



中华人民共和国国家标准

GB/T 36789—2018

动物狂犬病病毒核酸检测方法

Nucleic acid detection of animal rabies 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。

本标准主要起草人:冯焘、郭焕成、许运斌、江禹、涂长春。

引 言

本文件的发布机构提请注意,声明符合本文件时,可能涉及 4.4 与套式 RT-PCR 检测方法相关的专利的使用。

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构保证,他愿意同任何申请人在合理且无歧视的条款和条件下,就专利授权许可进行谈判。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得:

专利持有人姓名:江禹、涂长春

地址:吉林省长春市净月经济开发区柳莺西路 666 号军事医学科学院军事兽医研究所

请注意除上述专利外,本文件的某些内容仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。



动物狂犬病病毒核酸检测方法

1 范围

本标准规定了检测动物狂犬病病毒核酸的套式 RT-PCR 和荧光定量 RT-PCR 方法。

本标准适用于临床疑似狂犬病病毒感染动物脑组织、脊髓、脑脊液、唾液腺、唾液以及狂犬病病毒细胞培养物中病毒核酸的检测(参见附录 A)。

2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

RT-PCR:反转录-聚合酶链式反应(Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction)

DNA:脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic Acid)

RNA:核糖核酸(Ribonucleic Acid)

DEPC:焦炭酸乙二酯(Diethylpyocarbonate)

PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffer Solution)

Ct 值:达到阈值的循环数(Cycle Threshold)

EDTA:乙二胺四乙酸(Ethylene Diaminetetraacetic Acid)

dNTP:三磷酸脱氧核糖核苷(Deoxy-Ribonucleoside Triphosphate)

Taq 酶:耐热 DNA 聚合酶(Thermus Aquaticus Polymerase)

3 器材和试剂

3.1 器材

3.1.1 仪器

II 级生物安全柜、4 ℃离心机、冰箱(-20 ℃)、冰柜(4 ℃)、分析天平、PCR 扩增仪、荧光定量 PCR 扩增仪、电泳仪、电泳槽、紫外凝胶成像仪(或紫外分析仪)、微波炉、震荡混匀器、组织研磨器、单道可调移液器(10 μL、200 μL、1 000 μL)。

3.1.2 耗材

手术剪、医用镊子、称量纸、棉签、琼脂糖、量筒(500 mL)、锥形瓶(500 mL)、一次性无 RNase 枪头(10 μL、200 μL、1 000 μL)、无 RNase 离心管(1.5 mL)、与荧光定量 PCR 扩增仪配套的 PCR 管(0.2 mL)、组织研磨棒。

3.2 试剂

3.2.1 总 RNA 提取试剂。

3.2.2 磷酸盐缓冲液(1 mol/L PBS, pH 7.4)。配制方法见附录 B。

3.2.3 TAE 电泳缓冲液。配制方法见附录 B。

3.2.4 其他试剂:200 IU/μL 反转录酶、10×反转录酶缓冲液、40 U/μL RNA 酶抑制剂、5 IU *Taq* 酶、

10×Taq 缓冲液(含 Mg^{2+})、2.5 mmol/L dNTPs、50 μmol/L 寡聚脱氧胸苷酸引物[Oligo (dT)₁₅ Primer]、50 μmol/L 随机引物、25 mmol/L 氯化镁($MgCl_2$)、10 % 聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)、核酸染料、上样缓冲液、三氯甲烷、异丙醇、75 % 乙醇、双蒸水、DEPC 水。

3.2.5 引物及探针序列,见附录 C。

4 方法

4.1 样品的采集、保存和运送

4.1.1 对可疑为狂犬病而扑杀或死亡的动物,应在死亡后尽早无菌采集脑组织,放入灭菌容器内;对待活检动物,采集脑脊液和唾液拭子。生物安全要求见附录 D。

4.1.2 将待检样品置于 2 °C~8 °C 的运输箱内运输;如不能立即运输,可置于样品保存管内,-20 °C 以下保存,保存期间避免反复冻融。样品置于-70 °C 以下可长期保存。

