

实验动物 实验猪副流感病毒 5 型 RT-PCR 检测技术规范

地方标准信息服务平台

2024 - 08 - 30 发布

2024 - 09 - 29 实施

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由黑龙江省科学技术厅提出并归口。

本文件起草单位：中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

本文件主要起草人：陈建飞、冯力、刘怀然、张鑫、郭龙军、石达、时洪艳。

地方标准信息服务平台

实验动物 实验猪副流感病毒 5 型 RT-PCR 检测技术规范

1 范围

本文件规定了实验猪副流感病毒5型RT-PCR检测的样品采集、样品记录保存、样品处理、病毒RNA提取、RT-PCR操作程序和结果判定的要求，描述了相应的操作方法。

本文件适用于实验猪粪便、小肠及内容物中副流感病毒5型的定性检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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实验方法

GB 19489 实验室生物安全通用要求

NY/T 1948 兽医实验室生物安全要求通则

SN/T 4835—2017 实验室生物废弃物管理要求

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

cDNA: 互补脱氧核糖核酸 (complementary deoxyribonucleic acid)

DEPC: 焦碳酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate)

ddH₂O: 双蒸水 (double distilled water)

dNTPs: 三磷酸脱氧核糖核苷混合物 (deoxyribonucleotide triphosphate mixture)

M-MLV: 莫洛尼鼠白血病病毒 (moloney Murine Leukemia Virus)

PBS: 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline)

PPIV5: 猪副流感病毒5型 (porcine parainfluenza virus 5)

RNA: 核糖核酸 (ribonucleic acid)

RNase: 核糖核酸酶 (ribonuclease)

RT-PCR: 反转录-聚合酶链式反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction)

5 基本要求

5.1 生物安全

应按照GB 19489、NY/T 1948、SN/T4835—2017的规定执行。

5.2 人员

5.2.1 采样人员应具有一定的专业技术知识，熟练掌握采样工作程序和采样操作技术。采样时应戴口罩、手套，穿一次性防护服、鞋套。

5.2.2 检测人员进行样品处理、病毒 RNA 提取和 RT-PCR 操作时应穿工作服、戴一次性无菌手套。

6 样品采集

6.1 采样工具

6.1.1 手术刀、剪刀和镊子应无菌处理。

6.1.2 一次性无菌注射器、无菌采样棉签和无菌采样管（2 mL、25 mL、50 mL）。

6.2 粪便采集

用一次性无菌注射器吸取腹泻猪只的粪便1 mL~2 mL，或轻轻挤压腹泻猪的腹部，用无菌采样棉签从肛门处采集粪便5 g~10 g，放入无菌采样管中编号保存备用。

6.3 小肠及内容物采集

用手术刀剖开病死仔猪腹腔，分别在病变明显（膨胀、肠壁变薄、充满淡黄色或灰色液体）的肠管两端结扎，用剪刀在结扎线外端剪断，放入无菌采样管中编号保存备用。

7 样品保存记录

7.1 保存

样品应及时采用低温运输到实验室。样品在2 °C~8 °C条件下保存不应超过24 h；在-20 °C~-15 °C条件下保存不应超过1个月。

7.2 记录

收到样品后，应做好记录。

8 样品处理

8.1 粪便

在生物安全柜内向保存样品的无菌采样管中加入等体积含双抗的0.02 mol/L pH7.2磷酸盐缓冲液（A.1），经振荡器2000 r/min震荡3 min~5 min，经离心机4 °C、5 000 r/min离心20 min，取上清液，立即进行病毒RNA提取。

注：如不能立即试验，可冷冻保存上清液，并在2日内提取病毒RNA。

8.2 小肠及内容物

在生物安全柜内取3 cm~5 cm的小肠及其内容物，称重，用含双抗的0.02 mol/L pH7.2磷酸盐缓冲液（A.1）按重量体积比制成5倍悬液，经离心机4 °C、5 000 r/min离心20 min，取上清液，立即进行病毒RNA提取。

