



中华人民共和国国家标准

GB/T 27981—2011

牛传染性鼻气管炎病毒实时 荧光 PCR 检测方法

Real-time PCR method for the detection of
infectious bovine rhinotracheitis virus

2011-12-30 发布

2012-06-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
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。

本标准参考了 OIE 发布的《陆生动物诊断试验和疫苗手册》(2008 版)关于牛传染性鼻气管炎/牛传染性化脓性外阴阴道炎(Chapter 2.4.13)的内容。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:中华人民共和国广东出入境检验检疫局、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:陈茹、刘中勇、林志雄、罗琼、曾碧健、许如苏、姜焱、吴晓薇。

牛传染性鼻气管炎病毒实时 荧光 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了牛传染性鼻气管炎病毒(牛疱疹病毒 I 型, BoHV-1)实时荧光 PCR 检测方法的技术要求。

本标准适用于快速检测牛血样、拭子、精液、动物组织(粘膜、肝、脾、肾、淋巴结、胎盘组织等)和细胞培养物等样品中 BoHV-1 病毒感染。

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

世界动物卫生组织(OIE)《陆生动物诊断试验和疫苗标准手册》(2008 版) 关于检测牛冷冻精液中 BoHV-1 病毒的实时荧光 PCR 方法

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BoHV-1: bovine herpesvirus type 1, 牛疱疹病毒 I 型。

Ct 值: 荧光信号量达到设定的阈值时所经历的循环数。

DNA: deoxyribonucleic acid, 脱氧核糖核酸。

DTT: DL-dithiothreitol, 二硫苏糖醇。

EDTA: ethylene diaminetetraacetic acid, 乙二胺四乙酸。

IBR: bovine infectious rhinotracheitis, 牛传染性鼻气管炎。

PBS: phosphate buffer solution, 磷酸盐缓冲生理盐水。

PCR: polymerase chain reaction, 聚合酶链式反应。

SDS: sodium dodecyl sulfate, 十二烷基磺酸钠。

UDG 酶: uracil DNA glycosylase, 尿嘧啶 DNA 糖基化酶。

4 设备和器材

4.1 荧光 PCR 仪。

4.2 台式冷冻离心机。

4.3 可调微量移液器: 规格 10 μ L、100 μ L、200 μ L、1 mL。

4.4 带滤芯微量吸头: 规格 10 μ L、100 μ L、200 μ L、1 mL。

4.5 PCR 光学反应管。

4.6 微量离心管。

4.7 涡旋混匀器。

4.8 恒温培养箱。

4.9 冰箱: 规格 2 $^{\circ}$ C $\sim$ 8 $^{\circ}$ C, -20 $^{\circ}$ C, -80 $^{\circ}$ C。

4.10 恒温水浴箱。

5 试剂

除另有规定,本方法试验用水应按照 GB/T 6682 中规定的二级水,所用化学试剂均为分析纯。

5.1 引物与探针

引物与探针配制采用无 DNA 酶、无 RNA 酶水将每条引物与探针配制成 100 $\mu\text{mol/L}$ 储存液,置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或更低温度冻存;使用时取适量配制成 10 $\mu\text{mol/L}$ 工作液,避免多次冻融。

引物与探针序列:

gB 基因上游引物 gB-F:5'TGT GGA CCT AAA CCT CAC GGT 3'

gB 基因下游引物 gB-R:5'GTA GTC GAG CAG ACC CGT GTC 3'

gB 基因探针:5'[FAM]-AGG ACC GCG AGT TCT TGC CGC [BHQ-1] 3'

探针 5'端标记的报告荧光基团及 3'端标记的淬灭基团可根据荧光 PCR 仪设备等具体情况另行选定。

5.2 蛋白酶 K 溶液:配制方法见附录 A。

5.3 柠檬酸钠缓冲液:配制方法见附录 A。

5.4 0.5 mol/L EDTA:配制方法见附录 A。

5.5 0.01 mol/L pH7.2 PBS:配制方法见附录 A。

5.6 10% chelex 100:配制方法见附录 A。

5.7 1 mol/L DTT:配制方法见附录 A。

5.8 2 $\times$ 定量 PCR-UDG 酶预混液:含 60 U/mL 热启动 Taq 酶,40 mmol/L Tris-HCl (pH8.4),100 mmol/L KCl,6 mmol/L MgCl_2 ,400 $\mu\text{mol/L}$ dGTP,400 $\mu\text{mol/L}$ dATP,400 $\mu\text{mol/L}$ dCTP,800 $\mu\text{mol/L}$ dUTP,40 U/mL UDG。可采用经验证可靠的商品化预混液。