4.1.3 新鲜冷藏或冰冻样品均应尽快运送至检测地点。

4.2 样品处理

4.2.1 脑组织、脊髓和唾液腺

称取 0.1 g 待检动物脑组织、脊髓或唾液腺样品,置于离心管中。加入 400 μL 1×PBS 充分研磨。脑组织研磨液经 4 °C 3 000 r/min 离心 10 min。取 100 μL 上清放到 1.5 mL 离心管中,待检。

4.2.2 唾液拭子样品

将唾液拭子棉签倒置于离心管中,4 °C 3 000 r/min 离心 10 min。取上清 200 μL,置 1.5 mL 离心管中,待检。

4.2.3 脑脊液或细胞培养物样品

取脑脊液样品或细胞培养物 200 μL,置 1.5 mL 离心管中,待检。

4.3 核酸提取

4.3.1 提取样品总 RNA,可采用本标准推荐方法,或选择商业试剂盒,按照试剂盒说明进行。

4.3.2 取 100 μL 脑组织、脊髓或唾液腺样品悬液上清加入 900 μL 裂解液,或 200 μL 脑脊液、唾液样品、细胞培养物加入 800 μL 裂解液,剧烈振荡 30 s,静置 5 min。

4.3.3 每个样品管中加 200 μL 三氯甲烷,振荡 20 s,4 °C 12 000 r/min 离心 10 min。

4.3.4 转移 4.3.3 中的 600 μL 上清液至新离心管,加等体积的异丙醇,混匀后 4 °C 静置 10 min,4 °C 10 000 r/min 离心 10 min。

4.3.5 弃上清液,沉淀中加 1 mL 75%乙醇,4 °C 12 000 r/min 离心 10 min,弃上清,留沉淀,将离心管倒置于吸水纸上干燥。

4.3.6 将离心管中 RNA 沉淀用 10 μL DEPC 水充分溶解。

4.4 套式 RT-PCR 检测方法

4.4.1 对照设立

设置要求:从样品处置开始应设置阳性对照、阴性对照。

阳性对照:取已知阳性的同类样品作为阳性对照。也可以将适量灭活的狂犬病病毒添加到已知阴

性样品中作为阳性对照。

阴性对照:取已知阴性的同类样品作为阴性对照。

采用 4.3 的方法提取阳性对照和阳性对照的 RNA。

4.4.2 反转录

反应体系:以 Oligo(dT)₁₅ Primer、随机引物为引物,建立 20 μL 反转录体系。

| | |
|---|--------|
| 2.5 mmol/L dNTPs | 4.0 μL |
| 随机引物(50 μmol/L) | 1.5 μL |
| Oligo(dT) ₁₅ Primer(50 μmol/L) | 0.5 μL |
| 10×反转录缓冲液 | 4.0 μL |
| 反转录酶 | 1.0 μL |
| RNA 酶抑制剂 | 1.0 μL |
| RNA | 8.0 μL |

反应条件:42 °C 孵育 1.5 h 后,95 °C 反应 5 min,产物为 cDNA。

4.4.3 外套 PCR 反应体系

反应体系:

| | |
|---------------------------------|---------|
| 双蒸水 | 39.7 μL |
| 10×Taq 缓冲液(含 Mg ²⁺) | 5.0 μL |
| 外套上游引物 | 1.0 μL |
| 外套下游引物 | 1.0 μL |
| dNTPs | 1.0 μL |
| Taq 酶(5 U/μL) | 0.3 μL |
| 4.4.2 的反应产物 cDNA | 2.0 μL |

反应条件:94 °C,2 min 后;94 °C 30 s→56 °C 30 s→72 °C 40 s 进行 35 个循环;72 °C,10 min;产物保存于 4 °C 产物为外套 PCR 反应产物。

4.4.4 内套 PCR 反应体系

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,每个样品建立 50 μL 内套 PCR 反应体系,组成如下:

| | |
|---------------------------------|---------|
| 双蒸水 | 39.7 μL |
| 10×Taq 缓冲液(含 Mg ²⁺) | 5.0 μL |
| 内套上游引物 | 1.0 μL |
| 内套下游引物 | 1.0 μL |
| dNTPs | 1.0 μL |
| Taq 酶(5 U/μL) | 0.3 μL |
| 外套反应产物 | 2.0 μL |

