

WS

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 10058—2026

脊髓灰质炎野病毒和疫苗衍生病毒  
鉴定技术

Technology for identification of wild poliovirus and vaccine - derived poliovirus

2026-06-16 发布

2026-12-01 实施

国家疾病预防控制局 发布



## 目 次

前言 .....	III
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
4 缩略语 .....	1
5 WPV 和 VDPV 鉴定流程 .....	2
5.1 WPV 和 VDPV 鉴定流程图 .....	2
5.2 实验室生物安全 .....	2
6 WPV 和 VDPV 鉴定步骤 .....	3
6.1 标本的采集和运输 .....	3
6.2 标本的处理 .....	3
6.3 病毒分离 .....	3
6.4 ITD 筛选 .....	4
6.5 <i>VPI</i> 区核苷酸序列测定 .....	4
6.6 序列比对鉴定 WPV 和 VDPV .....	4
附录 A（规范性） 粪便标本处理标准操作流程 .....	5
附录 B（规范性） 脊髓灰质炎病毒型内鉴定标准操作流程 .....	7
附录 C（规范性） 脊髓灰质炎病毒 <i>VPI</i> 区核苷酸序列测定标准操作流程 .....	11
参考文献 .....	16



## 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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由国家疾病预防控制标准委员会传染病标准专业委员会提出，由国家疾病预防控制局归口。

本文件起草单位：中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所、江西省疾病预防控制中心、山东省疾病预防控制中心、福建省疾病预防控制中心、云南省疾病预防控制中心、辽宁省疾病预防控制中心。

本文件主要起草人：严冬梅、张勇、祝双利、熊英、陶泽新、杨秀惠、张杰、王艳、朱晖、李晓嫫、王东艳、杨倩、冀天娇、宋洋。



# 脊髓灰质炎野病毒和疫苗衍生病毒 鉴定技术

## 1 范围

本文件规定了脊髓灰质炎野病毒和疫苗衍生病毒的鉴定技术。  
本文件适用于从事疾病预防控制的医疗卫生及科研机构对脊髓灰质炎病毒的鉴定。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 19489 实验室 生物安全通用要求  
WS 233 病原微生物实验室生物安全通用准则  
WS 294 脊髓灰质炎诊断  
WS/T 852 感染性物质运输标准

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**Sabin 株 Sabin strain**  
脊髓灰质炎病毒减毒株，为疫苗原型株。

### 3.2

**脊髓灰质炎疫苗类似株 Sabin like strain; SL**  
与Sabin株相比，*VPI*编码区核苷酸变异率 $\leq 1\%$ （II型脊髓灰质炎病毒 $\leq 0.6\%$ ）的脊髓灰质炎病毒。

### 3.3

**脊髓灰质炎野病毒 wild poliovirus**  
与Sabin株相比，*VPI*编码区核苷酸变异率 $\geq 15\%$ 的脊髓灰质炎病毒。

### 3.4

**疫苗衍生脊髓灰质炎病毒 vaccine-derived poliovirus**  
与Sabin株相比，*VPI*编码区核苷酸变异率 $> 1\%$ （II型脊髓灰质炎病毒 $> 0.6\%$ ）且 $< 15\%$ 的脊髓灰质炎病毒。

### 3.5

**型内鉴定 intratypic differentiation**  
脊髓灰质炎病毒分为I型、II型和III型共3个血清型，型内鉴定指同一血清型内区分脊髓灰质炎野病毒、疫苗衍生脊髓灰质炎病毒和脊髓灰质炎疫苗类似株。

### 3.6

**L20B 阳性分离物 L20B positive isolate**  
在L20B细胞上进行病毒分离所获得的致细胞病变效应的阳性分离物。

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。  
BSL-2: 生物安全防护水平二级（Biosafety level-2）  
CPE: 致细胞病变效应（Cytopathic effect）  
EV: 肠道病毒（Enterovirus）  
ITD: 型内鉴定（Intratypic differentiation）

L20B: 表达人类脊髓灰质炎病毒受体的小鼠L细胞系 (Mouse L cells expressing the human poliovirus receptor)

NEV: 非肠道病毒 (Non enterovirus)

NPEV: 非脊髓灰质炎肠道病毒 (Non-polio enterovirus)

NSL: 非脊髓灰质炎疫苗类似株 (Non Sabin like)

PV: 脊髓灰质炎病毒 (Poliovirus)

PVn: I型、II型和III型脊髓灰质炎病毒

RD: 人横纹肌肉瘤细胞系 (Rhabdomyosarcoma)

SL: 脊髓灰质炎疫苗类似株 (Sabin like)

SLn: I型、II型和III型脊髓灰质炎疫苗类似株

VDPV: 疫苗衍生脊髓灰质炎病毒 (Vaccine derived poliovirus)

VDPVn: I型、II型和III型疫苗衍生脊髓灰质炎病毒

WPV: 脊髓灰质炎野病毒 (Wild poliovirus)

