ICS 11.220
B 41

DB21

辽 宁 省 地 方 标 准

DB21/T 3273—2020

猪伪狂犬病毒野毒株与 gE 基因缺失疫苗株 TaqMan 实时荧光定量 PCR 鉴别方法

A TaqMan Real-time PCR Method for Differentiation of Wild-type Strain from gE-deleted Vaccine Strain of Pseudorabies Virus

地方标准信息服务平台

2020－06－30 发布　　2020－07－30 实施

辽宁省市场监督管理局　　发布

目　　次

前言 II
1　范围 1
2　规范性引用文件 1
3　缩略语 1
4　仪器和耗材 1
5　试剂和材料 1
6　样品采集、处理和运输 2
7　荧光 qPCR 操作程序 3
8　结果判定 4
附录 A（规范性附录）　溶液配制 6
附录 B（规范性附录）　引物和探针 7

地方标准信息服务平台

前　言

本标准根据GB/T 1.1-2009的有关规定进行制定。

本标准由辽宁省农业农村厅提出并归口管理。

本标准负责起草单位：辽宁省农业发展服务中心。

本标准起草人：兰德松、顾贵波、周维、杨洺扬、李可心、孙世宇、张健、刘贺、李旭、高原、丁静。

本标准发布实施后，任何单位和个人如有问题和意见建议，均可以通过来电和来函等方式进行反馈，我们将及时答复并认真处理，根据实际情况依法进行评估及复审。

归口管理部门通讯地址：辽宁省农业农村厅（沈阳市和平区太原北街2号），联系电话：024-23447862

标准起草单位通讯地址：辽宁省农业发展服务中心（沈阳市皇姑区宁山东路29号），联系电话：024-88420057

地方标准信息服务平台

猪伪狂犬病毒野毒株与 gE 基因缺失疫苗株 TaqMan 实时荧光定量 PCR 鉴别方法

1 范围

本标准规定了猪伪狂犬病毒（pseudorabies virus,PRV）野毒株及gE基因缺失毒株的TaqMan荧光PCR检测方法。

本标准适用于猪血液、组织脏器、精液、鼻腔拭子和细胞培养物等材料中PRV核酸的检测以及PRV野毒株与gE基因缺失疫苗株病毒核酸的鉴别检测。

本标准的实验操作应在生物安全II级实验室（BSL-2实验室）中进行。

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，仅所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

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

gD 糖蛋白D（glycoprotein D）

gE 糖蛋白E（glycoprotein E）

PRV 伪狂犬病病毒（pseudorabies virus）

4 仪器和耗材

4.1 仪器

荧光PCR仪、高速冷冻离心机（可控温至4 ℃，离心速度可达12 000r/min以上）、组织研磨仪或研钵、自动化核酸提取仪（如选用商品化核酸提取试剂盒）、PCR微量离心机、2 ℃～8 ℃普通冰箱、-20 ℃以下普通冰箱、-70 ℃以下超低温冰箱、移液器（量程0.1 μL～2 μL、2 μL～20 μL、20 μL～200 μL）。

4.2 耗材

无菌无DNA酶的1.5 mL离心管、0.2 mL PCR反应管或八联管或96孔反应板、与移液器匹配的吸头。

5 试剂和材料

地方标准信息服务平台

5.1 DNAzol®Reagent：商品化DNA提取试剂，2 ℃～8 ℃普通冰箱中保存；或商品化核酸提取试剂盒（如磁珠法核酸提取试剂），通常18 ℃～25 ℃保存。

5.2 无水乙醇：-20 ℃普通冰箱中预冷。

5.3 75%乙醇：用无水乙醇和双蒸水配制，-20 ℃普通冰箱中预冷。

5.4 PBS：磷酸盐缓冲液（0.02 mol/L pH7.2），配制见附录A。

5.5 8 mmol/L NaOH溶液，配制见附录A。

5.6 2×TaqMan Fast qPCR Master Mix：为商品化探针法实时荧光PCR反应专用试剂，包含反应所需的缓冲液、酶、dNTP、Mg+等的预混液，-20 ℃普通冰箱中保存，避免反复冻融。

