



中华人民共和国国家标准

GB/T 22916—2008

水泡性口炎病毒荧光 RT-PCR 检测方法

Protocol of fluorogenic RT-PCR for vesicular stomatitis virus

青岛立见诊断技术发展中心
提供下载 www.qdregen.com

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
中国国家标准化管理委员会

发布

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 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。

本标准主要起草人:花群义、周晓黎、曾少灵、曹琛福、詹爱军、张彩虹、林庆燕、陈兵、杨云庆、孙洁。

青岛立见诊断技术发展中心
提供下载 www.qdregen.com

水泡性口炎病毒荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了水泡性口炎病毒荧光 RT-PCR 检测的操作方法。
本标准适用于动物及其产品中水泡性口炎病毒的检测。

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

焦碳酸二酯。

2.5 PBS

磷酸盐缓冲盐水(配方见附录 A)。

2.6 Taq 酶

Taq DNA 聚合酶。

2.7 VSV

水泡性口炎病毒。

3 原理

水泡性口炎病毒属 RNA 病毒,根据水泡性口炎病毒两型共有基因特定的序列,合成一对特异性引物和一条特异性的荧光双标记探针。通过严格设计和筛选的引物和探针,涵盖水泡性口炎病毒的两个型和突变株,为水泡性口炎病毒的特异性通用引物和探针。探针的 5'端标记 FAM 荧光素,它发出的荧光能够被检测仪器接收,称为报告荧光基团,3'端标记 TAMRA 荧光素,它在近距离内能吸收 5'端报告荧光基团发出的荧光信号,称为淬灭荧光基团。在扩增时,Taq 酶发挥它的 5'→3'端外切核酸酶的功能,将探针水解成单核苷酸,消除阻碍,标记在探针两端的报告荧光基团和淬灭荧光基团均游离于溶液中,仪器检测到发出的荧光信号。

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: 配方见附录 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 水泡性口炎病毒荧光 RT-PCR 检测试剂盒: 组成、功能及使用注意事项参见附录 B。

4.2.7 引物: 上游引物为 5'-ATGGCTCCTACAGTTAAGAGAATCA-3', 下游引物为 5'-TGAAG-TAATCAGCCGGGTATTC-3'。

4.2.8 荧光双标记探针(10 μmol/L): (FAM)5'-CGAAATTACCGGCCA ACGAGGATC-3' (TAM-AR)。扩增目标片段长度为 97 bp。

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放入含抗生素的 PBS 缓冲液中于 4 °C 环境中保藏。编号并作好记录。

5.2.2 水泡液及水泡皮: 只有当水泡完整时才能采集到水泡液。水泡一旦出现很快就会破溃, 所以要不失时机地采集水泡液。首先用 75% 酒精轻轻消毒水泡表皮, 尽量去掉污物, 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。

5.2.3 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。若水泡已经破溃, 则只能采集破溃的水泡皮, 用灭菌生理盐水冲洗掉水泡皮上的污物, 放入上述缓冲液中。

5.2.4 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。

5.2.5 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 环境中送检。

5.2.6 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、口腔分泌物、血液和精液

样品在混匀器上充分混合后, 用高压灭菌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 ℃ 下以 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,若需长期保存应置于 -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 实验室要求

水泡性口炎病毒荧光 RT-PCR 检测的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;各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;每一区域应有专用的仪器设备;进入各个工作区域应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。

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(阳性对照、阴性对照在试剂盒中已标出),编号。

6.2.3 每管加入 600 μ L 裂解液,分别加入被检样本、阴性对照、阳性对照各 200 μ L,一份样本换用一个吸头,再加入 200 μ L 三氯甲烷,在混匀器上振荡混匀 5 s(不能过于强烈,以免产生乳化层,也可以用手颠倒混匀)。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,加入 500 μ L 异丙醇(-20 ℃ 预冷),做标记。吸取 6.2.3 各管中的上清液转移至相应的管中,上清液应至少吸取 500 μ L,不能吸出中间层,颠倒混匀。

6.2.5 于 4 ℃、以 12 000 r/min 离心 15 min(Eppendorf 管开口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 μ L 75% 乙醇,颠倒洗涤。

6.2.6 于 4 ℃、以 12 000 r/min 离心 10 min(Eppendorf 管开口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,尽量沾干液体(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 管开口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 11 μ L DEPC 水,轻轻混匀,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;若需长期保存应放置于 -70 ℃ 冰箱内。

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,每个样品测试反应体系配制见表 1。

表 1 反应体系混合液的配制

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

根据测试样品的总数(n),计算好各试剂的使用量,加入到适当体积的试管中,向其中加入 $n \times 1/2$ (颗)RT-PCR 反转录酶颗粒,充分混合均匀,向每个 PCR 管中各分装 $40 \mu\text{L}$,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 $10 \mu\text{L}$,盖紧管盖,以 500 r/min 离心 30 s 。将 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 6.3.2 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 TAMAR。

6.3.4.2 循环条件设置:

- 第一阶段,反转录 $42^\circ\text{C}/30 \text{ min}$;
 - 第二阶段,预变性 $92^\circ\text{C}/3 \text{ min}$;
 - 第三阶段, $92^\circ\text{C}/10 \text{ s}$, $45^\circ\text{C}/30 \text{ s}$, $72^\circ\text{C}/1 \text{ min}$,5 个循环;
 - 第四阶段, $92^\circ\text{C}/10 \text{ s}$, $60^\circ\text{C}/30 \text{ s}$,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,表示样品中无水泡性口炎病毒。

7.3.2 阳性

C_t 值小于等于 30.0,且出现典型的扩增曲线,表示样品中存在水泡性口炎病毒。

7.3.3 有效原则

C_t 值在 30.0~35.5 的样本建议重做。重做结果无 C_t 值或大于 35.0 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 °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。

青岛立见诊断技术发展有限公司
提供下载 www.qdregen.com

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(内含水泡性口炎病毒的引物、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℃ 保存。
- B.2.2 DEPC 水是用 1%DEPC 处理后的去离子水,用于溶解 RNA。
- 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、血液等)中水泡性口炎病毒的检测。

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。