WPVn: I型、II型和III型脊髓灰质炎野病毒

## 5 WPV 和 VDPV 鉴定流程

### 5.1 WPV 和 VDPV 鉴定流程图

粪便标本是脊髓灰质炎病毒鉴定最常用的标本类型, 本文件以粪便标本为例说明WPV和VDPV鉴定流程, 其他类型的标本可参照执行。粪便标本的WPV和VDPV鉴定流程如图1所示。

### 5.2 实验室生物安全

根据《人间传染的病原微生物目录》(国卫科教发〔2023〕24号)规定, 鉴定流程中的所有操作应在BSL-2实验室进行。经此流程鉴定出的脊髓灰质炎野病毒和II型脊髓灰质炎病毒的病毒分离物操作应在BSL-3条件下进行, I型和III型脊髓灰质炎疫苗株和VDPV的病毒分离物应在BSL-2条件下进行。实验室生物安全要求应符合GB 19489和WS 233的规定。

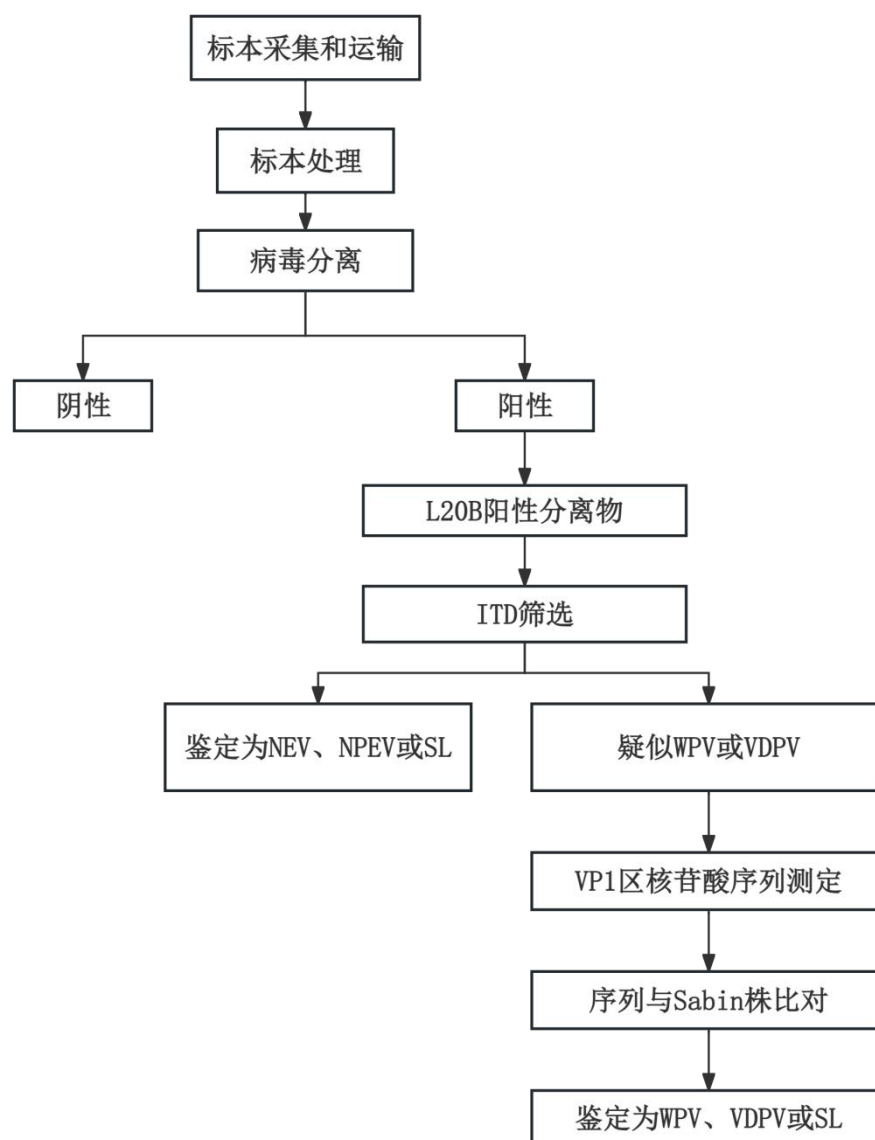


图1 WPV 和 VDPV 鉴定流程图

## 6 WPV 和 VDPV 鉴定步骤

### 6.1 标本的采集和运输

采集粪便标本用于脊髓灰质炎病毒分离，每份标本质量大于或等于5 g（约为成人的大拇指末节大小），装入一次性采便管或采便盒中。根据WS/T 852和《人间传染的病原微生物目录》的规定，应参照UN 3373（B类感染性物质）的要求，采用B类包装对标本进行冷藏运输。

