ICS 点击此处添加 ICS 号
点击此处添加中国标准文献分类号

团　　体　　标　　准

T/CVMA XXXXX—2021

伪狂犬病毒、猪细小病毒和猪圆环病毒 2 型三重荧光 PCR 检测方法

Triplex real time RT-PCR detection method for porcine pseudorabies virus、porcine parvovirus and porcine circovirus type 2 virus

（征求意见稿）

中国兽医协会
CVMA

XXXX－XX－XX 发布　　XXXX－XX－XX 实施

中国兽医协会　发布

目 次

前言 II
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 仪器和设备 2
6 试剂和材料 2
7 病料采集和处理 2
8 病毒总核酸的提取 2
9 荧光 PCR 反应 2
10 生物安全要求 4
附录 A（资料性附录） 病原基因参考序列 5
附录 B（资料性附录） 附表：引物和探针序列 6
附录 C（资料性附录） 病毒核酸提取步骤 7

中国兽医协会
CVMA

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。

本文件本文件的某些内容仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由中国海关科学技术研究中心提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

中国兽医协会
CVMA

伪狂犬病毒、猪细小病毒和猪圆环病毒 2 型三重荧光 PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了伪狂犬病毒、猪细小病毒和猪圆环病毒2型三重荧光RT-PCR检测方法操作规程。

本文件适用于伪狂犬病毒、猪细小病毒和猪圆环病毒2型的鉴别诊断。

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

GB 19489 实验室生物安全通用要求

NY/T 541 动物疫病实验室检验采样方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

三重荧光 PCR Triplex real time PCR

三重荧光聚合酶链式反应。

3.2

Ct 值 Cycle threshold

每个反应孔内的荧光信号达到设定阈值时所经历的循环次数。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

PRV：伪狂犬病毒（Porcine Pseudorabies Virus）

PPV：猪细小病毒（Porcine Parvovirus）

PCV-2：猪圆环病毒2型（Porcine Circovirus type 2）

FAM: 6-羧基荧光素(6-Carboxyfluorescein)

Cy5：荧光发光基团

Hex：六氯-6-甲基荧光素（6-Hexachlorofluorescein）

BHQ：荧光淬灭基团

中国兽医协会 CVMA

5 仪器和设备

多通道荧光PCR仪、生物安全柜、冰箱（2℃～6℃和-20℃）、台式冷冻离心机、组织匀浆机、漩涡器、移液器及吸头（至少包括10μL、200μL和1000μL三个量程）。

6 试剂和材料

6.1 病毒总核酸提取试剂 TIANamp Virus DNA/RNA Kit 或者其他等效核酸提取试剂。

6.2 IQ Powermix PCR kit 或者其他等效多重荧光 PCR 试剂。

6.3 无水乙醇（分析纯）和 75%乙醇（用新开启的分析纯无水乙醇和 DEPC 处理水配制）及实验用水按照 GB/T 6682《分析实验室用水规格和试验方法》规定使用，-20 ℃ 预冷。

6.4 阳性对照

含伪狂犬病毒（PRV）gE基因的体外重组质粒、含猪细小病毒（PPV）NS1基因的体外重组质粒、含猪圆环病毒2型（PCV-2）ORF2基因的体外重组质粒，序列片段序列见附录A。

6.5 阴性对照

伪狂犬病毒病毒阴性样品、猪细小病毒阴性样品和猪圆环病毒2型阴性样品。

6.6 引物和探针序列

引物和探针序列见附录B。

7 病料采集和处理

病料采集和处理，请遵照NY/T 541《动物疫病实验室检验采样方法》有关规定进行操作。

8 病毒总核酸的提取

见附录C。

9 荧光 PCR 反应

9.1 多重荧光 PCR 反应体系

多重荧光PCR反应体系配制见表1。

表 1 一步法多重荧光 PCR 反应体系（总体积 20uL）

混合液组份	体积（uL）	终浓度（nM）
2×IQ Powermix PCR 缓冲液	10	1×
引物混合物	0.8	400

中国兽医协会 CVMA

PCV-2 探针（FAM 标记）	0.4	200
PRV 探针（Cy5 标记）	0.4	200
PPV 探针（Hex 标记）	0.4	200
病毒总核酸	5	
DEPC 水补至总体积至	20	

