



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3954—2014

国境口岸尼帕病毒 RT-PCR 和实时荧光
RT-PCR 检测方法

Detection of nipah virus at frontier port by RT-PCR and real time
fluorescence RT-PCR

2014-04-09 发布

2014-11-01 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：中华人民共和国珠海出入境检验检疫局、深圳市计量质量检测研究院、中华人民共和国四川出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：莫秋华、李卫岗、谭华、史咏梅、胡科新、兰全学、林继灿、杨泽、赵俊华、陈肖萧。

国境口岸尼帕病毒 RT-PCR 和实时荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了国境口岸尼帕病毒 RT-PCR 方法和实时荧光 RT-PCR 方法检验的对象、检测方法及其结果报告。

本标准适用于国境口岸尼帕病毒的实验室检测。

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 19489 实验室 生物安全通用要求

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

WS/T 230 临床诊断中聚合酶链反应(PCR)技术的应用

可感染人类的高致病性病原微生物菌(毒)种或样本运输管理规定(原中华人民共和国卫生部)

人间传染的病原微生物菌(毒)种保藏机构管理办法(原中华人民共和国卫生部)

人间传染的病原微生物名录(原中华人民共和国卫生部,2006 年)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

尼帕病毒 **Nipah virus; NiV**

尼巴病毒 **Nipah virus; NiV**

属于副粘病毒科(Paramyxoviridae)亨德拉尼帕病毒属(*Henipavirus*),单股负链 RNA 病毒,可引起一种新型烈性人畜共患传染性疾病——尼帕病毒病(Nipah virus disease, NVD),严重威胁人类和猪、马等动物的健康。尼帕病毒感染人后的潜伏期为 1 周~3 周,在人群中有人传人的可能,人的临床表现主要为严重的快速进行性脑炎,脑干功能失常(表现为高血压、心动过速),死亡率高达 40%~70%。不同患者发病的严重程度各异,多数以神经症状为主,也可以呼吸道症状为主,特征症状是颈部和腹部肌肉痉挛,同时出现体温升高、头痛、嗜睡、呕吐、咳嗽、意识混乱,严重的昏迷、死亡。

3.2

逆转录聚合酶链反应 **reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR**

将 RNA 的逆转录(RT)和 cDNA 的聚合酶链式扩增(PCR)相结合的技术。本标准采用一步法逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)。在一步法 RT-PCR 中,首先以 RNA 为模板,利用下游特异性引物,在依赖 RNA 的 DNA 聚合酶(逆转录酶)的作用下转录合成互补 DNA(cDNA),该步称作“逆转录”;随后,再以 cDNA 为模板,利用上游和下游特异性引物,在 DNA 聚合酶的作用下进行 PCR 循环扩增;最终使 RNA 分子的某个特定区域(目的片段)被扩增达几百万倍。

3.3

实时荧光 RT-PCR real-time fluorescence RT-PCR

通过荧光染料或荧光标记的特异性荧光探针,对反转录后 PCR 扩增的产物进行标记跟踪,利用荧光信号累积实现实时在线监测整个 PCR 反应过程,结合相应的软件可以对结果进行定性和定量分析。本标准所采用的荧光探针是 *TaqMan* 水解探针。该探针为一段寡核苷酸分子,在 5'端和 3'端分别标记荧光报告基团(如 FAM)和荧光淬灭基团(如 TAMRA)。该探针可与 PCR 产物发生特异性杂交。当探针保持完整时,淬灭基团抑制报告基团的荧光发射。在 PCR 扩增时,利用 *Taq* 酶的 5'→3'外切酶活性将探针酶切水解,使荧光报告基团和荧光淬灭基团分离,距离变大,淬灭作用被解除,荧光信号释放出来并被仪器的荧光探测系统检测到。模板每复制一次,就有一条探针被切断,伴随一个荧光信号的释放,从而实现荧光信号的累积与 PCR 产物的数量完全同步。

3.4

Ct 值 cycle threshold

在荧光 PCR 中,每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

- 4.1 DEPC: diethyl pyrocarbonate, 焦碳酸乙二酯。
- 4.2 PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis, 聚丙烯酰胺凝胶电泳。
- 4.3 HPLC: high performance liquid chromatography, 高效液相色谱。
- 4.4 bp: base pair, 碱基对。
- 4.5 FAM: 6-carboxy-fluorescein, 6-羧基-荧光素, 一种荧光报告基团。
- 4.6 TAMPA: carboxytetramethylrhodamine, 羧基四甲基罗丹明。