5.9 核酸抽提试剂盒。

5.10 无 DNA 酶、无 RNA 酶水。

5.11 无水乙醇。

5.12 70%乙醇:用新开启的无水乙醇和无 DNA 酶、无 RNA 酶水配制, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷。

5.13 三氯甲烷。

5.14 异丙醇。

6 样品采集与处理

6.1 样品采集及前处理

6.1.1 采样工具

采样工具需经 $(121\pm 2)^{\circ}\text{C}/0.1\text{ MPa}$ 高压 15 min 并烘干,或经 $160\text{ }^{\circ}\text{C}$ 干烤 2 h 灭菌。

6.1.2 血清、全血

用无菌注射器或采血专用真空管针无菌自牛静脉采血,无菌分离血清,直接用于核酸提取。

用无菌注射器或采血专用真空管针无菌自牛静脉采血,将血液直接滴入抗凝剂中,并立即连续摇动,充分混合。抗凝剂采用柠檬酸钠缓冲液,或 0.5 mol/L EDTA。每 6 mL 血液加 1 mL 抗凝剂。直接用于核酸提取。

6.1.3 拭子

用无菌棉拭子采集鼻道、生殖器官和眼分泌物,采集时,将拭子反复刮擦呼吸道或生殖器官粘膜,蘸

取分泌物后,立即将棉拭子浸入 1 mL~2 mL 灭菌 0.01 mol/L pH7.2 的 PBS 中,4 ℃ 储存,尽快送达实验室。取样进行检验时,充分振动、挤干拭子,浸泡液采用 4 000 r/min 离心 1 min,取上清备用。

6.1.4 精液

将冷冻精液样品或新鲜精液样品分装到 1.5 mL 微量离心管中,充分解冻后,振荡混匀,采用 12 000 r/min 离心 30 s,取上清按 6.2.1 或 6.2.3 进行核酸提取;或取原液按 6.2.2 或 6.2.3 提取核酸。每一批次冷冻精液取 3 支冻精管,分别进行核酸提取和后续检测。

6.1.5 组织样品

剖检时无菌采集动物呼吸道粘膜、扁桃腺、肺部和支气管淋巴结,对流产胎儿,采集刚死亡胎儿肝、肺、肾、脾和胎盘组织。检测时,用无菌剪、镊取适量样品,按 1:5 的比例加入灭菌 0.01 mol/L pH7.2 的 PBS(例:1 g 组织样品加 5 mL 溶液),在研钵中剪碎,充分研磨,取研磨物分装到离心管中,冻融 2 次~3 次,4 000 r/min 离心 5 min,取上清备用。

6.1.6 细胞培养物

细胞培养物冻融 2 次~3 次,分装到 1.5 mL 微量离心管中,4 000 r/min 离心 1 min,取上清备用。

6.2 样品核酸抽提

6.2.1 有机溶剂抽提法

适用于上述各种样品。取 200 μ L 经前处理的样品或对照,加 200 μ L 0.01 mol/L pH7.2 PBS 缓冲液,加 SDS、蛋白酶 K 至终浓度分别为 1% 和 0.5 mg/mL,混匀器上振荡混匀,56 ℃ 温育 30 min,置沸水浴孵育 8 min;加等体积三氯甲烷,振荡混匀,12 000 r/min,离心 10 min,取上清;可重复三氯甲烷处理步骤一次;加等体积异丙醇(-20 ℃ 预冷),振荡混匀;4 ℃,13 000 r/min 离心 10 min,弃上清;加等体积 70% 乙醇,振荡混匀,4 ℃,13 000 r/min 离心 10 min;小心吸弃上清,吸头不要碰到有沉淀一面,倒置于吸水纸上,尽量沾干液体(不同样品需在吸水纸不同地方沾干),在洁净工作台室温干燥 5 min;加入 50 μ L 无 DNA 酶、无 RNA 酶水,轻轻混匀,溶解管壁上的核酸,室温放置 10 min,直接用于检测,或贮-20 ℃ 备用。长期贮存,应置-80 ℃ 或更低温度。

