



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 34757—2017

---

## 猪流行性腹泻 病毒 RT-PCR 检测方法

Porcine epidemic diarrhea—RT-PCR for detecting virus acid

2017-11-01 发布

2018-05-01 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。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:东北农业大学、中国动物卫生与流行病学中心、河南牧业经济学院、河南农业大学。

本标准主要起草人:李一经、邵卫星、魏荣、宋建德、姜艳平、袁丽萍、唐丽杰、乔薪媛、崔文、徐耀辉、吴发兴、张志、孙映雪、魏战勇、李晓成。

# 猪流行性腹泻 病毒 RT-PCR 检测方法

## 1 范围

本标准规定了猪流行性腹泻病毒 RT-PCR 检测方法的仪器、试剂、样品的采集和处理、RT-PCR 程序、电泳及结果判定的技术要求。

本标准适用于快速检测猪临床样品(猪小肠和新鲜粪便)或细胞培养物中猪流行性腹泻病毒核酸。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注明日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

## 3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

AMV:鸟类 RNA 病毒反转录酶(avian myeloblastosis virus)

bp:碱基对(base pair)

DEPC:焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate)

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

dNTPs:4 种脱氧核糖核苷三磷酸混合物(deoxyribonucleoside triphosphates)

PBS:磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline buffer)

RNA:核糖核酸(ribonucleic acid)

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

RRI:RNA 酶抑制剂(rnase ribonuclease inhibitor)

*Taq* 酶:*Taq* DNA 聚合酶(*Taq* DNA polymerase)

## 4 仪器

4.1 PCR 扩增仪。

4.2 高速台式冷冻离心机:可控温至 4℃、离心速度可达 12 000 r/min 以上。

4.3 组织研磨器或者研钵。

4.4 冰箱 2℃~8℃冰箱和-70℃以下超低温冰箱。

4.5 核酸电泳仪和水平电泳槽。

4.6 微量移液器 量程分别 0.2 μL~2 μL、1 μL~10 μL、10 μL~100 μL、20 μL~200 μL 和 100 μL~1 000 μL 的移液器,并配备与移液器相匹配的吸头。

4.7 高压灭菌锅。

4.8 凝胶成像系统(或紫外透射仪)。



## 5 耗材

5.1 1.5 mL 无 RNA 酶离心管。

5.2 0.2 mL PCR 管。

## 6 试剂

除非另有说明,在检测中使用的试剂均为分析纯。提取病毒 RNA 所用试剂应使用无 RNA 酶的容器进行分装。

6.1 水,GB/T 6682,三级水。

6.2 病毒裂解液:商品化 RNA 提取试剂盒,4℃~8℃保存。

6.3 氯仿:常温保存。

6.4 异丙醇:使用前预冷至-20℃。

6.5 无水乙醇:-20℃预冷。

6.6 75%乙醇:无水乙醇和双蒸水配制,-20℃预冷。

6.7 AMV 逆转录酶及 5 倍逆转录酶反应缓冲液:-20℃保存,避免反复冻融。

6.8 DEPC 水:购买商品化 DEPC 水。

6.9 Taq 酶及 10 倍 Taq 酶反应缓冲液:-20℃保存,避免反复冻融。

6.10 RRI:-20℃保存,避免反复冻融。

6.11 dNTPs:含 dATP、dGTP、dCTP、dTTP 各 10 mmol/L,-20℃保存,避免反复冻融。

6.12 DNA 分子量标准:DL2000bp DNA ladder。

6.13 磷酸盐缓冲液(PBS):配制见 A.1。

6.14 电泳缓冲液(TAE):配方及配制方法见 A.2。

6.15 样品处理液:配方及配制见 A.3。

6.16 1%琼脂糖凝胶板:配制见 A.4。

6.17 引物:见附录 B。

6.18 猪流行性腹泻病毒阳性样品及阴性样品:阳性样品的制备参见 C.1,阴性样品的制备参见 C.2。阳性样品和阴性样品可由标准编制单位或国家指定实验室提供。

## 7 样品采集和处理

### 7.1 采样工具

7.1.1 手术刀、剪刀、镊子,经 160℃干热灭菌 2 h。

7.1.2 注射器。

7.1.3 一次性无菌采样拭子。

7.1.4 组织研磨器或者研钵,经 160℃干热灭菌 2 h。

### 7.2 样品采集

宜采集腹泻急性期的小肠(5.0 cm~10.0 cm)或新鲜粪便(5.0 g~10.0 g),放到密封袋中。

### 7.3 样品运输

将含有样品的密封袋置于带有冰袋的样品运输箱中,送至实验室。样品的运送应在低温保存条件

下进行,样品被运到实验室时,所附带的冰袋应没有完全融化。

## 7.4 样品保存

### 7.4.1 采样点保存

样品不能被及时送到实验室时,应置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存,保存期应不超过1个月;如需长期保存样品,应置于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

### 7.4.2 实验室保存

7.2中采集的样品可立即用于检测。不能立即检测的样品,在 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存应不超过24 h, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下应不超过1个月, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下可长期保存。

## 7.5 样品处理

### 7.5.1 小肠样品的处理

取 $5.0\text{ cm}\sim 10.0\text{ cm}$ 小肠组织,用剪刀剪碎,加入 $5.0\text{ mL}\sim 10.0\text{ mL}$ 的PBS,用组织研磨器或研钵研磨后转移到小玻璃瓶中, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反复冻融3次后摇匀,取 $1.0\text{ mL}$ 小肠组织液到 $1.5\text{ mL}$ 离心管中,经 $12\ 000\text{ r/min}$ 离心 $5\text{ min}$ ,取 $500\text{ }\mu\text{L}$ 上清备用。

### 7.5.2 粪便样品的处理

取 $0.5\text{ g}\sim 1.0\text{ g}$ 新鲜粪便,加入到含 $5.0\text{ mL}\sim 10.0\text{ mL}$ 样品处理液(配方见A.3)的玻璃瓶中, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反复冻融3次后摇匀,取 $1.0\text{ mL}$ 处理过的粪便样品到 $1.5\text{ mL}$ 离心管中,经 $12\ 000\text{ r/min}$ 离心 $5\text{ min}$ ,取 $500\text{ }\mu\text{L}$ 上清备用。

## 8 RT-PCR 操作程序

### 8.1 RNA 的提取

选择市售商品化RNA提取试剂盒,按照试剂盒操作说明书提取样品中的RNA。在提取RNA时,应设立阳性和阴性对照样品,按同样的方法提取RNA。RNA提取操作应在通风柜或生物安全柜中进行,避免RNA气溶胶的污染。

### 8.2 反转录(RT)

8.2.1 反转录引物序列 下游引物P2,见附录B。

8.2.2 RT反应体系 反转录的反应体系参见附录D。

8.2.3 RT反应程序  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 $1\text{ h}$ , $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭活 $15\text{ min}$ ,结束反应。可以直接进行PCR,或者放于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。试验中设阳性和阴性对照。

### 8.3 聚合酶链式反应(PCR)

8.3.1 PCR引物序列 见附录B。

8.3.2 PCR反应体系 参见附录D。

8.3.3 PCR反应程序  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 $5\text{ min}$ 后进入PCR循环, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 $30\text{ s}$ , $52.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 $30\text{ s}$ , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 $30\text{ s}$ ,30个循环,最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 终延伸 $10\text{ min}$ ,结束反应。同时设空白对照。1%琼脂糖电泳分析结果。

## 9 电泳

9.1 制备 1.0% 琼脂糖凝胶板, 见附录 A。

9.2 取 10.0  $\mu\text{L}$  PCR 产物与 2.0  $\mu\text{L}$  市售的 DNA 上样缓冲液(6 $\times$ )混合, 加入到琼脂糖凝胶板的加样孔中, 同时加入 DNA 分子量标准作对照。

9.3 盖好电泳仪, 插好电极, 电压为 5 V/cm~10 V/cm, 时间为 30 min。

9.4 用紫外凝胶成像系统对图片拍照、存档。

9.5 用分子量标准比较判断 PCR 片段大小。

## 10 结果判定

### 10.1 试验成立的条件

阳性对照有 315 bp 的扩增条带, 阴性对照没有相应条带, 否则试验不成立。

### 10.2 样品检测结果

在阳性对照、阴性对照都成立的前提下, 若检测样品有 315 bp 的条带, 则判定该样品猪流行性腹泻病毒核酸阳性, 否则为阴性(参见图 E.1)。如需要, 可对扩增的条带进行回收, 克隆到 T 载体, 进行测序, 所得序列与附录 E 中的猪流行性腹泻病毒 M 基因的序列进行同源性比较, 以进一步确定样品检测结果。

附 录 A  
(规范性附录)  
溶液的配制

A.1 磷酸盐缓冲液(PBS)(0.01 mol/L、pH 7.4)的配制

准确称量下面各试剂,加入到 800 mL 蒸馏水中溶解,用盐酸调节溶液的 pH 至 7.4,加水至 1 L。  
分装后在 121 °C 灭菌 20 min,或过滤除菌,保存于室温。

|                                                               |                |
|---------------------------------------------------------------|----------------|
| 磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )                             | 0.20 g         |
| 磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) | 2.90 g         |
| 氯化钠( $\text{NaCl}$ )                                          | 8.00 g         |
| 氯化钾( $\text{KCl}$ )                                           | 0.20 g         |
| 蒸馏水                                                           | 加至 1 000.00 mL |

A.2 1×电泳缓冲液(TAE)的配制

先配制 TAE(50×)贮液,使用时再用蒸馏水稀释成 1×电泳缓冲液。1 L TAE 的配制(50×):准确称量 242 g Tris 碱、57.1 mL 的冰乙酸、100 mL 0.5 mol/L EDTA(pH 8.0),加入蒸馏水至 1 L,室温放置备用。

A.3 样品处理液的配制

准确称量下面各试剂,加去离子水定容至 200 mL,121 °C 灭菌 20 min 后室温放置备用。

|          |        |
|----------|--------|
| 氯化钠      | 1.60 g |
| 氯化钾      | 0.04 g |
| 磷酸氢二钠    | 0.29 g |
| 磷酸二氢钾    | 0.05 g |
| 乙二胺四乙酸二钠 | 3.72 g |

