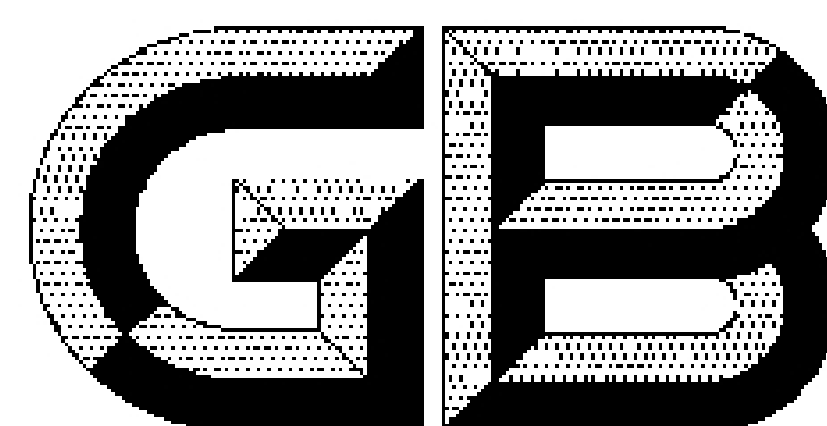




中华人民共和国国家标准

GB/T 36875—2018

猪瘟病毒 RT-nPCR 检测方法

Method of RT-nPCR for detection of classical swine fever virus

2018-09-17 发布

2019-04-01 实施

国家市场监督管理总局
中国国家标准化管理委员会 发布

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农村部提出。
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:军事医学科学院军事兽医研究所、中国兽医药品监察所。
本标准主要起草人:郭焕成、王琴、徐璐、冯焯、张乾义、赵启祖、邹兴启、朱元源、涂长春。



猪瘟病毒 RT-nPCR 检测方法

1 范围

本标准规定了猪瘟病毒特异的反转录-套式聚合酶链反应(RT-nPCR)方法的技术要求。

本标准适用于可能感染猪瘟病毒的猪脏器、血液、粪便和细胞培养物中猪瘟病毒核酸的检测,可用于猪瘟的诊断和监测。

本标准的猪瘟病毒 RT-nPCR 方法不能区分感染的猪瘟病毒野毒株和免疫的疫苗株。

2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DEPC:焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate)

EDTA-2Na:乙二胺四乙酸二钠(ethylene diaminetetraacetic acid disodium salt)

RNA:核糖核酸(ribonucleic acid)

RT-nPCR:反转录-套式聚合酶链反应(reverse transcription and nested polymerase chain reaction)

3 实验前准备

3.1 实验室条件

3.1.1 实验室分区

PCR 实验室分区包括核酸提取区、PCR 反应体系配制区——配液区、扩增区、电泳区。流程顺序为核酸提取区→配液区→扩增区→电泳区。各区仪器和耗材专用。

3.1.2 实验室应配备的仪器及器材

3.1.2.1 仪器:Ⅱ级生物安全柜、台式高速冷冻离心机、普通冰箱(−20 ℃和 4 ℃)、分析天平、PCR 扩增仪、电泳仪、电泳槽、紫外凝胶成像仪(或紫外分析仪)、组织研磨器、扁桃体采样器、微波炉、单道可调移液器(2 μL、10 μL、200 μL、1 000 μL)。

3.1.2.2 器材:无菌注射器、眼科剪、眼科镊、称量纸、棉拭子、灭菌牙签、500 mL 量筒、500 mL 锥形瓶、一次性无 RNA 酶吸头(10 μL、200 μL、1 000 μL)、1.5 mL 无 RNA 酶离心管、0.2 mL 薄壁 PCR 管。

