

DB50

重 庆 市 地 方 标 准

DB50/T 1254—2022

山羊地方性鼻内肿瘤病毒 EvaGreen 荧光 定量 PCR 检测方法

2022 - 06 - 01 发布

2022 - 09 - 01 实施

重庆市市场监督管理局 发布



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。

本文件由重庆市农业农村委员会提出并归口。

本文件起草单位：重庆市畜牧科学院、西南大学、重庆市酉阳土家族苗族自治县畜牧产业发展中心。

本文件主要起草人：陈静、叶超、方仁东、何玮、徐远东、范彦、黄德均、赵金红、孙晓燕、黎年富。





山羊地方性鼻内肿瘤病毒 EvaGreen 荧光 定量 PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了山羊地方性鼻内肿瘤病毒 EvaGreen 荧光定量 PCR 检测方法的缩略语、原理、试剂和耗材、仪器和设备、样品采集、运输与保存、操作步骤、结果判定、实验室生物安全要求等内容。

本文件适用于山羊地方性鼻内肿瘤病毒核酸的检测。

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 19489 实验室生物安全通用要求

GB/T 22915 口蹄疫病毒荧光 RT-PCR 检测方法

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

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 DNA）

Ct值 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（Cycle threshold）

DEPC 焦碳酸二乙酯（diethyl pyrocarbonate）

ENTV-2 山羊地方性鼻内肿瘤病毒（Enzootic nasal tumor virus 2 of goats）

gDNA 基因组DNA（genomic DNA）

gDNase 基因组脱氧核糖核酸酶（Genomic deoxyribonuclease）

PBS 磷酸盐缓冲液（Phosphate Buffered Solution）

PCR 聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction）

qPCR 荧光定量PCR（Quantitative PCR）

RNA 核糖核酸（Ribonucleic Acid）

5 原理

根据山羊地方性鼻内肿瘤病毒基因特定的序列设计合成一对特异性引物,该对引物能针对 ENTV-2 目的基因进行扩增,产生双链 DNA 片段,在 qPCR 反应体系中加入的 EvaGreen 荧光染料能与双链 DNA 片段结合而产生荧光信号,通过检测 PCR 反应液中的荧光信号强弱,实现对目的基因的准确定量。随着 PCR 反应的循环进行,PCR 产物与荧光信号的增长呈现对应关系。

6 试剂和耗材

- 6.1 除特别说明外,本文件所用试剂均为分析纯,所有试剂均用无 RNA 酶污染的容器(用 DEPC 水处理后高压灭菌)分装。
- 6.2 RNA 提取试剂: Trizol、三氯甲烷、异丙醇、无水乙醇、DEPC 水,或其他同等效果的商品化试剂盒。
- 6.3 反转录试剂: 5×gDNA Buffer(含 gDNase)、FQ-RT Primer Mix、FastKing RT Enzyme Mix、10×King RT Buffer; 或其他同等效果的商品化试剂盒。
- 6.4 反应液: EvaGreen 荧光定量 PCR 反应液。
- 6.5 特异性引物: ENTV-2-F: GAGGCAAATTGAGGCGTTGAT; ENTV-2-R: CCCGTTCTGCATTCG-CTGTAG(靶序列见附录 A)。
- 6.6 阴性对照: DEPC 水。
- 6.7 阳性对照: 质粒 pMD-19T-ENTV-2。
- 6.8 PBS 溶液: 按照 GB/T 22915 中 PBS 溶液配制的规定执行。
- 6.9 1.5 mL 离心管(无 RNA 酶)。
- 6.10 0.2 mL PCR 管。
- 6.11 医用棉签。

7 仪器和设备

- 7.1 荧光定量PCR仪。
- 7.2 高速冷冻离心机。
- 7.3 恒温水浴锅。
- 7.4 超净工作台。
- 7.5 生物安全柜(A2级)。
- 7.6 微量可调移液器(2.5 μL, 10 μL, 100 μL, 1 mL)及配套带滤芯吸头。
- 7.7 超低温冰箱。
- 7.8 常规冰箱。
- 7.9 制冰机。
- 7.10 瞬时离心机。
- 7.11 涡旋振荡仪。

8 样品采集、运输与保存

8.1 采集与运输

样品采集及运输按照 NY/T 541 的规定执行。山羊鼻腔内有鼻液的直接用医用棉签采集,无鼻液的用蘸有PBS溶液的医用棉签采集,拭子放入 1.5 mL 离心管内,做好标识,再将离心管放入塑料自封袋内,然后放入装有冰袋的保温箱,24 h 内运输至实验室。

