

广东省地方标准

DB44/T 2336—2021

实验动物 病毒 PCR 定性分析

Laboratory animal Qualitative analysis of virus with polymerase chain reaction
method

地方标准信息服务平台

2021 - 10 - 18 发布

2022 - 01 - 18 实施

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 缩略语 2

5 原理 2

6 主要设备和材料 2

7 试剂 3

8 方法 3

9 结果 10

10 防止交叉污染的措施 11

附录 A（规范性） 溶液的配制..... 12

附录 B（规范性） 引物及探针序列..... 14

参考文献 18

地方标准信息服务平台

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。

本文件由广东省科学技术厅提出并组织实施。

本文件由广东省实验动物标准化技术委员会（GD/TC 93）归口。

本文件起草单位：广东省实验动物监测所。

本文件主要起草人：王静、袁文、闵凡贵、潘金春、黄树武、罗银珠、何丽芳、张钰、黄韧。

地方标准信息服务平台

实验动物 病毒 PCR 定性分析

1 范围

本文件规定了实验动物病毒的PCR定性分析方法。
本文件适用于实验动物相关病毒核酸的定性分析。

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试验方法

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 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

聚合酶链式反应 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。

3.2

逆转录-聚合酶链式反应 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。

3.3

巢式PCR nested polymerase chain reaction

巢式PCR通过两轮PCR反应，使用两套引物扩增特异性DNA片段。第一对PCR引物扩增片段和普通PCR相似。第二对引物以第一轮PCR产物为模板，特异性地扩增位于首轮PCR产物内的一段DNA片段，从而大大提高了反应的敏感性和特异性。

3.4

实时荧光聚合酶链式反应 real-time PCR, 实时荧光PCR

实时荧光PCR方法是在普通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报告整个PCR进程，通过读取每次循环反应中的荧光发射信号，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。

3.5

实时荧光逆转录-聚合酶链式反应 real-time RT-PCR, 实时荧光 RT-PCR

实时荧光RT-PCR方法是在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报告整个PCR进程,通过读取每次循环反应中的荧光发射信号,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。

3.6

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。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

cDNA 互补 DNA (complementary DNA)

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)

EDTA 乙二胺四乙酸 (ethylenediamine tetraacetic acid)

PBS 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline)

RNA 核糖核酸 (ribonucleic acid)

TAE 三羟甲基氨基甲烷-乙酸-乙二胺四乙酸缓冲液 (tris-acetate EDTA)

5 原理

用合适的方法提取样本中的总RNA或/和DNA,分别针对病毒保守基因设计特异的引物探针序列,通过普通PCR或实时荧光PCR反应对模板进行扩增,根据PCR反应结果分析该样品中是否含有某种病毒。

6 主要设备和材料

- 6.1 PCR 仪。
- 6.2 实时荧光 PCR 仪。
- 6.3 电泳仪。
- 6.4 凝胶成像分析系统。
- 6.5 高速冷冻离心机。
- 6.6 普通离心机。
- 6.7 恒温孵育器。
- 6.8 漩涡振荡器。
- 6.9 组织匀浆器。
- 6.10 微量核酸定量仪。
- 6.11 生物安全柜。
- 6.12 PCR 超净工作台。
- 6.13 冰箱 (-20 °C、-80 °C)。

- 6.14 微量移液器：0.1 μL ~2 μL ，1 μL ~10 μL ，10 μL ~100 μL ，100 μL ~1000 μL 。
- 6.15 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）。
- 6.16 采样工具：剪刀、镊子和灭菌棉拭子等。

7 试剂

7.1 以下所用的试剂除特别注明者外均为分析纯，实验用水为双蒸水或去离子水，应符合 GB/T 6682 所规定一级水的要求。所有涉及分子生物学操作的水均为无 DNA 酶、无 RNA 酶水。

7.2 灭菌 PBS。配制方法见附录 A。

7.3 PCR 用水：经 DEPC 处理的水或商品无 DNA 酶、无 RNA 酶水，配制方法见附录 A。

7.4 RNA 抽提试剂：TRIzol 或其他类似产品。

7.5 DNA 抽提试剂：基因组 DNA 提取试剂盒 DNeasy Blood & Tissue Kit 或其他类似产品。

注：DNA 提取试剂盒是由 Qiagen 公司提供的 DNeasy Blood & Tissue Kit。给出这一信息是为了方便本文件使用者，并不表示对这一产品的认可。亦可使用其他类似的 DNA 提取试剂盒进行。

