



中华人民共和国国家标准

GB/T 38740—2020

实验动物 猴马尔堡病毒检测方法

Laboratory animal—Method for examination of simian Marburg virus (MARV)

2020-04-28 发布

2020-08-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国实验动物标准化技术委员会(SAC/TC 281)提出并归口。

本标准起草单位:海南出入境检验检疫局检验检疫技术中心、中华人民共和国福州海关、中华人民共和国成都海关、中华人民共和国海口海关、中华人民共和国济南海关、北京脑科学与类脑研究中心、中华人民共和国海口海关、中华人民共和国昆明海关。

本标准主要起草人:李丹丹、张体银、安徽、王绥家、凌宗帅、李文龙、陈平亚、艾军。



实验动物 猴马尔堡病毒检测方法

1 范围

本标准规定了猴马尔堡病毒实时荧光 RT-PCR 检测的操作方法。
本标准适用于猴马尔堡病毒的检测。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 18088 出入境动物检疫采样

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

马尔堡病毒 Marburg virus

一种高致病性病毒,属丝状病毒科(Filoviridae),单股负链 RNA 病毒,基因组约 19.1 kb,为已知的最大的负链 RNA 病毒。

3.2

逆转录实时荧光聚合酶链式反应 real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction; real-time RT-PCR

将 mRNA 逆转录为 cDNA 后再作为模板进行实时荧光 PCR 扩增。PCR 反应体系中加入一对引物的同时加入一条特异性的荧光探针,该探针为一寡核苷酸片段,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 特异性扩增时,*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,从而荧光监测系统可接收到荧光信号,实现了荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步。

3.3

噪音 noise

荧光 PCR 仪在仅仅使用 PCR 管和水状态下的本底荧光强度。

3.4

Ct 值 cycle threshold value

从基线到指数增长的拐点所对应的 PCR 反应循环次数。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DEPC:焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate)
 dNTP:脱氧核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate)
 FAM:6-羧基荧光素(6-carboxy fluorescein)
 MARV:马尔堡病毒(Marburg virus)
 PBS:磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline)
 RNA:核糖核酸(ribonucleic acid)
 RT-PCR:逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction)
 SDS:十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate)
 TAMRA:6-羧基四甲基若丹明(6-carboxytetramethylrhodamine)
 Taq 酶:Taq DNA 聚合酶(Taq DNA polymerase)
 Tris:三(羟甲基)氨基甲烷[tris(hydroxymethyl) aminomethane]

5 试剂或材料

本标准所用水应符合 GB/T 6682 中一级水的规格要求。

- 5.1 裂解液:Trizol 或其他等效裂解液。
- 5.2 三氯甲烷:异戊醇:体积比 24:1。
- 5.3 异丙醇:—20℃ 预冷。
- 5.4 磷酸盐缓冲液(PBS):见附录 A 中的 A.1。
- 5.5 无 RNase 水:见 A.2。
- 5.6 75%乙醇:见 A.3。
- 5.7 逆转录酶:—20℃ 保存,避免温度剧烈变化。
- 5.8 10×RT-PCR 缓冲液。
- 5.9 dNTPs:含 dCTP、dGTP、dATP、dTTP 各 2.5 mmol/L。
- 5.10 MgCl₂:25 mmol/L。
- 5.11 Taq DNA 聚合酶:—20℃ 保存,避免反复冻融或温度剧烈变化。
- 5.12 RNA 酶抑制剂。
- 5.13 阳性对照:体外转录的、非感染性的、猴马尔堡病毒阳性 RNA 片段, DNA 序列参见附录 B。
- 5.14 阴性组织对照:猴马尔堡病毒阴性组织样品。
- 5.15 引物和探针,浓度为 10 μmol/L,序列如下:
 上游引物 MARV-F:5'-TTG GTG CGG ACC TCC AAA GT-3';
 下游引物 MARV-R:5'-GCG CAA TTG CTG AGA GCT GA-3';
 探针:5'-FAM-AGC AGG CGT TGA GCA ACC TAG CCC GA-BHQ1-3'。

6 仪器设备

- 6.1 荧光定量 PCR 核酸扩增仪。
- 6.2 生物安全柜。
- 6.3 电子天平。
- 6.4 高速冷冻离心机,台式离心机。
- 6.5 冷藏冷冻冰箱。
- 6.6 组织匀浆器。
- 6.7 旋涡振荡器。

6.8 微量可调移液器:2 μL 、10 μL 、20 μL 、100 μL 、200 μL 、1 000 μL 。

6.9 低温冰箱,温度 $\leq -70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

7 样品采集

7.1 生物安全要求

样品的采集、保存及运输过程中应做好相关人员生物安全保护,并符合 GB/T 18088 的相关要求。样品的处理应在具有生物安全 3 级条件的实验室中进行,实验室条件符合 GB 19489 要求。

7.2 取样工具

棉拭子、剪刀、镊子、离心管、一次性无菌注射器,上述取样工具应无菌。

7.3 血液样品

用无菌注射器直接吸取血液至 1.5 mL 无菌抗凝离心管中,编号备用。

7.4 肛拭子或者粪便

将灭菌的棉拭子插入肛门或者粪便中轻轻左右搅动,然后将拭子放入装有 1.5 mL PBS 的离心管内,加盖、编号。棉拭子样品于旋涡振荡器上振荡混匀约 5 s 后,于离心机中瞬时离心,立即使用或 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

