ICS

点击此处添加中国标准文献分类号

团　　体　　标　　准

T/CVMA XXXXX—XXXX

猪冠状病毒多重实时荧光定量 RT-PCR 检测方法

Multiple real-time RT-PCR method for detection of porcine coronavirus

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

（征求意见稿）

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。

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。

本文件由上海市动物疫病预防控制中心提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：上海市动物疫病预防控制中心、南京诺唯赞生物科技股份有限公司、崇明区动物疫病预防控制中心、金山区动物疫病预防控制中心、湖南冠牧生物科技有限公司。

本文件主要起草人：杨德全、赵洪进、王建、鞠厚斌、张力军、杨显超、苑建军、卢春光、翁永刚、葛菲菲、沈海潇、李鑫、杨忠苹、王佳、舒涛、赵和平、陶田谷晟、朱九超、唐聪圣、张玉杰。

中国兽医协会 CVMA

猪冠状病毒多重实时荧光定量 RT-PCR 检测方法

1 范围

本文件规定猪冠状病毒（猪传染性胃肠炎病毒、猪流行性腹泻病毒和猪德尔塔冠状病毒）的多重实时荧光定量RT-PCR检测方法。

本文件适用于疑似猪冠状病毒感染的粪便、肛门拭子和临床病死猪的肠道及内容物样品的核酸检测。

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 19489 实验室 生物安全通用要求

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 符号和缩略语

下列缩略语适用于本文件。

荧光 RT-PCR 实时荧光反转录聚合酶链式反应（real-time reverse transcript polymerase chain reaction）

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

Cy5 花青染料（Cyanine dyes）

DEPC 焦碳酸二乙酯（diethyl pyrocarbonate）

FAM 6-羧基荧光素（6-carboxyfluorescein）

HEX 六氯-6-甲基荧光素（hexachlorofluorescein）

PBS 磷酸盐缓冲液（phosphate-buffered saline buffer）

PDCoV 猪德尔塔冠状病毒（porcine deltacoronavirus）

PEDV 猪流行性腹泻病毒（porcine epidemic diarrhea virus）

RNA 核糖核酸（ribonucleic acid）

TGEV 猪传染性胃肠炎病毒（transmissible gastroenteritis virus）

5 试剂和材料

中国兽医协会 CVMA

5.1 试剂

5.1.1 总则：除非另有说明，所用试剂均为分析纯，试验用水符合 GB/T 6682 的要求，所有试剂均用无 RNA 酶的容器分装。

5.1.2 TRIzol：2 ℃~8 ℃保存。

5.1.3 氯仿：2 ℃~8 ℃保存。

5.1.4 异丙醇：-20 ℃预冷。

5.1.5 DEPC 水：见附录 A 中 A.1。

5.1.6 75% 乙醇：用新开启的无水乙醇和 DEPC 水配制，-20 ℃预冷。

5.1.7 0.01 mol/L PBS 溶液（pH 7.2~ pH 7.4）：见附录 A 中 A.2。

5.1.8 多重荧光 RT-PCR 反应液配方：见附录 B.1。

5.1.9 阳性对照、阴性对照见附录 A 中 A.5 和 A.6。

5.2 引物和探针

多重荧光RT-PCR扩增用上、下游引物和探针序列参见附录C.1。

6 仪器设备

6.1 荧光 PCR 检测仪及配套反应管（板）。

6.2 高速冷冻离心机。

6.3 振荡器。

6.4 微量移液器（10 μL 、20 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL）及配套吸头（无核酸酶）。

6.5 冰箱（2 ℃~8 ℃和-20 ℃两种）

6.6 1.5 mL 离心管（无核酸酶）。

7 样品的采集与处理

7.1 总则

样品的采集、保存与运输按照NY/T 541执行。生物安全要求按照GB 19489的规定。

7.2 样品处理

7.2.1 肠道样品：采集充血、出血、肠壁变薄、含多量水样粪便等病变明显的小肠组织，无菌取 0.5 g 样品研磨后，加 0.3 mL～0.5 mL 的组织悬液（符合附录 A 中 A.3 的规定）进行匀浆混匀，转入无菌离心管中，4 ℃下 5000 r/min 离心 10 min，取上清液备用。

中国兽医协会 CVMA

7.2.2 拭子、粪便样品：将采集有拭子或粪便的拭子悬液（符合附录 A 中 A.4 的规定）在振荡器上充分混合，捻动、挤压干后弃去拭子。3000 r/min 离心 5 min，吸取上清 200 μL 于 1.5 mL 灭菌离心管中。