3.2 化学药品及试剂

3.2.1 总 RNA 提取试剂 Trizol。

3.2.2 TAE 电泳缓冲液的制备,配制方法见附录 A。

3.2.3 1%琼脂糖凝胶,配制方法见附录 A。

3.2.4 其他试剂:200 U/μL M-MLV 反转录酶,5×M-MLV 缓冲液,40 U/μL RNA 酶抑制剂,DEPC-H₂O,5 U/μL ExTaq DNA 聚合酶,10×ExTaq 缓冲液(Mg²⁺ Plus),6 碱基随机引物(50 μmol/L),6×上样缓冲液,dNTPs(2.5 mmol/L/dNTP),异丙醇,三氯甲烷,75%乙醇,ddH₂O,溴化乙啶替代染

料,DL2000 DNA Marker,阴性对照(DEPC-H₂O),阳性对照(猪瘟兔化弱毒疫苗、灭活的猪瘟病毒或已知的阳性样品)。

3.2.5 引物序列及配制方法,参见附录 B。

4 方法

4.1 样品的采集、保存和运送

4.1.1 采样注意事项

采样及样品前处理过程中应戴一次性手套,样品间不得交叉污染。

4.1.2 采样工具

扁桃体采样器:鼻捻子、开口器和采样枪。使用前均应用 3% 氢氧化钠溶液浸泡消毒 5 min~10 min,经清水冲洗;牙签经 121 °C 高压灭菌 15 min;剪、镊经 160 °C 干烤 2 h。

4.1.3 采样及样品处理方法

4.1.3.1 扁桃体样品

用鼻捻子固定活猪的上颚,用开口器打开口腔,用采样枪采取扁桃体样品,用灭菌牙签挑至 1.5 mL 离心管并做标记,编号,置于样品冷藏箱送至实验室。

在实验室生物安全柜中取出待检样品置于组织研磨器,加入 5 倍体积 4 °C 预冷的 DEPC-H₂O,充分研磨,4 °C、3 000×g 离心 15 min,取上清液转入离心管中编号备用。

4.1.3.2 组织样品

采取病死猪或安乐死的猪组织和脏器(淋巴结、脾脏、肾脏、肝脏和回肠等)装入一次性塑料袋或其他灭菌容器,编号,置于样品冷藏箱送至实验室。

在实验室生物安全柜中取 50 mg~100 mg 待检组织样品置于组织研磨器,加入 5 倍体积 4 °C 预冷的 DEPC-H₂O,充分研磨,4 °C、3 000×g 离心 15 min,取上清液转入离心管中编号备用。

4.1.3.3 全血样品

用无菌注射器采集全血,注入含 1/10 体积 4% EDTA 溶液的无菌容器中,充分混匀后编号备用。

4.1.3.4 粪便样品

用棉拭子挑取少许新鲜粪便样品于离心管中,加入 1 mL 生理盐水,震荡混匀,4 °C、3 000×g 离心 15 min,取上清液转入离心管中编号备用。其余液体排泄物离心后直接转入离心管编号备用。

4.1.3.5 细胞培养物

细胞培养物反复冻融 3 次,转入离心管中编号备用。

4.1.3.6 存放与运送

采集或处理的样品在 2 °C~8 °C 条件下保存应不超过 24 h;若需长期保存,应放置于-80 °C 冰箱,且应避免反复冻融(冻融不超过 3 次)。采集的样品放入样品管中密封后,采用保温容器加冰袋或干冰,在 24 h 内运送到实验室。

4.2 核酸提取

4.2.1 提取样品总 RNA,可采用本标准中的 Trizol 法,也可采用其他等效试剂盒,按照试剂盒说明书进行。

4.2.2 以猪瘟兔化弱毒疫苗、灭活的猪瘟病毒或已知的阳性样品作为阳性对照,以 DEPC-H₂O 为阴性对照。

4.2.3 按以下 Trizol 法进行样品总 RNA 提取:

