



中华人民共和国国家标准

GB/T 35911—2018

伪狂犬病病毒荧光 PCR 检测方法

Real-time PCR method for detection of pseudorabies virus

青岛立见诊断技术发展有限公司
提供下载 www.qdljdi.com

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、中国检验检疫科学研究院、湖南圣湘生物科技有限公司。

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

青岛立见诊断技术发展中心
提供下载 www.qdregen.com

伪狂犬病病毒荧光 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了伪狂犬病病毒荧光 PCR 检测的操作方法。
本标准适用于伪狂犬病病毒核酸检测。

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。

荧光 PCR 荧光聚合酶链式反应(real-time 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)

DNA 脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

Taq 酶 Taq DNA 聚合酶(Taq DNA polymerase)

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

PRV 伪狂犬病病毒(pseudorabies virus)

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 普通冰柜:—20℃以下。

4.6 超低温冰箱:可控温至—70℃以下。

4.7 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。

4.8 高压灭菌锅。

5 耗材

5.1 1.5 mL 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 DNAzol,商品化 DNA 抽提试剂,于 2 ℃~8 ℃保存。
- 6.3 无水乙醇,-20 ℃预冷。
- 6.4 75%乙醇,无水乙醇和双蒸水配制,-20 ℃预冷。
- 6.5 8 mmol/L NaOH 溶液,配制见附录 A。
- 6.6 PBS 缓冲液,配制见附录 A。
- 6.7 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。
- 6.8 dNTPs:含 dATP、dGTP、dCTP、dTTP 各 10 mmol/L,-20 ℃保存,避免反复冻融。
- 6.9 引物和 TaqMan 探针,其序列见附录 B。
- 6.10 伪狂犬病病毒阳性对照样品和阴性对照样品:阳性对照使用灭活疫苗或组织培养灭活毒,-20 ℃保存备用;阴性对照可采用健康猪的组织材料。
- 6.11 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 一次性无菌采样拭子。
- 7.1.3 组织研磨器或者研钵,经 160 ℃干热灭菌 2 h。
- 7.1.4 真空采血管。

7.2 样品采集

- 7.2.1 血液样品采集:用无菌注射器采集血液,注入含 1/10 4% EDTA 溶液的无菌容器中,充分混匀,编号备用。
- 7.2.2 精液样品采集:按照 GB/T 25172 的方法采集和保存精液。
- 7.2.3 鼻拭子采集:用棉拭子取受检动物鼻腔分泌物,置于 2 mL PBS 缓冲液中备用。
- 7.2.4 组织样品采集:取大脑海马背侧皮层、中脑、脑桥、三叉神经节、扁桃体、肺脏、淋巴结等组织,置于无菌离心管内,编号备用。
- 7.2.5 细胞培养物:细胞培养物反复冻融三次,第 3 次解冻后,将细胞培养物置于 1.5 mL 无 DNA 酶的灭菌离心管内,编号备用。

7.3 样品保存和运输

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 ℃ \pm 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 血液和精液样品无需进行前处理,直接用于核酸提取。
- 7.4.2 鼻拭子样品:充分涡旋震荡含有鼻拭子的管子 1 min~3 min,弃去拭子后 2 000 r/min 离心

5 min,取上清后用于后续的核酸提取。

7.4.3 组织样品:取1 g解冻的组织,剪碎,加入2 mL PBS缓冲液进行研磨,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。

7.4.4 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 PCR 操作程序

8.1 DNA 抽提

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

8.1.2 取 n 个灭菌的1.5 mL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800 μ L DNAzol,再分别加入被检样品、阳性对照、阴性对照各200 μ L,颠倒10次混匀,4 ℃或室温10 000 r/min离心10 min。

8.1.4 取900 μ L上清,置新的1.5 mL灭菌离心管中,加入500 μ L无水乙醇,混匀,室温放置3 min;4 ℃或室温10 000 r/min离心5 min。

8.1.5 弃上清,沿管壁缓缓加入0.8 mL~1 mL 75%乙醇,颠倒3次~6次混匀,4 ℃10 000 r/min离心5 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 用30 μ L 8 mmol/L NaOH溶液溶解沉淀,DNA在2 ℃~8 ℃冰箱可保存两个月,-20 ℃冰柜可稳定保存两年。

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39.8 μ L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 μ L的内参照质粒,并分别加入8.1制备的核酸10 μ L DNA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,预反应50 ℃/2 min;

第二阶段,预变性95 ℃/2 min;

第三阶段,变性 95 °C/15 s,退火、延伸、荧光采集 60 °C/30 s,40 个循环;

第四阶段,冷却 25 °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 PRV 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 PRV 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 以上要求需在同一实验同时满足,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 PRV 核酸阳性; $38 < C_t$ 值 ≤ 40 ,判定为可疑,可疑样品须重复检测。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 PRV 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 PRV gE 缺失株核酸阳性。

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 PRV 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 8 mmol/L NaOH 溶液

称量 0.32 g NaOH, 溶解到 1 000 mL 去离子水中, 混匀, 分装, 常温保存。

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 °C、15 min 高压灭菌后备用。

青岛立见诊断技术发展中心
提供下载 www.qdregen.com

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
gH-qF	5'-ACGCTCGGCTTCCTCTCC-3'
gH-qR	5'-GGTAGTCGTCGCTCTCGTG-3'
gH-P(探针)	5'-FAM-TCGCGCATCGTCTGGTGCAT-BHQ1-3'
gE-qF	5'-GCTGTACGTGCTCGTGAT-3'
gE-qR	5'-TCAGCTCCTTGATGACCGTGA-3'
gE-P(探针)	5'-HEX-CACAACGGCCACGTGCCACCTG-BHQ1-3'
IC-F	5'-AAGTGCTCGGTGCCTTTAGTG-3'
IC-R	5'-GTCCCATAGACTCACCTGAAGT-3'
IC-P(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 $\mu\text{mol/L}$ 储存浓度， $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用，保存期为 1 年；根据需要配制成 10 $\mu\text{mol/L}$ 工作液， $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存供检测使用，如经常使用反复冻融，有效期为 3 个月。

附 录 C
(规范性附录)
荧光 PCR 反应体系

荧光 PCR 反应体系见表 C.1。

表 C.1 荧光 PCR 反应体系

组 分	1 个检测反应的加入量
10×PCR Buffer	5 μL
Taq 酶 (5 U/μL)	2 μL
dNTPs(100 mmol/L)	1.5 μL
Mg ²⁺ (1 mol/L)	0.25 μL
gH-qF(10 μmol/L)	1 μL
gH-qR(10 μmol/L)	1 μL
gH-P(10 μmol/L)	1 μL
gE-qF(10 μmol/L)	1 μL
gE-qR(10 μmol/L)	1 μL
gE-P(10 μmol/L)	0.6 μL
IC-F(10 μmol/L)	0.5 μL
IC-R(10 μmol/L)	0.5 μL
IC-P(10 μmol/L)	0.5 μL
ddH ₂ O	23.95 μL
合计	39.8 μL