



中华人民共和国国家标准

GB/T 34757—2017

猪流行性腹泻 病毒 RT-PCR 检测方法

Porcine epidemic diarrhea—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(SAC/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、河南农业大学。

本标准主要起草人:李一经、邵卫星、魏荣、宋建德、姜艳平、袁丽萍、唐丽杰、乔薪瑗、崔文、徐耀辉、吴发兴、张志、孙映雪、魏战勇、李晓成。



猪流行性腹泻 病毒 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了猪流行性腹泻病毒 RT-PCR 检测方法的仪器、试剂、样品的采集和处理、RT-PCR 程序、电泳及结果判定的技术要求。

本标准适用于快速检测猪临床样品(猪小肠和新鲜粪便)或细胞培养物中猪流行性腹泻病毒核酸。

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。凡是注明日期的引用文件,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。

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:4 种脱氧核糖核苷三磷酸混合物(deoxyribonucleoside triphosphates)

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

RNA:核糖核酸(ribonucleic acid)

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

RRI:RNA 酶抑制剂(rnase ribonuclease inhibitor)

Taq 酶:Taq DNA 聚合酶(Taq DNA polymerase)

4 仪器

4.1 PCR 扩增仪。

4.2 高速台式冷冻离心机:可控温至 4℃、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 冰箱 2℃~8℃冰箱和-70℃以下超低温冰箱。

4.5 核酸电泳仪和水平电泳槽。

4.6 微量移液器 量程分别 0.2 μL~2 μL、1 μL~10 μL、10 μL~100 μL、20 μL~200 μL 和 100 μL~1 000 μL 的移液器,并配备与移液器相匹配的吸头。

4.7 高压灭菌锅。

4.8 凝胶成像系统(或紫外透射仪)。

5 耗材

5.1 1.5 mL 无 RNA 酶离心管。

5.2 0.2 mL PCR 管。

6 试剂

除非另有说明,在检测中使用的试剂均为分析纯。提取病毒 RNA 所用试剂应使用无 RNA 酶的容器进行分装。

6.1 水,GB/T 6682,三级水。

6.2 病毒裂解液:商品化 RNA 提取试剂盒,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 AMV 逆转录酶及 5 倍逆转录酶反应缓冲液:-20℃保存,避免反复冻融。

6.8 DEPC 水:购买商品化 DEPC 水。

6.9 Taq 酶及 10 倍 Taq 酶反应缓冲液:-20℃保存,避免反复冻融。

6.10 RRI:-20℃保存,避免反复冻融。

6.11 dNTPs:含 dATP、dGTP、dCTP、dTTP 各 10 mmol/L,-20℃保存,避免反复冻融。

6.12 DNA 分子量标准:DL2000bp DNA ladder。

6.13 磷酸盐缓冲液(PBS):配制见 A.1。

6.14 电泳缓冲液(TAE):配方及配制方法见 A.2。

6.15 样品处理液:配方及配制见 A.3。

6.16 1%琼脂糖凝胶板:配制见 A.4。

6.17 引物:见附录 B。

6.18 猪流行性腹泻病毒阳性样品及阴性样品:阳性样品的制备参见 C.1,阴性样品的制备参见 C.2。阳性样品和阴性样品可由标准编制单位或国家指定实验室提供。

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。

7.2 样品采集

宜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。

7.3 样品运输

将含有样品的密封袋置于带有冰袋的样品运输箱中,送至实验室。样品的运送应在低温保存条件

下进行,样品被运到实验室时,所附带的冰袋应没有完全融化。

7.4 样品保存

7.4.1 采样点保存

样品不能被及时送到实验室时,应置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存,保存期应不超过1个月;如需长期保存样品,应置于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

7.4.2 实验室保存

7.2中采集的样品可立即用于检测。不能立即检测的样品,在 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存应不超过24 h, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下应不超过1个月, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下可长期保存。

7.5 样品处理

7.5.1 小肠样品的处理

取 $5.0\text{ cm}\sim 10.0\text{ cm}$ 小肠组织,用剪刀剪碎,加入 $5.0\text{ mL}\sim 10.0\text{ mL}$ 的PBS,用组织研磨器或研钵研磨后转移到小玻璃瓶中, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反复冻融3次后摇匀,取 1.0 mL 小肠组织液到 1.5 mL 离心管中,经 $12\,000\text{ r/min}$ 离心 5 min ,取 $500\text{ }\mu\text{L}$ 上清备用。

7.5.2 粪便样品的处理

取 $0.5\text{ g}\sim 1.0\text{ g}$ 新鲜粪便,加入到含 $5.0\text{ mL}\sim 10.0\text{ mL}$ 样品处理液(配方见A.3)的玻璃瓶中, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反复冻融3次后摇匀,取 1.0 mL 处理过的粪便样品到 1.5 mL 离心管中,经 $12\,000\text{ r/min}$ 离心 5 min ,取 $500\text{ }\mu\text{L}$ 上清备用。

