ICS 65.020.30
CCS B 41

DB22

辽 宁 省 地 方 标 准

DB 22/T XXXX—XXXX

山羊痘和绵羊痘荧光 PCR 检测方法

Detection of goat pox and sheep pox by fluorescent PCR

（送审稿）

（本草案完成时间：2022.12.30）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX－XX－XX 发布　　XXXX－XX－XX 实施

辽宁省市场监督管理局　　发 布

目　　次

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　试剂材料和仪器设备 1
6　样品采集和处理 2
7　操作方法 3
8　结果判定 4
附录 A（规范性）　溶液配制 6
附录 B（资料性）　引物探针名称、序列 7
附录 C（资料性）　荧光 PCR 反应体系 8

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。

本文件由辽宁省农业农村厅提出并归口管理。

本文件起草单位：沈阳海关技术中心。

本文件主要起草人：耿庆华、林森、孟祥勇、啜微微、付洋、韩宏乾。

本文件发布实施后，任何单位和个人如有问题和意见建议，均可以通过来电和来函等方式进行反馈，我们将及时答复并认真处理，根据实际情况依法进行评估及复审。

归口管理部门通讯地址：辽宁省农业农村厅（沈阳市和平区太原北街2号），联系电话：024-23447862。

文件起草单位通讯地址：沈阳海关技术中心（辽宁省沈阳市沈河区东滨河路106号），联系电话：024-24123519。

山羊痘和绵羊痘荧光PCR检测方法

1 范围

本文件规定了山羊痘和绵羊痘荧光PCR检测的操作方法。

本文件适用于山羊痘和绵羊痘病毒的检测及其流行病学调查、诊断、检疫和监测。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

NY/T 576 绵羊痘和山羊痘诊断技术

NY/T 541 兽医诊断样品的采集、保存和运输技术规范

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DNA：脱氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid）

GTPV：山羊痘病毒（goat pox virus）

SPPV：绵羊痘病毒（sheep pox virus）

5 试剂材料和仪器设备

5.1 试剂材料

5.1.1 DNAzol，商品化 DNA 抽提试剂，于 4 ℃～8 ℃保存。

5.1.2 无水乙醇，-20℃预冷。

5.1.3 75 %乙醇，无水乙醇和双蒸水配制，-20℃预冷。

5.1.4 8 mM NaOH 溶液，配制见附录 A。

5.1.5 PBS 缓冲液，0.01 mol/L PBS， pH 7.4，配制见附录 A。

5.1.6 Taq 酶及 10 倍 Taq 酶反应缓冲液：Taq 酶浓度为 5 U/μL，Taq 酶反应缓冲液中 Mg2+浓度为 15 mM。

5.1.7 dNTPs：含 dATP、dGTP、dCTP、dTTP 各 10 mmol/L，-20 ℃保存，避免反复冻融。

5.1.8　引物和 TaqMan 探针，其序列见附录 B。

5.1.9　1.5 mL Eppendorf 管。

5.1.10　0.2 mL PCR 薄壁管或八联管。

5.1.11　山羊痘和绵羊痘病毒阳性对照样品：采用商品化山羊痘或绵羊痘病毒疫苗或接种了山羊痘和绵羊痘病毒的细胞悬液。

5.1.12　山羊痘和绵羊痘病毒阴性对照样品：采用 MDBK（牛肾细胞）细胞悬液或健康羊肉组织。

5.2　仪器设备

5.2.1　荧光 PCR 检测仪：ABI 7500 或功能相似的荧光 PCR 检测仪。

5.2.2　高速台式冷冻离心机：可控温至 4 ℃、离心速度可达 12000 r/min 以上。

5.2.3　组织研磨器或者研钵。

5.2.4　普通冰箱。

5.2.5　超低温冰箱：可控温至−70 ℃。

5.2.6　微量移液器：0.2μL～2 μL，1μL～10 μL，10μL～100 μL，20μL～200 μL，100μL～1000 μL，并配备与移液器匹配的吸头。

