



中华人民共和国国家标准

GB/T 35912—2018

猪繁殖与呼吸综合征病毒 荧光 RT-PCR 检测方法

Real-time RT-PCR method for detection of porcine reproductive
and respiratory syndrome virus

2018-02-06 发布

2018-09-01 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:中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中国农业科学院上海兽医研究所、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、湖南圣湘生物科技有限公司、中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人:张强、李健、熊炜、童光志、赵和平、李树清、花群义、杨忠华、李国新、王巧全、王艳、林颖峥、蔡开妹、喻正军、林祥梅、吴绍强。

猪繁殖与呼吸综合征病毒 荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了猪繁殖与呼吸综合征病毒荧光 RT-PCR 检测的操作方法。
本标准适用于猪繁殖与呼吸道综合征病毒美洲型毒株核酸检测。

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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 25172 猪常温精液生产与保存技术规范

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

Real-time RT-PCR: 荧光反转录聚合酶链式反应(real-time reverse transcript polymerase chain reaction)

Ct 值: 每个反应管内的荧光信号量达到设定的阈值时所经历的循环数(cycle threshold)

RNA: 核糖核酸(ribonucleic acid)

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

TE 缓冲液: Tris-EDTA 缓冲液(Tris-EDTA buffer)

DEPC: 焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate)

PRRSV: 猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus)

PBS: 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution)

4 仪器

- 4.1 荧光 PCR 检测仪。
- 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 普通冰箱: 2℃~8℃。
- 4.5 超低温冰箱: 可控温至-70℃以下。
- 4.6 微量移液器: 0.2 μL~2 μL、1 μL~10 μL、10 μL~100 μL、20 μL~200 μL、100 μL~1 000 μL, 并配备与移液器匹配的吸头。
- 4.7 高压灭菌锅。

5 耗材

- 5.1 1.5 mL 无 RNA 酶离心管。
- 5.2 0.2 mL PCR 薄壁管或八联管。

6 试剂

- 6.1 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。
- 6.2 Trizol,商品化 RNA 抽提试剂,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 DEPC 水:配制见 A.1,也可购买商品化 DEPC 水。
- 6.8 PBS:配制见 A.2。
- 6.9 *Taq* 酶及 10 倍 *Taq* 酶反应缓冲液:*Taq* 酶浓度为 5 U/ μ L,*Taq* 酶反应缓冲液中 Mg^{2+} 浓度为 15 mmol/L。
- 6.10 逆转录酶及 10 倍逆转录酶反应缓冲液:逆转录酶浓度为 50 U/ μ L,-20℃保存,避免反复冻融。
- 6.11 RNA 酶抑制剂(40 U/ μ L):-20℃保存,避免反复冻融。
- 6.12 dNTPs:含 dATP、dGTP、dCTP、dTTP 各 10 mmol/L,-20℃保存,避免反复冻融。
- 6.13 引物和 *TaqMan* 探针,其序列见附录 B。
- 6.14 猪繁殖与呼吸道综合征病毒阳性对照样品和阴性对照样品:阳性对照为非感染性体外转录 RNA;阴性对照为健康猪的组织材料。
- 6.15 内参照质粒:带有人 β -珠蛋白基因的质粒。

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。
- 7.1.5 真空采血管。

7.2 样品采集

- 7.2.1 血清样品采集:用无菌注射器抽取受检猪静脉血不少于 5 mL,置于无菌离心管内,室温或者 37℃倾斜放置自然凝集 20 min~30 min,2 000 r/min~3 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液到新的离心管内备用。
- 7.2.2 公猪精液:按照 GB/T 25172 的方法采集和保存精液。
- 7.2.3 口腔拭子:大猪使用保定器保定,小猪可以双手保定,用采样拭子蘸取口腔分泌物,放入无菌采样管中。
- 7.2.4 肺灌洗液:完整摘取肺脏/肺叶,送实验室进行灌洗。

7.2.5 组织样品采集:取肺脏、淋巴结、扁桃体、脾脏等组织,置于无菌离心管内备用。

7.2.6 细胞培养物:细胞培养物反复冻融3次,第3次解冻后,将细胞培养物置于1.5 mL无RNA酶的灭菌离心管内,编号备用。

7.3 样品保存和运输

7.3.1 上述采集的样品可立即用于检测。不能立即检测的样品,在2℃~8℃下保存应不超过24 h, -20℃±5℃下应不超过3个月, -70℃以下可长期保存。样品运送采用低温保存进行运输,并在规定温度下的保存期内送达。

