



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3558—2013

马尔堡病毒 RT-PCR 和实时荧光 RT-PCR 检测方法

RT-PCR and real time RT-PCR detection methods of Marburg virus

2013-03-01 发布

2013-09-16 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：中华人民共和国广东出入境检验检疫局、中国科学院武汉病毒研究所。

本标准主要起草人：洪烨、师永霞、袁志明、郑夔、相大鹏、黄弋、李小波、黄吉城、幸芦琴、郭波旋、钟玉清、李燕。

马尔堡病毒 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马尔堡出血热检测的生物安全要求,标本的采集、运输和保存,标本的处理,马尔堡病毒 RT-PCR 检测和实时荧光 RT-PCR 检测方法。

本标准适用于国境口岸入出境人员携带马尔堡病毒的分子生物学检测。

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

人间传染的病原微生物名录(卫生部)

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

RT-PCR:反转录-聚合酶链反应

实时荧光 RT-PCR:实时荧光反转录-聚合酶链反应

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

RNA:核糖核酸

FAM:FAM 荧光染料,一种荧光报告基团

4 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

4.1

马尔堡出血热 Marburg hemorrhagic fever; MHF

由马尔堡病毒(Marburg Virus)引起的、以急性发热伴有严重出血为主要临床表现的传染性疾病,经密切接触传播,传染性强,病死率高。由于马尔堡病毒来自于非洲绿猴并主要在非洲流行,又被称为青猴病和非洲出血热。

4.2

马尔堡病毒 Marburg virus

属丝状病毒科,病毒基因组为单股负链 RNA,长约 19 kb,编码 7 种病毒蛋白,包括 N 蛋白(NP)、病毒蛋白 35(VP35)、病毒蛋白 30(VP30)、病毒蛋白 24(VP24)、糖蛋白 4(gp4)、RNA 依赖的 RNA 聚合酶主要成分糖蛋白 7(gp7)和次要成分病毒蛋白 40(VP40)。

5 生物安全要求

按照 GB 19489 和《人间传染的病原微生物名录》的要求,马尔堡病毒相关材料的生物安全要求

如下:

- 马尔堡病毒相关的病毒培养和动物感染实验操作应在生物安全Ⅳ级(BSL-4 或 ABSL4)实验室内进行;
- 马尔堡病毒相关的未经培养的感染性材料的操作应在生物安全Ⅲ级(BSL-3)实验室内进行;
- 马尔堡病毒相关的灭活材料的操作应在生物安全Ⅱ级(BSL-2)实验室内进行;
- 马尔堡病毒感染材料的运输包装分类为 A 类,UN 编号为 UN2814。

6 人体血清标本的采集、运输和保存

无菌采集疑似病例发病 3 天内静脉血 3 mL~5 mL,室温静置 30 min 使其凝固,500g 离心 10 min,收集血清于 2 mL 无菌螺口塑料管中,用耐低温油性记号笔笔记上编号,低温送到实验室检测。如 24 h 内不能送到实验室,将血清置于-70℃保存。

7 血清标本的处理

血清标本直接进行分子生物学核酸的提取,如 24 h 不能及时检测应存放在-70℃冰箱。

8 马尔堡病毒的 RT-PCR 检测

8.1 主要仪器

本方法使用的主要仪器如下:

- PCR 扩增仪;
- 千分之一天平;
- 超净工作台;
- Ⅱ级生物安全柜;
- 高压灭菌锅;
- 低温高速离心机:最大离心力 20 000g;
- 电泳仪;
- 凝胶成像分析系统;
- 旋涡振荡器;
- 冰箱:4℃、-20℃和-70℃;
- 移液器:10 μL、20 μL、100 μL、200 μL 和 1 mL;
- 恒温水浴锅。

8.2 主要试剂

除另有规定外,所有试剂均采用分析纯。本方法使用的主要试剂如下:

- 核酸提取试剂:用美国 Qiagen 公司 QIAamp Viral RNA Kit¹⁾ 提取病毒核酸;
- RT-PCR 试剂:美国 Qiagen 公司 One step RT-PCR kit¹⁾;
- 无 RNA 酶的 DEPC 水;

1) 由指定单位提供,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。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。

- RT-PCR 检测的引物:上游引物 MBGV-FP(5'-CGATGGGCTTTCAGGACAGG-3')和下游引物 MBGV-RP(5'-CACGAGGGTTTTGACCTTGAAT-3'),预期扩增片段为 190 bp;
- 电泳缓冲液(50×TAE):称取 242 g Tris 碱,溶于 700 mL 的重蒸水中,加入 100 mL 0.5 mol/L EDTA(pH8.0)、57.1 mL 冰乙酸,至充分溶解后用水定容至 1 L,室温储存;使用前用重蒸水稀释至 1×TAE 进行倒胶和 DNA 电泳。
- 10 mg/mL 溴化乙锭(EB):在 100 mL 水中加入 1 g 溴化乙锭,磁力搅拌数小时以确保其完全溶解,然后用铝箔包裹容器或转移至棕色瓶中,保存于室温。使用浓度为 0.5 μg/mL。

