



中华人民共和国国家标准

GB/T 27521—2011

猪流感病毒核酸 RT-PCR 检测方法

RT-PCR assay for swine influenza virus nucleic acid

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 发布
中国国家标准化管理委员会

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:中国农业科学院哈尔滨兽医研究所,中国检验检疫科学研究院,中国兽医药品监察所。

本标准主要起草人:乔传玲、韩雪清、杨焕良、刘业兵、陈艳、吴绍强、陈化兰、林祥梅、辛晓光、朱中武、王慧煜、刘建、李建、梅琳、王伊琴、徐彪、阮周曦、宁宜宝、薄清如、秦智锋、林志雄。



猪流感病毒核酸 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了猪流感病毒核酸 RT-PCR 检测方法的技术要求。

本标准规定的 RT-PCR 检测方法适用于检测猪肺脏组织、鼻腔及气管分泌物和这些采集样品培养物中的猪流感病毒核酸。

2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DEPC:焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate)

dNTP:脱氧核苷酸三磷酸(deoxy-ribonucleoside triphosphate)

EB:溴化乙锭(ethidium bromide)

M-MLV RT:莫洛尼氏鼠白血病病毒反转录酶(moloney murine leukemia virus reverse transcriptase)

PCR:聚合酶链式反应(polymerase chain reaction)

RNA:核糖核酸(ribonucleic acid)

RNAase inhibitor:RNA 酶抑制剂

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

SPF:无特定病原体(specific pathogen free)

Taq DNA polymerase: *Taq* DNA 聚合酶

3 仪器

- 3.1 PCR 仪。
- 3.2 台式低温高速离心机。
- 3.3 电泳仪。
- 3.4 电泳槽。
- 3.5 冰箱。
- 3.6 凝胶成像系统。
- 3.7 微量移液器。
- 3.8 水浴锅。

4 试剂

- 4.1 LS TRIzol RNA 提取试剂或其他商品化的 RNA 提取试剂。
- 4.2 氯仿、异丙醇、无水乙醇。
- 4.3 1.2% 琼脂糖凝胶,见附录 A 中 A.1。
- 4.4 50×TAE 缓冲液,见附录 A 中 A.2。

- 4.5 溴化乙锭(EB, 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)或核酸染料, 见附录 A 中 A. 3。
- 4.6 焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的灭菌双蒸水, 见附录 A 中 A. 4。
- 4.7 DNA 分子量标准(100 bp)。
- 4.8 M-MLV 反转录酶。
- 4.9 RNA 酶抑制剂。
- 4.10 *Taq* DNA 聚合酶。
- 4.11 dNTP。
- 4.12 商品化的一步法 RT-PCR 反应试剂。含有 RT-PCR 缓冲液, 酶混合物, dNTP 混合物, 无 RNA 酶的水等。

5 引物

- 5.1 反转录引物见附录 B 中 B. 1。引物浓度为 20 pmol/ μL 。
- 5.2 PCR 引物见附录 B 中 B. 2。引物浓度均为 20 pmol/ μL 。

6 样品对照

以灭活的猪流感病毒感染 SPF 鸡胚尿囊液或者感染动物的组织作为阳性对照, 以正常 SPF 鸡胚尿囊液或者正常动物组织作为阴性对照。

7 操作步骤

7.1 样品的采集及处理

7.1.1 采样工具

下列采样工具应经 $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 min 高压灭菌并烘干:

- a) 棉拭子;
- b) 剪刀;
- c) 镊子;
- d) 1.5 mL 离心管;
- e) 研钵。

7.1.2 活猪

取鼻拭子。采集方法如下: 将棉拭子深入鼻腔旋转, 取鼻腔分泌液; 将采样后的拭子分别放入盛有 1.0 mL PBS(见附录 A 中 A. 5)的 1.5 mL 离心管中, 加盖、编号。

7.1.3 病死猪

取肺脏或气管分泌物等。采集方法如下: 用无菌镊子和剪刀采集肺脏等, 装入一次性塑料袋或其他灭菌容器, 编号。

7.1.4 样品贮运

样品采集后, 放入密闭的塑料袋内(一个采样点的样品放一个塑料袋), 于保温箱中加冰、密封, 24 h 内送实验室。

7.1.5 样品处理

7.1.5.1 棉拭子处理方法

样品在混合器上充分混合后,用高压灭菌镊子将拭子中的液体挤出,弃去拭子,室温静置 30 min, 4 ℃、3 000 r/min 离心 15 min,取上清液转入无菌的 1.5 mL 离心管中,编号备用。

