

ICS

团 体 标 准

T/CVMA XXXX—XXXX

口蹄疫病毒与水泡性口炎病毒三重实时荧光 RT-PCR 检测方法

Triplex real time RT-PCR detection method for Foot and Mouth Disease virus and Vesicular Stomatitis virus

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX=XX-XX 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。

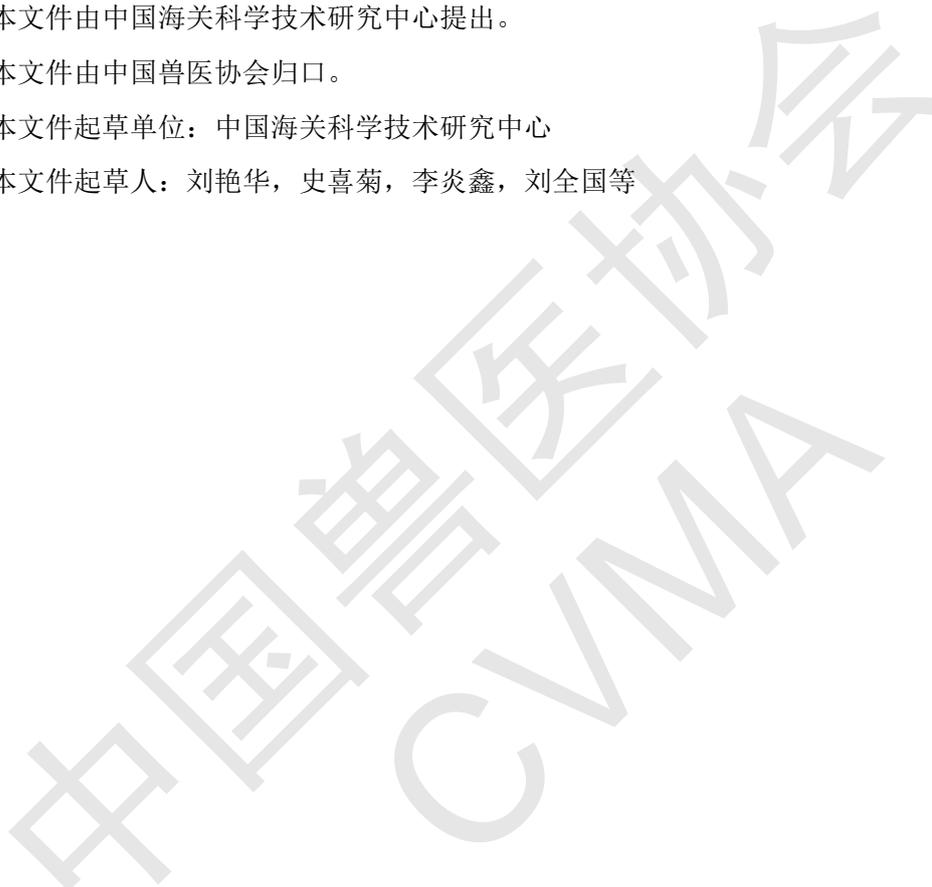
本文件涉及专利。

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：中国海关科学技术研究中心

本文件起草人：刘艳华，史喜菊，李炎鑫，刘全国等



引言

本文件的发布机构提请注意，声明符合本文件时，条目5.6和条目7的内容可能涉及到相关专利的使用。

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构保证，愿意同任何申请人在合理且无歧视的条款和条件下，就专利授权许可进行谈判。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得：

专利持有人姓名：中国海关科学技术研究中心

地址：北京市朝阳区甜水园街6号

请注意除上述专利外，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。

口蹄疫病毒与水泡性口炎病毒三重实时荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了口蹄疫病毒和水泡性口炎病毒三重实时荧光 RT-PCR 检测方法操作规程。