7.5 内脏样品

用无菌的剪刀和镊子剪取待检动物的肝脏、肾脏、心脏或者脾脏约 2.0 g 于组织匀浆器中,加入 10 mL PBS 匀浆,然后将组织悬液转入无菌 1.5 mL 离心管中 3 000 g 离心 10 min,取上清液转入另一无菌 1.5 mL 离心管中,编号备用。

7.6 存放和运送

采集或处理的样本在 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存应不超过 24 h;若长期保存,应放置 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,避免反复冻融(最多冻融 3 次)。采集的样品密封后,采用保温壶或保温桶加冰密封,尽快运送到实验室。

8 试验步骤

8.1 实验室生物安全要求

病原样本的检测应在生物安全 3 级条件的实验室中进行,实验室条件符合 GB 19489 要求。

8.2 样本核酸提取

8.2.1 在样本处理区进行。为防止 RNA 降解,所用试验用具及溶液应无 RNA 酶,操作过程中应佩戴一次性橡胶或乳胶手套。

8.2.2 取 200 μL 病毒液或已处理好的样品加入到无 RNA 酶的 1.5 mL 离心管中,加入 600 μL Trizol 试剂,用旋涡振荡器剧烈振荡 15 s 后,室温放置 5 min。

8.2.3 加入 200 μL 三氯甲烷,用旋涡振荡器剧烈振荡 15 s 后室温放置 3 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 12 000 g 离心 15 min。

8.2.4 吸取上清液转移至一个新的无 RNA 酶的 1.5 mL 离心管中,加入 500 μL 异丙醇,上下颠倒混

匀,室温放置 10 min。

8.2.5 4 ℃, 12 000 g 离心 15 min, 弃上清液, 将离心管倒置于吸水纸上, 将液体去除。

8.2.6 加入 1 000 μ L 预冷的 75%乙醇, 缓慢颠倒洗涤沉淀。

8.2.7 4 ℃, 12 000 g 离心 15 min, 弃上清液, 将离心管倒置于吸水纸上, 室温干燥沉淀 5 min~10 min。

8.2.8 加入 20 μ L DEPC 水, 溶解沉淀后, 室温孵育 10 min。提取的 RNA 应在 2 h 内使用或 -70 ℃冰箱保存备用。

8.2.9 在实验过程中, 同时设置阴性对照和以 DEPC 水空白对照。

8.2.10 可采用同等效果的商业化 RNA 抽提试剂盒代替以上方法。

8.3 反应体系

取出相应的荧光 RT-PCR 试剂、引物探针等, 在室温下融化后, 2 000 g 离心 5 s。按样品数量配制反应液, 每个反应管包含: 10 $\times$ RT-PCR 缓冲液 2 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 2 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 1.5 μ L, 10 μ mol/L 上下游引物各 1 μ L, 10 μ mol/L 探针 0.5 μ L, 5 U/ μ L DNA 聚合酶 0.5 μ L, 5 U/ μ L 逆转录酶 0.5 μ L, 40 U/ μ L RNA 酶抑制剂 0.5 μ L, DEPC 水 6.5 μ L。充分混合均匀, 向每个反应管中各分装 16 μ L, 转移至样本处理区, 最后加入总 RNA 4 μ L。

实时荧光 PCR 扩增可以采用等效的商品化荧光定量 PCR 试剂盒。

8.4 反应程序

50 ℃反转录 30 min; 95 ℃预变性 5 min; 95 ℃变性 15 s, 61 ℃退火 30 s, 收集荧光, 共 32 个循环。同时设阳性对照、阴性对照和空白对照, 记录 Ct 值。可根据不同仪器要求将反应程序做适当调整。

8.5 结果判定

8.5.1 结果分析条件设定

综合分析仪器给出的各项结果, 基线以仪器给出的默认值作为参考, 阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照扩增曲线的最高点为准, 具体根据仪器噪音情况进行调整, 选择 FAM 通道进行分析。

8.5.2 质控标准

阳性对照样品有对数扩增曲线, 而且 Ct 值 $\leq$ 28。

阴性对照和空白对照无 Ct 值并且无扩增曲线。

二者均成立才可判定试验成立。

8.5.3 结果描述及判定

检验样本 Ct 值 $\leq$ 28, 且出现典型的扩增曲线, 则判定 MARV 阳性。

检验样本 28<Ct 值 $\leq$ 32 时, 重复一次, 如果 Ct 值仍然 $\leq$ 32, 并且曲线有明显的对数增长期, 则判定 MARV 阳性; 否则判定 MARV 阴性。

样本 Ct 值为零或 Ct 值>32 时, 则判定 MARV 阴性。

附 录 A
(规范性附录)
试 剂 配 方

A.1 0.01 mol/L PBS

NaCl	8.5 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2.8 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g

将上述成分依次溶解,去离子水定容至终体积为 1 000 mL,调 pH 至 7.2,121 ℃ 高压灭菌 20 min,室温保存。

A.2 无 RNase 超纯水(DEPC 水)

超纯水	100 mL
焦炭酸二乙酯(DEPC)	50 mL

室温过夜,121 ℃,15 min 灭菌,或直接购买无 RNase 超纯水。

A.3 75%乙醇

无水乙醇	 7.5 mL
无 RNase 超纯水	2.5 mL

现配现用。

附 录 B
(资料性附录)
参 考 序 列

实时荧光 RT-PCR 扩增的猴马尔堡病毒基因序列(共 163 bp)

ttggtgcggacctccaaagtaaaaaatgaagttgctagtttcaagcaggcggttgagcaacctagcccgacatggagaatacgcaccatttgcac
gggttctgaatttatcagggattaacaacctcgagcatggactctatcctcagctctcagcaattgcgc