### 6.2 标本的处理

粪便标本在进行病毒分离之前应进行处理，具体操作按附录A。

### 6.3 病毒分离

处理后的粪便悬液应同时接种到L20B和RD两种细胞系上。病毒分离具体操作及L20B和RD两种细胞系的检测按WS 294的规定。

#### 6.4 ITD 筛选

ITD包括前后两个rRT-PCR实验，分别为ITD rRT-PCR和VDPV rRT-PCR。首先对L20B阳性分离物进行ITD rRT-PCR，鉴定脊髓灰质炎病毒和其血清型别，同时筛选疑似WPV。随后进行VDPV rRT-PCR，筛选疑似VDPV。ITD的具体操作按附录B。

#### 6.5 *VPI* 区核苷酸序列测定

对ITD筛选到的疑似WPV或VDPV进行完整的*VPI*区（I型、II型和III型脊髓灰质炎病毒*VPI*区域长度分别为906nt、903nt和900nt）核苷酸序列测定，该方法是鉴定WPV和VDPV的金标准方法。根据WS 294规定，粪便标本进行病毒分离时，传代次数 $\leq 5$ 次，随即进行*VPI*区核苷酸序列测定，防止病毒在扩增过程中产生随机突变位点。对单一血清型的脊髓灰质炎病毒*VPI*区核苷酸序列测定的具体操作按附录C。

#### 6.6 序列比对鉴定 WPV 和 VDPV

采用生物信息学软件对比样品与Sabin株的*VPI*区核苷酸序列，按照下述标准鉴定WPV、VDPV和SL。

- 属于血清型I型且与 Sabin1 的核苷酸变异率 $\geq 15\%$ （ $\geq 136$ 个 nt 差异）的脊髓灰质炎病毒为 WPV1。
- 属于血清型I型且与 Sabin1 的核苷酸变异率 $> 1\%$ （ $\geq 10$ 个 nt 差异）且 $< 15\%$ （ $\leq 135$ 个 nt 差异）的脊髓灰质炎病毒为 VDPV1。
- 属于血清型I型且与 Sabin1 的核苷酸变异率 $\leq 1\%$ （ $\leq 9$ 个 nt 差异）的脊髓灰质炎病毒为 SL1。
- 属于血清型II型且与 Sabin2 的核苷酸变异率 $\geq 15\%$ （ $\geq 136$ 个 nt 差异）的脊髓灰质炎病毒为 WPV2。
- 属于血清型II型且与 Sabin2 的核苷酸变异率 $> 0.6\%$ （ $\geq 6$ 个 nt 差异）且 $< 15\%$ （ $\leq 135$ 个 nt 差异）的脊髓灰质炎病毒为 VDPV2。
- 属于血清型II型且与 Sabin2 的核苷酸变异率 $\leq 0.6\%$ （ $\leq 5$ 个 nt 差异）的脊髓灰质炎病毒为 SL2。
- 属于血清型III型且与 Sabin3 的核苷酸变异率 $\geq 15\%$ （ $\geq 135$ 个 nt 差异）的脊髓灰质炎病毒为 WPV3。
- 属于血清型III型且与 Sabin3 的核苷酸变异率 $> 1\%$ （ $\geq 10$ 个 nt 差异）且 $< 15\%$ （ $< 135$ 个 nt 差异）的脊髓灰质炎病毒为 VDPV3。
- 属于血清型III型且与 Sabin3 的核苷酸变异率 $\leq 1\%$ （ $\leq 9$ 个 nt 差异）的脊髓灰质炎病毒为 SL3。



#### A. 4. 2 含有抗生素的PBS (+) 配制

将 $1 \times 10^6$ 单位的结晶青霉素和1 g硫酸链霉素溶解于100 mL无菌的PBS (+) 中，分装成5 mL每管冻存于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 。使用时，取5mL母液加到500 mL完全PBS中，使青霉素、链霉素最终含量分别为100单位/mL和 $100\text{ }\mu\text{g /mL}$ ， $2\text{ }^\circ\text{C}$ ~ $8\text{ }^\circ\text{C}$ 可保存一周。

