

ICS 65.020.30

B 44



中国实验动物学会团体标准

T/CALAS 22—2017

实验动物 小鼠诺如病毒检测方法

Laboratory animal - Methods for murine norovirus

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。

本标准附录为资料性附录。

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。

本标准起草单位：中国食品药品检定研究院、广东省实验动物监测所。

本标准主要起草人：李晓波、付瑞、袁文、岳秉飞、黄韧、王吉、张钰、王淑菁。

实验动物 小鼠诺如病毒检测方法

1 范围

本标准规定了小鼠诺如病毒（MNV）的检测方法、试剂等。

本标准适用于小鼠诺如病毒的检测。

2 规范性引用文件

下列标准所包含的条文，通过在本标准中引用而构成为本标准的条文。本标准出版时，所示版本均为有效。所有标准都会被修订，使用本标准的各方应探讨使用系列标准最新版本的可能性。

GB/T 14926.50—2001 《实验动物 酶联免疫吸附试验》

GB/T 14926.52—2001 《实验动物 免疫荧光试验》

GB 19489 《实验室 生物安全通用要求》

3 病毒的分离与鉴定

3.1 基本原理

样本经过处理，样本中的病毒粒子释放，将处理后的样本接种到病毒的易感细胞，在合适的条件下，病毒粒子在易感细胞中增殖，并产生典型的细胞病变，可通过显微镜进行观察判断。

3.2 主要试剂与器材

3.2.1 试剂

3.2.1.1 RAW264.7 细胞。

3.2.1.2 DMEM 高糖培养基。

3.2.1.3 新生牛血清。

3.2.1.4 无菌 PBS。

3.2.2 器材

3.2.2.1 倒置显微镜。

3.2.2.2 二氧化碳培养箱。

3.2.2.3 细胞培养瓶。

3.2.2.4 0.22μm 微孔滤膜。

3.2.2.5 移液管。

3.3 操作步骤

3.3.1 样品的采集

无菌采集小鼠盲肠内容物或粪便，置于离心管中，如不立即进行后续处理，需放

入 -70°C 冰箱保存。

3.3.2 样品的处理

约 100mg 粪便样品加入 900 μL 无菌 PBS, 涡旋震荡混匀, 12 000r/min 离心 10min, 取上清, 上清用 0.22 μm 微孔滤膜进行过滤, 进行后续试验。

3.3.3 接种

将过滤液接种至已长成单层的 RAW264.7 细胞, 接种量为培养液量的 10%, 在含 5% CO_2 的 37°C 培养箱中吸附 1h, 倒弃, 加入含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基继续培养。

3.4 结果判定

3.4.1 观察

接种后 36~72h, 显微镜观察细胞是否出现细胞病变效应 (CPE), 如未出现 CPE, 将细胞冻融 3 次, 盲传 3 代, 如仍无 CPE, 判为小鼠诺如病毒阴性; 如出现 CPE, 需进行下一步鉴定。

3.4.2 鉴定

出现 CPE 的细胞培养物, 进行免疫荧光法或分子生物学方法 (如普通 PCR 或荧光 PCR) 进行鉴定确认。

4 免疫荧光试验

4.1 基本原理

含有病毒抗原的细胞 (组织培养细胞或动物组织细胞) 固定于玻片上, 遇相应抗体形成抗原抗体复合物。此抗原抗体复合物仍保持其抗原活性, 可与相应的第二抗体荧光素结合物结合。荧光素在紫外光或蓝紫光的照射下, 可激发出可见的荧光。因此, 在荧光显微镜下以荧光的有无和强弱判定结果。

