

ICS 65.020.30

B 44



中国实验动物学会团体标准

T/CALAS 41—2017

实验动物 大鼠泰勒病毒检测方法

Laboratory animal - Methods for detection of rat theilovirus (RTV)

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：袁文、黄韧、张钰、郭鹏举、王静、闵凡贵。

实验动物 大鼠泰勒病毒检测方法

1 范围

本标准规定了实验动物大鼠泰勒病毒检测方法。

本标准适用于实验动物检测，实验动物怀疑本病发生，实验动物接种物、实验动物环境和动物源性生物制品中大鼠泰勒病毒的检测。

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 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双条引物分别与模板 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：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

ELISA 酶联免疫吸附试验 enzyme-linked immunosorbent assay

IFA 免疫荧光试验 indirect immunofluorescence assay

PBS 磷酸盐缓冲液 phosphate buffered saline

RNA 核糖核酸 ribonucleic acid

RTV 大鼠泰勒病毒 rat theilovirus

4 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。

5 酶联免疫吸附试验 (ELISA)

5.1 检测方法原理

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 试剂和材料

5.2.1 特异性抗原

用 RTV 感染 BHK21 细胞, 当病变达+++~++++时, 收获培养物。冻融三次或超声波处理后, 低速离心去除细胞碎片, 上清液再经超速离心浓缩后制成 ELISA 抗原。

5.2.2 正常抗原

BHK 细胞冻融破碎后, 经低速离心去除细胞碎片而获得的上清液。

5.2.3 阳性血清

自然感染 RTV 的抗体阳性血清, 或 RTV 抗原免疫清洁级或 SPF 级大鼠所获得的抗血清。

5.2.4 阴性血清

确诊无 RTV 感染的大鼠血清。

5.2.5 酶结合物

辣根过氧化物酶标记羊或兔抗大鼠 IgG 抗体, 或辣根过氧化物酶标记葡萄球菌蛋白 A (SPA)。

5.2.6 其他试剂

包被液、PBS、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。

5.3 仪器和设备

5.3.1 酶标仪

5.3.2 恒温培养箱

5.3.3 聚苯乙烯板: 40 孔、55 孔或 96 孔(可拆或不可拆)。

5.3.4 微量移液器(1~10 μL , 10~100 μL , 100~1000 μL)。

5.4 操作步骤

5.4.1 待检样本

采集大鼠血液, 分离血清, 血清必须清亮、透明、不溶血, -20°C 保存或立即检测。

5.4.2 包被抗原

根据滴定的最适工作浓度, 将特异性抗原和正常抗原分别用包被液稀释。加入酶标板, 每孔 100 μL , 置 37°C 孵育 1 h 后再 4°C 过夜。

5.4.3 洗板

用洗涤液洗 5 次, 每次 3 min, 叩干; 如不马上使用, 用铝箔纸真空包装密封, 置 4°C 保存。

5.4.4 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, 分别加入两孔(特异性抗原孔和正常抗原孔), 每孔 100 μL , 37°C 孵育 1 h, 洗涤同上。

5.4.5 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 μL , 37°C 孵育 1 h, 洗涤同上。

5.4.6 加底物溶液

每孔加入新配制的底物溶液 100 μL , 置 37°C , 避光显色 10~15 min。

5.4.7 终止反应

每孔加入终止液 50 μL 。

5.4.8 测 OD 值

在酶标仪上, 于 490 nm 处读出各孔 OD 值。

5.5 结果判定

5.5.1 质控标准

在阴性和阳性对照血清成立的条件下, 即阳性血清与特异性抗原反应的 OD 值 ≥ 0.6 , 阴性血清与特异性抗原反应的 OD 值 < 0.2 , 进行结果判定; 否则此次试验无效, 需重新进行试验。

5.5.2 同时符合下列 3 个条件者, 判为阳性:

- 待检血清与正常抗原和特异性抗原反应有明显的颜色区别;
- 待检血清与特异性抗原反应的 OD 值 ≥ 0.2 ;
- 待检血清与特异性抗原反应的 OD 值/阴性对照血清与特异性抗原反应的 OD 值 ≥ 2.1 。