5.7 引物和TaqMan探针，序列见附录B。

5.8 阳性对照和阴性对照：阳性对照使用PRV野毒株细胞培养物、Bartha-K61疫苗毒，阴性对照采用灭菌双蒸水或健康猪的组织材料。

5.9 除非另有说明，在检测中所用的试剂均为分析纯，实验室用水应符合GB/T 6682的要求。

6 样品采集、处理和运输

6.1 采样前准备

6.1.1 采样人员

参照NY/T 541中第5.1条的要求。

6.1.2 采样工具和器材

参照NY/T 541中第6.10.3条的要求。

6.2 样品采集

6.2.1 血液：参照NY/T 541中第6.1条中猪血液样品采集的要求进行，将采集的血液注入含1/10体积4 %EDTA溶液的无菌容器中，充分混匀，编号备检。

6.2.2 组织脏器：参照NY/T 541中第6.2条和6.3条中的要求进行，将采集的病死猪或剖杀猪主要脏器（脑组织、三叉神经节、扁桃体、肺脏、淋巴结等）或活体采集的扁桃体装入灭菌的15 mL～50 mL离心管中，编号备检；组织脏器使用组织研磨仪或研钵进行处理后用于核酸提取。

6.2.3 精液：参照NY/T 541中第6.10.3条中的要求进行。

6.2.4 鼻腔拭子：参照NY/T 541中第6.4条中的猪鼻腔拭子采集要求进行，将拭子样品放入PBS缓冲液（0.02 mol/L pH7.2）中，编号备检。

6.2.5 细胞培养物：细胞培养物反复冻融3次，第3次解冻后，4 ℃ 4 000 g离心10 min，取上清转入新的无菌无DNA酶的1.5 mL离心管中，编号备用。

6.3 样品保存、包装和废弃物处理

参照NY/T 541中第7条的要求。

6.4 样品运输

参照NY/T 541中第9条的要求。

7 荧光 qPCR 操作程序

7.1 DNA 提取

在实验室的核酸提取区进行。

7.1.1 DNAzol 手工提取

7.1.1.1 取 n 个无菌无 DNA 酶的 1.5 mL 离心管，n 为待检样品数+阳性对照+阴性对照，对每个离心管进行编号。

7.1.1.2 每管加入 800 μL DNAzol，分别加入被检样品、阳性对照、阴性对照各 200 μL，颠倒混匀，室温静置 5 min；4℃ 10 000 g 离心 10 min。

7.1.1.3 取 900 μL 上清，转入新的无菌无 DNA 酶 1.5 mL 离心管中，加入 500 μL 预冷的无水乙醇，颠倒混匀，室温放置 3 min；4℃ 10 000 g 离心 5 min。

7.1.1.4 弃上清，沿管壁缓慢加入 1 mL-20 ℃普通冰箱中预冷的 75 %乙醇，颠倒混匀，4℃ 10 000 g 离心 5 min。重复洗涤 2 次后，将离心管倒扣于吸水纸上，自然晾干或用移液器小心移去残液。

7.1.1.5 用 50 μL 8 mmol/L NaOH 溶液溶解沉淀，DNA 在-20 ℃以下保存备用。

7.1.2 核酸提取仪提取

7.1.2.1 按照与核酸提取仪匹配的核酸提取试剂盒说明书提取。

7.1.2.2 将提取的 DNA 转入新的无菌无 DNA 酶的 1.5 mL 离心管中，在-20℃以下普通冰箱中保存备用。

7.2 荧光 qPCR 检测

7.2.1 反应体系的配制和分装

在试剂配制区进行。gD基因和gE基因的反应体系相同。设荧光qPCR反应管数为n，n为待检样品数+阳性对照管数+阴性对照管数，每个反应体系见表1，配制体系时建议按照n+1个反应进行配制，配制反应体系建议在冰盒中进行；配制好的反应液充分混匀后，按照每管18 μL 分装于PCR反应管内，并做好标识。

表1 每个反应体系配制表

组分	用量
2×TaqMan Fast qPCR Master Mix	10 μL
上游特异性PCR引物（10 μmol/L）	0.5 μL
下游特异性PCR引物（10 μmol/L）	0.5 μL
TaqMan探针（10 μmol/L）	0.5 μL
灭菌双蒸水	6.5 μL
总体积	18 μL