4.2 主要试剂与器材

4.2.1 试剂

4.2.1.1 RAW264.7 细胞。

4.2.1.2 DMEM 高糖培养基。

4.2.1.3 新生牛血清。

4.2.1.4 无菌 PBS。

4.2.1.5 荧光素标记的小鼠二抗。

4.2.1.6 伊文思蓝。

4.2.1.7 小鼠诺如病毒毒种 (分离或购买均可)。

4.2.1.8 标准 MNV 抗体阳性和阴性小鼠血清。

4.2.1.9 胰酶。

4.2.1.10 50% 甘油。

4.2.2 器材

4.2.2.1 荧光显微镜。

4.2.2.2 二氧化碳培养箱。

4.2.2.3 生物安全柜。

4.2.2.4 细胞培养瓶、移液管、载玻片、盖玻片、湿盒等。

4.3 操作步骤

4.3.1 抗原片的制备

此步骤在生物安全柜操作，将 MNV 病毒接种至 RAW264.7 细胞，待出现病变后用胰酶消化下细胞，PBS 洗三次，用适量 PBS 悬浮细胞，将细胞悬液滴于玻片孔中。同时消化未感染病毒的同批细胞，滴加同一玻片另一孔内，作为正常细胞对照。孔内滴加的细胞以细胞铺开、不重叠为宜。室温干燥后，冷丙酮（4℃）固定 10min。PBS 漂洗后充分干燥，置于 -20℃ 备用。

4.3.2 加样

取出抗原片，室温干燥后，将用 PBS 1:40 稀释的待检血清和标准血清滴于抗原片上，每份血清加两个病毒抗原孔和一个正常对照孔，置湿盒内，37℃ 孵育 30min。

4.3.3 洗涤

将抗原片取出，用 PBS 振荡洗涤三次，每次 5min，室温干燥。

4.3.4 加二抗

用 0.01% 的伊文思蓝将荧光标记的二抗 1:200 稀释，滴加与抗原片上，置湿盒内，37℃ 孵育 30min。

4.3.5 洗涤：PBS 洗三次，每次 5min。

4.3.6 结果观察

50% 甘油封片，荧光显微镜下观察。

4.4 结果判定

在阴性、阳性对照成立的条件下，及阴性血清与正常细胞和病毒感染细胞反应均无荧光；阳性血清与正常细胞反应无荧光，与病毒感染细胞反应有荧光，即可判定结果。

4.4.1 待检血清与正常和病毒感染细胞均无荧光反应，判为阴性。

4.4.2 待检血清与正常细胞反应无荧光，与感染细胞有荧光反应，判为阳性。

5 酶联免疫吸附试验（ELISA）

5.1 基本原理

包被于固相载体表面的已知抗原与待检血清中的特异性抗体结合形成免疫复合物。此抗原抗体复合物仍保持其抗原活性，可与相应的第二抗体酶结合物结合。在酶的催化作用下底物发生反应，产生有色物质。颜色反应的深浅与待检血清中所含有的特异性抗体的量成正比。

5.2 主要试剂与器材

5.2.1 试剂

5.2.1.1 抗原：人工表达的 MNV 重组抗原或经高速离心纯化的病毒抗原。

5.2.1.2 酶结合物：辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG 抗体。

5.2.1.3 对照血清

5.2.1.3.1 阳性血清：MNV 抗原免疫小鼠获得的抗血清。

5.2.1.3.2 阴性血清：经确认 MNV 抗体阴性的小鼠血清。

5.2.1.4 样品：采集小鼠血液，分离血清，血清必须清亮、透明、不溶血， -20°C 保存或立即检测。

5.2.1.5 其他试剂：包被液、洗涤液、稀释液、磷酸盐-柠檬酸缓冲液、底物溶液、终止液等，依附录 A 自行配制。

5.2.2 器材

5.2.2.1 酶标仪。

5.2.2.2 恒温培养箱。

5.2.2.3 聚苯乙烯酶标板。

5.2.2.4 天平。

5.2.2.5 微量加样器等。

5.3 操作步骤

5.3.1 包被抗原

根据滴定的最佳工作浓度，将 MNV 抗原用包被液稀释，加入酶标板，每孔 $100\mu\text{L}$ ，置 37°C 1h 后再 4°C 过夜。

5.3.2 洗板

用洗涤液洗 5 次，每次 1~2min，叩干，如不马上使用，用铝箔纸真空包装密封，置 4°C 保存。

5.3.3 加样

待检血清和阴性、阳性对照血清分别用稀释液做 1:40 稀释，加入抗原孔，每孔 $100\mu\text{L}$ ，在记录纸标好加样位置， 37°C 孵育 1h 洗涤同上。

5.3.4 加酶结合物

用稀释液将酶结合物稀释成适当浓度，每孔加入 $100\mu\text{L}$ ， 37°C 孵育 1h，洗涤同上。

5.3.5 加底物溶液

每孔加入新配制的底物溶液 $100\mu\text{L}$ ，置 37°C ，避光显色 10~15min。

5.3.6 测定吸光值 (A 值)

