



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 35912—2018

---

## 猪繁殖与呼吸综合征病毒 荧光 RT-PCR 检测方法

Real-time RT-PCR method for detection of porcine reproductive  
and respiratory syndrome 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: 0100191211052083 防伪编号: 2019-1211-0432-1878-2393 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、湖南圣湘生物科技有限公司、中国检验检疫科学研究院。

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

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

订单号: 0100191211052083 防伪编号: 2019-1211-0432-1878-2393 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

# 猪繁殖与呼吸综合征病毒 荧光 RT-PCR 检测方法

## 1 范围

本标准规定了猪繁殖与呼吸综合征病毒荧光 RT-PCR 检测的操作方法。  
本标准适用于猪繁殖与呼吸道综合征病毒美洲型毒株核酸检测。

## 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。

Real-time RT-PCR: 荧光反转录聚合酶链式反应(real-time reverse transcript polymerase chain reaction)

*C<sub>t</sub>* 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)

RNA: 核糖核酸(ribonucleic acid)

Taq 酶: Taq DNA 聚合酶(Taq DNA polymerase)

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

DEPC: 焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate)

PRRSV: 猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus)

PBS: 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution)

## 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 超低温冰箱: 可控温至-70 °C 以下。

4.6 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。

4.7 高压灭菌锅。

## 5 耗材

- 5.1 1.5 mL 无 RNA 酶离心管。
- 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 Trizol,商品化 RNA 抽提试剂,4 ℃~8 ℃保存。
- 6.3 氯仿:常温保存。
- 6.4 异丙醇:使用前预冷至-20 ℃。
- 6.5 无水乙醇:-20 ℃预冷。
- 6.6 75%乙醇:无水乙醇和双蒸水配制,-20 ℃预冷。
- 6.7 DEPC 水:配制见 A.1,也可购买商品化 DEPC 水。
- 6.8 PBS:配制见 A.2。
- 6.9 Taq 酶及 10 倍 Taq 酶反应缓冲液:Taq 酶浓度为 5 U/ $\mu$ L,Taq 酶反应缓冲液中  $Mg^{2+}$  浓度为 15 mmol/L。
- 6.10 逆转录酶及 10 倍逆转录酶反应缓冲液:逆转录酶浓度为 50 U/ $\mu$ L,-20 ℃保存,避免反复冻融。
- 6.11 RNA 酶抑制剂(40 U/ $\mu$ L):-20 ℃保存,避免反复冻融。
- 6.12 dNTPs:含 dATP、dGTP、dCTP、dTTP 各 10 mmol/L,-20 ℃保存,避免反复冻融。
- 6.13 引物和 TaqMan 探针,其序列见附录 B。
- 6.14 猪繁殖与呼吸道综合征病毒阳性对照样品和阴性对照样品:阳性对照为非感染性体外转录 RNA;阴性对照为健康猪的组织材料。
- 6.15 内参照质粒:带有人  $\beta$ -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 注射器。
- 7.1.3 一次性无菌采样拭子。
- 7.1.4 组织研磨器或者研钵,经 160 ℃干热灭菌 2 h。
- 7.1.5 真空采血管。

### 7.2 样品采集

- 7.2.1 血清样品采集:用无菌注射器抽取受检猪静脉血不少于 5 mL,置于无菌离心管内,室温或者 37 ℃倾斜放置自然凝集 20 min~30 min,2 000 r/min~3 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液到新的离心管内备用。
- 7.2.2 公猪精液:按照 GB/T 25172 的方法采集和保存精液。
- 7.2.3 口腔拭子:大猪使用保定器保定,小猪可以双手保定,用采样拭子蘸取口腔分泌物,放入无菌采样管中。
- 7.2.4 肺灌洗液:完整摘取肺脏/肺叶,送实验室进行灌洗。

7.2.5 组织样品采集:取肺脏、淋巴结、扁桃体、脾脏等组织,置于无菌离心管内备用。

7.2.6 细胞培养物:细胞培养物反复冻融3次,第3次解冻后,将细胞培养物置于1.5 mL无RNA酶的灭菌离心管内,编号备用。

### 7.3 样品保存和运输

7.3.1 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℃±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 血清和精液样品无需进行前处理,直接用于核酸提取。

7.4.2 口腔拭子样品:加入500 μL无菌PBS,充分涡旋震荡1 min,反复挤压拭子,弃去拭子后3 000 r/min离心5 min,取上清用于后续的核酸提取。

7.4.3 肺灌洗液:根据肺脏/肺叶的大小,通过肺管加入5 mL~10 mL无菌PBS,反复揉捏,吸取灌洗液,3 000 r/min离心5 min,取上清用于核酸提取。

7.4.4 组织样品:取1 g组织,剪碎,加入2 mL生理盐水进行研磨,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。

7.4.5 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 RT-PCR 操作程序

### 8.1 RNA 抽提

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

8.1.2 取 $n$ 个灭菌的1.5 mL无RNA酶离心管,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600 μL Trizol裂解液,再分别加入被检样品、阳性对照、阴性对照各200 μL,颠倒10次混匀,最后加入200 μL氯仿,涡旋震荡5 s,4℃条件下12 000 r/min离心15 min。

