

# 团 体 标 准

T/CVMA X24—2019

## 口蹄疫病毒 O、A 和 Asia1 型分型荧光 RT-PCR 检测方法

Real-Time RT-PCR for Detection of Foot and Mouth Disease Viruses serotype  
O, A and Asia1

(征求意见稿)

2019- xx-xx 发布

2019 - xx -xx 实施

中 国 兽 医 协 会 发 布

## 前 言

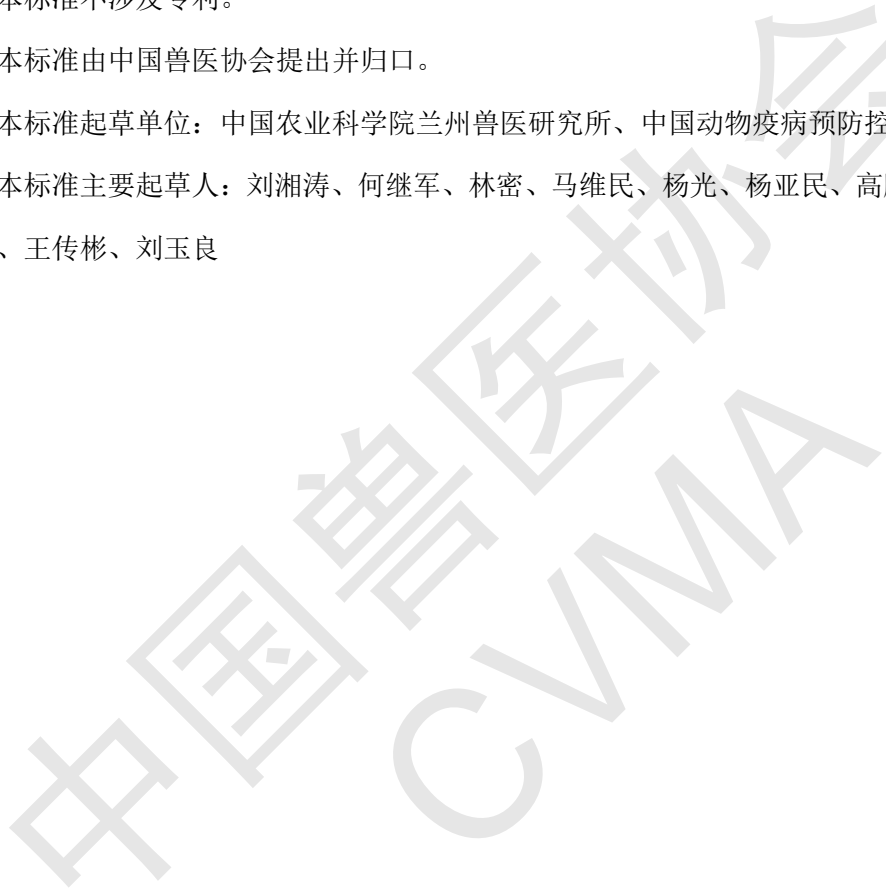
本标准按 GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准不涉及专利。

本标准由中国兽医协会提出并归口。

本标准起草单位：中国农业科学院兰州兽医研究所、中国动物疫病预防控制中心。

本标准主要起草人：刘湘涛、何继军、林密、马维民、杨光、杨亚民、高鹏程、靳野、郑海学、郭建宏、王传彬、刘玉良



# 口蹄疫病毒 O、A 和 Asia1 型分型荧光 RT-PCR 检测方法

## 1 范围

本标准规定了口蹄疫病毒O、A和Asia1型分型荧光RT-PCR检测技术要求和结果判定。

本标准适用于临床发病动物水泡皮、水泡液、反刍动物食道-咽部分泌物（O-P液）及其他组织和病毒培养物中口蹄疫病毒核酸检测。

## 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 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 18935 口蹄疫诊断技术

