ICS 11.220
CCS A41

DB 31

上 海 市 地 方 标 准

DB 31/T 955—XXXX
代替 DB 31/T 955-2015

猪肠道冠状病毒多重 RT-PCR 检测技术

Method of the multiplex RT-PCR for swine enteric coronavirus detection

（征求意见稿）

（本草案完成时间：2021-09-30）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX－XX－XX 发布　　XXXX－XX－XX 实施

上海市市场监督管理局　　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。

本文件由上海市农业农村委员会提出。

本文件由上海市畜牧业标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：上海市农业科学院。

本文件主要起草人：刘惠莉、陶洁、李本强、程靖华、石迎、乔长涛、林鸷。

猪肠道冠状病毒多重RT-PCR检测技术

1 范围

本文件规定了PEDV、TGEV、PDCoV三种猪冠状病毒多重RT-PCR检测方法。

本文件适用于临床猪PEDV、TGEV、PDCoV腹泻样品中冠状病毒核酸的检测。

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/T 36871 猪传染性胃肠炎病毒、猪流行性腹泻病毒和猪轮状病毒多重RT-PCR检测方法

GB/T 19489 实验室生物安全通用要求

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

Porcine coronavirus

猪冠状病毒，一类有囊膜的单股正链RNA病毒，主要包括猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒和猪德尔塔冠状病毒。

3.2

PEDV Porcine epidemic diarrhea virus

猪流行性腹泻病毒，属于α-冠状病毒，主要感染7日龄内仔猪引起呕吐、水样腹泻和脱水等临床症状。

3.3

TGEV Transmissible gastroenteritis virus

猪传染性胃肠炎病毒，属于α-冠状病毒，各年龄猪都可感染发病，引起呕吐、水样腹泻和脱水等临床症状，10日龄以内仔猪病死率可达100%。

3.4

PDCoV Porcine delta coronavirus

猪德尔塔冠状病毒，属于δ-冠状病毒，可感染5-15日龄哺乳仔猪，引起腹泻和呕吐，迅速脱水，发病率和死亡率达50%-100%。

3.5

RT Reverse transcription

反转录，以RNA为模板合成互补脱氧核糖核酸（cDNA）的过程。

3.6

PCR Polymerase chain reaction,

聚合酶链反应，一种在体外快速扩增特定脱氧核糖核酸（DNA）片段的方法，由热变性、复性和延伸三步反应组成一个循环，经多次循环反应，使目的DNA得以大量扩增。

3.7

Multi-PCR Multiplex polymerase chain reaction

多重聚合酶链反应，简称多重PCR，是PCR技术的一种形式。同一反应体系中加入多对引物，可同时扩增多个模板的PCR技术。

4 原理

本文件根据PEDV M基因、TGEV N基因、PDCoV M基因保守区域序列，分别设计一对特异性引物，建立了多重RT-PCR检测方法。

5 设备和器材

5.1 生物安全柜。
5.2 普通 PCR 仪。
5.3 台式冷冻离心机（离心力 12,000 g 以上）。
5.4 漩涡振荡器。
5.5 冰箱（2 ℃～8 ℃、-20 ℃、-80 ℃）。
5.6 可调移液器（2.5 μL、10 μL、100 μL、200 μL、1 mL）及配套带滤芯吸头。
5.7 RNase-free Eppendorf (EP)管（1.5 mL）。
5.8 PCR 光学反应管（0.2 mL）。
5.9 组织研磨仪。
5.10 凝胶成像系统。
5.11 水平电泳仪。
5.12 QUAWELL Q5000 微量紫外分光光度计。

6 试剂

6.1 一般要求

除特别说明以外，本文件所用的试剂均为分析纯，实验室用水应符合GB/T 6682的要求。

6.2 引物配制

用灭菌去离子水将引物配制成10 pmol/μL浓度，置于-20 ℃环境下保存。引物序列见附录A。

6.3 0.01 mmol/L、pH7.2 PBS溶液

取磷酸氢二钠（Na2HPO4·12H2O）29.02 g，磷酸二氢钠2.96 g，氯化钠8.50 g，将上述试剂溶于1,000 mL去离子水中，121 ℃高压灭菌20 min，4 ℃保存备用。

