

猪伪狂犬病毒交叉引物恒温扩增（CPA） 检测方法

2020 - 07 - 14 发布

2020 - 08 - 01 实施

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 缩略语	1
4 仪器	1
5 耗材	2
6 试剂	2
7 样品采集和处理	2
8 CPA 操作程序	3
9 样品处理及生物安全管控措施	4
附录 A（规范性附录） 溶液配制	6
附录 B（规范性附录） 引物	7
附录 C（规范性附录） CPA 反应体系	8

前 言

本规范依据GB/T1.1—2009的规定起草。

本标准由四川省农业农村厅提出、归口并解释。

本标准由四川省市场监督管理局批准。

本标准起草单位：四川省动物疫病预防控制中心、四川纳比生物科技有限公司。

本标准主要起草人：陈斌、周明忠、陈弟诗、袁旦一、李晓琪、裴超信、张毅、邓飞、李丽、邵靓、陈冬、蔡冬冬、丁梦蝶、邱明双、周莉媛、张睿、辜良斌。

猪伪狂犬病毒交叉引物恒温扩增（CPA） 检测方法

1 范围

本标准规定了猪伪狂犬病毒的交叉引物恒温扩增（CPA）检测方法。
本标准适用于四川省行政区域范围内猪伪狂犬病毒核酸检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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 25172—2010 猪常温精液生产与保存技术规范

SN/T 3567.1—2013 交叉引物恒温扩增检测方法 第1部分：通用技术规程

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

3.1 CPA

交叉引物恒温扩增（Crossing Priming Amplification）

3.2 DNA

脱氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid）

3.3 Bst 酶

Bst DNA聚合酶（Bst DNA polymerase）

3.4 TE 缓冲液

Tris-EDTA缓冲液（Tris-EDTA buffer）

3.5 PRV

伪狂犬病毒（pseudorabies virus）

3.6 PBS

磷酸盐缓冲液

4 仪器

- 4.1 恒温金属浴。
- 4.2 高速台式冷冻离心机。
- 4.3 组织研磨仪或研钵。
- 4.4 普通冰箱：2℃~8℃。
- 4.5 普通冰柜：-20℃以下。
- 4.6 超低温冰箱：可控温至-70℃。
- 4.7 微量移液器：0.2μL~2.5μL、2μL~20μL、20μL~200μL、100μL~1000μL，并配备与移液器匹配的吸头。
- 4.8 高压灭菌锅。
- 4.9 干烤灭菌器。
- 4.10 普通 PCR 仪。

5 耗材

- 5.1 1.5mL 离心管。
- 5.2 0.2mLPCR 薄壁管或八连管。
- 5.3 PCR 管漂浮板。

6 试剂

- 6.1 除非另有说明，在检测中使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 DNAzol 于 2℃-8℃ 保存；商品化 DNA 提取试剂按说明书要求条件保存。
- 6.3 无水乙醇，-20℃ 预冷。
- 6.4 75%乙醇，无水乙醇和双蒸水配制，-20℃ 预冷。
- 6.5 8mmol/LNaOH 溶液，配制见附录 A。
- 6.6 PBS 缓冲液，配制见附录 A。
- 6.7 Bst 酶及 Bst 酶反应缓冲液：Bst 酶浓度为 8U/μL，Bst 酶反应缓冲液为 10×Thermopol* Buffer，Mg²⁺ 浓度为 100mmol/L。
- 6.8 dNTP Mix：含 dATP、dGTP、dCTP、dTTP 各 10mmol/L，-20℃ 保存，避免反复冻融。
- 6.9 引物序列参见附录 B。
- 6.10 伪狂犬病毒阳性对照样品和阴性对照样品：阳性对照使用灭活疫苗或组织培养灭活毒，-20℃ 保存备用；阴性对照可采用 ddH₂O。
- 6.11 石蜡油，按说明书要求条件保存。

7 样品采集和处理

7.1 采样工具

- 7.1.1 手术刀、剪刀、镊子，经 160℃ 干热灭菌 2h 或高压灭菌烘干。
- 7.1.2 一次性无菌棉拭子。
- 7.1.3 组织研磨器或者研钵，经 160℃ 干热灭菌 2h 或高压灭菌烘干。
- 7.1.4 一次性注射器/真空采血管。

