



中华人民共和国国家标准

GB/T 34736—2017

绵羊肺腺瘤病毒核酸斑点杂交检测技术

Detection of jaagsiekte sheep retrovirus with dot blotting hybridization

2017-11-01 发布

2018-05-01 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

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
绵羊肺腺瘤病毒核酸斑点杂交检测技术
GB/T 34736—2017

*

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(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址: www.spc.org.cn

服务热线: 400-168-0010

2017年11月第一版

*

书号: 155066·1-57846

版权专有 侵权必究

前 言

本标准按照 GB T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准主要起草单位：内蒙古农业大学、中华人民共和国内蒙古出入境检验检疫局、北京农业职业学院。

本标准起草人：刘淑英、齐景伟、王海艳、王振玲、马学恩、梁化春、赵泽赟、孙晓林。

引 言

绵羊肺腺瘤病(ovine pulmonary adenomatosis, OPA)是由绵羊肺腺瘤病毒(Jaagsiekte sheep retrovirus, JSRV)引起的一种慢性、进行性、接触传染性的肺脏肿瘤性疾病。主要特征是患羊咳嗽、呼吸困难、大量浆液性鼻液、消瘦、Ⅱ型肺泡上皮细胞和无纤毛细支气管上皮细胞肿瘤性增生^[1]。剖检可见病羊肺脏发生实变,回缩不良,体积变大,比正常肺脏大2~3倍。肺表面有坚实的圆形粟粒大小的灰白色结节即腺瘤灶,小结节发生融合,形成形状不一并且不规则的大结节。气道内充满泡沫状液体,抬起两条后腿可从鼻孔流出泡沫状液体即具有证病意义的小推车试验^[2]。

绵羊肺腺瘤病毒(JSRV)是引起绵羊肺腺瘤病的病原。在所有已研究过的正常绵羊基因组内都含有约20拷贝的与JSRV密切相关的内源性逆转录病毒(endogenous retrovirus, ERVs)序列,因其基因结构与绵羊肺腺瘤病毒的极为相似,也称为内源性绵羊肺腺瘤病毒(enJSRV),为了区别称绵羊肺腺瘤病毒为exJSRV^[3]。研究表明,enJSRV和exJSRV的基因结构在gag基因、长末端重复序列(LTR)、env基因处区别较大,特别是env基因编码跨膜蛋白区域(TM)和长末端重复序列的U3区是2个高可变区。所以在检测病原exJSRV时,在这2个高可变区处设计特异性引物和制备特异性探针来排除enJSRV^{[4][5]}。

到目前为止,全世界都没有建立统一特异性诊断该病的方法^[1]。其原因有三个方面:一是该病的潜伏期较长,病程较长,对处于潜伏期或临床症状不明显的病羊很难发现。二是病羊体内检测不到循环抗体,很难用常规的免疫学方法进行诊断,三是引起该病的病原绵羊肺腺瘤病毒(JSRV)仍未建立体外培养体系,所以常规的病毒分离鉴定方法也无法利用。目前对该病的诊断还主要依靠临床症状和病理组织学检查。所以建立特异性诊断该病的技术标准将在国家出入境检验检疫、国内种羊安全评价、羊场检疫清群等方面具有非常重要的意义。

绵羊肺腺瘤病毒核酸斑点杂交检测技术

1 范围

本标准规定绵羊肺腺瘤病毒核酸斑点杂交检测的试剂、材料和设备、抽样、操作方法、结果判定等。

本标准适用于检测临床疑似病羊和进出口种羊肺组织或外周血液样品中绵羊肺腺瘤病毒核酸,也适用于羊临床样品中绵羊肺腺瘤病病原的快速检测。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义、缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

斑点杂交 dot blotting hybridization

利用核酸探针,在杂交膜上与待测样本核酸 DNA 杂交,核酸探针带有供反应后检测的合适标记物,并与特异靶分子结合形成杂交体,再用呈色反应显示。斑点杂交是直接将待检羊只的组织或血液样品 DNA 变性后,点样于硝酸纤维素膜或尼龙膜上,再与制备的特异性探针进行杂交来检测样品中的前病毒 DNA 的分子杂交技术。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

AMV:鸟类 RNA 病毒反转录酶(Avian Myeloblastosis Virus)

BCIP:5-溴-4-氯-3-吲哚-磷酸盐(5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphate)

cDNA:互补 DNA (Complementary DNA)

DNA:脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic Acid)

dNTPs:4 种脱氧核糖核苷三磷酸混合物(Deoxyribonucleoside Triphosphates)

EDTA:乙二胺四乙酸(Ethylenediaminetetraacetic Acid)

enJSRV:内源性绵羊肺腺瘤病毒(Endogenous Jaagsiekte Sheep Retrovirus)

ERV:内源性逆转录病毒(Endogenous Retrovirus)

JSRV:绵羊肺腺瘤病毒(Jaagsiekte Sheep Retrovirus)

NBT:四唑氮蓝(Nitro-Blue-Tetrazolium)

OPA:绵羊肺腺瘤病(Ovine Pulmonary Adenomatosis)

PCR:聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction)