



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1917—2007

牛地方流行性白血病 聚合酶链反应操作规程

Protocol of polymerase chain reaction for enzootic bovine leukemia

2007-05-23 发布

2007-12-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局

前 言

本标准参考了 OIE《陆生动物疾病诊断试验和疫苗标准手册》。

本标准的附录 A 和附录 B 为资料性附录。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国江苏出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：段宏安、张睿、周毅、姚燕林、王海涛、李金华、刘小琴。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

牛地方流行性白血病 聚合酶链反应操作规程

1 范围

本标准规定了牛地方流行性白血病聚合酶链反应检测方法。

本标准适用于牛地方流行性白血病的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(eqv ISO 3696:1987)

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

3 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

3.1

BLV Bovine Leukemia Virus

牛白血病病毒

3.2

PCR Polymerase chain reaction

聚合酶链反应。

3.3

BSA bovine serum albumin

牛血清白蛋白。

3.4

dNTP deoxyribonucleoside triphosphate

脱氧核糖核苷三磷酸。

3.5

dATP deoxyadenosine triphosphate

脱氧腺苷三磷酸。

3.6

dCTP deoxycytidine triphosphate

脱氧胞苷三磷酸。

3.7

dGTP deoxyguanosine triphosphate

脱氧鸟苷三磷酸。

3.8

dTTP deoxythymidine triphosphate

脱氧胸苷三磷酸。

3.9

bp base pair

碱基对。

3.10

ddH₂O double distilled water

双蒸水。

3.11

EDTA ethylene diaminetetraacetic acid

乙二胺四乙酸。

3.12

Taq 酶 Taq DNA polymerase

Taq DNA 聚合酶。

3.13

TBE

Tris-HCl、borate、EDTA 缓冲液。

3.14

Tris tris(hydroxymethyl)aminomethane

三(羟甲基)氨基甲烷。

3.15

FLK fetal lamb kidney

羊胎肾细胞

3.16

CPE cytopathic effect

致细胞病变效应。

4 方法原理

牛地方流行性白血病是由牛白血病病毒(BLV)引起的疾病,牛在任何年龄段均可感染,病毒以前病毒的形式整合于宿主细胞 DNA,存在于血液淋巴细胞和肿瘤细胞中。病毒也在各种体液包括鼻液、气管液、唾液和牛奶等的细胞成分中发现。从抗凝全血样品中分离的外周血淋巴细胞、血沉棕黄层或冷冻的全血以及肿瘤细胞均可用于提取病毒核酸,先用一对外侧引物扩增 BLV 目的基因 gp51(env)的一个大片段,再用一对内侧引物以大片段为模板进行第二次扩增,琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物,以确定样品是否含有 BLV。

5 试剂和材料

5.1 双蒸水应符合 GB/T 6682 中一级水规格。

5.2 琼脂糖(电泳纯)。

5.3 溴化乙锭(EB)。

5.4 Taq 酶:5 U/μL。-20℃保存,避免反复冻融或温度剧烈变化。

5.5 DNA 分子量标准(DNA Marker):50 bp~500 bp,须在 320 bp~360 bp 之间至少有一条带。

5.6 BLV 阳性对照:可取 BLV 持续感染的 FLK 细胞提取 DNA 用于 PCR 反应阳性对照,或由指定单位提供。

5.7 PBS(pH7.2)溶液、红细胞裂解液、淋巴细胞分离液、TE 缓冲液、dNTP、引物、10×PCR 反应液、电泳缓冲液和 10×加样缓冲液参见附录 A。

6 主要仪器

- 6.1 微量可调移液器。
- 6.2 PCR 扩增仪。
- 6.3 无菌室、超净工作台或通风橱。
- 6.4 消毒灭菌锅。
- 6.5 离心机。
- 6.6 冰箱。
- 6.7 纯水器或超纯水器。
- 6.8 旋涡混合器。
- 6.9 电泳仪。
- 6.10 紫外分析仪或凝胶成像系统。
- 6.11 紫外可见分光光度计或核酸蛋白分析仪。
- 6.12 手持式均质器。

7 试验方法

7.1 样品处理

7.1.1 抗凝血处理

取淋巴细胞分离液轻轻加到等量的抗凝血上,注意不要摇动打乱液层,2 000 r/min离心 20 min,离心后分成多层,最上层是血浆层,中间层是分离液,最下层是红细胞,在血浆层与分离液之间是一层较致密的白色层,为淋巴细胞层,用毛细吸管插入并吸取该层放入另一离心管中,以 PBS 洗涤后备用,若暂时不能实验时将样品冻结保存。