5.2.7　高压灭菌锅。

6　样品采集和处理

6.1　采样工具

6.1.1　手术刀、剪刀、镊子，经 160 ℃干热灭菌 2 h。

6.1.2　一次性无菌采样拭子。

6.1.3　组织研磨器或者研钵，经 160 ℃干热灭菌 2 h。

6.1.4　真空采血管。

6.1.5　记号笔。

6.1.6　低温保藏箱。

6.2　样品采集

6.2.1　血清样本采集：用无菌注射器抽取受检山羊或绵羊静脉血不少于 5 mL，置于无菌离心管内，室温或者 37 ℃倾斜放置自然凝集 20 min～ 30 min，2000 r/min～ 3000 r/min 离心 10 min，吸取上清液 200 μL 到新的离心管内备用。

6.2.2　精液样品采集：按照 NY/T 541 的方法采集和保存精液。

6.2.3　鼻拭子采集：用棉拭子取受检羊鼻腔分泌物，置于 2mL PBS 缓冲液中备用。

6.2.4 组织样本采集：取活体或剖检羊的皮肤丘疹用于病毒分离和抗原检测。

6.2.5 细胞培养物：待出现 80 %以上细胞病变时，将整瓶细胞冻在−80 ℃备用。

6.3 样本送检

上述采集的样本可立即用于检测，样本在 2 ℃～ 8 ℃下保存应不超过 24 h，−20 ℃ ± 5 ℃可以稳定保存 3 个月，长期保存请置于 −70 ℃以下。样本运送采用低温保藏箱或泡沫箱加生物冰袋密封进行运输。

6.4 样本处理

6.4.1 血清和精液样本无需进行前处理，直接用于核酸提取。

6.4.2 鼻拭子样本：充分涡旋震荡含有鼻拭子的管子 1 min～ 3min，2000 r/min 离心 5 min，取出 200 μL 上清，用于后续的核酸提取。

6.4.3 组织样本：取 1 g 解冻的组织，剪碎，加入 2 mL PBS 缓冲液进行研磨，制备组织匀浆，8000 r/min 离心 5 min，取上清 200 μL，用于后续的核酸提取。

6.4.4 细胞培养物：将细胞培养物反复冻融 3 次，解冻期间，间隔 5 min，摇晃十下细胞培养瓶，第 3 次解冻后，将细胞培养物置于灭菌离心管内，4000 r/min，4 ℃离心 10 min，取上清 200 μL，用于后续的核酸提取。

7 操作方法

7.1 实验室要求

山羊痘和绵羊痘病毒荧光PCR检测的实验室分为三个相对独立的工作区域：核酸提取区、试剂配制区和检测区。工作区域间应有明确的标识，每一个区域应有专用的仪器设备，避免不同区域的设备、物品共用。

7.2 DNA 抽提

7.2.1 DNA 抽提使用 DNAzol 手工提取，也可以使用等效的商品化试剂盒提取，在核酸提取区操作。

7.2.2 取 n 个灭菌的 1.5 mL 离心管， 其中 n 为待检样品数+阳性对照+阴性对照， 对每个离心管进行编号。

7.2.3 每管加入 800 μL DNAzol，分别加入被检样品、阳性对照、阴性对照各 200 μL，颠倒 10 次混匀， 4℃ 或室温 10 000 r/min 离心 10 min。

7.2.4 取 900 μL 上清，置于新的 1.5 mL 灭菌离心管中，加入 500 μL 无水乙醇，混匀，室温放置 3 min； 4 ℃ 或室温 10 000 r/min 离心 5 min。

7.2.5 弃上清，沿管壁缓缓加入 0.8 mL～ 1mL 75%乙醇，颠倒 3 次～ 6 次混匀，4 ℃ 10 000 r/min 离心 5 min。反复洗涤两次后，将离心管倒扣于吸水纸上，自然晾干或用移液器移去残液。

7.2.6 用 30 μL 8 mM NaOH 溶液溶解沉淀，DNA 在 4 ℃冰箱可稳定保存数月，−20 ℃冰箱可长期保存。

7.3 荧光 PCR 检测

7.3.1 反应体系的配制

在试剂配制区进行。设实时荧光PCR反应管数为 n，n 为待检样品数+阳性管数+阴性管数，每个反应的体系见附录C，为了避免移液器取样损失，建议按 n+1个反应进行配制。配制反应液在冰盒中进行。

