

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1521—2005

输入性蠓类虫媒病毒检测规程

Detecting codes for imported ceratopogonidae arbovirus

2005-02-17 发布

2005-07-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

本标准的附录 A、附录 B、附录 C、附录 D 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：中华人民共和国河北出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：王海军、高洪喜、李俊成、李德新、聂维忠。

本标准为首次发布的出入境检验检疫行业标准。

输入性蠓类虫媒病毒检测规程

1 范围

本标准规定了输入性蠓类虫媒病毒实验室的生物安全防护、检验流程、常用病毒学检验技术和结果报告原则。

本标准适用于检验检疫行业对输入性蠓类虫媒病毒的检测,也适用于对蚊、蛉、蝉等吸血节肢动物虫媒病毒的检测。

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。

SN/T 1294 国境口岸蠓类监测规程

WS 233 微生物和生物医学实验室生物安全通用准则

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

虫媒病毒 arbovirus

一些通过吸血的节肢动物叮咬敏感的脊椎动物而传播疾病的一群病毒。

3.2

输入性蠓类 imported ceratopogonidae

由交通工具、货物、集装箱、行李、邮包等携带进入我国国境的吸血蠓类。

4 实验室生物安全防护

蠓类虫媒病毒实验室应符合 WS 233 中规定的三级以上生物安全实验室的要求。

5 检测项目

包括在国际虫媒病毒中心登记的蠓类携带的可致人或人畜共患疾病的病毒种类(例如:乙型脑炎病毒、东方马脑炎病毒、裂骨热病毒、克里米亚-刚果出血热病毒等)。

6 标本的采集、运输和保存

6.1 标本采集用挥网法和灯诱法(方法见 SN/T 1294)。

6.2 入境船舶输入性蠓类在锚地采集;入境航空器、列车及其他交通工具在入境后及时采集。

6.3 采集的吸血蠓种按交通工具始发港、地,进行分类登记,分装小管、贴好标签。

6.4 采集的标本置于液氮罐中保存或运输,也可置于-80℃冰箱中保存。

7 检验程序

7.1 病毒分离

7.1.1 标本处理

标本处理参见第 A.1 章。

7.1.2 分离方法

7.1.2.1 动物分离法

选用 3 d~5 d 龄乳小白鼠分离病毒,进行动物病变观察和病毒传代。接种方法和病变观察参见 A.2.1。

7.1.2.2 组织培养分离法

选择合适的敏感细胞,如 Vero、BHK-21 或 C6/36 细胞分离病毒,接种方法和病变观察参见 A.2.2。

7.2 病毒的鉴定

7.2.1 鉴定原则

7.2.1.1 确定分离到病毒,通过理化与生物学特性试验,确定 DNA 或 RNA 病毒,有包膜或无包膜。

7.2.1.2 选择血清学试验确定病毒的科、属或组。

7.2.1.3 采用聚合酶链反应(PCR)等分子生物学方法确定病毒种类。

7.2.2 理化与生物学特性试验

7.2.2.1 滤过试验参见 B.1.1。

7.2.2.2 病毒核酸型试验参见 B.1.2。

7.2.2.3 酸敏感实验参见 B.1.3。

7.2.2.4 乙醚敏感试验参见 B.1.4。

7.2.2.5 细胞和乳小白鼠病变观察参见 A.2.1、A.2.2。

7.2.2.6 血凝特性 参见 B.2.1。

7.2.2.7 空斑试验 参见 B.2.2。

7.2.3 血清学试验

7.2.3.1 酶联免疫吸附试验(ELISA)参见 C.1。

7.2.3.2 免疫荧光试验(IFT)参见 C.2。

7.2.3.3 血凝试验(HA)和血凝抑制试验(HAI)参见 C.3。

7.2.4 分子生物学试验

采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)鉴定病毒主要包括以下步骤:

——病毒总 RNA 提取;

——cDNA 合成;

——PCR 扩增目的基因;

——PCR 产物回收与纯化;

——PCR 产物连接与转化;

——甘油菌制备与序列测定;

