

ICS 11.220
B 41



中华人民共和国国家标准

GB/T 27532—2011

GB/T 27532—2011

犬瘟热诊断技术

Diagnostic techniques for canine distemper

中华人民共和国
国家标准
犬瘟热诊断技术
GB/T 27532—2011

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100013)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
网址 www.spc.net.cn
总编室:(010)64275323 发行中心:(010)51780235
读者服务部:(010)68523946
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 15 千字
2012年1月第一版 2012年1月第一次印刷

*

书号: 155066·1-44041 定价 16.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107



GB/T 27532-2011

2011-11-21 发布

2012-03-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

A.8 DEPC 溶液(0.1%)

DEPC	1 mL
蒸馏水	加至 1 000 mL

磁力搅拌至溶解,高压灭菌 121 °C,30 min 后 4 °C 冰箱保存备用。

A.9 生理盐水

称取 9 g 无水氯化钠溶于 1 000 mL 去离子水中配成 0.9% 生理盐水,121.3 °C 灭菌 15 min。

A.10 5×TBE 电泳缓冲液

每升三蒸水中加入三羟甲基氨基甲烷(Tris)54.0 g,乙二胺四乙酸(EDTA)2.9 mg,硼酸 27.5 g,用 5 mol/L 的盐酸调 pH 值至 8.0。

A.11 EB 核酸染色剂

在 10 mL 三蒸水中加入 100 mg 溴化乙锭(EB)配制成 10 mg/mL 的浓缩液。

A.12 加样缓冲液(6×)

每 100 mL 三蒸水中加入溴酚蓝 0.25 g 和蔗糖 40 g。

前 言

本标准的附录 A 和附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:青岛农业大学动物科技学院、中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中华人民共和国山东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:单虎、黄娟、熊炜、温建新、秦晓冰、朱来华、宫文妮、袁小远、孙圆圆、马晶。

7.3 结果判定

7.3.1 被检组织与阴性血清作用后应无着染,若出现黄色或棕褐色着染,判定阴性对照不成立,应重复实验。

7.3.2 在符合 7.3.1 的条件下,被检组织与 CDV 阳性血清作用后本底清晰,细胞浆内呈现黄色或棕褐色着染,判为 CDV 阳性,相应动物犬瘟热感染阳性。

8 RT-PCR 检测

8.1 病料的采集及处理

采集的样品包括犬的泪液、鼻液、唾液、粪便及病死犬的肝、脾、肺等组织器官。将待检组织或粪便样品加等体积生理盐水研磨匀浆,3 000g 离心 15 min,收集上清液待检。口腔拭子、粪拭子用少量生理盐水浸润后,取上清液待检。经细胞病原分离培养的样品,收集细胞沉淀待检。CDV 阳性对照样品和阴性对照样品的同样处理。

8.2 RNA 抽提

分别取 100 μ L 待检样品、CDV 阳性样品和阴性样品的上清液各装入 1.5 mL 无 RNA 酶的 Eppendorf 管,加入 1 mL Trizol 试剂,用枪头充分吹打 20 次~30 次;13 000g 离心 15 min;取上层水相,加 500 μ L 异丙醇,颠倒数次混匀,-20 $^{\circ}$ C 放置 20 min;13 000g 离心 10 min;弃上清,沉淀用 1 mL DEPC 水配制的 75%乙醇清洗;8 000g 离心 10 min;弃上清,沉淀室温干燥 10 min;加 20 μ L DEPC 水溶解 RNA 沉淀。RNA 溶液在 2 h 内进行逆转录合成 cDNA 模板。另外,RNA 抽提也可采用市售的商品化 RNA 抽提试剂盒进行。

8.3 cDNA 模板制备

取 17 μ L RNA 溶液,加 10 倍逆转录酶浓缩缓冲液 2.5 μ L、dNTP 1.5 μ L、随机引物 2 μ L、RNA 酶抑制剂 1 μ L、逆转录酶 1 μ L,室温放置 10 min 后,置 PCR 仪上经 42 $^{\circ}$ C、60 min,70 $^{\circ}$ C、10 min。

