



中华人民共和国国家标准

GB/T 34745—2017

猪圆环病毒 2 型 病毒 SYBR Green I 实时 荧光定量 PCR 检测方法

Porcine circovirus type 2—Method of detecting virus by SYBR
Green I real-time PCR

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

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:河南农业大学、中国动物卫生与流行病学中心。

本标准主要起草人:魏战勇、郑兰兰、邵卫星、胡慧、陈红英、王亚宾、王学兵、崔保安、寇亚楠。

猪圆环病毒 2 型 病毒 SYBR Green I 实时 荧光定量 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测猪圆环病毒 2 型的技术要求。

本标准用于检测猪圆环病毒 2 型核酸,适用于临床样品中猪圆环病毒 2 型的快速检测。

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

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

Ct 值:循环阈值(Cycle Threshold)

DNA:脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic Acid)

EDTA:乙二胺四乙酸(Ethylenediaminetetraacetic Acid)

PBS:磷酸盐缓冲溶液(Phosphate Buffer Saline)

PCR:聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction)

PCV2:猪圆环病毒 2 型(Porcine Circovirus Type 2)

PMWS:仔猪断奶后多系统衰竭综合征(Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome)

Taq 酶:Taq DNA 聚合酶(Taq DNA Polymerase)

t_m 值:解链温度(Melting Temperature)

4 试剂

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。所有试剂均用无 RNA 酶污染的容器(用 DEPC 水处理后高压灭菌)分装。

4.1 蛋白酶 K(配制见附录 A): $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

4.2 裂解缓冲液(配制见附录 A): $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

4.3 异硫氰酸胍裂解液(配制见附录 A): $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

4.4 平衡酚(配制见附录 A): $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

4.5 酚-氯仿-异戊醇(25:24:1)混合液(配制见附录 A): $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

4.6 氯仿-异戊醇(24:1)(配制见附录 A): $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

4.7 氯仿:常温保存。

4.8 异丙醇:常温保存。

4.9 70%乙醇:用新开启的无水乙醇和灭菌去离子水配制(符合 GB/T 6682 要求), $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷。

4.10 SYBR Green PreMix 荧光染料预混酶:5 U/ μ L, -20 °C 保存。

5 仪器设备

5.1 荧光定量 PCR 扩增仪。

5.2 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。

5.3 组织研磨器或者研钵。

5.4 4 °C 冰箱、-20 °C 冰箱和 -70 °C 以下超低温冰箱。

5.5 可调微量移液器(2 μ L, 10 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1 000 μ L)。

5.6 振荡器。

5.7 高压灭菌锅。

6 耗材

6.1 离心管(1.5 mL)。

6.2 透明薄壁 PCR 管(0.2 mL)。

7 样品采集、运输及处理

7.1 样品采集

7.1.1 采样工具

棉拭子、剪刀、镊子、1.5 mL 离心管、研钵。以上采样工具经 121 °C $\pm$ 2 °C 下 15 min 高压灭菌,并干燥处理。

7.1.2 组织脏器

应采集疑似发病死猪的淋巴结、肺、脾、肝。用无菌的剪刀和镊子剪取待检样品,将采集的样品装入一次性塑料袋或其他灭菌容器,编号,用冰盒装运送至实验室冻存备用。

7.1.3 血清、血浆

用真空采血管或无菌注射器采集发病猪的血液,分离血清及血浆,并分装至无菌离心管中,密封,编号后保存于 4 °C 环境中送检。

7.2 样品运输

样品采集后,将采集的样品放入密闭的塑料袋内(一个采样点的样品,放入一个塑料袋内),存放于含有冰袋的保温箱中、密封,送实验室。

7.3 组织样品处理

取待检样品 2.0 g 于已洗净、灭菌并烘干的研钵中充分研磨,加 10 mL 灭菌生理盐水混匀,反复冻融 3 次,3 000 r/min 离心 15 min,取上清液转入无菌的 1.5 mL 离心管中,编号备用。血清和血浆样品可不经特殊处理,直接用于检测。