7.1.5.2 脏器处理方法

将所采组织病料置于洁净、灭菌并烘干的研磨器中,按质量体积比(1:1)加入样品保存液进行充分研磨;4 ℃、3 000 r/min 离心 15 min,取上清液转入无菌的 1.5 mL 离心管中,编号备用。

7.2 RNA 的提取

7.2.1 用 LS TRIzol 试剂提取待检样品、阳性对照及阴性对照样品的 RNA。

7.2.2 250 μ L 样品处理液和 750 μ L LS TRIzol 置入一个 1.5 mL 离心管,振荡数次,静置 5 min。

7.2.3 加 200 μ L 氯仿,振荡混匀,室温放置 5 min,4 ℃ 12 000 r/min,离心 15 min。

7.2.4 吸取上层水相至一新离心管中,加入等量异丙醇,混匀,室温放置 15 min,4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min,离心后在离心管边和底部可见有胶样 RNA 沉淀(对于细胞毒而言,可能看不到沉淀)。弃上清。

7.2.5 小心吸弃上清,加入 500 μ L 75%乙醇(DEPC 水配置),小心颠倒以漂洗沉淀及管壁,4 ℃、12 000 r/min,离心 5 min。

7.2.6 小心吸弃上清,沉淀置室温条件下干燥后,加适量 DEPC 水溶解。

7.2.7 提取的 RNA 须在 2 h 内进行 RT-PCR 扩增,若需长期保存,须放置-70 ℃冰箱保存。

7.2.8 也可采用商品化的基因组 RNA 提取试剂,按照说明书进行操作。同时进行阴、阳性对照样品 RNA 的提取。

7.3 RT-PCR

7.3.1 一步法反应操作步骤(如实验室有商品化的一步法 RT-PCR 反应试剂采用此操作步骤)

7.3.1.1 在 0.2 mL 反应管中依次加入:

一步法 RT-PCR 缓冲液	10 μ L
dNTP(10 mmol/L)	2.0 μ L
酶混合物	2.0 μ L
RNA 酶抑制剂	0.5 μ L
上游引物	0.5 μ L
下游引物	0.5 μ L
RNA 模板	5 μ L
DEPC 水	29.5 μ L

上述体系根据扩增目的片段不同,分别选择相应的 M、H1HA、甲 H1HA、H3HA、N1NA 及 N2NA 单个基因的上/下游引物进行反应。

7.3.1.2 采用 PCR 仪立即进行 RT-PCR 扩增。检测同时设立阴、阳性对照。

7.3.1.3 RT-PCR 反应条件为:48 ℃ 45 min;94 ℃ 2 min;然后 94 ℃ 30 s,50 ℃ 1 min,68 ℃ 2 min,共 40 个循环;最后 68 ℃延伸 7 min。

7.3.2 两步法反应操作步骤(如实验室没有商品化的一步法 RT-PCR 反应试剂采用此操作步骤)

7.3.2.1 RT 取 5 μ L RNA,加 1 μ L 反转录引物(Uni12),70 ℃水浴 5 min。

7.3.2.2 冰浴 2 min,继续加入:

5×反转录反应缓冲液	4 μL
0.1 mol/L DTT	2 μL
2.5 mmol/L dNTPs	2 μL
M-MLV 反转录酶	0.5 μL
RNA 酶抑制剂	0.5 μL
DEPC 水	5 μL

7.3.2.3 37 °C 水浴 1 h,合成 cDNA。取出直接进行 PCR 或置-20 °C 保存。

7.3.2.4 根据扩增目的片段不同,选择相应的上/下游引物进行扩增。

PCR 体系包括:

双蒸灭菌水	37.5 μL
反转录产物	4 μL
上游引物	0.5 μL
下游引物	0.5 μL
10×PCR Buffer	5 μL
2.5 mmol/L dNTPs	2 μL
Taq 酶	0.5 μL

首先加入双蒸灭菌水,然后再按照顺序逐一加入上述成分,每一次要加入到液面下。全部加完后,混匀,瞬时离心,使液体都沉降到 PCR 管底。

7.3.2.5 PCR 反应条件为:95 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 45 s,50 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 45 s,循环 30 次;72 °C 延伸 6 min。

