ICS 65.020.30
B 44

中国实验动物学会团体标准

T/CALAS 28—2017

实验动物　小鼠细小病毒 MVM 株 PCR 检测方法

Laboratory animal - PCR methods for Minute Virus of Mice

2017-05-18　发布　　2017-05-18　实施

中国实验动物学会　发布

前　言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则编写。

本标准附录 A 为规范性附录。

本标准由中国实验动物学会归口。

本标准由全国实验动物标准化技术委员会（SAC/TC281）技术审查。

本标准由中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会提出并组织起草。

本标准主要起草单位：广东省实验动物监测所，中国食品药品检定研究院。

本标准主要起草人：郭鹏举、张钰、黄韧、岳秉飞、袁文、王静、王吉、付瑞、王淑菁、李晓波。

实验动物　小鼠细小病毒 MVM 株 PCR 检测方法

1　范围

本标准规定了实验动物小鼠细小病毒 MVM 株普通 PCR 和实时荧光 PCR 检测方法。

本标准适用于实验动物及其产品、细胞培养物、实验动物环境和动物源性生物制品中小鼠细小病毒 MVM 株的检测。

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。凡是注明日期的引用文件，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》

GB/T 19495.2 《转基因产品检测　实验室技术要求》

3　术语、定义和缩略语

3.1　术语和定义

下列术语和定义适合于本标准。

3.1.1

聚合酶链式反应 polymerase chain reaction，PCR

体外酶催化合成特异 DNA 片段的方法，模板 DNA 先经高温变性成为单链，在 DNA 聚合酶作用和适宜的反应条件下，根据模板序列设计的两条引物分别与模板 DNA 两条链上相应的一段互补序列发生退火而相互结合，接着在 DNA 聚合酶的作用下以四种 dNTP 为底物，使引物得以延伸，然后不断重复变性、退火和延伸这一循环，使欲扩增的基因片段以几何倍数扩增。简称普通 PCR。

3.1.2

实时荧光聚合酶链式反应 real-time PCR

在常规 PCR 的基础上，在反应体系中加入特异性荧光探针，利用荧光信号积累实时检测整个 PCR 进程，通过检测每次循环中的荧光发射信号，间接反映了 PCR 扩增的目标基因的量，最后通过扩增曲线对未知模板进行定性或定量分析。简称实时荧光 PCR。

3.1.3

Ct 值 cycle threshold

实时荧光 PCR 反应中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。

3.2　缩略语

下列缩略语适用于本标准。

CPE 细胞病变效应（cytopathic effect）
DNA 脱氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid）
MVM 小鼠细小病毒 MVM 株（minute virus of mice）
PBS 磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline）

4 检测方法原理

用合适的方法提取样本中的总 DNA，针对小鼠细小病毒 MVM 株 VP1 基因设计特异的引物序列，通过 PCR 对模板 DNA 进行扩增，根据 PCR 检测结果判定该样品中是否含有小鼠细小病毒 MVM 株。

实时荧光 PCR 方法是在常规 PCR 的基础上，加入了一条特异性的荧光探针，探针两端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团。探针完整时，报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收；PCR 扩增时，*Taq* 酶的 5' → 3' 外切酶活性将探针酶切降解，使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离，淬灭作用消失，荧光信号产生并被检测仪器接受，随着 PCR 反应的循环进行，PCR 产物与荧光信号的增长呈对应关系。因此，可以通过检测荧光信号对核酸模板进行检测。

5 主要设备和材料

5.1 PCR 仪。
5.2 实时荧光 PCR 仪。
5.3 电泳仪。
5.4 凝胶成像分析系统。
5.5 高速冷冻离心机。
5.6 普通离心机。
5.7 恒温孵育器。
5.8 漩涡振荡器。
5.9 组织匀浆器。
5.10 生物安全柜。
5.11 PCR 超净工作台。
5.12 冰箱（-20℃）。
5.13 微量移液器（0.1~2μL、1~10μL、10~100μL、100~1000μL）。
5.14 灭菌离心管（1.5mL、2mL、5mL、15mL），灭菌吸头（10μL、200μL、1mL），灭菌 PCR 扩增反应管（0.2mL，八连管或 96 孔板）。
5.15 聚乙烯薄膜袋：90mm × 150mm 自封袋，使用前紫外灭菌 20min。
5.16 采样工具：剪刀、镊子和灭菌棉拭子等。