注：1. 引物混合物指的是3种病原引物混合物； 2. 此反应体积以IQ Powermix PCR kit为例，如果使用其他等效试剂，请遵照试剂说明书配制。

将混合液充分混合后，最后加入模板，简短离心，按照下列反应程序，进行一步法荧光RT-PCR反应。

9.2 荧光 PCR 反应程序

荧光PCR反应程序见表2。

表 2 荧光 PCR 反应程序

95℃	5min	
95℃	15sec	44 个循环
60℃	45sec	

9.3 结果描述及判定

9.3.1 质控标准

所有阳性对照（FAM、Cy5和Hex）均有S形扩增曲线，阴性对照（FAM、Cy5和Hex）均无扩增曲线且Ct≥40或者无值。

满足此条件，视为此次试验有效。

9.3.2 结果判断和鉴别

有扩增曲线，且Ct≤35，判定为核酸检测阳性；

有扩增曲线，但35<Ct<40，属于疑似区间，需要重新确认，建议使用单荧光PCR方法确认；如果Ct值仍然<40，则判定为核酸检测阳性，如果Ct值≥40或者无Ct值，判定为核酸检测阴性。

没有扩增曲线，或者Ct≥40，判定核酸检测阴性。

FAM阳性荧光信号表示PCV-2核酸检测阳性，Cy5阳性荧光信号表示PRV核酸检测阳性，Hex阳性荧光信号表示PPV核酸检测阳性；两种阳性荧光信号表示对应的其中两种病毒核酸检测阳性，三种阳性荧光信号表示PCV-2、PRV和PPV三种病毒核酸检测阳性。

10 生物安全要求

中国兽医协会 CVMA

样品处理和核酸提取以及废弃物处理按照GB 19489《实验室生物安全通用要求》规定，在相应等级的生物安全实验室或者生物安全柜中进行，并做好个人防护。

中国兽医协会
CVMA

附 录 A
（资料性附录）
病原基因参考序列

A1 PRV-gE 基因参考序列

ggccacgccc aacgacacgg gcctctacac gctgcacgac gcctcggggc cgcgggccgt gttctttgtg gcggtgggcg accggccgcc cgcgccggcg gacccggtgg gccccgcgcg ccacgagccc cgcttccacg cgctcggctt ccactcgcag ctcttctcgc ccggggacac gttcgacctg atgccgcgcg tggtctcgga catgggcgac tcgcgcgaga actttaccgc cacgctggac tggtactacg cgcgcgcgcc cccgcggtgc ctgctgtact acgtgtacga gccctgcatc taccacccgc gcgcgcccga gtgcctgcgc ccggtggacc cggcgtgcag cttcacctcg ccggcgcgcg cgcggctggt ggcgcgccg

A2 PPV-NS1 基因参考序列

aaagaccaga acatacacaa ccaataagag acagaatgtt aaacataaac ctaaccagaa aactgccagg tgattttgga cttttagaag aaactgaatg gccactaata tgtgcttggt tggtaaagaa aggttaccaa gcaacaatgg ctagctatat gcatcattgg ggaaatgtac ctgattggtc agaaaaatgg gaggagccaa aaatgcaaac cccaataaat acaccaacag actctcagat ttccacatca gtgaaaactt cgccagcgga caacaactac gcagcaactc caatacagga ggacctggat ttagctttag ccttggagcc gtggagcgag ccaacaacac caactttcac caacctgcac ttaactccaa caccgccaga ttcagcaata cggacaccaa gtccaacttg gtcggaaata gaaaccgaca taagagcctg ctttggtgaa aactgtgcac ccacaacaaa ccttgaataa

A3 PCV-2 的 ORF2 基因参考序列

tctgaattgt acatacatgg ttacacggat attgtattcc tggtcgtata tactgttttc gaacgcagtg ccgaggccta cgtggtctac atttccagca gtttgtagtc tcagccacag ctgatttctt ttgttgtttg gttggaagta atcaatagtg gaatctagga caggtttggg ggtaaagtag cgggagtggt aggagaaggg ctgggttatg gtatggcggg aggagtagtt tacatagggg tcataggtga gggctgtggc ctttgttaca aagttatcat ctagaataac agcactggag cccactcccc tgtcaccctg ggtgatcggg gagcagggcc agaattcaac cttaaccttt cttattctgt agtattcaaa gggcacagag cgggggtttg agccccctcc tgggggaaga aagtcattaa tattgaatct catcatgtcc accgcccagg agggcgtttt gactgtggtt cgcttgatag tatatccgaa ggtgcgggag aggcgggtgt tgaagatgcc atttttcctt ctccagcggt

