



中华人民共和国国家标准

GB/T 14926.21—2008
代替 GB/T 14926.21—2001

实验动物 兔出血症病毒检测方法

Laboratory animal—Method for examination of Rabbit
hemorrhagic disease virus (RHDV)

2008-12-10 发布

2009-03-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

GB/T 14926《实验动物》共 54 个部分,为不同微生物和病毒检测技术方法。

本部分自实施之日起代替 GB/T 14926.21—2001《实验动物 兔出血症病毒检测方法》。

本部分与 GB/T 14926.21—2001 相比主要技术差异如下:

- a) 增加兔出血症病毒核酸(RHDV)核酸检测方法;
- b) 确定兔免疫接种 RHDV 疫苗后的血清抗体合格判定标准。

本部分由全国实验动物标准化委员会提出并归口。

本部分起草单位:全国实验动物标准化技术委员会。

本部分主要起草人:贺争鸣、付瑞、田克恭。

本部分所代替标准的历次版本发布情况为:

——GB/T 14926.21—1994,GB/T 14926.21—2001。

实验动物 兔出血症病毒检测方法

1 范围

GB/T 14926 的本部分规定了兔出血症病毒(RHDV)的检测方法。
本部分适用于兔 RHDV 抗原、抗体和病毒核酸的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过 GB/T 14926 的本部分的引用而成为本部分的条款。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部分,然而,鼓励根据本部分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部分。

GB/T 14926.53 实验动物 血凝试验

GB/T 14926.54 实验动物 血凝抑制试验

3 原理

血凝试验(HA):在一定条件下,RHDV 能凝集人“O”型红细胞,产生可见的凝集反应。根据这一特性检测兔肝组织中有无 RHDV 抗原。

血凝抑制试验(HAI):在一定条件下,RHDV 凝集人“O”型红细胞的能力可被特异性抗体所抑制。根据这一特性检测兔血清中有无 RHDV 抗体。

核酸检测:根据 RHDV VP60 基因序列保守的特点,设计特异引物,扩增目的片段,检测兔组织中的 RHDV 核酸。

4 主要试剂与器材

4.1 试剂

4.1.1 血凝素

人工感染或自然发病的兔肝组织,经研磨制成 10% 悬液,3 000 r/min 离心 10 min 而获得的上清液。

4.1.2 阳性血清

RHDV 抗原免疫或 RHDV 自然感染恢复后的兔血清。

4.1.3 阴性血清

无 RHDV 感染、未经免疫的兔血清。

4.1.4 人“O”型红细胞。

4.1.5 缓冲液与溶液

4.1.5.1 PBS(pH7.4)

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2.83 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
去离子水	1 000 mL

4.1.5.2 TRIzol Reagent。

4.1.5.3 50×TAE Buffer(pH8.5)

Tris	242 g
醋酸	57.1 mL
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.2 g
去离子水	1 000 mL

4.1.5.4 溴乙锭(10 mg/mL)。

4.1.5.5 6×Loding Buffer。

4.1.5.6 氨苄青霉素(100 mg/mL)。

4.1.5.7 三氯甲烷(分析纯)。

4.1.5.8 乙醇(分析纯)。

4.1.5.9 异丙醇(分析纯)。

4.1.6 酶与缓冲液

4.1.6.1 5×AMV RT Buffer ,AMV RTase(10 U/μL)。

4.1.6.2 RNase inhibitor(40 U/μL)。

4.1.6.3 DEPC-H₂O。

4.1.6.4 随机引物 9mers(500 μg/mL)。

4.1.6.5 dNTP mixture(2.5 mmol/L each)。

4.1.6.6 MgCl₂(25 mmol/L),10×PCR Buffer, *Taq* DNA polymerase(5 U/μL)。

4.1.7 培养基

4.1.7.1 LB培养基

tryptone	10 g
yeast extract	5 g
NaCl	10 g
去离子水	1 000 mL

4.1.7.2 LB/Amp

tryptone	10 g
yeast extract	5 g
NaCl	10 g
ampicillin	100 μg/mL
去离子水	1 000 mL

4.1.8 琼脂糖凝胶 Agarose L03。

4.1.9 感受态细胞与载体

4.1.9.1 适用于所构建克隆载体的大肠杆菌感受态细胞。

4.1.9.2 DNA 片段琼脂糖凝胶纯化试剂盒。

4.1.9.3 可用于连接 PCR 产物的商品化 T 载体。

4.1.9.4 质粒小量提取试剂盒。

4.2 器材

4.2.1 微量振荡器。

4.2.2 微量血凝反应板(U 型或 V 型)。

4.2.3 微量加样器(容量 0.5 μL~10 μL,10 μL~100 μL,20 μL~200 μL,100 μL~1 000 μL)。

4.2.4 生物安全柜。

4.2.5 冷冻离心机。

4.2.6 紫外分光光度仪。

- 4.2.7 PCR 仪。
 4.2.8 电泳仪。
 4.2.9 紫外透射仪。
 4.2.10 恒温培养箱。
 4.2.11 恒温摇床。
 4.2.12 恒温水浴箱。
 4.2.13 超纯水系统。
 4.2.14 冰箱。

5 操作步骤

- 5.1 采用 HA 方法(见 GB/T 14926.53)进行病毒抗原检测。
 5.2 采用 HAI 方法(见 GB/T 14926.54)进行病毒抗体检测。
 5.3 病毒核酸检测

5.3.1 引物设计

根据 RHDV FDR 株序列(GenBank 登录号:NC_001543),针对 VP60 基因区段设计引物。引物在 RHDV 基因组中的位置、核苷酸组成及预期扩增目的基因长度见表 1。

