



中华人民共和国国家标准

GB/T 36871—2018

猪传染性胃肠炎病毒、猪流行性腹泻病毒和 猪轮状病毒多重 RT-PCR 检测方法

Multiplex RT-PCR to detect porcine transmissible gastroenteritis virus,
porcine epidemic diarrhea virus and porcine rotavirus

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:华中农业大学、中国动物卫生与流行病学中心。

本标准主要起草人:何启盖、库旭钢、张坤、陈芳洲、范盛先、孟宪荣、陈品、姜雯、陈焕春。

猪传染性胃肠炎病毒、猪流行性腹泻病毒和猪轮状病毒多重 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了猪传染性胃肠炎病毒(porcine transmissible gastroenteritis virus, TGEV)、猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)和猪轮状病毒(porcine rotavirus, PoRV)的多重 RT-PCR 检测方法。

本标准适用于猪传染性胃肠炎病毒、猪流行性腹泻病毒和猪轮状病毒的核酸检测。

2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

TGEV:猪传染性胃肠炎病毒(porcine transmissible gastroenteritis virus)

PEDV:猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus)

PoRV:猪轮状病毒(porcine rotavirus)

RT-PCR:逆转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction)

PBS:磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline)

TAE:电泳缓冲液(tris-acetate-ethylene diamine tetraacetic acid buffer)

TCID₅₀:半数细胞感染量(median tissue culture infective dose)

RNA:核糖核酸(ribonucleic acid)

DEPC:焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate)

3 试剂和仪器设备

除另有规定外,所用试剂均为分析纯。提取 RNA 所用试剂应使用无 RNA 酶的容器分装。

3.1 仪器

3.1.1 生物安全柜。

3.1.2 高速冷冻离心机。

3.1.3 组织匀浆器或研钵。

3.1.4 PCR 仪。

3.1.5 水平电泳槽。

3.1.6 凝胶成像系统。

3.1.7 紫外透射仪。

3.1.8 2℃~8℃冰箱。

3.1.9 -20℃冰箱。

3.1.10 单道微量移液器(0.5 μL~10 μL、10 μL~50 μL、20 μL~200 μL、100 μL~1 000 μL 等规格)。

3.2 试剂

3.2.1 氯仿,常温保存。

- 3.2.2 PBS(见附录 A),常温保存。
- 3.2.3 $1\times$ TAE(见附录 A),常温保存。
- 3.2.4 Trizol,4℃~8℃保存。
- 3.2.5 异丙醇,4℃~8℃保存。
- 3.2.6 DNA 分子量标准,4℃~8℃保存。
- 3.2.7 DEPC 处理水(见附录 A),4℃~8℃保存。
- 3.2.8 阳性对照(PEDV、TGEV 和 PoRV 分别经 Vero 细胞、PK-15 细胞和 MA-104 细胞传代,病毒含量分别为 25 TCID₅₀/mL,50 TCID₅₀/mL,50 TCID₅₀/mL),-20℃保存。
- 3.2.9 阴性对照(Vero 细胞、PK-15 细胞和 MA-104 细胞悬液),-20℃保存。
- 3.2.10 RNA 反转试剂盒,-20℃保存。
- 3.2.11 多重 RT-PCR 方法中使用的各种引物对(见附录 B)。引物干粉及稀释引物保存于-20℃。

3.3 耗材

- 3.3.1 Eppendorf(EP)管。
- 3.3.2 PCR 管。
- 3.3.3 吸头。

3.4 实验室分区

检测实验室要有相应的生物安全设施和不同功能分区,如样品处理区、核酸提取区、核酸电泳区、结果观察区。各功能区要有专用的试剂和实验材料,不可交叉使用。

4 样品的采集、处理、存放及运输



4.1 样品采集和处理

4.1.1 生物安全及采样要求

4.1.1.1 生物安全要求

样品采集及处理过程中应带一次性手套、口罩、防护帽,个人防护参见 NY/T 541。

4.1.1.2 采样要求

应采集出现腹泻症状 12 h~24 h 内猪的粪便、肛门拭子样品或剖检猪的小肠;母猪可采集乳汁(初乳最佳)。采集母猪乳汁前要对乳房外表消毒;采集病变小肠时,先结扎拟采集肠道区域两端后,再剪取该组织(防止肠内容物流出),将其全部放入样品袋内。每个样品要单独采集和分装,避免交叉污染。样品避免接触甲醛或高温,以免降低检出率。