每孔加入终止液 $50\mu\text{L}$ ，混匀后立即在酶标仪上进行测定，于 492nm 测定各孔吸光值；也可进行双波长检测，测定 492nm 和 405nm A 值，取两者差值。

5.4 结果判定

a) 阳性血清孔 A 值 ≥ 0.6 ，阴性血清孔 A 值 < 0.2 ，实验成立。

b) 待检血清 A 值 ≥ 0.2 ，同时待检血清 A 值 / 阴性对照 A 值 ≥ 2.1 ，判为阳性；否则判为阴性。

6 聚合酶链式反应 (PCR)

6.1 原理 人工合成的两条特异性引物分别与目的基因变性结合，在合适的条件下，由耐热的 DNA 聚合酶催化引物引导的 DNA 合成（即延伸），完成热变性-复性-延伸的 PCR 循环，通过 30 次左右的循环扩增，可通过琼脂糖凝胶电泳检查扩增的 DNA 特异性条带。

6.2 主要试剂与器材

6.2.1 试剂

6.2.1.1 逆转录试剂：购自商业化公司

6.2.1.2 PCR 试剂：购自商业化公司

6.2.1.3 核酸提取试剂盒：购自商业化公司；

6.2.1.4 引物

(1) 一次 PCR：针对衣壳蛋白基因设计

上游引物：5' -CAGATCACATGCTTCCCAC-3'

下游引物：5' -AGACCACAAAAGACTCATCAC-3'

扩增产物为 187bp。

(2) 套式 PCR 引物：针对 RNA 聚合酶基因设计

P1: 5' -GACATCATGGTGCGCCT-3'

P2: 5' -CTCATTCACAAAGACTGCTG-3'

P3: 5' -TCYTTCTATGGTGATGAYGA-3'

P4: 5' -TCTCAGCATCCATTGTTCCA-3'

第 2 轮的最终扩增产物为 466bp。

6.2.1.5 对照

(1) 阳性对照：MNV 感染的 RAW264.7 细胞，反复冻融 3 次后提取 RNA，经逆转录后得到的 cDNA。

(2) 阴性对照：灭菌双蒸水。

6.2.1.6 其他试剂：DNA marker，琼脂糖，电泳缓冲液，染料均购自商业公司。

6.2.2 器材

6.2.2.1 PCR 仪。

6.2.2.2 电泳仪。

6.2.2.3 凝胶成像仪。

6.2.2.4 高速离心机。

6.2.2.5 恒温水浴。

6.2.2.6 微量移液器。

6.2.2.7 无 RNA 酶和 DNA 酶的 0.2mLPCR 管及其他型号的离心管。

6.3 操作步骤

6.3.1 样本的采集：无菌采集小鼠的粪便、盲肠内容物、脾等任一样本即可。

6.3.2 样本的处理

6.3.2.1 粪便、盲肠内容物的处理

取约 100mg 样本，加入 900 μ L 灭菌 PBS，直接涡旋振荡 30s，12 000r/min 离心 10min，取上清，经 0.2 μ m 滤膜过滤后备用。

6.3.2.2 脾等组织

取约 100mg 样本，加入 900 μ L 灭菌 PBS，用研磨器研磨至匀浆状，12 000r/min 离心 10min，取上清备用。

6.3.3 核酸的提取

取适量上一步骤获得的上清,按核酸提取试剂盒说明提取病毒 RNA 备用。

6.3.4 逆转录

按试剂盒操作说明进行逆转录,不同试剂盒会有差异,在此仅举例说明。25 μ L 反应体系包括:5 $\times$ RT 缓冲液 5 μ L, dNTP 4 μ L, 随机引物 1 μ L, AMV 逆转录酶 0.5 μ L, 待检 RNA 8 μ L, 无 RNA 酶水补足。反应条件为:37 $^{\circ}$ C 90min, 72 $^{\circ}$ C 15min, 4 $^{\circ}$ C 5min 各 1 个循环,获得样本的 cDNA。

6.3.5 PCR 扩增

6.3.5.1 一次 PCR

25 μ L 反应体系包括:10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ L, dNTP 2 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 待检 cDNA 1 μ L, *Taq* 酶 0.5 μ L, 灭菌双蒸水补足。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 30s, 56 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s, 共 35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。

