

ICS 65.020.30

B 44



中国实验动物学会团体标准

T/CALAS 44—2017

实验动物 鼠痘病毒 PCR 检测方法

Laboratory animal - PCR method for detection of Ectromelia virus

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：王静、黄韧、张钰、袁文、闵凡贵、吴瑞可。

实验动物 鼠痘病毒 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了鼠痘病毒普通 PCR 和实时荧光 PCR 检测方法。

本标准适用于实验动物怀疑本病发生，实验动物接种物、实验鼠环境和鼠源性生物制品中鼠痘病毒的检测。

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 14926.20—2001 《实验动物 鼠痘病毒检测方法》

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

实时荧光聚合酶链反应 **real-time PCR, 实时荧光 PCR**

实时荧光 PCR 方法是在常规 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。（本标准中将“PCR”称为“普通 PCR”是为了与“实时荧光 PCR”进行区别，避免名称混淆。）

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

Ect 鼠痘病毒 Ectromelia virus

PBS 磷酸盐缓冲液 phosphate buffered saline

4 检测方法原理

根据鼠痘病毒 GenBank 中序列, 针对鼠痘病毒核酸保守序列 IFN- γ 受体和 TNF 受体基因设计特异的引物和探针序列, 分别通过 PCR 和实时荧光 PCR 对模板 DNA 进行扩增, 根据 PCR 和实时荧光 PCR 检测结果判定该样品中是否含有病毒核酸成分。PCR 的基本工作原理是以拟扩增的 DNA 分子为模板, 以一对分别与模板 5' 端和 3' 端互补的寡核苷酸片段为引物 (primer), 在耐热 DNA 聚合酶的作用下, 按照半保留复制的机制, 沿着模板链延伸直至完成新的 DNA 分子合成。重复这一过程, 即可使目的 DNA 片段得以大量扩增。实时荧光 PCR 则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。

5 主要设备和材料

5.1 实时荧光 PCR 仪。

5.2 PCR 仪。

5.3 电泳仪。

5.4 凝胶成像分析系统。

5.5 Nanodrop 紫外分光光度计。

5.6 高速冷冻离心机

5.7 台式离心机。

5.8 恒温孵育器。

5.9 涡旋振荡器。

5.10 组织匀浆器或手持式均质器。

5.11 生物安全柜。

5.12 PCR 工作台。

5.13 -80°C 冰箱, -20°C 冰箱, $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

5.14 微量移液器 (10 μL , 100 μL , 1000 μL)。

5.15 无 RNase 和 DNase 污染的离心管 (1.5 mL, 2 mL, 5 mL, 15 mL), 无 RNase 和 DNase 污染的吸头 (10 μL , 200 μL , 1 mL), 无 RNase 和 DNase 污染的 0.2 mL PCR 扩增反应管。

5.16 采样工具：剪刀、镊子、注射器等。

6 试剂

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 分子质量标准：100~2000 bp。

6.7 50×TAE 电泳缓冲液，配制方法见附录 A。

6.8 溴化乙锭：10 mg/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 的序列合成普通 PCR 引物和实时荧光 PCR 引物及探针，引物和探针加无 RNase 去离子水配制成 10 μmol/L 和 5 μmol/L 储备液，-20℃保存。

表 1 普通 PCR 引物序列

引物名称	引物序列（5'→3'）	产物大小/bp
正向引物	TGACTGAATACGACGAC	338
反向引物	TGGATCTAATTGCGCATG	

表 2 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	ATCCGGATACTACTGCGAATTTG
反向引物	CCGTAACCAGAACCACACTTTG
探针	FAM -CAAACGGTTGCAGGCTATGTGTACCACAA-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应戴一次性手套。

7.2.1 脏器组织

活体动物采用安乐死方法进行处死，剖检，无菌采集动物的肝脏、脾脏或病变皮肤组织，剪取待检样本 1.0 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 盲肠内容物或粪便

无菌采集约 1 g 的盲肠内容物或 1~2 颗粪便置于无菌 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。

7.2.3 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 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, 去除细胞碎片, 上清液转移到无菌 15 mL 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 5~10 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。

7.2.4.2 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。

7.2.5 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 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 DNA 提取

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

7.3.2 加入 200 μ L 缓冲液 AL, 涡旋振荡充分混匀, 56℃孵育 10 min。

7.3.3 加入 200 μ L 的无水乙醇, 涡旋振荡充分混匀。

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

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

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

7.3.7 将离心柱放在一个新的 1.5 mL 离心管上, 吸取 200 μ L 的缓冲液 AE 在吸附膜上, 室温孵育 1 min, ≥ 6000 g (8000 r/min) 离心 1 min。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, 提取方法可进行相应调整。

7.4 普通 PCR

7.4.1 普通 PCR 反应体系

普通反应体系见表 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，以含有鼠痘病毒的组织或细胞培养物提取的 DNA 作为阳性对照模板；以不含有鼠痘病毒 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；空白对照为非模板对照（no template control, NTC）。所有样本和对照设置两个平行反应。若使用其他公司 PCR 试剂，应按照其说明书规定的反应体系进行操作。

表 3 PCR 反应体系

试剂	用量/ μL	终浓度
2×Premix Taq Mix （Loading dye mix）	10	1×
ddH ₂ O	6.4	
PCR 正向引物（10 $\mu\text{mol/L}$ ）	0.8	0.4 $\mu\text{mol/L}$
PCR 反向引物（10 $\mu\text{mol/L}$ ）	0.8	0.4 $\mu\text{mol/L}$
DNA 模板	2	
总体积	20	

