

中华人民共和国国家标准

GB/T 35901—2018

猪圆环病毒2型荧光PCR检测方法

Real-time PCR method for detection of porcine circovirus type 2

2018-02-06 发布 2018-09-01 实施



前 言

本标准按照 GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中国农业科学院上海兽医研究所、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院、湖南圣湘生物科技有限公司。

本标准主要起草人:张强、李健、熊炜、童光志、赵和平、花群义、李树清、杨忠苹、李国新、王巧全、 王艳、林颖峥、蔡开妹、喻正军、吴绍强、林祥梅。





猪圆环病毒 2 型荧光 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了猪圆环病毒 2 型荧光 PCR 检测的操作方法。 本标准适用于猪圆环病毒 2 型核酸检测。

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

GB/T 25172 猪常温精液生产与保存技术规范

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

荧光 PCR:荧光聚合酶链式反应(real-time polymerase chain reaction)

Ct 值:每个反应管内的荧光信号量达到设定的阈值时所经历的循环数(cycle threshold)

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

Taq 酶: Taq DNA 聚合酶(Taq DNA polymerase)

TE 缓冲液: Tris-EDTA 缓冲液(Tris-EDTA buffer)

PCV:猪圆环病毒(porcine circovirus)

4 仪器设备

- 4.1 荧光 PCR 检测仪。
- 4.2 高速台式冷冻离心机:可控温至 4 ℃、离心速度可达 12 000 r/min 以上。
- 4.3 普通冰箱:2 ℃ ~8 ℃。
- 4.4 普通冰柜: -20 ℃以下。
- 4.5 超低温冰箱:可控温至-70℃以下。
- 4.6 微量移液器: 0.2 μL \sim 2 μL、1 μL \sim 10 μL、10 μL \sim 100 μL、20 μL \sim 200 μL、100 μL \sim 1 000 μL,并配备与移液器匹配的吸头。
- 4.7 高压灭菌锅。

5 耗材

- 5.1 1.5 mL 离心管。
- 5.2 0.2 mL PCR 薄壁管或八联管。

6 试剂

- 6.1 除非另有说明,在检测中使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 DNAzol,商品化 DNA 抽提试剂,于 2 ° ~8 ° 保存。
- 6.3 无水乙醇, -20 ℃预冷。
- 6.4 75%乙醇,无水乙醇和双蒸水配制,一20℃预冷。
- 6.5 8 mmol/L NaOH 溶液,配制见附录 A。 ///¬
- 6.6 PBS 缓冲液(0.01 mol/L PBS, pH 7.4),配制见附录 A。
- 6.7 Taq 酶及 10 倍 Taq 酶反应缓冲液: Tag 酶浓度为 5 $U/\mu L$, Taq 酶反应缓冲液中 Mg^{2+} 浓度为15 mmol/L。
- 6.8 dNTPs:含 dATP、dCTP、dTTP 各 10 mmol/L, -20℃保存, 避免反复冻融。
- 6.9 引物和 TagMan 探针,其序列见附录 B。
- 6.10 猪圆环病毒 2 型阳性对照样晶和阴性对照样品:阳性对照使用灭活疫苗或组织培养灭活毒, -20 ℃保存备用;阴性对照可采用健康猪的组织材料。
- 6.11 内参照质粒:带有人β-珠蛋白基因的质粒。

7 样品采集和处理

7.1 采样工具

- 7.1.1 手术刀、剪刀、镊子,经 160 ℃干热灭菌 2 h。
- 7.1.2 组织研磨器或者研钵,经 160 ℃干热灭菌 2 h。
- 7.1.3 真空采血管。