A.4 1%琼脂糖凝胶板的制备

准确称取 1 g 琼脂糖,加入 100 mL 1×TAE,在微波炉中加热,使琼脂糖充分溶解,取出,加入适量的染料,混匀,倒入制胶板中。

**附 录 B**  
(规范性附录)

**检测猪流行性腹泻病毒 RT-PCR 方法的引物序列**

检测猪流行性腹泻病毒 RT-PCR 方法的引物序列见表 B.1。

**表 B.1 检测猪流行性腹泻病毒 RT-PCR 方法的引物序列**

| 引物名称                        | 引物浓度             | 引物序列                       |
|-----------------------------|------------------|----------------------------|
| 上游引物 P1                     | 20 pmol/ $\mu$ L | 5'-TATGGCTTGCATCACTCTTA-3' |
| 下游引物 P2                     | 20 pmol/ $\mu$ L | 5'-TTGACTGAACGACCAACACG-3' |
| 注：扩增片段为 M 基因保守区，大小为 315 bp。 |                  |                            |



附 录 C  
(资料性附录)

猪流行性腹泻病毒阳性样品和阴性样品

C.1 阳性样品制备

取猪流行性腹泻病毒(PEDV),用 100 mL 的 PBS 稀释至 1 个病毒半数组织细胞感染量(TCID<sub>50</sub>),向其中加入不含 PEDV 的猪粪便 10 g,摇匀,分装,0.5 mL/管,备用。

C.2 阴性样品制备

用 PBS 按 10 : 1 的比例稀释不含 PEDV 的猪粪便,摇匀,分装,0.5 mL/管,备用。



附 录 D  
(资料性附录)  
检测方法的 RT 和 PCR 反应体系

D.1 RT 反应体系

|                   |                    |
|-------------------|--------------------|
| RNA               | 20 $\mu\text{L}$   |
| dNTPs (10 mmol/L) | 4.0 $\mu\text{L}$  |
| RNA 酶抑制剂(RRI)     | 1.0 $\mu\text{L}$  |
| 5 $\times$ 反应缓冲液  | 8.0 $\mu\text{L}$  |
| AMV 反转录酶          | 2.0 $\mu\text{L}$  |
| 下游引物 P2(见附录 B)    | 2.0 $\mu\text{L}$  |
| DEPC 水            | 3.0 $\mu\text{L}$  |
| 总体积               | 40.0 $\mu\text{L}$ |

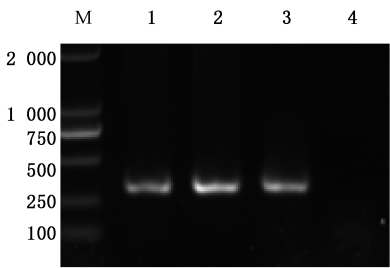
D.2 PCR 反应体系

|                                       |                    |
|---------------------------------------|--------------------|
| 反转录产物                                 | 3.0 $\mu\text{L}$  |
| <i>Taq</i> DNA 聚合酶反应缓冲液(10 $\times$ ) | 2.5 $\mu\text{L}$  |
| dNTPs (10 mmol/L)                     | 2.0 $\mu\text{L}$  |
| 上游引物 P1(见附录 B)                        | 1.0 $\mu\text{L}$  |
| 下游引物 P2(见附录 B)                        | 1.0 $\mu\text{L}$  |
| <i>Taq</i> DNA 聚合酶                    | 0.5 $\mu\text{L}$  |
| 灭菌去离子水                                | 15.0 $\mu\text{L}$ |
| 总体积                                   | 25.0 $\mu\text{L}$ |

附 录 E  
(资料性附录)  
检测样品电泳例图及核苷酸序列

E.1 检测样品中猪流行性腹泻病毒电泳例图

检测样品中猪流行性腹泻病毒电泳例图见图 E.1。



说明：  
M —— DNA 分子量标准 DL2000；  
1 —— 小肠组织样品；  
2 —— 粪便样品；  
3 —— 阳性样品对照；  
4 —— 阴性对照。

图 E.1 检测样品中猪流行性腹泻病毒电泳图

E.2 猪流行性腹泻病毒 M 基因第 249～563 位核苷酸序列(参考 CV777 株)

TATGGCCTGCATCACTCTTATGCTGCGGATAATGTATTTTGTCAATAGCATTCGGTTGTGG  
CGCAGGACACATTCTTGGTGGTCTTTCAACCCTGAAACTGACGCGCTTCTCACTACTTCTG  
TGATGGGCCGACAGGTTTGCATTCCAGTGCTTGGAGCACCAACTGGTGTAACGCTAACACT  
CCTTAGTGGTACGTTGCTTGTAGAGGGCTATAAGGTTGCTACTGGCGTACAGGTAAGTCA  
ATTACCTAATTTTCGTCACAGTCGCCAAGGCCACTACAACAATTGTCTACGGACGTGTTGGT  
CGTTCAGTCAA(315 bp)