- a) 取待检样品、阳性对照和阴性对照各 250 μL 置于 1.5 mL 离心管,每管加入 750 μL Trizol,一份样品换一个吸头,充分混匀,静置 10 min;
- b) 每个样品管中加 200 μL 三氯甲烷,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 4 ℃、13 000×g 离心 15 min;
- c) 用移液器转移离心后的上清液 400 μL(注意不要吸出中间层)至新 1.5 mL 无 RNA 酶离心管中,加等体积的异丙醇(4 ℃预冷),颠倒混匀,−20 ℃静置 20 min;
- d) 于 4 ℃、13 000×g 离心 15 min,小心倒去上清液,加入 700 μL DEPC-H₂O 配制的 75%乙醇,颠倒洗涤;
- e) 于 4 ℃、8 000×g 离心 6 min,小心倒去上清液,沉淀,室温干燥 10 min~15 min;
- f) 加入 20 μL DEPC-H₂O,轻轻混匀,溶解管壁上的 RNA 沉淀,冰上保存备用。提取的 RNA 应在 2 h 内进行 RT 扩增,若需长期保存应放至−80 ℃冰箱。

4.3 反转录

以随机引物为反转录引物,建立 20 μL 反转录体系,制备 cDNA:

dNTPs	4.0 μL
随机引物	1.5 μL
5×M-MLV 缓冲液	4.0 μL
反转录酶 M-MLV	1.0 μL
RNA 酶抑制剂	1.0 μL
总 RNA	8.5 μL
42 ℃ 1.5 h,95 ℃ 5 min。	

4.4 建立 50 μL 外套 PCR 反应体系

ddH ₂ O	36.7 μL
10×ExTaq 缓冲液(Mg ²⁺ Plus)	5.0 μL
外套上游引物	1.0 μL
外套下游引物	1.0 μL
dNTPs	4.0 μL
ExTaq DNA 聚合酶	0.3 μL
cDNA	2.0 μL

PCR 条件:95 ℃ 5 min→(95 ℃ 45 s→55 ℃ 1 min→72 ℃ 1 min)35 个循环→72 ℃ 7 min→4 ℃。

4.5 建立 50 μL 内套 PCR 反应体系

取 2 μL 外套 PCR 产物作为内套 PCR 的模板进行套式 PCR,建立 50 μL 内套 PCR 反应体系:

ddH ₂ O	36.7 μL
10×ExTaq 缓冲液(Mg ²⁺ Plus)	5.0 μL

内套上游引物	1.0 μL
内套下游引物	1.0 μL
dNTPs	4.0 μL
ExTaq DNA 聚合酶	0.3 μL
外套 PCR 产物	2.0 μL
PCR 条件:95 ℃ 5 min→(95 ℃ 45 s→55 ℃ 1 min→72 ℃ 45 s)35 个循环→72 ℃ 7 min→4 ℃	

4.6 电泳

- 4.6.1 配制适量的电泳及制胶用的缓冲液(通常是 1×TAE)。
- 4.6.2 配制 1%琼脂糖凝胶(见附录 A)。
- 4.6.3 将琼脂糖溶液倒入制胶模中,然后在适当位置处插上梳子。凝胶厚度一般为 4 mm~5 mm。
- 4.6.4 取 5 μL 内套 PCR 产物与 1 μL 6×上样缓冲液混匀,用移液器将其加入加样孔中。
- 4.6.5 接通电源,以 120 V 电压进行电泳,30 min 后停止电泳。
- 4.6.6 用凝胶成像仪观察并保存结果。

4.7 结果判定

阳性对照样品的内套 PCR 产物出现 272 bp 扩增带,阴性对照无扩增带出现(引物二聚体带除外)时,实验成立。被检样品的内套 PCR 产物出现 272 bp 特异性条带时,判定样品为猪瘟病毒核酸检测阳性,否则为阴性(见图 1)。