7.6 无水乙醇。

7.7 75%乙醇：使用 DNA 酶、无 RNA 酶水配制为 75%乙醇。

7.8 三氯甲烷（氯仿）。

7.9 异丙醇。

7.10 PCR 试剂：Premix Taq™（Version 2.0 plus dye）、Premix Ex Taq™（Probe qPCR）、One Step Primerscript™ RT-PCR Kit（Perfect Realtime）或其他类似产品。

注：以上 PCR 试剂是由 Takara 公司提供的商品试剂盒，是本文件适合的市售产品的使用实例，给出这一信息是为了方便本文件使用者，并不表示对这一产品的认可。亦可使用其他类似的 PCR 试剂。

7.11 DNA 相对分子质量标准：100 bp~2000 bp。

7.12 50×TAE 电泳缓冲液，配制方法见附录 A。

7.13 溴化乙锭：10 mg/mL，配制方法见附录 A 或其他类似产品。

7.14 1.5%琼脂糖凝胶，配制方法见附录 A。

7.15 引物和探针：引物和探针序列见附录 B。根据附录 B 中表 B.1 和表 B.2 序列合成引物和探针，引物和探针加入无 DNA 酶、无 RNA 酶水配制成 10 $\mu\text{mol/L}$ 储备液，-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

8 方法

8.1 生物安全措施

对于可能潜在人兽共患病的样本，应在生物安全二级及以上实验室进行操作，采样应在生物安全柜中进行。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。

8.2 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须戴一次性手套。采样及样本处理过程操作人员应做好个人防护。

8.2.1 脏器组织

剖检，无菌采集动物脏器，剪取待检样本0.5 g~2 g，加入5倍体积灭菌PBS，使用匀浆器充分匀浆1 min~2 min，然后将组织悬液在4 ℃，8 000 g离心10 min，取上清液转入另一无菌5 mL离心管中，编号备用。

8.2.2 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1 g~2.0 g于无菌5 mL离心管，加入5倍体积灭菌PBS，使用匀浆器充分匀浆1 min~2 min，8 000 g离心5 min，上清液转入另一无菌5 mL离心管中，编号备用。

8.2.3 血液样本

无菌采集动物血液0.2 mL~0.5 mL，加入柠檬酸钠或EDTA抗凝管中，轻轻颠倒混匀3次~5次，编号备用。

8.2.4 拭子取样

对活体动物取样可采集肛拭子、口腔拭子、鼻拭子，皮肤拭子、泄殖腔拭子等，浸泡于3 mL无菌PBS中5 min~10 min，充分混匀后，4 ℃，8 000 g离心5 min，取离心上清液转入另一无菌5 mL离心管中，编号备用。

8.2.5 细胞培养物

应通过以下任一方法取样：

- 直接刮取样本接种后出现CPE或可疑的细胞培养物置于无菌15 mL离心管中，1 500 g离心5 min，弃上清，加1 mL灭菌PBS重悬细胞，将细胞悬液转移到无菌1.5 mL离心管，编号备用；
- 将样本接种后出现CPE或可疑的细胞培养物反复冻融三次，细胞混悬液转移于无菌离心管中，8 000 g离心5 min，弃细胞碎片，上清液转移到无菌15 mL离心管中，编号备用。

8.2.6 饲料、垫料和饮水

饲料、垫料：取约5 g~10 g饲料和垫料置于50 mL无菌离心管中，加入3倍体积灭菌PBS（饲料和垫料需全部浸泡于液体中）。密封后浸泡5 min~10 min，充分混匀，将混悬液转移至15 mL无菌离心管，4 ℃，8 000 g离心5 min，取上清液转入另一无菌5 mL离心管中，编号备用。

饮水：取200 μL~1000 μL实验动物饮水直接转移到无菌1.5 mL离心管中，编号备用。

8.2.7 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约5 cm²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 min~10 min，充分混匀，取出棉拭子，将离心管于4 ℃，8 000 g离心5 min，取上清液转入另一无菌5 mL离心管中，编号备用。

8.2.8 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，须放置于-80 ℃冰箱，但应避免反复冻融。

8.2.9 采样废弃物处理

采样结束,动物尸体应使用生物安全垃圾袋包装完整,高压灭菌后交由医疗垃圾处理单位进行处理,采样器材应使用消毒液浸泡或高压灭菌消毒,并做好实验台面及采样室的消毒。

8.3 核酸提取

8.3.1 样本 RNA 提取

8.3.1.1 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。

8.3.1.2 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 $^{\circ}\text{C}$,10 000 g 离心 15 min。

8.3.1.3 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。

8.3.1.4 加入等量异丙醇混匀,室温放置 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$,10 000 g 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。

