ICS 65.020.30
CCS B 44

DB23

黑 龙 江 省 地 方 标 准

DB 23/T XXXX—XXXX

实验动物 实验猪副流感病毒5型 RT-PCR检测技术规范

（征求意见稿）

起草单位：中国农业科学院哈尔滨兽医研究所

联 系 人：陈建飞

联系电话：13946075389

联系邮箱：chenjianfei@caas.cn

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

黑龙江省市场监督管理局 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：

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型检测的样品采集、病毒核酸提取、反转录-聚合酶链式反应的技术要求。

本文件适用于实验猪副流感病毒5型的诊断。

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 19489　实验室生物安全通用要求

GB/T 6682　分析实验室用水规格和实验方法

NY/T 541-2016　兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3　术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

副流感病毒5型 （Parainfluenza Virus 5，PIV5）

副粘病毒科腮腺炎病毒属成员之一，1956 年首次在猴源肾细胞系中发现，被命名为猴病毒 5 型（Simian virus 5，SV5）。国际病毒分类委员会（International Committee on Taxonomy of Viruses，ICTV）2009年将其命名为副流感病毒5型（Parainfluenza Virus 5，PIV5），2016年将其更名为哺乳动物腮腺炎病毒 5 型（Mammalian rubulavirus 5），2018 年将其更名为哺乳动物正腮红病毒 5 型（Mammalian orthorubulavirus 5），感染宿主范围广。本文依旧称之为PIV5。

3.2

猪副流感病毒5型 （Porcine parainfluenza virus 5,PPIV5）。

1998年德国首次从患有猪繁殖与呼吸综合征的仔猪肺脏组织中分离到猪副流感病毒5型（Porcine parainfluenza virus 5,PPIV5）。2013年韩国从患有呼吸道症状的猪的肺脏组织中分离到PPIV5。2018年以来我国从腹泻猪的小肠组织或粪便中检测到PPIV5，随后用传代细胞系分离到PPIV5。

3.3

反转录-聚合酶链式反应 （Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR）。

在反转录酶的作用下，以RNA为模板合成cDNA,然后以cDNA为模板，在DNA聚合酶的作用下，通过体外扩增获得大量目的基因或DNA片段的技术。

4 实验室样品采集与处理

4.1 主要器材

4.1.1 灭菌手术刀、剪刀和镊子。

4.1.2 一次性无菌注射器（5 mL、10 mL）。

4.1.3 微量移液器（200 μL、1000 μL）及配套吸头（200 μL、1000 μL）。

4.1.4 离心管（1.5 mL、2 mL ）。

4.1.5 样品保存管（2 mL、25 mL、50 mL）。

4.1.6 医用防护服。

4.1.7 组织匀浆器（转速:5000 r/min ~ 30 000 r/min；可均质样品范围：0.03 mL ~ 2000 mL）。

4.1.8 振荡器（≥100 r/min）。

4.1.9 台式低温离心机(温度：2℃ ~ 8℃，转速：≥10 000 r/min)。

4.1.10 冰箱（-20 ℃）。

4.2 主要试剂

4.2.1 磷酸盐缓冲液（PBS），配方见附录 A 中的 A.1。

4.2.2 青霉素（100 000 IU）。

4.2.3 链霉素（100 000 μg）。

4.3 样品采集

4.3.1 采集要求

样品的采集、保存与运输按照 NY/T 541-2016 的规定执行。

4.3.2 粪便

用灭菌注射器吸 1 mL～2 mL 发病猪只的粪便或轻轻挤压发病猪的腹部，从肛门处采集 1mL～2 mL 粪便，放入 2 mL 样品保存管，封口，-20 ℃保存。

4.3.3 小肠及内容物

用手术刀剖开病死仔猪腹腔，分别在病变明显的肠管两端结扎并在结扎线外端剪断，放入 25 mL 或 50 mL 样品保存管，封口，-20 ℃保存。

4.4 样品处理

4.4.1 粪便

向样品保存管中加适量灭菌 PBS（含终浓度 1 000 IU/mL 青霉素、1 000 μg/mL 链霉素），经振荡器（2000 r/min）震荡 3 min～5 min，4 ℃、5 000 r/min 离心 20 min，取上清液进行检测或-20 ℃保存、备用。

4.4.2 小肠及内容物

取适量长度的小肠剪碎，连同肠内容物一并匀浆，用含终浓度 1 000 IU/mL 青霉素、1 000 μg/mL 链霉素的 PBS 按重量体积比制成 5 倍悬液，4 ℃条件下 5 000 r/min 离心 20 min，取上清液进行检测或-20 ℃保存、备用。