6.3.5.2 套式 PCR

a) 第 1 轮扩增:25 μ L 反应体系包括:10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ L, dNTP 2 μ L, 引物 P1、P2 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 待检 cDNA 1 μ L, *Taq* 酶 0.5 μ L, 灭菌双蒸水补足。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 1min, 55 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min, 共 30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。

b) 第 2 轮扩增:25 μ L 反应体系包括:10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ L, dNTP 2 μ L, 引物 P3、P4 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 第 1 轮产物 1 μ L, *Taq* 酶 0.5 μ L, 灭菌双蒸水补足。反应条件同第 1 轮。

6.3.6 PCR 产物电泳

取一次 PCR 产物或套式 PCR 的第 2 轮 PCR 产物 5 μ L 经 2% 琼脂糖凝胶电泳,在凝胶成像仪观察是否出现目的条带。

6.4 结果判定

6.4.1 一次 PCR

a) 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 187bp 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。

b) 琼脂糖凝胶电泳在凝胶成像仪上观察到 187bp 扩增条带,并经核酸序列测定后,判为小鼠诺如病毒阳性;琼脂糖凝胶电泳在凝胶成像仪上未观察到 187bp 扩增条带,判为小鼠诺如病毒阴性。

6.4.2 套式 PCR

a) 在阴性、阳性对照成立的条件下,即阳性对照的第 2 轮 PCR 扩增产物经电泳检测可见到 466bp 扩增条带,阴性对照的第 2 轮扩增产物无任何条带,可进行结果判定。

b) 琼脂糖凝胶电泳在凝胶成像仪上观察到 466bp 扩增条带,并经核酸序列测定后,判为小鼠诺如病毒阳性;琼脂糖凝胶电泳在凝胶成像仪上未观察到 466bp 扩增条带,判为小鼠诺如病毒阴性。

6.4.3 注意事项

一批样本若多个样本出现目的条带,只需选取几个进行序列测定,如果证实为阳性则

出现目的条带的样本均可判为阳性；否则为阴性。

7 实时荧光 RT-PCR 方法（染料法）

7.1 基本原理

在 PCR 反应体系中加入荧光染料，荧光染料能够特异性的掺入 DNA 双链，从而发射荧光信号，而单链 DNA 荧光染料不会掺入结合，也就不会发射荧光信号，从而保证荧光信号的增加与 PCR 产物的增加完全同步，通过荧光 PCR 仪检测荧光信号和溶解曲线来判断结果。

7.2 主要试剂与器材

7.2.1 试剂

7.2.1.1 逆转录试剂：购自商业化公司

7.2.1.2 SYBR Premix EX Taq™GC：购自商业化公司

7.2.1.3 核酸提取试剂盒：购自商业化公司；

7.2.1.4 引物：针对 MNV ORF1 和 ORF2 交界处保守序列设计

上游引物：5'-CAGGAAYGCTCAGCAGTCTTTGT-3'

下游引物：5'-GGYTGAATGGGGACGGC-3'

7.2.1.5 对照

7.2.1.5.1 阳性对照：MNV 感染的 RAW264.7 细胞，反复冻融 3 次后提取 RNA，经逆转录后得到的 cDNA。

7.2.1.5.2 阴性对照：灭菌双蒸水。

7.2.1.5.3 质粒标准品的制备：人工合成 MNV (KM458057.1) 基因组 5018-5450 DNA 序列，转 pMD19-T-simple 质粒中，作为 MNV 质粒标准品。

7.2.2 器材

7.2.2.1 实时荧光 PCR 仪。

7.2.2.2 高速离心机。

7.2.2.3 微量移液器。

7.2.2.4 无 RNA 酶和 DNA 酶的荧光定量 PCR 管及其他型号的离心管。

7.3 操作步骤

7.3.1 样本的采集

无菌采集小鼠的粪便、盲肠内容物、脾等任一样本即可。

7.3.2 样本的处理

7.3.2.1 粪便、盲肠内容物的处理

取约 100mg 样本，加入 900μL 灭菌 PBS，直接涡旋振荡 30s，12 000r/min 离心 10min，取上清，经 0.2μm 滤膜过滤后备用。

7.3.2.2 脾等组织：取约 100mg 样本，加入 900μL 灭菌 PBS，用研磨器研磨至匀浆状，12 000r/min 离心 10min，取上清备用。

7.3.3 核酸的提取：取适量上一步骤获得的上清，按核酸提取试剂盒说明提取病毒 RNA 备用。

7.3.4 逆转录

按试剂盒操作说明进行逆转录,不同试剂盒会有差异,在此仅举例说明。

25 μ L 反应体系包括:5 $\times$ RT 缓冲液 5 μ L, dNTP 4 μ L, 随机引物 1 μ L, AMV 逆转录酶 0.5 μ L, 待检 RNA 8 μ L, 无 RNA 酶水补足。反应条件为:37 $^{\circ}$ C 90min, 72 $^{\circ}$ C 15min, 4 $^{\circ}$ C 5min 各 1 个循环, 获得样本的 cDNA。

7.3.5 实时荧光 RT-PCR 扩增

7.3.5.1 质粒标准品的稀释

质粒标准品经 10 倍系列稀释,对应的浓度为 10^9 至 10^1 copies/ μ L, 每个稀释度做 3 个重复。

7.3.5.2 反应体系及条件

20 μ L 反应体系包括:2 $\times$ SYBR Premix Ex Taq GC 10 μ L, 上下游引物各 0.4 μ L, 50 $\times$ ROX Reference Dye II 0.4 μ L, 模板 2 μ L, 灭菌双蒸水补足。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 30s; 95 $^{\circ}$ C 10s, 60 $^{\circ}$ C 30s, 共 40 个循环。每个样品须做 3 个重复。

7.4 结果判定

满足下列条件,实验成立:

a) 阳性、阴性对照成立,即阳性对照出现典型扩增曲线,且溶解曲线为单峰;阴性对照无扩增曲线,为一平行直线;

b) 建立的标准曲线参数 slope 在 $-3.5\sim-3$, R^2 大于 0.99, 扩增效率在 90%~110%。

7.4.1 阳性及定量

待检样品出现典型 S 型扩增曲线,且循环阈值 (CT) < 35, 溶解曲线出现与阳性对照相同的单峰,同时符合这 3 个条件,判定该样品为小鼠诺如病毒阳性;根据标准曲线来确定阳性样本 MNV 核酸的浓度 (copies/ μ L)。

7.4.2 阴性

待检样品未出现典型 S 形扩增曲线,或循环阈值 (CT) ≥ 35 , 或溶解曲线峰与阳性对照不符,出现 1 条则判定该样品为小鼠诺如病毒阴性。

8 实时荧光 RT-PCR 法 (探针法)

8.1 基本原理

根据小鼠诺如病毒高度保守的开放阅读框 1 (ORF1) -ORF2 结合区域的基因序列,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' $\rightarrow$ 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。

8.2 主要试剂与器材

8.2.1 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。

- 8.2.1.1 灭菌 PBS。见附录 A。
- 8.2.1.2 无 RNase 去离子水：经 DEPC (焦炭酸乙二酯) 处理的去离子水或商品无 RNase 水。见附录 A。
- 8.2.1.3 RNA 抽提试剂 TRIzol (Lifetechnologies 公司，Cat.No. 15596-026)) 或其他等效产品。
- 8.2.1.4 无水乙醇。
- 8.2.1.5 75% 乙醇 (无 RNase 去离子水配制)。
- 8.2.1.6 三氯甲烷 (氯仿)。
- 8.2.1.7 异丙醇。
- 8.2.1.8 实时荧光 RT-PCR 试剂：One Step PrimerscriptTM RT-PCR Kit (Perfect Realtime) (Takara 公司，Cat.No.RR064A) 1) 或其他等效产品。
- 8.2.1.9 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	TCTGTYCTGCGCTGGGTGC	96
反向引物	GCTGCGCCATCACTCATCC	
探针	FAM- ATGCTGAGACCCCGCAGGAACG -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。

8.2.2 器材

- 8.2.2.1 实时荧光 PCR 仪。
- 8.2.2.2 高速冷冻离心机。
- 8.2.2.3 普通离心机。
- 8.2.2.4 恒温孵育器。
- 8.2.2.5 漩涡振荡器。
- 8.2.2.6 组织匀浆器。
- 8.2.2.7 生物安全柜。
- 8.2.2.8 PCR 超净工作台。
- 8.2.2.9 超低温冰箱 (-80℃)。
- 8.2.2.10 微量移液器 (0.1~2μL，1~10μL，10~100μL，100~1000μL)。
- 8.2.2.11 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 (0.2mL，八连管或 96 孔板)。
- 8.2.2.12 聚乙烯薄膜袋：90mm×150mm 自封袋，使用前紫外灭菌 20min。
- 8.2.2.13 采样工具：剪刀、镊子和灭菌棉拭子等。