8.3.1.5 加入 1 mL 75%乙醇,温和振荡离心管,悬浮沉淀。4 $^{\circ}\text{C}$,5 000 g 离心 5 min,弃上清,将离心管倒立吸水纸上,尽量使液体流干。

8.3.1.6 室温自然风干 5 min~10 min,注意 RNA 样本不要过于干燥,否则很难溶解。用 50 μL ~100 μL 无 DNA 酶、无 RNA 酶水溶解 RNA 样本。

8.3.1.7 取 2 μL 提取的 RNA 样本使用微量核酸定量仪测定提取 RNA 浓度。

8.3.1.8 制备好的 RNA 应尽快进行下一步 RT-PCR 反应,若暂时不能进行 PCR 反应,应于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

8.3.2 样本 DNA 提取

8.3.2.1 取 50 μL ~100 μL 样本至 1.5 mL 或 2 mL 离心管,加 20 μL 蛋白酶 K,用 PBS 补加至 220 μL 。

8.3.2.2 加入 200 μL 缓冲液 AL,涡旋震荡充分混匀,56 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min。

8.3.2.3 加入 200 μL 的无水乙醇,涡旋震荡充分混匀。

8.3.2.4 将第 8.3.2.3 条制备的混合液加入离心柱中,离心柱放在 2 mL 收集管上。 $\geq 6\ 000\ g$ 离心 1 min 后弃收集管/液。

8.3.2.5 离心柱放至新的 2 mL 收集管,加 500 μL 缓冲液 AW1, $\geq 6\ 000\ g$ 离心 1 min 后弃收集管/液。

8.3.2.6 离心柱放至新的 2 mL 收集管,加 500 μL 缓冲液 AW2,20 000 g 离心 3 min。弃收集管/液。

8.3.2.7 将离心柱放在一个新的 1.5 mL 离心管上,吸 200 μL 的缓冲液 AE 在吸附膜上,室温孵育 1 min, $\geq 6\ 000\ g$ 离心 1 min。收获 DNA 提取液。

8.3.2.8 取 2 μL 提取的 DNA 样本使用微量核酸定量仪测定提取 DNA 浓度。

8.3.2.9 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 $^{\circ}\text{C}$ 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给出的应用实例,可使用其他类似的DNA提取试剂盒进行,提取方法可做相应调整。

8.4 PCR 方法

8.4.1 普通 PCR

8.4.1.1 PCR 反应体系

PCR反应体系见表1。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，其中阳性对照以含有阳性病毒的组织或培养物提取的核酸作为阳性对照模板，其中阴性对照以不含有阳性病毒的样本核酸（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1 PCR 反应体系配制表

反应组份	用量 / μL	终浓度
2 $\times$ Premix Taq Mix (plus dye)	10	1 $\times$
Forward primer (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.8	0.4 $\mu\text{mol/L}$ ~1 $\mu\text{mol/L}$
Reverse primer (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.8	0.4 $\mu\text{mol/L}$ ~1 $\mu\text{mol/L}$
DNA 模板	2	<250 ng
PCR 用水	6.4	
总体积	20	
注1：可使用其他类似的PCR试剂进行，反应体系和反应参数可做相应调整。		
注2：反应体系可按各反应组份终浓度配比按比例增加或减少。		

8.4.1.2 PCR 反应参数

PCR反应参数见表2。

表2 PCR 反应参数

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95 ℃	3 min	1
变性	98 ℃	10 s	30
退火	50 ℃~60 ℃	30 s	
延伸	72 ℃	1 min/kb	
注：各引物退火温度及扩增条件参照附录B可作相应调整。			

8.4.2 RT-PCR

8.4.2.1 RT-PCR 反应体系

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阳性病毒的组织或培养物提取的核酸作为阳性对照模板，其中阴性对照以不含有阳性病毒的样本核酸（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 RT-PCR 反应体系配制表

反应组份	用量 / μL	终浓度
2 $\times$ 1 Step Buffer	10	1 $\times$
PrimeScript 1 Step Enzyme Mix	0.8	
Forward primer (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.8	0.4 $\mu\text{mol/L}$ ~1 $\mu\text{mol/L}$
Reverse primer (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.8	0.4 $\mu\text{mol/L}$ ~1 $\mu\text{mol/L}$
RNA 模板	2	< 1 μg
PCR 用水	5.6	
总体积	20	
注1: 可使用其他类似的一步法或两步法RT-PCR试剂盒进行, 反应体系和反应参数可做相应调整。		
注2: 反应体系可按各反应组份终浓度配比按比例增加或减少。		