7.3.2 反应液的分装

将 6.3.1 中配制的荧光PCR反应液充分混匀，按照每管 38.8 μL分装于 0.2 mL透明PCR管内，将PCR管置于 96 孔板上，按顺序加样并做好标识，转移至核酸提取区。

7.3.3 加样

在核酸提取区进行。在每个PCR反应管内加入 5 μL DNA模板，并分别加入本文件中 7.2 制备的核酸 10 μL DNA溶液，盖上盖子，500 r/min～ 1 000 r/mi离心 30 sec。转移至检测区。

7.3.4 上机检测

在检测区进行。将 6.3.3 中离心后的PCR管放入荧光PCR检测仪内，设置探针：5’选择FAM荧光通道，3’选择MGB荧光通道。

7.3.5 循环条件设置

第一阶段，预反应 50 ℃/2 min；
第二阶段，酶活化 95 ℃/2 min；
第三阶段，变性 95 ℃/15 sec，退火、延伸、荧光采集 60 ℃ 20 sec，45个循环；
第四阶段，冷却 25 ℃/10 sec。
检测结束后，保存结果，根据收集的荧光曲线和Ct值判定结果。

8 结果判定

8.1 阈值设定

阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整，以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增的最高点为准。

8.2 质量控制

8.2.1 阴性对照：无 Ct 值或无典型的 S 型扩增曲线。

8.2.2 阳性对照：Ct 值≤ 30，且扩增曲线为典型的 S 型。

8.2.3 以上要求需在同一次实验中同时满足，否则，本次实验无效，需重新进行。

8.3 结果描述及判定

8.3.1 被检样品检测结果中 Ct 值≤ 36，且有典型的 S 形扩增曲线，报告为 GTPV 或 SPPV 阳性；

8.3.2 被检样品检测结果无 Ct 值或无典型的 S 型扩增曲线，报告为 GTPV 或 SPPV 阴性。

8.3.3 被检样品检测结果中 36＜ Ct 值≤ 40，且有扩增曲线，报告为 GTPV 或 SPPV 疑似；需要进行重复实验。

8.3.4　GTPV 或 SPPV 疑似样品需要进行三平行实验，如果重复实验有两个平行实验检测结果仍为疑似，则最终检测结果报告为 GTPV 或 SPPV 阳性，否则判定为阴性。

附 录 A
（规范性）
溶液配制

A.1 8mM NaOH 溶液

称量 0.32 g NaOH，溶解到 1 000 mL去离子水中，混匀，分装，常温保存。

A.2 磷酸盐缓冲液（0.01 mol/L PBS，pH 7.4）

用 800 mL蒸馏水溶解 8 g NaCl，0.2 g KCl，1.44 g Na_2HPO_4和 0.24 g KH_2PO_4。用HCl调节溶液的pH值至 7.4，加水至1 L。分装后经 121 ℃、15 min高压灭菌后备用。

附　录　B
（资料性）
引物探针名称、序列

B.1　引物探针名称、序列

见表B.1。

表 B.1 引物探针名称、序列

名称	序列
P1（上游引物）	5′-CAGGAGGTGTTGAAAATTTTACAG-3′
P2（下游引物）	5′-CCGCATCGGCA TACGATTTCC-3′
P3（探针）	5′-(FAM)-ACAAAGAGCATTACATAAT-(MGB)-3′

注1：引物和探针可由生物公司合成，用TE溶液溶解并稀释至 100 μM储存浓度，−20 ℃保存备用，保存期为 1 年；根据需要配制成 10 μM工作液，−20 ℃保存供检测使用，如经常使用反复冻融，有效期为 3 个月。

附 录 C
（资料性）
荧光 PCR 反应体系

C.1 荧光 PCR 反应体系

见表C.1。

表 C.1 荧光 PCR 反应体系

组分	1个检测反应的加入量/μL
2×Real-time PCR 预混液	12.5 μL
上游引物	1.0 μL
下游引物	1.0 μL
探针	1.0 μL
DNA模板	5.0 μL
ddH_2O	1.5 μL
总量	25 μL