



中华人民共和国国家标准

GB/T 34756—2017

猪轮状病毒病 病毒 RT-PCR 检测方法

Porcine rotavirus disease—RT-PCR for detecting virus acid

2017-11-01 发布

2018-05-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

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 34756-2017
购买者: 全国动物卫生标准化技术委员会
订单号: 0100191216052474
防伪号: 2019-1216-0940-2868-3999
时 间: 2019-12-16
定 价: 21元

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
猪轮状病毒病 病毒 RT-PCR 检测方法
GB/T 34756—2017

*

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

2017年11月第一版

*

书号: 155066·1-57537

版权专有 侵权必究

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(SAT/TC 181)归口。

本标准起草单位:东北农业大学、中国动物卫生与流行病学中心、河南牧业经济学院。

本标准起草人:乔薪瑗、邵卫星、魏荣、崔文、唐丽杰、李一经、姜艳平、孙映雪、李卫华、徐耀辉。

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

订单号: 0100191216052474 防伪编号: 2019-1216-0940-2868-3999 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

猪轮状病毒病 病毒 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了猪轮状病毒 RT-PCR 检测方法的试剂、仪器设备、操作程序。

本标准适用于猪临床样品(新鲜粪便和小肠)及细胞培养物中猪轮状病毒核酸的检测。

2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

AMV:鸟类 RNA 病毒反转录酶(avian myeloblastosis virus)

bp:碱基对(base pair)

DEPC:焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate)

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

dNTPs:脱氧核糖核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphates)

PBS:磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline buffer)

PCR:聚合酶链式反应(polymerase chain reaction)

RNA:核糖核酸(ribonucleic acid)

RRI:RNA 酶抑制剂(RNase ribonuclease inhibitor)

RT:反转录(reverse transcriptase)

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

Taq 酶:Taq DNA 聚合酶(Taq DNA polymerase)

3 试剂

除另有规定外,所用试剂应为分析纯。提取病毒 RNA 所用试剂应使用无 RNA 酶的容器进行分装。

3.1 氯仿:常温保存。

3.2 异丙醇。

3.3 75 %乙醇。

3.4 二乙基焦磷酸胺(DEPC)。

3.5 Taq 酶。

3.6 AMV。

3.7 DNA 分子量标准(DL2000bp)。

3.8 电泳缓冲液(TAE)(配制见 A.1)。

3.9 1.5 %琼脂糖(配制见 A.3)。

3.10 猪轮状病毒阳性样品及阴性样品(见附录 B)。

4 仪器设备

4.1 高速冷冻离心机。

- 4.2 PCR 扩增仪。
- 4.3 核酸电泳系统。
- 4.4 恒温水浴锅。
- 4.5 冰箱(2℃~8℃、-20℃)。
- 4.6 凝胶成像系统(或紫外透射仪)。
- 4.7 组织匀浆器或研钵。
- 4.8 二级生物安全柜。
- 4.9 微量加样器(0.5 μL~10 μL; 2 μL~20 μL; 20 μL~200 μL; 100 μL~1 000 μL)。

5 操作程序

5.1 样品的采集、运输和处理

5.1.1 样品采集和运输

采集腹泻急性期的小肠(5.0 cm~10.0 cm)或新鲜粪便(5.0 g~10.0 g),放到密封袋中,置于带有冰袋的保存箱中,送至实验室。样品被运到实验室时,附带的冰袋应未完全融化;如样品不能被及时送到实验室,应置于-20℃冰箱中保存,贮存要求不超过1个月;如需长期保存样品,应置于-80℃冰箱。

5.1.2 样品处理

5.1.2.1 小肠样品

取 5.0 cm~10.0 cm 小肠组织,用剪刀剪碎,加入 10 mL PBS,用适宜规格的组织研磨器或研钵研磨后转移到适宜玻璃瓶中,每毫升样品加入 RNA 酶抑制剂 RRI(40 U/μL)500 μL,-20℃反复冻融 3 次后,摇匀,取 1.0 mL 到 1.5 mL 离心管中,经 12 000 r/min 离心 5 min,取 500 μL 上清备用。