8.4.2.2 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 $^{\circ}\text{C}$	30 min	1
预变性	94 $^{\circ}\text{C}$	2 min	1
变性	94 $^{\circ}\text{C}$	30 s	30
退火	55 $^{\circ}\text{C}$ ~65 $^{\circ}\text{C}$	30 s	
延伸	72 $^{\circ}\text{C}$	1 min/kb	
延伸	72 $^{\circ}\text{C}$	10 min	1
注: 各引物退火温度及扩增条件参照附录B可作相应调整。			

8.4.3 巢式 PCR

8.4.3.1 巢式 PCR 反应体系

当待检样本中所含病原核酸丰度较低时, 可选用巢式PCR反应。巢式PCR反应体系见表5。反应液的配制在冰上操作, 其中阳性对照以含有阳性病毒的组织或培养物提取的核酸作为阳性对照模板, 其中阴性对照以不含有阳性病毒的样本核酸(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5 巢式 PCR 反应体系配制表

步骤	反应组分	用量/ μL	终浓度
第一轮 PCR	2×Premix Taq Mix	10	1×
	PCR 用水	6.4	
	Forward primer 1 (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.8	
	Reverse primer 1 (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.8	0.4 $\mu\text{mol/L}$
	cDNA 模板/DNA 模板	2	0.4 $\mu\text{mol/L}$
	总体积	20	
第二轮 PCR	2×Premix Taq Mix (Loading dye mix)	10	1×
	PCR 用水	7.5	
	Forward primer 2 (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.8	
	Reverse primer 2 (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.8	0.4 $\mu\text{mol/L}$
	第一轮 PCR 产物	1	0.4 $\mu\text{mol/L}$
	总体积	20	
注1：可使用其他类似的一步法或两步法RT-PCR试剂盒进行，反应体系和反应参数可做相应调整。 注2：反应体系可按各反应组份终浓度配比按比例增加或减少。			

8.4.3.2 巢式 PCR 反应参数

巢式PCR反应参数见表6。

表6 巢式 PCR 反应参数

步骤	温度	时间	循环数
第一轮 PCR	94 ℃	3 min	1
	98 ℃	10 s	20
	50 ℃~60 ℃	30 s	
	72 ℃	1 min/kb	
第二轮 PCR	94 ℃	3 min	1
	95 ℃	30 s	30
	50 ℃~60 ℃	30 s	
	72 ℃	1 min/kb	
注：各引物退火温度及扩增条件参照附录B可作相应调整。			

8.4.4 PCR 产物电泳分析

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%琼脂糖凝胶进行电泳，以DNA分子量作参照。电压大小根据电泳槽长度来确定，一般控制在3 V/cm~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。

8.5 实时荧光 PCR 方法

8.5.1 实时荧光 PCR

8.5.1.1 实时荧光 PCR 反应体系

实时荧光PCR反应体系见表7。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，其中阳性对照以含有阳性病毒的组织或细胞培养物提取的核酸作为阳性对照模板，其中阴性对照以不含有阳性病毒的核酸样本（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7 实时荧光 PCR 反应体系配制表

反应组份	用量/ μL	终浓度
2 $\times$ Premix Ex Taq Mix	10	1 $\times$
Forward Primer (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.4	0.2 $\mu\text{mol/L}$ ~1 $\mu\text{mol/L}$
Reverse Primer (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.4	0.2 $\mu\text{mol/L}$ ~1 $\mu\text{mol/L}$
Probe (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.8	0.4 $\mu\text{mol/L}$ ~1 $\mu\text{mol/L}$
Rox (50 $\times$)	0.2	/
DNA 模板	2	≤ 100 ng
PCR 用水	6.2	/
总体积	20	/
注1：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。 注2：可使用其他类似的实时荧光PCR试剂盒进行，反应体系和反应参数可做相应调整。 注3：反应体系可按各反应组份终浓度配比按比例增加或减少。		

8.5.1.2 实时荧光 PCR 反应参数

实时荧光PCR反应体系见表8，反应结束后，根据收集的荧光曲线和Ct值判定结果。

表8 实时荧光 PCR 反应参数

步骤	温度	时间	采集荧光信号	循环数
预变性	95 $^{\circ}\text{C}$	30 s	否	1
变性	95 $^{\circ}\text{C}$	5 s		40
退火，延伸	60 $^{\circ}\text{C}$	34 s	是	

8.5.2 实时荧光 RT-PCR

8.5.2.1 实时荧光 RT-PCR 反应体系

实时荧光RT-PCR反应体系见表9。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，其中阳性对照以含有阳性病毒的组织或细胞培养物提取的核酸作为阳性对照模板，其中阴性对照以不含有阳性病毒的核酸样本（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9 实时荧光 RT-PCR 反应体系配制表