8.3 检测步骤

8.3.1 核酸提取

- 8.3.1.1 吸取 140 μL 血清样本加入溶解的 560 μL 裂解液 AVL。
- 8.3.1.2 脉冲混匀 15 s,置于室温 10 min。
- 8.3.1.3 短暂离心,加入 560 μL 乙醇(96%~100%)脉冲混匀 15 s。
- 8.3.1.4 短暂离心。
- 8.3.1.5 将 QIAamp 旋转柱置于 2 mL 收集管中。吸取 8.3.1.3 中溶液 630 μL 转移至旋转柱上,6 000g 离心 1 min,将旋转柱放至干净的收集管上,丢弃包含过滤液的收集管。
- 8.3.1.6 打开旋转柱盖,重复 8.3.1.5。
- 8.3.1.7 打开旋转柱盖,加入 500 μL 洗液 AW1,盖紧盖子,6 000g 离心 1 min。将旋转柱放至干净的收集管上,丢弃包含过滤液的收集管。
- 8.3.1.8 打开旋转柱盖,加入 500 μL 洗液 AW2,盖紧盖子,20 000g 离心 3 min。将旋转柱放至干净的收集管上,20 000g 再离心 1 min。将旋转柱放至干净的 1.5 mL 离心管上,丢弃包含过滤液的收集管。
- 8.3.1.9 打开旋转柱盖,加入 60 μL 室温平衡的缓冲液 AVE。
- 8.3.1.10 盖紧盖子,室温放置 1 min。
- 8.3.1.11 6 000g 离心 1 min。
- 8.3.1.12 收集滤出液,用于 RT-PCR 扩增。—20 °C 或—70 °C 储存 RNA。

8.3.2 RT-PCR 检测

- 8.3.2.1 准备 RT-PCR 反应液,设 50 μL 反应体系,每个待检标本反应液的组成为:5×RT-PCR 缓冲液 10 μL,10mmol/L dNTP 2 μL,10 μmol/L MBGV-FP 5 μL,10 μmol/L MBGV-RP 5 μL,RT-PCR Enzyme mix 2 μL,无 RNA 酶的 DEPC 水 21 μL,RNA 模板 5 μL。同时设立阴性对照和阳性对照,阳性对照模板为根据马尔堡病毒核苷酸序列体外转录的 RNA 片段;阴性对照模板为不含马尔堡病毒核酸的标本或无 RNA 酶的水。
- 8.3.2.2 将 PCR 反应管置于 PCR 扩增仪上进行操作,RT-PCR 反应程序为:50 °C 逆转录 30 min,95 °C 预变性 15 min;94 °C 变性 1 min,52 °C 复性 1 min,72 °C 延伸 30 s,35 个循环;72 °C 延伸 10 min;4 °C。

8.3.3 凝胶电泳

扩增结束后,在 5 μL 扩增产物中加入 1 μL 6×DNA 上样缓冲液,用含 0.5 μg/mL 溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,用凝胶成像系统照相记录结果。

8.4 结果判断

8.4.1 质量控制

反应结果应同时符合以下 2 个条件:

SN/T 3558—2013

- 阴性对照未出现特异性条带；
- 阳性对照出现预期 190 bp 大小的扩增条带。

8.4.2 结果分析

在实验结果有效情况下,如待测样品出现预期 190 bp 大小的扩增条带,则可判断待测样品马尔堡病毒核酸 PCR 阳性,判断为阳性结果的样品可通过复检和核酸序列测定进行确认;如待测样品中未出现预期大小的扩增产物,则可判断待测样品马尔堡病毒核酸 PCR 阴性。

8.5 测序

对于首发病例,应将 PCR 扩增产物进行序列测定,确定其碱基组成。使用 BLAST 分析其与已公布的马尔堡病毒序列的同源性,判断扩增产物是否为马尔堡病毒核酸。

9 实时荧光 RT-PCR 检测

9.1 主要仪器

本方法使用的主要仪器如下:

- 荧光定量 PCR 仪;
- 超净工作台;
- Ⅱ级生物安全柜;
- 高压灭菌锅;
- 低温高速离心机:最大离心力 20 000g;
- 旋涡振荡器;
- 冰箱:4℃、-20℃和-70℃;
- 移液器:10 μL、20 μL、100 μL、200 μL 和 1 mL。

9.2 主要试剂

本方法使用的主要试剂如下:

- 核酸提取试剂:用美国 Qiagen 公司 QIAamp Viral RNA Kit²⁾ 提取病毒核酸;
- 实时荧光 RT-PCR 通用试剂:Ag-Path-ID™ One step RT-PCR Kit,美国 Ambion 公司产品²⁾;
One step RT-PCR kit,美国 Qiagen 公司产品²⁾;
- 无 RNA 酶的 DEPC 水;
- 引物和探针:引物和探针序列见表 1。

2) 由指定单位提供,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。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。