——用 BLAST—序列相似性搜索工具对测得的病毒核酸序列进行比对鉴定病毒。

所需试剂及详细操作参见附录 D。

7.3 结果报告原则

7.3.1 根据检测结果,作出相应的报告,注明检验方法。

7.3.2 聚合酶链反应结果,应注明病毒核酸序列。

7.3.3 阳性结果应具有可重复性,方可作出报告。

7.4 病毒株的保存与运送

7.4.1 病毒株和原始检材,应送上一级实验室复检和鉴定。

7.4.2 经鉴定的病毒株由具有资质的实验室保存。

7.4.3 病毒株应置液氮罐中,由 2 名专业人员专车运送。

附 录 A
(资料性附录)
病毒分离技术

A.1 标本的处理

从液氮罐或 -80°C 低温冰箱中取出冻存管,将蠓类标本迅速倒入研磨器内,用灭菌生理盐水清洗3次~5次,加入1 mL Eagle液(含1 000 IU/mL青霉素、1 000 IU/mL链霉素)用力研磨成匀浆, 4°C 作用4 h, $12\ 000\ \text{r}/\text{min}\sim 15\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 离心15 min,用 $0.22\ \mu\text{m}$ 的滤器滤过上清液,滤过液直接接种细胞或乳小白鼠。

A.2 病毒的分离

A.2.1 动物分离法

A.2.1.1 接种方法和剂量

一般采用颅内和腹腔联合接种。取3 d龄乳小白鼠(6 g~8 g),用左手固定乳鼠,在眼和耳之间用碘酒、酒精消毒,右手持吸取标本悬液的0.25 mL注射器在消毒部位刺入,至硬膜下,每只乳鼠接种0.02 mL;消毒腹部,腹腔接种0.03 mL,每份标本接种5只~6只乳鼠。设乳鼠对照2只,同法同剂量注射稀释液。

A.2.1.2 病变观察

每天观察2次~3次,连续观察2周~3周。不同的虫媒病毒引起乳小白鼠发病的时间不同,凡接种后24 h内死亡的乳鼠均弃之,视为非特异性死亡。乳鼠发病可表现为离乳、离群、竖毛、肢体软弱、麻痹、颈项强直等症状。对照乳鼠应正常。接种乳鼠7 d~14 d无一发病时,则取出两只,解剖取鼠脑组织,制成标本盲传一代,观察两周仍未发病,按未分离出病毒报告。

A.2.1.3 传代与收集毒种

当发病乳鼠濒死时处死,解剖,取其脑、肝、脾、肺、肾等脏器,按第A.1章处理后,再接种乳鼠,待其发病规律稳定时收集毒种,保存并鉴定。

A.2.2 组织培养分离法

A.2.2.1 敏感细胞

选用对多数虫媒病毒敏感的Vero细胞、BHK-21细胞或C6/36细胞培养分离病毒。

A.2.2.2 接种方法

将处理好的标本研磨滤过液接种于长成单层细胞的细胞培养管,每份标本接种4只细胞管,每管接种0.1 mL~0.2 mL。同时设不接种标本对照2管。

A.2.2.3 培养

置 37°C 、5%二氧化碳培养箱中吸附1 h,加0.8 mL~0.9 mL的维持液,置 37°C 、5%二氧化碳培养箱中培养7 d~10 d。

A.2.2.4 病变观察

每天观察一次,常见的细胞病变有圆缩、融合、局灶性小颗粒状破坏等。细胞对照管应正常。

A.2.2.5 传代与保存

显微镜下观察到细胞病变时收获,未出现病变的继续观察。不同的虫媒病毒,引起细胞病变的时间不同,对能在组织培养中增殖,不引起明显细胞病变的病毒,若接种24 h如出现类似细胞病变的现象应视为非特异变化。将有细胞病变的培养管反复冻融三次, 4°C , $12\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 离心15 min后,取上清液, -20°C 保存。按照上述方法在细胞内连续传代三次,保存有细胞病变的细胞培养管并鉴定。

附录 B (资料性附录)

病毒的理化和生物学特性试验

B.1 理化特性试验

B.1.1 滤过试验

动物或组织培养物通过 G5 级细菌滤器或 0.22 μm 微孔滤膜过滤,滤过液在细菌培养基上不生长且仍能保持繁殖力和致病力,可认为已分离到病毒。

B.1.2 病毒核酸型试验

B.1.2.1 用维持液 10 倍系列稀释待测病毒。

B.1.2.2 将病毒悬液接种到细胞管或细胞板上孵育。

B.1.2.3 将含 5-碘脱氧尿苷(5-IUDR)的培养液(5-IUDR:将 17 mg 5-IUD 溶解在 10 mL 去离子水中,加维持液至 100 mL,使用前用生长液 1:10 稀释)加入试验组,正常培养液加入对照组。