注：如不能立即试验，可冷冻保存上清液，并在2日内提取病毒RNA。

9 病毒 RNA 提取

在生物安全柜内提取病毒RNA，提取方法按照附录B执行。

注：如不能立即进行cDNA合成，可将病毒RNA置-70 °C保存，并在2日内使用。

10 RT-PCR 操作程序

10.1 cDNA 合成

在生物安全柜内合成cDNA，合成方法按照附录C执行。

注：如不能立即进行PCR反应，可将cDNA置-20 °C保存，并在2日内使用。

10.2 PCR 反应体系和条件

在洁净台内配制PCR反应体系，配制方法按照附录D执行。

10.3 PCR 产物电泳检测

10.3.1 仪器设备

10.3.1.1 分析天平：分度值不大于0.1 mg。

10.3.1.2 容量瓶：容积分别为100 mL、500mL、1 000 mL、5 000 mL。

10.3.1.3 微波炉：容量不小于18 L，功率为500 W~900 W。

10.3.1.4 电泳仪：输出电压为5 V~600 V，输出电流为4 mA~400 mA，输出功率为1 W~240 W。

10.3.1.5 水平电泳槽：容积不小于300 mL。

10.3.1.6 凝胶成像系统：分辨率不小于130万像素。

10.3.1.7 微量移液器：10 μL。

10.3.1.8 量筒：容量200 mL。

10.3.1.9 无菌配套吸头：10 μL。

10.3.2 试剂

10.3.2.1 50×TAE 贮存液，按照A.2配制。

10.3.2.2 1×TAE 缓冲液，按照A.3配制。

10.3.2.3 6×电泳加样缓冲液，按照A.4配制。

10.3.2.4 1% 琼脂糖凝胶，按照A.5配制。

10.3.2.5 DNA Marker，标准分子量的分子量范围100 bp~2 000 bp。

10.3.3 试验步骤

取3 μL ~5 μL 扩增产物与0.6 μL ~1 μL 6 \times 电泳加样缓冲液混匀，加到凝胶孔内，再加入标准分子量。在150 V~180 V条件下电泳10 min~15 min。用凝胶成像仪观察凝胶，并拍照、记录检测结果。凝胶和剩余PCR产物应做无害化处理。

11 结果判定

11.1 试验成立条件

阳性对照应出现336 bp左右的特异性目的条带，并且阴性对照应无特异性目的条带。

11.2 判定

符合11.1，若待检样品泳道有336 bp左右的目的条带，则判为PPIV5核酸阳性；反之，则判为PPIV5核酸阴性。PCR产物电泳图见附录E。若进一步验证，宜对扩增产物进行测序。

地方标准信息服务平台

附录 A
(规范性)
溶液配制

A.1 含双抗 0.02 mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲液 (PBS)

A.1.1 0.2 mol/L的磷酸氢二钠溶液：称取磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 71.64 g，加适量ddH₂O溶解，定容至1 000 mL，混匀。

A.1.2 0.2 mol/L的磷酸二氢钠溶液：称取磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 31.21 g，加适量ddH₂O溶解，定容至1 000 mL，混匀。

A.1.3 0.02 mol/L pH7.2磷酸盐缓冲液：分别量取0.2 mol/L磷酸氢二钠溶液360 mL、0.2 mol/L磷酸二氢钠溶液各140 mL，称取氯化钠38 g，用ddH₂O溶解，定容至5 000 mL。4℃保存。

A.1.4 0.02 mol/L pH7.2磷酸盐缓冲液灭菌后，加入无菌青霉素和链霉素，终浓度分别为1 000 IU/mL和1 000 μg/mL。

A.2 50×TAE 电泳缓冲储存液

称取三羟甲基氨基甲烷 (Tris碱) 242 g、乙二胺四乙酸二钠 (Na_2EDTA) 37.2 g溶于800 mLddH₂O中，加入57.1 mL醋酸，充分搅拌后加ddH₂O定容至1 000 mL。室温保存。

A.3 1×TAE 电泳缓冲液

用 ddH₂O 将 50×TAE 电泳缓冲储存液 50 倍稀释。

A.4 6×电泳加样缓冲液

称取乙二胺四乙酸 (EDTA) 4.4 g、溴酚兰 0.25 g、二甲苯蓝FF 0.25 g溶于200 mL ddH₂O中，加热搅拌充分溶解。冷却至室温，加入180 mL甘油，以2 mol/L氢氧化钠溶液调节pH值至7.0，用ddH₂O定容至 500 mL。室温保存。

