

ICS 65.020.30

B 44



中国实验动物学会团体标准

T/CALAS 25—2017

实验动物 小鼠肝炎病毒 PCR 检测方法

Laboratory animals - PCR method for detection of Murine Hepatitis Virus

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、中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

本标准主要起草人：王静、袁文、黄韧、张钰、伍妙梨、郭鹏举、韩凌霞、王伟。

实验动物 小鼠肝炎病毒 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了实验动物小鼠肝炎病毒实时荧光 RT-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肝炎病毒的检测。

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

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。

3.1.2

逆转录-聚合酶链式反应 reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR

以 RNA 为模板，采用 Oligo (dT)、随机引物或特异性引物，RNA 在逆转录酶和适宜反应条件下，被逆转录成 cDNA，然后再以 cDNA 作为模板，进行 PCR 扩增。

3.1.3

实时荧光逆转录-聚合酶链式反应 real-time RT-PCR, 实时荧光 RT-PCR

实时荧光 RT-PCR 方法是在常规 RT-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。

3.1.4

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)

DEPC 焦碳酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate)

DNA 脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid)

MHV 小鼠肝炎病毒 (murine hepatitis virus)

PBS 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline)

RNA 核糖核酸 (ribonucleic acid)

4 检测方法原理

根据小鼠肝炎病毒保守序列 M 蛋白基因, 设计合成一对特异性引物和一条特异性探针, 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 实时荧光 PCR 仪。

5.2 高速冷冻离心机。

5.3 普通离心机。

5.4 恒温孵育器。

5.5 漩涡振荡器。

5.6 组织匀浆器。

5.7 生物安全柜。

5.8 PCR 超净工作台。

5.9 超低温冰箱 (-80℃)。

5.10 微量移液器 (0.1~2μL、1~10μL、10~100μL、100~1000μL)。

5.11 无 RNase 的离心管 (1.5mL、2mL、5mL、15mL), 无 RNase 的吸头 (10μL、200μL、1mL), 无 RNase 的 PCR 扩增反应管 (0.2 mL, 八连管或 96 孔板)。

5.12 聚乙烯薄膜袋: 90mm × 150mm 自封袋, 使用前紫外灭菌 20min。

5.13 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。见附录 A。
- 6.2 无 RNase 去离子水：经 DEPC 处理的去离子水或商品无 RNase 水。见附录 A。
- 6.3 RNA 抽提试剂 TRIzol 或其他等效产品。
- 6.4 无水乙醇。
- 6.5 75% 乙醇（无 RNase 去离子水配制）。
- 6.6 三氯甲烷（氯仿）。
- 6.7 异丙醇。
- 6.8 实时荧光 RT-PCR 试剂：One Step Primerscript™ RT-PCR Kit（Perfect Realtime）或其他等效产品。
- 6.9 引物和探针：根据表 1 的序列合成引物和探针，引物和探针加无 RNase 去离子水配制成 10μmol/L 储备液，-20℃保存。

表 1 实时荧光 RT-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	GGAACCTCTCGTTGGGCATTATACT	108
反向引物	ACCACAAGATTATCATTTTCACAACATA	
探针	FAM-ACATGCTACGGCTCGTGTAACCGAACTGT-BHQ-1	

注：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

活体动物采用安乐死方法进行处死，剖检，无菌采集动物的肠系膜淋巴结、肝脏、脾脏和肠，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 RNA 提取 TRIzol 对人体有害, 使用时应戴一次性手套, 注意防止溅出。

7.3.1 取 200μL 处理后的样本加 1mL TRIzol 后, 充分混匀, 室温静置 10min 使其充分裂解。

7.3.2 按 200μL 氯仿 /mL TRIzol 加入氯仿, 盖紧样本管盖, 用手用力振荡摇晃离心管 15s, 禁用漩涡振荡器, 以免基因组 RNA 断裂。室温静置 5min。4℃ 12 000r/min 离心 15min。

7.3.3 离心后混合物分成三层: 下层红色的苯酚 - 氯仿层, 中间层, 上层无色的水样层。RNA 存在于水样层当中, 水样层的容量大约为所加 TRIzol 容量的 60%。吸取上层水相, 至另一离心管中, 注意不要吸取中间界面。

7.3.4 按 0.5mL 异丙醇 /mL TRIzol 加入异丙醇混匀, 室温放置 10min。4℃ 12 000r/min 离心 10min, 弃上清, RNA 沉淀一般形成一胶状片状沉淀附着于试管壁和管底。

7.3.5 按 1mL 75% 乙醇 /mL TRIzol 加入 75% 乙醇, 温和振荡离心管, 悬浮沉淀。4℃ 7500r/min 离心 5min, 弃上清, 将离心管倒立吸水纸上, 尽量使液体流干。

7.3.6 室温自然风干干燥 5~10min, 注意 RNA 样本不要过于干燥, 否则很难溶解。

7.3.7 用 50~100μL 无 RNase 去离子水溶解 RNA 样本, 制备好的 RNA 应尽快进行下一步 PCR 反应, 若暂时不能进行 PCR 反应, 应于 -80℃ 冰箱保存备用。