7.4 样本存放

样本在 2 °C ~ 8 °C 条件下保存应不超过 24 h,若长期保存应放在 -70 °C 以下冰箱,应避免反复冻

融(冻融不超过3次)。

8 操作程序

8.1 病毒 DNA 提取

8.1.1 样品标记

取灭菌的 1.5 mL 离心管,分别加入被检样品、阳性样品与阴性样品,并在离心管上做标记,避免混乱。

8.1.2 DNA 抽提

取 $n+2$ 支 1.5 mL 离心管,分别加入被检样本 n 个、阴性对照、阳性对照各 300 μL ,加入等体积异硫氰酸胍裂解液(或加入等体积样品裂解缓冲液混匀,再加入蛋白酶 K 至终浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 60 min(或 55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min),然后加入等体积的平衡酚,混匀器上振荡混匀 5 s(不能过于强烈,以免产生乳化层,也可以用手颠倒混匀)。于 12 000 r/min 离心 10 min。取上清液,分别加入等体积的酚-氯仿-异戊醇(25:24:1)、氯仿-异戊醇(24:1)、氯仿进行抽提。

取 1.5 mL 离心管,吸取各管中的上清液转移至相应的管中,不能吸出中间层,加入 2 倍体积异丙醇,放置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀 60 min 或 -70 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀 30 min。

于 12 000 r/min 离心 5 min(离心管开口保持朝离心机转轴方向放置),小心弃去上清液,倒置于吸水纸上,沾干液体(不同样品应在吸水纸不同地方沾干);加入 600 μL 70%乙醇,颠倒洗涤两次。

于 12 000 r/min 离心 5 min(离心管开口保持朝离心机转轴方向放置),小心倒去上清液,倒置于吸水纸上,尽量沾干液体(不同样品应在吸水纸不同地方沾干)。自然风干。

8.1.3 DNA 溶解

加入 20 μL 灭菌去离子水,轻轻混匀,溶解管壁上的 DNA,12 000 r/min 离心 30 s,冰上保存备用。长期保存应放置于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

8.2 荧光定量 PCR 检测

8.2.1 荧光定量 PCR 反应体系的配制

在反应混合物配制区进行。从试剂保存盒中取出上游引物 P1、下游引物 P2、SYBR Green PreMix,灭菌超纯水,在室温下融化后,3 000 r/min 离心 5 s。设定 PCR 数为 $n+2$,其中 n 为待检样品数,一管阳性对照及一管阴性对照,每个样本测试反应体系配制(见附录 B)。

计算好各试剂的使用量,加入一适当体积的离心管中,向其中加入 12.5 $\mu\text{L} \times n$ 的 SYBR Green PreMix,0.5 $\mu\text{L} \times n$ 的上游引物 P1,0.5 $\mu\text{L} \times n$ 的下游引物 P2,10.5 $\mu\text{L} \times n$ 的灭菌去离子水并充分混合均匀。向每个定量 PCR 管中各分装 24 μL ,转移至样本处理区。

8.2.2 加样

在样本处理区进行。在各设定的定量 PCR 管中分别加入 7.2 中制备的未知样本 DNA 溶液各 1 μL ,盖紧管盖后,500 r/min 离心 30 s。

8.2.3 荧光定量 PCR 扩增反应

在样本检测区进行。将本标准 7.3.2 中加样后的 PCR 管放入荧光 PCR 检测仪内,记录样本摆放顺序。在 96 孔板内记录或填写被检样品、阳性对照、阴性对照。

设定 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测猪圆环病毒 2 型的反应参数(见附录 B)。试验检测结束后,根据收集的荧光曲线和 Ct 值判定结果。

9 结果判定

9.1 结果分析条件设定

直接读取检测结果。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曲线的最高点为准。

9.2 质控标准

9.2.1 阴性对照

无 Ct 值并且无扩增曲线。

9.2.2 阳性对照

Ct 值应 ≤ 30.0 ,并出现典型的扩增曲线。否则,此次实验视为无效。读取检测结果,阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品扩增曲线的最高点的结果显示阴性为准,或可根据仪器噪声情况进行调整。

9.3 结果描述及判定

9.3.1 阴性判定

无 Ct 值并且无扩增曲线,判为阴性,表示样品中无猪圆环病毒 2 型病毒。

9.3.2 阳性判定

Ct 值 ≤ 30.0 ,且出现典型的扩增曲线,判为阳性,表示样品中存在猪圆环病毒 2 型病毒。

9.3.3 有效原则

Ct 值 > 30.0 ,且具有扩增曲线的样品建议重做。重做结果无 Ct 值者为阴性,否则为阳性。

附 录 A

(规范性附录)