反应条件:94 °C,2 min 后;94 °C 30 s→56 °C 30 s→72 °C 40 s 进行 35 个循环;72 °C,10 min;产物为外套 PCR 反应产物,保存于 4 °C。

4.4.5 电泳

配制适量的电泳及制胶用的缓冲液和 1% 琼脂糖凝胶(见附录 B)。将琼脂糖溶液倒入制胶模中,然后在适当位置处插上梳子。凝胶厚度一般在 3 mm~5 mm 之间。取 PCR 产物与上样缓冲液混匀,

用移液枪将其加入加样孔中。接通电源,以 120 V 电压进行电泳,20 min 后停止电泳。用凝胶成像仪观察并保存结果。

4.4.6 实验成立的条件

阳性对照样品的外套 PCR 产物出现 845 bp 扩增带、内套 PCR 产物出现 371 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。

4.4.7 结果判定

被检样品的外套 PCR 产物出现 845 bp 扩增条带,内套 PCR 产物出现 371 bp 特异性条带,或仅内套 PCR 产物出现 371 bp 特异性条带时,均判定样品为狂犬病病毒检测阳性,否则为阴性。

4.5 荧光定量 RT-PCR 检测方法

4.5.1 对照设立

设置要求:从样品处置开始应设置阳性对照、阴性对照。

阳性对照:取已知阳性的同类样品作为阳性对照。也可以将适量灭活的狂犬病病毒添加到已知阴性样品中作为阳性对照。

阴性对照:取已知阴性的同类样品作为阴性对照。

采用 4.3 的方法提取阳性对照和阴性对照的 RNA。

4.5.2 荧光定量 RT-PCR 反应体系建立

每个样品建立 50 μL 荧光定量 RT-PCR 体系,组成如下:

| | |
|----------------------------|---------------------|
| DEPC 水 | 16.15 μL |
| dNTPs | 0.5 μL |
| 10 \times <i>Taq</i> 缓冲液 | 5 μL |
| MgCl ₂ | 12 μL |
| 10% Triton X-100 | 1 μL |
| RNA 酶抑制剂 | 0.25 μL |
| <i>Taq</i> 酶 | 0.5 μL |
| 反转录酶 | 0.6 μL |
| 上游引物工作液 | 2 μL |
| 下游引物工作液 | 1 μL |
| 探针工作液 | 1 μL |
| 总 RNA | 10 μL |

4.5.3 荧光定量 RT-PCR 扩增

42 $^{\circ}\text{C}$ 30 min;92 $^{\circ}\text{C}$ 3 min;92 $^{\circ}\text{C}$ 30 s \rightarrow 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s \rightarrow 72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s 进行 45 个循环;设置 72 $^{\circ}\text{C}$ 时收集荧光。