5 检测对象

- 5.1 国境口岸伴发热的尼帕病毒感染的病例或疑似病例。
- 5.2 其他申请检验的人员。

6 生物安全和 PCR 防污染要求

实验室生物安全应符合 GB 19489 的规定。按照原中华人民共和国卫生部制定的《人间传染的病原微生物名录》的规定操作相应的试验材料,未经培养的感染材料的操作在 BSL-3 生物安全实验室内进行,而在 BSL-2 生物安全实验室内可操作灭活的材料。PCR 防污染措施按 WS/T 230 和 SN/T 1193 的规定执行。

7 主要仪器

- 7.1 二级 B 型生物安全柜。
- 7.2 台式高速冷冻离心机(最高离心力 12 000g 以上)。
- 7.3 旋涡振荡器。
- 7.4 冰箱: 4℃、-20℃和-70℃。
- 7.5 超净工作台。

- 7.6 微型离心机。
- 7.7 PCR 热循环仪。
- 7.8 荧光 PCR 仪。
- 7.9 电子天平($d=1\text{ mg}$)。
- 7.10 微波炉。
- 7.11 电泳仪。
- 7.12 凝胶成像分析系统。
- 7.13 高压灭菌锅。
- 7.14 超纯水器或双蒸水器。
- 7.15 微量可调移液器一套(含以下 5 种规格:10 μL 、20 μL 、100 μL 、200 μL 、1 mL)。

8 主要试剂

- 8.1 无 RNA 酶的 DEPC 水。
- 8.2 引物和探针:RT-PCR 引物应为 PAGE 以上级别纯化,探针为 HPLC 纯化,引物和探针序列见 9.2.4.1 和 9.2.5.1。
- 8.3 一步法 RT-PCR 基础试剂:宝生物工程(大连)有限公司 PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2¹⁾。
- 8.4 一步法荧光 RT-PCR 基础试剂:宝生物工程(大连)有限公司 One Step PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time)¹⁾。
- 8.5 电泳缓冲液(10 \times TBE):称取 108 g Tris 碱,7.44 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 和 55 g 硼酸,溶于 800 mL 的双蒸水中,充分搅拌溶解后加水定容至 1 L,室温保存。
- 8.6 溴化乙锭(EB):10 mg/mL,使用浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 。
- 8.7 GoldenView 核酸染料:使用浓度为 5 $\mu\text{L}/100\text{ mL}$ 。

9 检验程序

9.1 样品的采集、保存和运送

采集发热的疑似病人或患者的临床标本,包括血液、脑脊液、咽拭子等,如是血浆不宜使用肝素抗凝。样品的运送过程宜在 0 $^{\circ}\text{C}$ 以下进行。样品的保存和运输的生物安全要求参照原卫生部颁布的《人间传染的病原微生物菌(毒)种保藏机构管理办法》和《可感染人类的高致病性病原微生物菌(毒)种或样本运输管理规定》。

9.2 实验室检验

9.2.1 样品处理

血液样本直接分离血清或血浆。脑脊液样本首先在 4 $^{\circ}\text{C}$ 以 3 000 r/min 离心 10 min,小心吸弃上层液体,保留约 250 μL 上清,并用其重悬细胞沉淀。咽拭子样本直接进行病毒核酸提取。不能立即进行检验时,样本冻存于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱备用。

1) 给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的认可和推荐。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效产品。

SN/T 3954—2014

9.2.2 病毒核酸提取

9.2.2.1 Trizol 法

取 9.2.1 处理好的样本 150 μL , 加入 750 μL Trizol 液, 振荡混匀后室温静置 5 min, 然后加入 200 μL 三氯甲烷, 盖紧离心管, 振荡混匀 15 s 后室温静置 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 10 min, 取上层水相至另一离心管中, 加入等量异丙醇沉淀 RNA, 充分混匀后室温放置 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 再加入 1 mL 的 70% 乙醇洗涤 1 次, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 室温放置 2 min~3 min, 马上加入 20 μL ~50 μL 无 RNA 酶的 DEPC 水(或其他核酸溶解液)溶解沉淀, 即为 RNA 模板, 用于 RT-PCR 扩增。分装后保存在 -70 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