6.4 其它

6.4.1 TRIzol（4℃～8℃保存）。
6.4.2 无水乙醇。
6.4.3 75%乙醇（无水乙醇和灭菌去离子水配制，-20 ℃预冷）。
6.4.4 三氯甲烷。
6.4.5 异丙醇。
6.4.6 反转录试剂盒。
6.4.7 RNase-free H_2O 。
6.4.8 PCR Mix （-20 ℃保存）。
6.4.9 DNA分子量标准（4℃～8℃保存）。

7 操作方法

7.1 生物安全

样品采集与处理过程中应戴一次性手套、口罩、防护服，个人防护参见NY/T 541。

7.2 采样要求

样品采集要求参见GB/T 36871。

7.3 待检样品采集与处理

7.3.1 样品采集

用洁净的药匙或其他物品，刮取适量新鲜粪便，放置于无菌EP管或其他洁净容器中。

7.3.1.2 样品处理

称取装有粪便的EP管，使粪便净重约1～2g，加入1mL灭菌的0.01M PBS（pH7.2），置于振荡仪上充分震荡30s，静置5min。反复冻融3次后，12, 000r/min离心5min，取300μL上清，用于核酸提取，或置于-20℃保存备用。

7.3.2 肛拭子样品

7.3.2.1 样品采集

将灭菌的医用棉签插入猪肛门（以棉签棉花部分全部插入肛门为准），同一方向转动3圈，确保充分获取粪便。将肛拭子棉签放置于洁净EP管中。

7.3.2.2样品处理

在装有肛拭子的EP管中加入1mL灭菌的0.01M PBS（pH7.2），置于振荡仪上充分震荡30s，静置5min。-20℃/室温反复冻融3次后，12, 000r/min离心5min，取300μL上清，用于核酸提取，或置于-20℃保存备用。

7.3.3 肠组织样品

7.3.3.1 样品采集

选择充血、出血、肠壁变薄、含水样粪便等病变明显的小肠组织，用无菌手术剪剪取一段肠组织，放置于洁净EP管或其他洁净容器中。

7.3.3.2 样品处理

用无菌手术剪剪取约1cm长度的肠组织样品，放入液氮速冻，加入1mL灭菌的0.01M PBS（pH7.2），用组织研磨仪或研钵充分研磨组织样品，反复冻融3次后，12, 000r/min离心5min，取300μL上层液体，用于核酸提取，或置于-20℃保存备用。

7.4 待检样品总RNA提取

参照试剂盒标准化操作进行总RNA提取：300μL上述处理的样本中加入750μL预冷的TRIzol试剂中；加入200μL氯仿，剧烈振荡15s，室温放置3～5min；4℃，12,000r/min离心15min，吸取上层无色水相约400μL转移至新的RNase-free EP管中；加入等体积的异丙醇，混匀，-20℃放置10min；4℃，12,000r/min离心10min，弃上清；加入1mL 75%的乙醇洗涤沉淀；4℃，12,000r/min离心10min，弃上清；室温干燥，加入20μL RNase-free H2O溶解RNA， -70℃保存或立即反转录。（可选取等效方法提取样品总RNA）

7.5 反转录

以上述提取的RNA为模板进行反转录：10μL RNA、1μL Random Primer、4μL M-MLV Reaction Buffer(5×)、1μL dNTP Mixture(10mM each)、1μL M-MLV RT(200U/μL)、1μL Ribonuclease Inhibitor(40U/μL)、2μL RNase-free H_2O，42℃作用60min，70℃灭活15min。制备的cDNA置于-20℃保存，备用。