中国兽医协会 CVMA

aacggtggcg ggggtggacg agccaggggc ggcggcggag gatctggcca agatggctgc gggggcggtg tcttcttctc cggtaacgcc tccttggata cgtcat

中国兽医协会
CVMA

附　录　B
（资料性附录）
附表：引物和探针序列

病毒 Viruses	靶基因 Target genes	引物/探针 Primers/Probes	序列（5’→3’） Sequences（5’→3’）
伪狂犬病毒 PRV	*gE*	FP1	CGGTGCCTGCTGTACTACG
		RP1	GGCGAGGTGAAGCTGCA
		Probe1	Cy5-CGAGCCCTGCATCTACCACC-BHQ2
猪细小病毒 PPV	*NS*1	FP1	AGCGAGCCAACAACACCA
		RP1	CACCAAAGCAGGCTCTTATGTC
		Probe1	HEX-ACCAACCTGCACTTAACTCCAACA-BHQ1
猪圆环病毒 2 型 PCV-2	*ORF*2	FP1	ACGGATATTGTAKTCCTGGTCGT
		RP1	CTTCCAACCMAAYAACAAAAGRAATCA
		RP2	ACTTCCAACCAAATAACAAAAGAAATCAG
		RP3	CCAACCAAACAACAAAAGAAACCA
		Probe1	FAM-CAGTGCCGAGGCCTACGTG-BHQ1
		Probe2	FAM-CAGTGCCGAGGCCTACRTG-BHQ1

中国兽医协会
CVMA

附　录　C
（资料性附录）
病毒核酸提取步骤

1. 用移液器将 20 μL Proteinase K 加入一个干净的 1.5 mL 离心管中。

2. 向离心管中加入 200 μL 血浆/血清/病毒培养液或 25 mg 组织匀浆（样品需平衡至室温），如果样本体积小于 200 μL，可加入 0.9% NaCl 溶液补充。

3. 加入 200 μL Carrier RNA 工作液，盖上管盖，涡旋振荡 15 sec 混匀。

4. 56℃孵育 15 min，简短离心，收集附着在管壁及管盖的液体。

5. 加入 250 μL 无水乙醇，涡旋振荡 15 sec，彻底混匀，在室温（15℃-25℃）放置 5 min。

6. 简短离心，收集附着在管壁及管盖的液体。

7. 将离心管中的溶液和絮状沉淀全部转移至 RNase-Free 吸附柱 CR2（吸附柱放在收集管中），盖上管盖，6,000×g 离心 1 min，弃收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。

8. 小心打开吸附柱盖子，加入 500 μL 溶液 GD（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），盖上管盖，6,000×g 离心 1 min，弃收集管中的废液，将吸附柱放回收集管。

9. 小心打开吸附柱盖子，加入 600 μL 溶液 PW（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），盖上管盖，静置 2 min， 6,000×g 离心 1 min，弃收集管中的废液，将吸附柱放回收集管。

10. 重复步骤 9。

11. 小心打开吸附柱盖子，加入 500 μL 无水乙醇，盖上管盖， 6,000×g 离心 1 min，弃收集管中的废液。

12. 将吸附柱放回收集管中，13,400×g 离心 3 min，使吸附膜完全变干，弃收集管中的废液。

13. 将吸附柱放入一个新的 RNase-Free 离心管（1.5 ml）中，小心打开吸附柱的盖子，室温放置 3 min，使吸附膜完全变干。向吸附膜的中间部位悬空滴加 20-150 μL RNase-Free ddH2O，盖上盖子，室温放置 5 min。

14. 13,400×g 离心 1 min，收集到的即为病毒总核酸（DNA 或 RNA）。

注：上述提取步骤以TIANamp Virus DNA/RNA Kit为例，如果使用其他等效核酸提取试剂，请遵照试剂盒使用说明书操作。

中国兽医协会 CVMA