

猪圆环病毒 2 型与 3 型双重荧光定量 PCR 检测方法

Duplex fluorescence quantitative PCR method for the detection of porcine
circovirus type 2 and type 3

2020 - 06 - 30 发布

2020 - 07 - 30 实施

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009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。

本标准由浙江省农业农村厅提出。

本标准由浙江省畜牧兽医和饲料标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：浙江农林大学。

本标准主要起草人：宋厚辉、邵春艳、周莹珊、王晓杜、孙静、姜胜、杨永春、程昌勇、章先、杨杨、卫芳芳。

猪圆环病毒 2 型与 3 型双重荧光定量 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了猪圆环病毒2型与3型双重荧光定量PCR的检测方法。
本标准适用于猪圆环病毒2型与3型的核酸检测。

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 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

Ct值：达到阈值的循环数（Cycle threshold）

DNA：脱氧核糖核酸（Deoxyribonucleic Acid）

PBS：磷酸盐缓冲液（Phosphate Buffer Solution）

PCR：聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction）

PCV-2：猪圆环病毒2型（Porcine Circovirus 2）

PCV-3：猪圆环病毒3型（Porcine Circovirus 3）

Taq酶：Taq DNA聚合酶（Taq DNA polymerase）

4 试剂和材料

除非另有说明，所用试剂均为分析纯；灭菌水，0.01 mol/L PBS和8 mmol/L NaOH配制中所使用的水应符合GB/T 6682-2008分析实验室用水规格和试验方法中一级水的要求。

4.1 DNAzol Reagent：DNA 抽提试剂，2 ℃~8 ℃保存。

4.2 无水乙醇：4 ℃预冷。

4.3 75%乙醇：用无水乙醇和灭菌水配制，-20 ℃预冷。

4.4 8 mmol/L NaOH 溶液：配制方法见附录 A。

4.5 0.01 mol/L PBS，pH 7.2：配制方法见附录 A。

4.6 2×Premix HS Taq（内含 PCR buffer，HS Taq，dNTPs，Mg²⁺，RNaseH 等）。

4.7 阳性对照：猪圆环病毒 2 型灭活疫苗和猪圆环病毒 3 型阳性克隆质粒。PCV-3 目的基因（ORF2）序列见附录 A。

4.8 空白对照：灭菌水。

4.9 用于荧光定量 PCR 的引物浓度为 10 μmol/L，Taqman 探针浓度 5 μmol/L，其序列分别为：
——PCV-2-F：5'-TCACCTATGACCCCTATG-3'；

- PCV-2-R: 5' -GGAAGTAATCAATAGTGAATC-3' ;
- PCV-2-P: 5' -FAM-CTCCTCTCGCCATAACCATAACC-BHQ1-3' ;
- PCV-3-F: 5' -TGGCTCAACACATATGAC-3' ;
- PCV-3-R: 5' -ACGGACTTGTAAACGAATC-3' ;
- PCV-3-P: 5' -HEX-TGCCGTAGAAGTCTGTCATTCCA-BHQ1-3' 。

4.10 一次性耗材: 乳胶手套、1.5 mL 离心管、15 mL 离心管、荧光 PCR 反应管和吸头。

5 器材和设备

- 5.1 电热干燥箱。
- 5.2 高压灭菌锅。
- 5.3 高速台式冷冻离心机: 可控温至 4 °C, 最大离心速度可达 12 000 r/min 以上。
- 5.4 冷藏冰箱, 超低温冰箱 (-80 °C)。
- 5.5 荧光 PCR 检测仪。
- 5.6 组织匀浆器。
- 5.7 移液器。
- 5.8 研钵。