5.5.3 均不符合上述 3 个条件者, 判为阴性。

5.5.4 仅有 1~2 条符合者, 判为可疑, 需选用同一种方法或另一种方法重试。

6 免疫荧光试验 (IFA)

6.1 检测方法原理

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。

6.2 试剂和材料

6.2.1 抗原片

用 RTV 感染 BHK21 细胞, 接种后 24~48 h, 待细胞出现病变或确知细胞内含有丰富的病毒抗原后, 用胰酶消化下细胞, PBS 洗涤三次, 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, 滴加于同一玻片另一孔内, 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 10 min, PBS 漂洗后, 充分干燥, -20℃保存。

6.2.2 阳性血清

自然感染 RTV 的抗体阳性血清, 或 RTV 抗原免疫清洁级或 SPF 级大鼠所获得的抗血清。

6.2.3 阴性血清

确诊无 RTV 感染的大鼠血清。

6.2.4 酶结合物

异硫氰酸荧光素标记羊或兔抗大鼠 IgG 抗体, 使用时用含 0.01%~0.02%伊文思蓝 PBS 稀释至适当浓度。

6.2.5 其他试剂

PBS、50%甘油 PBS 等, 依附录 A 自行配制。

6.3 仪器和设备

6.3.1 荧光显微镜

6.3.2 恒温培养箱

6.3.3 印有 10~40 个小孔的玻片。

6.3.4 微量移液器(1~10 μL, 10~100 μL, 100~1000 μL)。

6.4 操作步骤

6.4.1 待检样本

采集大鼠血液, 分离血清, 血清必须清亮、透明、不溶血, -20℃保存或立即检测。

6.4.2 加样

取出抗原片, 室温干燥后, 将适当稀释的待检血清和阴性、阳性血清分别滴于抗原片上, 每份血清加两个病毒细胞孔和一个正常细胞孔, 置湿盒内, 37℃、30~45 min。

6.4.3 洗涤

用 PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 室温干燥。

6.4.4 加荧光标记二抗

取适当稀释的荧光抗体,滴加于抗原片上,置湿盒内,37℃、30~45 min。

6.4.5 洗涤

PBS 洗 3 次,每次 5 min。

6.4.6 结果观察

50%甘油 PBS 封片,荧光显微镜下观察。

6.5 结果判定

在阴性、阳性对照血清成立的条件下,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反应,即可判定结果。

6.5.1 待检血清与正常细胞和病毒感染细胞均无荧光反应,判为阴性。

6.5.2 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。根据荧光反应的强弱可判定为+~++++。

7 普通 RT-PCR

7.1 检测方法原理

用合适的方法提取样本中的总 RNA,针对大鼠泰勒病毒 5' -UTR 基因设计特异的引物序列,通过 RT-PCR 对模板 RNA 进行扩增,根据 PCR 检测结果判定该样本中是否含有大鼠泰勒病毒。

7.2 试剂和材料

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。

7.2.1 灭菌 PBS。配制方法见附录 A。

7.2.2 无 RNase 去离子水:经焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的去离子水或商品无 RNase 水。配制方法见附录 A。

7.2.3 RNA 抽提试剂:TRIzol 或其他等效产品。

7.2.4 无水乙醇。

7.2.5 75%乙醇(无 RNase 去离子水配制)。

7.2.6 三氯甲烷(氯仿)。

7.2.7 异丙醇。

7.2.8 RT-PCR 试剂:PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2 试剂盒或其他等效产品。

7.2.9 DNA 分子质量标准:100~2000 bp。

7.2.10 50×TAE 电泳缓冲液,配制方法见附录 A。

7.2.11 溴化乙锭:10 mg/mL,配制方法见附录 A;或其他等效产品。

7.2.12 1.5%琼脂糖凝胶,配制方法见附录 A。

7.2.13 引物:根据表 1 的序列合成引物,引物加无 RNase 去离子水配制成 10 μmol/L 储备液,-20℃保存。

表 1 普通 RT-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	GACCTCTTTCAACGCGACG	5'-UTR	363
反向引物	CGATGCTCTGTTCTAAGTTTCC		