5 病毒核酸提取

5.1 主要器材

5.1.1 台式低温离心机(温度：2℃～8℃，转速：≥10 000 r/min)。

5.1.2 微量移液器（2.5μL、10μL、200 μL、1000 μL）及配套吸头（10 μL、200 μL、1000 μL）。

5.1.3 冰箱（-20 ℃、-70 ℃）。

5.1.4 1.5 mL 无 RNA 酶灭菌离心管。

5.2 主要试剂

5.2.1 RNA 提取液：Trizol 试剂。

5.2.2 酚氯仿抽提液：苯酚、三氯甲烷、异戊醇（25:24:1）混合液。

5.2.3 异丙醇（分析纯）。

5.2.4 DEPC 水：焦磷酸二乙酯按 0.1%含量加入去离子水中配制而成。

5.2.5 75%乙醇：无水乙醇（分析纯）与 DEPC 水按 3:1 配制而成。

5.3 样品制备

5.3.1 粪便、小肠及内容物：按4.4处理。
5.3.2 阳性对照：已知病毒材料，如PPIV5感染的细胞。
5.3.3 阴性对照：未感染细胞或灭菌去离子水。

5.4 操作

5.4.1 实验室生物安全按照 GB 19489 的规定执行。

5.4.2 取待检样品上清（4.4）、阳性对照、阴性对照各 300 μL 于无 RNA 酶的灭菌离心管（1.5 mL）中，加 500 μL RNA 提取液（TRIzol 试剂），充分混匀，室温静置 10 min；加入 500 μL 酚氯仿抽提液，充分混匀，室温静置 10 min；在 4 ℃条件下 12 000 r/min 离心 10 min，取上清液（500 μL）于新的无 RNA 酶灭菌离心管（1.5 mL）中，加入 1.0 mL 异丙醇，充分混匀，在-20 ℃条件下静置 30 min；在 4 ℃条件下 12 000 r/min 离心 10 min，小心弃上清；加 1.0 mL75%乙醇，在 4 ℃条件下 12 000 r/min 离心 10 min，小心弃上清，倒置于吸水纸上，室温自然风干；加入 20 μL DEPC 水溶解 RNA 沉淀，瞬时离心，立即使用或-70 ℃保存、备用。

5.4.3 可采用自动化核酸提取仪和配套核酸抽提试剂等效核酸提取试剂和方法提取RNA。

6 反转录-聚合酶链式反应（RT-PCR）检测

6.1 主要器材

6.1.1 PCR 扩增仪（96 孔或 3×32 孔或 3×21 孔，温度：0℃～100℃，升降温速率 4℃～6℃/S）。

6.1.2 电热恒温水槽（20℃～100℃）。

6.1.3 台式低温离心机(温度：2℃～8℃, 转速：≥10 000 r/min)。

6.1.4 电泳仪（最大输出：600V，400 mA, 240 W）和水平电泳槽（容积≥300 mL）。

6.1.5 凝胶成像仪（分辨率≥130 万像素）。

6.1.6 微量移液器（2.5μL、10 μL、200 μL、1000 μL）及配套吸头（10 μL、200 μL、1000 μL）。

6.1.7 离心管（1.5 mL）。

6.1.8 PCR 扩增管（0.2 mL）。

6.2 主要试剂

6.2.1 反转录（RT）试剂

6.2.1.1 5×M-MLV 缓冲液。

6.2.1.2 dNTPs (各 10 mM)。

6.2.1.3 RNase 抑制剂（40 U/μL）。

6.2.1.4 反转录酶 M-MLV（200 U/μL）。

6.2.1.5 反转引物：随机六聚体（Random 6 mers，10 μmol/L）。

6.2.2 PCR 试剂

6.2.2.1 10×Ex Taq buffer、2.5 mM dNTPs、Ex Taq 酶。

6.2.2.2 灭菌去离子水（按 GB/T 6682 的规定制备）。

6.2.2.3 引物。

NP9F：5'-CGTGCTTAAAGCATATGAGCGA-3'；

NP326R：5'-ATTAAGCGGAATGATCCCT-3'。

6.2.3 电泳试剂

6.2.3.1 电泳缓冲液：50×TAE 贮存液（配方见附录 A 中的 A.2），临用时加蒸馏水（按 GB/T 6682 的规定制备）配成 1×TAE 缓冲液（配方见附录 A 中的 A.3）。

6.2.3.2 琼脂糖：国产或进口的琼脂糖。

6.2.3.3 电泳加样缓冲液：配方见附录 A 中的 A.4。

6.2.3.4 DNA Marker（标准分子量）：分子大小范围 100 bp～2 000 bp。

6.3 样品制备

6.3.1 粪便、小肠及内容物：按4.4处理。
6.3.2 阳性对照：已知病毒材料，如PPIV5感染的细胞。
6.3.3 阴性对照：未感染细胞或灭菌去离子水。

6.4 操作

6.4.1 cDNA 合成

合成反应在 20 μL 体系中进行。取 5.4 制备的总 RNA 各 12.5 μL 于无 RNA 酶的灭菌离心管（1.5 mL）中，加入 1μL 随机 6 聚体、混匀，70 ℃水浴 10 min、冰浴 2 min， 瞬时离心，依次加入 4 μL 5×M-MLV 缓冲液、1μL dNTPs 混合物（各 10 mM）、0.5 μL RNase 抑制剂、1.0 μL 反转录酶 M-MLV，混匀，42 ℃水浴 1 h； 70 ℃水浴 15 min、冰浴 3 min，得到 cDNA 溶液，立即使用或置-20℃保存。