6 试剂

除特别说明外，所有实验用试剂均为分析纯；实验用水为去离子水。

6.1 灭菌 PBS。配制方法见附录 A。

6.2 DNA抽提试剂：基因组DNA提取试剂盒DNeasy Blood & Tissue Kit或其他等效产品。

6.3 无水乙醇。

6.4 PCR 试剂：Premix Taq ™（Version 2.0 plus dye）或其他等效产品。

6.5 实时荧光 PCR 试剂：Premix Ex Taq ™（Probe qPCR）或其他等效产品。

6.6 DNA 相对分子质量标准：100~2000bp。

6.7 50×TAE 电泳缓冲液，配制方法见附录 A。

6.8 溴化乙锭：10mg/mL，配制方法见附录 A，或其他等效产品。

6.9 1.5% 琼脂糖凝胶，配制方法见附录 A。

6.10 引物和探针：根据表 1 和表 2 的序列合成引物和探针，引物和探针加入灭菌去离子水配制成 10μmol/L 储备液，-20℃保存。

表 1 普通 PCR 检测引物

引物名称	引物序列（5'→3'）	检测基因	产物大小（bp）
正向引物	CAATACAACAGCACATCAGTCAA	VP1	465
反向引物	CCTTTGGTGTTCCCATCACATT		

表 2 实时荧光 PCR 扩增引物和探针

引物和探针名称	引物和探针序列（5'→3'）	产物大小（bp）
正向引物	GCCATACACACCTGCAGCAAA	73
反向引物	TGGYGATGCTATGGTTGGT	
探针	FAM-TCAATGGAAACACTTGGTTTCTACCCTTGGA-BHQ-1	

注 1：简并碱基 Y：T/C。

注 2：探针也可选用具有与FAM和BHQ-1荧光基团相同检测效果的其他合适的荧光报告基团和荧光淬灭基团组合。

7 检测方法

7.1 生物安全措施

实验操作及处理按照 GB 19489 的规定，由具备相关资质的工作人员进行相应操作。

7.2 采样及样本的处理

采样过程中样本不得交叉污染，采样及样本前处理过程中须戴一次性手套。

7.2.1 脏器组织

剖检，无菌采集动物的肠系膜淋巴结、肾脏、脾脏和肝脏，剪取待检样本 2.0g 于无菌 5mL 离心管，加入 4mL 灭菌 PBS，使用电动匀浆器充分匀浆 1~2min，然后将组织悬液在 4℃，3000r/min 离心 10min，取上清液转入另一无菌 5mL 离心管中，编号备用。

7.2.2 盲肠内容物或粪便

无菌采集动物盲肠内容物或粪便，取待检样本 2.0g 于无菌 5mL 离心管，加入 4mL 灭菌 PBS，使用电动匀浆器充分匀浆 1~2min，12 000r/min 离心 10min，取上清液转入另一无菌 5mL 离心管中，编号备用。

7.2.3 细胞培养物

方法一：直接刮取样本接种后出现 CPE 或可疑的细胞培养物于 15mL 离心管中，3000r/min 离心 10min，去上清，加 1mL 灭菌 PBS 重悬细胞，然后将细胞悬液转移到无菌 1.5mL 离心管中，编号备用。

方法二：将样本接种后出现 CPE 或可疑的细胞培养物反复冻融三次，细胞混悬液转移于 15mL 离心管中，12 000r/min 离心 10min，去细胞碎片，上清液转移到无菌 15mL 离心管中，编号备用。