7.2 样品采集

- 7.2.1 血清样品采集:用无菌注射器抽取受检猪静脉血不少于 5 mL,置于无菌离心管内,室温或者 37 $^{\circ}$ C倾斜放置自然凝集 20 min $^{\circ}$ 2000 r/min $^{\circ}$ 3 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液到新的 离心管内备用。
- 7.2.2 粪便样品采集:取猪新鲜粪便1g,装入15 mL灭菌离心管中,加入5 mL PBS,混匀。
- 7.2.3 精液样品采集:按照 GB/T 25172 的方法采集和保存精液。
- 7.2.4 组织样品采集:采取病死猪(包括流产的死胎)或扑杀猪主要脏器(淋巴结、脾脏、肺脏、肾脏和肝脏)装入灭菌 15 mL 离心管中,编号,送实验室。
- 7.2.5 细胞培养物:细胞培养物反复冻融 3次,第 3次解冻后,将细胞培养物置于 1.5 mL 无 DNA 酶的 灭菌离心管内,编号备用。

7.3 样品保存和运输

上述采集的样品可立即用于检测。不能立即检测的样品,在 2 $^{\circ}$ $^{\circ}$ $^{\circ}$ $^{\circ}$ 飞 保存应不超过 24 h, -20 $^{\circ}$ $^{\circ}$

7.4 样品处理

- 7.4.1 血清和精液样品无需进行前处理,直接用于核酸提取。
- 7.4.2 粪便样品: 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,转入 1.5 mL 离心管中,用于后续的核酸提取。

- 7.4.3 组织样品:取1g解冻的组织,剪碎,加入2mL PBS 进行研磨,制备组织匀浆,8 000 r/min 离心 5min,取上清用于后续的核酸提取。
- 7.4.4 细胞培养物:4 000 r/min,4 ℃离心 10 min,取上清用于后续的核酸提取。

8 荧光 PCR 操作程序

8.1 DNA 抽提

- 8.1.1 在核酸提取区操作。DNA 抽提使用 DNAzol 试剂提取,也可以使用等效商品化试剂盒提取。
- 8.1.2 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。
- 8.1.3 每管先加入 800 μL DNAzol,再分别加入被检样品、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。
- 8.1.4 取 900 μ L 上清,置新的 1.5 mL 灭菌离心管中,加入 500 μ L 无水乙醇,混匀,室温放置 3 min; 4 ℃或室温 10 000 r/min 离心 5 min。
- 8.1.5 弃上清,沿管壁缓缓加入 0.8 mL \sim 1 mL 75%乙醇,颠倒 3 次 \sim 6 次混匀,4 $^{\circ}$ C 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。
- **8.1.6** 用 50 μL 8 mmol/L NaOH 溶液溶解沉淀, DNA 在 2 ℃ ~8 ℃冰箱可保存两个月, −20 ℃冰柜可稳定保存两年。

8.2 荧光 PCR 检测

8.2.1 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。

8.2.2 反应液的分装

将 8.2.1 中配制的荧光 PCR 反应液充分混匀,按照每管 39.8 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。

8.2.3 加样

在核酸提取区进行。在每个 PCR 反应管内加入 $0.2~\mu L$ 的内参照质粒,并分别加入 8.1~ 制备的核酸 $10~\mu L$ DNA 溶液,盖上盖子,500 r/min~1 000 r/min 离心 30~ s。转移至检测区。

8.2.4 上机检测

8.2.4.1 荧光通道设置

在检测区进行。将 8.2.3 中离心后的 PCR 管放入荧光 PCR 检测仪内,设置探针:5′选择 FAM 和 HEX 两个荧光通道,3′均选择无(None)。

8.2.4.2 循环条件设置与检测

第一阶段,预反应 50 ℃/2 min;

第二阶段,预变性 95 ℃/2 min;

第三阶段,变性 95 ℃/15 s,退火、延伸、荧光采集 60 ℃/30 s,40 个循环;

GB/T 35901-2018

第四阶段,冷却 25 ℃/10 s。

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。

9 结果判定

9.1 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。

9.2 质量控制

- 9.2.1 PCV-2 阴性对照: FAM 通道无报告 Ct 值或无典型的 S型扩增曲线, HEX 通道 Ct 值 \leq 36 且扩增曲线为典型的 S型:
- 9.2.2 PCV-2 阳性对照: FAM 通道 Ct 值 \leq 30, HEX 通道 Ct 值 \leq 36, 扩增曲线为典型的 S型;
- 9.2.3 9.2.1 和 9.2.2 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。