B.1.2.4 孵育,读取结果并计算滴度。如系 DNA 型病毒,病毒的繁殖明显受到抑制;RNA 病毒则不受影响。

B.1.3 酸敏感试验

B.1.3.1 将 1 mL 病毒悬液用 0.1 mol/L 盐酸调 pH 至 3.0,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 2 h。

B.1.3.2 用 5.6% 碳酸氢钠(NaHCO_3)调 pH7.2 左右。

B.1.3.3 取 1 mL 病毒不加酸,调 pH 同 B.1.3.2。

B.1.3.4 将试验组与对照组同时滴定,对酸敏感病毒经此处理抑制滴度大于 2 对数以上。

B.1.4 乙醚敏感试验

B.1.4.1 将 15 mL 乙醚加入 0.5 mL 待测病毒悬液中(使用玻璃试管),用力摇匀。

B.1.4.2 将试管 20 $^{\circ}\text{C}$ 竖立置放 1 h~2 h,并间歇摇动,或 4 $^{\circ}\text{C}$ 竖立置放 18 h~24 h。

B.1.4.3 将混合物放玻璃平皿中,使溶剂挥发。

B.1.4.4 分别配置乙醚处理和未处理过的病毒 10 倍系列稀释液。

B.1.4.5 分别滴定两组病毒悬液,对比其感染滴毒。并设已知的对乙醚敏感病毒和不敏感病毒对照。

B.2 生物学特性试验

B.2.1 血凝特性及 pH 范围

许多虫媒病毒的外膜上有血凝素突起,有凝集哺乳动物和鸟类红细胞的作用。不同的虫媒病毒对哺乳动物和鸟类红细胞有选择性,且其血凝活性需要一定的温度和 pH 条件,可以为病毒的初步鉴定提供参考。方法参见附录 C.3。

B.2.2 空斑试验。

B.2.2.1 制备细胞

用传代细胞 Vero、BHK-21 或 C6/36 按常规胰酶消化法制备细胞,接种于 2.2 cm \times 5.5 cm 培养瓶,5 d~6 d 后长成致密的单层。

B.2.2.2 接种病毒

吸出细胞瓶/孔的生长液,接种 10 倍系列稀释的不同稀释度病毒悬液,每小瓶 0.2 mL,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% 二氧化碳孵箱内吸附 1 h~2 h。每 15 min 轻轻摇动一次。

B.2.2.3 加第一层覆盖物

制得的覆盖物温度下降到 40 $^{\circ}\text{C}$ 时,每小瓶加 4 mL,待凝固后置 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱内培养。

B.2.2.4 加第二层覆盖物

培养 3 d~4 d 或更长的时间,在第一层覆盖物上加含中性红的琼脂覆盖物每瓶 2 mL,每孔 0.75 mL,置孵箱中继续培养,第二天观察结果。健康的活细胞染成红色;病毒引起死亡的细胞不着色,形成白色斑点可以计数。

B.2.2.5 计算病毒滴度

根据空斑数计算病毒滴度,以空斑形成单位(PFU)表示。计算见式(B.1):

$$PFU = K \times \frac{P_1 + P_2 + \dots + P_n}{n} \times \frac{1}{V} \dots\dots\dots (B.1)$$

式中:

PFU——空斑形成单位;

K——稀释度;

P——该稀释度所有培养瓶上的空斑数;

n——培养瓶数;

V——每瓶接种量,单位为毫升(mL)。

附 录 C
(资料性附录)
血清学检验技术

C.1 酶联免疫吸附试验(ELISA)

C.1.1 主要试剂

- a) 包被缓冲液(pH9.6 碳酸盐缓冲系统)。
- b) 标本稀释液(PBS-Tween-20 pH7.4)。
- c) 洗涤液(Tris-Tween 0.02 mol/L pH7.4)。
- d) 底物溶液(磷酸盐-柠檬酸缓冲液)。
- e) 终止反应剂(4 mol/L H₂SO₄)。

C.1.2 主要器材

- a) 聚苯乙烯微量反应板:96孔(可拆),用前洗净凉干,在紫外线下20 cm处照射1 h。
- b) 微量加样器(单道或多道),5 μL~50 μL、50 μL~200 μL、塑料吸头。
- c) 酶标检测仪。
- d) 恒温培养箱。
- e) 恒温水浴箱。
- f) 微板振荡器。
- g) 洗板机。

