

ICS 65.020.30

B 44



中国实验动物学会团体标准

T/CALAS 39—2017

实验动物 汉坦病毒 PCR 检测方法

Laboratory animal - PCR method for detection of Hantavirus

2017-12-29 发布

2018-01-01 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。

本标准主要起草人：张钰、袁文、黄韧、王静、闵凡贵、吴瑞可。

实验动物 汉坦病毒 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了实验动物汉坦病毒普通 RT-PCR 和实时荧光 RT-PCR 检测方法。

本标准适用于实验动物怀疑本病发生，以及实验动物接种物、实验动物环境和动物源性生物制品中汉坦病毒的检测。

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 14926.19—2001 《实验动物 汉坦病毒检测方法》

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。

(本标准中将“RT-PCR”称为“普通 RT-PCR”是为了与“实时荧光 RT-PCR”进行区别，避免名称混淆。)

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

HV 汉坦病毒 Hantavirus

PBS 磷酸盐缓冲液 phosphate buffered saline

RNA 核糖核酸 ribonucleic acid

4 检测方法原理

用合适的方法提取样本中的总 RNA，分别针对汉坦病毒 M 和 S 片段基因设计特异的引物探针序列，通过 RT-PCR 对模板 RNA 进行扩增，根据 RT-PCR 检测结果判定该样品中是否含有汉坦病毒，套式 PCR 引物中的内引物可用于病毒分型。

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收，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。根据两种类型病毒设计两条探针序列可用于汉坦病毒分型检测。

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 涡旋振荡器。

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（0.1~2 μL，1~10 μL，10~100 μL，100~1000 μL）。

- 5.14 灭菌离心管 (1.5 mL, 2mL, 5 mL, 15 mL), 灭菌吸头 (10 μ L, 200 μ L, 1 mL), 灭菌 PCR 扩增反应管 (0.2 mL, 八连管或 96 孔板)。
- 5.15 聚乙烯薄膜袋: 90 mm $\times$ 150 mm 自封袋, 使用前紫外灭菌 20 min。
- 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 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 RT-PCR 试剂: PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2 试剂盒或其他等效产品。
- 6.9 实时荧光 RT-PCR 试剂: One Step Primerscript™ RT-PCR Kit (Perfect Realtime) 或其他等效产品。
- 6.10 DNA 相对分子质量标准: 100~2000 bp。
- 6.11 50 $\times$ TAE 电泳缓冲液, 配制方法见附录 A。
- 6.12 溴化乙锭: 10 mg/mL, 配制方法见附录 A; 或其他等效产品。
- 6.13 1.5%琼脂糖凝胶, 配制方法见附录 A。
- 6.14 引物和探针: 根据表 1 和表 2 的序列合成引物和探针, 引物和探针加无 RNase 去离子水配制成 10 μ mol/L 储备液, -20 $^{\circ}$ C 保存。

表 1 普通 RT-PCR 检测引物

引物名称		引物序列 (5' $\rightarrow$ 3')	产物大小/bp
HV 通用外引物	P1	AAAGTAGGTGITAYATCYTIACAATGTGG	464
	P2	GTACAICCTGTRCCIACCCC	
型特异性引物-汉滩型	P3	GAATCGATACTGTGGGCTGCAAGTGC	383
	P4	GGATTAGAACCCCAAGCTCGTCTC	
型特异性引物-汉城型	P5	GTGGACTCTTCTTCTCATTATT	418
	P6	TGGGCAATCTGGGGGGTTGCATG	

注: 简并碱基 Y: T/C, R: A/G。

表 2 实时荧光 RT-PCR 扩增引物和探针

病毒基因型	引物和探针名称	引物和探针序列 (5' → 3')
汉滩型	HTN-F	CAATCAYATTTTCACTATTATTATCAGG
	HTN-R	TTAACTGACCCACCCKYTGARTAAT
	HTN-P	FAM- TTCCCACCCATAAATG -MGB
汉城型	SEO-F	GGTGATGAYATGGAYCCAGA
	SEO-R	TTCATAGGTTCTGTTTHGAGA
	SEO-P	VIC-CTTCGTAGCCTGGCTCA -MGB

注：①简并碱基 Y：T/C，R：A/G，K：T/G，H：A/T/C。

②探针也可选用具有与 FAM、VIC 和 MGB 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应戴一次性手套。