8.1.4 将上层透明液体(约400 μL)转移到一个新的无RNA酶的离心管中,加入等体积预冷的异丙醇,每个离心管对应编号。

8.1.5 12 000 r/min离心15 min,弃去上清,沿管壁缓缓加入0.8 mL~1 mL 75%乙醇,颠倒3~6次混匀,12 000 r/min离心10 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 加入20 μL DEPC水,轻轻混匀,溶解RNA。提取的RNA应尽快进行反转录扩增或放置于-70℃冰箱保存。

8.1.7 提取过程中要注意交叉污染,移液过程每份样品都需要更换吸头;不同样品离心管倒扣在吸水纸上的不同位置。

### 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 44.8  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  的内参照质粒,并分别加入 8.1 制备的核酸 5  $\mu\text{L}$  RNA 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,反转录 42  $^{\circ}\text{C}$ ,30 min;

第二阶段,预变性 95  $^{\circ}\text{C}$ ,1 min;

第三阶段,变性 95  $^{\circ}\text{C}$ /15 s,退火、延伸、荧光采集 60  $^{\circ}\text{C}$ /30 s,40 个循环;

第四阶段,冷却 25  $^{\circ}\text{C}$ ,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 PRRSV 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 PRRSV 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 9.2.1 和 9.2.2 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 PRRSV 美洲型变异株核酸阳性;38 $<$  $C_t$  值 $\leq$ 40,判定为可疑,可疑样品应重新检测,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 PRRSV 美洲型变异株核酸阳性。

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 PRRSV 美洲型经典株核酸阳性。

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 PRRSV 美洲型毒株核酸阴性。

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 DEPC 水配制

每升去离子水中加入 1 mL DEPC,用力摇匀,使 DEPC 充分混匀在水中,37 ℃放置 12 h 以上,再经 121 ℃、15 min 高压灭菌备用。

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<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>。用 HCl 调节溶液的 pH 至 7.4,加水至 1 L。分装后经 121 ℃、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  |
|------------|---|
| M-qF       | 5'-TTGCTAGGCCGCAAGTAC-3'                  |
| M-qR       | 5'-ACGCCGGACGACAAATGC-3'                  |
| M-P(探针)    | 5'-FAM-CTGGCCCCTGCCACCAC-BHQ1-3'          |
| NSP2-qF    | 5'-CACCGCGTAGAACTGTGACAA-3'               |
| NSP2-qR    | 5'-TYATATTCCGTYTGTGAGGAC-3'               |
| NSP2-P(探针) | 5'-HEX-ACGCTGACGCACCAGGATGAGCCTCT-BHQ1-3' |
| IC-F       | 5'-AAGTGCTCGGTGCCTTTAGTG-3'               |
| IC-R       | 5'-GTCCCATAGACTCACCTGAAGT-3'              |
| IC-P2(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， $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用；根据需要配制成 10  $\mu\text{mol/L}$  工作液， $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存供检测使用。


全国动物卫生标准化技术委员会 专用

附 录 C  
(规范性附录)  
荧光 RT-PCR 反应体系

荧光 RT-PCR 反应体系见表 C.1。

表 C.1 荧光 RT-PCR 反应体系

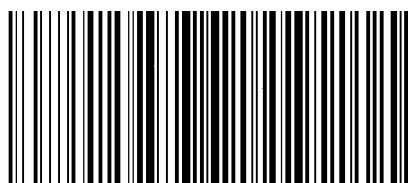
| 组分                         | 1 个检测反应的加入量 |
|----------------------------|-------------|
| 5×RT-PCR buffer            | 10 μL       |
| M-MLV 反转录酶(200 U/μL)       | 0.3 μL      |
| <i>Taq</i> DNA 聚合酶(5 U/μL) | 1.7 μL      |
| RNA 酶抑制剂(40 U/μL)          | 0.5 μL      |
| dNTPs (100 mmol/L)         | 0.4 μL      |
| M-qF(10 μmol/L)            | 1 μL        |
| M-qR(10 μmol/L)            | 1 μL        |
| M-P(10 μmol/L)             | 0.6 μL      |
| NSP2-qF(10 μmol/L)         | 1 μL        |
| NSP2-qR(10 μmol/L)         | 1 μL        |
| NSP2-P(10 μmol/L)          | 0.6 μL      |
| IC-F(10 μmol/L)            | 0.5 μL      |
| IC-R(10 μmol/L)            | 0.5 μL      |
| IC-P2(10 μmol/L)           | 0.5 μL      |
| DEPC 水                     | 25.2 μL     |
| 合计                         | 44.8 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 35912-2018  
购买者: 全国动物卫生标准化技术委员会  
订单号: 0100191211052083  
防伪号: 2019-1211-0432-1878-2393  
时 间: 2019-12-11  
定 价: 21元



GB/T 35912-2018

中 华 人 民 共 和 国  
国 家 标 准

猪繁殖与呼吸综合征病毒  
荧光 RT-PCR 检测方法

GB/T 35912—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: 155066·1-59464

版权专有 侵权必究