9.3 结果描述及判定

- 9.3.1 被检样本检测结果中 FAM 通道 Ct 值 \leq 38,且扩增曲线为典型的 S 曲线,报告为 PCV-2 核酸阳性;38<Ct 值 \leq 40,判定为可疑,可疑样品重新检测,如重复后仍然 38<Ct 值 \leq 40,且扩增曲线均为典型的 S 曲线,报告为 PCV-2 核酸阳性。
- 9.3.2 被检样本检测结果中 FAM 通道无 Ct 值或充典型的 S 型扩增曲线,同时 HEX 通道 Ct 值 \leq 36 且扩增曲线为典型的 S 曲线,则该样本超过本方法检测灵敏度范围,报告为 PCV-2 核酸阴性。
- 9.3.3 被检样本检测结果中 FAM 通道无 C_t 值或无典型的 S型扩增曲线,同时 HEX 通道 C_t 值>36,则该样本的检测结果无效,应查找并排除原因,并对此样本进行重复实验。



附 录 A (规范性附录) 溶液配制

A.1 8 mmol/L 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 Na₂ HPO₄ 和 0.24 g KH₂PO₄。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 (规范性附录)

引物和探针

引物、探针的名称和序列见表 B.1。

表 B.1 引物、探针的名称与序列

名称	序列
PCV2-qF	5'-GGAGTCTGGTGACCGTTGC-3'
PCV2-qR	5'-CCAATCACGCTTCTGCATTTT-3'
PCV2-P(探针)	5'-FAM-CCGCTCACTTTCAAAAGTTCAGCCA-BHQ1-3/
IC-F	5'-AAGTGCTCGGTGCCTTTAGTG-3'
IC-R	5'-GTCCCATAGACTCACCCTGAAGT-3'
IC-P(探针)	5'-HEX-CCTGGCTCACCTGGACAACCTCAAG-BHQ1-3'

注: 引物和探针可由生物公司合成,用 TE 溶液溶解并稀释至 100 μ mol/L 储存浓度,-20℃保存备用;根据需要配制成 10 μ mol/L 工作液,-20 ℃保存供检测使用。

附录C (规范性附录) 荧光 PCR 反应体系

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
10×PCR Buffer	5 μL
Taq 酶 (5 U/μL)	2 μL
dNTPs(100 mmol/L)	1.5 μL
Mg ²⁺ (1 mol/L)	0.25 μL
PCV2-qF(10 μmol/L)	1 μL
PCV2-qR(10 μmol/L)	1 μL
PCV2-P(10 μmol/L)	0.6 μL
IC-F(10 μmol/L)	0.5 μL
IC-R(10 μmol/L)	0.5 μL
IC-P(10 μmol/L)	0.5 μL
ddH ₂ O	26.95 μL
合计	39.8 μL

⚠ 版权声明

中国标准在线服务网(www.spc.org.cn)是中国标准出版社委托北京标科网络 技术有限公司负责运营销售正版标准资源的网络服务平台,本网站所有标准资源均 已获得国内外相关版权方的合法授权。未经授权,严禁任何单位、组织及个人对标 准文本进行复制、发行、销售、传播和翻译出版等违法行为。版权所有,违者必究!

中国标准在线服务网 http://www.spc.org.cn

标准号: GB/T 35901-2018

购买者:全国动物卫生标准化技术委员会

订单号: 0100191211052081

防伪号: 2019-1211-0430-4414-1802

间: 2019-12-11

价: 21元



中华人民共和国 国家标准 猪圆环病毒 2 型荧光 PCR 检测方法

GB/T 35901-2018

中国标准出版社出版发行 北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029) 北京市西城区三里河北街 16 号(100045)

> 网址:www.spc.org.cn 服务热线:400-168-0010 2018年2月第一版

书号: 155066 • 1-59463

版权专有 侵权必究