



中华人民共和国国家标准

GB/T 22915—2008

口蹄疫病毒荧光 RT-PCR 检测方法

Protocol of universal fluorogenic RT-PCR for foot and mouth disease virus

2008-12-31 发布

2009-05-01 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

本标准参考了世界动物卫生组织(OIE)《陆生动物诊断试验和疫苗手册(哺乳动物、禽鸟与蜜蜂)》(第5版)。

本标准的附录 A、附录 C 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。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、中华人民共和国云南出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人:花群义、杨云庆、秦智锋、周晓黎、卢体康、董俊、陶虹、阮周曦、叶弈优、林祥梅、吴绍强。

口蹄疫病毒荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了口蹄疫病毒荧光 RT-PCR 检测的操作方法。
本标准适用于动物及其动物产品中口蹄疫病毒的检测。

2 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

2.1 荧光 RT-PCR

荧光反转录-聚合酶链反应。

2.2 Ct 值

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。

2.3 RNA

核糖核酸。

2.4 DEPC

焦碳酸磷酯。

2.5 PBS

磷酸盐缓冲盐水,配方见附录 A。

2.6 Taq 酶

TaqDNA 聚合酶。

2.7 FMDV

口蹄疫病毒。

3 原理

根据口蹄疫病毒各型共有的基因特定序列的保守片段,合成一对通用的特异性引物和一条通用的特异性探针。荧光探针的 5'端标记 FAM 荧光素,3'端标记 TAMRA 荧光素,3'端的淬灭基团在近距离内能吸收 5'端报告荧光基团发出的荧光信号。但在扩增时,由于 Taq 酶的 5'→3'的外切活性,在延伸到荧光探针时,将其切断,两基团分离,淬灭作用消失,荧光信号产生。因此,可以通过检测荧光信号对核酸模板进行检测。

4 材料与试剂

4.1 仪器与器材

4.1.1 荧光 RT-PCR 检测仪。

4.1.2 高速台式冷冻离心机(离心速度 12 000 r/min 以上)。

4.1.3 台式离心机(离心速度 3 000 r/min)。

4.1.4 混匀器。

4.1.5 冰箱(2℃~8℃和-20℃两种)。

4.1.6 微量可调移液器(5 μL,10 μL,100 μL,1 000 μL)及配套带滤芯吸头。

4.1.7 Eppendorf 管(1.5 mL)、透明薄壁 PCR 管(0.2 mL)。

4.2 试剂

4.2.1 除特别说明以外,本标准所用试剂均为分析纯,所有试剂均用无 RNA 酶污染的容器(用 DEPC 水处理后高压灭菌)分装。

4.2.2 三氯甲烷。

4.2.3 异丙醇: -20 °C 预冷。

4.2.4 PBS: 配制见附录 A。

4.2.5 75%乙醇: 用新开启的无水乙醇和 DEPC 水配制, -20 °C 预冷。

4.2.6 引物: 上游引物 5'-TTACAAACCTGTGATCGCCTC-3', 下游引物 5'-CGGAGATCAACT-TCTCCTGTATG-3'。

4.2.7 荧光双标记探针(10 μmol/L): (FAM)5'-CCTCTCCTTTGCACGCCGTGG-3'(TAMRA)。

4.2.8 口蹄疫病毒通用荧光 RT-PCR 检测试剂盒: 组成、功能及使用注意事项参见附录 B。

5 抽样

5.1 采样工具

5.1.1 下列采样工具应经 121 °C ± 2 °C, 15 min 高压灭菌并烘干。

5.1.2 棉拭子。

5.1.3 剪刀、镊子。

5.1.4 注射器。

5.1.5 1.5 mL Eppendorf 管。

5.1.6 研钵。

5.2 样品采集

5.2.1 采集的样品主要是口腔、蹄冠上的水泡上皮组织、水泡液、血液、口腔分泌物和组织。采集后立即冷藏送检或置于含抗生素的 PBS 缓冲液中低温保藏, 编号并作好记录。

5.2.2 水泡液及水泡皮: 用 75% 酒精轻轻消毒水泡表皮, 去掉污物, 用灭菌生理盐水擦去酒精, 然后用无菌注射器穿刺水泡吸取水泡液, 置于含抗生素的 PBS 缓冲液灭菌瓶中。水泡液采取后, 将水泡皮以无菌术剪下, 放入含抗生素的 PBS 缓冲液中。

5.2.3 口腔分泌物和咽喉拭子: 用拭子采取口腔分泌物或将拭子深入口腔内来回刮 3 次~5 次取分泌物, 拭子一并放入盛有 1.0 mL 含抗生素的 PBS 缓冲液的 1.5 mL Eppendorf 管中。也可用食道探杯刮取咽喉液体, 放入加有抗生素的 PBS 中。编号, 冷藏送检或低温保藏。

