



中华人民共和国国家标准

GB/T 27540—2011

猪瘟病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

Method of the real-time RT-PCR for the detection of
classical swine fever 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 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:中国兽医药品监察所。

本标准主要起草人:王琴、王泰健、徐璐、范学政、刘俊、蒋春燕、赵启祖、宁宜宝、邹兴启。



猪瘟疫病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了猪瘟疫病毒(Classical swine fever virus, CSFV)实时荧光 RT-PCR 检测方法。

本标准适用于猪瘟疫的诊断和监测,适用于猪活体及其脏器、血液、排泄物和细胞培养物中 CSFV 核酸的检测。

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。

中华人民共和国农业部公告第 302 号 兽医实验室生物安全技术管理规范

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CSFV:猪瘟疫病毒(Classical swine fever virus)

Ct 值:达到阈值的循环数(cycle threshold)

DEPC:焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate)

HS Taq 酶:热启动 Taq DNA 聚合酶(HS Taq DNA polymerase)

RNA:核糖核酸(ribonucleic acid)

荧光 RT-PCR:荧光逆转录聚合酶链式反应(real time fluorescent quantitative reverse transcription polymerase chain reaction)

4 试剂和材料



除另有说明,所用试剂均为分析纯;所有试剂均用无 RNA 酶的容器分装。

- 4.1 Trizol:RNA 抽提试剂,外观为粉红色,分装至棕色瓶中,于 4℃~8℃保存。
- 4.2 氯仿:4℃预冷。
- 4.3 异丙醇:4℃预冷。
- 4.4 75%乙醇:用新开启的无水乙醇和 DEPC 水配制,−20℃预冷。
- 4.5 DEPC 水:去离子水中加入 0.1%DEPC,37℃作用 1 h,(121±2)℃,高压灭菌 15 min。
- 4.6 RNA 酶抑制剂(30 U/μL)。
- 4.7 10×PCR buffer (10 mmol/L pH8.3 Tris-HCl,50 mmol/L KCl,1.5 mmol/L MgCl₂)。
- 4.8 dNTP(2.5 mmol/L)。
- 4.9 用于 RT-PCR 反应的引物浓度为 10 μmol/L,探针浓度为 5 μmol/L,其序列如下:
上游引物 F:5-TACAGGACAGTCGTCAGTAGTTCGA-3

下游引物 R:5-CCGCTAGGGTTAAGGTGTGTCT-3

探针 P:5-FAM-CCCACCTCGAGATGCTATGTGGAC GA-TAMRA-3

- 4.10 反转录酶:Superscript III 反转录酶(200 U/ μ L)。
- 4.11 DNA 聚合酶:HS Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)。
- 4.12 阴性对照:DEPC 水。
- 4.13 强阳性对照:非感染体外转录 RNA (4 200 pg/ μ L)。
- 4.14 弱阳性对照:非感染体外转录 RNA (42 pg/ μ L)。

5 器材和设备

- 5.1 高速台式冷冻离心机:最大离心力 12 000g 以上。
- 5.2 冰箱。
- 5.3 荧光 PCR 检测仪。
- 5.4 组织匀浆器。
- 5.5 微量移液器和吸头。
- 5.6 离心管。

6 样品的采集

6.1 采样注意事项

采样及样品前处理过程中应戴一次性手套,样本不得交叉污染。

6.2 采样工具

扁桃体采样器:鼻捻子、开口器和采样枪。使用前均应用 3%氢氧化钠溶液浸泡消毒 5 min~10 min,经清水冲洗。

灭菌牙签和 0.5 mL 或 1.5 mL 离心管经(121 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,高压灭菌 15 min;剪、镊经 160 $^{\circ}$ C 干烤 2 h。

6.3 采样方法

6.3.1 活体样品

固定活猪的上唇,用开口器打开口腔,用采样枪采取扁桃体样品,用灭菌牙签挑至 0.5 mL 或 1.5 mL 离心管并作标记,编号,送实验室。取待检样品,按 1:5 倍体积加入 DEPC 水,于研钵或组织匀浆器中充分研磨,3 000g 离心 15 min,取上清液转入离心管中编号备用。

6.3.2 内脏样品

采取病死猪各种脏器(淋巴结、胰脏、脾脏、回肠、肝脏和肾脏)装入一次性塑料袋或其他灭菌容器,编号,送实验室。取 50 mg~100 mg 待检样品,按 1:5 倍体积加入 DEPC 水,于研钵或组织匀浆器中充分研磨,3 000g 离心 15 min,取上清液转入离心管中编号备用。

6.3.3 4%EDTA 抗凝血

用无菌注射器直接全血,注入含 1/10 4%EDTA 溶液的无菌容器中,充分混匀后编号备用。

6.3.4 排泄物

挑取少许粪便样本于离心管中,加入适量生理盐水,振荡混匀,室温 $3\,000g$ 离心 15 min ,取上清液转入离心管中编号备用。其余液体排泄物直接转入离心管编号备用。

6.3.5 细胞培养物

细胞培养物冻融 3 次,转入离心管中编号备用。

6.4 存放与运送

采集或处理的样品在 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存应不超过 24 h ;若需长期保存,应放置 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,但应避免反复冻融(冻融不超过 3 次)。采集的样品密封后,采用保温壶或保温桶加冰密封,在 $6\text{ h}\sim 8\text{ h}$ 之内运送到实验室。按照《兽医实验室生物安全技术管理规范》进行样品的生物安全标识。