9.2.2.2 试剂盒提取纯化核酸法

按适用于病毒基因组提取的商品试剂盒说明书操作。

9.2.3 阳性对照、阴性对照和空白对照设置

检测过程中分别设阳性对照、阴性对照和空白对照。阳性对照为尼帕病毒核酸或根据尼帕病毒核苷酸序列通过基因合成、载体构建和体外转录合成的 RNA(见附录 A), 阴性对照可选择其他种类病毒的核酸样本, 空白对照用无菌水作为 RT-PCR 和实时荧光 RT-PCR 反应的模板。

9.2.4 普通 RT-PCR 检测

9.2.4.1 检测引物

引物应用液浓度配制 20 $\mu\text{mol/L}$, 扩增片段大小 292 bp, 序列如下:

——NiV-F1; 5'-TAGAAATAATCTCAGACATCGGAAA-3';

——NiV-R1; 5'-CCCATAGACCTGTCAATAGTAGTAGC-3'。

注: 其他等效商品试剂盒也可使用。

9.2.4.2 反应体系组成

一步法 RT-PCR 反应体系采用以下参数: 2 \times one step RT-PCR 缓冲液 10 μL ; 引物 NiV-F1 和 NiV-R1 各 1.0 μL ; RT-PCR Enzyme Mix(含逆转录酶和 Taq DNA 聚合酶) 1.0 μL ; RNA 模板 5.0 μL ~7.0 μL ; 加无 RNA 酶的水补足至 20 μL 。

9.2.4.3 反应条件

一步法 RT-PCR 反应条件: 50 $^{\circ}\text{C}$ 反转录 30 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。因不同 PCR 仪器的性能差异, 可根据条件适当调整 PCR 退火温度和时间。

9.2.4.4 琼脂糖凝胶电泳

用 0.5 \times TBE 电泳缓冲液配制 2.0%(质量分数)的琼脂糖凝胶(含溴化乙锭或 GoldenView 或其他等效核酸染料)。将琼脂糖凝胶放入水平电泳槽, 使电泳缓冲液刚好淹没胶面。取 5 μL 普通 RT-PCR 扩增产物和 1 μL 上样缓冲液混匀后加入糖凝胶的样品孔。在电泳时设立 DNA 标准分子量作对照, 使用 100 bp DNA 分子量标准。按 8 V/cm 的电压条件电泳约 30 min~40 min。采用凝胶成像分析系统观察核酸条带并判断结果。

9.2.5 实时荧光 RT-PCR 方法

9.2.5.1 检测引物和探针

引物应用液浓度配制成 20 $\mu\text{mol/L}$, 扩增片段大小 131 bp。探针应用液浓度配制成 20 $\mu\text{mol/L}$, 探针的 5' 和 3' 端分别用 FAM 和 TAMRA 标记。

引物和探针的序列如下:

——NiV-F2: 5'-CATCAGCAGGAAGGCAAGAGAGTA-3';

——NiV-R2: 5'-CTGTCTGCCACTCTGYTCTATAGGT-3';

——NiV-P: 5'-FAM-ACTGCCTCCAATGAGCACACCTCCTGC-TAMRA-3'。

注: 简并碱基 Y 为 C 或 T。

9.2.5.2 反应体系组成

一步法实时荧光 RT-PCR 反应体系采用以下参数: $2 \times \text{One Step RT-PCR}$ 缓冲液 III (含 dNTP 和 Mg^{2+} 等) 12.5 μL ; 引物 NiV-F2 0.7 μL ; 引物 NiV-R2 0.6 μL ; 探针 NiV-P 0.4 μL ; TaKaRa Ex Taq HS (5 U/ μL) 0.5 μL ; PrimeScript RT Enzyme Mix II 0.5 μL ; RNA 模板 5.0 μL ; 加水补足至 25 μL 。

9.2.5.3 反应条件

一步法实时荧光 RT-PCR 反应条件: 42 $^{\circ}\text{C}$ 反转录 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 6 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 35 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s, 45 个循环; 选择 FAM 通道于 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火时收集荧光信号。不同实验室可根据所使用的试剂和仪器参考上述反应条件作适当调整。