6.2.2 Chelex 100 提取法

采纳世界动物卫生组织(OIE)《陆生动物诊断试验和疫苗标准手册》(2008 版)操作程序,适用于精液样品。

在微量离心管中,加入 10% chelex 100 溶液 100 μ L,蛋白酶 K(10 mg/mL)11.5 μ L,1 mol/L DTT 7.5 μ L,90 μ L 无 DNA 酶、无 RNA 酶水,10 μ L 精液样品,充分混匀;置 56 ℃ 温育 30 min,充分振荡混匀 10 s;置沸水浴孵育 8 min,充分振荡混匀 10 s;用 12 000 r/min 离心 3 min,取上清直接用于检测,或贮-20 ℃ 备用。长期贮存,应置-80 ℃ 或更低温度。

6.2.3 试剂盒抽提法

可采用经验证等效的商品化核酸抽提试剂盒方法。

7 实时荧光 PCR 检测

7.1 对照设立

7.1.1 样品设置要求:从样品处理开始,应设置阳性对照、阴性对照。

7.1.2 阳性对照:取已知阳性的同类样品作为阳性对照。也可将适量 BoHV-1 病毒或含阳性模板的

质粒 DNA 添加到已知阴性样品中作为阳性对照样品。

7.1.3 阴性对照:取已知阴性的同类样品作为阴性对照。

7.1.4 空白对照:在扩增反应阶段设置。以无 DNA 酶、无 RNA 酶水作为模板设置空白对照。

7.2 实时荧光 PCR 检测

7.2.1 加样

反应体系采用 25 μL 反应体积,其中,含 $2\times$ 定量 PCR-UDG 预混液 12.5 μL ,上、下游引物各 200 nmol/L,探针 100 nmol/L,模板 5 μL (100 pg~1 μg),补加适量无 DNA 酶、无 RNA 酶水使反应总体积达 25 μL 。加完样后,盖紧管盖,混匀,低速瞬时离心,使反应液集中管底。

7.2.2 扩增反应

反应参数设置:

——50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min;

——95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min;

——95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,45 个循环,荧光收集设置在每次循环的退火延伸时进行。

荧光素或检测通道设置:采用 FAM 通道或将报告荧光(report dye)设定为 FAM,采用其他报告荧光应按仪器说明对应设定通道;淬灭荧光(quencher dye)设定为 None,校准荧光(reference dye)设定为 None。可根据不同品牌仪器说明等效设置参数。

7.2.3 结果判定

7.2.3.1 结果分析条件设定

综合分析仪器给出的各项结果,基线(baseline)以仪器给出的默认值作为参考,阈值(threshold)设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照样品扩增曲线的最高点为准,具体还需根据仪器噪声情况进行调整,选择反应所设定的荧光基团对应的通道进行分析。

7.2.3.2 质控

阴性对照和空白对照应无 C_t 值,阳性对照的 C_t 值应 ≤ 30 且出现典型的扩增曲线。

如对照不满足以上条件,此次实验视为无效。

7.2.3.3 荧光 PCR 反应结果判定

在质控有效的条件下进行结果判定。

阴性反应结果判定,检测结果呈现无 C_t 值的反应判为阴性反应。

阳性反应结果判定,检测结果呈现 C_t 值 ≤ 35 且扩增曲线有明显的对数增长期,判为阳性反应。

对于 $35 < C_t \text{ 值} < 45$ 的样品,应进行重复试验。如果重复试验的 C_t 值 < 45 ,且曲线有明显的对数增长期,判为阳性反应。否则判为阴性反应。

必要时,对初次检测呈阳性反应的样品进行重复检测。

8 注意事项

检测过程防止交叉污染应注意的事项见附录 B。

附 录 A

(规范性附录)