表 1 RT-PCR 引物

引物	位置	序列	产物大小
正向引物 P1	nt 6254- nt 6271	5'-ATGCCAATGCTGGGTCTG-3'	368bp
反向引物 P2	nt 6621- nt 6602	5'-TTGAGGCGTGTATGTGATGG-3'	—

5.3.2 RNA 提取

- 5.3.2.1 在生物安全柜内,取 RHDV 感染的兔肝组织 50 mg~100 mg,置于灭菌玻璃研磨器中,加 1 mL 灭菌 PBS(pH 7.4)充分研磨。
 5.3.2.2 将肝组织匀浆转移至 1.5 mL 洁净离心管中,加入 1 mL TRIzol Reagent,混匀,室温放置 10 min。
 5.3.2.3 加 0.2 mL 三氯甲烷,充分混匀 10 s,室温放置 10 min,4 °C 12 000 r/min 离心 15 min。
 5.3.2.4 取上清,加等体积异丙醇,室温 20 min,4 °C 12 000 r/min 离心 15 min。
 5.3.2.5 弃上清,沉淀以 1 mL 75%乙醇(现用现配)洗涤后,室温干燥至 RNA 呈透明膜状。
 5.3.2.6 加 40 μL DEPC-H₂O 溶解 RNA(沉淀),紫外分光光度仪测定所提取的 RNA,立即进行反转录(RT)或-70°C 保存。

警告:DEPC 对眼睛和气道粘膜有强刺激,在操作中应在通风条件下进行,使用时戴口罩,不小心沾到手上应立即冲洗。

5.3.3 反转录(RT)

- 5.3.3.1 RT 反应体系为 25 μL,依次加入如下成分:5 μL 5×AMV RT Buffer,5 μL dNTP mixture (2.5 mmol/L each),1 μL 随机引物(500 μg/mL),0.5 μL RNase inhibitor(40 U/μL),12.5 μL RNA 模版,1 μL AMV RTase(10 U/μL)。
 5.3.3.2 反转录反应条件为:37 °C 90 min,95 °C 5 min,所得 cDNA 可用作 PCR 反应模板。
 5.3.3.3 每次进行 RT 时均设标准阳性、阴性及空白对照。

5.3.4 RT-PCR

- 5.3.4.1 PCR 反应体系为 50 μL,依次加入如下成分:5 μL 10×PCR Buffer,2 μL MgCl₂ (25 mmol/L),2 μL dNTP mixture,1 μL 正向引物 P1(50 pmol/L),1 μL 反向引物 P2(50 pmol/L),2 μL cDNA,0.5 μL Taq DNA polymerase(5 U/μL),36.5 μL ddH₂O。

5.3.4.2 PCR 反应参数为:95 °C 预变性 5 min;94 °C 1 min,59 °C 1 min,72 °C 1 min,共 30 次循环;最后一次循环后 72 °C 再延伸 10 min。

5.3.4.3 每次进行 RT-PCR 时均设标准阳性、阴性及空白对照。

5.3.5 琼脂糖凝胶电泳

5.3.5.1 配制 2% 琼脂糖凝胶(含 0.5 μg / mL 溴化乙锭)。

5.3.5.2 取 PCR 扩增产物 8 μL,分别与 2 μL 的 6× 载样缓冲液混匀,加到凝胶孔格中。

5.3.5.3 电泳缓冲液为 1× TAE 缓冲液,电泳条件为 100 V 恒压电泳 30 min~60 min,紫外透射仪下观察结果。

5.3.6 RHDV 基因的克隆、鉴定及序列测定

5.3.6.1 RHDV RT-PCR 和 RT-nested PCR 产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳后,用洁净锋利的手术刀切下目的条带,用 Wizard PCR Preps DNA Purification System 回收纯化,取 1 μL 电泳检测。

5.3.6.2 10 μL 的连接反应体系中依次加入下列成分:5 μL 2× Rapid Ligation Buffer,pGEM-T Easy Vector 1 μL,回收纯化的 PCR 目的片段 3 μL,1 μL T4 DNA Ligase。连接反应条件为:室温 1 h,4 °C 12 h。

5.3.6.3 取 5 μL 连接产物转化 *E. coli* DH 5α 感受态细胞,然后将转化的菌液均匀涂布于含氨苄青霉素(100 μg/mL)的 LB 平板上,37 °C 培养过夜。挑取光滑、圆整的白色菌落,接种于含氨苄青霉素(100 μg/mL)的 LB 液体培养基,37 °C 200 r / min 振荡培养 6 h,然后用质粒小量提取试剂盒制备质粒 DNA 供限制性酶切分析,并进行 PCR 鉴定。

5.3.6.4 将筛选到的阳性克隆分别送检测单位,以 T7 和 SP6 通用引物,用 ABI 测序仪进行序列测定。测序结果经计算机软件分析与 GenBank 中相关序列进行同源性比较。

6 结果判定

6.1 HA

经研磨制成 10% 的兔肝上清液,HA 滴度小于等于 1 : 16 判为阴性。对阳性(HA 滴度大于 1 : 16)检测结果,选用同一种方法重试,如仍为阳性则判为阳性。

6.2 HAI

6.2.1 基础级兔:如接种疫苗,HAI 抗体效价大于 1 : 10,同时免疫抗体合格率[(被检动物抗体阳性数/被检动物总数)×100%]大于等于 70% 判定该兔群免疫合格。

6.2.2 清洁级兔、SPF 兔:HAI 抗体效价小于等于 1 : 10 判为阴性;对阳性(HAI 抗体效价大于 1 : 10)检测结果,选用同一种方法重试,如为阳性则判为阳性。

6.3 RT-PCR

每个样本均进行两次试验检测,以标准 Marker 及阳性对照为基准,在 368 bp 处见到电泳条带并测序结果正确者为阳性。

7 结果报告

根据判定结果,作出报告。