7.1.2 血凝块处理

取出装有血凝块的采血管,将手持式均质器的均质头置入灭菌双蒸水中清洗后,浸入无水酒精中清洗,于火焰上烧灼至干,浸入灭菌 PBS 中冷却,置于血凝块中均质,直至无团块状物存在。血凝块均质液加入等量红细胞裂解液充分混匀,置于冰上 15 min,加入冷至 2℃~8℃的灭菌双蒸水至满管,如加入红细胞裂解液后已满管,可先行离心后再加灭菌双蒸水,颠倒混匀,1 500 r/min 离心 5 min,去上清液,如沉淀仍有血凝块,可用红细胞裂解液裂解直至无血凝块存在,细胞沉淀用 PBS 洗涤二次后备用。

7.1.3 肿瘤或其他组织处理

将肿瘤或其他组织加入 PBS 成 10%的匀浆液,1 000 r/min 离心 5 min,取上清备用。

7.1.4 细胞培养物处理

刮取样品接种后出现 CPE 或可疑的细胞培养物 500 μ L,经 2 000 r/min 离心 10 min,去上清,取沉淀备用。

7.1.5 检测过程中防止交叉污染的措施按照 SN/T 1193 中的规定执行。

7.2 病毒 DNA 提取

7.2.1 取微量离心管,每管加 100 μ L 5%chelex-100 溶液,再加入 7.1 中处理好的样品、阳性、阴性对照各 100 μ L,细胞培养物离心后的沉淀可直接加入 chelex-100 溶液,旋涡混匀,56℃~60℃孵育 20 min,旋涡混合 10 s,98℃水浴 10 min,旋涡混合 10 s,置于冰上冷却 3 min,15 000 r/min 离心 2 min。取上清 5 μ L 用于 PCR 反应。剩余部分置于 4℃短期或-20℃长期保存备用。

7.2.2 可选用其他合适 DNA 抽提方法或商品化试剂盒提取 DNA。

7.3 套式 PCR 扩增

7.3.1 一次 PCR 反应体系

在 PCR 反应管中配制一次 PCR 反应体系:10 $\times$ PCR 缓冲液 5 μ L、dNTP 1 μ L、BLV1A 和 BLV6A

各 1 μL 、*Taq* 酶 0.5 μL 、DNA 提取物 5 μL 、水 36.5 μL ，总体积 50 μL 。反应体系中各试剂浓度可进一步优化，使用不同 PCR 扩增仪，可对参数作适当调整。

7.3.2 一次 PCR 反应条件

反应在 PCR 扩增仪中进行，首先 94℃ 变性 45 s，60℃ 退火 60 s，72℃ 延伸 90 s，进行 5 次循环，随后 94℃ 变性 45 s，55℃ 退火 60 s，72℃ 延伸 90 s，进行 30 次循环，经 72℃ 延伸 10 min 结束反应。

7.3.3 二次 PCR 反应体系

在 PCR 反应管中配制二次 PCR 反应体系：10×PCR 缓冲液 5 μL 、dNTP 1 μL 、BLV3 和 BLV5 各 1 μL 、*Taq* 酶 0.5 μL 、一次 PCR 扩增产物 5 μL 、水 36.5 μL ，总体积 50 μL 。

7.3.4 二次 PCR 反应条件

反应在 PCR 扩增仪中进行，首先 94℃ 变性 45 s，58℃ 退火 60 s，72℃ 延伸 90 s，进行 5 次循环，随后 94℃ 变性 45 s，55℃ 退火 60 s，72℃ 延伸 90 s，进行 30 次循环，经 72℃ 延伸 10 min 结束反应。

7.4 琼脂糖凝胶电泳

用 TBE 电泳缓冲液配制 2% 的琼脂糖(含 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EB)平板。将平板放入水平电泳槽，使电泳缓冲液淹没胶面。将 8 μL 二次 PCR 扩增产物和 2 μL 电泳缓冲液混匀后加入样品孔。在电泳时设立 DNA 分子量标准作对照。5 V/cm 电泳 0.5 h。紫外检测仪下观察电泳结果并记录。

8 结果判断

PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳，阳性对照检测出 341 bp 大小的条带，阴性和空白对照未出现条带。