7.6 PCR引物

针对PEDV M基因、TGEV N基因、PDCoV M基因的保守区域，分别设计一对引物，引物序列见附录A。上游、下游引物的使用浓度均为10 pmol/μL。

7.7 多重PCR扩增

配制20μL PCR反应体系：2μL样品cDNA、10μL PCR Mix，以及PEDV、TGEV和PDCoV上、下引物（10μM）各0.6 μL，4.4μL RNase-free H_2O。加完试剂后瞬时离心混匀，将PCR管置于普通PCR仪内，反应结束后，利用1.5%琼脂糖凝胶电泳分析结果。反应程序：94℃，4 min；（94℃，35s；55℃，35s；72℃，35s）1个循环，共30个循环；72℃，8 min；16℃，10 min。

7.8 阴性及阳性对照

7.7.1 阴性对照：用RNase-free H_2O作为阴性对照。

7.7.2 阳性对照：用T-PEDV/M、T-TGEV/N、T-PDCoV/M 重组质粒按照体积比1:1:1进行混合，将混合物作为阳性对照。重组质粒标准品制备见附录B。

7.9 琼脂糖凝胶电泳分析

配制浓度为1.5%的琼脂糖凝胶，分别取5μL扩增产物和DL 2,000 DNA Marker加入到各凝胶孔。待电泳结束，置于凝胶成像系统上观察，判定结果并做好记录。

8 结果判定

8.1 试验成立条件

当阴性对照无任何DNA扩增带，而阳性对照在332bp、226bp和504bp位置出现特异性DNA扩增带，则实验结果成立；否则，此次检测无效。实验结果成立时的判定结果如下：

8.2 阳性判定

— 被检样品仅在332bp位置出现特异性DNA扩增带，判定为PEDV阳性；
— 被检样品仅在226bp位置出现特异性DNA扩增带，判定为TGEV阳性；
— 被检样品仅在504bp位置出现特异性DNA扩增带，判定为PDCoV阳性；
— 被检样品在332bp和226bp位置出现2条特异性DNA扩增带，判定为PEDV和TGEV二重阳性；
— 被检样品在226bp和504bp位置出现2条特异性DNA扩增带，判定为TGEV和PDCoV二重阳性；
— 被检样品在332bp和504bp位置出现2条特异性DNA扩增带，判定为PEDV和PDCoV二重阳性。
— 被检样品在332bp、226bp和504bp位置出现3条特异性DNA扩增带，判定为PEDV、TGEV和PDCoV三重阳性。

8.3 阴性判定

— 被检样品在332bp位置未出现特异性DNA扩增带，判定为PEDV阴性；
— 被检样品在226bp位置未出现特异性DNA扩增带，判定为TGEV阴性；
— 被检样品在504bp位置未出现特异性DNA扩增带，判定为PDCoV阴性。

9 注意事项

9.1 样品采集及处理过程中防止发生生物安全危害的措施参照 GB/T 19489 进行。
9.2 核酸提取及检测过程中防止交叉污染的措施参照 SN/T 1193 进行。

附录 A
（规范性）
引物序列

表 A　猪冠状病毒多重 PCR 引物序列

引物名称	引物序列（5’-3’）	目的基因	长度(bp)
PEDV-F	GATACTTTGGCCTCTTGTGT	PEDV M	332
PEDV-R	ATTGACTTACCTGTACGC		
TGEV-F	ACCAGATAGAAGTCACGTT	TGEV N	226
TGEV-R	TCAACCTGTGTGTCATCAAA		
PDCoV-F	ACTTATTCTGCTTTGGCTGCT	PDCoV M	504
PDCoV-R	GAAGTGGTTATGGTGTGAAGTC		

