ICS 11.220
B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA 25-2020

口蹄疫病毒O型、A型和Asia1型分型荧光RT-PCR检测方法

Real-time RT-PCR for detection of foot and mouth disease virus serotype O, A and Asia1

中国兽医协会
CVMA

2020-12-22 发布　　2020-12-22 实施

中 国 兽 医 协 会　发布

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提出并归口。

本文件起草单位：中国农业科学院兰州兽医研究所、中国动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人：刘湘涛、何继军、林密、马维民、杨光、杨亚民、高鹏程、靳野、郑海学、郭建宏、王传彬、刘玉良

中国兽医协会
CVMA

口蹄疫病毒O型、A型和Asia1型分型荧光RT-PCR检测方法

1 范围

本文件规定了口蹄疫病毒O型、A型和Asia1型分型荧光RT-PCR检测方法的试剂、主要仪器设备、操作步骤、结果判定和注意事项。

本文件适用于疑似口蹄疫临床发病动物水泡皮、水泡液、反刍动物食道-咽部分泌物（O-P液）、动物组织和病毒培养物中口蹄疫病毒核酸检测。

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/T 18935 口蹄疫诊断技术

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 试剂

4.1 总 RNA 提取试剂

4.1.1 无核酸酶水：将焦碳酸二乙酯（DEPC）按 0.1%的量（w/v）加入三蒸水中制备的无 DNA 酶和 RNA 酶水（按照附录 A.1 配制）。宜使用商品化无核酸酶水。

4.1.2 Trizol 裂解液：商品化试剂，4 ℃保存。

4.1.3 三氯甲烷：分析纯，常温保存。

4.1.4 异丙醇：分析纯，常温保存。使用前预冷至-20 ℃。

4.1.5 75%乙醇：无水乙醇（分析纯）与无核酸酶水按体积比 3:1 配制而成。使用前预冷至-20 ℃。

4.1.6 其他商品化 RNA 提取试剂：可采用其他商品化 RNA 提取方法，如采用离心柱、磁珠法、自动化核酸提取仪等提取 RNA，分别使用配套试剂。

4.2 Real-time RT-PCR 试剂

2×一步 RT-PCR 缓冲液、聚合酶 Ex Taq HS (5 U/μL)、Prime Script 反转录酶混合液、RNA 酶抑制剂（40 U/μL）。

4.3 引物和探针序列

O 型上游引物序列为：5’-GCTCTTTCCCCACCAGTTCA-3’；下游引物序列为：5’-TTGTACTGGTCGTAGCGGTTGA-3’；探针序列为：5’-CGGACGAACATGACGGCGCACA-3’，其5’端和 3’端分别标记 FAM 和 BHQ。

A 型上游引物序列为：5’-TTGCACTTCATGTTTACTGGCT-3’；下游引物序列为：5’-CGTGTCCCATTCTGCGTGG-3；探针序列为：5’-ACGCCACCGGACACACCTGAGAA-3’，其 5’端和 3’端分别标记 CY5 和 BHQ。

Asia1 型上游引物序列为：5’-CCGACGGCTTCACACTGA-3’；下游引物序列为：5’-AGAAGTAGTACGTCGCAGACC-3’；探针序列为：5’-CTCACCCAGCCCAAGAGCACCC-3’，其 5’端和 3’端分别标记 HEX 和 BHQ。

配制反应体系时，3 条上游引物、3 条下游引物和 3 条探针分别等量混合，成为混合上游引物、混合下游引物和混合探针。

4.4 阳性对照和阴性对照

4.4.1 阳性对照：灭活后的口蹄疫病毒培养物，-20 ℃保存备用。
4.4.2 阴性对照：可使用无核酸酶水。

5 主要仪器设备

荧光PCR仪（至少含FAM、CY5和HEX三种荧光信号）、组织匀浆器、高速台式冷冻离心机、生物安全柜等。

6 操作步骤

6.1 样品采集、保存

样品采集和保存按照GB/T 18935进行。

6.2 样品处理

6.2.1 生物安全要求：样品处理的实验室应符合 GB 19489。
6.2.2 组织样品处理：将采集的发病动物病料或组织，置组织匀浆器中充分研磨，用 0.04 mol/L PBS（pH 7.4）（按照附录 A.2 配置）制成 1:5~1:10 组织悬液，4 ℃浸毒 1 h，3000 r/min 离心 10 min，取上清液备用。
6.2.3 水泡液、O-P 液样品处理：直接用于检测。
6.2.4 病毒培养物：病毒接种本动物、实验动物后的发病病料等组织样品，按照 5.2.2 处理。病毒接种细胞培养物直接检测。