相关试剂的配制

A.1 磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)配方

A.1.1 0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液:称取 27.6 g 磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$),先用适量蒸馏水溶解,最后稀释至 1 000 mL。

A.1.2 0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液:称取 53.6 g 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)(或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.6 g 或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 35.6 g),先用适量蒸馏水溶解,最后稀释至 1 000 mL。

A.1.3 0.01 mol/L、pH7.2 磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)的配制:取 0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液 14 mL, 0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液 36 mL,加氯化钠(NaCl) 8.5 g,用蒸馏水稀释至 1 000 mL。经 121 °C 15 min 高压灭菌,冷却后,无菌条件下按每毫升加入 1 000 IU 青霉素、1 000 μg 链霉素。

A.2 裂解缓冲液

取 0.02 mol/L 三(羟甲基)氨基甲烷(Tris-HCl)(pH7.5),0.03 mol/L 乙二胺四乙酸(EDTA),加适量蒸馏水溶解,再加入十二烷基硫酸钠(SDS)至终浓度为 1%,慢速搅拌至溶解,最后定容至 1 000 mL。

A.3 20 mg/mL 蛋白酶 K

20 mg 蛋白酶 K,加入灭菌水 1 mL。

A.4 异硫氰酸胍裂解液

59.08 g 异硫氰酸胍,10 mL 0.5 mol/L Tris-HCl (pH6.4),10 mL 0.2 mol/L EDTA(pH8.0),再加灭菌水定容到 100 mL。

A.5 平衡酚

从-20 °C 冰冻室中取出经过液化的酚,温度升至室温后,68 °C 水浴加热使酚溶解,加入羟基喹啉至终浓度为 0.1%。加入等体积 0.5 mol/L Tris-HCl (pH8.0)的缓冲液,用磁力搅拌 15 min,待两相分开后,尽可能彻底地移除上层水相液。加入等体积 0.1 mol/L Tris-HCl (pH8.0)到酚中,搅拌 15 min,待两相分开后,尽可能彻底地移除上层水相液。重复抽提,直到酚相 pH 大于 7.8。

A.6 酚-氯仿-异戊醇(25 : 24 : 1)混合液

将平衡酚、氯仿和异戊醇按体积比 25 : 24 : 1 混合,搅拌均匀。

A.7 氯仿-异戊醇(24 : 1)

将氯仿和异戊醇按体积比 24 : 1 混合,搅拌均匀。

附 录 B
(规范性附录)

荧光定量 PCR 检测用引物、反应条件及注意事项

B.1 猪圆环病毒 2 型 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测用引物

猪圆环病毒 2 型 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测用引物见表 B.1。

表 B.1 设计引物序列

名称	序列	长度	扩增目的片段
上游引物 P1	5'-GGGCCAGAATTCAACCTTAACC-3'	171bp	猪圆环病毒 2 型 ORF2 基因片段
下游引物 P2	5'-CGCACCTTCGGATATACTGTCA-3'		

引物浓度均为 20 pmol/ μ L。
引物的 t_m 值在 58℃~62℃之间,并且上下游引物的 t_m 值不能差别太大。
引物的 GC 含量在 40%~60%之间,45%~55%最佳。

B.2 猪圆环病毒 2 型 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 反应体系

猪圆环病毒 2 型 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 反应体系试剂配制见表 B.2。

表 B.2 测试反应体系配制表

试剂	用量
上游引物 P1	0.5 μ L
下游引物 P2	0.5 μ L
SYBR Green PreMix(包含 DNA 聚合酶,dNTP,SYBR-Green I)	12.5 μ L
模板 DNA	1 μ L
灭菌去离子水	10.5 μ L

B.3 猪圆环病毒 2 型 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 反应参数

设定 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测猪圆环病毒 2 型的反应参数。

第一阶段,预变性 95℃/3 min。

第二阶段,95℃/15 s,55℃/15 s,72℃/15 s,40 个循环;荧光信号的收集设置在第二阶段每次循环的退火延伸时进行,以获得样本的扩增动力学曲线。

第三阶段,反应结束后先加热至 95℃,然后再降至 60℃,开始以 0.5℃/s 递增至 95℃检测荧光信号得出扩增产物的溶解曲线。

B.4 使用时的注意事项

在检测过程中,应严防不同样品间的交叉污染。

反应液分装时应避免产生气泡,上机前检查各反应管是否盖紧,以免荧光物质泄漏污染仪器。
