ICS 11.220

B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA XXXXX—XXXX

山羊痘病毒属病毒分子生物学检测方法

Goatpox virus is a molecular biological detection method of the 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

前　　言

本文件按 GB/T 1.1-2020给出的规则起草。

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这些专利的责任。

本文件由中国兽医协会提出并归口。

本文件起草单位：中国动物疫病预防控制中心、禾旭（郑州）生物技术有限公司。

本文件主要起草人：孙雨、宋晓晖、王传彬、王睿男、孙航、马英、毕一鸣、黄辉、姚强、刘近、杨转、姬杰菲、殷笑丹、杨晓帆、石书霞、鲁龙、徐秀杰、苏扬、李凯武、阴思晴

中国兽医协会
CVMA

山羊痘病毒属病毒分子生物学检测方法

1 范围

本文件规定了山羊痘病毒属分子生物学检测试剂、仪器设备、实验操作步骤。

本文件适用于牛组织、分泌物和培养物中山羊痘病毒属病毒的核酸检测。

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

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3 试剂

除另有规定外，所有试剂均为分析纯，实验用水应符合GB/T 6682 中相关规定。常规PCR检测试剂见附录B；实时荧光PCR检测(SYBR Green法）试剂见附录C。

4 仪器用具

高速冷冻离心机、电子天平、PCR仪、荧光PCR仪、水平电泳系统、-20℃低温冰箱和-80℃超低温冰箱、凝胶成像分析系统、pH计、微波炉、磁力搅拌器、恒温水浴锅、高压灭菌锅、超净工作台、可调移液器（2.5 μL，10 μL，20 μL-100 μL，200 μL，1000 μL）和可调移液器枪头、灭菌离心管、研钵等。

5 样品采集

样品采集按照NY/T 541进行。对于病死牛，取皮肤损伤病灶、皮肤结痂处、肺脏、气管、淋巴结、消化道黏膜等组织；对于活牛，用棉拭子分别采集同一只牛的唾液、精液和皮肤结节，放在含有保护液

中国兽医协会 CVMA

（50%甘油生理盐水）的同一灭菌离心管中，加盖，编号。

6 样品处理

6.1 组织样品

每份组织分别从三个不同的位置称取样品约1.0 g，剪碎后取适量于研磨器中研磨，加入1.0 mL生理盐水继续研磨，待匀浆后转至无菌离心管中，置高速冷冻离心机内10,000 ×g 离心2 min，取上清液100 μL于1.5 mL无菌离心管中。

6.2 分泌物和排泄物样品

将唾液/精液/皮肤结节棉拭子在振荡器上充分混合，捻动、挤压干后弃去拭子。10,000 ×g离心5 min，吸取上清100 μL于1.5 mL无菌离心管中。

6.3 培养物样品

将培养物10,000 ×g离心5 min，取上清100 μL于1.5 mL无菌离心管中。

7 病毒 DNA 的提取

7.1 若选用附录 A 中所列试剂提取病毒 DNA，则参照以下步骤进行操作。

7.1.1 取已处理的样品、阴性对照和阳性对照，分别加入裂解液 600 μL，充分颠倒混匀，室温静置 3 min～5 min；

7.1.2 将液体吸入吸附柱中，10,000 ×g 离心 30 s；

7.1.3 弃去收集管中液体，加入 600 μL 洗涤液，10,000 ×g 离心 30 s；

7.1.4 重复上述步骤 7.1.3 进行洗涤；

7.1.5 弃去收集管中液体，10,000 ×g 离心 2 min，以除去残留的洗涤液；

7.1.6 将吸附柱移入新的 1.5 mL 无菌离心管中，向柱中央加入洗脱液 50 μL，室温静置 1 min，10,000 ×g 离心 30 s，无菌离心管中液体为模板 DNA。

7.2 若使用病毒 DNA 试剂盒提取病毒 DNA，则按试剂盒说明书进行操作。

中国兽医协会 CVMA

8 检测鉴定

8.1 常规 PCR 检测

以含山羊痘病毒属病毒材料作为阳性对照，以不含山羊痘病毒属病毒的健康牛组织作为阴性对照，同时以双蒸水代替模板作为空白对照。分别提取样品和对照的总 DNA 进行 PCR 检测，具体操作见附录 B。