7.2.4 实验动物环境

7.2.4.1 实验动物饲料、垫料和饮水

取适量实验动物饲料和垫料置于聚乙烯薄膜袋中，加入适量灭菌 PBS（饲料和垫料需全部浸泡于液体中）。密封后浸泡 5~10min，充分混匀，将混悬液转移至 15mL 离心管中，4℃，12 000r/min 离心 10min，取上清液转入另一无菌 5mL 离心管中，编号备用。取适量实验动物饮水直接转移到无菌 5mL 离心管中，编号备用。

7.2.4.2 实验动物设施设备

用灭菌棉拭子拭取实验动物设施设备出风口初效滤膜表面沉积物，将拭子置入灭菌 15mL 离心管，加入适量灭菌 PBS，浸泡 5~10min，充分混匀，取出棉拭子，将离心管于 4℃，12 000r/min 离心 10min，取上清液转入另一无菌 5mL 离心管中，编号备用。

7.2.5 样本的存放

采集或处理的样本在 2~8℃条件下保存应不超过 24h，若需长期保存，须放置 -80℃冰箱，但应避免反复冻融（冻融不超过 3 次）。

7.3 样本 DNA 提取。

7.3.1 取 50~100μL 的样本至 1.5mL 或 2mL 离心管中，加 20μL 蛋白酶 K，用 PBS 补加至 220μL。

7.3.2 加入 200μL 缓冲液 AL，涡旋震荡充分混匀，56℃孵育 10min。

7.3.3 加入 200μL 的无水乙醇，涡旋震荡充分混匀。

7.3.4 移取步骤 7.3.3 的混合液至离心柱上，离心柱放在 2mL 收集管上。≥ 6000*g*（8000r/min）离心 1min。弃收集管 / 液。

7.3.5 离心柱放至新的 2mL 收集管上，加 500μL 的缓冲液 AW1，≥ 6000*g*（8000r/min）离心 1min。弃收集管 / 液。

7.3.6 离心柱放至新的 2mL 收集管上，加 500μL 的缓冲液 AW2，20 000*g*（14 000r/min）离心 3min。弃收集管 / 液。

7.3.7 将离心柱放在一个新的 1.5 离心管上，吸 200μL 的缓冲液 AE 在吸附膜上，室温孵育 1min，≥ 6000*g*（8000r/min）离心 1min。制备好的 DNA 应尽快进行下一步 PCR 反应，若暂时不能进行 PCR 反应，应于 -20℃冰箱保存备用。

注：该 DNA 提取方法是针对 DNA 提取试剂盒 DNeasy Blood & Tissue Kit 给出的，可使用其他等效的 DNA 提取试剂盒进行，提取方法可做相应调整。

7.4 普通 PCR

7.4.1 PCR 反应体系

PCR 反应体系见表 3。反应液的配制在冰上操作，每次反应同时设计阳性对照、阴性对照和空白对照，其中阳性对照以含有 MVM 的组织或培养物提取的 DNA 作为阳性对照

模板，其中阴性对照以不含有 MVM DNA 样本（可以是正常动物组织或正常培养物）作为阴性对照模板，空白对照即为不加模板对照（no template control，NTC），即在反应中用水来代替模板。

表 3 每个样本反应体系配制表

反应组分	用量（μL）	终浓度
2 × Premix *Taq* Mix（plus dye）	25	1 ×
正向引物（10μmol/L）	2	400nmol/L
反向引物（10μmol/L）	2	400nmol/L
DNA 模板	10	
灭菌去离子水	11	
总体积	50	