5.2.4 血液: 用真空采血管或无菌注射器直接采取至无菌 Eppendorf 管中, 密封、编号后保存于 4 °C 或送检。

5.2.5 肌肉或组织脏器: 无菌采集待检样品, 装入一次性塑料袋或其他灭菌容器, 编号, 冷藏送检或低温保藏。

5.3 样品贮运

样品采集后, 放入密闭的塑料袋内(一个采样点的样品, 放入一个塑料袋内), 于保温箱中加冰、密封, 送实验室。

5.4 样品制备

5.4.1 水泡液、血液和口腔分泌物

样品在混匀器上充分混合后, 用经高压灭菌的镊子将拭子中的液体挤出, 室温放置 30 min, 取上清液转入无菌的 1.5 mL Eppendorf 管中, 编号备用。

5.4.2 水泡皮、肌肉或组织脏器

取待检样品 2.0 g 于洁净、灭菌并烘干的研钵中充分研磨, 加 10 mL PBS 混匀, 4 °C 下 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清液转入无菌的 1.5 mL Eppendorf 管中, 编号备用。

5.5 样本存放

制备的样本在 2℃~8℃ 条件下保存应不超过 24 h, 若需长期保存应置 -70℃ 以下, 但应避免反复冻融(冻融不超过三次)。

6 操作方法

6.1 实验室标准化设置与管理要求

口蹄疫病毒荧光 RT-PCR 检测的实验室规范, 见附录 C。

6.2 样本的处理

6.2.1 在样本制备区进行。样品中总 RNA 提取的试剂盒, 有商品化试剂盒出售, 也可自行配制。

6.2.2 取 n 个灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管, 其中 n 为被检样品、阳性对照与阴性对照的数量之和, 编号。

6.2.3 每管加入 600 μL 裂解液, 分别加入被检样本、阴性对照、阳性对照各 200 μL , 一份样本换用一个吸头, 再加入 200 μL 氯甲烷, 混匀器上振荡混匀 5 s。于 4℃、以 12 000 r/min 离心 15 min。

6.2.4 取与 6.2.2 相同数量灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管, 各加入 500 μL 异丙醇(-20℃ 预冷), 做标记。吸取 6.2.3 各管中的上清液, 移至相应管中, 每管至少吸取 500 μL , 不能吸出中间层, 颠倒混匀。

6.2.5 于 4℃、以 12 000 r/min 离心 10 min (Eppendorf 管保持朝离心机转轴方向放置), 小心倒去上清液, 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; 加入 600 μL 75% 乙醇, 颠倒洗涤。

6.2.6 于 4℃、以 12 000 r/min 离心 10 min (Eppendorf 管保持朝离心机转轴方向放置), 小心倒去上清液, 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。

6.2.7 以 4 000 r/min 离心 10 s (Eppendorf 管保持朝离心机转轴方向放置), 将管壁上的残余液体甩到管底部, 小心倒去上清液, 用微量加样器将其吸干, 一份样本换用一个吸头, 吸头不要碰到有沉淀一面, 室温干燥 3 min, 不能过于干燥, 以免 RNA 不溶。

6.2.8 各管加入 1 mL DEPC 水, 轻轻颠倒溶解管壁上的 RNA, 以 2 000 r/min 离心 5 s, 冰上保存备用。提取的 RNA 应在 2 h 内进行 PCR 扩增, 扩增产物应保存在 -70℃ 冰箱。

6.3 检测

6.3.1 扩增试剂准备

在反应混合物配制区进行。从试剂盒中取出相应的荧光 RT-PCR 反应液、Taq 酶, 在室温下融化后, 以 2 000 r/min 离心 5 s。设所需荧光 RT-PCR 检测总数为 n ($n = u + 2 + 1$), 其中 u 为被检样品数、2 为阳性对照数、1 为阴性对照数, 按表 1 配制反应体系混合液。

表 1 配制反应体系混合液

| 序号 | 组分 | 每管用量/ μL | n 管总用量/ μL |
|----|-----------------------------|---------------------|-------------------------|
| 1 | 荧光 RT-PCR 反应液(2 \times) | 25 | $n \times 25$ |
| 2 | Taq 酶 | 1 | $n \times 1$ |
| 3 | RT-PCR 反转录酶颗粒 | 1/2(颗) | $n \times 1/2$ (颗) |
| 4 | RNA 酶抑制剂(RNasin) | 1 | $n \times 1$ |
| 5 | ROX 参考染料(ROX reference dye) | 1 | $n \times 1$ |
| 6 | DEPC 水 | 12 μL | $n \times 12$ |

