



中华人民共和国国家标准

GB/T 27528—2011

口蹄疫病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

Real-time RT-PCR for detection of foot and mouth disease virus

2011-11-21 发布

2012-03-01 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

本标准的附录 A、附录 B 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

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:中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院、北京盈九思科技发展有限公司。

本标准主要起草人:秦智锋、林祥梅、吴绍强、花群义、卢体康、刘建、陈书琨、吕建强、曾少灵、詹爱军、韩雪清、孙洁、曹琛福、贾广乐、高小博、陈兵、阮周曦、梅琳、张彩虹、陶虹。



口蹄疫病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了口蹄疫病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法。
本标准适用于口蹄疫病毒的检测与鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 18088 出入境动物检疫采样

GB/T 18935 口蹄疫诊断技术

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

3 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

Ct 值:循环阈值(cycle threshold)。

4 试剂耗材和仪器设备

4.1 试剂耗材

4.1.1 除非另有说明,在检测中使用的试剂均为分析纯,实验室用水应符合 GB/T 6682 的要求。

4.1.2 口蹄疫病毒实时荧光 RT-PCR 试剂:−20℃ 保存,见附录 A。

4.1.3 引物和探针序列

上游引物(FMDV-F)序列为:5' ACTGGGTTTTACAAACCTGTGA 3'。

下游引物(FMDV-R)序列为:5' GCGAGTCCTGCCACGGA 3'。

TaqMan 探针(FMDV-Pb)序列为:5' TCCTTTGCACGCCGTGGGAC 3',其 5' 端和 3' 端分别标记 FAM 和 BHQ。

4.1.4 DEPC 处理水:见附录 B。推荐购买商品化 DEPC 处理的无 DNA 酶和 RNA 酶的水。

4.1.5 氯仿:分析纯,常温保存。

4.1.6 异丙醇:分析纯,使用前预冷至−20℃。

4.1.7 75%乙醇:用 DEPC 水和无水乙醇配制,使用前预冷至−20℃。

4.1.8 石英砂:市售化学纯,121℃,15 min 高压灭菌后备用。

4.1.9 0.01 mol/L PBS,pH7.6~7.8;见附录 B。

4.1.10 阳性对照为灭活疫苗毒或组织培养灭活毒,−20℃ 保存备用。阴性对照样品可采用健康的猪或牛的组织材料。

4.2 主要仪器设备

4.2.1 荧光 PCR 检测仪。

4.2.2 高速台式冷冻离心机:可控温至 4℃,离心速度可达 12 000g 以上。

4.2.3 生物安全柜。

5 采样和样品前处理

5.1 样品采集、保存及运输

按照 GB/T 18088 和 GB/T 18935 的要求进行。

5.2 样品制备

5.2.1 样品的制备应符合 GB 19489 规定。

5.2.2 用无菌的手术刀采取动物机体组织(如舌、鼻、蹄水泡皮)0.2 g~1.0 g 置研钵中,加入等量灭菌石英砂充分研磨。其他机体组织(如淋巴结、扁桃体、肌肉等)除去包膜和其他结缔组织,选取内部实质部分,置研钵中,加入石英砂充分研磨。然后按照 1:5 比例加入 0.01 mol/L PBS(pH7.6~7.8),4 °C 浸泡过夜或者-20 °C 反复冻融 2 次,每次 30 min。然后 4 °C 8 000g 离心 5 min。

5.2.3 液体样品如水泡液或者食道咽部黏液(O-P 液)不必经过研磨或者冻融处理,直接进行下一步。

6 核酸提取

6.1 核酸提取要求

核酸提取应按照 SN/T 1193 进行。

6.2 传统酚氯仿法抽提核酸

6.2.1 取灭菌的 1.5 mL 离心管,做好标识。

6.2.2 每管加入 600 μ L 裂解液,分别加入被检样本、阴性对照、阳性对照各 200 μ L,再加入 200 μ L 氯仿,混匀器上振荡混匀 5 s,于 4 °C 12 000g 离心 15 min。

6.2.3 取灭菌的 1.5 mL 离心管,加入-20 °C 预冷 400 μ L 异丙醇,吸取本标准 6.2 各管中的上清液转移至相应的管中,避免吸出中间层,颠倒混匀。