4.1.2 粪便样品

用洁净的药匙和其他物品,刮取适量新鲜粪便,放置于 EP 管或其他洁净容器中。

4.1.3 肛门拭子样品

4.1.3.1 采集方法

将灭菌的医用棉签插入肛门(以棉签棉花部分全部插入肛门为准),同一方向转动 3 次,确保充分获取粪便。

4.1.3.2 样品处理

将肛门拭子放在盛有 0.8 mL 灭菌 PBS 的无菌 EP 管中,涡旋或振荡 10 min,反复冻融 2 次,4 ℃ 条件下 $14\ 600\times g$ 离心 10 min,取上清转入新的 EP 管中,编号备用。

4.1.4 肠道样品

4.1.4.1 采集方法

选择充血、出血、肠壁变薄、含多量水样粪便等病变明显的小肠组织。提取模板前,用无菌剪刀剪取约 $0.5\text{ cm}\times 0.5\text{ cm}$,作为待检样品。

4.1.4.2 样品处理

加入 0.8 mL~1.0 mL 的 PBS 混匀,组织匀浆器或研钵中充分匀浆或研磨,将组织混悬液转入无菌 EP 管中,反复冻融 2 次,4 ℃ 条件下 $14\ 600\times g$ 离心 10 min,取上清转入新的无菌 EP 管中,编号备用。

4.1.5 母猪乳汁

4.1.5.1 采集方法

用无菌 EP 管收集母猪产后乳汁 2.0 mL~3.0 mL。

4.1.5.2 样品处理

将乳汁转移到无菌 EP 管中,反复冻融 2 次,4 ℃ 条件下 $14\ 600\times g$ 离心 10 min,取上清转入新的 EP 管中,编号备用。

4.2 存放与运输

采集的样品与冰块或干冰一起放入保温壶或保温箱,密封,在保温壶和保温箱外喷洒来苏尔或季铵盐类消毒液,尽快送到实验室检测。采集或处理的样品在 4 ℃~8 ℃ 条件下保存应不超过 24 h;若需长期保存,应放置于-80 ℃ 冰箱,避免反复冻融。

5 操作方法

5.1 样品 RNA 的制备(Trizol 法或 RNA 提取试剂盒)

5.1.1 取 1.5 mL 灭菌 EP 管,分别加入待检样品、阴性对照样品、阳性对照样品各 200 μL ,加入 1 mL Trizol 溶液,剧烈振荡,静置 5 min。

5.1.2 加入 200 μL 氯仿,振荡,冰上静置 7 min。

5.1.3 4 ℃ 下, $14\ 600\times g$ 离心 10 min,取上清 600 μL ,加入等体积异丙醇混匀后,冰上静置 10 min。4 ℃ 下, $14\ 600\times g$ 离心 7 min,弃上清,加入 800 μL 75% 的冷乙醇; $9\ 800\times g$ 离心 5 min。

5.1.4 弃上清,自然干燥 5 min,加入 20 μL DEPC 处理水溶解沉淀,即为 RNA 模板。

注:可使用商品化的 RNA 提取试剂盒,按其操作步骤提取 RNA。

5.2 反转录(cDNA 的合成)