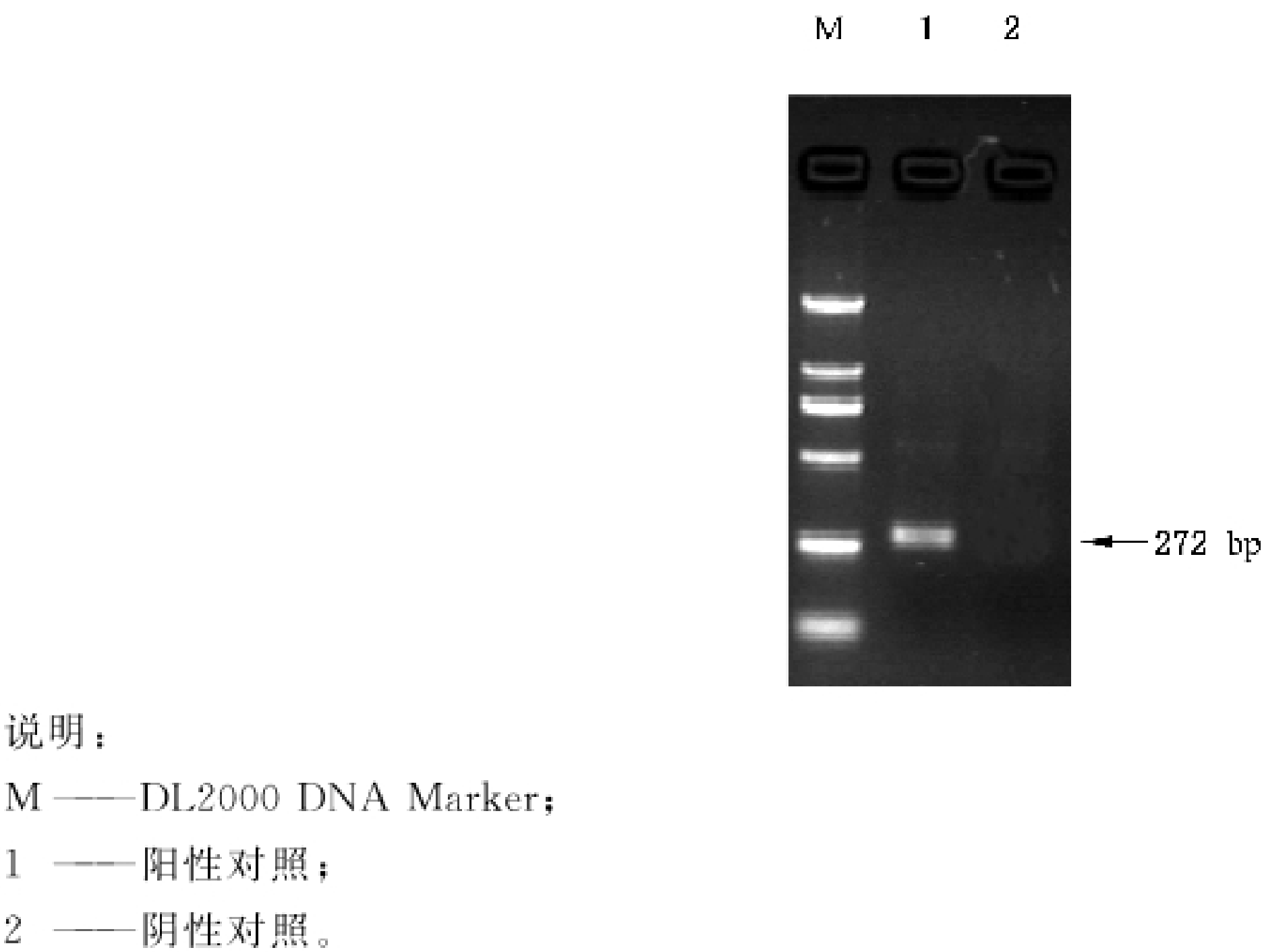


图 1 套式 RT-PCR 检测结果的电泳图示例

4.8 基因测序

根据需要,可进一步将阳性 PCR 扩增产物用内套 PCR 上游、下游引物进行双向测序,获得 CSFV 的 PCR 扩增区基因序列。

5 注意事项

5.1 样品的处理和检测应在生物安全 II 级(BSL-2 级)或以上的实验室进行。疑似猪瘟样品的分装、研磨、离心及添加 RNA 提取裂解液需在 II 级生物安全柜内进行。检测后的废弃物品需浸入 1%次氯酸钠