7.4 样品处理

7.4.1 血清和精液样品无需进行前处理,直接用于核酸提取。

7.4.2 口腔拭子样品:加入500 μL无菌PBS,充分涡旋震荡1 min,反复挤压拭子,弃去拭子后3 000 r/min离心5 min,取上清用于后续的核酸提取。

7.4.3 肺灌洗液:根据肺脏/肺叶的大小,通过肺管加入5 mL~10 mL无菌PBS,反复揉捏,吸取灌洗液,3 000 r/min离心5 min,取上清用于核酸提取。

7.4.4 组织样品:取1 g组织,剪碎,加入2 mL生理盐水进行研磨,制备组织匀浆,8 000 r/min离心5 min,取上清用于后续的核酸提取。

7.4.5 细胞培养物:4 000 r/min,4℃离心10 min,取上清用于后续的核酸提取。

8 荧光 RT-PCR 操作程序

8.1 RNA 抽提

8.1.1 在核酸提取区操作。RNA抽提使用Trizol手工提取,也可以使用等效的商品化试剂盒。

8.1.2 取 n 个灭菌的1.5 mL无RNA酶离心管,其中 n 为待检样品数+阳性对照+阴性对照,对每个离心管进行编号。

8.1.3 每管先加入600 μL Trizol裂解液,再分别加入被检样品、阳性对照、阴性对照各200 μL,颠倒10次混匀,最后加入200 μL氯仿,涡旋震荡5 s,4℃条件下12 000 r/min离心15 min。

8.1.4 将上层透明液体(约400 μL)转移到一个新的无RNA酶的离心管中,加入等体积预冷的异丙醇,每个离心管对应编号。

8.1.5 12 000 r/min离心15 min,弃去上清,沿管壁缓缓加入0.8 mL~1 mL 75%乙醇,颠倒3~6次混匀,12 000 r/min离心10 min。反复洗涤两次后,将离心管倒扣于吸水纸上,自然晾干或用移液器移去残液。

8.1.6 加入20 μL DEPC水,轻轻混匀,溶解RNA。提取的RNA应尽快进行反转录扩增或放置于-70℃冰箱保存。

8.1.7 提取过程中要注意交叉污染,移液过程每份样品都需要更换吸头;不同样品离心管倒扣在吸水纸上的不同位置。

8.2 荧光 PCR 检测

8.2.1 反应体系的配制

在试剂配制区进行。设实时荧光PCR反应管数为 n , n 为待检样品数+阳性管数+阴性管数,每个反应的体系见附录C,为了避免移液器取样损失,建议按 $n+1$ 个反应进行配制。配制反应液在冰盒中进行。

8.2.2 反应液的分装

将 8.2.1 中配制的荧光 PCR 反应液充分混匀,按照每管 44.8 μL 分装于 0.2 mL 透明 PCR 管内,将 PCR 管置于 96 孔板上,按顺序加样并做好标识,转移至核酸提取区。

8.2.3 加样

在核酸提取区进行。在每个 PCR 反应管内加入 0.2 μL 的内参照质粒,并分别加入 8.1 制备的核酸 5 μL RNA 溶液,盖上盖子,500 r/min~1 000 r/min 离心 30 s。转移至检测区。

8.2.4 上机检测

8.2.4.1 荧光通道设置

在检测区进行。将 8.2.3 中离心后的 PCR 管放入荧光 PCR 检测仪内,设置探针:5' 选择 FAM、HEX 和 ROX 三个荧光通道,3' 均选择无(None)荧光。

8.2.4.2 循环条件设置与检测

第一阶段,反转录 42 $^{\circ}\text{C}$,30 min;

第二阶段,预变性 95 $^{\circ}\text{C}$,1 min;

第三阶段,变性 95 $^{\circ}\text{C}$ /15 s,退火、延伸、荧光采集 60 $^{\circ}\text{C}$ /30 s,40 个循环;

