

小反刍兽疫病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

Development the method of real-time fluorescent RT-PCR for detection of PPRV

2020 - 04 - 30 发布

2020 - 05 - 30 实施

目 次

前 言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 缩略语	1
4 原理	1
5 仪器和器材	1
6 试剂和引物	2
7 操作步骤	2
8 试验成立条件与结果判定	4
9 检测过程中防治交叉污染的措施	4
10 废弃物处理	5

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由动物卫生标准化技术委员会（辽宁）提出。

本标准由辽宁省农业农村厅归口。

本标准起草单位：辽宁省农业发展服务中心、洛阳莱普生信息科技有限公司、辽宁佰瑞生物科技有限公司。

本标准主要起草人：邓文超、石霖、魏园园、吴继阳、张皓淳、王冰、张鑫、王竹、刘金玲、董娜、高原、杨作丰、彭潇潇、姚伟、里里、陈腾、胡影。

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：辽宁省动物及产品检疫中心（沈阳市沈河区万柳塘路105号甲），联系电话：024-24229579。

小反刍兽疫病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了小反刍兽疫病毒实时荧光RT-PCR检测方法的技术要求。

本标准适用于在生物安全 II 级（BSL-2）以上的实验室进行小反刍兽疫病毒病的诊断、监测及流行病学调查，适用于反刍动物血液血清、淋巴结及口鼻棉拭子中小反刍兽疫病毒核酸的RT-PCR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 19495.2-2004 转基因产品检测 实验室技术要求

中华人民共和国农业部公告第302号（《兽医实验室生物安全技术管理规范》）

农业部关于印发《病死及病害动物无害化处理技术规范》的通知（农医发[2017]25号）

3 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

PPRV: 小反刍兽疫病毒 (Peste des Petits Ruminants virus)

RNA: 核糖核酸 (ribonucleic acid)

RNase: 核糖核酸酶 (ribonuclease)

DEPC: 焦炭酸二乙酯 (diethylpyrocarbonate)

bp: 碱基对 (base pair)

RT-PCR: 反转录聚合酶链式反应 (reverse transcription polymerase chain reaction)

dNTP: 脱氧核糖核苷三磷酸 (deoxy-ribonucleoside triphosphate)

PBS: 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution)

TAE: 三羟甲基氨基甲烷-乙酸电泳缓冲液 (Tris acetate-EDTA buffer)

4 原理

本方法针对小反刍兽疫病毒高度保守区域设计特异性引物和探针，在反应体系中含小反刍兽疫病毒基因组模板的情况下，PCR 反应得以进行并释放荧光信号。利用仪器对 PCR 过程中相应通道的信号强度进行实时监测和输出，实现检测结果的定性分析。

5 仪器和器材

5.1 台式冷冻离心机（离心范围 0~20000r/min）

5.2 冰箱：4℃±1℃，-20℃±1℃，-80℃±1℃

5.3 全自动荧光定量PCR仪 (ABI7000、ABI7300、ABI7500、ABI7900、BIO-Rad CFX384Touch、BIO-Rad CFX96Touch 等)

5.4 离心管: 15 mL、1.5 mL 和 0.2 mL。

5.5 微量可调移液器: 100~1000 μ L, 20~200 μ L, 10~100 μ L, 5~50 μ L, 2~20 μ L, 0.5~10 μ L, 0.2~2 μ L。

6 试剂和引物

6.1 RNA 抽提试剂: Trizol 外观为淡粉色, 于 4~8℃ 保存。

6.2 氯仿: -20℃ 预冷。

6.3 异丙醇: -20℃ 预冷。

6.4 DEPC 水: 去离子水中加入 0.1%DEPC, 37℃ 作用 1h 或室温过夜, 121±1℃ 高压灭菌 15 min。

6.5 75%乙醇: 用无水乙醇和 DEPC 水配制, -20℃ 预冷。

6.6 阳性对照: PPRV 细胞培养物。

6.7 阴性对照: 灭菌水。

6.8 Prime Script™ one Step RT-PCR kit Ver.2 试剂盒。

6.9 PBS: 磷酸盐缓冲液 (0.02 mol/L pH7.2)。

6.10 引物: 用于 RT-PCR 反应的引物浓度为 20 μ mol/L。

注: 本标准中使用的试剂, 除另有说明外, 所有实验使用的试剂等级均为不含 RNA 或 RNase 的分析纯或生化试剂; 所有试剂均用无 RNA 酶污染的无菌的容器分装。

7 操作步骤

7.1 采样与样品的前处理

7.1.1 口鼻棉拭子样品

采样时要将拭子深入口腔、鼻腔来回刮 3~5 次, 取口腔、鼻腔分泌液, 将拭子放入有 1.0mLPBS 的离心管中备用。

7.1.2 血液或血清样品

采用静脉采血方法, 使用无菌注射器抽取羊只血液样品置于离心管中待检或者静置后取上清待检。

7.1.3 淋巴结样品

取少量样品 (2~3 g) 于研钵或匀浆器中研磨, 加 10 mL PBS 混匀, 然后将研磨匀浆转入无菌离心管中, 4℃, 3000 r/min 离心 10 min 取上清液转入无菌的 1.5 mL 离心管中, 编号待检。