溶液的配制

A. 1 0.01 mol/L pH7.2 PBS

A 液(0.2 mol/L 磷酸二氢钠溶液):称取磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)27.6 g,溶于蒸馏水中,定容至 1 L。

B液(0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液):称取磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)53.6 g(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)加蒸馏水溶解,定容至1 L。

0.2 mol/L A 液	14 mL
---------------	-------

0.2 mol/L B 液 36 mL

氯化钠	8.5 g
-----	-------

将上述体积 A 液与 B 液混合,溶解氯化钠,并用蒸馏水定容至 1 L,即为 0.01 mol/L pH7.2 PBS 缓冲液。

A.2 柠檬酸钠缓冲液

柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 5.3 g

柠檬酸钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 15 g

葡萄糖($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	16.2 g
---	--------

称取上述试剂,溶解于蒸馏水,定容至 1 L,混匀。采用 $(121 \pm 2)^\circ\text{C}/0.1\text{ MPa}$ 高压灭菌 15 min 后贮存于 4°C 。

A.3 0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)

称取 186.1 g EDTA, 加入 800 mL 蒸馏水中, 磁力搅拌器上剧烈搅拌, 用氢氧化钠 (NaOH) 调 pH 至 8.0, 定容至 1 L, 分装后采用 $(121 \pm 2)^\circ\text{C}/0.1\text{ MPa}$ 高压灭菌 15 min, 贮室温。

A. 4 10% chelex 100

称取 10 g chelex 100 树脂,加入适量灭菌双蒸水中,定容至 100 mL。吸取时边搅拌边用灭菌吸头移取。

A. 5 1 mol/L DTT

称取 3.09 g DTT, 加 20 mL 0.01 mol/L 乙酸钠 (pH 5.2) 溶解, 过滤除菌, 分装成小份后, -20°C 保存。

A.6 蛋白酶 K 溶液(10 mg/mL)

称取 100 mg 蛋白酶 K 加入 9.5 mL 水中,轻轻摇动,直至蛋白酶 K 完全溶解。不要涡旋混合。加水定容到 10 mL。

附 录 B
(规范性附录)

检测过程防止交叉污染的措施

- B.1** 采样及样品处理过程,应防止不同样品之间通过器具、手套等的交叉污染。采样及样品处理工具应经过高压灭菌或高温烘烤处理,一套工具仅限一个样品使用。存放样品的容器应清洗、高压灭菌或高温烘烤处理,或使用一次性灭菌容器。
- B.2** 实验过程,应穿工作服和戴一次性手套,勤换手套,工作服应经常清洗。
- B.3** 使用带滤芯吸嘴。吸嘴、离心管、PCR 管等应经过高压灭菌处理,一次性使用,不得回收清洗后重复使用。
- B.4** 样品处理与 PCR 加样应在不同的区域进行,不同区域配备独立的加样工具和用具。该区域可以是独立的空间间隔、有紫外消毒设施的独立的设备如核酸提取工作站、PCR 加样工作站、可密闭进行紫外消毒的超净工作台、生物安全柜等。若在敞开的空间进行核酸提取或 PCR 加样,该空间应安装紫外灯或配备具有等同降解核酸功能的设备如移动紫外灯、带紫外消毒功能的空气消毒净化器等。上述区域在每次使用后应及时清洁处理,并在使用前后照射紫外 30 min 以上。每个区域应有专门的废弃物容器,该容器应能耐受煮沸、10%次氯酸钠溶液消毒处理。每次实验结束,应在紫外消毒前,及时清理废弃物及消毒容器,并将该废弃物容器放回工作区进行紫外消毒。
- B.5** PCR 反应液等试剂应按检测需求分装贮存,避免同一管试剂多次开启使用。
- B.6** 装有核酸模板、样品或试剂的离心管在打开之前,应短暂离心,避免离心管用力崩开,所有操作尽量避免产生气溶胶。
- B.7** 上机运行前,应检查并盖紧各 PCR 管,以防荧光物质或模板泄漏而污染机器。
- B.8** 应遵循基因检测实验室其他技术要求。
-