5.1.2.2 粪便样品

取 0.5 g~1.0 g 新鲜粪便,加入到含 5.0 mL~10.0 mL 样品处理液(配方见 A.2)的玻璃瓶中,每毫升样品加入 RNA 酶抑制剂 RRI(40 U/μL)500 μL,-20℃反复冻融 3 次后,摇匀,取 1.0 mL 到 1.5 mL 离心管中,经 12 000 r/min 离心 5 min,取 500 μL 上清液备用。

5.1.2.3 细胞培养物样品

取细胞培养物,每毫升样品加入 RNA 酶抑制剂 RRI(40 U/μL)500 μL,反复冻融 3 次,经 2 000 r/min 离心 10 min,取 1 mL 上清备用。

5.2 RNA 的提取

可选择市售商品化试剂盒、全自动核酸提取法或其他商品化提取法提取 RNA。在提取 RNA 过程中设立阳性和阴性对照样品, RNA 提取操作应在生物安全柜内进行。

5.3 反转录

5.3.1 反转录引物序列

反转录引物采用下游引物 P2,见附录 C。

5.3.2 反转录反应体系

反转录的反应体系见附录 D。

5.3.3 反转录反应程序

42 ℃水浴 1 h, 70 ℃灭活 15 min, 结束反应。可以直接进行 PCR, 或者放于 -20 ℃保存备用。试验中设立阳性对照、阴性对照和空白对照。

5.4 PCR

5.4.1 PCR 引物序列

见附录 C。

5.4.2 PCR 反应体系

见附录 D。

5.4.3 PCR 反应程序

95 ℃预变性 5 min 后进入 PCR 循环, 94 ℃变性 30 s, 54 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 40 s, 30 个循环, 最后 72 ℃终延伸 10 min, 结束反应。1.5% 琼脂糖电泳分析结果。

5.5 电泳

5.5.1 制备 1.5% 琼脂糖凝胶板, 见 A.3。

5.5.2 取 10.0 μL PCR 产物与 2.0 μL DNA 上样缓冲液 (6×) 混合, 加入琼脂糖凝胶板的加样孔中, 同时加入 DNA 分子量标准作对照。

5.5.3 盖好电泳仪, 插好电极, 电压为 80 V~100 V, 时间为 30 min。

5.5.4 用紫外凝胶成像系统对图片拍照、存档。

5.5.5 用分子量标准比较判断 PCR 片段大小。

5.6 结果判定

5.6.1 试验成立的条件

阳性对照的 PCR 扩增产物电泳后在 271 bp 位置出现特异性条带, 同时阴性对照和空白对照 PCR 扩增产物电泳后没有任何条带 (参见图 E.1), 则试验结果成立; 否则结果不成立。

5.6.2 阳性判定

在阳性对照、阴性对照、空白对照试验结果都成立的前提下, 如果样品的 PCR 产物电泳后在 271 bp 位置上出现特异性条带, 判定为猪轮状病毒核酸阳性。猪轮状病毒 VP6 基因扩增条带测序序列参见 E.2。

5.6.3 阴性判定

在试验结果成立的前提下, 如果检测样品在 271 bp 位置未出现特异性条带, 判定为猪轮状病毒核酸阴性。

附录 A
(规范性附录)
溶液的配制

A.1 电泳缓冲液的配制

50×TAE 的配制:准确称量 242 g 三羟甲基氨基甲烷、57.1 mL 的冰乙酸、100 mL 0.5mol/L 乙二胺四乙酸(pH8.0),加入蒸馏水至 1 L,室温放置备用。

使用时,用蒸馏水稀释成 1 倍使用。

A.2 样品处理液的配制

准确称量下列试剂,加去离子水定容至 200 mL,121 °C 灭菌 20 min 后室温放置备用。

氯化钠	1.60 g
氯化钾	0.04 g
磷酸氢二钠	0.29 g
磷酸二氢钾	0.05 g
乙二胺四乙酸二钠	3.72 g

A.3 1.5%琼脂糖的配制

准确称取 1.5 g 琼脂糖,加入 100 mL 1×TAE,在微波炉中加热,使琼脂糖充分溶解,取出,加入适量的染料,混匀,倒入制胶板中。

附 录 B

(规范性附录)