本文件适用于活猪或猪产品中口蹄疫病毒和水泡性口炎病毒的快速筛选及鉴别。

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

GB19489 实验室生物安全通用要求

3 术语、定义和缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1 三重荧光 RT-PCR Triplex real time RT-PCR

三重荧光反转录-聚合酶链式反应。

3.1.2 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。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

3.2.1 FMDV: 口蹄疫病毒 (Foot and Mouth Disease Virus)

3.2.2 VSV-NJ: 新泽西型水泡性口炎病毒 (New Jersey Vesicular Stomatitis Virus)

3.2.3 VSV-IND: 印第安纳型水泡性口炎病毒 (Indiana Vesicular Stomatitis Virus)

3.2.4 FAM: 6-羧基荧光素 (6-Carboxyfluorescein)

3.2.5 Cy5: 荧光发光集团

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

3.2.7 BHQ: 荧光淬灭基团

4 仪器和设备

- 4.1 多通道荧光 PCR 仪
- 4.2 生物安全柜
- 4.3 冰箱（2~6 °C和-20°C）
- 4.4 台式冷冻离心机
- 4.5 组织匀浆机
- 4.6 漩涡器
- 4.7 移液器及吸头（10 μ L、200 μ L 和 1000 μ L）

5 试剂和材料

- 5.1 病毒总核酸提取试剂 TIANamp Virus DNA/RNA Kit。
- 5.2 Path-IDTM Multiplex one-step RT-PCR kit。
- 5.3 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), -20 °C 预冷。

5.4 阳性对照

口蹄疫病毒体外转录的非感染性RNA片段、水泡性口炎病毒体外转录的非感染性RNA片段。

5.5 阴性对照

口蹄疫病毒阴性样品、水泡性口炎病毒阴性样品。

5.7 引物和探针序列

引物和探针序列见表1。

表1 口蹄疫病毒和水泡性口炎病毒三重荧光RT-PCR引物和探针序列

病原	靶基因	引物名称	序列
口蹄疫病毒 (FMDV)	3D 基因	FP1	5' ACTGGGTTTTACAAACCTGTGATG 3'
		FP2	5' CTGGGTTTTATAAACCTGTGATGGC 3'
		RP1	5' CCACGGAGATCAACTTCTCCT 3'
		RP2	5' TGCCACAGAGATCAACTTCTCC 3'
		RP3	5' CCACGGAAATCAACTTCTCCTG 3'
		Probe1	5' FAM-TCTCCTTTGCACGCCGTGG-BHQ1 3'
		Probe2	5' FAM-TCCTCTCCTTTGCACGTCGTG-BHQ1 3'
新泽西型水泡 性口炎病毒	L 基 因	FP1	5' GCTCTTTATGCATGACCCTGC 3'
		FP2	5' TGCTTTTTATGCATGACCCWGC 3'

(VSV-NJ)		RP1	5' CGAGACAACGCCATACCACA 3'
		Probe1	5' Cy5-CTGGTTTGCACACCAGAACATTCA-BHQ2 3'
印第安纳型水泡性口炎病毒 (VSV-IND)	L 基 因	FP1	5' TGATGATGCATGATCCWGCTCT 3'
		RP1	5' ACACWCCTCCAATGGAAGGGT 3'
		Probe	5' HEX-ACCGGGCTTGCACAGTTCTAC-BHQ1 3'

6 病毒总核酸的提取

6.1 Carrier RNA 溶液的配制

6.1.1 Carrier RNA 储存液: 向装有 310 µg Carrier RNA 冻干粉的管子中加入 310 µL RNase-Free ddH₂O, 将 Carrier RNA 彻底溶解, 得到终浓度为 1 µg/µL 的溶液, 并分装、置于 -20 °C 储存。

6.1.2 Carrier RNA 工作液: 根据样品的数量计算所需缓冲液 GB 和 Carrier RNA 溶液的体积 (计算公式如下), 将缓冲液 GB 与 Carrier RNA 溶液颠倒混匀, 即得到 Carrier RNA 工作液; 为避免溶液出现起泡现象, 请勿使用涡旋振荡。

