

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3991—2014

赤羽病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

Detection of akabane virus with real-time RT-PCR

2014-11-19 发布

2015-05-01 实施

中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布



前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国宁波出入境检验检疫局、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：张吉红、唐泰山、黄素文、李如松、倪健波、王建峰、张常印。

赤羽病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了赤羽病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法。
本标准适用于家畜及其产品中赤羽病毒的检验。

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 19489 实验室 生物安全通用要求

3 术语、定义和缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适应于本文件。

3.1.1

实时荧光 RT-PCR real time RT-PCR

在 RT-PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号的积累实时监控整个 RT-PCR 扩增过程。

3.1.2

Ct 值 cycle threshold

每个反应管内的荧光信号达到设定的域值时所经历的循环数。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

AKAV:赤羽病毒(Akabane virus)

DEPC:焦碳酸二乙酯(Diethylpyrocarbonate)

dNTP:脱氧核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate)

FAM:6-羧基荧光素(6-carboxyfluorescein)

PBS:磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline)

RNA:核糖核酸(Ribonucleic Acid)

SDS:十二烷基硫酸钠(Sodium dodecyl sulfate)

TAMRA:6-羧基四甲基罗丹明(6-carboxytetramethylrhodamine)

Tris:三(羟甲基)氨基甲烷[tris(hydroxymethyl)aminomethane]

Taq 酶:Taq DNA 聚合酶(Taq DNA polymerase)

4 仪器和设备

4.1 荧光定量 PCR 核酸扩增仪。

- 4.2 超净工作台。
- 4.3 电子天平。
- 4.4 高速冷冻离心机,台式小型离心机,微型离心机。
- 4.5 冷藏冷冻冰箱。
- 4.6 组织匀浆器。
- 4.7 旋涡震荡器。
- 4.8 微量移液器:2 μL 、10 μL 、20 μL 、100 μL 、200 μL 、1 000 μL 。
- 4.9 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱。
- 4.10 无 RNase 玻璃容器、无 RNase 离心管(1.5 mL)、无 RNase 吸头(20 μL 、200 μL 、1 000 μL)、无 RNase PCR 薄壁管、无 RNase 药匙:见 A.4。

5 试剂和材料

除另有规定外,试剂为分析纯或生化试剂。实验用水应符合 GB/T 6682 中一级水的规格。所有试剂均用无 RNA 酶污染的容器分装。

- 5.1 裂解液:Trizol 或其他等效裂解液。
- 5.2 三氯甲烷:异戊醇:体积分数 24:1。
- 5.3 异丙醇: $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷。
- 5.4 PBS(磷酸盐缓冲液):见 A.1。
- 5.5 无 RNase 水:见 A.2。
- 5.6 75%乙醇:见 A.3。
- 5.7 $10\times$ RT-PCR 缓冲液。
- 5.8 ROX reference dye。
- 5.9 EX Taq HS。
- 5.10 RNase Inhibitor。
- 5.11 M-MLV RTase。
- 5.12 引物和探针
引物和探针序列如下,其中探针的 5'端标记 FAM,3'端标记 TAMRA。
上游引物 AKAV-1:5'-CCC CTG GTG CTG AGA TGT TT-3'
下游引物 AKAV-2:5'-CTT CCT CAT GAA GTT GAC ATC CAT-3'
探针 AKAV probe:5'-ACC CAC TGG TTA TCG ACA TGC ACC G-3'

6 样品的采集和前处理

6.1 取样工具

- 6.1.1 棉拭子、剪刀、镊子、离心管。
- 6.1.2 所有上述取样工具应经 $121\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$,15 min 高压灭菌并烘干。
- 6.1.3 采样方法

6.2 活畜

用无菌注射器直接吸取血液至无菌离心管中,编号备用。

6.3 内脏或肌肉样品

用无菌的剪刀和镊子剪取待检样品 2.0 g 于组织匀浆器中,加入 10 mL PBS 匀浆,然后将组织悬液转入无菌离心管中 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液转入另一无菌离心管中,编号备用。

6.4 存放与运送

采集或处理的样本在 2 ℃~8 ℃ 条件下保存应不超过 24 h;若长期保存,应放置-70 ℃ 冰箱,但应避免反复冻融(最多冻融 3 次)。采集的样品密封后,采用保温壶或保温桶加冰密封,尽快运送到实验室。

7 操作方法

7.1 样本核酸的提取

在样本处理区进行。为防止 RNA 降解,所用实验用具及溶液应无 RNA 酶,操作过程中应自始至终佩戴一次性橡胶或乳胶手套,必要时更换,以避免将皮肤表面的 RNA 酶污染用具或带入溶液。

取 200 μL 病毒液或血清样品加入到 1.5 mL 离心管中,加入 1 000 μL Trizol 试剂,剧烈振荡 15 s 后,室温放置 5 min。在上述离心管中加入 200 μL 三氯甲烷,用手剧烈振荡 15 s 后室温放置 3 min。12 000 r/min 离心 15 min,离心管中液体分成 3 层,上层水相含有 RNA(若样品为病料组织,则需用酚:三氯甲烷、三氯甲烷各抽提一次)。小心吸出上层水相,转移至一个新的 1.5 mL 离心管中,加入 0.5 mL 异丙醇,在室温放置 10 min。12 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,加入 1 000 μL 75%乙醇,在混旋仪上混匀,7 500 r/min 离心 5 min。倒出上清液,放置 15 min 自然干燥。加入 20 μL DEPC 处理过的无 RNA 酶双蒸水重新溶解后在室温孵育 10 min。也可使用等效 RNA 提取试剂盒。提取的 RNA 应在 2 h 内进行 RT-PCR 扩增或放置于-70 ℃ 冰箱。