溶液的污物缸内 30 min, 后经高压灭菌后处理。

5.2 RT-nPCR 实验室各分区器材试剂专用, 不可跨区流动使用, 防止污染。实验结束后立即用 75% 酒精或紫外灯对工作环境消毒处理。

5.3 所用试剂应在规定的温度下保存, 用毕立即放回原处。反转录酶和 DNA 聚合酶现用现取, 其他试剂使用前需室温融化。配制反转录和 PCR 反应体系时, 应将反应体系和融化的试剂暂放于冰盒。

5.4 提取 RNA 时, 应戴口罩、乳胶手套, 尽量避免交谈, 缩短操作时间, 防止唾液和皮肤上 RNA 酶的污染。使用酒精棉清洁实验工作台、移液器等实验器材。

5.5 因套式 PCR 极其敏感, 样品处理和核酸提取过程中使用的塑料管和吸头等材料均需一次性使用, 不得重复利用。

5.6 推荐使用 DEPC 处理的无核酸酶的一次性耗材。用灭菌的镊子夹取离心管, 且离心管开盖、扣盖时避免接触管口。

5.7 检测试剂在使用前需经 $2\,000\times g$ 离心 15 s, 使液体全部沉降于管底。配制分装反应体系时应避免产生气泡。

5.8 移液器、PCR 仪等应定期校验。

附 录 A
(规范性附录)
溶液的制备

A.1 TAE 电泳缓冲液的制备

A.1.1 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)溶液(pH 8.0)

二水乙二胺四乙酸二钠	18.61 g
灭菌双蒸水	80 mL
氢氧化钠	调 pH 至 8.0
灭菌双蒸水	加至 100 mL

A.1.2 TAE 电泳缓冲液(50 倍)配制

三羟甲基氨基甲烷(Tris)	242 g
冰乙酸	57.1 mL
0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液(pH 8.0)	100 mL
灭菌双蒸水	加至 1 000 mL

A.2 1%琼脂糖凝胶的配制

琼脂糖	1 g
TAE 电泳缓冲液(50 倍)	2 mL
灭菌双蒸水	98 mL
微波炉中完全融化,加溴化乙啶替代染料溶液 5 μ L。	

附 录 B
(资料性附录)
引 物

引物信息见表 B.1。

表 B.1 猪瘟病毒套式 RT-PCR 引物信息

引物名称	引物序列(5'-3')	扩增片段长度
外套上游引物	5' AGR CCA GAC TGG TGG CCN TAY GA 3' (2228-2250) *	671 bp
外套下游引物	5' TTY ACC ACT TCT GTT CTC A 3' (2898-2880) *	
内套上游引物	5' TCR WCA ACC AAY GAG ATA GGG 3' (2477-2497) *	272 bp
内套下游引物	5' CAC AGY CCR AAY CCR AAG TCA TC 3' (2748-2726) *	
注 1: R (A/G),Y (C/T),N(A/T/C/G),W(A/T)。		
注 2: 引物使用时以 DEPC-H ₂ O 稀释至 10 μmol/L,于-20 ℃ 保存。		
* 括号中数字为引物序列在 CSFV Alfort-187 株基因组中的位置。		



参 考 文 献

[1] GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

[2] GB 19489 实验室 生物安全通用要求

[3] GB/T 27401 实验室质量控制规范 动物检疫

[4] EU Diagnostic Manual for Classical Swine fever (CSF) Diagnosis; Technical Part (Second Draft March 2002).

[5] OIE Biological Standards Commission. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animal. 2014.