配制反转录反应体系,每管加入 5.1.4 中制备的 RNA 模板 16 μL 和 4 μL 5 $\times$ RNA 反转录反应混合液(含 Buffer、dNTP、M-MLV、RNA 酶抑制剂、通用反转录引物等),37 ℃ 水浴 15 min 或置于 PCR 仪中 37 ℃ 15 min,反应结束后,经 85 ℃ 15 s 灭活反转录酶,即为 cDNA,直接用于 PCR 扩增或-20 ℃



冻存备用。

5.3 多重 PCR 扩增

PCR 扩增体系配制如下。引物工作浓度均为 $10\ \mu\text{mol/L}$ 。各种试剂添加完后充分混匀,瞬时离心,使反应液全部集中于管底。

试剂	体积(μL)
2×PCR 扩增 MIX	12.5
PEDV P1/P2	各 0.2
TGEV P3/P4	各 0.4
PoRV P5/P6	各 1.0
灭菌双蒸水	5.3
cDNA	4.0
共计	25.0

PCR 扩增条件: $94\ ^\circ\text{C}$ 预变性 5 min 后, $94\ ^\circ\text{C}$ 50 s, $55\ ^\circ\text{C}$ 1 min, $72\ ^\circ\text{C}$ 1 min, 35 个循环,最后 $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。扩增反应结束后取出产物置于 $4\ ^\circ\text{C}\sim 8\ ^\circ\text{C}$ 。

5.4 扩增产物的电泳检测

5.4.1 称取适量琼脂糖配置浓度为 1.5% 的琼脂糖溶液,充分溶化后按 1 : 10 000 加入溴化乙锭或新型核酸染料(溴化乙锭替代物),倒入胶槽制备凝胶板。

5.4.2 在电泳槽中加入 $1\times\text{TAE}$,使液面没过凝胶。取 $8\ \mu\text{L}$ 扩增产物加到各凝胶孔;取 $5\ \mu\text{L}$ DNA 分子量标准物(DL2000 Marker)加到另一凝胶孔中。

5.4.3 电泳,待染料移行到凝胶 4/5 距离,停止电泳。

5.4.4 将电泳好的凝胶放到紫外透射仪或凝胶成像系统上观察,判定结果并做好记录。

6 结果判定

6.1 试验成立条件

含 PEDV、TGEV 和 PoRV 阳性对照材料,PCR 扩增产物电泳后,同时出现大小约为 663 bp、528 bp 和 333 bp 的特异性条带,阴性对照材料无任何扩增产物(见图 C.1),则试验结果成立;缺少任何一条扩增产物或大小不符,则试验不成立。

6.2 结果判定

6.2.1 检测结果分类

在试验成立的前提下,被检样品中可出现 PEDV、TGEV 和 PoRV 等 3 种病原的三重感染、二重感染、单独感染(阳性)和均不感染(阴性)的结果。

6.2.2 阳性结果

6.2.2.1 三重感染

出现大小约为 663 bp、528 bp 和 333 bp 的 3 条特异性条带,判定为 PEDV、TGEV 和 PoRV 三重感染阳性(必要时基因测序,序列参见附录 D)。

6.2.2.2 二重感染

出现大小约为 663 bp 和 528 bp 的特异性条带,判定为 PEDV 和 TGEV 二重感染阳性;出现大小约为 663 bp 和 333 bp 的特异性条带,判定为 PEDV 和 PoRV 二重感染阳性;出现大小约为 528 bp 和 333 bp 特异性条带,判定为 TGEV 和 PoRV 二重感染阳性。

6.2.2.3 单独感染

仅出现大小约为 663 bp 或 528 bp 或 333 bp 的特异性条带,判定为 PEDV 或 TGEV 或 PoRV 单独感染阳性。

6.2.3 阴性结果

未出现大小约为 663 bp、528 bp 和 333 bp 的特异性条带,判定为 PEDV、TGEV 和 PoRV 均不感染(阴性)。

附 录 A
(规范性附录)
试验试剂和溶液的配制

A.1 0.01 mol/L(pH 7.2)PBS

NaCl	8.0 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	2.9 g
KCl	0.2 g

加蒸馏水至 1 000 mL,调 pH 值至 7.2~7.4,121 °C 高压灭菌 30 min,冷却后室温保存备用。

A.2 1×TAE

Tris 碱	24.2 g
冰乙酸	5.7 mL
0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)	10.0 mL