表 1 马尔堡病毒实时荧光 RT-PCR 检测的引物和探针

引物/探针名称	序列(5'-3')	扩增片段
Mfo	CATCTGATGGGATTCACACTGAG	GP 基因片段,预期 扩增片段为 108 bp
Mro	TGGGAGGTACACCTGTCCTGAA	
Mp ^a	FAM-aaa+Gtt+Gct+Gat+Tc+Ccct-BHQ1	
mnp-F	GGTCAAAGTAGATTCTCAGGACTTC	NP 基因片段,预期 扩增片段为 80 bp
mnp-R	GTCACCCCTGAATCAGTTTTTT	
mnp-Probe	FAM-TGTGAAAAACAGTTCTCGAGTTCATC-TAMRA	
注: 等效的引物和探针或其他等效的商品化检测试剂盒也可使用。		
^a Mp 为 TaqMan-LNA 探针,探针序列中前面带“+”号的碱基表示 LNA 修饰碱基。		

9.3 核酸提取

见 8.3.1。

9.4 实时荧光 RT-PCR 检测

9.4.1 靶目标为 GP 基因的实时荧光 RT-PCR 检测

9.4.1.1 加样

使用 Ag-Path-ID™ One step RT-PCR kit 进行体系配置,设 20 μL 反应体系,每个待检标本反应液的组成为:2×RT-PCR 缓冲液 10 μL、10 μmol/L Mfo 1 μL、10 μmol/L Mro 1 μL、5 μmol/L Mp 1 μL、25×RT-PCR Enzyme Mix 0.8 μL、模板 RNA 6.2 μL。同时设立阴性对照和阳性对照,阳性对照模板为根据马尔堡病毒核苷酸序列体外转录的 RNA 片段,阴性对照模板为不含马尔堡病毒核酸的标本或无 RNA 酶的水。

9.4.1.2 实时荧光 RT-PCR 扩增反应

在不同的荧光定量 PCR 仪上,TaqMan 探针实时荧光 RT-PCR 的反应条件略有不同。以 Roche LightCycler 或 ABI 7900HT 荧光定量 PCR 仪为例,实时荧光 RT-PCR 检测扩增程序为:50 ℃ 10 min,95 ℃ 10 min;95 ℃ 5 s,60 ℃ 20 s(收集荧光信号),45 个循环。如使用其他仪器,应根据其他仪器的要求设置具体的反应条件。

9.4.2 靶目标为 NP 基因的实时荧光 RT-PCR 检测

9.4.2.1 加样

使用 One step RT-PCR kit 进行体系配置,设 25 μL 反应体系,每个待检标本反应液的组成为:5×RT-PCR缓冲液 5 μL、10 μmol/L mnp-F 1 μL、10 μmol/L mnp-R 1 μL、5 μmol/L mnp-Probe 0.5 μL、RT-PCR Enzyme Mix 1 μL、模板 RNA 3μL、重蒸水 13.5 μL。同时设立阴性对照和阳性对照,阳性对照模板为根据马尔堡病毒核苷酸序列体外转录的 RNA 片段,阴性对照模板为不含马尔堡病毒核酸的标本或无 RNA 酶的水。

9.4.2.2 实时荧光 RT-PCR 扩增反应

在不同的荧光定量 PCR 仪上,TaqMan 探针实时荧光 RT-PCR 的反应条件略有不同。以 Roche

SN/T 3558—2013

LightCycler 或 BioRad DNA EngineOpticon 为例,实时荧光 RT-PCR 检测扩增程序为:50 °C 30 min, 95 °C 15 min;95 °C 15 s,60 °C 30 s(收集荧光信号),45 个循环。如使用其他仪器,应根据其他仪器的要求设置具体的反应条件。

9.5 结果分析

9.5.1 阈值确定

阈值确定的方法对所有的样品都是统一的,一般是以荧光 PCR 反应的前 3 个~15 个循环的荧光信号作为荧光本底信号,以本底信号标准差的 10 倍作为荧光阈值,以样品扩增产生的荧光信号达到荧光阈值时所对应的循环数为循环阈值(Ct 值)。

9.5.2 质量控制

反应结果应同时符合以下 2 个条件:

- 阴性对照无扩增曲线;
- 阳性对照 Ct 值<35 并有明显扩增曲线。

9.5.3 结果判定

9.5.3.1 根据以下条件进行结果判定:

- 无明显扩增曲线,判断为马尔堡病毒荧光 RT-PCR 检测阴性;
- 有明显扩增曲线,且 Ct 值 ≤ 40 ,初步判断为马尔堡病毒荧光 RT-PCR 检测阳性;
- 有明显扩增曲线,且 $40 < \text{Ct 值} \leq 45$ 的标本应重做,重做后只要出现扩增曲线,则判断为马尔堡病毒荧光 RT-PCR 检测阳性,否则为阴性。

9.5.3.2 阳性标本的确认:荧光 RT-PCR 结果阳性的标本可进一步进行 RT-PCR 扩增。对于首发病例,应对扩增片断进行测序和序列比对,确认是否为马尔堡病毒核酸阳性。