C.1.3 双抗体夹心法

- C.1.3.1 将纯化的特异性抗体用包被液稀释后,每孔加100 μL,置湿盒4℃过夜。
- C.1.3.2 洗涤5次,每次3 min,磕干。
- C.1.3.3 加入待检抗原,每孔100 μL,设立阴性、阳性和空白对照。置37℃湿盒保温1 h。
- C.1.3.4 重复C.1.3.2。
- C.1.3.5 加入酶标记的特异性抗体,每孔100 μL,37℃湿盒保温1 h。
- C.1.3.6 重复C.1.3.2。
- C.1.3.7 加入新鲜配制的底物,每孔100 μL,置37℃湿盒保温30 min。
- C.1.3.8 加入50 μL终止剂。
- C.1.3.9 在酶标仪上,于490 nm处读出各孔A值。

C.1.4 结果判定

- C.1.4.1 同时符合下列两个条件者,判为阳性:
 - a) 待测抗原与特异性抗体反应的A值 ≥ 0.2 ;
 - b) 待测抗原与特异性抗体反应的A值/阴性对照抗原与特异性抗体反应的A值 ≥ 2.1 。
- C.1.4.2 均不符合上述两个条件者,判为阴性。
- C.1.4.3 仅有1~2项符合者,判为可疑。应选用同一种方法或另一种方法重试。

C.2 免疫荧光技术(IFIT)

C.2.1 主要试剂

C.2.1.1 抗原片制备

- a) 组织培养标本:将大小适宜的盖玻片清洁消毒处理后,置培养皿内,放入二氧化碳孵箱,待长成单层细胞,立即接种病毒,当细胞出现50%的病变时,将盖片取出,用冷丙酮固定15 min,经

PBS 冲洗后保存于 -20°C 备用。

- b) 冰冻组织切片标本:感染虫媒病毒的冰冻组织,在 -20°C 低温下切片(厚度约 $4\text{ mm}\sim 6\text{ mm}$),直接贴于载玻片上,晾 $10\text{ min}\sim 30\text{ min}$,或用电吹风机吹干。经冷丙酮固定 $10\text{ min}\sim 60\text{ min}$ 备用。

C.2.1.2 洗液($0.01\text{ mol/LpH}7.4\text{ PBS}$)。

C.2.1.3 特异性荧光抗体(用于直接法)。使用时用含 $0.01\%\sim 0.02\%$ 的伊文思蓝 PBS 稀释至适当浓度。

C.2.1.4 荧光素标记的抗抗体。

C.2.1.5 封片液($50\%\text{ PBS}$ 甘油)。

C.2.2 主要仪器

- a) 荧光显微镜(落射式光源,全自动照相装置)。
- b) 冰冻切片机。
- c) 低温冰箱。
- d) 37°C 温箱。
- e) 恒温水浴箱。
- f) 带圈的洁净载玻片等。
- g) 微量加样器:容量 $5\ \mu\text{L}\sim 50\ \mu\text{L}$ 。

C.2.3 直接法

C.2.3.1 干燥

取制备好的抗原片,室温干燥。

C.2.3.2 加抗体

滴加工作浓度的特异性荧光抗体或荧光素标记的特异性单克隆抗体,使抗体铺满细胞面。设立阳性、阴性和空白对照。置 37°C 温箱孵育 $30\text{ min}\sim 60\text{ min}$ 。

C.2.3.3 漂洗

PBS 液漂洗 3 次,每次 5 min ,室温干燥。

C.2.3.4 封片

用 50% 的甘油 PBS 封片。

C.2.3.5 结果判定

在阳性、阴性对照成立的情况下,即阳性对照有荧光反应,阴性对照无荧光即可判定结果。

待检抗原标本和正常细胞标本与正常血清均无荧光反应,判定阴性。

待检抗原标本与特异性荧光抗体有荧光反应,正常细胞标本与特异性荧光抗体无荧光反应,判为阳性。

根据荧光颗粒多少、亮度强弱可分以下 4 个等级:

++++: 阳性细胞 $<90\%$,荧光强而亮,且范围广;

+++ : 阳性细胞 $\leq 70\%$,荧光明亮;

++ : 阳性细胞 $\leq 50\%$,荧光较弱,但清晰可见;

+ : 阳性细胞 $\leq 25\%$,为极弱的可疑荧光;

