

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4055—2014
代替 SN/T 1635—2005

贝类中诺如病毒检测方法 普通 RT-PCR 方法和实 时荧光 RT-PCR 方法

Detection method of norovirus in shellfish—
Conventional RT-PCR and real-time RT-PCR

2014-11-19 发布

2015-05-01 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

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 SN/T 1635—2005《贝类中诺沃克病毒检测方法 普通 RT-PCR 方法和实时荧光 RT-PCR 方法》。

本标准与 SN/T 1635—2005 相比,主要技术变化如下:

——修改了标准的中文名称;

——修改了病毒名称,即由诺沃克病毒修改为诺如病毒。

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:中华人民共和国广西出入境检验检疫局、中华人民共和国上海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:刘军义、潘良文、李想、吕蓉、韦梅良、陈立军、罗兆飞。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

——SN/T 1635—2005。

贝类中诺如病毒检测方法

普通 RT-PCR 方法和实时荧光 RT-PCR 方法

1 范围

本标准规定了贝类中诺如病毒普通 RT-PCR 和实时荧光 RT-PCR 检测方法。
本标准适用于贝类中诺如病毒的检测。

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 19495.2 转基因产品检测 实验室技术要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

实时荧光 RT-PCR **real-time fluorescence RT-PCR**

实时荧光 RT-PCR 方法是在常规 RT-PCR 的基础上,加入了一条特异性的荧光探针。该探针为一寡核苷酸,两端分别标记一个报告基团和一个淬灭荧光基团。探针完整时,报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收;PCR 扩增时,*Taq* 酶的 5'-3' 外切酶活性将探针酶切降解,使报告基团和淬灭荧光基团分离,从而荧光监测系统可接收到荧光信号,即每扩增一条 DNA 链,就有一个荧光分子形成,实现了荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步。

3.2

Ct 值 **cycle threshold**

每个反应管内的荧光信号达到设定的域值时所经历的循环数。

4 试剂

所有实验用试剂均为分析纯;除特别说明外,实验用水为蒸馏水或去离子水。

- 4.1 诺如病毒阳性标本:由国家质量监督检验检疫总局指定单位提供。-80℃低温冰箱保存。
- 4.2 甘氨酸缓冲液:见 A.1.1。
- 4.3 PEG 8000 溶液:见 A.1.2。
- 4.4 50×TAE 缓冲液:见 A.1.3。
- 4.5 溴化乙锭溶液(10 μg/μL):见 A.1.4。
- 4.6 含 0.5 μg/mL 溴化乙锭的 1.5%琼脂糖凝胶:见 A.1.5。
- 4.7 10×加样缓冲液:见 A.1.6。

- 4.8 裂解液: Tri-reagent(Sigma 公司, Cat. No. T-9424)或其他等效裂解液。
- 4.9 Poly(dT)磁珠: Dynabeads-oligo(dT)₂₅ (Cat. No. 61005, Dynal Biotech Inc., Oslo, Norway)或等效品。
- 4.10 无 RNase 超纯水: 见 A.2.3。
- 4.11 75%乙醇: 见 A.2.4。
- 4.12 异丙醇: 未开封的新品。
- 4.13 1×RNA 吸附缓冲液: 见 A.2.5。
- 4.14 2×RNA 吸附缓冲液: 见 A.2.6。
- 4.15 洗液: 见 A.2.7。
- 4.16 RNase 抑制剂。
- 4.17 逆转录酶 AMV。
- 4.18 DNA 聚合酶。
- 4.19 dNTPs: 含 dATP、dUTP、dCTP、dGTP 各 10 mmol/L。
- 4.20 引物和探针: 根据表 1 和表 2 的序列进行合成引物和探针, 加无 RNase 超纯水配制成 50 μmol/L 储存液。

表 1 普通 RT-PCR 检测的引物

检测的病毒类群	引物	扩增片断大小/bp
GI 和 GII	正义引物 JV12: 5'-ATACCACTATGATGCAGATTA-3' 反义引物 JV13: 5'-TCATCATCACCATAGAAAGAG-3'	327