8.2 实时荧光 PCR 检测（ SYBR Green 法）

以含山羊痘病毒属病毒材料作为阳性对照，以不含山羊痘病毒属病毒的健康牛组织作为阴性对照，同时以双蒸水代替模板作为空白对照。分别提取样品和对照的总 DNA 进行实时荧光 PCR 检测，具体操作见附录 C。

9 结果判定

样品检测时，检测流程及结果判定按照下述原则进行：

----常规 PCR 初步筛检，若检测结果为阴性，则判定样品不携带山羊痘病毒属病毒；若检测结果为阳性，则采用 PCR 产物序列测定或实时荧光 PCR 进行验证；

----若验证结果为阳性，则判定样品携带山羊痘病毒属病毒；若验证结果为阴性，则判定样品不含山羊痘病毒属病毒。

中国兽医协会
CVMA

附　录　A

(规范性附录)

DNA 提取试剂的配制

A.1 保护液（50% 生理盐水）

将生理盐水缓慢倒入盛有甘油的容器中，按 1:1 体积比充分混合。

A.2 裂解液

异硫氰酸胍	236.4 g
氯化钠	23.2 g
0.5 mol/L 乙二铵四乙酸二钠溶液（EDTA）（ pH=8.0 ）	40 mL
灭菌双蒸水	加至 2000 mL

EDTA（0.5 mol/L , pH=8.0）溶液配制

EDTA	18.61 g
灭菌双蒸水	80 mL
氢氧化钠	调 pH 至 8.0
灭菌双蒸水	加至 100 mL

A.3 洗涤液

磷酸氢二钠	143.2 g
磷酸二氢钾	62.4 g
氯化钠	18 g
灭菌双蒸水	加至 2000 mL

再加入 6000 mL 无水乙醇，充分混匀。

A.4 洗脱液

磷酸氢二钠	143.2 g
磷酸二氢钾	62.4 g
灭菌双蒸水	加至 2000 mL

中国兽医协会
CVMA

附　录　B

（资料性）

常规 PCR 检测

中国兽医协会 CVMA

B.1　相关试剂

B.1.1　DNA 提取相关试剂的配制

见附录 A。

B.1.2　10 × PCR 缓冲液的配制

Tris base	6.06 g
KCl	18.64 g
Triton X-100	5 mL

加无核酸酶灭菌蒸馏水至400 mL，用HCl调pH值至9.0（25 ℃），定容至500 mL。高压灭菌冷却后置于2 ℃~8 ℃保存备用。

B.1.3　引物序列

根据已报道的山羊痘病毒属病毒基因组序列设计 1 对用于特异性扩增的荧光染料引物。

山羊痘病毒属引物序列及目的片段长度

引物	引物序列(5′→3′)	预期片段大小 /bp
正向引物	AATCGTATGCCGATGCGGA	231
反向引物	AATCATATCCCCCTGTGTACGAAT	

B.2　常规 PCR 检测

B.2.1　总 DNA 的提取

见正文第 7 部分“病毒 DNA 的提取”。

B.2.2　PCR 扩增

PCR 反应体系见表 B.1，每个反应设置 3 个重复。

PCR 反应条件：95 ℃ 3 min，95 ℃ 30 s，59 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，共 35 个循环；72 ℃ 7 min，扩增产物置于 4 ℃ 保存。

表 B.1 PCR 反应体系

名称	加样量/μL
Buffer mix	12.5
正向引物	1.0
反向引物	1.0
DNA 模板	2.0
ddH_2O	8.5
总计	25.0

B.2.3 阴性对照、阳性对照和空白对照的设置

B.2.3.1 阳性对照：以含山羊痘病毒属病毒材料作为阳性对照；

B.2.3.2 阴性对照：以不含山羊痘病毒属病毒的健康牛组织作为阴性对照；

B.2.3.3 空白对照：以双蒸水代替模板作为空白对照。

B.2.4 琼脂糖凝胶电泳

制备 1.5%的琼脂糖凝胶，对 PCR 产物进行电泳。电泳结束后，在溴化乙锭（EB，浓度为 0.5 μg/mL）溶液染色 10 min，再在凝胶成像分析系统中观察是否扩增出预期的特异性 DNA 电泳带，拍照并作记录。