反应组份	用量（μL）	终浓度
2×One Step RT-PCR Buffer III	10	1×
PrimeScriptRT Enzyme Mix II	0.4	/
<i>Ex Taq</i> HS（5 U/μL）	0.4	/
Forward Primer（10 μmol/L）	0.4	0.2 μmol/L~1 μmol/L
Reverse Primer（10 μmol/L）	0.4	0.2 μmol/L~1 μmol/L
Probe（10 μmol/L）	0.8	0.4 μmol/L~1 μmol/L
Rox（50×	0.4	/
RNA 模板	2	10 pg~100 ng
PCR 用水	5.2	/
总体积	20	/
注1：可使用其他类似的一步法或两步法实时荧光RT-PCR试剂盒进行，反应体系和反应参数可做相应调整。 注2：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。 注3：反应体系可按各反应组份终浓度配比按比例增加或减少。		

8.5.2.2 实时荧光 RT-PCR 反应参数

实时荧光RT-PCR反应参数见表10，反应结束后，根据收集的荧光曲线和Ct值判定结果。

表10 实时荧光 RT-PCR 反应参数

步骤	温度	时间	采集荧光信号	循环数
逆转录	42 ℃	5 min	否	1
预变性	95 ℃	10 s		1
变性	95 ℃	5 s		40
退火，延伸	60 ℃	34 s	是	

9 结果

9.1 普通 PCR/普通 RT-PCR/巢式 PCR

9.1.1 质控标准

在阴性、阳性对照及空白对照成立的条件下，即阳性对照的扩增产物经电泳分析可见到目的扩增条带（条带大小参见附录B），阴性对照及空白对照的扩增产物无任何条带，可进行结果判定。

9.1.2 结果判定

9.1.2.1 样本经琼脂糖凝胶电泳，在凝胶成像仪上观察到特定大小的目的扩增条带，判定为该病毒核酸阳性。

9.1.2.2 样本经琼脂糖凝胶电泳，在凝胶成像仪上未观察到特定大小的目的扩增条带，判定为该病毒核酸阴性。

9.2 实时荧光 PCR/实时荧光 RT-PCR

9.2.1 结果分析和条件设定

直接读取仪器结果，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。

9.2.2 质控标准

9.2.2.1 空白对照无 Ct 值，并且无荧光扩增曲线，扩增曲线为水平线或 Ct 值小于 40。

9.2.2.2 阴性对照无 Ct 值，并且无荧光扩增曲线，扩增曲线为水平线或 Ct 值小于 40。

9.2.2.3 各病毒阳性对照 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。

9.2.3 结果判定

9.2.3.1 若待检样本无荧光扩增曲线，则判定该病毒核酸阴性。

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

9.2.3.3 若待检样本 Ct 值介于 35 和 40 之间时，应重新进行实时荧光 PCR。重新试验后，若 Ct 值 ≥ 40 时，则判定该病毒核酸阴性。重新试验后的 Ct 值仍介于 35 和 40 之间，则判定该病毒核酸可疑阳性，需进一步进行序列测定。

9.3 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特异性片段序列进行比对，序列同源性在 99% 以上，可确诊待检样本某种病毒核酸阳性，否则判定某种病毒核酸阴性。

10 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) 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1 000 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 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 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1 000 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1 000 mL，经121 °C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 °C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 (pH 8.0)

乙二胺四乙酸二钠 ($\text{EDTA-Na}_2\text{-H}_2\text{O}$)	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
灭菌去离子加至100 mL，121 °C，15 min灭菌备用。	

A.3.2 50×TAE电泳缓冲液配制

三羟甲基氨基甲烷 (Tris)	242 g
冰乙酸	57.1 mL
0.5 mol/L EDTA溶液，pH8.0	100 mL
灭菌去离子加至1000 mL，121 °C，15 min灭菌备用。	
用时用灭菌去离子水稀释至1X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上,凝胶适宜厚度为 3 mm~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。