8 RT-PCR 操作程序

8.1 RNA 的提取

选择市售商品化RNA提取试剂盒,按照试剂盒操作说明书提取样品中的RNA。在提取RNA时,应设立阳性和阴性对照样品,按同样的方法提取RNA。RNA提取操作应在通风柜或生物安全柜中进行,避免RNA气溶胶的污染。

8.2 反转录(RT)

8.2.1 反转录引物序列 下游引物P2,见附录B。

8.2.2 RT反应体系 反转录的反应体系参见附录D。

8.2.3 RT反应程序 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h , $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭活 15 min ,结束反应。可以直接进行PCR,或者放于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。试验中设阳性和阴性对照。

8.3 聚合酶链式反应(PCR)

8.3.1 PCR引物序列 见附录B。

8.3.2 PCR反应体系 参见附录D。

8.3.3 PCR反应程序 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min 后进入PCR循环, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s , $52.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s ,30个循环,最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min ,结束反应。同时设空白对照。1%琼脂糖电泳分析结果。

9 电泳

9.1 制备 1.0% 琼脂糖凝胶板, 见附录 A。

9.2 取 10.0 μL PCR 产物与 2.0 μL 市售的 DNA 上样缓冲液(6 $\times$)混合, 加入到琼脂糖凝胶板的加样孔中, 同时加入 DNA 分子量标准作对照。

9.3 盖好电泳仪, 插好电极, 电压为 5 V/cm~10 V/cm, 时间为 30 min。

9.4 用紫外凝胶成像系统对图片拍照、存档。

9.5 用分子量标准比较判断 PCR 片段大小。

10 结果判定

10.1 试验成立的条件

阳性对照有 315 bp 的扩增条带, 阴性对照没有相应条带, 否则试验不成立。

10.2 样品检测结果

在阳性对照、阴性对照都成立的前提下, 若检测样品有 315 bp 的条带, 则判定该样品猪流行性腹泻病毒核酸阳性, 否则为阴性(参见图 E.1)。如需要, 可对扩增的条带进行回收, 克隆到 T 载体, 进行测序, 所得序列与附录 E 中的猪流行性腹泻病毒 M 基因的序列进行同源性比较, 以进一步确定样品检测结果。

附 录 A
(规范性附录)
溶液的配制

A.1 磷酸盐缓冲液(PBS)(0.01 mol/L、pH 7.4)的配制

准确称量下面各试剂,加入到 800 mL 蒸馏水中溶解,用盐酸调节溶液的 pH 至 7.4,加水至 1 L。分装后在 121 ℃灭菌 20 min,或过滤除菌,保存于室温。

磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	0.20 g
磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O)	2.90 g
氯化钠(NaCl)	8.00 g
氯化钾(KCl)	0.20 g
蒸馏水	加至 1 000.00 mL

A.2 1×电泳缓冲液(TAE)的配制

先配制 TAE(50×)贮液,使用时再用蒸馏水稀释成 1×电泳缓冲液。1 L TAE 的配制(50×):准确称量 242 g Tris 碱、57.1 mL 的冰乙酸、100 mL 0.5 mol/L EDTA(pH 8.0),加入蒸馏水至 1 L,室温放置备用。

A.3 样品处理液的配制

准确称量下面各试剂,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.4 1%琼脂糖凝胶板的制备

准确称取 1 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)

检测猪流行性腹泻病毒 RT-PCR 方法的引物序列

检测猪流行性腹泻病毒 RT-PCR 方法的引物序列见表 B.1。

表 B.1 检测猪流行性腹泻病毒 RT-PCR 方法的引物序列

引物名称	引物浓度	引物序列
上游引物 P1	20 pmol/ μ L	5'-TATGGCTTGCATCACTCTTA-3'
下游引物 P2	20 pmol/ μ L	5'-TTGACTGAACGACCAACACG- 3'
注：扩增片段为 M 基因保守区,大小为 315 bp。		

附 录 C

(资料性附录)

猪流行性腹泻病毒阳性样品和阴性样品

C.1 阳性样品制备

取猪流行性腹泻病毒(PEDV),用 100 mL 的 PBS 稀释至 1 个病毒半数组织细胞感染量(TCID₅₀),向其中加入不含 PEDV 的猪粪便 10 g,摇匀,分装,0.5 mL/管,备用。