表 2 实时荧光 RT-PCR 检测的引物和探针

检测的病毒类群	引物和探针序列	扩增片断大小/bp
GI	正义引物 COG1F: 5'-CGYTGGATGCGNTTYCATGA-3' 反义引物 COG1R: 5'-CTTAGACGCCATCATCATTYAC-3' 探针 RING1(a)-TP: 5'-FAM-AGATYGCGATCYCCTGTCCA-TAMRA-3' 探针 RING1(b)-TP: 5'-FAM-AGATCGCGGTCTCCTGTCCA-TAMRA-3'	107
II	正义引物 COG2F: 5'-CARGARBCNATGTTYGRTGGATGAG-3' 反义引物 COG2R: 5'-TCGACGCCATCTTCATTCACA-3' 探针 RING2-TP: 5'-FAM-TGGGAGGGCGATCGCAATCT-TAMRA-3'	119
注: 引物 COG1F、COG1R、COG2F, 探针 RING1(a)-TP 为简并引物, 序列中 Y 代表 C 或 T, R 代表 A 或 G, B 代表 A 以外的其他 3 种碱基任何一个, N 代表四种碱基中的任何一个。		

- 4.21 DNA 分子量标记: 100 bp~2 000 bp。

5 仪器与器材

- 5.1 实时荧光 PCR 仪。
- 5.2 PCR 仪。
- 5.3 电泳仪。
- 5.4 凝胶分析成像系统。

- 5.5 冷冻离心机。
- 5.6 匀浆器。
- 5.7 水浴锅。
- 5.8 微量可调移液器。
- 5.9 高压灭菌锅。
- 5.10 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱。
- 5.11 50 mL 离心管。
- 5.12 无 RNase 玻璃容器:见 A. 2. 1。
- 5.13 无 RNase 离心管(1.5 mL, 15 mL)、无 RNase 移液器吸嘴(20 μL , 200 μL , 1 000 μL)、无 RNase 药匙、无 RNase PCR 薄壁管:见 A. 2. 2。
- 5.14 1.5 mL 磁性抽提架。

6 检测方法

6.1 实验室设施要求

实验室设施应达到 GB/T 19495.2 中相关实验室技术要求。

6.2 方法提要

用 Tri-reagent 或其他等效裂解液提取病毒 RNA,并根据诺如病毒 RNA 3'末端含有一个 Poly(A) 的结构,用含有 Poly(dT)的磁珠吸附诺如病毒 RNA 进行进一步纯化。利用普通 RT-PCR 和实时荧光 RT-PCR 进行检测,对可疑的 PCR 产物进行测序分析确证。

6.3 检测步骤

6.3.1 病毒的富集

6.3.1.1 解剖取下贝类的中肠腺组织。

6.3.1.2 取 5 g 中肠腺组织加入 35 mL 甘氨酸缓冲液(pH 9.5)。

6.3.1.3 匀浆器高速匀浆 3 min,将匀浆液装入 50 mL 离心管,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min 或室温下振荡 30 min,4 $^{\circ}\text{C}$,10 000 g 离心 30 min。

6.3.1.4 移取上清至一 50 mL 新管,加入等体积的 PEG 8000 溶液,颠倒 5 次混匀。冰上放置至少 1 h,4 $^{\circ}\text{C}$,10 000 g 离心 5 min,弃去上清,保留沉淀。

6.3.2 病毒 RNA 的提取和纯化

6.3.2.1 为防止 RNA 降解,所用实验用具及溶液应无 RNA 酶,操作过程中应自始至终佩戴抛弃式橡胶或乳胶手套,并经常更换,以避免将皮肤表面的 RNA 酶污染用具或带入溶液。

6.3.2.2 在 6.3.1.4 的沉淀中加入 5 mL Tri-reagent 或其他等效裂解液,剧烈振荡 30 s,室温放置 5 min。

6.3.2.3 转移溶液入一 15 mL 无 RNA 酶离心管,加入 1.2 mL 三氯甲烷,剧烈振荡 30 s,室温放置 5 min,4 $^{\circ}\text{C}$,12 000 g 离心 5 min,吸取上清至另一 15 mL 无 RNA 酶离心管。

6.3.2.4 在上清液中加入 0.5 倍体积(约 2.5 mL)的异丙醇,室温放置 5 min,4 $^{\circ}\text{C}$,5 000 g 离心 5 min。

6.3.2.5 弃去上清,用 5 mL,4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 75%乙醇洗涤沉淀。