地方标准信息平台

附 录 B
(规范性)
引物及探针序列

针对实验动物常见病毒性病原微生物核酸保守序列设计特异引物,进行PCR或反转录PCR扩增;普通PCR引物序列见表B.1,实时荧光PCR引物和探针序列见表B.2。

表B.1 实验动物病毒普通 PCR/普通 RT-PCR 引物

动物种类	病毒	引物名称	引物序列 (5' → 3')	产物大小 (bp)	退火温度 (°C)
啮齿类动物	淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV)	Forward primer	CGCACC GGGGATCCTAGGCT	712	55
		Reverse primer	CCTGTCCAGCCCCAGCCAC		
	汉坦病毒 (HV)	Forward primer	AAAGTAGGTGITYATCYTIACAATGTGG	464	55
		Reverse primer	GTACAICCTGTRCCIACCCC		
	汉坦病毒汉滩型 (HTN)	Forward primer	GAATCGATACTGTGGGCTGCAAGTGC	383	55
		Reverse primer	GGATTAGAACCCAGCTCGTCTC		
	汉坦病毒汉城型 (SEO)	Forward primer	GTGGACTCTTCTCTCATTATT	418	55
		Reverse primer	TGGGCAATCTGGGGGGTTGCATG		
	鼠痘病毒 (ECT)	Forward primer	TGACTGAATACGACGAC	338	55
		Reverse primer	TGGATCTAATTGCGCATG		
	小鼠肝炎病毒/大鼠冠状病毒 (MHV/RCV)	Forward primer	AATGGAACCTCTCGTTGGG	375	55
		Reverse primer	TAGTGGCTGTTAGTGATGG		
	仙台病毒 (SV)	Forward primer	ATGAAGGACAAAGCATTATCGCCTA	180	55
		Reverse primer	CAACCAGTCTCCTGATTCCACGTA		
	小鼠肺炎病毒 (PVM)	Forward primer	AGATCAGAGCCCGTCAAAAT	122	60
		Reverse primer	GCATATAACATCCAATACGAGTTTGAA		
	呼肠孤病毒 III 型 (REO3)	Forward primer	TGCAAAGATGGGGAACGC	411	55
		Reverse primer	TGGTGACACTGACAGCAC		
	小鼠细小病毒 MVM 株 (MVM)	Forward primer	GAGCGCCATCTAGTGAGC	483	55
		Reverse primer	ATTTGCCTGTGCTGGCTG		
	小鼠细小病毒 MPV 株 (MPV)	Forward primer	GCAGCAATGATGTAACGAAGCT	260	55
		Reverse primer	CCATCTGCCTGAATCATAGCTAA		
	小鼠脑脊髓炎病毒 (TMEV)	Forward primer	CCTATTTGCACAGCCGT	403	55
		Reverse primer	GGAGAGGTGCCATAGTAGC		
	小鼠腺病毒 (MAD)	Forward primer	TWCATGCACATCGCBGG	281	55
		Reverse primer	CCGCGGATGTCAAA		

表B.1 实验动物病毒普通 PCR/普通 RT-PCR 引物 (续)

动物种类	病毒	引物名称	引物序列（5′ →3′ ）	产物大小（bp）	退火温度（℃）
啮齿类动物	多瘤病毒（POLY）	Forward primer	ATGTGCACAGCGTGTA	369	55
		Reverse primer	TGTCATCGGGCTCAGC		
	小鼠诺如病毒（MNV）	Forward primer	CAGATCACATGCTTCCCAC	187	60
		Reverse primer	AGACCACAAAAGACTCATCAC		
	大鼠细小病毒 H-1 株（H1）	Forward primer	CTAGCAACTCTGCTGAAGGAAGCTC	253	55
		Reverse primer	TAGTGATGCTGTTGCTGTATCTGATG		
	大鼠细小病毒 KRV 株（KRV）	Forward primer	GCACAGACAACCAACAGGAAGCTCTCC	280	55
		Reverse primer	AGTCTCACTTTGAGCGGCTG		
	大鼠细小病毒 RMV 株（RMV）	Forward primer	ACTGAGAACTGGAGACGAATTC	843	55
		Reverse primer	GGTCTCAGTTTGGCTTTAAGTG		
	大鼠细小病毒 RPV 株（RPV）	Forward primer	CGCACATGTAGAATTTTGCTG	487	55
		Reverse primer	CAAAGTCACCAGGCAATGTGTT		
	大鼠泰勒病毒（RTV）	Forward primer	GACCTCTTTCAACGCGACG	363	55
		Reverse primer	CGATGTCTGTTCTAAGTTTCC		
兔	兔出血热病毒（RHDV）	Forward primer	ATGCCAATGCTGGGTCTG	368	59
		Reverse primer	TTGAGGCGTGTATGTGATGG		
	兔轮状病毒（RRV）	Forward primer	ATGGTTCGCTTGTGTCTTAGTTG	251	60
		Reverse primer	ATGCGTTGGGTGTAGTTCCTGTA		
猴	猴 D 型逆转录病毒（SRV-D）	Forward primer 1	GAATCTGTAGCGGACAATTGGCTT	461	55
		Reverse primer 1	GGGCGGATTGCTGCCTGACA		
		Forward primer 2	ACTTGTTAGGGCAGTCCTCTCAGG	400	55
		Reverse primer 2	ACAGGCTGGATTAGCGTTTCATA		
	猴免疫缺陷病毒（SIV）	Forward primer 1	TGTCAAAAAATACTTTCGGTCTTAG	796	55
		Reverse primer 1	TGTTTGAGTCATCCAATCTTTACT		
		Forward primer 2	TAAATGCCTGGGTAAAAT	313	55
		Reverse primer 2	TGGTATGGGGTTCGTGTCTCTGT		
	猴 T 淋巴细胞趋向性病毒 I 型（STLV-1）	Forward primer	GTGCCAATCATGGACCTGCC	160	60
		Reverse primer	TCCTGGAGCGTCGATTAGAAGG		
注1：简并碱基 Y：T/C，R：A/G，W：A/T，B：T/C/G。					
注2：汉坦病毒、猴D型逆转录病毒、猴免疫缺陷病毒为巢式PCR引物，可根据样本量丰度选择单用一对引物或巢式PCR。					

