

ICS

点击此处添加中国标准文献分类号

团 体 标 准

T/CVMA XXXXX—XXXX

山羊鼻内肿瘤病毒的检测方法

Detection Method of Goats *Enzootic Nasal Tumor Virus*

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国兽医协会 发布

中国兽医协会
CVMA

目次

前 言.....	II
引 言.....	III
山羊鼻内肿瘤病毒的检测方法.....	1
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 试剂.....	1
3.1 RNA 提取试剂盒.....	1
3.2 其它试剂.....	1
3.2 引物.....	1
4 仪器与设备.....	1
5 操作步骤.....	1
5.1 样品采集与处理.....	1
5.2 对照.....	2
5.3 核酸 RNA 提取.....	2
5.3.1 若选用 EasyPure Viral DNA/RNA Kit 试剂盒提取 RNA，则参照以下步骤进行操作。.....	2
5.3.2 若使用其他等效的 RNA 提取试剂，则按照试剂说明书操作。.....	2
5.4 RT-PCR 检测.....	2
5.4.1 RT-PCR 反应体系与程序.....	2
5.4.2 RT-PCR 产物电泳.....	3
6 结果判定.....	3
附录 A （规范性附录）.....	4
附录 B （资料性附录）.....	6

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由中国兽医协会（CVMA）提出。

本文件由中国兽医协会（CVMA）归口。

本文件起草单位：福建省农业科学院畜牧兽医研究所。

本文件主要起草人：胡奇林、张靖鹏、江锦秀、林裕胜、徐泉明。

中国兽医协会
CVMA

引 言

山羊地方性鼻内肿瘤(Enzootic nasal tumor, ENT)是由山羊鼻内肿瘤病毒(Enzootic nasal tumor virus of goats, ENTV-2)引起的羊一种慢性、进行性、接触性、肿瘤性传染病,临床上以流稀薄鼻液、呼吸困难、消瘦为主要症状,以一侧或两侧鼻甲骨内出现菜花状肿瘤增生为主要病变。ENT呈世界性分布,首例绵羊地方性鼻内肿瘤1939年报道于德国,以后在法国、美国、日本、加拿大、以色列等国都有绵羊或山羊感染的报道。我国刘凤翔等在内蒙古首先报道了本病,此后,湖南、四川、陕西等地发生了该病。其发病率多为0.2%-15%,有时高达20%,致死率达100%,主要见于1岁以上青年羊及成年种羊;该病潜伏期长达数月至数年,隐蔽性大,易于传播,该病呈水平传播,病羊及发病羊是主要传染源,通过其呼吸道分泌物传染。我国每年因此病造成的直接经济损失达到5亿元以上,不少羊场因为该病的发生,造成毁灭性损失。山羊地方性鼻内肿瘤严重威胁着我国养羊业的发展。

ENTV-2属于逆转录病毒科 β 逆转录病毒属B/D型逆转录病毒。羊基因组中普遍存在内源性逆转录病毒(ERVs)。绵羊肺腺瘤病毒(JSRV)(属于逆转录病毒科 β 逆转录病毒属)是绵羊肺腺瘤的病原。ENTV-2与ERVs和JSRV基因组同源性很高。山羊感染ENTV-2后体内检测不到抗ENTV-2的抗体。迄今为止,国内外尚未找到能适应ENTV-2繁殖的体外培养体系。这些极大地限制了对ENTV-2致病机制、免疫机理、检测方法和疫苗等的研究,目前,国内外没有ENT的疫苗和治疗ENTV的有效药物,控制山羊地方性鼻内肿瘤最有效的方法只有应用特异性RT-PCR方法检出发病羊和感染羊,及时淘汰,净化羊群,以控制ENTV-2的传播和蔓延。但是,ENT和羊支原体性肺炎及山羊传染性胸膜肺炎的临床症状非常相似,均表现为流鼻涕、呼吸困难和消瘦,临床上难以区别。并且,ENTV-2和绵羊肺炎支原体及山羊支原体山羊亚种经常呈混合感染或者继发感染,临床上很容易混淆。

因此,对ENT进行早期准确快速诊断,既能在感染早期检出感染羊只及时淘汰,控制ENTV-2的传播和蔓延,又能避免假阳性错误淘汰不带毒羊只而导致不必要的经济损失,具有重要的现实和经济意义。