## 附录 B (规范性) 脊髓灰质炎病毒型内鉴定标准操作流程

### B.1 型内鉴定 (ITD) 标准操作流程

ITD标准操作流程如图B.1所示。ITD所包括的ITD rRT-PCR和VDPV rRT-PCR两个实验的实验步骤和结果判读分别见B.3和B.4。

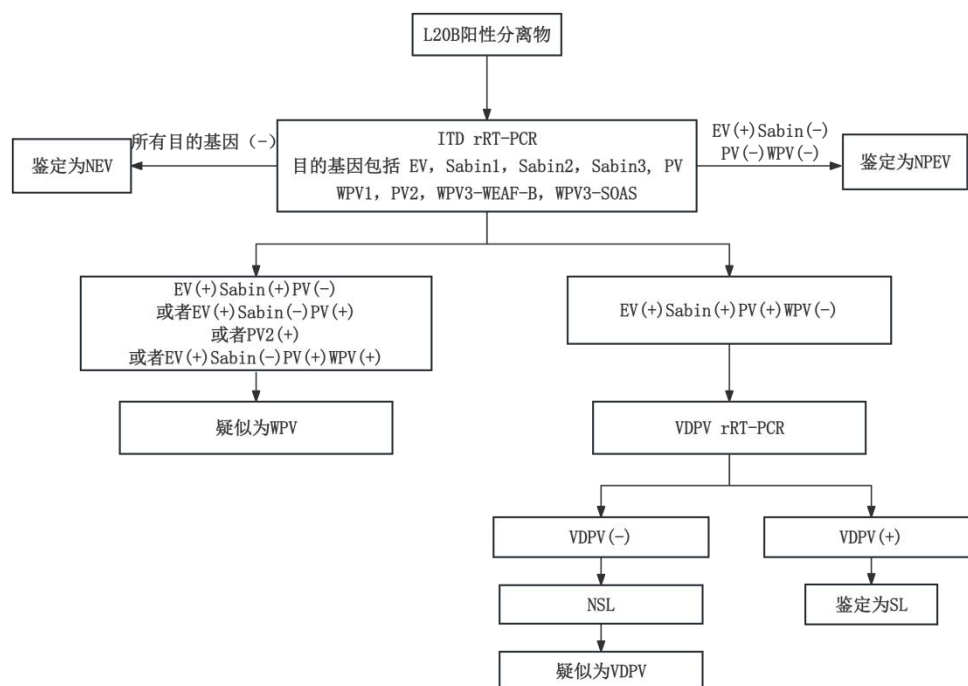


图 B.1 脊髓灰质炎病毒 ITD 操作流程

### B.2 实验材料

#### B.2.1 试剂

ITD rRT-PCR和VDPV rRT-PCR可采用商品化一步法rRT-PCR试剂盒。

#### B.2.2 阳性对照

ITD rRT-PCR和VDPV rRT-PCR的阳性对照均为已知的待检目的基因核酸。

#### B.2.3 阴性对照

ITD rRT-PCR和VDPV rRT-PCR的阴性对照均为无RNA酶的去离子水。

#### B.2.4 ITD rRT-PCR引物和探针

ITD rRT-PCR引物和探针共9套，分别检测目的基因EV、Sabin1、Sabin2、Sabin3、PV、WPV1、PV2、WPV3的WEAF基因型 (WPV3-WEAF) 和WPV3的SOAS基因型 (WPV3-SOAS)。参考引物和探针序列及所对应的荧光报告基因见表B.1。

表 B.1 ITD rRT-PCR 引物和探针

目的基因	引物和探针 (荧光基团)	核苷酸序列 (5'→3')
<i>EV</i>	上游引物 <i>PanEV</i>	GGC CCC TGA ATG CGG CTA ATC C
	探针 <i>PanEV</i> (VIC)	CCG ACT ACT TTG GGW GTC CGT GT
	下游引物 <i>PanEV</i>	GCG ATT GTC ACC ATW AGC AGY CA
<i>Sabin 1</i>	上游引物 <i>Sabin1</i>	AGG TCA GAT GCT TGA AAG C
	探针 <i>Sabin 1</i> (CY5)	CGC CCC CAC CGT TTC ACG GA
	下游引物 <i>Sabin 1</i>	CCA CTG GCT TCA GTG TTT
<i>Sabin 2</i>	上游引物 <i>Sabin 2</i>	CCG TTG AAG GGA TTA CTA AA
	探针 <i>Sabin2</i> (FAM)	ATT GGT TCC CCC GAC TTC CAC CAA T
	下游引物 <i>Sabin 2</i>	CGG CTT TGT GTC AGG CA
<i>Sabin 3</i>	上游引物 <i>Sabin 3</i>	AGG GCG CCC TAA CTT T
	探针 <i>Sabin 3</i> (ROX)	TCA CTC CCG AAG CAA CAG
	下游引物 <i>Sabin 3</i>	TTA GTA TCA GGT AAG CTA TC
<i>PV</i>	上游引物 <i>PanPV</i>	TTG GAG TTC TTC ACI TAI TCI MGI TTY GAY ATG
	探针 <i>PanPV</i> (FAM) <sup>a</sup>	TGR TTN ARI GCR TGI CCR TTR TT
	下游引物 <i>PanPV</i>	GGA GCT CCG GGT GGG AYR TAC ATI ATY TGR TAI AC
<i>WPV1</i>	上游引物 <i>WPV1-WEAF</i>	GTA CAA ACC AGT CAY GTN AT
	上游引物 <i>WPV1-SOAS</i>	CGT ACA GAC TAG RCA YGT NAT
	探针 <i>WPV1</i> (FAM)	CAT WAT GGT TAC RCA MGC ACC T
	下游引物 <i>WPV1</i>	GAG AAT AAY TTG TCY TTK GAY GT
<i>PV2</i>	上游引物 <i>PV2</i>	GAT GCA AAY AAC GGI CAT GC
	探针 <i>PV2</i> (FAM)	ATG ACT ATA CGT GGC AGA C
	探针 <i>PV2 -1D</i> (FAM)	CRC CKA TIC CTG GYA
	下游引物 <i>PV2</i>	TCA TAA AAG TGG GAR TAC GCR TT
	下游引物 <i>PV2-1C</i>	TCG TAA AAA TGA GAA TAT GCA TT
<i>WPV3-WEAF</i>	上游引物 <i>WPV3-SOAS</i>	CAG GGA GTA GAT GAY CTN AT
	上游引物 <i>WPV3-WEAF</i>	CAG GGG GTT GAT GAY TTR AT
	探针 <i>WPV3</i> (CY5)	CNC ARA ACA GYC TTC CGG ATA CC
	下游引物 <i>WPV3</i>	ACK GTG TCT GAY GGN AC
<i>WPV3-SOAS</i>	上游引物 <i>WPV3-SOAS 6S</i>	GTY RTA CAR CGR CGY AGY AGR A
	探针 <i>WPV3-SOAS</i> (FAM)	TTC TTY GCA AGI GGR GCR TGY GT
	下游引物 <i>WPV3-SOAS 5A</i>	TCY TTR TAI GTR ATG CGC CAA G