7.2.1 脏器组织

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

7.2.2 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 15 mL 离心管中，3000 r/min 离心 10min，去上清，加 1 mL 灭菌 PBS 重悬细胞，然后将细胞悬液转移到无菌 1.5 mL 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 3 次，细胞混悬液转移于 15 mL 离心管中，12 000 r/min 离心 10 min，去细胞碎片，上清液转移到无菌 15 mL 离心管中，编号备用。

7.2.3 实验动物环境

7.2.3.1 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 5~10 min，充分混匀，将混悬液转移至 15 mL 离心管中，4℃、12 000 r/min 离心 10 min，取上清液转入另一无菌 5 mL 离心管中，编号备用。取适量实验动物饮水直接转移到无菌 5 mL 离心管中，编号备用。

7.2.3.2 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 15 mL 离心管，加入适量灭菌 PBS，浸泡 5~10 min，充分混匀，取出棉拭子，将离心管于 4℃、12 000 r/min 离心 10 min，取上清液转入另一无菌 5 mL 离心管中，编号备用。

7.2.4 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 24 h, 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

7.3.1 TRIzol 对人体有害, 使用时应戴一次性手套, 注意防止溅出。

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

7.3.3 按每毫升 TRIzol 加入 200 μL 氯仿, 盖紧样本管盖, 用手用力振荡摇晃离心管 15 s, 不应用涡旋振荡器, 以免基因组 RNA 断裂。室温静置 5 min。4℃、12 000 r/min 离心 15 min。

7.3.4 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。

7.3.5 按每毫升 TRIzol 加入 0.5 mL 异丙醇混匀, 室温放置 10 min。4℃、12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, RNA 沉淀一般形成胶状沉淀附着于试管壁和管底。

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

7.3.7 室温自然风干干燥 5~10 min, RNA 样本不要过于干燥。

7.3.8 用 50~100 μL 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 普通 RT-PCR

7.4.1 第一轮 RT-PCR

7.4.1.1 RT-PCR 反应体系

第一轮 RT-PCR 反应体系见表 3。反应液的配制在冰浴上操作, 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 HV 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 HV 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×Buffer	25	1×
Enzyme Mix	2	
P1 (10 $\mu\text{mol/L}$)	2	400 nmol/L
P2 (10 $\mu\text{mol/L}$)	2	400 nmol/L
DNA 模板	10	
无 RNase 去离子水	9	
总体积	50	

7.4.1.2 RT-PCR 反应参数

RT-PCR 反应参数见表 4。

表4 RT-PCR 反应参数

步骤	温度/℃	时间	循环数
逆转录	50	30 min	1
预变性	95	5 min	1
变性	94	1 min	35
退火	55	1 min	
延伸	72	45 s	
延伸	72	10 min	1

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进行相应调整。

7.4.2 第二轮 RT-PCR

取第一轮 RT-PCR 的扩增产物 10 μL 作为模板，分别采用汉滩型和汉城型两对型特异性引物，参照 7.4.1 第一轮 RT-PCR 的反应体系和反应参数（省去逆转录步骤）进行第二轮 PCR 扩增。

7.4.3 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳检测和拍照

将适量 50 $\times$ TAE 稀释成 1 $\times$ 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 10 μL PCR 产物在 1.5%琼脂糖凝胶进行电泳检测，以 DNA 分子质量作为参照。电压大小根据电泳槽长度来确定，一般控制在 3~5 V/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，其中含有 HV 的组织或细胞培养物提取的 DNA 作为阳性对照模板；以不含有 HV 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 $\times$ One Step RT-PCR Buffer III	25	1 $\times$
Ex Taq HS (5 U/ μL)	1	
PrimeScriptRT Enzyme Mix II	1	
HTN-F (20 $\mu\text{mol/L}$)	1	400 nmol/L
HTN-R (20 $\mu\text{mol/L}$)	1	400 nmol/L
HTN-P (20 $\mu\text{mol/L}$)	1	400 nmol/L
SEO-F (20 $\mu\text{mol/L}$)	1	400 nmol/L
SEO-R (20 $\mu\text{mol/L}$)	1	400 nmol/L
SEO-P (20 $\mu\text{mol/L}$)	1	400 nmol/L

续表

反应组分	用量/ μL	终浓度
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。

7.5.2 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/ $^{\circ}\text{C}$	时间	采集荧光信号	循环数
逆转录	42	5 min	否	1
预变性	95	30 s		1
变性	95	5 s		40
退火, 延伸	60	34 s	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进行相应调整。
试验结束后，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 RT-PCR

8.1.1 质控标准

8.1.1.1 第一轮 RT-PCR 反应（外引物）中，阴性对照和空白对照未出现条带、阳性对照出现预期大小（464 bp）的扩增条带，则表明反应体系运行正常。

8.1.1.2 第一轮 RT-PCR 反应（外引物）中，阴性对照和空白对照未出现条带、阳性对照也未出现预期大小（464 bp）的扩增条带，但是第二轮 PCR 反应（基因型鉴别引物）中一对引物的阳性对照出现预期大小（383 bp 或 418 bp）的扩增条带，则表明反应体系运行正常，且阴性对照和空白对照未出现目的条带。

8.1.1.3 符合上述两种情况之一，即可进行结果判定；否则此次试验无效，需重新进行普通 PCR 扩增。

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 383 bp 扩增条带，判为汉滩型汉坦病毒核酸阳性。

8.1.2.2 样本经琼脂糖凝胶电泳，在凝胶成像仪上观察到 418 bp 扩增条带，判为汉城型汉坦病毒核酸阳性。

8.1.2.3 样本经琼脂糖凝胶电泳，在凝胶成像仪上均未观察到 383 bp 和 418 bp 扩增条带，判为汉坦病毒核酸阴性。

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 两条探针的空白对照无 Ct 值，并且无荧光扩增曲线，一直为水平线。

8.2.2.2 两条探针的阴性对照无 Ct 值，并且无荧光扩增曲线，一直为水平线。

8.2.2.3 汉滩型和汉城型阳性对照 Ct 值 ≤ 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，则判定汉坦病毒核酸阴性。

8.2.3.2 若待检测样本有荧光扩增曲线，且 Ct 值 ≤ 35 时，则判断汉坦病毒核酸阳性，根据探针和病毒的对应关系鉴别诊断汉坦病毒的基因型。

8.2.3.3 若待检测样本 Ct 值介于 35 和 40 之间，应重新进行实时荧光 PCR 检测。重新检测后，若 Ct 值 ≥ 40 ，则判定汉坦病毒核酸阴性。重新检测后，若 Ct 值仍介于 35 和 40 之间，则判定汉坦病毒核酸可疑阳性，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 HV 特异性片段序列进行比对，序列同源性在 90% 以上，可确诊待检样本汉坦病毒核酸阳性，否则判定汉坦病毒核酸阴性。

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

0.2 mol/L 磷酸二氢钠溶液: 称取磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 27.6 g, 先加适量去离子水溶解, 最后定容至 1000 mL, 混匀。

A.1.2 B 液

0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液: 称取磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 53.6 g (或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.6 g, 或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 35.6 g), 先加适量去离子水溶解, 最后定容至 1000 mL, 混匀。

A.1.3 0.02 mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲液 (PBS) 的配制

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

A.3 50×TAE 电泳缓冲液

A.3.1 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA) 溶液 (pH8.0)

乙二胺四乙酸二钠 ($\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	18.61 g
灭菌去离子水	80 mL
5 mol/L 氢氧化钠溶液	调 pH 至 8.0
灭菌去离子水加至 100 mL, 121℃、15 min 灭菌备用。	

A.3.2 50×TAE 电泳缓冲液配制

羟基甲基氨基甲烷 (Tris)	242 g
冰醋酸	57.1 mL
0.5 mol/L EDTA 溶液, pH8.0	100 mL
灭菌去离子水加至 1000 mL, 121℃、15 min 灭菌备用。	
用时用灭菌去离子水稀释至 1×使用。	

A.4 溴化乙锭 (EB) 溶液 (10 μg/μL)

溴化乙锭	20 mg
灭菌去离子水	20 mL

A.5 含 0.5 μg/mL 溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶的配制

琼脂糖	1.5 g
1×TAE 电泳缓冲液	加至 100 mL

混合后加热至完全融化，待冷至 50~55℃时，加溴化乙锭（EB）溶液 5 μL，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，凝胶适宜厚度为 3~5 mm，需确认在梳齿下或梳齿间没有气泡，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.

中华人民共和国卫生部. 2005. 《全国肾综合征出血热监测方案（试行）》.

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.