样品扩增出 341 bp 大小的条带即可判断为阳性结果，必要时，取 PCR 产物扩增产物测序，与参考序列(参见附录 B)同源性在 95% 以上，可确证为阳性结果。如果条带大小不在 341 bp 位置或无条带即可判断为阴性结果。

附录 A

(资料性附录)

试剂配制

A.1 PBS 溶液(pH7.2)

氯化钠(NaCl)8.5 g,氯化钾(KCl)0.2 g,磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)2.85 g,磷酸二氢钾(KH_2PO_4)0.27 g,定容至1 000 mL双蒸水中,调 pH 至 7.2,灭菌备用。

A.2 红细胞裂解液

0.15 mol/L NH_4Cl -0.01 mol/L KHCO_3 -0.001 mol/L $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 。

A.3 5% Chelex-100 溶液

称取 5 g Chelex-100,定容至 100 mL 蒸馏水中,移取时,边搅拌边用灭菌的1 000 μL 吸头移取,必要时,可将灭菌吸头尖部用灭菌剪刀剪掉,以移取时可吸取胶珠且不流出为宜。

A.4 淋巴细胞分离液(聚蔗糖-泛影葡胺液,1.077 $\pm$ 0.001)

取 9%聚蔗糖(分子量 400 000)24 份与 33.9%泛影葡胺 10 份混匀,过滤除菌或 114.3 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min,分装于棕色瓶中,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,一般可保存 3 个月。

A.5 TE 缓冲液

10 mmol/L Tris-HCl,1 mmol/L EDTA,pH 8.0。

A.6 dNTP(dATP、dTTP、dCTP、dGTP)

将同样浓度的 dATP、dTTP、dCTP 和 dGTP 等体积混匀,制备成所需浓度的 dNTP,使用浓度为 10 mmol/L。

A.7 引物

配制成 15 $\mu\text{mol/L}$ 。引物序列分别为:

BLV1A:5'-CTTTGT GTG CCA AGT CTC CCA GAT ACA-3'

BLV6A:5'-CCA ACA TAT AGC ACA GTC TGG GAA GGC-3'

BLV3:5'-CTG TAA ATG GCT ATC CTA AGA TCT ACT GGC-3'

BLV5:5'-GAC AGA GGG AAC CCA GTC ACT GTT CAA CTG-3'

A.8 10 $\times$ PCR 缓冲液(含 MgCl_2)

100 mmol/L 氯化钾(KCl),160 mmol/L 硫酸铵 $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$,20 mmol/L 硫酸镁(MgSO_4),200 mmol/L Tris-HCl(pH8.8),1% TritonX-100,1 mg/mL BSA,25 mmol/L 氯化镁(MgCl_2)。

A.9 电泳缓冲液(5 $\times$ TBE)

Tris 54 g,硼酸 27.5 g,0.5 mol/L EDTA(pH8.0)20 mL,加蒸馏水至 1 000 mL。

A.10 10 $\times$ 加样缓冲液

0.25%溴酚蓝,40%蔗糖。

附 录 B
(资料性附录)
确证试验——PCR 产物测序

PCR 扩增的 gp51 基因参考序列:

CTTTCTGTGCCAAGTCTCCCAGATACACCTTGGACTCTGTAAATGGCTATCCTAAGATCTA
CTGGCCCCCCCCACAAGGGCGGCGCCGTTTGGAGCCAGGGCCATGGTCACATATGATTGC
GAGCCCCGATGCCCTTATGTGGGGGCAGATCGGTTGCGACTGCCCCCACTGGGACAATGCCT
CCCAGGCTGATCAAGGATCCTTTTATGTCAATCATCAGATTTTATTCCTGCATCTCAAAC
AATGTCATGGAATTTTCACTCTAACCTGGGAGATATGGGGATATGATCCCCTGATCACCT
TTTCTTTACATAAGATCCCTGATCCCCCTCAACCCGACTTTCCCCAGTTGAACAGTGACTG
GGTTCCCTCTGTCTCAGATCATGGGCCCTGCTTTTAAATCAAACAGCACGGGCCCTCCCAGAC
TGTGCTATATGTTGG

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
牛地方流行性白血病
聚合酶链反应操作规程
SN/T 1917—2007

*

中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 12 千字
2007 年 9 月第一版 2007 年 9 月第一次印刷
印数 1—2 000

*

书号: 155066 · 2-18060 定价 8.00 元



SN/T 1917-2007