<sup>a</sup> 在 *PanPV* 探针序列 5'端第 8 个位置添加了 Zen™作为第二个内部淬灭剂。

### B.2.5 VDPV rRT-PCR引物和探针

VDPV rRT-PCR引物和探针为*VDPV1*和*VDPV3*。参考引物和探针序列及所对应的荧光报告基团见表 B.2。

表 B.2 VDPV rRT-PCR 引物和探针

目的基因	引物和探针 (荧光基团)	核苷酸序列 (5'→3')
<i>VDPV1</i>	上游引物 <i>VDPV1</i>	CATGCGTGGCCATTATA
	探针 <i>VDPV1</i> (FAM)	CACCAAGAATAAGGATAAG
	下游引物 <i>VDPV1</i>	TAAATTCCATATCAAATCTA
<i>VDPV3</i>	上游引物 <i>VDPV3</i>	CAT TTA CAT GAA ACC CAA AC
	探针 <i>VDPV3</i> (FAM)	AGG ACC AAC TTG GAC
	下游引物 <i>VDPV3</i>	TGG TCA AAC CTT TCT CAG A

## B.3 实验步骤

### B.3.1 准备样品

取100  $\mu\text{L}$  L20B阳性分离物置于1.5 mL离心管中，在3000 g、室温条件下离心2min，吸取上清液备用，无需提取病毒RNA。

### B.3.2 配制反应体系

不同的商品化一步法rRT-PCR试剂盒配制反应体系不同，具体操作按照试剂盒的说明书进行。以一般通用方法为例，反应体系的配制见表B.3。

表 B.3 反应体系配制（19  $\mu\text{L}$  体系）

成分	浓度	体积 $\mu\text{L}$
一步法主液	2×	10
引物	0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0.5
探针	0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0.5
无 RNA 酶的去离子水	—	8

### B.3.3 加样

取1  $\mu\text{L}$ 的L20B阳性分离物上清液（或1  $\mu\text{L}$ 阳性对照或1  $\mu\text{L}$ 阴性对照）加入上述配制的反应体系中。

### B.3.4 设置反应程序

设置反应程序如下：50  $^{\circ}\text{C}$ 反应30min；95  $^{\circ}\text{C}$ 预变性1min；扩增反应95  $^{\circ}\text{C}$ 15s，50  $^{\circ}\text{C}$ 45s，72  $^{\circ}\text{C}$ 5s，共40个循环；4  $^{\circ}\text{C}$ 保持。不同的荧光定量PCR仪扩增的程序会有一些差异，可根据所使用的仪器对反应程序进行适当调整。

## B.4 结果判读

在分析样品的数据之前，应先检查阳性对照和阴性对照。当阴性对照和阳性对照成立时判断结果，Ct值 $<28$ 时判断为阳性， $28 \leq \text{Ct值} < 30$ 时需要提取RNA进行重新检测，Ct值 $\geq 30$ 或没有峰值时判断为阴性。当对照不成立时，需重新检测。