猪轮状病毒阳性样品和阴性样品

B.1 阳性样品制备

取猪轮状病毒细胞毒灭活后,用 100 mL PBS 稀释至 1 个半数组织培养感染量 TCID₅₀,向其中加入不含猪轮状病毒的猪粪便 10 g,摇匀,分装,0.5 mL/管,备用。

B.2 阴性样品制备

用 PBS 按 10 : 1 的比例稀释不含猪轮状病毒的猪粪便,摇匀,分装,0.5 mL/管,备用。

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

附录 C

(规范性附录)

检测猪轮状病毒 RT-PCR 方法的引物序列、浓度及扩增片段

引物序列及浓度见表 C.1。

表 C.1 引物序列

引物名称	引物浓度	引物序列	说明
上游引物 P1	10 pmol/ μ L	5'-GAAACGGAATAGCTCCACAAT-3'	扩增片段为轮状病毒的 VP6 基因,大小为 271 bp
下游引物 P2	10 pmol/ μ L	5'-GAATAATCAAATCCAGCCACC-3'	

附录 D

(规范性附录)

检测方法的 RT 和 PCR 反应体系

D.1 RT 反应体系组成

RNA	20 μL
10 mmol/L dNTPs	4.0 μL
RNA 酶抑制剂	1.0 μL
5 \times 反应缓冲液	8.0 μL
AMV 反转录酶	2.0 μL
下游引物 P2(见附录 C)	2.0 μL
DEPC 水	3.0 μL
总体积	40.0 μL

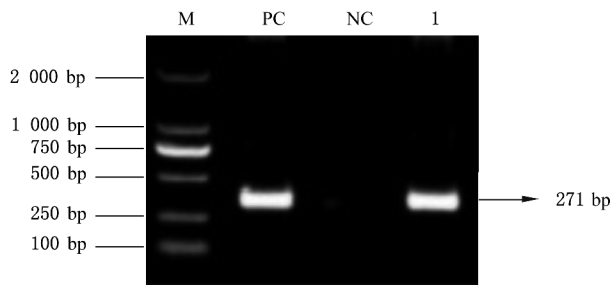
D.2 PCR 反应体系

反转录产物(cDNA)	3.0 μL
<i>Taq</i> DNA 聚合酶反应缓冲液(10 \times)	2.5 μL
10 mmol/L dNTPs	2.0 μL
上游引物 P1(见附录 C)	1.0 μL
下游引物 P2(见附录 C)	1.0 μL
<i>Taq</i> DNA 聚合酶	0.5 μL
灭菌去离子水	15.0 μL
总体积	25.0 μL

附录 E
(资料性附录)
检测阳性样品电泳例图及核苷酸序列

E.1 检测样品中猪轮状病毒阳性电泳示例

检测样品中猪轮状病毒阳性电泳示例见图 E.1。



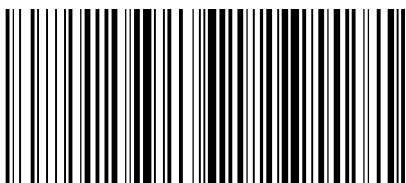
说明：

- M —— DNA 分子量标准(2000 bp DNA Ladder Marker)；
- PC —— 阳性对照；
- NC —— 阴性对照；
- 1 —— 粪便样品。

图 E.1 猪轮状病毒阳性检测样品的核酸电泳结果

E.2 猪轮状病毒 VP6 基因第 317~587 位核苷酸序列

TGAAATGGCTAGAGAGTCGCAACGAAACGGAATAGCTCCACAATCTGAAGCACTGAG
AAAGCTGTCAGGTATTAAGTTTAAGGGAATTAATTTTGACAATTCATCTGATTACATTGA
GAATTGGAATTTACAAAATAGACGACAGCGTACTGGATTTCGTGTTCCATAAGCCAAATAT
ACTTCCATACTCAGCATCATTCACTTTGAATAGATCACAGCCGGCACATGATAATTTAATG
GGGACTATGTGGATTAACGCTGGATCAGAAATT(271 bp)



GB/T 34756-2017

版权专有 侵权必究

*

书号:155066·1-57537