7 实时荧光 RT-PCR 检测

7.1 核酸提取

在样本制备区进行。

7.1.1 取 n 个灭菌的 1.5 mL 离心管,其中 n 为待检样品数 $\times$ 重复数 3+阳性管数+弱阳性管数+阴性管数,对每个离心管进行编号。

7.1.2 每管加入 $500\text{ }\mu\text{L}$ Trizol,分别加入被检样品、阳性对照、弱阳性对照和阴性对照各 $200\text{ }\mu\text{L}$ (由于阳性和弱阳性样品中模板浓度相对较高,检测过程中不得交叉污染),颠倒 10 次混匀,静置 5 min ;再加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 氯仿,混匀器上振荡混匀 5 s (也可以用手反复颠倒混匀)。于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\,000g$ 离心 15 min 。

7.1.3 取与 7.1.1 中相同数量灭菌的 1.5 mL 离心管,加入 $500\text{ }\mu\text{L}$ 异丙醇($4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷),对每个管进行编号。取 7.1.2 中离心后的上清液约 $500\text{ }\mu\text{L}$ (注意不要吸出中间层)转移至相应的管中,颠倒混匀, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min 。

7.1.4 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\,000g$ 离心 15 min (离心管开口保持朝离心机转轴方向放置),弃上清,倒置于吸水纸上,沾干液体,加入 $600\text{ }\mu\text{L}$ 75% 乙醇,颠倒洗涤。

7.1.5 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\,000g$ 离心 10 min (离心管开口保持朝离心机转轴方向放置),弃上清,倒置于吸水纸上,沾干液体(不同样品应在吸水纸不同地方沾干)。

7.1.6 $4\,000g$ 离心 10 s (离心管开口保持朝离心机转轴方向放置),用微量加样器小心将残余液体吸干,室温干燥 $3\text{ min}\sim 10\text{ min}$ 。

7.1.7 加入 $38\text{ }\mu\text{L}$ 经 DEPC 处理的水和 $2\text{ }\mu\text{L}$ RNA 酶抑制剂,轻柔混匀,溶解管壁上的 RNA,冰上保存备用。提取的 RNA 应在 2 h 内进行荧光 RT-PCR 扩增;若需长期保存应放置 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

7.2 荧光 RT-PCR 扩增体系的配制

在反应混合物配制区进行。

设 PCR 反应数为 n ,其中 n 为待检样品数 $\times$ 重复数 3+阳性管数+弱阳性管数+阴性管数,每个样本测试反应体系配制见表 1。配制完毕的反应液分装时应尽量避免产生气泡,上机前注意检查各反应管是否盖紧,以免荧光物质泄露污染仪器。

表 1 每个样品反应体系配制表

体系组分		用量	终浓度
猪瘟病毒 RT-PCR 反应液	10×PCR Buffer	5.0 μL	1×
	dNTPs	1.5 μL	0.075 $\mu\text{mol/L}$
	上游引物 F	3.0 μL	0.6 $\mu\text{mol/L}$
	下游引物 R	3.0 μL	0.6 $\mu\text{mol/L}$
探针溶液	探针 P	1.5 μL	0.15 $\mu\text{mol/L}$
反应酶	SuperscriptⅢ 反转录酶	0.3 μL	2 U/ μL
	HS Taq DNA 聚合酶	0.5 μL	0.05 U/ μL
总 量		14.8 μL	

7.3 加样

在样本处理区进行。

在各设定的荧光 RT-PCR 管中分别加入本标准 7.1.7 中制备的 35.2 μL RNA 溶液,盖紧管盖后,500 r/min 离心 30 s。放入荧光 PCR 检测仪内。

7.4 荧光 RT-PCR 扩增

在检测区进行。

将本标准 7.3 中离心后的 PCR 管放入荧光 RT-PCR 检测仪内,记录样品摆放顺序。

循环条件设置:

- a) 反转录 50 $^{\circ}\text{C}$ /20 min;
- b) 预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ /4 min;
- c) 88 $^{\circ}\text{C}$ 、8 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 、35 s,40 个循环。荧光收集设置在此阶段每次循环的退火延伸时进行。

7.5 结果判定

7.5.1 阈值设定

试验检测结束后,根据收集的荧光曲线和 C_t 值直接读取检测结果, C_t 值为每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。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的最高点为准。

7.5.2 质控标准

7.5.2.1 阴性对照无 C_t 值,且无典型扩增曲线。

7.5.2.2 强阳性对照的 C_t 值应 ≤ 27.0 并出现典型的扩增曲线;弱阳性对照的 C_t 值应在 34.0 左右并出现典型的扩增曲线。否则,此次试验视为无效。

7.5.3 结果描述及判定

7.5.3.1 阴性

无 C_t 值并且无典型的扩增曲线,表示样品中无 CSFV 核酸。

7.5.3.2 阳性

Ct 值 ≤ 34.0 ,且出现典型的扩增曲线,表示样品中存在 CSFV 核酸。

7.5.3.3 可疑

Ct 值 > 34.0 ,且出现典型扩增曲线的样本建议重复试验,重复试验结果出现 Ct 值 ≤ 34.0 和典型扩增曲线者为阳性,否则为阴性。