表B.2 实验动物病毒实时荧光 PCR/实时荧光 RT-PCR 扩增引物和探针

动物种类	病毒	引物和探针名称	引物和探针序列 (5' → 3')
啮齿类动物	淋巴细胞脉络丛 脑膜炎病毒 (LCMV)	Forward primer	AAGCTCTGGACTGGAGCCAA
		Reverse primer	GAGAGCGGAGGTTAAGTTGCA
		Probe	FAM-TTTCACCAACGACTCCATCCTTAATCACAAC-TBHQ-1
	汉滩型 汉坦病毒 (HTN)	Forward primer	CAATCAYATTTRCACTATTATTATCAGG
		Reverse primer	TTAACTGACCCACCKYTGARTAT
		Probe	FAM-TTCCCACCCATAAATG-MGB
	汉城型 汉坦病毒 (SEO)	Forward primer	GGTGATGAYATGGAYCCAGA
		Reverse primer	TTCATAGGTTCTGGTTHGAGA
		Probe	VIC-CTTCGTAGCCTGGCTCA-MGB
	鼠痘病毒 (ECT)	Forward primer	ATCCGGATACTACTGCGAATTTG
		Reverse primer	CCGTAACCAGAACCACTTTG
		Probe	FAM-CAAACGGTTGCAGGCTATGTGTACCACAA-BHQ-1
	小鼠肝炎病毒/ 大鼠冠状病毒 (MHV/RCV)	Forward primer	GGAACCTCTCGTTGGGCATTATACT
		Reverse primer	ACCACAAGATTATCATTTTCACAACATA
		Probe	FAM -ACATGCTACGGCTCGTGTAAACCGAAGT-BHQ-1
	仙台病毒 (SV)	Forward primer	GGGCGGCATCTGTAGAAATC
		Reverse primer	CGGAAATCACGAGGGATGG-
		Probe	FAM - AGGCGTCGATGCGGTGTTCCAAC-BHQ-1
	小鼠肺炎病毒 (PVM)	Forward primer	GCAAGGACACTCGGCATGT
		Reverse primer	TGGAGCCCTATTTCTGCCAC
		Probe	FAM-CTTACTTACTGCCTTCAACCGTTGCGAAGA-BHQ1
	小鼠细小病毒 MVM 株 (MVM)	Forward primer	GCCATACACCTGCAGCAAA
		Reverse primer	TGGYGATGCTATGGTTGGT
		Probe	FAM-TCAATGGAAACACTTGGTTTCTACCCTTGA-BHQ-1
	小鼠细小病毒 MPV 株 (MPV)	Forward primer	TGGTTGCTCTKGAYTCTAACACATA
		Reverse primer	TTAAAGTAGTACCTGTAAGGACTTGG
		Probe	FAM-CCTTACACACCAGCAACAGACAACCAAGA-BHQ-1
	小鼠脑脊髓炎病 毒 (TMEV)	Forward primer	CTTGTGAAGTGTTCCTCC
		Reverse primer	GGGAGGCATGATGGTAGTTT
		Probe	FAM-TCGCGACGTGGTTGGAGATCTAA-BHQ-1
	小鼠腺病毒 (MAD)	Forward primer	ACTCTGAGCGGTGTCCGC
		Reverse primer	GATGTGCATGAAGGCCACT
		Probe	FAM-TGACGACGCTTCAATGCAGCC-BHQ1