附录 B
（规范性）
重组质粒标准品制备

B.1 特异性引物

特异性引物序列及扩增片段长度见附录 A。

B.2 病毒核酸提取及 RT-PCR 扩增

分别取 PEDV、TGEV 和 PDCoV 参考毒株，按 7.4 和 7.5 提取病毒总 RNA 并反转录成 cDNA。以 cDNA 为模板，分别利用 PEDV-F/PEDV-R、TGEV-F/TGEV-R、PDCoV-F/PDCoV-R 引物对，建立 50μL 反应体系：2μL 阳性 cDNA、10μL 5×PCR Buffer、3μL dNTP、1μL *pfu* 聚合酶，上、下引物（10μM）各 1μL，32μL RNase-free H_2O。按 7.7 中的反应程序进行单一 PCR 扩增，获得 PCR 产物。

B.3 重组质粒标准品构建

利用 1.5%琼脂糖凝胶电泳进行 PCR 产物鉴定，在凝胶成像系统上切下含目的基因片段的凝胶块，利用商品化胶回收试剂盒进行 PCR 产物回收。利用 T4 DNA 连接酶，将纯化的 PCR 产物与 pEASY Blunt Zero 载体连接，并转化 DH5α 感受态细胞，涂布于氨苄抗性的 LB 平板上，37℃培养 16h 左右。挑取单个菌落，接种于氨苄抗性的 LB 液体中，按质粒提取试剂盒说明书进行质粒提取。

注：商品化的胶回收试剂盒、T4 连接酶试剂盒、质粒提取试剂盒使用前经技术验证合格。

B.4 重组质粒标准品鉴定

B.4.1 PCR鉴定

以提取的质粒为模板，利用附录 A 中相应的引物进行 PCR 扩增，利用琼脂糖凝胶电泳进行结果观察，结果判定见 8.。

B.4.2 测序鉴定

对 B.4.1 中筛选疑似阳性质粒送测序公司进行序列测定，利用 Larsergene 软件对获得的序列与标准毒株序列进行比对分析，两者在相应区域的序列应一致。

经 PCR、测序鉴定正确的重组质粒（图 B-1），分别命名为 T-PEDV/M、T-TGEV/N、T-PDCoV/M，作为多重 PCR 反应的阳性标准品。

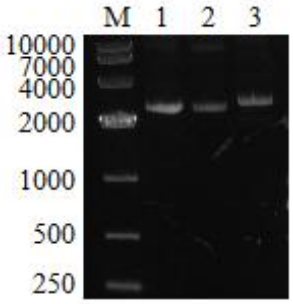

图 B-1. 3 种阳性质粒鉴定图

M: DL1,000 DNA Marker; 1: T-PEDV/M; 2: T-TGEV/N; 3: T-PDCoV/M

B.4.3 多重PCR最低检测限度测定

利用 QUAWELL Q5000 微量紫外分光光度计测定 3 种阳性质粒的浓度，并进行 10 倍倍比稀释，然后进行多重 PCR 扩增。结果显示（图 B-2），T-PEDV/M、T-TGEV/N、T-PDCoV/M 阳性质粒最高稀释 10^{-6} 倍时，仍可以特异性扩增 PEDV、TGEV 和 PDCoV 目的片段。即该多重 PCR 体系检测 PEDV、TGEV 和 PDCoV 的核酸最低检测限度分别为 3.59×10^{4}copies/μL、8.79×10^{4}copies/μL、1.76×10^{4}copies/μL。

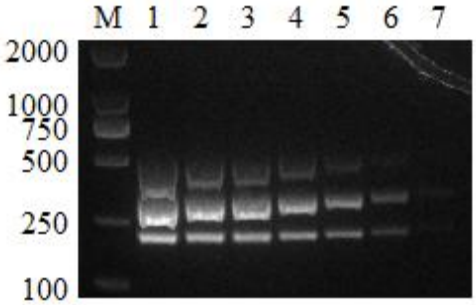

图 B-2. 多重 PCR 灵敏度的确定

M: DL,2000 DNA Marker; 1-7:3 种阳性质粒分别稀释 10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}、10^{-6}、10^{-7} 倍