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

订单号: 0100191211052084 防伪编号: 2019-1211-0433-5518-1139 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:中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中国农业科学院上海兽医研究所、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院、湖南圣湘生物科技有限公司。

本标准主要起草人:张强、童光志、李健、熊炜、赵和平、李树清、王艳、李国新、杨忠苹、花群义、林颖峥、王巧全、蔡开妹、喻正军、吴绍强、林祥梅。

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

订单号: 0100191211052084 防伪编号: 2019-1211-0433-5518-1139 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

伪狂犬病病毒荧光 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了伪狂犬病病毒荧光 PCR 检测的操作方法。
本标准适用于伪狂犬病病毒核酸检测。

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

GB/T 25172 猪常温精液生产与保存技术规范

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

荧光 PCR 荧光聚合酶链式反应(real-time polymerase chain reaction)

Ct 值 每个反应管内的荧光信号量达到设定的阈值时所经历的循环数(cycle threshold)

DNA 脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

Taq 酶 Taq DNA 聚合酶(Taq DNA polymerase)

TE 缓冲液 Tris-EDTA 缓冲液(Tris-EDTA buffer)

PRV 伪狂犬病病毒(pseudorabies virus)

4 仪器

4.1 荧光 PCR 检测仪。

4.2 高速台式冷冻离心机:可控温至 4 °C、离心速度可达 12 000 r/min 以上。

4.3 组织研磨器或者研钵。

4.4 普通冰箱:2 °C~8 °C。

4.5 普通冰柜: -20 °C 以下。

4.6 超低温冰箱:可控温至 -70 °C 以下。

4.7 微量移液器:0.2 μL~2 μL、1 μL~10 μL、10 μL~100 μL、20 μL~200 μL、100 μL~1 000 μL,并配备与移液器匹配的吸头。

4.8 高压灭菌锅。

5 耗材

5.1 1.5 mL 离心管。

5.2 0.2 mL PCR 薄壁管或八联管。

6 试剂

- 6.1 除非另有说明,在检测中使用的试剂均为分析纯,实验室用水应符合 GB/T 6682 的要求。
- 6.2 DNAzol,商品化 DNA 抽提试剂,于 2 ℃~8 ℃ 保存。
- 6.3 无水乙醇,-20 ℃ 预冷。
- 6.4 75%乙醇,无水乙醇和双蒸水配制,-20 ℃ 预冷。
- 6.5 8 mmol/L NaOH 溶液,配制见附录 A。
- 6.6 PBS 缓冲液,配制见附录 A。
- 6.7 Taq 酶及 10 倍 Taq 酶反应缓冲液:Taq 酶浓度为 5 U/ μ L,Taq 酶反应缓冲液中 Mg^{2+} 浓度为 15 mmol/L。
- 6.8 dNTPs:含 dATP、dGTP、dCTP、dTTP 各 10 mmol/L,-20 ℃ 保存,避免反复冻融。
- 6.9 引物和 TaqMan 探针,其序列见附录 B。
- 6.10 伪狂犬病病毒阳性对照样品和阴性对照样品:阳性对照使用灭活疫苗或组织培养灭活毒,-20 ℃ 保存备用;阴性对照可采用健康猪的组织材料。
- 6.11 内参照质粒:带有人 β -珠蛋白基因的质粒。

7 样品采集和处理

7.1 采样工具

- 7.1.1 手术刀、剪刀、镊子,经 160 ℃ 干热灭菌 2 h。
- 7.1.2 一次性无菌采样拭子。
- 7.1.3 组织研磨器或者研钵,经 160 ℃ 干热灭菌 2 h。
- 7.1.4 真空采血管。

7.2 样品采集

- 7.2.1 血液样品采集:用无菌注射器采集血液,注入含 1/10 4% EDTA 溶液的无菌容器中,充分混匀,编号备用。
- 7.2.2 精液样品采集:按照 GB/T 25172 的方法采集和保存精液。
- 7.2.3 鼻拭子采集:用棉拭子取受检动物鼻腔分泌物,置于 2 mL PBS 缓冲液中备用。
- 7.2.4 组织样品采集:取大脑海马背侧皮层、中脑、脑桥、三叉神经节、扁桃体、肺脏、淋巴结等组织,置于无菌离心管内,编号备用。
- 7.2.5 细胞培养物:细胞培养物反复冻融三次,第 3 次解冻后,将细胞培养物置于 1.5 mL 无 DNA 酶的灭菌离心管内,编号备用。