- : 无荧光,为阴性。

C.2.4 间接法

C.2.4.1 PBS 液洗片,吹干。

C.2.4.2 滴加特异性抗体,置湿盒放 37°C 温箱 30 min 。设立阴性、阳性标本及中间层对照(即中间层加阴性血清)。

C.2.4.3 用 PBS 洗涤 3 次,吹干。

- C. 2. 4. 4 滴加工作浓度的荧光素标记的抗抗体,置湿盒 37℃温箱 30 min~60 min。
- C. 2. 4. 5 用 PBS 洗涤 3 次,吹干。
- C. 2. 4. 6 50% PBS 洗甘油封片。
- C. 2. 4. 7 结果判定同 C. 2. 3. 5。

C. 3 血凝(HA)和血凝抑制试验(HAI)

C. 3. 1 主要试剂

- C. 3. 1. 1 血凝素(病毒抗原)组织培养中的病毒及其抗原物质,经冻溶、离心除去沉淀,可用作血凝试验的抗原。(采用鼠脑—蔗糖—丙酮提取法制备)。
- C. 3. 1. 2 pH 9.0 硼酸缓冲液(BBS)。
- C. 3. 1. 3 适宜 pH 的磷酸盐缓冲液(PBS)。
- C. 3. 1. 4 红细胞悬液 根据不同病毒血凝所需敏感红细胞制备悬液,一般将血液保存于阿氏液内,使用前用 PBS 洗 3 次,用适宜 pH PBS 制备成 0.5% 的红细胞悬液。

C. 3. 2 主要器材

- a) 微量血凝反应板 96 孔、U 型。
- b) 微量加样器(容量 5 μL ~25 μL 、50~100 μL)。
- c) 恒温培养箱。
- d) 恒温水浴箱。
- e) 微量震荡器。

C. 3. 3 血凝试验

C. 3. 3. 1 稀释

将血凝素用 PBS 作连续倍比稀释,每稀释度留 25 μL 于微量血凝板中。

C. 3. 3. 2 加样

每孔内加入 25 μL PBS 与 50 μL 红细胞悬液,摇匀,同时设立红细胞对照。

C. 3. 3. 3 温育

置所需温度作用 30 min~60 min。

C. 3. 3. 4 结果判定

以出现血凝++的最高稀释度定为一个血凝单位(如 1:640)。

作血凝抑制试验时用 4 个~8 个血凝单位(即 1:160-1:80)。各孔血凝结果以++++、+++、++、+表示:

- ++++:红细胞均匀铺于管底;
- +++ :红细胞凝集同上,孔底有大圈;
- ++ :红细胞于孔底形成一个中等大的圈,周围有小凝块;
- + :红细胞于孔底形成一个小圈,四周有少许凝块。

C. 3. 4 血凝抑制试验

C. 3. 4. 1 稀释血清

在血凝板上,自 1:10 起作一系列倍比稀释,每稀释度留 25 μL ,另取 1:10 稀释的血清作对照。

C. 3. 4. 2 滴加血凝素

每孔滴加 4 U 或 8 U 的血凝素 25 μL (血清对照孔除外),血清对照孔滴加 25 μL PBS。

C. 3. 4. 3 血凝素单位校对

将 8 U 血凝素稀释成 4 U、2 U、1 U 和 1/2 U,每孔 25 μL ,摇匀后置所需温度作用 1 h~2 h。

C. 3. 4. 4 红细胞对照

加 PBS 50 μL 。

C. 3. 4. 5 血清对照

阴性和阳性血清 25 μL 加 PBS 25 μL 。

C. 3. 4. 6 滴加红细胞悬液

全部试验和对照孔内加入 50 μL 0.5% 红细胞悬液, 混合后放所需温度或水浴作用 1 h~2 h, 观察结果。

C. 3. 4. 7 结果判定

对照系统(阴性血清、阳性血清、待检抗原、阳性抗原、红细胞)成立的条件下判定结果。判定时以完全不出现血凝的血清最高稀释度为血清的血凝抑制滴度。结果表示同 C. 3. 3. 4。

附录 D

(资料性附录)

逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)