6.4.2 PCR

6.4.2.1 将引物（NP9F/NP326R）稀释到工作浓度 10 pmol/μL。

6.4.2.2 PCR 反应体系

反应在 25 μL 体系中进行。在 PCR 管中依次加入灭菌去离子水 17.25 μL、10×Ex Taq buffer2.5 μL、2.5 mM dNTPs 2 μL、Ex Taq 酶 0.25μL、上下游引物各 0.5 μL。在以上体系基础上，按阴性对

照（2 μL 灭菌去离子水）、待检样品（2 μL cDNA）、阳性对照（2 μL PPIV5 cDNA）顺序加入扩增模板。

6.4.2.3 PCR 反应条件

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

6.4.3 扩增产物电泳检测

6.4.3.1 1% 琼脂糖凝胶板的制备

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。

6.4.3.2 加样及电泳

取待检样品、阳性对照、阴性对照扩增产物各 5 μL、DL2,000 DNA Marker 5 μL 进行琼脂糖凝胶电泳，150 V 条件下 10 min～15 min。

6.4.3.3 凝胶成像仪观察

反应产物电泳结束后，用凝胶成像仪观察检测结果、拍照、记录试验结果。

6.5 试验成立条件

阳性对照出现约336 bp的目的条带，同时，阴性对照无目的条带（参见附录B中图B.1）。

6.6 结果判定

符合6.5条件，若待检样品泳道有约336 bp的目标条带，则判为PPIV5核酸阳性（参见附录B中图B.1）；反之，则判为PPIV5核酸阴性（参见附录B中图B.1）。

附录A
（规范性）
溶液配制

A.1　0.02 mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲液（PBS）的配制

A.1.1　0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液

称取磷酸氢二钠（$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$）71.64 g，先加适量去离子水（按 GB/T 6682 的规定制备）溶解，最后定容至 1 000mL，混匀。

A.1.2　0.2 mol/L 磷酸二氢钠溶液

称取磷酸二氢钠（$NaH_2PO4 \cdot 2H_2O$）31.21g，先加适量去离子水（按 GB/T 6682 的规定制备）溶解，最后定容至 1 000mL，混匀。

A.1.3　0.2 mL/L 磷酸氢二钠溶液 360 mL

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 140 mL，称取氯化钠 38 g，用去离子水（按 GB/T 6682 的规定制备）溶解，最后定容至 5 000 mL，4℃保存。

A.2　50×TAE 贮存液

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，加入去离子水（按 GB/T 6682 的规定制备）800 mL，充分搅拌溶解，加入 57.1mL 的醋酸，充分搅拌，加去离水定容至 1L，室温保存。

A.3　1×TAE 缓冲液

用去离子水将 50×TAE 电泳缓冲储存液 50 倍稀释后即成。

A.4　电泳加样缓冲液

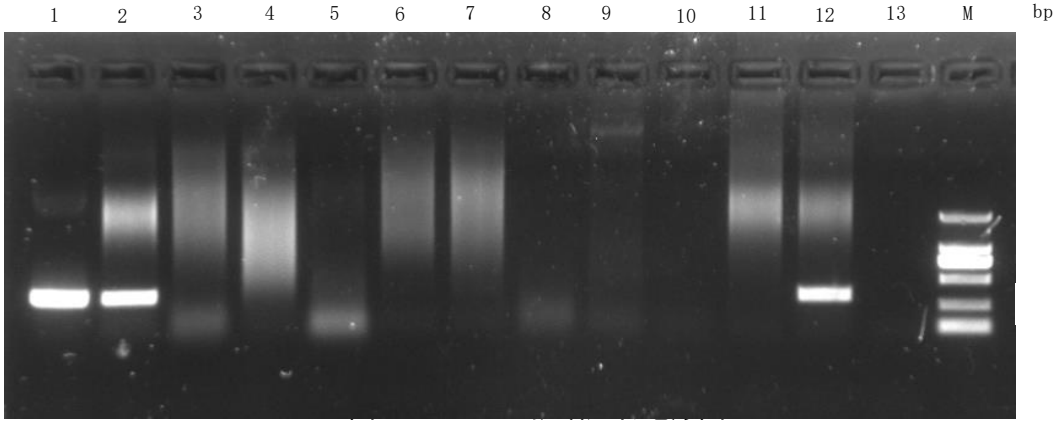
称取乙二胺四乙酸（EDTA）4.4 g，溴酚兰 0.25 g，二甲苯蓝FF 0.25 g，加入去离水200 mL，加热搅拌充分溶解，加入180 mL甘油后，用2 N 氢氧化钠调节pH值至7.0，用去离子水定容至500 mL，室温保存。

附 录 B
（资料性）

RT-PCR检测电泳图示

B.1 RT-PCR检测电泳图示

见图B.1。



B.2 说明

B.2.1 M：DNA Marker（标准分子量）为DL2000。

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