7.3 样品保存和运输

上述采集的样品可立即用于检测。不能立即检测的样品,在 2 ℃~8 ℃ 下保存应不超过 24 h,-20 ℃ \pm 5 ℃ 下应不超过 3 个月,-70 ℃ 以下可长期保存。样品运送采用低温保存进行运输,并在规定温度下的保存期内送达。

7.4 样品处理

- 7.4.1 血液和精液样品无需进行前处理,直接用于核酸提取。
- 7.4.2 鼻拭子样品:充分涡旋震荡含有鼻拭子的管子 1 min~3 min,弃去拭子后 2 000 r/min 离心

5 min,取上清后用于后续的核酸提取。

7.4.3 组织样品:取1 g解冻的组织,剪碎,加入2 mL PBS缓冲液进行研磨,制备组织匀浆,8 000 r/min离心5 min,取上清用于后续的核酸提取。

7.4.4 细胞培养物:4 000 r/min,4 ℃离心10 min,取上清用于后续的核酸提取。

8 荧光 PCR 操作程序

8.1 DNA 抽提

8.1.1 在核酸提取区操作。DNA抽提使用DNAzol手工提取,也可以使用等效的商品化试剂盒提取。

8.1.2 取 n 个灭菌的1.5 mL离心管,其中 n 为待检样品数+阳性对照+阴性对照,对每个离心管进行编号。

8.1.3 每管先加入800 μ L DNAzol,再分别加入被检样品、阳性对照、阴性对照各200 μ L,颠倒10次混匀,4 ℃或室温10 000 r/min离心10 min。

8.1.4 取900 μ L上清,置新的1.5 mL灭菌离心管中,加入500 μ L无水乙醇,混匀,室温放置3 min;4 ℃或室温10 000 r/min离心5 min。

8.1.5 弃上清,沿管壁缓缓加入0.8 mL~1 mL 75%乙醇,颠倒3次~6次混匀,4 ℃10 000 r/min离心5 min。反复洗涤两次后,将离心管倒扣于吸水纸上,自然晾干或用移液器移去残液。

8.1.6 用30 μ L 8 mmol/L NaOH溶液溶解沉淀,DNA在2 ℃~8 ℃冰箱可保存两个月,-20 ℃冰柜可稳定保存两年。

8.2 荧光 PCR 检测

8.2.1 反应体系的配制

在试剂配制区进行。设实时荧光PCR反应管数为 n , n 为待检样品数+阳性管数+阴性管数,每个反应的体系见附录C,为了避免移液器取样损失,建议按 $n+1$ 个反应进行配制。配制反应液在冰盒中进行。

8.2.2 反应液的分装

将8.2.1中配制的荧光PCR反应液充分混匀,按照每管39.8 μ L分装于0.2 mL透明PCR管内,将PCR管置于96孔板上,按顺序加样并做好标识,转移至核酸提取区。

8.2.3 加样

在核酸提取区进行。在每个PCR反应管内加入0.2 μ L的内参照质粒,并分别加入8.1制备的核酸10 μ L DNA溶液,盖上盖子,500 r/min~1 000 r/min离心30 s。转移至检测区。

8.2.4 上机检测

8.2.4.1 荧光通道设置

在检测区进行。将8.2.3中离心后的PCR管放入荧光PCR检测仪内,设置探针:5'选择FAM、HEX和ROX三个荧光通道,3'均选择无(None)荧光。

8.2.4.2 循环条件设置与检测

第一阶段,预反应50 ℃/2 min;

第二阶段,预变性95 ℃/2 min;

第三阶段,变性 95 °C/15 s,退火、延伸、荧光采集 60 °C/30 s,40 个循环;

第四阶段,冷却 25 °C/10 s。

检测结束后,保存结果,根据收集的荧光曲线和 C_t 值判定结果。

9 结果判定

9.1 阈值设定

阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整,以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增的最高点为准。

9.2 质量控制

9.2.1 PRV 阴性对照:FAM 通道无报告 C_t 值或无典型的 S 型扩增曲线,HEX 通道无报告 C_t 值或无典型的 S 型扩增曲线,ROX 通道 C_t 值 \leq 36 且扩增曲线为典型的 S 型。

9.2.2 PRV 阳性对照:FAM 通道 C_t 值 \leq 30,HEX 通道 C_t 值 \leq 30,ROX 通道 C_t 值 \leq 36,且 3 个通道的扩增曲线均为典型的 S 型。

9.2.3 以上要求需在同一次实验中同时满足,否则,本次实验无效,需重新进行。

9.3 结果描述及判定

9.3.1 被检样本检测结果中 FAM 通道 C_t 值 \leq 38,HEX 通道 C_t 值 \leq 38,且扩增曲线均为典型的 S 曲线,报告为 PRV 核酸阳性; $38 < C_t$ 值 \leq 40,判定为可疑,可疑样品须重复检测。如重复后仍然 $38 < C_t$ 值 \leq 40,且扩增曲线均为典型的 S 曲线,报告为 PRV 核酸阳性。