7.4.2 普通 PCR 反应参数

普通 PCR 反应参数见表 4。

表 4 普通 PCR 反应参数

步骤	温度/ $^{\circ}\text{C}$	时间	循环数
预变性	94	5 min	1
变性	95	30 s	35
退火	55	30 s	
延伸	72	30 s	
后延伸	72	5 min	1

注：可使用其他等效的 PCR 检测试剂盒进行，反应体系和反应参数可进行相应调整。

7.4.3 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 10 μL PCR 产物在 1.5%琼脂糖凝胶中进行电泳检测，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，以含有鼠痘病毒的组织或细胞培养物提取的 DNA 作为阳性对照模板；以不含有鼠痘病毒 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；空白对照即为非模板对照（no template control, NTC）。所有样本和对照设置两个平行反应。若使用其他公司实时荧光 PCR 试剂，应按照其说明书规定的反应体系进行操作。反应体系见表 5。

表 5 实时荧光 PCR 反应体系

反应组分	用量/ μL	终浓度
2×Premix Ex Taq Mix	10	1×
正向引物（10 $\mu\text{mol/L}$ ）	0.8	400 nmol/L
反向引物（10 $\mu\text{mol/L}$ ）	0.8	400 nmol/L
探针（5 $\mu\text{mol/L}$ ）	1	250 nmol/L
Rox（50×	0.4	
cDNA 模板	2	
ddH ₂ O	5	
总体积	20	

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。试验检测结束后，根据收集的荧光曲线和 Ct 值判定结果。

表 6 实时荧光 PCR 反应参数

步骤	温度/ $^{\circ}\text{C}$	时间	循环数	采集荧光信号
预变性	95	30 s	1	否
变性	95	5 s	40	否
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。

8 结果判定

8.1 普通 PCR 结果判定

8.1.1 质控标准：阴性对照和空白对照未出现条带，阳性对照出现预期大小（338 bp）的目的扩增条带则表明反应体系运行正常，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 质控成立条件下，若样本未出现预期大小（338 bp）的扩增条带，则可判定样本鼠痘病毒核酸检测阴性。

8.1.2.2 质控成立条件下，若样本出现预期大小（338 bp）的扩增条带，则可判定样本鼠痘病毒核酸检测阳性。

8.2 实时荧光 PCR 结果判定

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 ≤ 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 质控成立条件下，若待检测样本无荧光扩增曲线，则判定样本鼠痘病毒核酸检测阴性。

8.2.3.2 质控成立条件下，若待检测样本有荧光扩增曲线，且 Ct 值 ≤ 35 时，则判定样本中鼠痘病毒核酸检测阳性。

8.2.3.3 质控成立条件下，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 ，则判定样本未检出鼠痘病毒。重新检测后，若 Ct 值仍介于 35 和 40 之间，则判定样本鼠痘病毒可疑阳性，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鼠痘病毒特异性片段序列进行比对，序列同源性在 90%以上，可确诊待检样本鼠痘病毒核酸阳性，否则判定鼠痘病毒核酸阴性。

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 50×TAE 电泳缓冲液

A.2.1 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.2.2 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。	
用时以灭菌去离子水稀释至 1×使用。	

A.3 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.4 含 0.5 μg/mL 溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶的配制

琼脂糖	1.5 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

- 付瑞, 岳秉飞, 贺争鸣. 2012. 鼠痘病毒 PCR 检测方法的建立及在鼠源性生物制品检定中的应用. 实验动物科学, (03): 12-14+19.
- 葛文平, 张旭, 高翔, 等. 2012. 我国商业化 SPF 级小鼠病原体污染分析. 中国比较医学杂志, (3): 65-68.
- 李嘉荣, 钱琴, 来永禄, 等. 2000. 鼠痘病毒潜伏感染的研究. 上海实验动物科学, (2): 82-85+95.
- 钱琴, 屈霞琴, 陈天培. 2003. 鼠痘病毒检测方法的进展. 上海畜牧兽医通讯, (5): 10-11.
- 仇保丰, 宋鸿雁, 董蓉莲, 等. 2015. 鼠痘、小鼠肝炎和鼠仙台病毒感染症的国内流行情况及防控对策. 中国动物检疫, (10): 9-14.
- 应贤平, 钱琴, 屈霞琴, 等. 2000. 实验小鼠痘病毒感染检测分析. 中国实验动物学杂志, (2): 8-12.
- 赵丽娟. 2014. 鼠痘病毒环介导等温扩增检测方法的研究. 扬州: 扬州大学硕士学位论文.
- Garver J, Weber L, Vela EM, et al. 2016. Ectromelia Virus Disease Characterization in the BALB/c Mouse: A Surrogate Model for Assessment of Smallpox Medical Countermeasures. Viruses, 8 (7): 203.
- McInnes EF, Rasmussen L, Fung P, et al. 2011. Prevalence of viral, bacterial and parasitological diseases in rats and mice used in research environments in Australasia over a 5-y period. Lab Anim (NY), 40 (11): 341-350.
- Melo-Silva CR, Tschärke DC, Lobigs M, et al. 2017. Ectromelia virus N1L is essential for virulence but not dissemination in a classical model of mousepox. Virus Res, 228: 61-65.
- Sakala IG, Chaudhri G, Scalzo AA, et al. 2015. Evidence for Persistence of Ectromelia Virus in Inbred Mice, Recrudescence Following Immunosuppression and Transmission to Naive Mice. PLoS Pathog, 11 (12): e1005342.
- Sigal LJ. 2016. The Pathogenesis and Immunobiology of Mousepox. Adv Immunol, 129: 251-276.
- Szulc-Dabrowska L, Gierynska M, Boratynska-Jasinska A, et al. 2013. Quantitative immunophenotypic analysis of antigen-presenting cells involved in ectromelia virus antigen presentation in BALB/c and C57BL/6 mice. Pathog Dis, 68 (3): 105-115.