7.4 实时荧光 RT-PCR

7.4.1 实时荧光 RT-PCR 反应体系

一步法实时荧光 RT-PCR 反应体系见表 2。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肝炎病毒的组织或细胞培养物提取的 RNA 作为阳性对照模板, 其中阴性对照以不含有小鼠肝炎病毒 RNA 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 2 每个样品反应体系配制表

反应组分	用量 (μL)	终浓度
2 × One Step RT-PCR Buffer III	25	1 ×
<i>Ex Taq</i> HS (5U/μL)	1	
PrimeScriptRT Enzyme Mix II	1	
正向引物 (10μmol/L)	2	400nmol/L
反向引物 (10μmol/L)	2	400nmol/L
探针 (10μmol/L)	2	400nmol/L
Rox	1	
RNA 模板	10	
无 RNase 去离子水	6	
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。

7.4.2 实时荧光 RT-PCR 反应参数

实时荧光 RT-PCR 反应参数见表 3。

表 3 实时荧光 RT-PCR 反应参数

步骤	温度	时间	采集荧光信号	循环数
逆转录	42℃	5min	否	1
预变性	95℃	30s		1
变性	95℃	5s		40
退火, 延伸	60℃	34s	是	

注：可使用其他等效的一步法或两步法实时荧光 RT-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 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品扩增曲线的最高点为准。

8.2 质控标准

8.2.1 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 阴性对照无 Ct 值，并且无荧光扩增曲线，一直为水平线。

8.2.3 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 RT-PCR 扩增。

8.3 结果判定

8.3.1 若待检测样本无荧光扩增曲线，则判定样本小鼠肝炎病毒核酸阴性。

8.3.2 若待检测样本有荧光扩增曲线，且 Ct 值应 ≤ 35 时，则判断样本小鼠肝炎病毒核酸

阳性。

8.3.3 若待检测样本 Ct 值介于 35 和 40 之间时,应重新进行实时荧光 RT-PCR 检测。重新检测后,若 Ct 值 ≥ 40 时,则判定样本小鼠肝炎病毒核酸阴性。重新检测后的 Ct 值仍介于 35 和 40 之间,则判定样本小鼠肝炎病毒核酸可疑阳性,需进一步进行序列测定。

8.4 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小鼠肝炎病毒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肝炎病毒核酸阳性,否则判定小鼠肝炎病毒核酸阴性。

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 0.02 mol/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 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 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 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53.6g (或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.6g 或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 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 无 RNase 去离子水的配制

实验用去离子水按体积比 0.1% 加入 DEPC 摇匀,室温静置过夜,121℃ 高压灭菌 15min,冷却备用。

参考文献

- 邵伟娟,高诚,陈鸿书,等.2000.RT-PCR 方法在小鼠肝炎病毒检测中的应用.上海实验动物科学,20(3): 141-143.
- 邵伟娟,高诚,陆国平,等.2000.小鼠肝炎病毒 RT-PCR 检测方法的建立和比较研究.中国实验动物学报,8(1): 26-30.
- 田克恭.1992.实验动物病毒性疾病.北京:中国农业出版社,76-83.

- 姚玉霞, 丛斌, 彭郁葱, 等. 1998. 逆转录 - 聚合酶链反应检测鼠肝炎病毒方法的建立. 中国实验动物学报, 6 (2): 13-17.
- Barthold SW, Smith AL, Povar ML. 1985. Enterotropic mouse hepatitis virus infection in nude mice. Lab Anim Sci, 35 (6): 613-618.
- Casebolt DB, Qian B, Stephensen CB. 1997. Detection of enterotropic mouse hepatitis virus fecal excretion by polymerase chain reaction. Lab Anim Sci, 47 (1): 6-10.
- GB 14922.2—2011 实验动物微生物学等级及监测.
- GB/T 14926.22—2001 实验动物 小鼠肝炎病毒检测方法.
- Homberger FR, Smith AL, Barthold SW. 1991. Detection of rodent coronaviruses in tissues and cell cultures by using polymerase chain reaction. J Clin Microbiol, 29 (12): 2789-2793.
- Huang DS, Emancipator SN, Fletcher DR, et al. 1996. Hepatic pathology resulting from mouse hepatitis virus S infection in severe combined immunodeficiency mice. Lab Anim Sci, 46 (2): 167-173.
- Kunita S, Terada E, Goto K, et al. 1992. Sequence analysis and molecular detection of mouse hepatitis virus using the polymerase chain reaction. Lab Anim Sci, 42 (6): 593-598.
- Wang RF, Campbell WL, Cao WW, et al. 1999. Diagnosis of mouse hepatitis virus contamination in mouse population by using nude mice and RT-PCR. Mol Cell Probes, 13 (1): 29-33.
- Yamada YK, Yabe M, Takimoto K, et al. 1998. Application of nested polymerase chain reaction to detection of mouse hepatitis virus in fecal specimens during a natural outbreak in an immunodeficient mouse colony. Exp Anim, 47 (4): 261-264.
- Yamada YK, Yabe M, Yamada A, et al. 1993. Detection of mouse hepatitis virus by the polymerase chain reaction and its application to the rapid diagnosis of infection. Lab Anim Sci, 43 (4): 285-290.
-