



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3307—2012

口岸食源性疾病腺病毒 PCR 检测方法

PCR method of adenovirus for foodborne disease at frontier port

2012-12-12 发布

2013-07-01 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：中华人民共和国天津出入境检验检疫局、中华人民共和国江西出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：关淳、赵良娟、王乃福、曲鹏、黄晶晶、高旗利。

口岸食源性疾病腺病毒 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了口岸食源性疾病腺病毒 40 型和 41 型 PCR 检测方法、结果判定及报告及生物安全措施。

本标准适用于检验检疫机构对口岸食源性疾病腺病毒 40 型和 41 型的检测和报告。

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实验方法

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

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

腺病毒 adenovirus

属于腺病毒科,无包膜的双链 DNA 病毒,基于生物和遗传特征,共有 51 个血清型,分属 A~F 6 个亚属,F 亚属包括腺病毒 40 型和 41 型,称为肠腺病毒,肠腺病毒是引起儿童食源性病毒腹泻的重要病原体。病毒颗粒呈球形,直径 70 nm~90 nm,病毒体呈类似通讯卫星样结构。腺病毒对酸碱及温度的耐受范围较宽,对脂溶剂有较强的抵抗力,紫外线照射 30 min 或 56 ℃,30 min 可被灭活。

4 设备

4.1 高速冷冻离心机:最大离心力 13 000g。

4.2 PCR 扩增仪。

4.3 电泳仪。

4.4 空气浴振荡摇床:200 r/min。

4.5 凝胶成像系统。

4.6 可调移液器:0.1 μL~2 μL,1 μL~10 μL,20 μL~100 μL,100 μL~1 000 μL。

4.7 水浴锅。

4.8 低温冰箱:−20 ℃和−80 ℃。

4.9 匀浆器。

4.10 制冰机。

4.11 高压灭菌锅。

4.12 生物安全柜。

5 主要试剂

除另有规定外,试剂为分析纯,实验用水均为灭菌双蒸水,规格符合 GB/T 6682 一级水的要求。

- 5.1 *Taq* DNA 聚合酶。
- 5.2 dNTP:dATP、dTTP、dCTP、dGTP。
- 5.3 琼脂糖。
- 5.4 限制性内切酶 *Rsa* I。
- 5.5 PEG 8 000 溶液:16% PEG 8 000、0.3 mol/L 氯化钠。
- 5.6 匀浆缓冲液:0.1 mol/L 磷酸氢二钠、0.3 mol/L 氯化钠、pH9.6。
- 5.7 溴化乙锭。
- 5.8 相对分子质量标准:50 bp DNA ladder 和 100 bp DNA ladder。
- 5.9 柱式病毒 DNA 提取试剂盒。
- 5.10 PCR 产物纯化试剂盒。
- 5.11 PBS 缓冲液:pH7.4。
- 5.12 TE 缓冲液:10 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA、pH8.0。
- 5.13 10×PCR 缓冲液:200 mmol/L Tris-HCl、200 mmol/L KCl、15 mmol/L MgCl₂、pH8.4。
- 5.14 5×TBE 电泳缓冲液:Tris 54 g、硼酸 27.5 g、0.5 mol/L EDTA 20 mL,加蒸馏水至 1 000 mL, pH8.0。使用时稀释为 0.5×TBE 电泳缓冲液。
- 5.15 质控样品:用含腺病毒目的基因的质粒作为 PCR 的阳性对照;不含腺病毒目的基因的质粒为阴性对照。
- 5.16 引物序列见表 1。

表 1 腺病毒 PCR 扩增引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')	扩增片段大小
正向引物	5'-GCC GCA GTG GTC TTA CAT GCC ACA CTC-3';	301 bp
反向引物	5'-CAG CAC GCC GCG GAT GTC AAA GT-3'	

注:PCR 引物核苷酸序列采用与 Ad40 及 Ad41 六邻体基因高度保守区互补引物扩增腺病毒 DNA。

6 检测步骤

6.1 样品处理

样品运输过程中保持温度在 0℃~5℃。实验室接到样品后应尽快进行检测,如果暂时不能检测应将样品保存于-70℃冰箱中,避免样品的反复冻融。取可疑食品 5 g~10 g 加入 40 mL 匀浆缓冲液中,匀浆器充分匀浆 3 min;将匀浆液置于 37℃空气浴振荡摇床中,200 r/min 振荡 30 min;4℃,12 000g,离心 10 min。取 10 mL 上清液转移到 10 mL 离心管中,加入 1.4 mL PEG 8 000 溶液,颠倒 5 次混匀。冰上放置至少 1 h,4℃,12 000g 离心 10 min,弃上清液,保留沉淀,用于腺病毒 DNA 提取。对于患者早期粪便和呕吐物取上清液,用 PBS 缓冲液 10%稀释后,进行 DNA 提取。