C.2 阴性样品制备

用 PBS 按 10 : 1 的比例稀释不含 PEDV 的猪粪便,摇匀,分装,0.5 mL/管,备用。

附 录 D
(资料性附录)
检测方法的 RT 和 PCR 反应体系

D.1 RT 反应体系

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

D.2 PCR 反应体系

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



附 录 E
(资料性附录)
检测样品电泳例图及核苷酸序列

E.1 检测样品中猪流行性腹泻病毒电泳例图

检测样品中猪流行性腹泻病毒电泳例图见图 E.1。

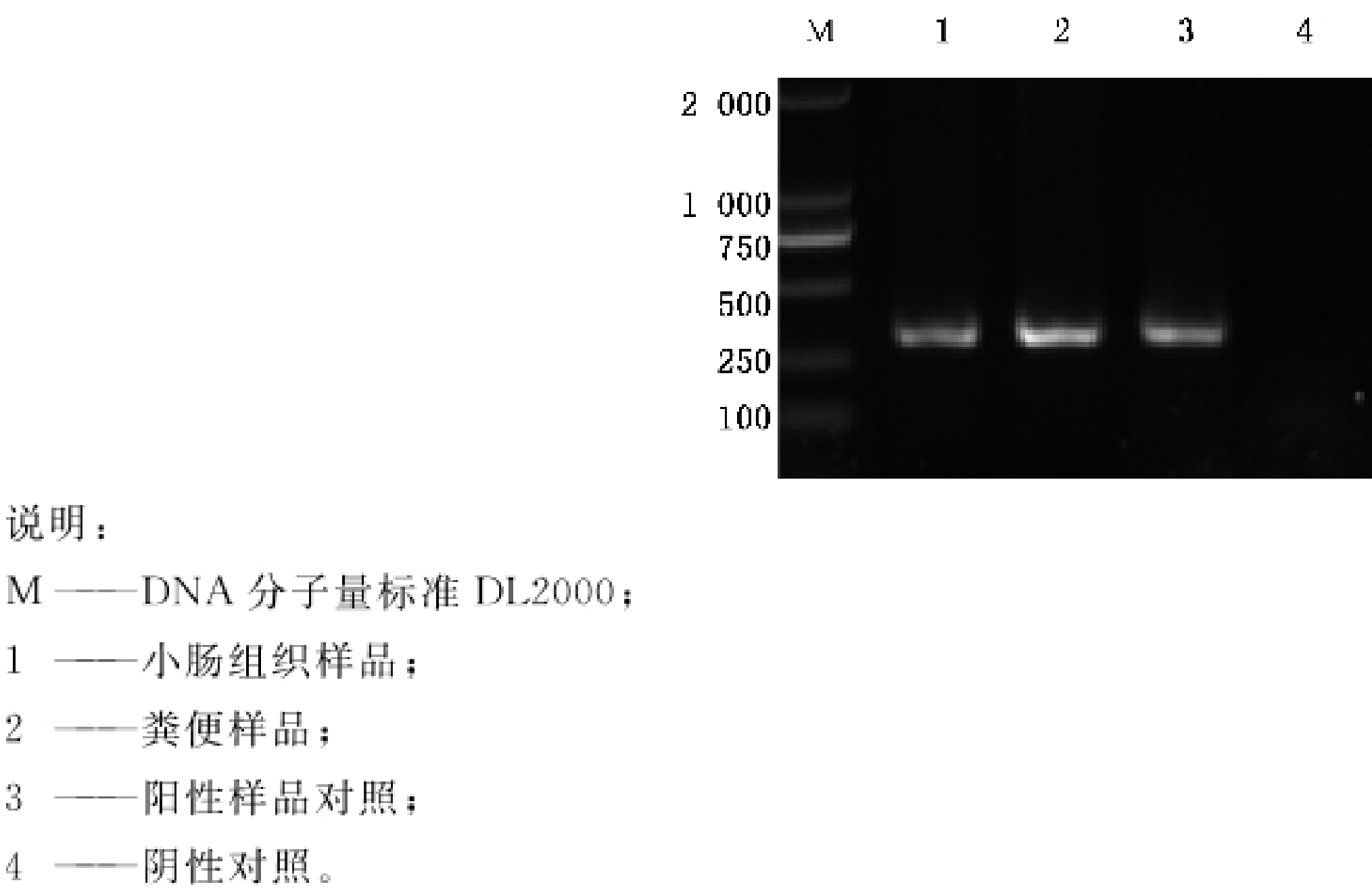


图 E.1 检测样品中猪流行性腹泻病毒电泳图

E.2 猪流行性腹泻病毒 M 基因第 249~563 位核苷酸序列(参考 CV777 株)

TATGGCCTGCATCACTCTTATGCTGCGGATAATGTATTTTGTCAATAGCATTTCGGTTGTGG
CGCAGGACACATTCTTGGTGGTCTTTCAACCCTGAACTGACGCGCTTCTCACTACTTCTG
TGATGGGCCGACAGGTTTGCATTCCAGTGCTTGGAGCACCAACTGGTGTAACGCTAACACT
CCTTAGTGGTACGTTGCTTGTAGAGGGCTATAAGGTTGCTACTGGCGTACAGGTAAGTCA
ATTACCTAATTTTCGTCACAGTCGCCAAGGCCACTACAACAATTGTCTACGGACGTGTTGGT
CGTTCAGTCAA(315 bp)