6.3.2 反应体系混合液分装

根据测试样品的数量(n), 向配制的反应体系混合液中加入 $n \times 1/2$ 颗 RT-PCR 反转录酶颗粒, 充

分混合均匀,按每个 PCR 管 40 μL 分装于 0.2 mL 透明 PCR 管,将荧光 PCR 管放于 96 孔板上,一定要按顺序记录好被检样品管、阳性对照管、阴性对照管。转移至样本处理区。

6.3.3 加样

在样本处理区进行。在各设定的 PCR 管中分别加入 6.2.8 中制备的 RNA 溶液 10 μL ,盖紧管盖,500 r/min 离心 30 s。转移至检测区。

6.3.4 荧光 RT-PCR 检测

6.3.4.1 在检测区进行。将 6.3.3 中离心后的 PCR 管放入荧光 RT-PCR 检测仪内,记录样本摆放顺序。在 96 孔板内(表内)记录或填写被检样品(Unknown)、阳性对照(PC)、阴性对照(NTC)。设置探针:5'为 FAM,3'为 TAMRA。

6.3.4.2 循环条件设置:

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

——第二阶段,预变性 94 $^{\circ}\text{C}$,3 min;

——第三阶段,94 $^{\circ}\text{C}$ /10 s,45 $^{\circ}\text{C}$ /30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ /1 min,5 个循环;

——第四阶段,94 $^{\circ}\text{C}$ /10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ /30 s,40 个循环,在第四阶段每个循环的退火延伸时收集荧光;试验检测结束后,根据收集的荧光曲线和 C_t 值判定结果。

7 结果判定

7.1 结果分析条件设定

直接读取检测结果。基线和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。

7.2 质控标准

7.2.1 阴性对照无 C_t 值,并且无扩增曲线,一直为水平线。

7.2.2 阳性对照的 C_t 值应小于 28.0,并出现典型的扩增曲线,2 个阳性对照扩增曲线基本重合。否则,此次实验视为无效。

7.3 结果描述及判定

7.3.1 阴性

无 C_t 值并且无扩增曲线,表示样品中无口蹄疫病毒。

7.3.2 阳性

C_t 值小于等于 30.0,且出现典型的扩增曲线,表示样品中存在口蹄疫病毒。

7.3.3 有效原则

C_t 值在 30.0~38.0 的样品建议重做。重做结果无 C_t 值者为阴性,否则为阳性。

附 录 A
(规范性附录)
试剂的配制

A.1 A液

0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液:磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 27.6 g,溶于蒸馏水中,最后稀释至 1 000 mL。

A.2 B液

0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液:磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 53.6 g(或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.6 g,或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 35.6 g),加蒸馏水溶解,最后稀释至 1 000 mL。

A.3 0.01 mol/L、pH7.2 磷酸盐缓冲盐水(PBS)的配制

取 A液 14 mL,B液 36 mL,加氯化钠(NaCl)8.5 g,用蒸馏水稀释至 1 000 mL。经 $121\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ 15 min 高压灭菌,冷却后,无菌条件下按每毫升加入 1 000 IU 青霉素、1 000 μg 链霉素。

附 录 B
(资料性附录)
试剂盒的组成

B.1 试剂盒组成

每个试剂盒可做 48 个检测,包括以下成分:

| | |
|-----------------------------|-----------------|
| 裂解液 | 30 mL×1 盒 |
| DEPC 水 | 2 mL×1 管 |
| RT-PCR 反应液(内含口蹄疫病毒的引物、探针) | 750 μ L×1 管 |
| RT-PCR 酶 | 2 颗粒×12 管 |
| <i>Taq</i> 酶 | 12 μ L×1 管 |
| 阴性对照 | 1 mL×1 管 |
| 阳性对照(非感染性体外转录 RNA) | 2 mL×1 管 |
| ROX 参考染料(ROX reference dye) | 0.1 mL×1 管 |

B.2 说明

B.2.1 裂解液的主要成分为异硫氰酸胍和酚,为 RNA 提取试剂,外观为红色液体,于 4 $^{\circ}$ C 保存。

B.2.2 DEPC 水,是用 1%DEPC 处理后的去离子水,用于溶解 RNA 和稀释标准品。

B.2.3 RT-PCR 反应液中含有特异性引物、探针及各种离子。

B.3 功能

试剂盒可用于动物组织样品(包括水泡皮、水泡液、组织、脏器、分泌物、血液、血清或血浆等)中口蹄疫病毒的检测。

B.4 使用时的注意事项

B.4.1 在检测过程中,应严防不同样品间的交叉污染。

B.4.2 反应液分装时应避免产生气泡,上机前检查各反应管是否盖紧,以免荧光物质泄露污染仪器。

B.4.3 RT-PCR 酶颗粒极易吸潮失活,应在室温条件下置于干燥器内保存,使用时取出所需数量,剩余部分立即放回干燥器中。

附录 C
(规范性附录)