7.3 仪器和设备

7.3.1 PCR 仪。

7.3.2 电泳仪。

7.3.3 凝胶成像分析系统。

7.3.4 高速冷冻离心机。

7.3.5 普通离心机。

7.3.6 恒温孵育器。

7.3.7 涡旋振荡器。

7.3.8 组织匀浆器。

7.3.9 生物安全柜。

7.3.10 PCR 超净工作台。

7.3.11 冰箱 (-20℃)。

7.3.12 微量移液器 (0.1~2 μL, 1~10 μL, 10~100 μL, 100~1000 μL)。

7.3.13 灭菌离心管 (1.5 mL, 2 mL, 5 mL, 15 mL), 灭菌吸头 (10 μL, 200 μL, 1 mL), 灭菌 PCR 扩增反应管 (0.2 mL, 八连管或 96 孔板)。

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

7.3.15 采样工具: 剪刀、镊子和灭菌棉拭子等。

7.4 操作步骤

7.4.1 采样及样本的处理

采样过程中样本不得交叉污染, 采样及样本前处理过程中应戴一次性手套。

7.4.1.1 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 2.0 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。

7.4.1.2 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, 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。

7.4.1.3 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 15 mL 离心管中, 3000 r/min 离心 10 min, 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。

7.4.1.4 实验动物环境

7.4.1.4.1 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 5~10 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。

7.4.1.4.2 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 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。

7.4.1.5 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 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）。

7.4.2 样本 RNA 提取

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

7.4.2.2 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。

7.4.2.3 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，禁用漩涡振荡器，以免基因组 RNA 断裂。室温静置 5 min。4℃、12 000 r/min 离心 15 min。

7.4.2.4 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。

7.4.2.5 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 沉淀一般形成一胶状片状沉淀附着于试管壁和管底。

7.4.2.6 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。

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

7.4.2.8 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。

7.4.3 RT-PCR 反应体系

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，以含有 RTV 的组织或培养物提取的 RNA 作为阳性对照模板；以不含有 RTV RNA 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 RT-PCR 反应体系

反应组分	用量/ μL	终浓度
2 $\times$ Buffer	25	1 $\times$
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	

7.4.4 RT-PCR 反应参数

RT-PCR 反应参数见表 3。

表 3 RT-PCR 反应参数

步骤	温度/ $^{\circ}\text{C}$	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。

7.4.5 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 结果判定

7.5.1 质控标准

在阴性、阳性对照成立条件下，阳性对照的扩增产物经电泳检测可见到 363bp 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。

7.5.2 结果判定

7.5.2.1 样本经琼脂糖凝胶电泳，在凝胶成像仪上观察到 363 bp 扩增条带，判为大鼠泰勒病毒核酸阳性。

7.5.2.2 样本经琼脂糖凝胶电泳,在凝胶成像仪上未观察到 363 bp 扩增条带,判为大鼠泰勒病毒核酸阴性。

8 实时荧光 RT-PCR

8.1 检测方法原理

实时荧光 RT-PCR 方法是在常规 RT-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。

8.2 试剂和材料

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 灭菌 PBS。配制方法见附录 A。

8.2.2 无 RNase 去离子水:经 DEPC 处理的去离子水或商品无 RNase 水,配制方法见附录 A。

8.2.3 RNA 抽提试剂:TRIzol 或其他等效产品。

8.2.4 无水乙醇。

8.2.5 75%乙醇(无 RNase 去离子水配制)。

8.2.6 三氯甲烷(氯仿)。

8.2.7 异丙醇。

8.2.8 实时荧光 RT-PCR 试剂:One Step Primerscript™ RT-PCR Kit (Perfect Realtime),或其他等效产品。

8.2.9 引物和探针:根据表 4 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 μmol/L 储备液,-20℃保存。

表 4 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')
正向引物	CCAAGCGTGTGCTATTGTC
反向引物	TCCATAGTAAGAAGATCCGCTGG
探针	FAM-CAGCCATTGACAAAAGTTCCGACGGAAT-BHQ1

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。

8.3 仪器和设备

实时荧光 PCR 仪,其他仪器和设备同 7.3。

8.4 操作步骤

8.4.1 采样及样本的处理

同 7.4.1。

8.4.2 样本 RNA 提取

同 7.4.2。

8.4.3 实时荧光 RT-PCR 反应体系

实时荧光 RT-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，以含有 RTV 的组织或细胞培养物提取的 RNA 作为阳性对照模板；以不含有 RTV 的 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 实时荧光 RT-PCR 反应体系

