

中华人民共和国国家标准

GB/TXXXXX—XXXX

猪瘟病毒 RT-nPCR 检测方法

Method of RT-nPCR for Detection of

Classical Swine Fever Virus

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

(征求意见稿)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 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。

本标准的附录 A 为规范性附录，附录 B 为资料性附录。

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归口。

本标准起草单位：军事医学科学院军事兽医研究所、中国兽医药品监察所。

本标准主要起草人：郭焕成、王琴、徐璐、冯焯、张乾义、赵启祖、邹兴启，朱圆源，涂长春。

猪瘟病毒 RT-nPCR 检测方法

1 范围

本标准规定了猪瘟病毒特异的套式RT-PCR (RT-nPCR) 方法的技术要求。

本标准适用于可能感染猪瘟病毒的猪活体或其脏器、血液、排泄物和细胞培养物中猪瘟病毒核酸的检测，可用于猪瘟的诊断和监测。

本标准的猪瘟病毒套式RT-PCR (RT-nPCR) 方法不能区分感染的猪瘟病毒野毒株和免疫的疫苗株。

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，仅所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 27540 猪瘟病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

猪瘟病毒 Classical swine fever virus, CSFV

猪瘟病毒是猪瘟 (Classical swine fever, CSF) 的病原体，感染猪和野猪。猪瘟是一种急性、热性、高度接触性传染病，以高热、出血和高死亡率为特征。猪瘟病毒为单股正链RNA病毒，黄病毒科瘟病毒属成员，病毒粒子略呈圆形，直径40-60nm，外包脂质囊膜，内部为二十面体对称的核衣壳。

3.2

反转录套式聚合酶链式反应 Reverse transcription nested polymerase chain reaction, RT-nPCR

反转录套式聚合酶链式反应即以RNA为模板反转录成cDNA，再以cDNA为模板进行套式PCR。套式PCR又称巢式PCR，使用两对PCR引物扩增完整的片段。第一对PCR引物扩增片段和普通PCR相似。第二对引物称为套式引物，其结合在第一次PCR产物内部，使得第二次PCR扩增片段短于第一次扩增片段。套式PCR的优势在于，如果第一次扩增产生了错误片段，则第二次能在错误片段上进行引物配对并扩增的概率极低。因此，套式PCR的扩增特异性高。同时，通过两次PCR反应，显著提高了核酸检测的灵敏度。

3.3

DEPC

焦碳酸二乙酯 (Diethyl pyrocarbonate)。DEPC是RNA酶的化学修饰剂，和RNA酶的活性基团组氨酸的咪唑环反应而抑制RNA酶活性。

4 实验前准备

4.1 实验室条件

4.1.1 实验室分区：PCR 实验室分区包括核酸提取区、PCR 反应体系配制区—配液区、扩增区、电泳区。流程顺序为核酸提取区→配液区→扩增区→电泳区。各区仪器和耗材专用。

4.1.2 实验室应配备的仪器及器材

4.1.2.1 仪器：II 级生物安全柜、台式高速冷冻离心机、普通冰箱（-20℃和 4℃）、分析天平、PCR 扩增仪、电泳仪、电泳槽、紫外凝胶成像仪（或紫外分析仪）、组织研磨器、扁桃体采样器、微波炉、单道可调移液器（2μL、10μL、200μL、1000μL）。

4.1.2.2 器材：无菌注射器、眼科剪、眼科镊、称量纸、棉拭子、灭菌牙签、500mL 量筒、500mL 锥形瓶、一次性无 RNA 酶吸头（10μL、200μL、1000μL）、1.5mL 无 RNA 酶离心管、0.2mL 薄壁 PCR 管。