9.3.2 被检样本检测结果中 FAM 通道 C_t 值 \leq 40,且扩增曲线为典型的 S 型扩增曲线,HEX 通道无 C_t 值或者无典型的 S 型扩增曲线,报告为 PRV gE 缺失株核酸阳性。

9.3.3 被检样本检测结果中 FAM 通道和 HEX 通道均无 C_t 值或无典型的 S 型扩增曲线,同时 ROX 通道 C_t 值 \leq 36 且扩增曲线为典型的 S 曲线,则该样本超过本方法检测灵敏度范围,报告为 PRV 核酸阴性。

9.3.4 被检样本检测结果中 FAM 通道和 HEX 通道均无 C_t 值或无典型的 S 型扩增曲线,同时 ROX 通道 C_t 值 $>$ 36,则该样本的检测结果无效,应查找并排除原因,并对此样本进行重复实验。

附 录 A
(规范性附录)
溶 液 配 制

A.1 8 mmol/L NaOH 溶液

称量 0.32 g NaOH,溶解到 1 000 mL 去离子水中,混匀,分装,常温保存。

A.2 磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L PBS,pH 7.4)

用 800 mL 蒸馏水溶解 8 g NaCl,0.2 g KCl,1.44 g Na_2HPO_4 和 0.24 g KH_2PO_4 。用 HCl 调节溶液的 pH 至 7.4,加水至 1 L。分装后经 121 °C、15 min 高压灭菌后备用。

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

附 录 B
(规范性附录)
引物和探针

引物、探针的名称和序列见表 B.1。

表 B.1 引物、探针的名称与序列

名 称	序 列
gH-qF	5'-ACGCTCGGCTTCCTCTCC-3'
gH-qR	5'-GGTAGTCGTCGCTCTCGTG-3'
gH-P(探针)	5'-FAM-TCGCGCATCGTCTGGTGCAT-BHQ1-3'
gE-qF	5'-GCTGTACGTGCTCGTGAT-3'
gE-qR	5'-TCAGCTCCTTGATGACCGTGA-3'
gE-P(探针)	5'-HEX-CACAACGGCCACGTCGCCACCTG-BHQ1-3'
IC-F	5'-AAGTGCTCGGTGCCTTTAGTG-3'
IC-R	5'-GTCCCATAGACTCACCTGAAGT-3'
IC-P(探针)	5'-ROX-CCTGGCTCACCTGGACAACCTCAAG-BHQ2-3'


注：引物和探针可由生物公司合成，用 TE 溶液溶解并稀释至 100 $\mu\text{mol/L}$ 储存浓度，-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用，保存期为 1 年；根据需要配制成 10 $\mu\text{mol/L}$ 工作液，-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存供检测使用，如经常使用反复冻融，有效期为 3 个月。

附 录 C
(规范性附录)
荧光 PCR 反应体系

荧光 PCR 反应体系见表 C.1。

表 C.1 荧光 PCR 反应体系

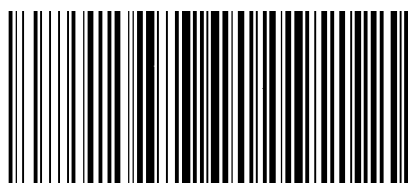
组 分	1 个检测反应的加入量
10×PCR Buffer	5 μL
Taq 酶 (5 U/μL)	2 μL
dNTPs(100 mmol/L)	1.5 μL
Mg ²⁺ (1 mol/L)	0.25 μL
gH-qF(10 μmol/L)	1 μL
gH-qR(10 μmol/L)	1 μL
gH-P(10 μmol/L)	1 μL
gE-qF(10 μmol/L)	1 μL
gE-qR(10 μmol/L)	1 μL
gE-P(10 μmol/L)	0.6 μL
IC-F(10 μmol/L)	0.5 μL
IC-R(10 μmol/L)	0.5 μL
IC-P(10 μmol/L)	0.5 μL
ddH ₂ O	23.95 μL
合计	39.8 μL

 **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 35911-2018
购买者: 全国动物卫生标准化技术委员会
订单号: 0100191211052084
防伪号: 2019-1211-0433-5518-1139
时 间: 2019-12-11
定 价: 21元



GB/T 35911-2018

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
伪狂犬病病毒荧光 PCR 检测方法
GB/T 35911—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2月第一版

*

书号: 155066·1-59462

版权专有 侵权必究