反应组分	用量/ μL	终浓度
2×One Step RT-PCR Buffer III	25	1×
Ex TaqHS（5 U/ μL ）	1	
PrimeScript RT Enzyme Mix II	1	
正向引物（10 $\mu\text{mol/L}$ ）	2	400 nmol/L
反向引物（10 $\mu\text{mol/L}$ ）	2	400 nmol/L
探针（10 $\mu\text{mol/L}$ ）	2	400 nmol/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。

8.4.4 实时荧光 RT-PCR 反应参数

实时荧光 PCR 反应参数见表 6。

表 6 实时荧光 RT-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：可使用其他等效的实时荧光 PCR 检测试剂盒进行，反应体系和反应参数可进行相应调整。试验检测结束后，根据收集的荧光曲线和 Ct 值判定结果。

8.5 结果判定

8.5.1 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。

8.5.2 质控标准

8.5.2.1 空白对照无 Ct 值，并且无荧光扩增曲线，一直为水平线。

8.5.2.2 阴性对照无 Ct 值，并且无荧光扩增曲线，一直为水平线。

8.5.2.3 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。

8.5.3 结果判定

8.5.3.1 若待检测样本无荧光扩增曲线，则判定大鼠泰勒病毒核酸阴性。

8.5.3.2 若待检测样本有荧光扩增曲线，且 Ct 值 ≤ 35 时，则判断大鼠泰勒病毒核酸阳性。

8.5.3.3 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 ，则判定大鼠泰勒病毒核酸阴性。重新检测后，若 Ct 值仍介于 35 和 40 之间，则判定大鼠泰勒病毒核酸可疑阳性，需进一步进行序列测定。

8.6 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大鼠泰勒病毒特异性片段序列进行比对，序列同源性在 90%以上，可确诊待检样本大鼠泰勒病毒核酸阳性，否则判定大鼠泰勒病毒核酸阴性。

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 PBS (0.01 mol/L, pH 7.4)

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2.83 g
蒸馏水	加至 1000 mL

经 121℃ 高压灭菌 15 min, 冷却备用。

A.2 包被液 (0.05 mol/L, pH 9.6)

碳酸钠	1.59 g
碳酸氢钠	2.93 g
蒸馏水	加至 1000 mL

A.3 洗涤液

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

A.4 稀释液

含 10% 小牛血清的洗涤液。

A.5 磷酸盐-柠檬酸缓冲液 (pH 5.0)

柠檬酸	3.26 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	12.9 g
蒸馏水	700 mL

A.6 底物溶液

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

A.7 终止液 (2 mol/L 硫酸)

硫酸	58 mL
蒸馏水	442 mL

A.8 50% 甘油 PBS

甘油	5 mL
PBS (0.01 mol/L pH 7.4)	5 mL

A.9 无 RNase 去离子水的配制

实验用去离子水按 0.1% (V/V) 加入 DEPC 摇匀, 室温静置过夜, 121℃ 高压灭菌 15

min, 冷却备用。

A.10 50×TAE 电泳缓冲液

A.10.1 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 (EDTA- $\text{Na}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	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.10.2 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 1 000 mL, 121℃、15 min 灭菌备用。
用时以灭菌去离子水稀释至 1×使用。

A.11 溴化乙锭 (EB) 溶液 (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)

溴化乙锭	20 mg
灭菌去离子水	20 mL

A.12 含 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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

- Drake MT, Besch-Williford C, Myles MH, et al. 2011. *In vivo* tropisms and kinetics of rat theilovirus infection in immunocompetent and immunodeficient rats. *Virus Research*, 160: 374-380.
- Drake MT, Riley LK, Livingston RS. 2008. Differential susceptibility of SD and CD rats to a novel rat theilovirus. *Comparative Medicine*, 58: 458-464.
- Dyson MC. 2010. Management of an outbreak of rat theilovirus. *Laboratory Animals*, 39: 155-157.
- Easterbrook JD, Kaplan JB, Glass GE, et al. 2008. A survey of rodent-borne pathogens carried by wild-caught Norway rats: a potential threat to laboratory rodent colonies. *Laboratory Animals*, 42: 92-98.