GB/T 27528 口蹄疫病毒实时荧光RT-PCR检测方法

## 3 试剂

### 3.1 总 RNA 提取试剂

3.1.1 无核酶水：将焦碳酸二乙酯（DEPC）按 0.1% 的量（w/v）加入三蒸水中制备的无 DNA 酶和 RNA 酶水（附录 A.1）。推荐使用商品化无核酶水。

3.1.2 Trizol 裂解液：商品化试剂，4℃ 保存。

3.1.3 三氯甲烷：分析纯，常温保存。

3.1.4 异丙醇：分析纯，常温保存。使用前预冷至-20℃。

3.1.5 75%乙醇：无水乙醇（分析纯）与无核酶水按 3:1 配制而成。使用前预冷至-20℃。

3.1.6 核酸提取等效方法和试剂：可采用等效 RNA 提取方法，如采用离心柱、磁珠法、自动化核酸提取仪等提取核酸，分别使用配套试剂。

### 3.2 Real-time RT-PCR 试剂

2×Real-time RT-PCR 缓冲液、热启动 Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)、PrimeScript 反转录酶混合液、RNA 酶抑制剂 (40 U/μL)。

### 3.3 引物和探针序列

O 型上游引物序列为：5'-GCTCTTTCCCCACCAGTTCA-3'；下游引物序列为：5'-TTGTACTGGTCGTAGCGGTTGA-3'；探针序列为：5'-CGGACGAACATGACGGCGCACA-3'，其 5' 端和 3' 端分别标记 FAM 和 BHQ。

A 型分型上游引物序列为：5'-TTGCACTTCATGTTTACTGGCT-3'；下游引物序列为：5'-CGTGTCCCATTTCTGCGTGG-3'；探针序列为：5'-ACGCCACCGGACACACCTGAGAA-3'，其 5' 端和 3' 端分别标记 CY5 和 BHQ。

Asia1 型分型上游引物序列为：5'-CCGACGGCTTCACACTGA-3'；下游引物序列为：5'-AGAAGTAGTACGTCGCAGACC-3'；探针序列为：5'-CTCACCCAGCCCAAGAGCACCC-3'，其 5' 端和 3' 端分别标记 HEX 和 BHQ。

配制反应体系时，3 条上游引物、3 条下游引物和 3 条探针分别等量混合，成为混合上游引物、混合下游引物和混合探针。

### 3.4 阳性对照和阴性对照

3.4.1 阳性对照：口蹄疫病毒培养物灭活抗原。

3.4.2 阴性对照：无核酶水。

## 4 主要仪器设备

荧光 PCR 仪、组织匀浆器、高速台式冷冻离心机、生物安全柜等。

## 5 操作步骤

## 5.1 样品采集

样品采集按照GB/T 18935 5.3进行。

## 5.2 样品处理

5.2.1 生物安全措施：样品处理过程中的生物安全要求和措施，按照 GB19489 进行。

5.2.2 组织样品处理：将采集的发病动物病料或组织，置组织匀浆器中充分研磨，0.04 mol/L PBS (pH 7.4) (附录 A.2) 制成 1:5~1:10 组织悬液，4℃浸毒，3000 r/min 离心 10 min，取上清液备用。

5.2.3 水泡液、O-P 液样品处理：直接用于检测。

5.2.4 病毒培养物：病毒接种本动物、实验动物后的发病病料等组织样品，按照 5.2.2 处理。病毒接种细胞培养物直接检测。

## 5.3 病毒 RNA 提取

5.3.1 若使用传统的 Trizol 裂解方法提取病毒 RNA，参照以下步骤进行操作。

5.3.1.1 取已处理的待检样品、阳性对照和阴性对照各 200  $\mu\text{L}$ ，分别置于 1.5 mL 离心管中，每管加入 1000  $\mu\text{L}$  Trizol 裂解液，充分混匀，室温静置 3~5 min。

5.3.1.2 在每管中加入 200  $\mu\text{L}$  氯仿，涡旋震荡 15 秒，室温下放置 2~3min 后，4℃，12000 r/min，离心 10 min。