7.2 样品采集

- 7.2.1 血液样品采集：用含有 EDTA 的真空采血管采集血液，充分混匀，编号备用。
- 7.2.2 血清样品采集：不含有 EDTA 的真空采血管时，采血后静置析出血清，将血清转入离心管编号备用。
- 7.2.3 精液样品采集：按照 GB/T 25172—2010 中第 4、8 章节的方法采集和保存精液。
- 7.2.4 鼻拭子样品采集：用棉拭子取受检动物鼻腔分泌物，置于 2mlPBS 缓冲液中备用。
- 7.2.5 组织样品采集：取大脑海马背侧皮层、中脑、脑桥、三叉神经节、扁桃体、肺脏、淋巴结等组织 5-10g，置于无菌离心管内，编号备用。

7.3 样品保存和运输

采集的样品可立即用于检测。不能立即检测的样品，在 2℃-8℃ 下保存应不超过 24h，-20℃±5℃ 下应不超过 3 个月，-70℃ 以下可长期保存。样品运送采用低温保存进行运输，并在规定温度下的保存期内送达。

7.4 样品处理

- 7.4.1 血液和精液样品无需进行前处理，直接用于核酸提取。
- 7.4.2 鼻拭子样品：充分震荡洗脱含有鼻拭子的管子 1min 左右，弃去拭子后静置 5min，取上清用于后续的核酸提取。
- 7.4.3 组织样品：取 2g 左右的组织，剪碎，加入 1-2mlPBS 缓冲液进行研磨至匀浆状态，8000r/min，离心 1min 取上清用于后续的核酸提取。

8 CPA 操作程序

8.1 DNA 提取试剂

- 8.1.1 核酸提取区进行操作。DNA 提取使用 DNAzol 手工提取，也可以使用商品化试剂盒提取。
- 8.1.2 取 n 个灭菌的 1.5ml 离心管，其中 n 为待检样品数量加上阴阳性对照，对每个离心管进行编号。
- 8.1.3 每管先加入 800μLDNAzol，再分别加入被检样品、阳性对照、阴性对照各 200 μL，颠倒 10 次混匀，4℃ 或室温 10000 r/min 离心 10min。
- 8.1.4 取 900μL 上清，置于新的 1.5ml 离心管中，加入 500 μL 无水乙醇，混匀，室温放置 3min；4℃ 或室温 10000 r/min 离心 5min。
- 8.1.5 弃上清，沿管壁缓缓加入 0.8mL-1 mL 乙醇，颠倒 3-6 次混匀，4℃ 10000 r/min 离心 5min。反复洗涤两次后，将离心管倒扣于吸水纸上，自然晾干或用移液器移去残液。
- 8.1.6 用 30μL 8mmol/L NaOH 溶液溶解沉淀，DNA 在 2-8℃ 冰箱可保存两个月，-20℃ 冰柜可保存 2 年左右。

8.2 CPA 反应

8.2.1 反应体系的配制

在试剂准备区进行。设 CPA 反应管为 n，n 为待检样品数量加上阴阳性对照，每个反应的体系见附录 C，为了避免移液器取样损失，建议按 n+1 反应进行配制。

8.2.2 反应液的分装

将 8.2.1 中配制的 CPA 反应液充分混匀，按照每管 16 μL 分装于 0.2mL 透明 PCR 管内，按顺序加样并做好标识，转移至核酸提取区。

8.2.3 加样

在核酸提取区进行。在每个PCR反应管中分别加入8.1制备的DNA核酸溶液4 μ L，再向每管滴加20 μ L石蜡油，盖上盖子，将反应管以大于4000 r/min瞬时离心3-5秒。转移至检测区。

8.2.4 CPA 扩增

方法一：将PCR反应管置恒温设备（水浴锅、金属浴）上，63 $^{\circ}$ C避光温浴35min。

方法二：实验室若暂时无石蜡油，可将PCR管置于普通PCR仪，程序设置热盖105 $^{\circ}$ C，样品孔63 $^{\circ}$ C，35min。

8.2.5 结果判定

8.2.5.1 操作程序

将恒温扩增后的PCR反应管（不可开盖，以避免污染）放入一次性核酸检测装置（含核酸检测试纸条）（按照SN/T 3567.1—2013中附录B操作），检查液泡有无漏液以及是否在下图（图1）所示位置，合上核酸检测装置内芯后将其装入装置外盒。