B.2.5 结果判断

如果阴性对照和空白对照无特异性扩增，阳性对照在 231bp 大小处有扩增条带，待测样品出现与阳性对照一致的扩增条带，则判定为阳性。

如果阴性对照和空白对照无特异性扩增，阳性对照在 231bp 大小处有扩增条带，待测样品未出现与阳性对照一致的扩增条带，则判定为阴性。

如果采用 PCR 产物序列测定方法进一步确认，当序列测定得到的核苷酸序列与已知的山羊痘病毒属病毒 DNA 序列一致时，则判定样品携带山羊痘病毒属病毒；若序列不一致，则判定样品不携带山羊痘病毒属病毒。

中国兽医协会
CVMA

附 录 C

（资料性）

实时荧光 PCR 检测（ SYBR Green 法）

C.1 试剂

C.1.1 DNA 提取相关试剂的配制

见附录 A。

C.1.2 10 × PCR 缓冲液的配制

Tris base	6.06 g
KCl	18.64 g
Triton X-100	5 mL

加无核酸酶灭菌蒸馏水至400 mL，用HCL调pH值至9.0（25 ℃），定容至500 mL。高压灭菌冷却后置于2 ℃~8 ℃保存备用。

C.1.3 引物序列

山羊痘病毒属引物序列及目的片段长度

引物	引物序列(5′→3′)	预期片段大小 /bp
正向引物	TGGGAAAAGGTAGAAAAATCAGGAGG	141
反向引物	ATCCGCATCGGCATACGATT	

C.2 实时荧光 PCR 检测

C.2.1 总 DNA 的提取

见正文第 7 部分“病毒 DNA 的提取”。

C.2.2 实时荧光 PCR 反应体系(SYBR Green 法)

实时荧光 PCR 反应体系见表 C.1，每个反应设置 3 个重复。

表 C.1 PCR 反应体系

名称	加样量/μL
2x PCR 缓冲液（MIX）	12.5
正向引物（10μmol/L）	0.75
反向引物（10μmol/L）	0.75

中国兽医协会 CVMA

模板 DNA（0.1μg~2μg）	2.0
荧光染料 50x ROX	0.5
ddH2O	8.5
合计	25

C.2.3 实时荧光 PCR 检测(SYBR Green 法）

在各实时荧光 PCR 反应管中加入上述试剂后，将管盖盖紧，离心 5 s-10 s。将离心后的实时荧光 PCR 反应管放入实时荧光 PCR 检测系统内，记录样本拜访顺序。实时荧光 PCR 反应程序为：95℃ 15min，1 个循环；95 ℃ 15 s，60 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，40 个循环，在每次循环的延伸时收集荧光。检测结束后，根据扩增曲线和 Ct 值判定结果。每个样品设置三个平行的反应体系，检测过程中应分别设立阴性对照、阳性对照和空白对照。以含山羊痘病毒属病毒材料作为阳性对照，以不含山羊痘病毒属病毒的健康牛组织作为阴性对照，同时以双蒸水代替模板作为空白对照。

C.2.4 结果判断与描述

C.2.4.1 结果分析条件设定

直接读取检测结果。阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整。

C.2.4.2 对照结果的判定

空白对照：无荧光增幅现象。

阴性对照：无荧光增幅现象。

阳性对照：有荧光增幅现象。

否则，实验视为无效。

C.2.4.3 检测结果的判定

同时进行的阴性、阳性、空白对照实验结果正常，检测样品无荧光增幅现象，判断样品中未检出山羊痘病毒属病毒。

同时进行的阴性、阳性、空白对照实验结果正常，检测样品有荧光增幅现象，且 Ct 值≤35，则判断样品中检出山羊痘病毒属病毒。

同时进行的阴性、阳性、空白对照实验结果正常，若检测样品中荧光增幅曲线的 Ct 值在 35~40 之间，则应重新进行实时荧光 PCR 反应。再次扩增后的结果 Ct 值仍在 35~40 之间，可判断样品中检出山羊痘病毒属病毒，否则可判断样品中未检出山羊痘病毒属病毒。

中国兽医协会 CVMA