6.2 腺病毒 DNA 的提取

用柱式 DNA 提取试剂盒或传统酚-三氯甲烷法提取 DNA 模板,前者按说明书操作,后者参照

附录 A。将 DNA 模板溶于 50 μL TE 缓冲液中,以备 PCR 检测。

6.3 PCR 检测

PCR 反应液组成(总体积 50 μL): $10\times$ PCR 缓冲液 5 μL ;2 mmol/L dNTPs 5 μL ;10 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各 2.5 μL ;Taq DNA 聚合酶 2 μL ;提取的 DNA 模板 5 μL ;无 RNase 超纯水 28 μL 。

PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s,共 35 个循环,最后一个循环 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

PCR 检测时应具有阳性对照、阴性对照和试剂空白对照。使用不同型号扩增仪时,要对扩增条件进行优化。可使用等效的商品化试剂盒。

6.4 电泳观察结果

用 0.5 \times TBE 电泳缓冲液配制 1.5%琼脂糖电泳凝胶并趁凝胶未凝固时加入溴化乙锭使其最终浓度达到 1 $\mu\text{g/mL}$,制胶。在电泳槽中加入电泳缓冲液,使液面没过胶面。将 7.5 μL 扩增产物和 6 倍加样缓冲液 1.5 μL 混合,点样,相对分子质量标准为参照,5 V/cm 恒压,电泳 30 min~40 min。紫外凝胶成像仪下观察电泳结果,拍照并记录结果。扩增目的条带大小为 301 bp。

6.5 扩增产物的限制性内切酶分析

按 PCR 产物纯化试剂盒说明书操作,纯化 PCR 扩增产物。取 10 μL PCR 扩增产物加入限制性内切酶 *Rsa* 12 μL ,酶切 10 \times buffer 2 μL ,超纯水 6 μL ,反应体积共 20 μL ,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中 4 h。取 10 μL 酶切产物进行琼脂糖电泳,相对分子质量标准为参照,凝胶成像系统观察。纯化的扩增产物经 *Rsa* I 酶切后可清楚的将肠道腺病毒 40 型和 41 型区别开,腺病毒 40 型被酶切为 256 bp 和 45 bp 两个片段,腺病毒 41 型被酶切为 211 bp 和 90 bp 两个片段。

7 结果判定及报告

当阳性对照出现目的条带,阴性对照及试剂空白对照均未出现目的条带时,试验结果成立。

被检样品未出现预期大小的扩增条带时,报告未检出食源性腺病毒。

被检样品出现预期大小的扩增条带,应对扩增产物进行纯化后做限制性内切酶分析,扩增产物经酶切后得到与腺病毒 40 型或 41 型相同的片段时,则可判定检测结果阳性。根据结果判定,报告检出某型食源性腺病毒 DNA 片段,否则报告未检出食源性腺病毒。

8 安全防护

实验中使用的溴化乙锭具有致癌作用,应戴乳胶或 PE 手套进行操作。实验中产生的废弃物和器皿应于 121 $^{\circ}\text{C}$ 高压 15 min 后再丢弃或进行清洗。

9 防污染措施

实验环境应符合 SN/T 1193 的要求,检测过程中防污染措施按照 SN/T 1193 中的规定执行。

10 生物安全措施

实验室设备和防护应符合 GB 19489。

SN/T 3307—2012

下列操作应在生物安全 2 级(BSL-2)实验室或生物安全柜中进行：

- 可能产生含病毒气溶胶的样品处理；
- 收集或浓缩病毒；
- 病毒 DNA 提取和扩增；
- 离心管和离心机转头的封闭和开启。

附 录 A
(资料性附录)

酚-三氯甲烷 DNA 提取方法

- A.1 取 400 mL PBS 缓冲液重悬的沉淀,加入 10% SDS 50 μ L, 20 mg/mL 蛋白酶 K 5 μ L,混匀后于 56 $^{\circ}$ C 保温 30 min。
- A.2 加入等体积酚:三氯甲烷:异戊醇(25:24:1),振荡混匀,12 000g 离心 8 min,将上层水相液移入另一离心管中。
- A.3 加入等体积的三氯甲烷:异戊醇(24:1),振荡混匀,12 000g 离心 8 min,将上层水相移入另一离心管中。
- A.4 加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc,2 倍体积的预冷无水乙醇,冰水浴中放置 30 min,12 000g 离心 15 min,弃去上清液。
- A.5 用 70%乙醇冲洗沉淀 2 次,自然干燥,50 μ L TE 溶解。