图1 操作示意图

注1：按手柄至检测装置于关闭状态，将检测装置放置在操作台上，同时开始计时。15min-30min内通过阅读窗判读结果并记录结果，30min后判读结果无效。

8.2.5.2 结果描述及判定

试纸条出现两条红色条带，一条位于质控区（C线），一条位于检测区（T线），结果判定为阳性。试纸条质控区（C线）出现一条红色条带，检测区（T线）没有条带，结果判定为阴性。

试纸条质控区（C线）和检测区（T线）均未出现条带，或仅检测区（T线）出现红色条带，检测结果无效。表明试纸条已损坏、失效或者操作有误。此时应查找并排除原因，并对此样本进行重复实验。（图2）

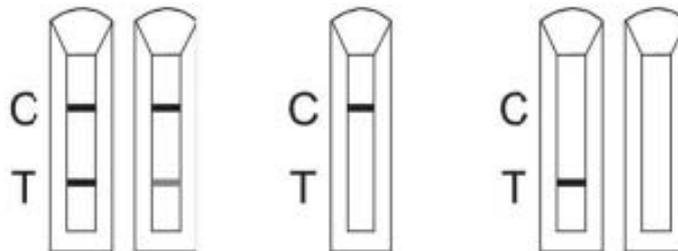


图2 检测结果判读示意图

9 样品处理及生物安全管控措施

实验完毕后，立即对实验室检测环境进行消毒，同时对样品及试验过程中产生的废弃物进行高温高压灭菌处理，并送有资质的无害化处理公司进行处理。

附 录 A
(规范性附录)
溶液配制

A.1 8mmol/L NaOH溶液

称量0.32g NaOH，溶解到1000 mL去离子水中，混匀，分装，常温保存。

A.2 磷酸盐缓冲液 (0.01mol/L PBS, pH7.4)

用800mL蒸馏水溶解8g NaCl, 0.2g KCl, 1.44g Na_2HPO_4 和0.24g KH_2PO_4 。用HCl调节溶液的pH至7.4, 加水至1L。分装后经121℃、15min高压灭菌后备用。

附 录 B
(规范性附录)
引物

表B.1 引物的名称与序列

名称	序列
PRVgE p1	5'- ACGAGCCCCGCTTCCA -3'
PRVgE p2	5'- CATGTCCGAGACCACGCGCTCCACTCGCAGCTCTTCT -3'
PRVgE p3	5'-FAM-GCATCAGGTCGAACGTGT -3'
PRVgE p4	5'-Biotin-CATGTCCGAGACCACGCGCG -3'
PRVgE p5	5'- CCAGCGTGGCGGTAAAGTTCTC -3'
PRVgE p6	5'- CGCGGGTGGTAGATGCA -3'

注：引物和探针可由生物公司合成，用TE溶液溶解并稀释至100 μ mol/L储存浓度，-20 $^{\circ}$ C保存备用，保存期为1年；根据需要配制成40 μ mol/L工作浓度，-20 $^{\circ}$ C保存供检测使用，如经常使用反复冻融，有效期为3个月。

附 录 C
(规范性附录)
CPA 反应体系

C.1 CPA反应体系

组分	1 个检测反应的加入量
10×Thermopol* Buffer	2 μL
Bst 酶 (8U/μL)	1 μL
dNTP (10 mmol/L)	0.8 μL
Mg ²⁺ (100 mmol/L)	0.6 μL
PRVgE p1 (40μmol/L)	0.1 μL
PRVgE p2 (40μmol/L)	0.25 μL
PRVgE p3 (40μmol/L)	0.25 μL
PRVgE p4 (40μmol/L)	0.25 μL
PRVgE p5 (40μmol/L)	0.25 μL
PRVgE p6 (40μmol/L)	0.1 μL
ddH ₂ O	10.4 μL
合计	16 μL