6.3 病毒 RNA 提取

6.3.1 若使用传统的 Trizol 裂解方法提取病毒 RNA，参照以下步骤进行操作：

a) 取已处理的待检样品、阳性对照和阴性对照各 200 μL，分别置于 1.5 mL 离心管中，每管加入 1000 μL Trizol 裂解液，充分混匀，室温静置 3 min~5 min。

b) 在每管中加入 200μL 三氯甲烷，涡旋震荡 15 s，室温下放置 2 min~3 min 后，4 ℃，12000 r/min，离心 10 min。

c) 吸取约 500 μL 上层水相，置于新的离心管中，加入等量异丙醇，充分混匀，室温静置 15 min。4 ℃，12000 r/min，离心 10 min，小心倒干液体，留下 RNA 沉淀。

d) 加 1000 μL 75%乙醇，颠倒洗涤沉淀，4 ℃，10000 r/min，离心 5 min，小心倒干液体，室温干燥 5 min~10 min。

e) 在每管中加 20 μL 无核酸酶水溶解 RNA。提取的 RNA 可立即用于荧光 RT-PCR 反应，也可-70 ℃冰箱保存备用。

6.3.2 若使用其他商品化 RNA 提取试剂盒，按说明书操作。

6.4 荧光 RT-PCR 检测

6.4.1 反应液配制，采用 25 μL 反应体系，扩增体系配制见表 1。

表1 扩增体系配制

2×一步 RT-PCR 缓冲液	12.5 μL
Ex Taq HS (5 U/μL)	0.5 μL
Prime Script RT Enzyme MixII	0.5 μL
混合上游引物(10 μmol/L)	0.5 μL
混合下游引物(10 μmol/L)	0.5 μL
混合探针（5 μmol/L)	1 μL
样品及对照 总 RNA	2 μL
无核酸酶水	7.5 μL
总体积	25 μL

6.4.2 扩增程序：42 ℃反转录 15 min；95 ℃预变性 3 min；95 ℃变性 10 s，60 ℃退火 30 s，40 次循环。探针检测设置 FAM、CY5 和 HEX 三种荧光信号。在退火结束时收集荧光。

7 结果判定

7.1 分析条件设置

基线以荧光PCR仪给出的默认值作为参考，阈值设定原则以阈值线设定于刚好超过阴性对照扩增曲线的最高点为准，不同荧光PCR仪可根据其噪音情况进行调整。

7.2 试验成立条件

阴性对照在FAM、CY5和HEX通道检测无Ct值且无特定扩增曲线，阳性对照在FAM、CY5和HEX通道检测Ct值≤25且有明显对数扩增曲线，二者均成立才可判定试验成立，否则试验无效。

7.3 判定标准

结果判定时，对FAM、CY5和HEX通道检测一一判定。

若FAM检测通道有对数扩增曲线，且Ct值≤30，可判样品为口蹄疫病毒O型核酸阳性；若Ct值＞30，可判样品为口蹄疫病毒O型核酸阴性。若CY5检测通道有对数扩增曲线，且Ct值≤30，可判样品为口蹄疫病毒A型核酸阳性；若Ct值＞30，可判样品为口蹄疫病毒A型核酸阴性。若HEX检测通道有对数扩

增曲线，且Ct值≤30，可判样品为口蹄疫病毒Asia1型核酸阳性；若Ct值＞30，可判样品为口蹄疫病毒Asia1型核酸阴性。若样品经扩增后，有2或3个检测通道同时有对数扩增曲线，且Ct值≤30，应按照GB/T 18935进一步复核。

8 注意事项

—实验室进行疑似口蹄疫样品检测，应严格遵守我国生物安全相关法律法规要求。

—本方法可用于我国主要口蹄疫流行毒株的检测，按照本方法检测为口蹄疫病毒核酸阳性的样品，应送有资质的实验室进一步诊断。

—核酸检测实验室应有分区，操作过程中，应防止核酸降解和交叉污染。

—实验所用试剂，按照规定温度保存和使用。

—实验废弃物按规定处理。

中国兽医协会
CVMA

附　录　A
（规范性）
溶液的配制

A.1 无核酸酶水

1 L 三蒸水中加入 1 mL DEPC，充分摇匀，37 ℃放置 12 h 以上，再经 121 ℃高压灭菌 15 min。分装备用。

A.2　0.04 mol/L PBS（pH 7.4）

预先配制 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液（PBS，pH 7.4）见表 A.1：

表 A1 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液配方

氯化钠（NaCl）	85.00 g
磷酸氢二钠（Na_2HPO_4）	15.49 g
磷酸二氢钠（NaH_2PO_4）	2.03 g
加蒸馏水至	1000 mL

0.04 mol/L PBS（pH 7.4）配制，见表 A.2：

表 A2 0.04 mol/L PBS

0.1 mol/L PBS	400 mL
蒸馏水	600 mL

121 ℃高压灭菌 30 min，室温或 4 ℃冰箱保存。

中国兽医协会 CVMA