7.1.4 存放与运输

采集或处理的样品在2~8℃条件下保存应不超过24h；若需长期保存，应放置-80℃冰箱，但应避免反复冻融（冻融不超过3次）。采集的样品密封后，采用保温壶或保温桶加冰密封，在6~8h之内运送到实验室检测。按照《兽医实验室生物安全技术管理规范》进行样品的生物安全标识。

7.2 荧光 RT-PCR 检测

7.2.1 RNA 提取

RNA 的提取可采用手动提取或者使用商品化试剂盒提取，但是注意提取时设立阳性对照、阴性对照。

7.2.1.1 手动提取 RNA 的操作步骤

7.2.1.1.1 将 750 μL Trizol 加入 1.5 mL 灭菌离心管中，然后加入 250 μL 待检样品，颠倒混匀后室温静置 3~5 min。

7.2.1.1.2 7.2.1.1.2 再加入 250 μL 氯仿，混匀器上振荡混合 15s（或用手反复颠倒混匀），4℃下 1 3000r/min 离心 15 min。

7.2.1.1.3 小心吸取 450 μL 上清液转移至装有 500 μL 异丙醇的 1.5 mL 灭菌离心管中，颠倒混匀。-20℃室温静置 15 min，4℃ 1 3000r/min 离心 10 min。

7.2.1.1.4 弃上清液，加入 1 mL 75%的 DEPC 乙醇，4℃下 13000 r/min 离心 10 min。重复洗涤 2 次。

7.2.1.1.5 4000 r/min 离心 10s，用微量移液器小心将残余液体吸干，室温干燥 3~10 min。

7.2.1.1.6 干燥后用 20 μL DEPC 水溶解管壁上的 RNA，冰上保存备用；若需长期保存应放置-70℃冰箱。

7.2.1.2 试剂盒提取 RNA

严格按照合法的商品化 RNA 提取试剂盒说明书进行操作。

7.2.2 反应体系的配制

反应体系的成分：去离子水 7.5ul，上游引物 PPRVF 0.5ul，下游引物 PPRVR 0.5ul，探针 PPRVP(10umol/L)0.5ul，2×qPCR Master Mix 12.5ul，Taq 聚合酶 0.5ul，反转录酶 0.5ul，加入 PCR 反应管后震荡离心混匀。

7.2.3 加样

7.2.3.1 打开 PCR 反应管盖，加入 PCR 反应液 20 μL，加入样本模板 5 μL，阳性对照和阴性对照也各加 5 μL，记录加样顺序。

7.2.3.2 盖好 PCR 管盖，将 PCR 反应液与样本模板振荡混匀后，4℃，2000 r/min，离心 10s。

7.2.3.3 将 PCR 反应管转移到 PCR 区进行上机。

7.2.4 PCR 过程

7.2.4.1 开机预热并检验仪器性能。

7.2.4.2 取样本准备区准备好的 PCR 反应管，放置在仪器样品槽相应位置，并记录放置顺序。

7.2.4.3 按表 1 设置仪器扩增相关参数，进行 PCR 扩增

表1 仪器扩增相关参数

体系	反应体系设为 25 μ L		
信号采集	小反刍兽疫病毒—FAM 通道采集荧光信号。		
PCR 反应条件	阶段	条件	循环数
	反转录	50 $^{\circ}$ C: 10min	1
	预变性	95 $^{\circ}$ C: 3min	1
	PCR	95 $^{\circ}$ C: 5s 55 $^{\circ}$ C: 60s (此阶段结束时采集荧光信号)	45

8 试验成立条件与结果判定

8.1 试验成立条件

阳性对照：Ct值 \leq 30，有明显指数增长，呈典型的S型曲线。阴性对照：Ct值 $>$ 43或无Ct值，线形为直线或轻微斜线，无明显指数增长期和平台期。试验成立，参考图如下：



8.2 结果判定

阳性：样本检测结果 Ct 值 \leq 40，有明显指数增长，表明样本中检测出该病毒核酸；

阴性：样本检测结果 Ct 值 $>$ 43 或无 Ct 值，表明样本中未检测出该病毒核酸；

可疑：样本检测结果 Ct 值在 40~43 范围，判定为可疑；此时应对样本进行重复检测，如重复实验结果 Ct 值仍在 40~43 范围，有明显指数增长，则判定为阳性，否则为阴性。

结果分析后应保存当前的分析结果，记录好阈值和基线。

9 检测过程中防止交叉污染的措施

按照GB/T 19495.2-2004的规定执行。

10 废弃物处理

按照农业部关于印发《病死及病害动物无害化处理技术规范》的通知（农医发[2017]25号）规定执行。