目前,我国对该病的研究尚开展不多,主要集中于对ENTV-2基因测序、基因表达等方面,尚未见山羊地方性鼻内肿瘤诊断技术标准。

综上所述,制定山羊鼻内肿瘤病毒的检测方法的技术标准,对有效控制和净化山羊地方性鼻内肿瘤具有重要意义,对保障我国养羊业的健康稳定发展和提高食品安全质量具有重要的现实和经济意义。

中国兽医协会
CVMA

山羊鼻内肿瘤病毒的检测方法

1 范围

本文件规定了山羊鼻内肿瘤病毒核酸检测的反转录-聚合酶链式反应（RT-PCR）的操作技术规程。本文件适用于山羊鼻内肿瘤病毒的检测方法。

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，仅所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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 试剂

3.1 RNA 提取试剂盒

使用EasyPure Viral DNA/RNA Kit提取试剂盒。或选其它同等商品化RNA提取试剂盒。

3.2 其它试剂

Trizol；三氯甲烷；异丙醇；焦炭酸二乙酯（DEPC）处理水；配制方法见附录A.2；75%乙醇：配制方法见附录A.3；10000XGeneRed Nucleic Acid Dye：配制方法见附录A.4；1×TAE缓冲液：配制方法见附录A.5；1.0%琼脂糖凝胶：配制方法见附录A.6；DNA相对分子量标准：DL2000；10×加样缓冲液：配制方法见附录A.7。

3.2 引物

根据ENTV-2 pol 基因的SU保守区域设计一对特异性引物(F: 5'-TTCAAACCTTCCTAACCTTCATTC-3'; R: 5'-GTATTTTCATGTATAACAATGCAGC-3')。

4 仪器与设备

PCR仪；高速台式冷冻离心机；微量移液器；混匀器；冰箱。

5 操作步骤

5.1 样品采集与处理

采集发病羊、濒死羊或死亡羊的鼻拭子样品，放入1mL加有双抗的PBS中，折断多余部分棉棒，密闭采样管。将采集的鼻拭子样品4℃过夜，第二天在涡旋振荡器上震荡5S后，用1mL移液器尽量吸出鼻拭子浸液，10000 rpm，离心5min，取上清，-20℃保存备用。

5.2 对照

以经鉴定正确的ENTV-2-FJ株(见“山羊地方性鼻内肿瘤病毒ENTV-2FJ株的分离纯化和全基因组序列分析”，农业生物技术学报, 2020, 28(02):313-324)提取的核酸RNA为阳性对照；以其他羊RNA病毒提取的核酸RNA为阴性对照；以灭菌无离子水为空白对照。

5.3 核酸RNA提取

5.3.1 若选用 EasyPure Viral DNA/RNA Kit 试剂盒提取 RNA，则参照以下步骤进行操作。

- a) 加入 20μL Proteinase K 于一个无菌的 1.5ml 离心管中；
- b) 在离心管中加入 200μL 样品；
- c) 加入 200μL Bing Buffer 5(包含 5.6μg Carrier)，旋涡混合 15 秒；
- d) 56℃孵育 15 分钟；
- e) 加入 250μL 无水乙醇(此时可能会出现絮状沉淀)，旋涡混合 15 秒，室温放置 5 分钟；将溶液和沉淀仪器加入离心柱中，12,000xg 离心 1 分钟，弃掉流出液；
- f) 加入 500μL Wash Buffer 5，12,000xg 离心 1 分钟，弃掉流出液；
- g) 重复步骤 7 一次；
- h) 室温 12,000xg 离心 1 分钟，彻底去除残留的乙醇；
- i) 将离心柱转入一个新 1.5 ml RNase-free 的离心管中，并向离心柱中央加 20-50μL RNase-free Water，室温静置 1 分钟；
- j) 室温 12,000xg 离心 1 分钟，洗脱 RNA；
- k) 将 RNA 置于-70℃保存。