加蒸馏水至 100 mL,使用时用蒸馏水作 50 倍稀释,即为 1×TAE。

A.3 DEPC 处理水

用 0.1% DEPC 处理后的蒸馏水,经 121 °C 30 min 高压灭菌,或直接购买无 RNA 酶的无菌水。



附 录 B
(规范性附录)

猪传染性胃肠炎病毒、猪流行性腹泻病毒和猪轮状病毒多重 RT-PCR 引物序列

猪传染性胃肠炎病毒、猪流行性腹泻病毒和猪轮状病毒多重 RT-PCR 引物序列见表 B.1。

表 B.1 猪传染性胃肠炎病毒、猪流行性腹泻病毒和猪轮状病毒多重 RT-PCR 引物扩增序列

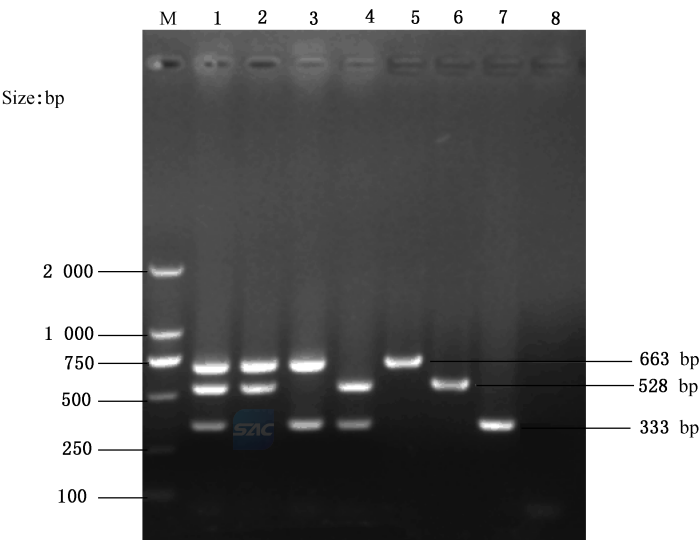
引物名称	引物序列	扩增片段大小	参考毒株序列
PEDV P1	5'-TTC GGT TCT ATT CCC GTT GAT G-3'	PEDV M 基因 (663 bp)	AY 974335
PEDV P2	5'-CCC ATG AAG CAC TTT CTC ACT ATC-3'		
TGEV P3	5'-TTA CAA ACT CGC TAT CGC ATG G-3'	TGEV N 基因 (528 bp)	DQ 443743
TGEV P4	5'-TCT TGT CAC ATC ACC TTT ACC TGC-3'		
PoRV P5	5'-CCC CGG TAT TGA ATA TAC CAC AGT-3'	PoRV VP7 基因 (333 bp)	DQ 786577
PoRV P6	5'-TTT CTG TTG GCC ACC CTT TAG T-3'		

附 录 C

(规范性附录)

猪传染性胃肠炎病毒、猪流行性腹泻病毒和猪轮状病毒多重 RT-PCR 扩增结果电泳图

猪传染性胃肠炎病毒、猪流行性腹泻病毒和猪轮状病毒多重 RT-PCR 扩增结果电泳图见图 C.1。



说明：

- M ——DNA 分子量标准(DL2000 Marker)；
- 1 ——PEDV + TGEV + PoRV；
- 2 ——PEDV + TGEV；
- 3 ——PEDV + PoRV；
- 4 ——TGEV + PoRV；
- 5 ——PEDV；
- 6 ——TGEV；
- 7 ——PoRV；
- 8 ——阴性对照。