D.1 试剂

- D.1.1 Trizol 试剂。
- D.1.2 反转酶 Super script II RT。
- D.1.3 DEPC 水:去离子水中加入 DEPC(Sigma 公司)配成 0.5%DEPC 水。
- D.1.4 70%乙醇:用 DEPC 水配制。
- D.1.5 cDNA 试剂盒。
- D.1.6 dNTPs:含 dATP、dCTP、dGTP、dTTP。每种浓度为 10 mmol/L。
- D.1.7 TAE 电泳缓冲液:Tris-乙酸缓冲液(50×),每升溶液含 242 gTris-碱,7.1 mL 冰乙酸。
- D.1.8 EDTA 溶液(0.5 mol/L pH8.0)。
- D.1.9 琼脂糖电泳凝胶:1%琼脂糖,加入 EB 至最终浓度 0.5 μg/mL。
- D.1.10 上样缓冲液:0.25%溴酚蓝,0.5%二甲苯青,50%蔗糖。
- D.1.11 X-gal:用二甲基甲酰胺溶解配制 20 mg/mL 贮存液。
- D.1.12 IPTG:异丙基硫代-D-半乳糖苷配制 2%贮存液。
- D.1.13 碱裂解法质粒快提溶液:
 ——溶液 I:50 mol/L 葡萄糖,25 mol/L Tris-Cl(pH8.0),10 mol/L EDTA;
 ——溶液 II:0.2 mol/L 氢氧化钠,1%SDS,用前现配;
 ——溶液 III:0 mol/L 乙酸钾,加冰乙酸调 pH7.8。
- D.1.14 TE(pH8.0):取 Tris-HCl(1 mol/L pH8.0)5 mL,EDTA(0.5 mol/L pH8.0)1 mL,加水 500 mL,高压蒸汽灭菌后,4℃保存备用。
- D.1.15 细菌培养基:
 ——LB 培养基:酵母浸膏 5 g/L,蛋白胨 10 g/L,氯化钠 10 g/L,琼脂 15 g/L 用 10 mol/L 氢氧化钠调 pH 至 7.0,高压灭菌;
 ——ALB 培养基:在 LB 中加入氨苄青霉素 100 μg/mL。
- D.1.16 菌株 大肠杆菌 DH5 α。
- D.1.17 PGEM 载体试剂盒。
- D.1.18 限制性内切酶 Apa I。
- D.1.19 PCR 产物纯化试剂盒。
- D.1.20 引物可用专用软件设计引物。

D.2 主要仪器

- a) PCR 扩增仪。
- b) 桥式琼脂糖凝胶电泳仪。
- c) 紫外线投射仪。
- d) 台式冷冻高速离心机(10 000 r/min~20 000 r/min)。
- e) 微量移液器(1 μL~5 μL,5 μL~25 μL)。

D.3 操作步骤

D.3.1 总 RNA 提取(TRIZOL 法)

- D.3.1.1 取 100 μL 冻存病毒抗原于 1.5 mL 的 Eppendorf 管中。
- D.3.1.2 加 0.7 mL Trizol 液,轻轻震荡混匀。室温静止 15 min。
- D.3.1.3 加入 0.2 mL 三氯甲烷,室温静止 10 min。 4°C 10 000 r/min 离心 15 min。
- D.3.1.4 弃取上清,加入 0.5 mL 异丙醇,室温放置 10 min。 4°C 10 000 r/min 离心 10 min。
- D.3.1.5 弃取上清,加入 1 mL 75%的乙醇洗涤液, 4°C 7 500 r/min 离心 5 min,弃取上清,室温干燥。

D.3.2 制备病毒 cDNA

- D.3.2.1 取病毒 RNA 5 μL 加入 Eppendorf 管中,加 4 μL oligo dT_{12~18},分成两个管(10 $\mu\text{mol/L}$)充分混匀, 70°C 变性 5 min 后水浴 5 min。
- D.3.2.2 加入下列各组分:5 \times 缓冲液 4 μL ,氯化镁(25 mmol/L)2 μL ,DTT(0.1 mol/L)1 μL ,dNTP (10 mmol/L)1 μL ,反转录酶(SuperScript II RT)1 μL ,RNA 酶抑制剂(RNAase H)1 μL ,充分混匀于 42°C 反应 45 min(具体方法可按照试剂盒操作)。

D.3.3 PCR 扩增

- D.3.3.1 取 cDNA 1 μL 作为模板于 200 μL PCR 反应管中。
- D.3.3.2 依次加入下列各组分;dNTP(2.5 mmol)2 μL ,10 \times 缓冲液 2 μL ,上游引物(20 $\mu\text{mol/L}$)2 μL ,下游引物(20 $\mu\text{mol/L}$)2 μL ,EX-*Taq* 酶 1 μL ,去离子水 17 μL 混匀后进行 PCR 扩增。

D.3.4 扩增产物回收分析

- D.3.4.1 制备 1%琼脂糖电泳胶。
- D.3.4.2 取 3 μL PCR 产物,在 100 V 电压条件下电泳,紫外灯下检查条带,切下目的条带置于 Eppendorf 管中。
- D.3.4.3 加入 200 μL 胶溶解剂(Gel solubilizer), 65°C 水浴 5 min 至胶融化。
- D.3.4.4 加入 Sephaglas BP5 μL ,轻混,置室温 5 min,离心 30 s,弃上清液,再离心 30 s,弃上清液。
- D.3.4.5 用 80 μL 洗液(Wash Buffer)洗 3 次,弃上清后干燥至少 10 min。
- D.3.4.6 加入 36 μL Elution Buffer,置室温 5 min,离心 1 min,取上清至另一洁净的 Eppendorf 管。
- D.3.4.7 取 PCR 纯化产物行 1%琼脂糖凝胶电泳检测。将纯化产物于 -20°C 冰箱保存。

D.3.5 PCR 产物的连接与转化

D.3.5.1 感受态宿主菌的制备

- a) 挑取单个 DH5 α 菌落,接种于 LB 培养基(不含氨苄青霉素)中, 37°C 活化过夜。
- b) 取上述菌液按 1:100 接种于 50 mL LB 中, 37°C 震荡培养 2 h。
- c) 菌液 OD 值=0.5 时, 4°C 5 000 r/min 离心 8 min。
- d) 弃上清,沉淀用 0.1 mol/L 氯化钙悬浮,置水浴内 30 min,5 000 r/min 离心 8 min。
- e) 弃上清,沉淀用 0.1 mol/L 氯化钙重悬,分装后置水浴备用或 -70°C 保存。

D.3.5.2 连接目的片段

可用 Promega 公司的 T 载体试剂盒。参加反应的组分和条件:2 \times T4 DNA 连接酶缓冲液 5 μL ,取回收产物 3 μL ,PGEM-T 载体 1 μL ,T4 DNA 连接酶 1 μL , 4°C 连接过夜。

D.3.5.3 转化

连接产物 5 μL 加入 100 μL D.3.5.1 制备的感受态细胞内,置水浴 30 min 后, 42°C 热休克 90 s,再置水浴 2 min,加 LB 0.8 mL,置 37°C 水浴 1 h,取 200 μL 菌液加入 40 μL 20 mg/mL 5-溴-4-氯-3-吡啶-D-半乳糖苷(X-gal)和 4 μL 异丙基硫代半乳糖苷(IPTG 0.1 mol/L),混匀后涂含氨苄青霉素(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)平皿, 30°C 培养 12 h~16 h,挑取白色菌落。

D.3.6 提取质粒

D.3.6.1 将单个白色菌落接种到 1.5 mL 含氨苄青霉素的 LB 培养液中,振荡培养过夜,离心收集细菌。

D.3.6.2 用 100 μ L 溶液 I 悬浮。

D.3.6.3 加 200 μ L 溶液 II,轻轻混匀,冰浴 10 min。

D.3.6.4 加 150 μ L 溶液 III,混匀,冰浴 10 min。

D.3.6.5 15 000 r/min 离心 10 min,取上清液。

D.3.6.6 加等体积酚:三氯甲烷:异戊醇(25:24:1)抽提,乙醇沉淀,75%乙醇洗涤,抽干,加含 RnaseA(100 μ g/mL)的 TE 溶液 20 μ L,37 $^{\circ}$ C 消化 30 min 后用于酶切鉴定。

D.3.7 序列测定

D.3.7.1 甘油菌制备:取新鲜菌液 80 μ L 接种到 2 mL LB 中,在 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床中,250 r/min 4 h,取 0.8 mL 菌液加入 0.2 mL 100%甘油,置-80 $^{\circ}$ C 低温冰箱保存。

D.3.7.2 按 PCR 产物的测序试剂盒的操作说明进行测序(或由生物工程公司完成)。

D.3.8 鉴定病毒

通过 Blast 进行序列对比。在国际互联网美国生物技术中心(NCBI)网站找到 BLAST 主页,进入核酸数据库,输入测得的核酸序列,进行核酸-核酸序列比对,以病毒核酸的同源性或相似性确定病毒或发现新种。