7.4.2 PCR 反应参数

PCR 反应参数见表 4。

表 4 PCR 反应参数

步骤	温度（℃）	时间（min）	循环数
预变性	95	5	1
变性	94	1	35
退火	54	1	
延伸	72	1	
延伸	72	8	1

注：可使用其他等效的 PCR 检测试剂进行，反应体系和反应参数可做相应调整。

7.4.3 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳检测和拍照

将适量 50 × TAE 稀释成 1 × TAE 溶液，配制含核酸染料溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶。PCR 反应结束后，取 10μL PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳检测，以 DNA 分子量作参照。电压大小根据电泳槽长度来确定，一般控制在 3~5V/cm，当上样染料移动到凝胶边缘时关闭电源。电泳完成后在凝胶成像系统拍照记录电泳结果。

7.5 实时荧光 PCR

7.5.1 实时荧光 PCR 反应体系

实时荧光 PCR 反应体系见表 5。反应液的配制在冰上操作，每次反应同时设计阳性对照、阴性对照和空白对照，其中阳性对照以含有小鼠细小病毒 MVM 株的组织或细胞培养物提取的 DNA 作为阳性对照模板，其中阴性对照以不含有小鼠细小病毒 MVM 株 DNA 样本（可以是正常动物组织或正常细胞培养物）作为阴性对照模板，空白对照即为不加模板对照（no template control，NTC），即在反应中用水来代替模板。

表 5 每个样本反应体系配制表

反应组分	用量（μL）	终浓度
2×Premix Ex Taq Mix	25	1×
正向引物（10μmol/L）	1	200nmol/L
反向引物（10μmol/L）	3	600nmol/L
探针（10μmol/L）	3	600nmol/L
Rox（50×）	1	1×
DNA 模板	10	
灭菌去离子水	7	
总体积	50	

注：试剂 Rox 只在具有 Rox 荧光校正通道的实时荧光 PCR 仪上进行扩增时添加，否则用水补齐。

7.5.2 实时荧光 PCR 反应参数

实时荧光 PCR 反应参数见表 6。

表 6 实时荧光 PCR 反应参数

步骤	温度（℃）	时间（s）	采集荧光信号	循环数
预变性	95	30	否	1
变性	95	5		40
退火，延伸	60	34	是	

注：可使用其他等效的实时荧光 PCR 检测试剂盒进行，反应体系和反应参数可做相应调整。试验检测结束后，根据收集的荧光曲线和 Ct 值判定结果。

8 结果判定

8.1 普通 PCR

8.1.1 质控标准

在阴性、阳性对照成立的条件下，即阳性对照的扩增产物经电泳检测可见到 465bp 扩增条带，阴性对照的扩增产物无任何条带，可进行结果判定。

8.1.2 结果判定

8.1.2.1 样本经琼脂糖凝胶电泳，在凝胶成像仪上观察到 465bp 扩增条带，判为小鼠细小病毒 MVM 株核酸阳性；

8.1.2.2 样本经琼脂糖凝胶电泳，在凝胶成像仪上未观察到 465bp 扩增条带，判为小鼠细小病毒 MVM 株核酸阴性。

8.2 实时荧光 PCR

8.2.1 结果分析和条件设定

直接读取检测结果，基线和阈值设定原则根据仪器的噪声情况进行调整，以阈值线刚好超过正常阴性样本扩增曲线的最高点为准。

8.2.2 质控标准

8.2.2.1 空白对照无 Ct 值，并且无荧光扩增曲线，一直为水平线。

8.2.2.2 阴性对照无 Ct 值，并且无荧光扩增曲线，一直为水平线。

8.2.2.3 阳性对照 Ct 值应≤ 35，并且有明显的荧光扩增曲线，则表明反应体系运行正常，否则此次试验无效，需重新进行实时荧光 PCR 扩增。

8.2.3 结果判定

8.2.3.1 若待检测样本无荧光扩增曲线，则判定小鼠细小病毒 MVM 株核酸阴性。

8.2.3.2 若待检测样本有荧光扩增曲线，且 Ct 值应≤ 35 时，则判断小鼠细小病毒 MVM 株核酸阳性。

8.2.3.3 若待检测样品 Ct 值介于 35 和 40 之间时，应重新进行实时荧光 PCR 检测。重新检测后，若 Ct 值≥ 40 时，则判定小鼠细小病毒 MVM 株核酸阴性。重新检测后的 Ct 值仍介于 35 和 40 之间，则判定小鼠细小病毒 MVM 株核酸可疑阳性，需进一步进行序列测定。