计算公式:

$$n \times 0.22 \text{ mL} = y \text{ mL}$$

$$y \text{ mL} \times 28 \text{ µL/mL} = z \text{ µL}$$

式中 n=同时提取的样品个数, y=需要加入缓冲液 GB 的体积, z=需要加入 Carrier RNA 溶液的体积。

6.2 操作步骤

6.2.1 用移液器将 20 µL Proteinase K 加入一个干净的 1.5 ml 离心管中。

6.2.2 向离心管中加入 200 µL 血浆/血清/淋巴液或 25mg 磨碎的组织 (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。

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

6.2.4 56°C 孵育 15 min, 简短离心以收集附着在管壁及管盖的液体。

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

6.2.6 简短离心, 以收集附着在管壁及管盖的液体。

6.2.7 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, 8,000 rpm (~6,000×g) 离心 1 min, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中。

6.2.8 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, 8,000 rpm (~6,000×g) 离心 1 min, 弃废液, 将吸附柱放回收集管。

6.2.9 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，8,000 rpm (~6,000×g)离心 1 min，弃废液，将吸附柱放回收集管。

6.2.10 重复步骤 (9)。

6.2.11 小心打开吸附柱盖子，加入 500 μL 无水乙醇，盖上管盖，8,000 rpm (~6,000×g)离心 1 min，弃废液。

6.2.12 将吸附柱放回收集管中，12,000 rpm (~13,400×g)离心 3 min，使吸附膜完全变干，弃废液。

6.2.13 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。

6.2.14 12,000 rpm (~13,400×g)离心 1 min，收集到的即为病毒总核酸 (DNA 或 RNA)。

7 荧光 RT-PCR 反应

7.1 多重荧光 RT-PCR 反应体系

表 1：一步法多重荧光 RT-PCR 反应体系 (总体积 20uL)

混合液组份	体积 (uL)	终浓度 (nM)
2×Multiplex RT-PCR 缓冲液	10	1×
Multiplex 酶混合液	1	1×
引物混合物	1.6	400
FMDV 探针 (FAM 标记)	0.4	200
VSV-NJ 探针 (Cy5 标记)	0.4	
VSV-IND 探针 (Hex 标记)	0.4	200
病毒总核酸	1-5	
DEPC 水补至总体积至	20	

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。

7.2 单荧光 RT-PCR 反应体系

表 2：一步法单荧光 RT-PCR 反应体系 (总体积 20uL)

混合液组份	体积 (uL)	终浓度 (nM)
2×Multiplex RT-PCR 缓冲液	10	1×
Multiplex 酶混合液	1	1×
引物混合物	1.6	400

FMDV 探针 (FAM 标记) /VSV-NJ 探 针 (Cy5 标记) /VSV-IND 探针 (Hex 标记)	0.4	200
病毒总核酸	1-5	
DEPC 水补至总体积至	20	

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。

7.3 荧光 RT-PCR 反应程序

表 3: 荧光 RT-PCR 反应程序

48°C	10min	
95°C	10min	
5°C	15sec	44 个循环
60°C	45sec	

7.4 结果描述及判定

7.4.1 质控标准

阳性对照 (FAM、Cy5 和 Hex) 均有 S 形扩增曲线, Ct 值大约在 28 左右, 阴性对照无扩增信号; 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。

7.4.2 结果判断和鉴别

有扩增曲线, 且 $Ct \leq 35$, 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;

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 FMDV 核酸检测阳性, Cy5 阳性荧光信号表示 VSV-NJ 核酸检测阳性, Hex 阳性荧光信号表示 VSV-IND 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 FMDV、VSV-NJ 和 VSV-IND 三种病毒核酸检测阳性。

8 生物安全要求

疑似阳性样品的核酸提取要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