9.2.6 结果判定及报告

9.2.6.1 普通 RT-PCR 方法结果的判定

当阳性对照出现目的片段条带, 而阴性对照和空白对照没有任何核酸条带出现时才可对样本进行结果判定及报告, 否则视为试验失败, 需重新试验。

本方法检验结果判定及报告如下:

——检测样本出现 292 bp 条带时, 报告“检出尼帕病毒特异性基因(RT-PCR 法, 292 bp)”;

——检测样本未出现 292 bp 条带时, 报告“未检出尼帕病毒特异性基因(RT-PCR 法, 292 bp)”。

9.2.6.2 实时荧光 RT-PCR 方法结果的判定

在实时荧光 RT-PCR 试验中, 若阳性对照有明显的荧光增幅现象, 且 C_t 值在预期的范围之内 (≤ 30); 阴性对照和空白对照无荧光增幅现象, 则表明反应体系运行正常, 可以进行结果判定, 否则, 试验视为无效, 需重新试验。

当同时进行的阳性、阴性和空白对照试验结果正常, 本方法检验结果判定及报告如下:

——检测样品有明显的荧光增幅曲线, 且 C_t 值 ≤ 35 时, 判为阳性, 报告“检出尼帕病毒特异性基因(实时荧光 RT-PCR 法)”。

——检测样品荧光增幅曲线的 C_t 值介于 35 和 40 之间时, 应重新进行实时荧光 RT-PCR 检测。若重新检测的 C_t 值仍介于 35 和 40 之间, 且曲线有明显的对数增长期, 判为阳性, 报告“检出尼帕病毒特异性基因(实时荧光 RT-PCR 法)”; 否则判为阴性, 报告“未检出尼帕病毒特异性基因(实时荧光 RT-PCR 法)”。

——检测样品荧光增幅曲线的 C_t 值介于 40 和 45 之间时, 建议采用浓缩方式处理核酸样本, 再重新进行实时荧光 RT-PCR 检测。若重新检测的 C_t 值有明显减少趋势, 且曲线有明显的对数增长

SN/T 3954—2014

期,判为阳性,报告“检出尼帕病毒特异性基因(实时荧光 RT-PCR 法)”。此类样本建议用其他方法进一步验证;否则判为阴性,报告“未检出尼帕病毒特异性基因(实时荧光 RT-PCR 法)”。

——检测样品无荧光增幅现象,判为阴性,报告“未检出尼帕病毒特异性基因(实时荧光 RT-PCR 法)”。

9.2.6.3 测序(可选择)

对于检测阳性的样本可切下电泳分析的目的条带,用凝胶回收试剂盒回收纯化(按其说明书进行),全自动遗传分析仪进行测序,确认病毒基因序列,也可进一步分析病毒基因的变异情况。

附 录 A

(规范性附录)

尼帕病毒阳性对照基因合成序列及 GenBank 参考序列编号

A.1 尼帕病毒 GenBank 参考序列编号:AJ564621.1。

A.2 阳性对照基因合成序列:

tgctaaaggcagagcagtagaataatctcagacatcggaactatgtcgaggaaactggatggcaggattcttcgcaaccatcagattcgggttgg
agacaaggatccagcacttgactcaacgaattccagagtgaacctcaacacatcaaaagcttgatgctactctacagagaaattggcccaagagccc
cttatatggtgcttcttgaagaatcaattcagactaaatttgcacctggagggttaccattattgtggagctttgcatgggtgtggctactactattgac
aggtctatgggggcattgaatatcaatcgtggttatcttgagcctatgtattcagactaggccaaaatcagcacgtcaccatgctggaggaattgat
cagaacatggcaatagactgggactaagttcagatcaagttgcagaactcgtgctgcagttcaggaaacatcagcaggaaggcaagagagtaatg
ttcaggctagagaggcaaaatttctgcaggaggtgtgctcattggaggcagtgatcaagatatcgatgaagggaagaacctatagaacagagtgg
cagacagtcagttaccttcaaaaggagatgagtatttcaccccttgctaacagtgtgccgagcagttctgtgagcacatccggtgggaccagattgac