6 实验室分区

检测实验室应有相应的生物安全设施和功能分区, 包括样品处理区、核酸提取区、试剂配制区和扩增区。各功能区有专用的试剂和实验材料, 不可交叉使用。

7 样品的采集与处理

7.1 采样注意事项

采样及样品前处理过程中应注意无菌操作, 防止样本交叉污染。

7.2 采样工具

药匙、剪刀、镊子, 经 160 °C 干热灭菌 2 h。

7.3 采样方法与处理

7.3.1 内脏样品

采取病死或剖杀猪的主要脏器(淋巴结、脾脏、肺脏和肾脏)装入 15 mL 灭菌离心管中, 按 1: 4 倍体积加入灭菌的 0.01 mol/L PBS。运送至实验室后, 再用研钵或组织匀浆器对组织进行充分研磨混匀, 反复冻融 3 次。在 4 °C 条件下以 3 000 r/min 离心 20 min, 取上清液转入 1.5 mL 离心管中编号备用, 待检。

7.3.2 血清样品

血清样品无需处理, 直接用于核酸提取。

7.4 存放与运送

采集的样品密封后，采用保温壶或保温桶加冰密封，在6 h~8 h之内运送到实验室。采集或处理的样品在2℃~8℃条件下保存应不超过24 h；需长期保存时，应放置-80℃冰箱，但应避免反复冻融（冻融不超过3次）。

8 核酸提取

8.1 一般要求

应在核酸提取区进行。

8.2 DNAzol 法抽提核酸

8.2.1 取 n 个灭菌的 1.5 mL 离心管，其中 n 为待检样品数、2 管阳性对照及 2 管空白对照之和，对每个离心管进行编号。

8.2.2 每管加入 500 μL DNAzol，分别加入待检样品、阳性对照和空白对照各 250 μL，颠倒 10 次混匀，静置 5 min；于 4℃，10 000 r/min 离心 10 min。

8.2.3 取 900 μL 上清，置于新的 1.5 mL 灭菌离心管中，每使用 1 mL DNAzol，加 500 μL 无水乙醇，颠倒混匀 5 次~8 次，室温放置 1 min~3 min；于 4℃，5 000 r/min 离心 5 min。

8.2.4 弃上清，沿管壁缓缓加入 1 mL 75%乙醇，颠倒混匀 3 次~6 次，静置 0.5 min~1 min；4℃，1 000 r/min 离心 2 min。反复洗涤两次后，将离心管倒扣于吸水纸上，自然晾干（以无乙醇味为准）。

8.2.5 用 50 μL 8 mmol/L NaOH 溶液溶解沉淀，于-20℃冰箱保存备用。

8.3 核酸提取等效方法

可采用核酸提取试剂盒或自动化核酸抽提仪及配套核酸抽提试剂进行核酸抽提。

9 实时荧光 PCR 检测

9.1 实时荧光 PCR 扩增体系的配制

9.1.1 在试剂配制区进行。

9.1.2 设 PCR 反应数为 n，其中 n 为待检样品数、2 管阳性对照及 2 管空白对照之和，每个样本测试反应体系配制见表 1。配制完毕的反应液分装时应尽量避免产生气泡，转移至核酸提取区加样。

表1 每个样品反应体系配制表

体系组分	用量
2×Premix HS Taq	10 μL
PCV-2-F	0.4 μL
PCV-2-R	0.4 μL
PCV-2-P	0.8 μL
PCV-3-F	0.4 μL
PCV-3-R	0.4 μL
PCV-3-P	0.8 μL
DEPC 水	4.8 μL
总量	18 μL

9.2 加样

9.2.1 在核酸提取区进行。

9.2.2 在各设定的荧光 PCR 管中分别加入本标准 8.2.5 中制备的 2 μ L DNA 溶液，盖紧管盖后，3 000 r/min 离心 30 s；上机前应检查各反应管是否盖紧。

9.3 实时荧光 PCR 扩增

9.3.1 在扩增区进行。

9.3.2 将本标准 9.2 中离心后的 PCR 管放入荧光 PCR 检测仪内，记录样品摆放顺序。

9.3.3 循环条件设置：

a) 95 $^{\circ}$ C 条件下预变性 30 s；

b) 95 $^{\circ}$ C 条件下变性 5 s；60 $^{\circ}$ C 条件下扩增 30 s，40 个循环；60 $^{\circ}$ C 时设置采集荧光。

