

DB33

浙江省地方标准

DB33/T 2246—2020

猪流行性乙型脑炎病毒荧光定量 RT —PCR 检测方法

Real-time PCR detection technique for Japanese encephalitis virus

2020 - 03 - 03 发布

2020 - 04 - 03 实施

浙江省市场监督管理局 发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009的规定编写。

本标准由浙江省农业农村厅提出。

本标准由浙江省畜牧兽医和饲料标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：浙江省动物疫病预防控制中心。

本标准主要起草人：谢荣辉、张传亮、吴赞竑、徐辉、刘霞、周蕾、柴娟、虞一聪、王雅婷、周彩琴、赵灵燕、刘爱军、吴雪军。

猪流行性乙型脑炎病毒荧光定量 RT—PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了猪流行性乙型脑炎病毒（Japanese encephalitis virus, JEV）荧光定量RT—PCR检测的实验条件、操作步骤和结果判定等要求。

本标准适用于猪流行性乙型脑炎病毒核酸的检测。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

猪流行性乙型脑炎

由猪流行性乙型脑炎病毒引起的一种急性传染病。猪的主要临床症状表现为高热、流产、死胎和公猪睾丸炎。

3 实验条件

3.1 仪器

- 3.1.1 高速冷冻离心机。
- 3.1.2 荧光定量 PCR 仪。
- 3.1.3 生物安全柜。
- 3.1.4 组织研磨仪。
- 3.1.5 微量移液器。
- 3.1.6 冰箱。
- 3.1.7 涡旋混匀器。
- 3.1.8 高压灭菌器。

3.2 试剂

除特别说明外，本标准所用试剂均为分析纯，所有试剂均用无RNA酶污染的容器分装。

- 3.2.1 Trizol：核糖核酸（Ribonucleic acid, RNA）提取试剂。
- 3.2.2 氯仿：4℃预冷。
- 3.2.3 异丙醇：4℃预冷。
- 3.2.4 焦炭酸二乙酯（Diethylpyrocarbonate, DEPC）水：取 DEPC 100 μL，加超纯水至 100 mL，室温过夜，121℃高压灭菌 15 min，分装，冻存备用。
- 3.2.5 75%乙醇：用 75 mL 无水乙醇，加 DEPC 水至 100 mL，混匀，-20℃预冷。

3.2.6 商品化的一步法实时荧光 RT-PCR 反应试剂:One Step Prime Script™ RT-PCR Kit(Perfect Real Time, TAKARA), 含有 2×One Step RT-PCR Buffer III、Ex Taq HS (5 U/ μL)、PrimeScript RT Enzyme Mix II 和无 RNA 酶的水。

3.2.7 0.01mol/L PH7.4 磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffered saline, PBS): 取 Na₂HPO₄·12H₂O 2.9g, KCl 0.2g, KH₂PO₄ 0.2g, NaCl 8g, 溶于 800 mL 去离子水中, 充分搅拌溶解, 滴加浓盐酸将 pH 调节至 7.4, 然后加去离子水定容至 1 L, 高温灭菌 30 min, 室温保存。

3.2.8 引物和探针, 其序列如下: 上游引物: 5—GGCTCTTATCACGTTCTTCAAGTTT—3, 下游引物: 5—TGCTTCCATCGGCCYAAAA—3, 探针: 5—FAM—AGCATTAGCCCCGACCAAGGCG—TAMRA—3。

3.2.9 阳性对照: 猪乙型脑炎活疫苗 (SA14-14-2 株)。

4 操作步骤

4.1 样品采集

4.1.1 脑组织: 选择代表性病症的病死猪, 应无菌采集脑组织, 将采集到的脑组织装入到无菌离心管中并编号, 冷藏送检或-20 °C 以下保存备用。

4.1.2 全血: 用无菌注射器耳静脉采集猪血, 将采集到的猪血装入到无菌离心管中并编号, 冷藏送检。若不能及时送检的全血, 应分离血清置于-20 °C 以下保存备用。

4.2 样品处理

4.2.1 取待检脑组织适量装入到无菌离心管中, 按 1: 10 体积加入 PBS, 置于组织研磨仪中充分研磨。将研磨后的样品, 反复冻融 3 次, 10000 r/min 离心 5 min, 取上清液至无菌离心管中, 编号待检。

4.2.2 取全血 3500 r/min 离心 5 min, 取血清至无菌离心管中, 编号待检。

4.3 RNA 提取

4.3.1 按下列步骤完成 RNA 提取, 也可采用商品化的病毒 RNA 提取试剂盒。

4.3.2 取 n 个灭菌的 1.5mL 离心管, 其中 n 为被检样品、阳性对照与阴性对照的和, 对每个离心管进行编号。

4.3.3 每管加入 750 μL Trizol, 分别加入被检样品、阳性对照和阴性对照各 250ul, 震荡数次, 静置 5 min。再加入 200 μL 预冷的氯仿, 震荡混匀, 静置 5 min, 于 4 °C 12 000 r/min 离心 15 min。

4.3.4 取与本标准 5.3.2 中相同数量的灭菌 1.5ml 离心管, 并对每个离心管进行编号。取本标准 5.3.3 中离心后的上清液 (注意不吸出中间层) 转移至相应的管中, 加入等体积异丙醇, 混匀, -20 °C 静置 30 min。

4.3.5 于 4 °C 12 000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 缓缓加入 1 mL 75%乙醇, 颠倒洗涤沉淀及管壁。于 4 °C 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 室温条件下干燥后, 加入 30 μL DEPC 处理水, 轻轻混匀, 溶解管壁上的 RNA, 以 4 000 r/min 离心 10 s, 冰上保存备用。提取的 RNA 应在 2 h 内进行荧光 RT-PCR 扩增, 若需长期保存, 需置于-70 °C 冰箱保存。

4.4 荧光定量 RT-PCR 反应

4.4.1 反应体系组成

设立阳性对照、阴性对照, 反应体系 (20 μL) 由表1中物质组成。

表1 反应体系配制表

试剂	用量 / μL
2×One Step RT-PCR Buffer III	10
Ex Taq HS (5 U/ μL)	0.4
PrimeScript RT Enzyme Mix II	0.4
上游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.4
下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.4
探针 (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.4
样品RNA	4
RNase Free dH ₂ O	4
总 量	20

4.4.2 反应条件

反转录：42 °C 15 min；预变性：94 °C 2 min；扩增：94 °C 10 s，60 °C 40 s，45个循环，60 °C时设置采集荧光。

4.4.3 荧光素的设定

Report Dye 设定为FAM，Quencher Dye设定为none。

5 结果判定

5.1 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。

5.2 质控标准

阳性对照的Ct值应≤30并出现典型的扩增曲线，阴性对照无Ct值且无典型扩增曲线，二者同时成立可判定试验成立，否则试验无效。

5.3 结果描述及判定

5.3.1 阴性判定

无Ct值，且无典型扩增曲线，判为阴性。

5.3.2 阳性判定

Ct值≤35，且出现典型扩增曲线，判为阳性。

5.3.3 可疑判定

Ct值>35，且出现典型扩增曲线的样品，需重复检测；重复检测结果Ct值≤38且出现典型扩增曲线的判为样品阳性，否则判为阴性。