7.2 扩增试剂准备与配制

在反应混合物配制区进行。

检测赤羽病毒的一步法实时荧光 RT-PCR 反应体系见表 1。每个反应体系设置两个平行反应。反应体系中各试剂的量可根据具体情况或不同的反应总体积进行适当调整。可采用商业 RT-PCR 一步法或两步法试剂盒。以赤羽病毒 RNA 作为阳性对照,以不含有赤羽病毒的动物 RNA 作为阴性对照,以水代替模板作为空白对照。

表 1 实时荧光 RT-PCR 反应体系

名称	贮液浓度	终浓度	加样量/μL
RT-RCR 缓冲液	10×	1×	2.0
dNTPs	2.5 mmol/L	0.25 mmol/L	2.0
Mg ²⁺	25 mmol/L	1.9 mmol/L	1.5
引物 AKAV-1	20 μmol/L	0.6 μmol/L	0.6
引物 AKAV-2	20 μmol/L	0.6 μmol/L	0.6
探针 AKAV probe	10 μmol/L	0.3 μmol/L	0.6

SN/T 3991—2014

表 1 (续)

名称	贮液浓度	终浓度	加样量/ μL
ROX reference dye	50×	1×	0.4
EX Taq HS	5 U/ μL	0.1 U/ μL	0.4
M-MLV Rtas	200 U/ μL	2 U/ μL	0.2
RNase Inhibitor	40 U/ μL	0.8 U/ μL	0.4
模板			4.0
RNase free dH ₂ O			7.3
总体积			20.0

7.3 荧光 RT-PCR 反应

在检测区进行,将加样后的 PCR 管放入荧光 PCR 检测仪内,记录样本摆放顺序。反应参数设置: 50 °C 30 min; 95 °C 5 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环。

注: 可根据不同仪器或反应试剂盒的要求将反应参数作适当调整。

8 结果判断

8.1 结果分析条件设定

读取检测结果。阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照扩增曲线的最高点,不同仪器可根据仪器噪音情况进行调整。

8.2 质控标准

8.2.1 阴性对照: 无扩增曲线, Ct 值 > 38。

8.2.2 阳性对照: 出现典型的扩增曲线, Ct 值 ≤ 35。

8.2.3 否则, 试验视为无效。

8.3 结果判定

8.3.1 检测样品的 Ct 值 > 38 时, 则判定赤羽病毒核酸阴性。

8.3.2 检测样品的 Ct 值 ≤ 35 时, 且出现典型的扩增曲线, 则判定赤羽病毒核酸阳性。

8.3.3 检测样品的 Ct 值 > 35 且 ≤ 38 时, 或虽然 Ct 值 ≤ 35, 但扩增曲线不明显, 则应对样品进行复检; 若复检后, Ct 值 ≤ 38, 则判定赤羽病毒核酸阳性, Ct 值 > 38 则判定赤羽病毒核酸阴性。

8.4 结果验证与描述

样品的实时荧光 RT-PCR 结果为阳性时, 需将 PCR 产物进行克隆测序。把测序所得到的核苷酸序列与已知的赤羽病毒相应序列进行比对 (利用 NCBI 网站上的 BLAST 软件进行比对, 网址为 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)。若测序结果与赤羽病毒没有同源性, 则判定赤羽病毒核酸阴性。测序结果与赤羽病毒具有同源性, 则判定赤羽病毒核酸阳性。

9 生物安全措施

为了保护实验室人员的安全,应由具备资格的工作人员检测病毒,所有样品污染物应小心处置。并参见 GB 19489 中的有关规定执行。

SN/T 3991—2014

附 录 A
(规范性附录)
主要试剂及容器用具

A.1 磷酸盐缓冲液配方**A.1.1 A 液**

0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液

 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 27.6 g 溶于蒸馏水中,最后稀释至 1 000 mL。**A.1.2 B 液**

0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液

 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 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.1.3 磷酸盐缓冲生理盐水的配制(0.01 mol/L、pH 7.2)**

A 液 14 mL

B 液 36 mL

氯化钠 18.5 g

用蒸馏水稀释至 1 000 mL

A.2 无 RNase 超纯水

超纯水 100 mL

DEPC 50 mL

室温过夜,121 ℃,15 min 灭菌,或直接购买无 RNase 超纯水。

A.3 75%乙醇

无水乙醇 7.5 mL

无 RNase 超纯水 2.5 mL

现配现用。

A.4 玻璃容器及塑料用具

离心管、移液器吸嘴、药匙及玻璃容器等用具应用 0.01% 的 DEPC 水室温浸泡过夜,然后灭菌,烘干;或直接购买无 RNase 的相应规格离心管、移液器吸头等。