8.4 PCR 检测

在 0.2 mL PCR 薄壁管中,按每个样品 10 倍 Taq 酶浓缩缓冲液 2.5 μ L、dNTP 0.5 μ L、Taq 酶 0.5 μ L、cDNA 模板 2 μ L、上游引物和下游引物(CDVF、CDVR)各 0.5 μ L、三蒸水 18.5 μ L,配制 PCR 检测体系。将 PCR 管置 PCR 仪上按如下程序扩增:首先 94 $^{\circ}$ C 变性 2 min;再 94 $^{\circ}$ C、30 s,55 $^{\circ}$ C、30 s,72 $^{\circ}$ C、40 s 进行 35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C、3 min。用 TBE 电泳缓冲液配制 1.5%的琼脂糖平板(含 0.5 μ g/mL EB,参见附录 A 中 A.11,将平板放入水平电泳仪,使电泳缓冲液刚好没过胶面,将 10 μ L PCR 产物和 2 μ L 加样缓冲液(6 \times)混匀后加入样品孔。在电泳时设立 DNA 标准分子量作对照。5 V/cm 电泳约 30 min,当溴酚蓝到达底部时停止,用凝胶成像系统观察结果。

8.5 结果判定

8.5.1 经 RT-PCR 检测,CDV 阳性对照样品可扩增出大小为 455 bp 的核酸片段,且阴性对照样品无扩增条带,否则试验结果视为无效。

8.5.2 在符合 8.5.1 的条件下,若待检样品扩增出了大小为 455 bp 的核酸片段,则初步判定犬瘟热病毒核酸阳性;若待检样品无扩增条带或扩增条带大小不为 455 bp,则判定犬瘟热病毒核酸阴性。

8.5.3 待检样品扩增出的阳性基因片段应进行核酸序列测定,若其序列与提供的比对序列的同源性 $\geq 90\%$,则可确诊为犬瘟热病毒核酸阳性,否则判定犬瘟热病毒核酸阴性。

8.5.4 若犬瘟热病毒核酸阳性且病原分离也呈阳性,则可判定犬瘟热病毒感染阳性。

犬瘟热诊断技术

1 范围

本标准规定了犬瘟热的临床诊断、犬瘟热病毒的病原分离、免疫酶检测、免疫组织化学检测、RT-PCR 检测的操作方法。

本标准适用于犬瘟热的鉴定及其流行病学调查、诊断和监测。其中病毒分离、免疫酶检测、免疫组织化学检测、RT-PCR 检测适用于犬瘟热的病原诊断。

2 试剂和材料

- 2.1 改良最低要素营养液(DMEM)培养基:配方参见附录 A。
- 2.2 非洲绿猴肾细胞(Vero 细胞)。
- 2.3 磷酸盐缓冲液(PBS):配制参见附录 A。
- 2.4 青霉素、链霉素:配方参见附录 A。
- 2.5 CDV 阳性血清:中和抗体效价 1:1 024。
- 2.6 CDV 阴性血清:无 CDV 感染的犬血清。
- 2.7 酶结合物:HRP 标记的葡萄球菌 A 蛋白(SPA)。
- 2.8 底物溶液:配制参见附录 A。
- 2.9 过氧化氢甲醇溶液:配制参见附录 A。
- 2.10 盐酸酒精溶液:配制参见附录 A。
- 2.11 胰蛋白酶溶液:配制参见附录 A。
- 2.12 Taq 酶及 10 倍 Taq 酶反应缓冲液:Taq 酶浓度为 5 U/ μ L,-20 $^{\circ}$ C 保存。
- 2.13 逆转录酶及 10 倍逆转录酶反应缓冲液:逆转录酶浓度为 50 U/ μ L,-20 $^{\circ}$ C 保存。
- 2.14 RNA 酶抑制剂(40 U/ μ L):-20 $^{\circ}$ C 保存。
- 2.15 dNTP:含 dATP、dGTP、dCTP、dTTP 各 10 mmol/L,-20 $^{\circ}$ C 保存。
- 2.16 引物:浓度为 20 μ mol/L,其序列如下:
上游引物(CDVF):5' CGA GTC TTT GAG ATA GGG TT 3';
下游引物(CDVR):5' CCT CCA AAG GGT TCC CAT GA 3'。
- 2.17 随机引物:含有 9 个碱基的随机序列引物,浓度为 50 μ mol/L,-20 $^{\circ}$ C 保存。
- 2.18 DEPC 水:自配(参见附录 A),或购买商品化 DEPC 水。
- 2.19 Trizol 试剂:4 $^{\circ}$ C 保存。
- 2.20 异丙醇:使用前预冷至-20 $^{\circ}$ C。
- 2.21 75%乙醇:用新开启的无水乙醇和 DEPC 水配制,使用前预冷至-20 $^{\circ}$ C。
- 2.22 1.5 mL 无 RNA 酶的 Eppendorf 管。
- 2.23 0.2 mL 无 RNA 酶的 PCR 薄壁管。

3 器材和设备

- 3.1 细胞培养瓶(中号瓶)。
- 3.2 二氧化碳培养箱。
- 3.3 恒温水浴箱(5 $^{\circ}$ C~100 $^{\circ}$ C)。
- 3.4 普通光学显微镜。