口蹄疫病毒荧光 RT-PCR 检测方法的实验室规范

C.1 实验室设置要求

- C.1.1 实验室分为三个相对独立的工作区域:样本制备区、反应混合物配制区和检测区。
- C.1.2 工作区域应有明确标记,避免不同工作区域内的设备、物品混用。
- C.1.3 每一区域应有专用的仪器设备。
- C.1.4 整个实验过程中均应使用无 RNA 酶的一次性耗材,用到的玻璃器皿使用前应 250 °C 干烤 4 h 以上,以彻底去除 RNA 酶。
- C.1.5 各区域的仪器设备应有明确标记,以避免设备物品从各自的区域内移出,造成不同的工作区域间设备物品发生混淆。
- C.1.6 进入各个工作区域严格遵循单一方向顺序,即只能从样本制备区、扩增反应混合物配制区至检测区。
- C.1.7 在不同的工作区域应使用不同颜色或有明显区别标志的工作服,以便于鉴别;离开工作区时,不得将各区特定的工作服带出。
- C.1.8 实验室清洁时应按样本制备区、扩增反应混合物配制区至检测区的顺序进行。
- C.1.9 不同的实验区域应有其各自的清洁用具以防止交叉污染。

C.2 工作区域仪器设备配置

C.2.1 样本制备区(要求在负压实验室或具有三级生物安全实验室内进行操作,BSL-3)

样本制备区需配置以下仪器设备:

- 2 °C~8 °C 冰箱;
- 20 °C 冰箱;
- 高速台式冷冻离心机(4 °C,12 000 r/min);
- 混匀器;
- 常量加样器(0.5 μL、2 μL、5 μL、10 μL、20 μL、50 μL、100 μL、300 μL、1 000 μL);
- 可移动紫外灯(近工作台面)。

C.2.2 反应混合物配制区

反应混合物配制区需配置以下仪器设备:

- 2 °C~8 °C 冰箱;
- 20 °C 冰箱;
- 手掌式离心机(3 000 r/min);
- 混匀器;
- 微量加样器(0.5 μL、2 μL、5 μL、10 μL、20 μL、50 μL、100 μL、300 μL、1 000 μL);
- 可移动紫外灯(近工作台面)。

C.2.3 检测区

检测区需配置以下仪器设备:

- 荧光 PCR 仪(配计算机);
- 移动紫外灯;
- 打印机。

C.3 各工作区域功能及注意事项

C.3.1 样本制备区(要求在负压实验室或具有三级生物安全实验室内进行操作)

样本制备区的功能及注意事项如下:

- 标本的保存,核酸提取、贮存及其加入至扩增反应管,在样本制备区进行。
- 避免在本区内不必要的走动。可在本区内设立正压条件以避免邻近区的气溶胶进入本区造成污染。为避免样本间的交叉污染,加入待测核酸后,应立即盖紧含反应混合液的反应管。
- 用过的加样器吸头应放入专门的消毒(例如含次氯酸钠溶液)容器内。实验室桌椅表面每次工作后都要清洁,实验材料(原始样本、提取过程中样本与试剂的混合液等)如出现外溅,应作清洁处理并作记录。
- 对实验台适当的紫外照射(波长 254 nm,与工作台面近距离)有助于灭活去污染。工作后通过移动紫外线灯管来确保对实验台面的充分照射。

C.3.2 反应混合物配制区

反应混合物配制区功能及注意事项如下:

- 试剂的分装和反应混合液的制备在本区进行。
- 用于标本制备的试剂应直接运送至反应混合物配制区,不能经过检测区,在打开含有反应混合液的离心管或试管前,应将其快速离心数秒。
- 在整个本区的实验操作过程中,操作者应戴手套,并经常更换。工作结束后应立即对工作区进行清洁。本工作区的实验台表面应可耐受诸如次氯酸钠等化学物质的消毒清洁作用。
- 实验台表面用可移动紫外灯(波长 254 nm)进行照射。

C.3.3 检测区

检测区功能及注意事项如下:

- 基因片段(病毒 RNA 或 cDNA)的扩增及扩增片段的分析在本区内进行。
- 本区注意避免通过本区的物品及工作服将扩增产物带出。为避免气溶胶所致的污染,应尽量减少在本区内的走动。
- 完成操作及每天工作后都应对实验室台面进行清洁和消毒,紫外照射方法与前面区域相同。如有溶液溅出,应处理并作记录。本区的清洁消毒和紫外照射方法同前面区域。

C.3.4 使用时的注意事项

- 在检测过程中,应严防不同样品间的交叉污染。
- 反应液分装时应避免产生气泡,上机前检查各反应管是否盖紧,以免荧光物质泄露污染仪器。