9.4 荧光通道设定

PCV-2 Report Dye 设定为 FAM，Quencher Dye 设定为 BHQ；PCV-3 Report Dye 设定为 HEX，Quencher Dye 设定为 BHQ。

10 结果判定

10.1 阈值设定

阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整，以阈值线刚好超过阳性对照品“S”型曲线指数扩增初期的荧光值为准。

10.2 质控标准

阳性对照品 FAM 和 HEX 通道的 Ct 值均应 \leq 30.0，并出现典型的“S”型扩增曲线；空白对照品 FAM 和 HEX 通道均无 Ct 值，且无典型扩增曲线。阳性对照和空白对照同时成立可判定试验有效，否则试验无效。

10.3 结果描述及判定

10.3.1 若被检样品 FAM 通道 Ct 值 \leq 36.0，且出现典型的“S”型扩增曲线，判定为 PCV-2 核酸阳性；若被检样品 FAM 通道无 Ct 值，且无典型的扩增曲线，判定为 PCV-2 核酸阴性；若被检样品 FAM 通道 Ct 值 $>$ 36.0，且出现典型“S”型扩增曲线，建议对该样品进行重复试验，重复试验结果 Ct 值 \leq 38.0 且出现典型扩增曲线者判为 PCV-2 核酸阳性，否则判为 PCV-2 核酸阴性。

10.3.2 若被检样品 HEX 通道 Ct 值 \leq 36.0，且出现典型的“S”型扩增曲线，判定为 PCV-3 核酸阳性；若被检样品 HEX 通道无 Ct 值，且无典型的扩增曲线，判定为 PCV-3 核酸阴性；若被检样品 HEX 通道 Ct 值 $>$ 36.0，且出现典型“S”型扩增曲线，建议对该样品进行重复试验，重复试验结果 Ct 值 \leq 38.0 且出现典型扩增曲线者判为 PCV-3 核酸阳性，否则判为 PCV-3 核酸阴性。

附 录 A
(规范性附录)
配制方法

A.1 8 mmol/L NaOH溶液的配制

称量0.32 g NaOH，溶解到1 000 mL二级水中，混匀，分装，常温保存。

A.2 0.01 mol/L PBS (pH 7.2) 的配制

称取磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 3.0 g，磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 0.2 g，氯化钾 (KCl) 0.2 g，氯化钠 (NaCl) 8 g，加二级水定容至1 000 mL，完全溶解后用3 mol/L的NaOH调pH为7.2，经121 °C ($\pm 2^\circ\text{C}$)，高压灭菌15 min，室温保存。

A.3 PCV-3 目的基因 (ORF2) 序列

ATGAGACACAGAGCTATATTCAGAAGAAGACCCCGCCCAAGGAGACGACGACGCCACAGAAGGCGCTATGCCAGAAGAAGACTAT
TCATTAGGAGGCCACAGCTGGCACATACTACACAAAGAAATACTCCACCATGAACGTCATTTCCGTTGGAACCTCCTCAGAATAATAAG
CCCTGGCAGCCAAACCACTTCATTACCCGCCTAAACGAGTGGGAAACTGCAATTAGCTTTGAATATTATAAGATACTAAAGATGAAAGT
TACACTAAGCCCTGTAATTTCTCCAGCTCAGCAAACAAAACTATGTTCCGGGCACACAGCCATAGATCTAGACGGCGCCTGGACCACAA
ACACTTGGCTCCAAGACGACCCTTATGCGGAAAGTTCCTACTCGTAAAGTTATGACTTCTAAAAAAAACACAGCCGTTACTTCACCCCG
AAACCAATTCTGGCGGAACTACCAGCGCTCACCCAGGACAAAGCCTCTTCTTTTCTCCAGACCCACCCCATGGCTCAACACATATGA
CCCCACCGTTCAATGGGGAGCACTGCTTTGGAGCATTATGTCCCGGAAAAAACTGGAATGACAGACTTCTACGGCACGAAAGAAGTTT
GGATTCGTTACAAGTCCGTTCTCTAA