6.3.2.6 沉淀重悬于 300 μL 无 RNase 的水中,将悬液转移至一 1.5 mL 无 RNase 的离心管中。

6.3.2.7 加入 400 μL 1 \times RNA 吸附缓冲液,振荡 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 放置 3 min。

6.3.2.8 加入 100 μL Dynabeads-oligo(dT)₂₅, 轻柔混合, 磁性抽提架上放置 1 min。

6.3.2.9 弃去上清, 加入 500 μL 2 \times RNA 吸附缓冲液, 室温下晃动 5 min 洗涤。

6.3.2.10 离心管在磁性抽提架上放置 1 min, 弃去上清。加入 500 μL 洗液, 颠倒 5 次混匀, 离心管在磁性抽提架上放置 1 min, 弃去洗液。重复洗涤 3 次。

6.3.2.11 沉淀用 100 μL 无 RNase 水悬浮, 90 $^{\circ}\text{C}$ 放置 2 min 释放 RNA。磁性抽提架上放置 1 min, 取上清液。将上清移至另一 1.5 mL 无 RNase 的离心管中, 加入 20 U RNase 抑制剂, 即时进行 RT-PCR 检测。

6.3.2.12 也可使用商品化的 RNA 提取试剂盒提取和纯化病毒 RNA。

6.3.3 普通 RT-PCR 检测

6.3.3.1 普通 RT-PCR 反应体系

检测贝类中诺如病毒的一步法普通 RT-PCR 反应体系见表 3。每个反应体系设置两个平行反应。反应体系中各试剂的量可根据具体情况或不同的反应总体积进行适当调整。也可采用 RT-PCR 两步法试剂盒。以诺如病毒 RNA 作为阳性对照, 以不含有诺如病毒的贝类 RNA 作为阴性对照, 以水代替模板作为空白对照。

表 3 普通 RT-PCR 反应体系

名称	贮液浓度	终浓度	加样量/ μL
RT-PCR 缓冲液	5 \times	1 \times	10
MgSO ₄	25 mmol/L	1 mmol/L	2
dNTPs	10 mmol/L	0.2 mmol/L	1
正义引物	50 $\mu\text{mol/L}$	1 $\mu\text{mol/L}$	1
反义引物	50 $\mu\text{mol/L}$	1 $\mu\text{mol/L}$	1
逆转录酶	5 U/ μL	0.1 U/ μL	1
DNA 聚合酶	5 U/ μL	0.1 U/ μL	1
模板	—	—	10
水(无 RNase)	—	—	23
总体积	—	—	50

6.3.3.2 普通 RT-PCR 反应参数

普通 RT-PCR 的反应参数: 42 $^{\circ}\text{C}$, 60 min; 94 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; 94 $^{\circ}\text{C}$, 1 min, 37 $^{\circ}\text{C}$, 90 s, 74 $^{\circ}\text{C}$, 1 min, 40 个循环; 74 $^{\circ}\text{C}$, 7 min。

6.3.3.3 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳检测

将适量 50 \times TAE 稀释成 1 \times TAE 溶液, 配制溴化乙锭含量为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 1.5% 琼脂糖凝胶。取 15 μL PCR 产物, 加 1.5 μL 上样缓冲液点样进行电泳, 并加 DNA 分子量标记点样以判断 PCR 产物的片段大小。电压大小根据电泳槽长度来确定, 一般控制在 3 V/cm~5 V/cm, 当溴酚蓝移动到凝胶边缘时关闭电源, 电泳检测结果用凝胶分析成像系统记录。

6.3.4 实时荧光 RT-PCR

6.3.4.1 实时荧光 RT-PCR 反应体系

检测贝类中诺如病毒的一步法实时荧光 RT-PCR 反应体系见表 4。每个反应体系设置两个平行反应。反应体系中各试剂的量可根据具体情况或不同的反应总体积进行适当调整。也可采用 RT-PCR 两步法试剂盒。以诺如病毒 RNA 作为阳性对照,以不含有诺如病毒的贝类 RNA 作为阴性对照,以水代替模板作为空白对照。

