

猪圆环病毒 3 型实时荧光 PCR 检测方法

Method of the Real-time fluorescent PCR for the detection of porcine circovirus type 3

(征求意见稿)

(本草案完成时间: 2021-09-30)

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

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 原理.....	1
5 设备和器材.....	1
6 试剂.....	2
7 样品的采集与处理.....	2
8 DNA 提取.....	3
9 实时荧光 PCR 检测.....	3
10 注意事项.....	4
附录 A（规范性） DNA 提取方法.....	5

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。

本文件代替DB31/T 955-2015《猪圆环病毒2a/2b亚型实时荧光PCR检测和分型方法》。本文件与DB31/T 955-2015相比，除编辑性修改外，主要技术变化如下：

——更改了中英文标准名；

——起草依据更改为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》；

——删除了检测猪圆环病毒2a/2b亚型的引物和探针，增加了检测猪圆环病毒3型的引物和探针，删除了FAM检测通道和判定依据。

本文件由上海市农业农村委员会提出。

本文件由上海市畜牧业标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：上海市动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人：赵洪进、王建、刘健、周锦萍、鞠厚斌、杨德全、白艺兰、葛菲菲、李凯航、李鑫、沈海潇、卢军、葛杰。

本文件所代替标准的历次版本发布情况为：

——DB31/T 955-2015。

猪圆环病毒 3 型实时荧光 PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了猪圆环病毒3型实时荧光PCR检测方法的原理、设备和器材、试剂、样品的采集与处理、DNA提取、实时荧光PCR检测和注意事项等操作内容。

本文件适用于猪圆环病毒3型的实时荧光PCR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 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- GB/T 19489 实验室生物安全通用要求
- SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

Ct 值 Cycle threshold value

荧光信号量达到设定的阈值时所经历的循环数。

3.2

PCV3 Porcine circovirus type 3

猪圆环病毒3型，属于圆环病毒科圆环病毒属新发猪病毒性传染病病原，表现出了猪皮炎与肾病综合征 (PDNS) 的临床病症。

4 原理

本文件根据PCV3 ORF1序列，设计相应的引物和探针，建立了实时荧光PCR检测方法。

5 设备和器材

5.1 荧光 PCR 仪。

5.2 台式冷冻离心机（离心力 12,000 g 以上）。

5.3 水浴锅。

5.4 冰箱（2 ℃~8 ℃、-20 ℃、-80 ℃）。

5.5 可调移液器（2.5 μL、10 μL、100 μL、200 μL、1 mL）及配套带滤芯吸头。

5.6 离心管（1.5 mL）。

- 5.7 PCR 光学反应管 (0.2 mL)。
- 5.8 涡旋混匀器。
- 5.9 核酸提取仪。

6 试剂

6.1 一般要求

除特别说明以外，本文件所用的试剂均为分析纯，实验室用水应符合GB/T 6682的要求。

6.2 引物与探针

6.2.1 引物配制：用灭菌去离子水将引物配制成 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度，置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境下保存。上游引物 PCV3-F1：5' -GGGAAAGCCCGAAACACA-3'，下游引物 PCV3-R1：5' -ACTGCCTCCACACTCCACAAT-3'。

6.2.2 探针配制：探针配制成 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度，置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境下保存。探针序列 PCV3-P1：5' -HEX-TACGATAAACAACACTGGACCCCGACCGA-BHQ1-3'。

6.3 10 mg/mL 蛋白酶 K 溶液

取100 mg蛋白酶K加入9.5 mL灭菌去离子水中，轻轻摇动，直至蛋白酶K完全溶解，禁止涡旋混合，加灭菌去离子水定容至10 mL。

6.4 2 \times PCR 酶预混液

6.4.1 配制：终浓度 60 U/mL 热启动 Taq 酶，40 mmol/L Tris-HCl (pH8.4)，100 mmol/L KCl，6 mmol/L MgCl_2 ，400 $\mu\text{mol/L}$ dATP、400 $\mu\text{mol/L}$ dTTP、400 $\mu\text{mol/L}$ dGTP 和 400 $\mu\text{mol/L}$ dCTP。

6.4.2 采用商品化预混液。

6.5 0.01 mmol/L、pH7.4 PBS 溶液

取磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 29.02 g，磷酸二氢钠2.96 g，氯化钠8.50 g，将上述试剂溶于1,000 mL去离子水中， $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌20 min， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

6.6 其它

- 6.6.1 SDS。
- 6.6.2 无水乙醇。
- 6.6.3 75%乙醇（无水乙醇和灭菌去离子水配制， $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷）。
- 6.6.4 三氯甲烷。
- 6.6.5 异丙醇。
- 6.6.6 核酸提取试剂盒。