## B.5 结果报告

综合ITD rRT-PCR和VDPV rRT-PCR的结果作为ITD的最终报告结果，见表B.4。

表 B.4 ITD 结果报告

ITD rRT-PCR 结果									ITD rRT-PCR 结果报告	是否进行 VDPV rRT-PCR	VDPV rRT-PCR 结果	VDPV rRT-PCR 结果报告	ITD 结果报告(综合 ITD rRT-PCR 和 VDPV rRT-PCR 的 结果)	下一步行动
<i>EV</i>	<i>Sabin1</i>	<i>Sabin2</i>	<i>Sabin3</i>	<i>PV</i>	<i>WPV1</i>	<i>PV2</i>	<i>WPV3-WEAF</i>	<i>WPV3-SOAS</i>						
-	-	-	-	-	-	-	-	-	NEV	否	—	—	NEV	报告 NEV
+	-	-	-	-	-	-	-	-	NPEV	否	—	—	NPEV	报告 NPEV
+	+	-	-	-	-	-	-	-	不成立	否	—	—	不成立	重复一次后如果 依旧不成立, 应进行 测序 <sup>a</sup>
+	-	-	-	+	-	-	-	-	无法判断	否	—	—	无法判断	测序
+	-	+/-	-	+	-	+	-	-	PV2	否	—	—	PV2	测序
+	-	-	-	+	+	-	-	-	NSL1	否	—	—	NSL1	测序
+	-	-	-	+	-	-	+	+	NSL3	否	—	—	NSL3	测序
+	+	-	-	+	-	-	-	-	SL1	是	+	SL1	SL1	报告 SL1
+	+	-	-	+	-	-	-	-	SL1	是	-	NSL1	SL1-不一致 <sup>b</sup>	测序
+	-	-	+	+	-	-	-	-	SL3	是	+	SL3	SL3	报告 SL3
+	-	-	+	+	-	-	-	-	SL3	是	-	NSL3	SL3-不一致	测序

<sup>a</sup> *VPI* 区核苷酸测序。  
<sup>b</sup> 代表 ITD-rRT-PCR 的结果为 SL, 而 VDPV rRT-PCR 的结果为 NSL, 两个实验的结果不一致。

附 录 C  
(规范性)  
脊髓灰质炎病毒 VP1 区核苷酸序列测定标准操作流程

### C.1 VP1 区核苷酸序列测定操作流程

脊髓灰质炎病毒 VP1 区核苷酸序列测定是鉴定 WPV 和 VDPV 的金标准，具体操作流程见图 C.1。

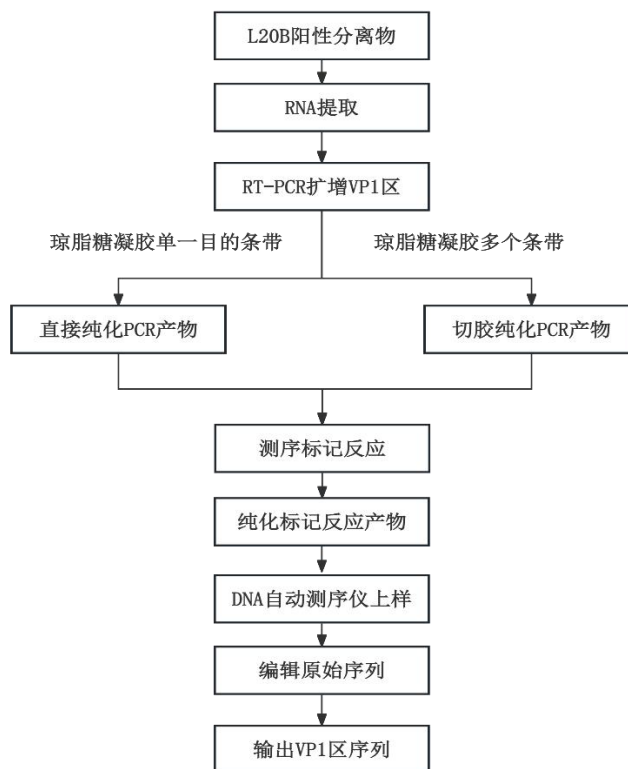


图 C.1 脊髓灰质炎病毒 VP1 区核苷酸序列测定流程图

### C.2 RNA 提取

#### C.2.1 实验材料

商品化 RNA 提取试剂盒。

#### C.2.2 实验步骤

C.2.2.1 L20B 阳性分离物冻融两次，在 13000 g 的条件下离心 1min，收集上清液，移至不含 RNA 酶的离心管中。

C.2.2.2 使用商品化的试剂盒或自动核酸提取仪提取上清液中的 RNA，操作方法参照试剂盒说明书或自动核酸提取仪使用说明。

### C.3 RT-PCR 扩增

#### C.3.1 实验材料

C.3.1.1 商品化 RT-PCR 反应试剂盒。

C.3.1.2 阳性对照：脊髓灰质炎病毒 RNA。

C.3.1.3 阴性对照：无 RNA 酶的去离子水。

## C.3.1.4 RT-PCR 引物参见表 C.1。

表 C.1 RT-PCR 引物

名称	所在基因	上游/下游	核苷酸序列 (5'→3')	碱基位置所用参考病毒	引物位置
Y7R	<i>VP3</i>	上游	GGTTTTGTGTCAGCITGYAAYGA	Sabin 1 GenBank AY184219	2399~2421
Q8	<i>2A</i>	下游	AAGAGGTCTCTRTTCCACAT	Sabin 1 GenBank AY184219	3504~3485