5.3.2 若使用其他等效的 RNA 提取试剂，则按照试剂说明书操作。

5.4 RT-PCR检测

5.4.1 RT-PCR反应体系与程序

反转录体系: 25μL 体系，每个反应管的反应液配置为：GoScript™ Reverse R Oligo.dT4μL，GoScript™ Enzyme Mix 2μL，RNA 2μL，焦炭酸二乙酯（DEPC）处理水 12μL。2000rpm 离心 15S，使每个反应管的反应混合液都沉降到管底。然后进行反转录，程序为：25℃ 5min，42℃ 20min，80℃ 5min。

反转录结束后，进行 PCR 扩增，每个反应管的反应液配置为：Prime STAR Max Prime 2X 10 μ L，上游引物 1 μ L，下游引物 1 μ L，cDNA 模板 2 μ L，N 焦炭酸二乙酯（DEPC）处理水 6 μ L。PCR 程序为：94 $^{\circ}$ C 预变性 3min；94 $^{\circ}$ C 变性 15s，56 $^{\circ}$ C 退火 10s，72 $^{\circ}$ C 延伸 15s，循环数为 32；72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

5.4.2 RT-PCR产物电泳

反应结束后，分别取5 μ L RT-PCR产物与0.5 μ L加样缓冲液混合，加入到1.0%琼脂糖凝胶板的加样孔中，加上DNA分子量标准5 μ L，以5V/cm的电压进行电泳，30分钟后在紫外凝胶成像仪中观察结果。

6 结果判定

以阳性对照孔出现约350bp特异条带、阴性和空白孔均无扩增，判为试验成立；当待检样品出现约350bp特异条带时，判为阳性；当待检样品无特异条带时，判为阴性（见附录B）。

附录 A
(规范性附录)

相关试剂的配制

A.1 0.01M 磷酸盐缓冲盐水(PBS)

NaCl	8.0g
KCl	0.2g
Na ₂ HPO ₄	2.9g
KH ₂ PO ₄	0.2g

将上述试剂溶于 800 mL 灭菌双蒸水中，定容至 1 000mL，1.034×10⁵Pa 高压灭菌 30 min，4℃保存备用。

A.2 焦炭酸二乙酯 (DEPC) 处理水

于三蒸水中按 0.1%加入 DEPC，室温静置过夜，1.034×10⁵帕高压灭菌 20 分钟，冷却备用。

A.3 75%乙醇

取无水乙醇 750mL 加入双蒸水 250mL，定容至 1000mL，-20℃保存备用。

A.4 1000XGeneRed Nucleic Acid Dye

购自天根生化科技有限公司。

A.5 1×TAE缓冲液

A.5.1 配制0.5mol/L乙二胺四乙酸二钠溶液 (pH8.0)

二水乙二胺四乙酸二钠	18.61g
氢氧化钠	调 pH 至 8.0
灭菌双蒸水	至 100mL

A.5.2 配制50×TAE缓冲液

羟基甲基氨基甲烷 (Tris)	242g
冰乙酸	57.1mL
0.5mol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液 (pH8.0)	100 mL
灭菌双蒸水	至 1000mL

使用时用灭菌双蒸水稀释 50 倍使用。

A.5.3 配制1×TAE缓冲液

50×TAE 缓冲液	20mL
灭菌双蒸水	至 1000mL

A.6 1.0%琼脂糖凝胶

琼脂糖	1g
1×TAE 缓冲液	100mL

置微波炉中加热至完全融化，待冷却至 50-60℃时，加入 10000XGeneRed Nucleic Acid Dye 10uL，摇匀后倒入制胶板中，待完全凝固后取下加样梳，备用。

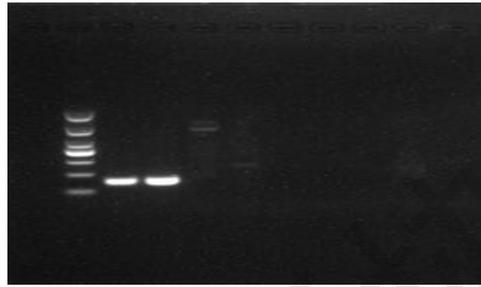
A.7 10×加样缓冲液

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

附录 B
(资料性附录)

RT-PCR检测结果图

M 1 2 3 4 5 6 7 8



M 为 DNA Marker 2000；1-2、阳性对照 3：大肠杆菌；4：羊口疮病毒；5：无胆甾原体；6：丝状支原体山羊亚种；7：山羊支原体山羊肺炎亚种；8：空白对照；