4.5.4 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最高点为准。

4.5.5 实验成立的条件

阴性对照无 Ct 值,且无典型扩增曲线。阳性对照 Ct 值 < 26 ,且出现典型扩增曲线。实验结果有效。

4.5.6 结果描述及判定

阴性:无 Ct 值,且无典型扩增曲线,判定样品中无 RABV。

阳性:Ct 值 ≤ 32 ,且出现典型扩增曲线,判定样品中存在 RABV。

可疑:Ct 值 > 32 ,且出现典型扩增曲线,判定为可疑,需对样本重新检测。重检结果出现 Ct 值和典型扩增曲线者判为阳性,否则判为阴性。



附 录 A
(资料性附录)
狂犬病与狂犬病毒属

狂犬病是由狂犬病毒属(Lyssavirus genus)成员引起的一种具有高度嗜神经性的烈性传染病。2012年国际病毒分类委员会(ICTV)第十次会议将狂犬病病毒界定为单股负链RNA病毒目(Mononegavirales)弹状病毒科(Rhabdoviridae)狂犬病毒属成员。该属目前包括了12个已定种和2个暂定种,分别为狂犬病病毒(Rabies virus, RABV)、拉各斯蝙蝠病毒(Lagos bat virus, LBV)、蒙哥拉病毒(Mokola virus, MOKV)、杜文哈根病毒(Duvenhage virus, DUVV)、欧洲蝙蝠狂犬病毒1型(European bat lyssavirus 1, EBLV-1)、欧洲蝙蝠狂犬病毒2型(European bat lyssavirus 2, EBLV-2)、澳大利亚蝙蝠病毒(Australian bat lyssavirus, ABLV)、阿拉万病毒(Aravan virus, ARAV)、北塔吉克斯坦病毒(Khujand virus, KHUV)、伊尔库特病毒(Irkut virus, IRKV)、西高加索蝙蝠病毒(West Caucasian bat virus, WCBV)、希莫尼蝙蝠病毒(Shimoni bat virus, SHIBV)、博克罗蝙蝠狂犬病病毒(Bokeloh bat lyssavirus, BBLV)、生驹狂犬病毒(Ikoma lyssavirus, IKOV)。除RABV外,其他成员统称为狂犬病相关病毒(RRV)。RABV作为狂犬病毒属最重要的成员,分布最广,全世界99%以上的人和家养动物狂犬病是由RABV引起的,其他国家偶尔有狂犬病毒属其他成员引发的狂犬病报道。在我国目前所有人和陆生动物狂犬病疫情均是由RABV感染引发的。

世界动物卫生组织(OIE)《陆生动物诊断实验和疫苗手册》明确指出,核酸检测技术是快速、敏感的狂犬病诊断方法,可用于临床样品诊断和狂犬病毒属初步分型。本标准按照OIE要求,根据我国狂犬病病毒流行株的特点制定,不仅适用于动物脑组织的检测,而且与荧光抗体实验(FAT)方法相比,更适用于脑脊液、唾液以及腐败样品的检测。需要指出的是,套式RT-PCR和荧光定量RT-PCR方法均可以准确地检测出狂犬病病毒(RABV)。此外,套式RT-PCR方法还可用于检测狂犬病相关病毒,有关实验室可根据实际仪器设备条件进行选择。



附 录 B
(规范性附录)
溶液的制备

B.1 磷酸盐缓冲液(1 mol/L PBS、pH7.4)的制备**B.1.1 成分**

| | |
|---|--------|
| 磷酸二氢钠 | 1 g |
| 氯化钾 | 1 g |
| 氯化钠 | 42.5 g |
| 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) | 14.5 g |

B.1.2 配制方法

将 B.1.1 试剂溶于 5 000 mL 灭菌双蒸水中。

B.1.3 使用

使用时(121 ± 2) °C 高压灭菌 20 min, 4 °C 保存备用。

B.2 TAE 电泳缓冲液的制备**B.2.1 乙二胺四乙酸二钠(EDTA)溶液(0.5 mol/L、pH8.0)****B.2.1.1 成分**

| | |
|------------|---------|
| 二水乙二胺四乙酸二钠 | 18.61 g |
| 氢氧化钠 | 2 g |

B.2.1.2 配制方法

将二水乙二胺四乙酸二钠加入到 80 mL 灭菌双蒸水中,用氢氧化钠(约 2 g)调 pH 至 8.0,二水乙二胺四乙酸二钠全部溶解后,加灭菌双蒸水至 100 mL。

B.3 TAE 电泳缓冲液(50 倍)配制**B.3.1 成分**

| | |
|-----------------------------|---------|
| 羟基甲基氨基甲烷(Tris) | 242 g |
| 冰乙酸 | 57.1 mL |
| 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液(pH8.0) | 100 mL |

B.3.2 配制方法

将羟基甲基氨基甲烷(Tris)加入 57.1 mL 冰乙酸和 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液(pH8.0) 100 mL,加灭菌双蒸水至 1 000 mL。

B.4 TAE 电泳缓冲液(工作液)配制

B.4.1 成分

| | |
|--------------|-------|
| 50×TAE 电泳缓冲液 | 20 mL |
|--------------|-------|

B.4.2 配制方法

将 50×TAE 电泳缓冲液 20 mL 加灭菌双蒸水至 1 000 mL。

B.5 1%琼脂糖凝胶的配制

B.5.1 成分

| | |
|-----------------|-----------|
| 琼脂糖 | 1 g |
| TAE 电泳缓冲液(50 倍) | 2 mL |
| 核酸染料 | 5 μ L |