## C.3.2 实验步骤

## C.3.2.1 配制反应体系

不同的商品化RT-PCR反应试剂盒配制体系不同，具体操作按照试剂盒的说明书进行。以一般通用方法为例，参见表C.2。

表 C.2 反应体系配制 (20  $\mu$ L 体系)

成分	浓度	体积/ $\mu$ L
Buffer	2 $\times$	12.5
逆转录酶和 <i>Taq</i> DNA 聚合酶	5 U/ $\mu$ L	1
上游引物	0.1 $\mu$ g/ $\mu$ L	0.5
下游引物	0.1 $\mu$ g/ $\mu$ L	0.5
无 RNA 酶的去离子水	—	5.5

## C.3.2.2 加样

取5  $\mu$ L提取的阳性分离物RNA (或5  $\mu$ L阳性对照或5  $\mu$ L阴性对照) 加入上述配制的反应体系中。

## C.3.2.3 设置反应程序

设置反应程序如下：50  $^{\circ}$ C反应30min；94  $^{\circ}$ C预变性2min；扩增反应94  $^{\circ}$ C30s，50  $^{\circ}$ C30s，72  $^{\circ}$ C1min 20s，共40个循环；72  $^{\circ}$ C7min；4  $^{\circ}$ C保持。不同的荧光定量PCR仪扩增的程序会有一些差异，可根据所使用的仪器对反应程序进行适当调整。

## C.3.3 凝胶电泳

使用含有GelRed或其他荧光染料的琼脂糖凝胶对3  $\mu$ L~5  $\mu$ L PCR产物进行电泳，在凝胶成像仪中观察并记录结果。将PCR产物的剩余部分置于冰上或4  $^{\circ}$ C，用于下一步PCR产物的纯化。

## C.4 PCR 产物纯化

## C.4.1 纯化方法选择原则

PCR产物根据电泳结果，选择直接纯化或者切胶纯化。如果电泳结果只有一个1.1 kb的目的条带，可采用直接纯化。如果凝胶电泳结果除了1.1 kb的目的片段外还有其他非特异的条带，应采用切胶纯化。

## C.4.2 直接纯化

## C.4.2.1 实验材料

商品化的PCR产物纯化试剂盒。

## C.4.2.2 实验步骤

按照商品化的PCR产物纯化试剂盒说明书，对保存在4  $^{\circ}$ C的剩余PCR产物进行纯化，去除产物中的引物、核苷酸、聚合酶和盐。选择任何商品化试剂盒都应提供大于90%的DNA回收率。用纯化后的PCR产物作为模板进行下一步的标记反应。

## C.4.3 切胶纯化

### C.4.3.1 实验仪器和材料

- C.4.3.1.1 电泳仪。
- C.4.3.1.2 微波炉。
- C.4.3.1.3 手术刀。
- C.4.3.1.4 紫外透射仪。
- C.4.3.1.5 防紫外线护目镜或面罩。
- C.4.3.1.6 琼脂糖凝胶。
- C.4.3.1.7 GelRed。
- C.4.3.1.8 商品化的切胶回收 PCR 产物纯化试剂盒。

### C.4.3.2 实验步骤

- C.4.3.2.1 将约 50  $\mu\text{L}$  的 PCR 产物加入 1 cm 厚的 1.7%琼脂糖凝胶中，然后电泳 30min。
- C.4.3.2.2 将凝胶放入 GelRed 溶液中染色约 20min。
- C.4.3.2.3 在紫外透射仪上将 PCR 产物所在的琼脂糖凝胶块用手术刀小心割下，放入新的 1.5 mL 的离心管中。
- C.4.3.2.4 称取切下来的琼脂糖凝胶块的质量，按照商品化的切胶回收 PCR 产物纯化试剂盒说明书进行 PCR 产物的纯化。用纯化后的 PCR 产物作为模板进行下一步的标记反应。

## C.5 测序标记反应

### C.5.1 实验材料

- C.5.1.1 商品化的标记反应试剂盒。
- C.5.1.2 标记反应引物，见表 C.3。

表 C.3 标记反应引物

名称	所在基因	上游/下游	核苷酸序列 (5'→3')	碱基位置所用参考病毒	引物位置
PV4S	<i>VP1</i>	上游	ACITAYAARGAYACIGTICA	Sabin2 GenBank AY184220	2810~2829
PV1A	<i>VP1</i>	下游	TTIAIIGCRTGICCRTRTT	Sabin1 GenBank AY184219	2934~2915
Y7	<i>VP3</i>	上游	GGGTTTGTGTGCAGCCTGTAATGA	Sabin1 GenBank AY184219	2399~2421
Q8	<i>2A</i>	下游	AAGAGGTCTCTRTCCACAT	Sabin1 GenBank AY184219	3504~3485

### C.5.2 实验步骤

#### C.5.2.1 配制反应体系

每个纯化过的PCR产物作为DNA模板进行4条引物标记，测序标记反应体系见表C.4。

表 C.4 测序标记反应体系 (20 $\mu\text{L}$  体系)