5.3.1.3 吸取约 500  $\mu\text{L}$  上层水相，置于新的离心管中，加入等量异丙醇，充分混匀，室温静置 15 min。4℃，12000 r/min，离心 10 min，小心倒干液体，留下 RNA 沉淀。

5.3.1.4 加 1000  $\mu\text{L}$  75%乙醇，颠倒洗涤沉淀，4℃，10000 r/min，离心 5 min，小心倒干液体，室温干燥 5 min~10 min。

5.3.1.5 在每管中加 20  $\mu\text{L}$  无核酶水溶解 RNA。提取的 RNA 可立即用于荧光 RT-PCR 反应，也可-70℃ 冰箱保存备用。

5.3.2 若使用病毒 RNA 提取试剂盒，按试剂盒说明书操作。

## 5.4 荧光 RT-PCR 检测

5.4.1 反应液配制，采用 25 $\mu$ L 反应体系，扩增体系配制如下：

2 $\times$ 一步 RT-PCR 缓冲液	12.5 $\mu$ L
Ex Taq HS (5 U/ $\mu$ L)	0.5 $\mu$ L
PrimeScript RT Enzyme Mix II	0.5 $\mu$ L
混合上游引物(10 $\mu$ mol/L)	0.5 $\mu$ L
混合下游引物(10 $\mu$ mol/L)	0.5 $\mu$ L
混合探针 (5 $\mu$ mol/L)	1 $\mu$ L
样品及对照 总 RNA	2 $\mu$ L
无核酶水	7.5 $\mu$ L

5.4.2 扩增程序：42 $^{\circ}$ C 反转录 15 min；95 $^{\circ}$ C 预变性 3min；95 $^{\circ}$ C 变性 10 s，60 $^{\circ}$ C 退火 30 s，40 次循环。探针检测设置 FAM、CY5 和 HEX 三种荧光信号。在退火结束时收集荧光。

## 5.5 结果判定

5.5.1 分析条件设置：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设定于刚好超过阴性对照扩增曲线的最高点为准。不同仪器可根据仪器噪音情况进行调整。

5.5.2 试验成立条件：阴性对照在 FAM、CY5 和 HEX 通道检测无 Ct 值且无扩增曲线；阳性对照在 FAM、CY5 和 HEX 通道检测 Ct 值 $\leq$ 25，并且有明显对数扩增曲线，试验结果成立。

## 5.6 判定标准

若 FAM 检测通道有对数扩增曲线，且 Ct 值 $\leq$ 30，可判样品为口蹄疫病毒 O 型阳性；若 30<Ct 值 $\leq$ 35，可判样品为口蹄疫病毒 O 型可疑。

若 CY5 检测通道有对数扩增曲线，且 Ct 值 $\leq$ 30，可判样品为口蹄疫病毒 A 型阳性；若 30<Ct 值 $\leq$ 35，可判样品为口蹄疫病毒 A 型可疑。

若 HEX 检测通道有对数扩增曲线，且 Ct 值 $\leq$ 30，可判样品为口蹄疫病毒 Asia1 型阳性；若 30<Ct 值 $\leq$ 35，可判样品为口蹄疫病毒 Asia1 型可疑。

若 CY5、FAM、HEX 检测通道均无扩增曲线或 Ct 值 $>$ 35，可判样品为口蹄疫病毒 A 型、O 型和 Asia1 型阴性。

附 录 A  
(规范性附录)  
溶液的配制

### A.1 无核酶水

1 升三蒸水中加入 1mL DEPC，充分摇匀，37℃放置 12h 以上，再经 121℃高压灭菌 15min。分装备用。

### A.2 0.04mol/L PBS (pH 7.4)

预先配制 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4):

氯化钠 (NaCl)	85.00 g
磷酸氢二钠 (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	15.49 g
磷酸二氢钠 (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2.03 g
加蒸馏水至	1000 mL

0.04mol/L PBS (pH 7.4) 配制:

0.1 mol/L PBS	400 mL
蒸馏水	600 mL

121℃高压灭菌 30 min，室温或 4℃冰箱保存。

---