第四阶段,冷却 25 $^{\circ}\text{C}$,10 s。

检测结束后,保存结果,根据收集的荧光曲线和 C_t 值判定结果。

9 结果判定

9.1 阈值设定

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的最高点为准。

9.2 质量控制

9.2.1 PRRSV 阴性对照:FAM 通道无报告 C_t 值或无典型的 S 型扩增曲线,HEX 通道无报告 C_t 值或无典型的 S 型扩增曲线,ROX 通道 C_t 值 ≤ 36 且扩增曲线为典型的 S 型。

9.2.2 PRRSV 阳性对照:FAM 通道 C_t 值 ≤ 30 ,HEX 通道 C_t 值 ≤ 30 ,ROX 通道 C_t 值 ≤ 36 ,且 3 个通道的扩增曲线均为典型的 S 型。

9.2.3 9.2.1 和 9.2.2 要求需在同一次实验中同时满足,否则,本次实验无效,需重新进行。

9.3 结果描述及判定

9.3.1 被检样本检测结果中 FAM 通道 C_t 值 ≤ 38 ,HEX 通道 C_t 值 ≤ 38 ,且扩增曲线均为典型的 S 曲线,报告为 PRRSV 美洲型变异株核酸阳性; $38 < C_t$ 值 ≤ 40 ,判定为可疑,可疑样品应重新检测,如重复后仍然 $38 < C_t$ 值 ≤ 40 ,且扩增曲线均为典型的 S 曲线,报告为 PRRSV 美洲型变异株核酸阳性。

9.3.2 被检样本检测结果中 FAM 通道 C_t 值 ≤ 40 ,且扩增曲线为典型的 S 型扩增曲线,HEX 通道无 C_t 值或者无典型的 S 型扩增曲线,报告为 PRRSV 美洲型经典株核酸阳性。

9.3.3 被检样本检测结果中 FAM 通道和 HEX 通道均无 C_t 值或无典型的 S 型扩增曲线,同时 ROX 通道 C_t 值 ≤ 36 且扩增曲线为典型的 S 曲线,则该样本超过本方法检测灵敏度范围,报告为 PRRSV 美洲型毒株核酸阴性。

9.3.4 被检样本检测结果中 FAM 通道和 HEX 通道均无 C_t 值或无典型的 S 型扩增曲线,同时 ROX 通道 C_t 值 > 36 ,则该样本的检测结果无效,应查找并排除原因,并对此样本进行重复实验。

附 录 A
(规范性附录)
溶 液 配 制

A.1 DEPC 水配制

每升去离子水中加入 1 mL DEPC,用力摇匀,使 DEPC 充分混匀在水中,37 ℃放置 12 h 以上,再经 121 ℃、15 min 高压灭菌备用。

A.2 磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L PBS,pH 7.4)

用 800 mL 蒸馏水溶解 8 g NaCl,0.2 g KCl,1.44 g Na_2HPO_4 和 0.24 g KH_2PO_4 。用 HCl 调节溶液的 pH 至 7.4,加水至 1 L。分装后经 121 ℃、15 min 高压灭菌后备用。

附 录 B
(规范性附录)
引物和探针

引物、探针的名称和序列见表 B.1。

表 B.1 引物、探针的名称与序列

名称	序列
M-qF	5'-TTGCTAGGCCGCAAGTAC-3'
M-qR	5'-ACGCCGGACGACAAATGC-3'
M-P(探针)	5'-FAM-CTGGCCCCTGCCCACCAC-BHQ1-3'
NSP2-qF	5'-CACCGCGTAGAACTGTGACAA-3'
NSP2-qR	5'-TYATATTCCGTYTGTGAGGAC-3'
NSP2-P(探针)	5'-HEX-ACGCTGACGCACCAGGATGAGCCTCT-BHQ1-3'
IC-F	5'-AAGTGCTCGGTGCCTTTAGTG-3'
IC-R	5'-GTCCCATAGACTCACCCTGAAGT-3'
IC-P2(探针)	5'-ROX-CCTGGCTCACCTGGACAACCTCAAG-BHQ2-3'

注：引物和探针可由生物公司合成，用 TE 溶液溶解并稀释至 100 μmol/L 储存浓度，-20 ℃ 保存备用；根据需要配制成 10 μmol/L 工作液，-20 ℃ 保存供检测使用。

附 录 C
(规范性附录)
荧光 RT-PCR 反应体系

荧光 RT-PCR 反应体系见表 C.1。

表 C.1 荧光 RT-PCR 反应体系

组分	1 个检测反应的加入量
5×RT-PCR buffer	10 μL
M-MLV 反转录酶(200 U/μL)	0.3 μL
Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)	1.7 μL
RNA 酶抑制剂(40 U/μL)	0.5 μL
dNTPs (100 mmol/L)	0.4 μL
M-qF(10 μmol/L)	1 μL
M-qR(10 μmol/L)	1 μL
M-P(10 μmol/L)	0.6 μL
NSP2-qF(10 μmol/L)	1 μL
NSP2-qR(10 μmol/L)	1 μL
NSP2-P(10 μmol/L)	0.6 μL
IC-F(10 μmol/L)	0.5 μL
IC-R(10 μmol/L)	0.5 μL
IC-P2(10 μmol/L)	0.5 μL
DEPC 水	25.2 μL
合计	44.8 μL