8.3 序列测定

必要时，可取待检样本扩增出的阳性 PCR 产物进行核酸序列测定，序列结果与已公开发表的 MVM 特异性片段序列进行比对，序列同源性在 90% 以上，可确诊待检样本小鼠细小病毒 MVM 株核酸阳性，否则判定小鼠细小病毒 MVM 株核酸阴性。

9 检测过程中防止交叉污染的措施

按照 GB/T 19495.2 中的要求执行。

附录 A

（规范性附录）

溶液的配制

A.1 0.02mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲液（PBS）的配制

A.1.1 A 液

0.2mol/L 磷酸二氢钠溶液：称取磷酸二氢钠（$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$）27.6g，先加适量去离子水溶解，最后定容至 1000mL，混匀。

A.1.2 B 液

0.2mol/L 磷酸氢二钠溶液：称取磷酸氢二钠 $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 53.6g（或 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 71.6g 或 $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 35.6g），先加适量去离子水溶解，最后定容至 1000mL，混匀。

A.1.3 0.02 mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲液（PBS）的配制

取 A 液 14mL，B 液 36mL，加氯化钠（NaCl）8.5g，加 800mL 无离子水溶解稀释，用 HCl 调 pH 至 7.2，最后定容至 1000mL，经 121℃高压灭菌 15min，冷却备用。

A.2 50×TAE 电泳缓冲液

A.2.1 0.5mol/L 乙二铵四乙酸二钠（EDTA）溶液（pH8.0）

乙二铵四乙酸二钠（EDTA-$Na_2 \cdot H_2O$）	18.61g
灭菌去离子水	80mL
5mol/L 氢氧化钠溶液	调 pH 至 8.0

灭菌去离子加至 100mL，121℃，15min 灭菌备用。

A.2.2 50×TAE 电泳缓冲液配制

羟基甲基氨基甲烷（Tris）	242g
冰乙酸	57.1mL
0.5mol/L EDTA 溶液，pH8.0	100mL

灭菌去离子加至 1000mL，121℃，15min 灭菌备用。

用时用灭菌去离子水稀释至 1×使用。

A.3 溴化乙锭（EB）溶液（10μg/μL）

溴化乙锭	20mg
灭菌去离子水	20mL

A.4 含 0.5 μg/mL 溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶的配制

琼脂糖	1.5g

1×TAE 电泳缓冲液加至 100mL

混合后加热至完全融化，待冷至 50~55℃时，加溴化乙锭（EB）溶液 5μL，轻轻晃动摇匀，避免产生气泡，将梳子置入电泳槽中，然后将琼脂糖溶液倒入电泳板上，待凝固后取下梳子备用。

参 考 文 献

田克恭 . 1992. 实验动物病毒性疾病 . 北京：中国农业出版社，76-83.

Ball-Goodrich LJ，Johnson E. 1994. Molecular characterization of a newly recognized mouse parvovirus. J Virol，68：6476-6486.

Besselsen DG，Besch-Williford CL，et al.1995.Detection of newly recognized rodent parvoviruses by PCR. J Clin Microbiol，33（11）：2859-2863.

Besselsen DG，Pintel DJ，Purdy GA，et al. 1996.Molecular characterization of newly recognized rodent parvoviruses. J Gen Virol，77：899-911.

Bootz F，Sieber I，Popovic D，et al. 2003. Comparison of the sensitivity of in vivo antibody production tests with *in vitro* PCR-based methods to detect infectious contamination of biological materials. Laboratory animals，37：341-351.

GB 14922.2—2011 实验动物微生物学等级及监测 .

GB/T 14926.28—2001 实验动物 小鼠细小病毒检测方法 .