8.2 保存

按照 GB/T 22915 的规定执行。采集或处理好的样品在 0℃~4℃ 条件下保存不应超过 24 h；如需长期保存，应置 -80℃ 冰箱，避免反复冻融。

9 操作步骤

9.1 样品处理

在生物安全柜中，向装有拭子的 1.5 mL 离心管中加入灭菌PBS溶液 0.5 mL，在涡旋振荡器上振荡15 s，吸出全部PBS悬液备用。

9.2 病毒 RNA 的提取

- 9.2.1 吸取上述样品处理后的PBS悬液 0.2 mL置入新的 1.5 mL离心管，加入 0.7 mL Trizol，涡旋振荡 15 s，室温静置 10 min。
- 9.2.2 加入 0.2 mL 三氯甲烷，涡旋振荡 15 s，4℃ 12,000 rpm 离心 10 min，取上清液。
- 9.2.3 加入 0.5 mL 的异丙醇混匀，4℃ 12,000 rpm 离心 10 min，弃去上清液。
- 9.2.4 加入 1 ml 75% 乙醇，4℃ 12,000 rpm 离心 10 min，弃去上清液。
- 9.2.5 室温静置干燥，加入 20 μL DEPC水溶解沉淀，直接用于实验或置 -80℃ 超低温冰箱保存。

注：或采用其他同等效果的商品化试剂盒进行RNA提取。

9.3 反转录

- 9.3.1 模板RNA应在冰上解冻，表 1 和表 2 中所用试剂应在室温下解冻，然后使用前分别涡旋振荡混匀，离心 15 s，置于冰上备用。
- 9.3.2 基因组DNA (gDNA) 去除反应体系的配制：在超净工作台中，将表 1 中的试剂依次加入PCR管中，涡旋振荡混匀，离心 15 s，在恒温水浴锅中 42℃ 孵育 3 min，作为反转录的RNA模板。

表 1 gDNA 去除反应体系

组成成分	使用量 (μL)
5×gDNA Buffer (含 gDNase)	2
Total RNA	5
DEPC 水	3
总体积	10

表 2 反转录反应体系

试剂	使用量 (μL)
10×King RT Buffer	2
FQ-RT Primer Mix	2
FastKing RT Enzyme Mix	1
RNA 模板	10
DEPC 水	5
总体积	20

9.3.3 反转录反应体系的配制：在超净工作台中，将表2中的试剂依次加入PCR管中，涡旋振荡混匀，离心15 s。

9.3.4 RNA样品的反转录：42 ℃ 15 min，95 ℃ 3 min，反应结束后，置冰上冷却，得cDNA用于后续实验，或放入 -20 ℃ 冰箱中储存。

9.4 荧光定量 PCR 检测

9.4.1 荧光定量 PCR 反应体系

使用 EvaGreen 荧光定量 PCR 反应液 SsoFast™EvaGreen®Supermix 进行 PCR。ENTV-2-F 和 ENTV-2-R 浓度均为 10 μM，反应体系具体见表 3。

表 3 荧光定量 PCR 反应体系

试剂	使用量		
	检测样品	阳性对照	阴性对照
SsoFast™EvaGreen®Supermix	10 μL	10 μL	10 μL
ENTV-2-F	0.4 μL	0.4 μL	0.4 μL
ENTV-2-R	0.4 μL	0.4 μL	0.4 μL
cDNA	1 μL	—	—
pMD-19T-ENTV-2	—	1 μL	—
DEPC 水	补足至 20 μL		

9.4.2 荧光定量PCR反应条件

预变性 95 ℃ 2 min；变性 95 ℃ 5 s，60 ℃ 30 s（收集信号），共 40 个循环；熔解曲线条件：95 ℃ 15 s、60 ℃ 15 s、95 ℃ 15 s。

注：或采用其他同等效果的 EvaGreen 荧光定量PCR反应液商品化试剂进行。

10 结果判定

10.1 质控标准

阴性对照无Ct值，无特异性扩增曲线，无熔解峰；阳性对照Ct值应≤28.0，有特异性扩增曲线，熔解曲线只在 82 ℃ 有一个熔解峰，实验成立，否则，实验无效。

10.2 结果描述及判定

10.2.1 阴性结果

无Ct值，无特异性的扩增曲线，无熔解峰，判定被检样品中山羊鼻内肿瘤病毒核酸为阴性。

10.2.2 阳性结果

Ct值小于 35.0，出现特异性的扩增曲线，熔解曲线只有一个峰，且在 82 ℃，判定被检样品中山羊鼻内肿瘤病毒核酸为阳性。

10.2.3 可疑样品判定

$35.0 \leq Ct \text{值} \leq 40.0$ 的样品应复检，复检的结果仍为 $35.0 \leq Ct \text{值} \leq 40.0$ ，熔解曲线只有一个峰，且在 $82\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，判定为阳性；无 Ct 值者判定为阴性。

11 实验室生物安全要求

实验操作应符合 GB 19489 的规定，在生物安全二级及以上实验室进行实验。



附 录 A
(资料性)
引物扩增序列

A. 1 引物扩增序列

GAGGCAAATTGAGGCGTTGATGCGACATGCTTGAATGAGGCTCATGTGCAACCTCCAGTGACACCGAGTAACATACTGA
TCATGCTATTGTTATTGCTACAGCGAATGCAGAACGGG