B.5.2 配制方法

将琼脂糖和 TAE 电泳缓冲液(50 倍)加入 98 mL 灭菌双蒸水,放入微波炉中加热至完全融化后,滴加 5 μ L 核酸染料。

附 录 C
(规范性附录)
引物及探针

表 C.1 和表 C.2 给出了套式 RT-PCR 引物信息和荧光定量 RT-PCR 引物及探针信息。

表 C.1 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'-ATGTAACNCCTCTACAATGG-3' | 371 bp |
| 外套下游引物 | 5'-GCCCTGGTTCGAACATTCT-3' | |
| 内套上游引物 | 5'-ACAATGGAKKCTGACAARATTG-3' | 845 bp |
| 内套下游引物 | 5'-CCTGYWYWGAGCCAGTTVCCYTC-3' | |
| 注 1: R (AG), Y (CT)。 | | |
| 注 2: 引物使用时用 DEPC 水稀释 20 μmol/L, 于 -20 °C 保存。 | | |

表 C.2 荧光定量 RT-PCR 引物及探针信息

| 引物及探针名称 | 引物及探针序列(5'-3') | 扩增片段长度 |
|--|---|--------|
| 上游引物工作液 | ATGTAACACCYCTACAATG | 92 bp |
| 下游引物工作液 | GCAGGGTAYTTRTACTCATA | |
| 探针 | FAM-ACAAGATTGTATTCAAAGTCAATAATCAG-TAMRA | |
| 注 1: R (AG), Y (CT)。 | | |
| 注 2: 两引物扩增片段长度为 111 bp, Taqman 探针 5'端标记荧光报告基团 FAM(6-羧基荧光素), 3'端标记荧光淬灭基团为 TAMRA(6-羧基-4-甲基罗丹明)。引物和探针使用时以 DEPC 水分别稀释 20 μmol/L 和 5 μmol/L, 于 -20 °C 保存。 | | |



附 录 D
(规范性附录)
生物安全

D.1 生物安全措施

D.1.1 狂犬病病毒属于高危险病原,为了确保狂犬病检测实验室的生物安全,实验室具有严格的安全管理规定,工作人员应经过生物安全培训,皮肤裸露或有开放性伤口时,不能进行本实验。

D.1.2 所有涉及狂犬病检测的人员应进行暴露前免疫和血清抗狂犬病毒中和抗体水平的检测,以确保抗体水平达到保护,未经免疫的人员不得进入狂犬病研究、检测实验室。

D.1.3 样品的处理应在生物安全Ⅱ级(BSL-2级)或以上的实验室进行。严格操作疑似感染狂犬病病毒脑组织时的个人防护措施:操作样品时应穿防护服,带一次性乳胶手套和口罩,在生物安全柜内操作。本实验涉及载玻片等玻璃器材,要防止玻片破碎划伤。

D.1.4 实验室中所有的废弃物、沾染的器皿,包括检测的组织样品、解剖器械、实验器皿等,均应严格消毒处理后才能够丢弃,消毒可采用焚烧、5%氢氧化钠浸泡或121℃高压30min的方法。

D.1.5 RT-PCR实验室按照工作流程分为配液区、模板提取区、扩增区和电泳区。各区器材试剂专用,不可跨区流动使用,防止污染。实验结束后立即用75%乙醇或紫外灯对工作环境消毒处理。

D.1.6 提取RNA时,推荐使用免处理的无RNase和DNase一次性耗材。须戴口罩、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75%乙醇清洁实验工作台、移液器等实验器材。

D.2 急救措施

D.2.1 如果在狂犬病病毒生物安全实验室内出现伤口暴露,应立即用大量肥皂水冲洗创面,补充注射狂犬病疫苗1剂,创伤严重时应立即就医。

D.2.2 如果因操作感染物而造成暴露,应立即按Ⅲ级暴露处理原则进行暴露后处理。