图 C.1 猪传染性胃肠炎病毒、猪流行性腹泻病毒和猪轮状病毒多重 RT-PCR 扩增结果电泳图

附 录 D
(资料性附录)

猪传染性胃肠炎病毒、猪流行性腹泻病毒和猪轮状病毒多重 RT-PCR 扩增序列

D.1 猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)RT-PCR 目的 N 基因扩增序列如下:

ACAAACTCGCTATCGCATGGTGAAGGGCCAACGTAAAGAGCTTCCTGAAAGGTGGTTCTTC
TACTACTTAGGTACTGGACCTCATGCAGATGCCAAATTTAAAGATAAATTAGATGGAGTT
GTCTGGGTTGCCAAGGATGGTGCCATGAACAAACCAACCACGCTTGGTAGTCGTGGTGCTA
ATAATGAATCCAAAGCTTTGAAATTCGATGGTAAAGTGCCAGGCGAATTTCAACTTGAAG
TTAATCAATCAAGAGACAATTCAAGGTCACGCTCTCAATCTAGATCTCGGTCTAGAAATA
GATCTCAATCTAGAGGCAGGCAACAATTCAATAACAAGAAGGATGACAGTGTAGAACAAG
CTGTTCTTGCCGCACTTAAAAAGTTAGGTGTTGACACAGAAAAACAACAGCAACGCTCTCG
TTCTAAATCTAAAGAACGTAGTAAGTCTAAGACAAGAGATACTACACCTAAGAATGAAAA
CAAACACACCTGGAAGAGAACTGCAGGTAAAGGTGATGTGACAAGA

D.2 猪流行性腹泻病毒(PEDV)RT-PCR 目的 M 基因扩增序列如下:

TTCTATTCCCGTTGATGAGGTGATTCAACACCTTAGAACTGGAATTTACATGGAATAT
CATACTGACGATACTACTTGTAGTGCTTCAGTATGGCCATTACAAGTACTCTGTGATCTTG
TATGGTGTTAAGATGGCTATTCTATGGATACTTTGGCCTCTTGTGTTGGCACTGTCCTCT
TTGACGCATGGGCTAGCTTTCAGGTCAACTGGGTCTTTTTTCGCTTTCAGCATCCTTATGGC
TTGCATCACTCTTATGCTGTGGATAATGTACTTTGTCAATAGCATTTCGGTTGTGGCGCAGG
ACACATTCTTGGTGGTCCCTCAATCCTGAAACAGACGCGCTTCTCACTACTTCTGTGATGG
GCCGACAGGTCTGCATTCCAGTGCTTGGAGCACCAACTGGTGTAACGCTAACACTCCTTAG
TGGTACATTGCTTGTAGAGGGCTATAAGGTTGCTACTGGCGTACAGGTAAGTCAATTACC
TAATTTTCGTCACAGTCGCCAAGGCCACTACAACAATTGTCTACGGACGTGTTGGTCGTTCA
GTCAATGCTTCATCTGGCACTGGTTGGGCTTTCTATGTACGGTCAAAACACGGCGACTACT
CAGCTGTGAGTAATCCGAGTGCGGTCTCACAGATAGTGAGAAAGTGCTTCAT

D.3 猪轮状病毒(PoRV)RT-PCR 目的 VP7 基因扩增序列如下:

GGTATTGAATATAACCACAGTTTTTAACCTTTTTGATATCAGTTGTATTATTGAATTACATA
CTTAAATCATTAACCAGAATAATGGACTTCATCATTTACAGATTTCTTCTCATTATAGTT
ATACTGTCACCATTTCTTAACGCACAAAATTATGGAATAAACCTTCCAATTACTGGATCA
ATGGATACTCCATATGCGAACTCGACACAAGAAGAAGTGTTCCCTAACATCAACTTTATGC
TTATACTATCCAAGTGAAGCTGCGACACAAATAAATGACAATTTCGTGGAAAGATACACTT
TCTCAGCTATTTTTAACTAAAGGGTGGCCAACAG