7.2.2 加样

在核酸提取区进行。每个反应管中按顺序分别加入2 μL待检样品、阳性对照、 阴性对照DNA溶液，盖好盖子后，PCR微量离心机瞬时离心30 s，转移至PCR扩增区。

7.2.3 qPCR 扩增检测

在PCR扩增区进行。

7.2.3.1 荧光通道

将PCR反应管放入荧光PCR仪内，设置探针：5’端选择FAM荧光通道，3’端选择无（none）荧光。

7.2.3.2 荧光 qPCR 反应条件

gD和gE基因荧光qPCR反应条件均为：94 ℃ 3 min；94 ℃ 15 s，60 ℃ 45 s，收集荧光，40个循环。

8 结果判定

8.1 阈值设定

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的最高点为准。

8.2 质量控制

8.2.1 阴性对照无 Ct 值，且无典型的 S 型扩增曲线。

8.2.2 阳性对照 FAM 通道 Ct 值≤30，且扩增曲线为典型的 S 型。

8.2.3 以上要求需在同一次实验中同时满足，否则，本次实验无效，需重新进行。

8.3 结果描述及判定

8.3.1 gD 基因检测结果

8.3.1.1 阴性

无Ct值或Ct值＞38，且无典型的S型扩增曲线，报告为PRV核酸阴性。

8.3.1.2 阳性

Ct值≤36，且扩增曲线为典型的S型，报告为PRV核酸阳性，但需进一步经gE基因检测来进行PRV野毒与疫苗毒的鉴别检测。

8.3.1.3 可疑

36＜Ct值≤38，判定为可疑，需从提取DNA开始进行一次重复检测。如重复检测结果仍为36＜Ct值≤38，且扩增曲线均呈典型的S型扩增曲线，报告为PRV核酸阳性，但需进一步经gE基因检测来进行PRV野毒与疫苗毒的鉴别检测。

8.3.2 gE 基因检测结果

8.3.2.1 阴性

无Ct值或Ct值＞38，且无典型的S型扩增曲线，报告为PRV野毒核酸阴性。

地方标准信息服务平台

8.3.2.2 阳性

Ct值≤36，且扩增曲线为典型的S型，报告为PRV野毒核酸阳性。

8.3.2.3 可疑

36＜Ct值≤38，判定为可疑，需从提取DNA开始进行一次重复检测。如重复检测结果仍为36＜Ct值≤38，且扩增曲线均呈典型的S型扩增曲线，报告为PRV野毒核酸阳性。

8.3.3 鉴别方法

针对缺失包含gE基因在内的PRV活疫苗免疫猪只，如果gE基因检测阳性，则判定为PRV野毒核酸阳性；如果gD基因检测阳性而gE基因检测阴性，则判定为PRV疫苗毒阳性；如果gD基因和gE基因检测均为阴性，则判定为PRV核酸阴性，既无PRV野毒也无疫苗毒。针对未免疫缺失gE基因的PRV疫苗（△gE/PRV）的猪只，如果gD基因或gE基因检测结果为阳性，则判定为PRV野毒核酸阳性；如果gD基因和gE基因检测均为阴性，则判定为PRV核酸阴性。

地方标准信息服务平台

附 录 A
（规范性附录）
溶液配制

A.1 8 mmol/L NaOH溶液的配制

称量0.32 g NaOH，溶解到1 000 mL灭菌去离子水中，混匀，分装，常温保存。

A.2 0.02 mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲液（PBS）的配制

A.2.1 0.2 mol/L磷酸氢二钠溶液：称取磷酸氢二钠（$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$） 71.64 g，先加适量去离子水溶解，最后定容至1000mL，混匀。

A.2.2 0.2 mol/L磷酸二氢钠溶液：称取磷酸二氢钠（$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$） 31.21 g，先加适量去离子水溶解，最后定容至1000 mL，混匀。

A.2.3 量取0.2 moL/L磷酸氢二钠溶液360 mL，0.2mol/L磷酸二氢钠溶液140 mL，称取氯化钠38 g，用无离子水溶解稀释至5000 mL，4℃保存。

地方标准信息服务平台

附 录 B
（规范性附录）
引物和探针

名称	序列（5’-3’）
gD-qF（上游引物）	GTTCAACGAGGGCCAGTACC
gD-qR（下游引物）	CGGCGTCAGGAATCGCATCA
gD-P（探针）	FAM-ACCAGCACCGCACGTACAAG-BHQ1
gE-qF（上游引物）	CCGAGGACGAGTTCAGCA
gE-qR（下游引物）	GGCCCATTCGTCACTTCCG
gE-P（探针）	FAM-ACCAGACGTCGAAGCCGGA-BHQ1

注：引物和探针均由生物公司合成，用无菌无核酸酶水配制成10 μmol/L工作液，-20 ℃以下普通冰箱中保存供检测用。

地方标准信息服务平台