7 样品的采集与处理

7.1 血清

用采样器采集待检活猪静脉血2 mL，4 °C保存，24 h内送至实验室。待凝固后，2,000 g离心5 min，取上清液-70 °C保存备用。

7.2 拭子

用无菌棉拭子反复刮擦呼吸道粘膜5~10次，蘸取分泌物后将棉拭子浸入2 mL PBS中，4 °C保存，24 h内送至实验室。取样进行检验时，振荡、挤干拭子，浸泡液采用4,000 g离心1 min，取上清液-70 °C保存备用。

7.3 精液

取解冻或新鲜精液样品1 mL至1.5 mL微量离心管中，振荡混匀，采用5,000 g离心30 s，取上清液-70 °C保存备用。

7.4 组织样品

无菌采集猪肺脏、肠系膜淋巴结、脾脏和肾，取1 g以上组织剪碎，加入2 mL PBS，于研钵或组织匀浆器中研磨制成悬液，5,000 g离心20 min，取上清液-70 °C保存备用。

7.5 细胞培养物

细胞培养物冻融3次，取1 mL至1.5 mL微量离心管中，4,000 g离心1 min，取上清液-70 °C保存备用。

8 DNA 提取

DNA提取方法见附录A。

9 实时荧光 PCR 检测

9.1 对照的设置

9.1.1 阳性对照：阳性质粒（无需提取）或 PCV3 细胞培养物核酸提取物作阳性对照。

9.1.2 阴性对照：阴性质粒（无需提取）或细胞培养物（未感染 PCV3）核酸提取物作阴性对照。”

9.1.3 空白对照：在扩增反应阶段设置灭菌去离子水作空白对照。

9.2 加样

依次加入2×PCR预混液12.5 μL、PCV3-F1和PCV3-R1各0.5 μL、探针PCV3-P1 1 μL、模板5 μL，灭菌去离子水定容至25 μL，混匀，低速瞬时离心，置荧光PCR仪中扩增。

9.3 扩增反应

9.3.1 PCR 程序

9.3.1.1 95 °C预变性 3 min；95 °C变性 15 s，60 °C退火延伸 40 s，40 个循环。

9.3.1.2 荧光信号收集设置在每次循环的退火延伸阶段。

9.3.2 荧光素或检测通道设置

- 9.3.2.1 采用 HEX 通道，或将报告荧光设定为 HEX，采用其他报告荧光应按仪器说明设定对应通道。
- 9.3.2.2 淬灭荧光设定为 None，校准荧光设定为 None。可根据不同品牌仪器说明等效设置参数。

9.4 结果判定

9.4.1 判定前设定

综合分析仪器给出的各项结果，基线以仪器给出的默认值作为参考，阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照扩增曲线的最高点为准。

9.4.2 质控标准

- 9.4.2.1 阳性对照样品应有典型扩增曲线，且 Ct 值 \leq 30。
- 9.4.2.2 阴性对照没有扩增曲线，且无 Ct 值或 Ct 值 $>$ 30。
- 9.4.2.3 空白对照没有扩增曲线，且无 Ct 值。
- 9.4.2.4 三者均成立可判定试验成立，否则试验无效。

9.4.3 结果判定

- 9.4.3.1 阳性判定：样品有典型扩增曲线，且 HEX 通道 Ct 值 \leq 30 的样品为阳性。
- 9.4.3.2 阴性判定：样品无典型扩增曲线，且无 Ct 值或 Ct 值 $>$ 30 的样品为阴性。
- 9.4.3.3 可疑判定：样品有扩增曲线，且 $30 < \text{Ct 值} \leq 35$ 的样品为可疑样品。可疑样品应重复试验，重复试验结果 Ct 值 \leq 35 为阳性，否则为阴性。

10 注意事项

- 10.1 样品采集及处理过程中防止发生生物安全危害的措施参照 GB/T 19489 进行。
- 10.2 核酸提取及检测过程中防止交叉污染的措施参照 SN/T 1193 进行。

附 录 A
(规范性)
DNA 提取方法

A.1 有机溶剂抽提法

A.1.1 适用范围

可用于血清、拭子、组织样品和细胞培养液的DNA提取。

A.1.2 提取方法

A.1.2.1 取 200 μL 处理好的待检样品或对照，加入 200 μL PBS 缓冲液，再加入 SDS 和蛋白酶 K 溶液分别为 4 μg 和 20 μL ；

A.1.2.2 振荡混匀，于 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min 后，置沸水孵育 8 min；

A.1.2.3 加等体积三氯甲烷，振荡混匀，12,000 g 离心 10 min，取上清液；

A.1.2.4 加等体积异丙醇（-20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷），振荡混匀，4 $^{\circ}\text{C}$ 12,000 g 离心 10 min，弃上清液；

A.1.2.5 加等体积 75 %乙醇，振荡混匀，4 $^{\circ}\text{C}$ 12,000 g 离心 10 min，弃上清液，并干燥 5 min；

A.1.2.6 加入 50 μL 灭菌去离子水并室温放置 10 min 充分溶解核酸，直接用于检测，或置 -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

A.1.2.7 若使用其他等效的 DNA 提取试剂，则按照试剂说明书操作。