表 4 实时荧光 RT-PCR 反应体系

名称	贮液浓度	终浓度	加样量/ μL	
			G I 型病毒	G II 病毒
RT-PCR 缓冲液	5 \times	1 \times	10	10
MgSO ₄	25 mmol/L	1 mmol/L	2	2
dNTPs	10 mmol/L	0.2 mmol/L	1	1
正义引物	50 $\mu\text{mol/L}$	1 $\mu\text{mol/L}$	1	1
反义引物	50 $\mu\text{mol/L}$	1 $\mu\text{mol/L}$	1	1
逆转录酶	5 U/ μL	0.1 U/ μL	1	1
DNA 聚合酶	5 U/ μL	0.1 U/ μL	1	1
探针	5 $\mu\text{mol/L}$	0.1 $\mu\text{mol/L}$	探针 a:3 探针 b:1	1
模板	—	—	10	10
水(无 RNase)	—	—	19	22
总体积	—	—	50	50

6.3.4.2 实时荧光 RT-PCR 反应参数

实时荧光 RT-PCR 的反应参数为:48 $^{\circ}\text{C}$,45 min;50 $^{\circ}\text{C}$,2 min;95 $^{\circ}\text{C}$,10 min;95 $^{\circ}\text{C}$,15 s,56 $^{\circ}\text{C}$,1 min,45 个循环。

注:反应参数可根据所使用的实时荧光 PCR 仪的要求作适当调整。

7 结果判断及表述

7.1 结果判断

7.1.1 普通 RT-PCR

对样品进行 RT-PCR 检测,如果阴性对照和空白对照未出现条带,阳性对照出现预期大小的扩增条带(327 bp),而样品未出现预期大小的扩增条带,则可判断样品诺如病毒阴性。如果阴性对照和空白对照未出现条带,阳性对照和样品出现预期大小的扩增条带(327 bp),则对样品 RT-PCR 产物进行序列分析、并与 GenBank 上序列进行比对,若待测样品的序列与 GenBank 诺如病毒的 cDNA 序列一致,则可判断样品诺如病毒阳性,否则可判断样品诺如病毒阴性。

7.1.2 实时荧光 RT-PCR

7.1.2.1 阴性对照、空白对照检测结果应为 $Ct \geq 45$ ，无扩增曲线，阳性对照检测结果应为 $Ct \leq 30$ 并出现典型扩增曲线。

7.1.2.2 检测样品的 Ct 值大于或等于 45 时，判断诺如病毒阴性。

7.1.2.3 检测样品的 Ct 值小于或等于 30 并出现典型扩增曲线时，判断诺如病毒阳性。

7.1.2.4 检测样品的 Ct 值小于 45 而大于 30 并出现典型扩增曲线时，应重新进行测试，如果重新测试的 Ct 值大于或等于 45 时，则判断诺如病毒阴性；如果重新测试的 Ct 值小于 45，则判断诺如病毒阳性。

7.2 结果表述

7.2.1 诺如病毒阳性。

7.2.2 诺如病毒阴性。

附 录 A
(规范性附录)
溶液的配制

A.1 普通溶液的配制

A.1.1 甘氨酸缓冲液:含 0.1 mol/L 甘氨酸,0.3 mol/L NaCl,pH 9.5

甘氨酸	7.5 g
NaCl	17.5 g
双蒸水	800 mL
5 mol/L 氢氧化钠溶液	调 pH 至 9.5
加双蒸水至 1 000 mL,121 °C,15 min 灭菌备用。	

A.1.2 PEG 8000 溶液:含 16%(质量体积比)PEG 8000 0.525 mol/L NaCl

PEG 8000	16 g
NaCl	3.07 g
加双蒸水至 100 mL,121 °C,15 min 灭菌备用。	

A.1.3 50×TAE 缓冲液

A.1.3.1 0.5 mol/L EDTA-Na₂(二水乙二铵四乙酸二钠)溶液,pH 8.0

EDTA-Na ₂ ·2H ₂ O	186.1 g
灭菌双蒸水	800 mL
5 mol/L 氢氧化钠溶液	调 pH 至 8.0
灭菌双蒸水加至 1 000 mL,121 °C,15 min 灭菌备用。	

A.1.3.2 TAE 电泳缓冲液(50×)配制

羟基甲基氨基甲烷(Tris)	242 g
冰乙酸	57.1 mL
0.5 mol/L EDTA 溶液,pH 8.0	100 mL
灭菌双蒸水加至 1 000 mL,121 °C,15 min 灭菌备用。	
用时用灭菌双蒸水稀释至 1×使用。	

A.1.4 溴化乙锭(EB)溶液(10 μg/μL)