8.3 操作步骤

8.3.1 采样及样本的处理

采样过程中样本不得交叉污染, 采样及样品前处理过程中须戴一次性手套。

8.3.1.1 脏器组织

剖检, 无菌采集动物的肠系膜淋巴结、肝脏、脾脏和肠, 剪取待检样品 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。

8.3.1.2 盲肠内容物或粪便

无菌采集动物盲肠内容物或粪便, 取待检样品 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。

8.3.1.3 细胞培养物

a) 方法一: 直接刮取样品接种后出现 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。

b) 方法二: 将样品接种后出现 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。

8.3.1.4 实验动物环境

8.3.1.4.1 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。

8.3.1.4.2 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。

8.3.1.5 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)。

8.3.2 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。

8.3.2.1 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。

8.3.2.2 按 200μL 氯仿 /mL TRIzol 加入氯仿, 盖紧样品管盖, 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。

8.3.2.3 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。

8.3.2.4 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。

8.3.2.5 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。

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

8.3.2.7 用 50~100μL 无 RNase 去离子水溶解 RNA 样品, 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。

8.3.3 实时荧光 RT-PCR

8.3.3.1 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诺如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诺如病毒 RNA 样品 (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 ×
Ex Taq HS (5U/μL)	1	
PrimeScript RT 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)	2.5	500nmol/L
Rox	1	
RNA 模板	10	
无 RNase 去离子水	5.5	
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。

8.3.3.2 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℃	15min	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 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。

8.4 结果判定

8.4.1 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。

8.4.2 质控标准

8.4.2.1 空白对照无 Ct 值, 并且无荧光扩增曲线, 一直为水平线。

8.4.2.2 阴性对照无 Ct 值, 并且无荧光扩增曲线, 一直为水平线。

8.4.2.3 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。

8.4.3 结果判定

8.4.3.1 若待检测样品无荧光扩增曲线, 则判定样品未检出小鼠诺如病毒。

8.4.3.2 若待检测样品有荧光扩增曲线, 且 Ct 值应 ≤ 35 时, 则判断样品中检出小鼠诺如病毒。

8.4.3.3 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 RT-PCR 检测。重新检测后, 若 Ct 值 ≥ 40 时, 则判定样品未检出小鼠诺如病毒。重新检测后的 Ct 值仍介于 35 和 40 之间, 则判定样品检出小鼠诺如病毒。

9 生物安全

以上所有方法的操作均需按 GB 19489 规定执行。

附录 A

(资料性附录)

试剂的配制

A.1 包被液 (0.05mol/L, PH 9.6) 用于 ELISA

碳酸钠	1.59g
碳酸氢钠	2.93g
蒸馏水	加至 1000mL

A.2 PBS (0.01mol/L, pH 7.4) 用于 ELISA 和 IFA

氯化钠	8g
氯化钾	0.2g
磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.83g
蒸馏水	加至 1000mL

A.3 洗涤液 用于 ELISA

PBS (0.01mol/L, pH 7.4)	1000mL
Tween-20	0.5mL

A.4 稀释液 用于 ELISA

含 10% 小牛血清的洗涤液。

A.5 磷酸盐 - 柠檬酸缓冲液 (pH5.0) 用于 ELISA

柠檬酸	3.26g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	12.9g
蒸馏水	700mL

A.6 底物溶液 用于 ELISA

磷酸盐 - 柠檬酸缓冲液 (pH 5.0)	10mL
邻苯二胺 (OPD)	4mg
30% H_2O_2	2 μL

A.7 终止液 (2 mol/L 硫酸) 用于 ELISA

硫酸	58mL
蒸馏水	442mL

A.8 0.02mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲液 (PBS) 的配制 用于实时荧光 RT-PCR

A.8.1 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.8.2 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.8.3 0.02mol/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，用无离子水溶解稀释，最后定容至 1000mL，经 121℃ 高压灭菌 15min，冷却备用。

A.9 无 RNase 去离子水的配制 用于实时荧光 RT-PCR

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