8 扩增产物的电泳检测

制备 1.2% 琼脂糖凝胶板,见附录 A 中 A.1。在电泳槽中加入 1×TAE 电泳缓冲液,使液面刚刚没过凝胶。取 3 μL~5 μL 扩增产物分别和适量加样缓冲液混合后,加到凝胶孔。加入分子量标准。恒压 (110 V) 下电泳 30 min~40 min,将电泳好的凝胶放到凝胶成像系统上观察结果。

9 试验成立的条件

阳性对照的扩增产物经电泳检测,在预期大小的条带位置均出现特异性条带,阴性对照的扩增产物经电泳检测均没有预期大小的目的条带。阴、阳性对照同时成立则表明试验有效,否则试验无效。

10 结果判定

10.1 阳性判定

应用引物 M-684U/M-684L、H1-668U/H1-668L、甲-428U/甲-428L、H3-668U/H3-668L、N1-615U/N1-615L、N2-246U/N2-246L,按照各基因检测体系对样品进行检测,扩增产物如果在 684 bp、668 bp、428 bp、668 bp、615 bp、246 bp 位置出现特异性条带,则判定为猪流感病毒或相应亚型病毒核酸阳性。

10.2 阴性判定

如果在所用引物预期扩增片段的位置均未出现特异性条带,则判定为猪流感病毒核酸阴性。

附 录 A

(规范性附录)

相关试剂的配制

A.1 1.2%琼脂糖凝胶

琼脂糖	1.2 g
1×TAE 电泳缓冲液	加至 100 mL

放入 100 mL TAE 电泳缓冲液(1×)中,加热融化。温度降至 60 ℃左右时,加入 5 μL 核酸染料,均匀铺板,厚度为 3 mm~5 mm。

A.2 50×TAE 电泳缓冲液

A.2.1 0.5 mol/L 乙二铵四乙酸二钠(EDTA)溶液(pH8.0)

 二水乙二铵四乙酸二钠	18.61 g
灭菌双蒸水	80 mL
氢氧化钠	调 pH 至 8.0
灭菌双蒸水	加至 100 mL

A.2.2 TAE 电泳缓冲液(50×)

羟基甲基氨基甲烷(Tris)	242 g
冰乙酸	57.1 mL
0.5 mol/L 乙二铵四乙酸二钠溶液(pH8.0)	100 mL
灭菌双蒸水	加至 1 000 mL

用时用灭菌双蒸水稀释使用。

A.3 溴化乙锭(EB)溶液

溴化乙锭	20 mg
灭菌双蒸水	加至 20 mL

A.4 DEPC 水

灭菌双蒸水	100 mL
焦碳酸二乙酯(DEPC)	50 μL

室温过夜,121 ℃高压灭菌 15 min,分装到 1.5 mL DEPC 处理过的离心管。

A.5 PBS 缓冲液

A.5.1 A 液

0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液。

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 27.6 g,溶于灭菌双蒸水中,定容至 1 000 mL。

A.5.2 B 液

0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液。

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 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),溶于灭菌双蒸水中,定容至 1 000 mL。

A.5.3 0.01 mol/L、pH7.2 磷酸盐缓冲液的配制

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

0.2 mol/L B 液	36 mL
---------------	-------

NaCl	8.5 g
------	-------

加灭菌双蒸水定容至 1 000 mL。

附 录 B
(规范性附录)
引 物

B.1 反转录引物

 Uni 12:5'-AGCAAAAGCAGG-3'。

B.2 PCR 引物

引物名称	引物序列(5'~3')	长度(bp)	扩增目的片段
M-684U	CAAGACCAATCCTGTCACCTC	684	猪流感病毒 M 基因
M-684L	AAGACGATCAAGAATCCACAA		
H1-668U	AGCAAAAGCAGGGGAAAATAA	668	猪流感病毒 H1 亚型 HA 基因
H1-668L	TGCATTCTGGTAGAGACTTTG		
甲-428U	CAGCAAATCCTACAGGAATG	428	猪甲型 H1N1 流感病毒 HA 基因
甲-428L	GAGATGTTCCAAGTCTGATC		
H3-668U	TGTTACCCTTATGATGTGCC	668	猪流感病毒 H3 亚型 HA 基因
H3-668L	CCCTGTTGCCAATTTTCAGAG		
N1-615U	TTGCTTGGTCRGCAAGTGC	615	猪流感病毒 N1 亚型 NA 基因
N1-615L	YCWGTCCAYCCATTWGGATCC		
N2-246U	CAGTAGTAATGACTGATGG	246	猪流感病毒 N2 亚型 NA 基因
N2-246L	CCTGAGCACACATAACTGGA		
