



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

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。

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 °C~8 °C、-20 °C)。
- 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 °C 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 °C 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 °C 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 °C 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 μ L PCR 产物与 2.0 μ L DNA 上样缓冲液 (6 $\times$) 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 ℃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 $TCID_{50}$,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。

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

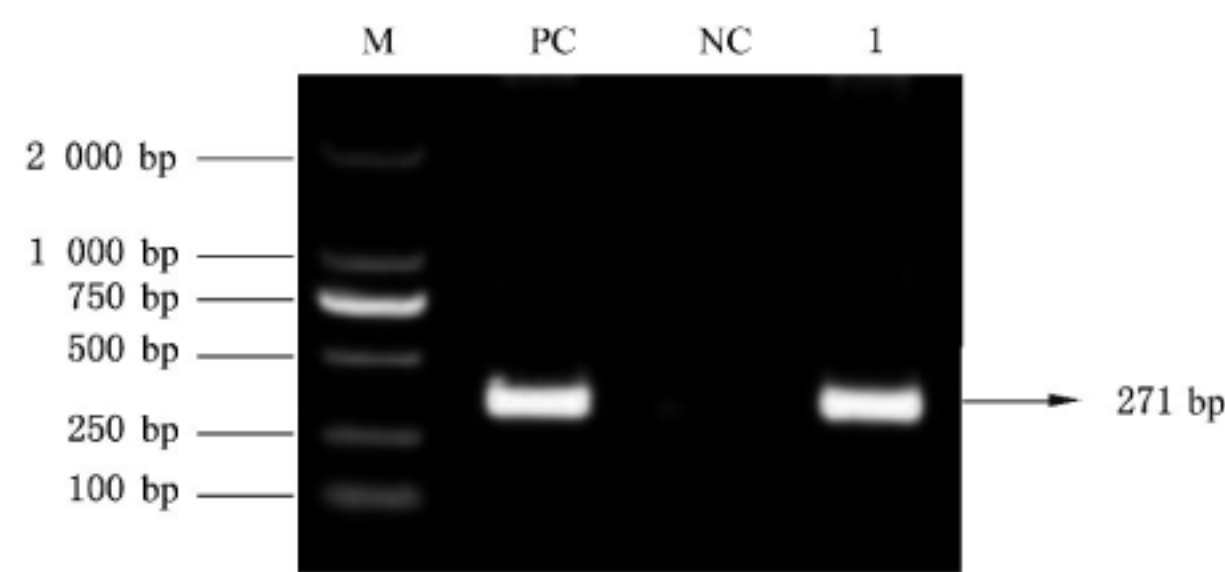
D.2 PCR 反应体系

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)