6.2.4 于 4 °C 12 000g 离心 15 min,弃上清,倒置于吸水纸上,沾干液体;加入 600 μ L 75% 预冷乙醇,颠倒洗涤。

6.2.5 于 4 °C 12 000g 离心 10 min,弃上清,倒置于吸水纸上,沾干液体。

6.2.6 10 000g 离心 10 s,用微量加样器将其吸干,室温干燥 5 min~10 min

6.2.7 加入 15 μ L DEPC 水,溶解管底的 RNA,5 000g 离心 5 s,冰上保存备用,若需长期保存应放置-70 °C 冰箱。

6.3 核酸提取等效方法

口蹄疫病毒核酸提取也可以采用等效 RNA 提取试剂及方法;如采用自动化核酸抽提仪和配套核酸抽提试剂进行核酸抽提。

7 实时荧光 RT-PCR 检测

7.1 反应液的配制

配制每个 PCR 反应混合液:实时荧光 RT-PCR 反应液 14.5 μ L, Taq 酶 0.25 μ L,反转录酶 0.25 μ L。

将以上 PCR 反应试剂按使用量吸取到一个离心管中,充分混匀,然后在每个 PCR 管中分装 15 μ L,转移至样本处理区。

7.2 加样

在已分装有 PCR 反应混合液的 PCR 管中分别加入已提取好的核酸 10 μ L,盖上管盖,将 PCR 管放入荧光 PCR 检测仪内,记录样本放置顺序。

7.3 PCR 扩增检测

7.3.1 反应条件设定

第一步:42 °C 30 min,95 °C 5 min。

第二步:95 °C 10 s,55 °C 1 min,72 °C 30 s,5 个循环。

第三步:95 °C 5 s,60 °C 30 s,40 个循环,60 °C 时设置采集荧光。

7.3.2 荧光素设定

Report Dye 设定为 FAM,Quench Dye 都设定为 BHQ,Reference dye 设定为 None。

8 结果判定

8.1 判定前的设置

综合分析仪器给出的各项结果,基线以仪器给出的默认值作为参考,阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品扩增曲线的最高点为准,具体根据仪器噪声情况进行调整,选择 FAM 通道进行分析。

8.2 试验成立判定

选用 FAM 通道进行分析,阳性对照样品有对数扩增曲线,而且 Ct 值 ≤ 30 ,阴性对照没有对数扩增曲线,而且 Ct 值为无,二者均成立才可判定试验成立,否则试验无效。

8.3 阳性判定

Ct 值 ≤ 30 的样本为阳性,表明口蹄疫病毒核酸阳性。

8.4 阴性判定

Ct 值显示为无的样本为阴性样本,表明口蹄疫病毒核酸阴性。

8.5 可疑判定

如果 $30 < \text{Ct 值} \leq 40$,判为可疑。此时重复扩增检测,如果重复扩增曲线为对数扩增曲线且 Ct ≤ 40 ,判为样本阳性,表明口蹄疫病毒核酸阳性;否则判为样本阴性。

附 录 A
(规范性附录)

实时荧光 RT-PCR 反应液及裂解液组成

A.1 实时荧光 RT-PCR 反应液组成

实时荧光 RT-PCR 反应液(1×):含 50 mmol/L KCl,10 mmol/L Tris-HCl(pH8.3),2.5 mmol/L MgCl₂,0.2 mmol/L dNTP mix,上、下游引物各 200 nmol/L,探针 100 nmol/L,1U Taq 酶,100U 逆转录酶,2m mol/L DTT,5%甘油。

A.2 裂解液组成

裂解液主要成分为异硫氰酸胍和酚,为 RNA 提取试剂,于 4℃ 保存。

附 录 B
(规范性附录)
溶液的配制

B.1 DEPC 水

每升三蒸水中加入 1 mL DEPC,用力摇匀,使 DEPC 充分混匀在水中,37 °C 放置 12 h 以上,再经 121 °C 15 min 高压灭菌备用。

**B.2 0.01 mol/L PBS(pH7.6~7.8)**

磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	3.0 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.2 g
氯化钾(KCl)	0.2 g
氯化钠(NaCl)	8 g

加三蒸去离子水定容至 1 000 mL,完全溶解后用 3 mol/L 的 NaOH 调 pH 为 7.6~7.8。经 121 °C,15 min 高压灭菌,室温保存。