溴化乙锭	20 mg
灭菌双蒸水	20 mL

A.1.5 含 0.5 μg/mL 溴化乙锭的 1.5%琼脂糖凝胶的配制

琼脂糖	1.5 g
1×TAE 电泳缓冲液	加至 100 mL

混合后加热至完全融化,待冷至 50 ℃~55 ℃时,加溴化乙锭(EB)溶液 5 μL,轻轻晃动摇匀,避免产生气泡,将梳子置入电泳槽中,然后将琼脂糖溶液倒入电泳板上,待凝固后(需约 40 min),取下梳子,备用。

A.1.6 10×加样缓冲液

聚蔗糖	25 g
灭菌双蒸水	100 mL
溴酚蓝	0.1 g
二甲苯青	0.1 g

A.2 RNase 的去除和无 RNase 溶液的配制

配制溶液用的酒精、异丙醇、Tris、EDTA、LiCl、浓 HCl、NaOH 等应采用未开封的新品。配制溶液所用的超纯水、玻璃容器、移液器吸嘴、药勺等塑料用具应无 RNase。操作过程中应自始至终佩戴抛弃式橡胶或乳胶手套,并经常更换,以避免将皮肤上的细菌和真菌以及人体自身分泌的 RNA 酶污染用具或带入溶液。

A.2.1 玻璃容器应在 240 ℃烘烤 4 h 以去除 RNase。

A.2.2 离心管、移液器吸嘴、药勺等塑料用具应用 0.01% 的 DEPC(焦碳酸二乙酯)水室温浸泡过夜,然后灭菌,烘干;或直接购买无 RNAase 的相应规格离心管、移液器吸嘴。

A.2.3 无 RNase 超纯水

超纯水	100 mL
焦碳酸二乙酯(DEPC)	50 μL

室温过夜,121 ℃,15 min 灭菌,或直接购买无 RNase 超纯水。

A.2.4 75%乙醇

无水乙醇	7.5 mL
无 RNase 超纯水	2.5 mL

现配现用。

A.2.5 1×RNA 吸附缓冲液

A.2.5.1 1 mol/L Tris-HCl pH 7.5

Tris	1.21 g
无 RNase 超纯水	6 mL
36.5% HCl	0.75 mL
1 mol/L HCl	调 pH 至 7.5

加无 RNase 超纯水至 10 mL,分装到 1.5 mL 无 RNase 离心管中,-20℃保存。

A.2.5.2 0.5 mol/L EDTA-Na₂(乙二胺四乙酸二钠),pH 7.5

EDTA-Na ₂ ·2H ₂ O	1.86 g
无 RNase 超纯水	6 mL
10 mol/L NaOH	调 pH 至 7.5

加无 RNase 超纯水至 10 mL,分装到 1.5 mL 无 RNase 离心管中,-20℃保存。

A.2.5.3 5 mol/L LiCl

LiCl	2.12 g
无 RNase 超纯水	8 mL

加无 RNase 超纯水至 10 mL,分装到 1.5 mL 无 RNase 离心管中,-20℃保存。

A.2.5.4 1×RNA 吸附缓冲液:含 20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5),1.0 mol/L LiCl,2 mmol/L EDTA-Na₂,pH 7.5

1 mol/L Tris-HCl(pH 7.5)	200 μL
5 mol/L LiCl	2 000 μL
0.5M EDTA-Na ₂ (pH 7.5)	40 μL
无 RNase 超纯水	7 760 μL
总体积	10 mL

现配现用。

A.2.6 2×RNA 吸附缓冲液:含 40 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5),2.0 mol/L LiCl,4 mmol/L EDTA-Na₂,pH 7.5

1 mol/L Tris-HCl(pH 7.5)	400 μL
5 mol/L LiCl	4 000 μL
0.5M EDTA-Na ₂ (pH 7.5)	80 μL
无 RNase 超纯水	5 520 μL
总体积	10 mL

现配现用。

A.2.7 洗液:含 10 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5),0.15 mol/L LiCl,1 mmol/L EDTA-Na₂,pH 7.5

1 mol/L Tris-HCl(pH 7.5)	100 μL
5 mol/L LiCl	300 μL
0.5 mol/L EDTA-Na ₂ (pH 7.5)	20 μL
无 RNase 超纯水	9 580 μL
总体积	10 mL

现配现用。