表B.2 实验动物病毒实时荧光 PCR/实时荧光 RT-PCR 扩增引物和探针 (续)

动物种类	病毒	引物和探针名称	引物和探针序列（5′ →3′ ）
啮齿类动物	多瘤病毒 （POLY）	Forward primer	CGGCGTCTCTAAATGCGAG
		Reverse primer	AGCAGTTTGGGAACGGGTG
		Probe	FAM - CAAAATGTACAAAGGCCTGTCCAAGACCC -BHQ1
	小鼠诺如病毒 （MNV）	Forward primer	TCTGTYCTGCGCTGGGTGC
		Reverse primer	GCTGCGCCATCACTCATCC
		Probe	FAM- ATGCTGAGACCCCGCAGGAACG -BHQ-1
	大鼠泰勒病毒 （RTV）	Forward primer	CCAAGCGTGTGCTCTATTTC
		Reverse primer	TCCATAGTAAGAAGATCCGCTGG
		Probe	FAM-CAGCCATTGACAAAAGTCCGACGGAAT-BHQ1
猴	猴 D 型逆转录病毒 毒 （SRV-D）	Forward primer	CTGGWCAGCCAATGACGGG
		Reverse primer	CGCCTGTCTTAGGTTGGAGTG
		Probe	FAM-TCACTAACCTAAGACAGGAGGGTCGTCA-BHQ1
	猴免疫缺陷病毒 （SIV）	Forward primer	GGAAACAGGAACAGCAGAACTAT
		Reverse primer	ACCACCTATTTGTTGTACTGGGTA
		Probe	FAM-CCTCCTCTGCCGCTAGATGGTGCT-BHQ1
	猴 T 淋巴细胞趋 向性病毒 I 型 （STLV-1）	Forward primer	示例1： CCTCTACATGAGGTGGACA
		Reverse primer	ATCAAGGCCTCGTCTGTTCT
		Probe	示例2： FAM- ACTCAAATTCGCAATATGCTGCC -BHQ-1
禽	禽流感病毒 （AIV）	Forward primer	GACCRATCCTGTACCTCTGAC
		Reverse primer	AGGGCATTYTGGACAAAKCGTCTA
		Probe	FAM-TGCAGTCCTCGTCACTGGGCACG-BHQ1
	鸡传染性贫血 （CAV）	Forward primer	CTGGTTTCAAGAATGTGC
		Reverse primer	TGGGAGTAGTGGTAATCA
		Probe	FAM-ATCAACCCAAGCCTCCCTCG-BHQ
注1： 简并碱基 Y： T/C， R： A/G， K： T/G， H： A/T/C。			
注2： 探针也可选用具有与FAM、VIC、BHQ1和MGB荧光基团类似效果的其他合适的荧光报告基团和荧光淬灭基团组合。			

参 考 文 献

[1] GB/T 14926.21-2008 兔出血症病毒检测方法

[2] T/CALAS 22-2017 实验动物 小鼠诺如病毒检测方法

[3] T/CALAS 25-2017 实验动物 小鼠肝炎病毒PCR检测方法

[4] T/CALAS 26-2017 实验动物 小鼠脑脊髓炎病毒PCR检测方法

[5] T/CALAS 27-2017 实验动物 小鼠细小病毒MPV株PCR检测方法

[6] T/CALAS 28-2017 实验动物 小鼠细小病毒MVM株PCR检测方法

[7] T/CALAS 39-2017 实验动物 汉坦病毒PCR检测方法

[8] T/CALAS 41-2017 实验动物 大鼠泰勒病毒检测方法

[9] T/CALAS 42-2017 实验动物 大鼠细小病毒RMV株和RPV株检测方法

[10] T/CALAS 44-2017 实验动物 鼠痘病毒PCR检测方法

[11] T/CALAS 45-2017 实验动物 小鼠腺病毒PCR检测方法

[12] T/CALAS 46-2017 实验动物 多瘤病毒PCR检测方法

[13] T/CALAS 47-2017 实验动物 猴免疫缺陷病毒PCR检测方法

[14] T/CALAS 48-2017 实验动物 猴D型逆转录病毒PCR检测方法

[15] T/CALAS 49-2017 实验动物 仙台病毒PCR检测方法

[16] T/CALAS 50-2017 实验动物 呼肠孤病毒III型PCR检测方法

地方标准信息服务平台

地方标准信息服务平台

广东省地方标准
实验动物 病毒 PCR 定性分析
DB44/T 2336—2021

*

广东省标准化研究院组织印刷
广州市海珠区南田路 563 号 1304 室
邮政编码：510220
电话：020-84250337