4.2 化学药品及试剂

4.2.1 总 RNA 提取试剂 Trizol。

4.2.2 TAE 电泳缓冲液的制备，配制方法见附录 A。

4.2.3 1%琼脂糖凝胶，配制方法见附录 A。

4.2.4 其它试剂：200U/μL M-MLV 反转录酶，5×M-MLV 缓冲液，40U/μL RNA 酶抑制剂，DEPC-H₂O，5U/μL Ex-Taq DNA 聚合酶，10×Ex-Taq 缓冲液（Mg²⁺ Plus），6 碱基随机引物（50μM），6×上样缓冲液，dNTPs（2.5 mM/dNTP），异丙醇，氯仿，75%乙醇，ddH₂O，溴化乙啶替代染料，DL2000 DNA Marker，阴性对照（DEPC-H₂O），阳性对照（猪瘟病毒阳性组织样品或细胞培养上清）。

4.2.5 引物序列及配制方法，见附录 B。

5 方法

5.1 样品的采集、保存和运送

5.1.1 采样注意事项

采样及样品前处理过程中应戴一次性手套，样品间不得交叉污染。

5.1.2 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5～10min，经清水冲洗；牙签经121℃高压灭菌15min；剪、镊经160℃干烤2h。

5.1.3 采样及样品处理方法

5.1.3.1 活体样品

用鼻捻子固定活猪的上颌，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1.5mL 离心管并作标记，编号，置于样品冷藏箱送至实验室。

实验室内取待检样品置于组织研磨器，加入5倍体积4℃预冷的DEPC-H₂O，充分研磨，4℃、3000g离心15min，取上清液转入离心管中编号备用。

5.1.3.2 组织样品

采取病死猪或安乐死的猪组织和脏器（淋巴结、脾脏、肾脏、肝脏和回肠等）装入一次性塑料袋或其它灭菌容器，编号，置于样品冷藏箱送至实验室。

实验室内取50mg~100mg待检组织样品置于组织研磨器，加入5倍体积4℃预冷的DEPC-H₂O，充分研磨，4℃、3000g离心15min，取上清液转入离心管中编号备用。

5.1.3.3 4%EDTA 抗凝血

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

5.1.3.4 排泄物

用棉拭子挑取少许新鲜粪便样品于离心管中，加入适量生理盐水，震荡混匀，4℃、3000g离心15min，取上清液转入离心管中编号备用。其余液体排泄物离心后直接转入离心管编号备用。

5.1.3.5 细胞培养物

细胞培养物冻融3次，转入离心管中编号备用。

5.1.3.6 存放与运送

采集或处理的样品在2~8℃条件下保存应不超过24h；若需长期保存，应放置-80℃冰箱，但应避免反复冻融（冻融不超过3次）。采集的样品放入样品管中密封后，采用保温容器加冰袋或干冰，在24h内运送到实验室。

5.2 核酸提取

采用Trizol方法提取样品总RNA。

5.2.1 取 n 个 1.5mL 离心管，其中 n 为待检样品数+阳性对照管数+阴性对照管数，对每个离心管进行编号。

5.2.2 每管加入 500μL Trizol，分别加入待检样品、阳性对照和阴性对照各 200μL，一份样品换一个吸头，充分混匀，静置 10min；再加入 200μL 氯仿，混匀器上振荡混匀 5s（不能过于强烈，以免产生乳化层，也可以用手颠倒混匀）。于 4℃、13 000g 离心 15min。

5.2.3 取与本标准 5.2.1 中相同数量的 1.5mL 离心管，加入 400μL 异丙醇（4℃预冷），对每个管进行编号。取本标准 5.2.2 离心后的上清液约 400μL（注意不要吸出中间层）转移至相应的管中，颠倒混匀，-20℃静置 20min。

5.2.4 于 4℃、13 000g 离心 15min，小心倒去上清，加入 700μL 75%乙醇，颠倒洗涤。

5.2.5 于 4℃、8000g 离心 6min，小心倒去上清，沉淀室温干燥 10~15min。

5.2.6 加入 20μL DEPC-H₂O，轻轻混匀，溶解管壁上的 RNA 沉淀，冰上保存备用。提取的 RNA 须在 2h 内进行 RT 扩增，若需长期保存须放至-80℃冰箱。