成分	浓度	体积 $\mu\text{L}$
标记试剂	—	2
纯化后的 PCR 产物	—	2~8 (根据目的条带明亮程度选择用量)
测序缓冲液	5 $\times$	2
引物	0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	1
去离子水	—	补足至 20

#### C.5.2.2 设置反应程序

设置反应程序如下：96  $^{\circ}\text{C}$ 预变性1min；扩增反应：94  $^{\circ}\text{C}$ 10s，50  $^{\circ}\text{C}$ 5s，60  $^{\circ}\text{C}$ 4min，共25个循环；4 $^{\circ}\text{C}$ 保持。不同的荧光定量PCR仪扩增的程序会有一些差异，可根据所使用的仪器对反应程序进行适当调整。

## C.6 纯化标记反应产物

### C.6.1 原理

离心柱式方法纯化标记反应产物的原理是离心柱内的凝胶保留了多余的标记试剂、dNTPs和不需要的盐，允许荧光标记的PCR产物流过。

### C.6.2 实验仪器和材料

#### C.6.2.1 微量离心机。

#### C.6.2.2 葡聚糖 Sephadex G-50 粉末。

#### C.6.2.3 离心柱。

### C.6.3 实验步骤

C.6.3.1 电子秤称量 2.7 g Sephadex G-50 粉末，置于 50 mL 离心管中，加去离子水至 50 mL 后充分混匀，静置 30min。

C.6.3.2 用移液器将混匀的 Sephadex G-50 混悬液 900  $\mu$ L 加入离心柱中，静置 10min。

C.6.3.3 加压或离心，使多余的液体从离心柱的底部流出。

C.6.3.4 将离心柱放在 2 mL 收集管上，于室温下 3000 r/min，离心 2min。

C.6.3.5 弃掉收集管，将离心柱放在 1.5 mL 无菌离心管上，向凝胶的斜面中央加入 20  $\mu$ L 标记产物，3000 r/min 离心 2min，1.5 mL 离心管中的液体即为纯化后的标记产物。

## C.7 测序仪上样

根据DNA自动测序仪的使用说明，将纯化后的标记反应产物上样到测序仪中进行序列测定。

## C.8 编辑原始序列

### C.8.1 检查原始峰图质量

#### C.8.1.1 合格的原始峰图

合格的原始峰图应具有峰形尖锐、基线平稳、无重叠峰和背景噪声小的特点。

#### C.8.1.2 不合格的原始峰图

如果原始峰图出现了多个重叠的信号峰，或显著的拖尾现象（峰宽度延长）则为不合格的峰图。

### C.8.2 修剪序列

原始峰图的5'端和3'端分别为上游和下游引物的位置，若出现混杂的碱基或存在较高的背景噪声，应将其剪切掉。

### C.8.3 组装序列

将剪切后的Y7、PV1A、PV4S和Q8序列利用末端重叠的方法组装成一条完整序列。合格的组装指重叠部分碱基匹配度不低于85%，并且重叠部分长度应不少于20个碱基对。同时，无论上游还是下游引物扩增的序列应均能覆盖整个VPI区域，即每个碱基位置至少有一条上游和一条下游引物的序列进行校对。

### C.8.4 校对碱基并输出共有序列

序列组装后应对序列之间重叠区域不一致的碱基进行校对，以确保不同序列同一位置碱基对的一致性。

### C.8.5 修剪序列长度

将输出的共有序列与参考株 Sabin1 VPI（GenBank No.AY184219）、Sabin2 VPI（GenBank No.AY184220）或 Sabin3 VPI（GenBank No.AY184221）进行比对，调整重叠组装匹配度至75%，并根据

据参考株*VPI*区序列长度（PV1包含906个碱基，PV2包含903个碱基，PV3包含900个碱基）修剪共有序列，获得完整的*VPI*区核苷酸序列。

### 参 考 文 献

- [1] World Health Organization. Polio Laboratory Manual 4th edition[M]. Geneva: World Health Organization, 2004.
- [2] Kilpatrick D R, Iber J C, Chen Q, et al. Poliovirus serotype-specific VP1 sequencing primers [J]. Journal of virological methods, 2011, 174(1-2): 128-130.
- [3] Gerloff N, Sun H, Mandelbaum M, et al. Diagnostic assay development for poliovirus eradication [J]. Journal of clinical microbiology, 2018, 56(2): 10-1128.
- [4] Sun H, Harrington C, Gerloff N, et al. Validation of a redesigned pan-poliovirus assay and real-time PCR platforms for the global poliovirus laboratory network[J]. PLoS One, 2021, 16(8): e0255795.
- [5] Global Polio Eradication Initiative (GPEI). Reporting and classification of vaccine-derived polioviruses: GPEI guidelines[R]. Geneva: World Health Organization, 2015.
- [6] 国家卫生健康委员会. 人间传染的病原微生物目录 [Z]. 2023年8月18日.
-