A.5 1% 琼脂糖凝胶

称取1 g琼脂糖，加入100 mL 1×TAE电泳缓冲液，微波炉加热融化，摇匀。待温度降至40 ℃左右时，加入10 mg/mL溴化乙锭 (EB) 或EB替代物5 μL，均匀铺板，厚度为3 mm~5 mm。

附录 B
(规范性)
病毒 RNA 提取

B.1 仪器设备

- B.1.1 台式低温离心机：温度范围为2℃~8℃，转速不小于12 000 r/min。
- B.1.2 高压灭菌锅：压力不小于0.1 MPa，温度范围为105℃~135℃。
- B.1.3 涡旋振荡器：不小于100 r/min。
- B.1.4 冰箱：-70℃~-65℃。
- B.1.5 生物安全柜：空气流速范围为100~400 ft/min，噪音水平不超过65dB，振动水平不超过0.025 4 mm，过滤器效率在99.99%以上。
- B.1.6 微量移液器：2.5 μL、10 μL、200 μL、1000 μL。
- B.1.7 无RNA酶的无菌配套吸头：10 μL、200 μL、1000 μL。
- B.1.8 无RNA酶的灭菌离心管：1.5 mL。

B.2 试剂

- B.2.1 异丙醇，分析纯。
- B.2.2 无水乙醇，分析纯。
- B.2.3 Trizol试剂。
- B.2.4 酚氯仿抽提液：苯酚、三氯甲烷、异戊醇体积比为25:24:1。
- B.2.5 DEPC水：ddH₂O按0.1%含量加入焦磷酸二乙酯配制而成。
- B.2.6 75%乙醇：无水乙醇与DEPC水按3:1配制而成。
- B.2.7 阳性对照：已知病毒材料，如PPIV5感染的细胞。

B.3 方法

- B.3.1 在生物安全柜内，取待检样品上清液和阳性对照各300 μL分别置于1.5 mL无RNA酶的灭菌离心管中，加500 μL Trizol 试剂，充分混匀，室温静置10 min。
- B.3.2 加入500 μL酚氯仿抽提液，充分混匀，室温静置10 min。
- B.3.3 在4℃条件下12 000 r/min离心10 min，取上清液500 μL于新的无RNA酶的灭菌离心管中，加入1.0 mL异丙醇，充分混匀，在-20℃条件下静置30 min。
- B.3.4 在4℃条件下12 000 r/min离心10 min，小心弃去上清液；加1.0 mL 75%乙醇，在4℃条件下1 200 r/min离心10 min，小心弃去上清液，倒置于吸水纸上，室温自然风干。
- B.3.5 向离心管中加入20 μL DEPC水溶解RNA沉淀，瞬时离心使残留管壁的液滴聚集于管底，获得含RNA溶液，立即使用。

注：若条件允许，还可采用商品化核酸提取试剂盒、自动化核酸提取仪及配套核酸抽提试剂提取病毒RNA。

附录 C
(规范性)
cDNA 合成

C.1 仪器设备

- C.1.1 台式低温离心机：温度范围为2℃~8℃，转速不小于10 000 r/min。
- C.1.2 制冰机：功率为0.5 kW~20 kW。
- C.1.3 冰箱：-20℃~-15℃。
- C.1.4 电热恒温水槽：温度范围为5℃~95℃。
- C.1.5 生物安全柜：空气流速范围为100~400 ft/min，噪音水平不超过65dB，振动水平不超过0.025 4 mm，过滤器效率在99.99%以上。
- C.1.6 微量移液器：2.5 μL、10 μL、200 μL、1000 μL。
- C.1.7 无菌配套吸头：10 μL、200 μL、1000 μL。
- C.1.8 无RNA酶的灭菌离心管：1.5 mL。

C.2 试剂

- C.2.1 5×M-MLV缓冲液。
- C.2.2 dNTPs，各10 mmol/L。
- C.2.3 RNase抑制剂，40 U/μL。
- C.2.4 M-MLV逆转录酶，200 U/μL。
- C.2.5 随机六聚体，Random 6 mers，10 μmol/L。
- C.2.6 样品病毒RNA。
- C.2.7 阳性对照RNA。

C.3 方法

- C.3.1 在生物安全柜内取制备的病毒RNA各 12.5 μL分别置于无RNA酶的灭菌离心管中，加入1 μL随机六聚体、混匀，70℃水浴10 min、冰浴2 min。
- C.3.2 瞬时离心，依次加入4 μL 5×M-MLV缓冲液、1 μL dNTPs 混合物、0.5 μL RNase抑制剂、1.0 μL M-MLV逆转录酶，混匀。
- C.3.3 42℃水浴 1 h。
- C.3.4 70℃水浴 15 min、冰浴3 min，得到cDNA溶液，立即使用或置-20℃保存、备用。

附录 D
(规范性)
PCR 反应体系和条件

D.1 引物

引物名称、序列及扩增产物大小见表1。用灭菌ddH₂O配制成10 mmol/L，分装、冷冻保存备用。

表 D.1 PCR 引物和扩增产物大小

引物名称	引物序列	产物大小
NP9F	5' -CGTGCTTAAAGCATATGAGCGA-3'	336 bp
NP326R	5' -ATTAAGCGGAATGATCCCT-3'	

D.2 仪器设备

D.2.1 PCR扩增仪：96孔或3×32孔或3×21孔，温度范围为0℃~100℃，升降温速率为4℃/秒~6℃/秒。

D.2.2 微量移液器：10 μL、200 μL。

D.2.3 无菌配套吸头：10 μL，200 μL。

D.2.4 PCR扩增管：0.2 mL。

D.3 试剂

D.3.1 10×Ex *Taq* buffer。

D.3.2 2.5 mmol/L dNTPs。

D.3.3 Ex *Taq* DNA聚合酶。

D.3.4 灭菌ddH₂O。

D.3.5 NP9F，10 mmol/L。

D.3.6 NP326R，10 mmol/L。

D.3.7 样品cDNA。

D.3.8 阳性对照cDNA。

D.4 反应体系

D.4.1 在PCR管中依次加入灭菌ddH₂O 17.25 μL、10×Ex *Taq* buffer 2.5 μL、2.5 mmol/L dNTPs 2 μL、Ex *Taq*酶 0.25 μL、引物NP9和FNP326R各0.5 μL，混匀。

D.4.2 在以上体系基础上，按阴性对照、待检样品和阳性对照顺序分别加入2 μL灭菌ddH₂O、2 μL样品cDNA和2 μL阳性对照cDNA作为扩增模板。

D.5 反应条件

95 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s、55 °C退火30 s、72 °C延伸30 s, 30个循环; 72 °C延伸5 min;
4 °C保存。

地方标准信息服务平台

附录 E
(资料性)
PCR 产物电泳图

E.1 电泳图

PCR产物电泳结果见图E.1。

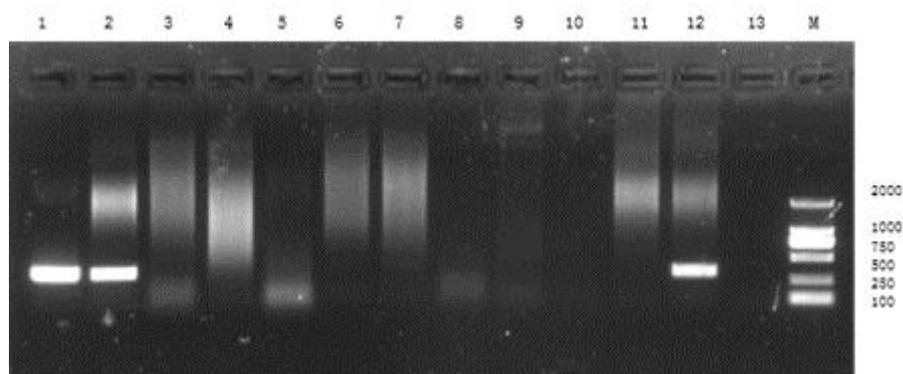


图 E.1 PCR 产物电泳图

E.2 说明

E.2.1 M: DNA Marker (标准分子量) 为DL2000。

E.2.2 泳道1、2为阳性样品, 泳道3~11为阴性样品, 泳道12为阳性对照, 泳道13为阴性对照。

地方标准信息服务平台