5.3 反转录

以随机引物为反转录引物，建立20μL反转录体系，制备cDNA：

| | |
|-------------|-------|
| dNTPs | 4.0μL |
| 随机引物 | 1.5μL |
| 5×M-MLV 缓冲液 | 4.0μL |
| 反转录酶 M-MLV | 1.0μL |
| RNA 酶抑制剂 | 1.0μL |
| 总 RNA | 8.5μL |

42℃1.5h，95℃5min。

5.4 建立 50μL 外套 PCR 反应体系

| | |
|---------------------------------------|--------|
| ddH ₂ O | 36.7μL |
| 10×Ex-Taq 缓冲液 (Mg ²⁺ Plus) | 5.0μL |
| 外套上游引物 | 1.0μL |
| 外套下游引物 | 1.0μL |
| dNTPs | 4.0μL |
| Ex-Taq DNA 聚合酶 | 0.3μL |
| cDNA | 2.0μL |

PCR条件: 95℃5min→(95℃45s→55℃1min→72℃1min) 35个循环→72℃7min→4℃。

5.5 建立 50μL 内套 PCR 反应体系

取2μL外套PCR产物作为内套PCR的模板进行套式PCR, 建立50μL内套PCR反应体系:

| | |
|---------------------------------------|--------|
| ddH ₂ O | 36.7μL |
| 10×Ex-Taq 缓冲液 (Mg ²⁺ Plus) | 5.0μL |
| 内套上游引物 | 1.0μL |
| 内套下游引物 | 1.0μL |
| dNTPs | 4.0μL |
| Ex-Taq DNA 聚合酶 | 0.3μL |
| 外套 PCR 产物 | 2.0μL |

PCR条件: 95℃5min→(95℃45s→55℃1min→72℃45s) 35个循环→72℃7min→4℃

5.6 电泳

5.6.1 配制适量的电泳及制胶用的缓冲液 (通常是 1×TAE)。

5.6.2 配制 1%琼脂糖凝胶 (见附录 A)。

5.6.3 将琼脂糖溶液倒入制胶模中, 然后在适当位置处插上梳子。凝胶厚度一般为 4~5mm。

5.6.4 取 5μL 内套 PCR 产物与 1μL 6×上样缓冲液混匀, 用移液器将其加入加样孔中。

5.6.5 接通电源, 以 120v 电压进行电泳, 30min 后停止电泳。

5.6.6 用凝胶成像仪观察并保存结果。

5.7 结果判定

阴性对照无凝胶成像条带且阳性对照可见272bp目的条带, 实验成立。若成像系统中无272bp的目的条带, RT-nPCR反应为阴性, 表示样品中无猪瘟病毒核酸。若成像系统中有272bp的目的条带, RT-nPCR反应为阳性, 表示样品中有猪瘟病毒核酸。若目的条带模糊难以判别时, 建议重复检测一次, 复检后仍模糊, 结合GB/T 27540检测判断结果。

示例 1:

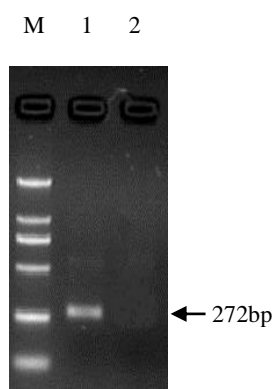


图1 套式 RT-PCR 检测结果的电泳图示例

M: DL2000 DNA Marker

1: 阳性对照

2: 阴性对照

5.8 基因测序

根据需要，可进一步将阳性PCR扩增产物用内套PCR上游、下游引物进行双向测序，获得CSFV的PCR扩增区基因序列。

6 注意事项

- 6.1 检测后的废弃物品需浸入1%次氯酸钠溶液的污物缸内30min，后经高压处理。
- 6.2 RT-nPCR实验室各分区器材试剂专用，不可跨区流动使用，防止污染。实验结束后立即用75%酒精或紫外灯对工作环境消毒处理。
- 6.3 所用试剂应在规定的温度下保存，用毕立即放回原处。反转录酶和DNA聚合酶现用现取，其他试剂使用前需室温融化。配制反转录和PCR反应体系时，应将反应体系和融化的试剂暂放于冰盒。
- 6.4 提取RNA时，须戴口罩、乳胶手套，尽量避免交谈，缩短操作时间，防止唾液和皮肤上RNA酶的污染。使用酒精棉清洁实验工作台、移液器等实验器材。
- 6.5 因套式PCR极其敏感，样品处理和核酸提取过程中使用的塑料管和吸头等材料均需一次性使用，不得重复利用。
- 6.6 推荐使用免处理的无核酸酶的一次性耗材。用灭菌的镊子夹取离心管，且离心管开盖、扣盖时避免接触管口。
- 6.7 检测试剂在使用前需经2000g离心15s，使液体全部沉降于管底。配制分装反应体系时应避免产生气泡。
- 6.8 按要求准确吸取各种试剂。
- 6.9 移液器、PCR仪等应定期校验。

附 录 A
(规范性附录)
溶液的制备

A.1 TAE电泳缓冲液的制备

A.1.1 0.5mol/L 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA) 溶液 (pH8.0)

| | |
|------------|------------|
| 二水乙二胺四乙酸二钠 | 18.61g |
| 灭菌双蒸水 | 80mL |
| 氢氧化钠 | 调 pH 至 8.0 |
| 灭菌双蒸水 | 加至 100mL |

A.1.2 TAE电泳缓冲液 (50倍) 配制

| | |
|------------------------------|------------|
| 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) | 242g |
| 冰乙酸 | 57.1mL |
| 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液 (pH8.0) | 100mL |
| 灭菌双蒸水 | 加至 1 000mL |

A.2 1%琼脂糖凝胶的配制

| | |
|------------------|------|
| 琼脂糖 | 1g |
| TAE 电泳缓冲液 (50 倍) | 2mL |
| 灭菌双蒸水 | 98mL |

微波炉中完全融化，加溴化乙啶替代染料溶液 5 μ L。

注：用于电泳的缓冲液和用于制胶的缓冲液必须统一。

附 录 B
(资料性附录)
引物

B.1 引物信息 见表B.1

表B.1 猪瘟病毒套式 RT-PCR 引物信息

| 引物名称 | 引物序列 (5' -3') | 扩增片段长度 |
|---|---|--------|
| 外套上游引物 | 5' AGR CCA GAC TGG TGG CCN TAY GA 3' (2228-2250)* | 671bp |
| 外套下游引物 | 5' TTY ACC ACT TCT GTT CTC A 3' (2898-2880)* | |
| 内套上游引物 | 5' TCR WCA ACC AAY GAG ATA GGG 3' (2477-2497)* | 272bp |
| 内套下游引物 | 5' CAC AGY CCR AAY CCR AAG TCA TC 3' (2748-2726)* | |
| 注1: R (AG), Y (CT)。 | | |
| 注2: 引物使用时以 DEPC-H ₂ O 稀释至 10μmol/L, 于-20℃保存。 | | |

* 括号中数字为引物序列在CSFV Alfort-187株基因组中的位置。

参 考 文 献

- [1]GB/T1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》。
- [2]GB/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法。
- [3]GB 19489 实验室生物安全通用要求。
- [4]GB/T 27401 实验室质量控制规范动物检疫。
- [5]EU Diagnostic Manual for Classical Swine fever (CSF) Diagnosis: Technical Part (Second Draft March 2002)。
- [6] OIE Biological Standards Commission. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animal. 2014。
-