8 操作方法

8.1 样品核酸提取

8.1.1 在样本制备区进行。RNA 提取使用 TRIzol 裂解法提取；也可采用其他等效的商品化试剂盒提取。

8.1.2 待检样品、阳性对照和阴性对照的份数总和用 n 表示，取 n 个灭菌 1.5 mL 离心管，逐管编号。

8.1.3 每管加入 600 μL TRIzol。

8.1.4 每管对应编号分别加入 200 μL 待检样品、阳性对照和阴性对照，混匀。

8.1.5 每管加入 200 μL 氯仿，充分颠倒混匀。于 4 ℃、12000 r/min 离心 15 min。

8.1.6 新取 n 个灭菌的 1.5 mL 离心管，逐管编号，每管加入 500 μL 异丙醇(-20 ℃预冷)。

8.1.7 吸取本标准 8.1.5 各管中的上清液 500 μL，转移至 8.1.6 相应的管中，避免吸出中间层，颠倒混匀。

8.1.8 于 4 ℃、12000 r/min 离心 15 min，轻轻倒去上清，倒置于吸水纸上，沥干液体，不同样品应在吸水纸不同地方沥干。

8.1.9 每管加入 600 μL 75% 乙醇(-20 ℃预冷)，颠倒洗涤。

8.1.10 于 4 ℃、12000 r/min 离心 10 min，轻轻倒去上清，倒置于吸水纸上，沥干液体，不同样品应在吸水纸不同地方沥干。

8.1.11 4000 r/min 离心 10 s，将管壁上的残余液体甩到管底部，用微量移液器将其吸干。注意一份样本换用一个吸头，吸头不要碰到有沉淀一面。

8.1.12 室温干燥 3 min。

8.1.13 每管加入 11 μL DEPC 水，轻轻混匀，溶解管壁上的 RNA，2000 r/min 离心 5 s，获得 RNA 溶液，可直接用于检测或保存于-20 ℃备用。

8.2 扩增试剂的准备与配制

8.2.1 在试剂储存和准备区进行。

8.2.2 设实时荧光 PCR 反应管数为 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 B，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。将配制的荧光 PCR 反应液充分混匀，按照每管 20 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，转移至样本制备区。

8.3 加样

8.3.1 在样本制备进行。

中国兽医协会 CVMA

8.3.2　在上述 8.2.2 的反应管中分别加入 8.1.13 中制备的 RNA 溶液 5 μL，使每管总体积达到 25 μL，记录反应管对应的样品编号。盖紧管盖后，500 r/min 离心 30 s。转移至扩增区。

8.4　荧光 RT-PCR 反应

8.4.1　在扩增区进行。

8.4.2　将 8.3.2 中加样后的反应管放入荧光 PCR 检测仪中，设置探针：报告基团选择 FAM、HEX 和 Cy5 三个荧光通道，HEX 对应淬灭基团选择 MGB，其余均选择无（None）荧光。在荧光 PCR 仪上进行以下反应：50 ℃15 min，95 ℃ 30 s；95 ℃ 10 s，60 ℃ 30 s，在每个循环第二步（60℃ 30s）收集荧光信号，共 45 个循环。

9　结果判定

9.1　结果分析条件设定

阈值设定原则：阈值线设定于刚好超过阴性对照扩增曲线的最高点。不同仪器可根据仪器噪音情况进行调整。

9.2　实验成立的条件

9.2.1　阴性对照：FAM 通道无 Ct 值或无典型的 S 型扩增曲线，HEX 通道无 Ct 值或无典型的 S 型扩增曲线，Cy5 通道无 Ct 值或无典型的 S 型扩增曲线。

9.2.2　阳性对照：FAM 通道 Ct 值≤30，HEX 通道 Ct 值≤30，Cy5 通道 Ct 值≤30，且三个通道的扩增曲线均为典型的 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　被检样品若 FAM 通道 Ct 值≤38 且扩增曲线为典型的 S 型曲线，HEX 通道无 Ct 值或无典型的 S 型扩增曲线，Cy5 通道无 Ct 值或无典型的 S 型扩增曲线，报告为 TGEV 核酸阳性；38＜Ct≤45 时，判定为可疑，可疑样品应重新检测，如重复后 Ct 值仍然≤45，并且有典型的 S 型扩增曲线，报告为 TGEV 核酸阳性。

9.3.2　被检样品若 HEX 通道 Ct 值≤38 且扩增曲线为典型的 S 型曲线，FAM 通道无 Ct 值或无典型的 S 型扩增曲线，Cy5 通道无 Ct 值或无典型的 S 型扩增曲线，报告为 PEDV 核酸阳性。38＜Ct≤45 时，判定为可疑，可疑样品应重新检测，如重复后 Ct 值仍然≤45，并且有典型的 S 型扩增曲线，报告为 PEDV 核酸阳性。

9.3.3　被检样品若 Cy5 通道 Ct 值≤38 且扩增曲线为典型的 S 型曲线，FAM 通道无 Ct 值或无典型的 S 型扩增曲线，HEX 通道无 Ct 值或无典型的 S 型扩增曲线，报告为 PDCoV 核酸阳性。38＜Ct≤45 时，判定为可疑，可疑样品应重新检测，如重复后 Ct 值仍然≤45，并且有典型的 S 型扩增曲线，报告为 PDCoV 核酸阳性。

9.3.4　被检样品若 FAM 通道无 Ct 值或无典型的 S 型扩增曲线，HEX 通道无 Ct 值或无典型的 S 型扩增曲线，Cy5 通道无 Ct 值或无典型的 S 型扩增曲线，报告为猪冠状病毒（TGEV、PEDV 和 PDCoV）核酸阴性。

中国兽医协会 CVMA

附 录 A
（规范性）
溶液配制

A.1 DEPC水配方

将 DEPC 加入去离子水（符合 GB/T6682 要求）中至终浓度为 0.1%（体积比），充分混合均匀后作用 12 h，分装，121 ℃高压灭菌 30 min，冷却后冷藏备用。

A.2 0.01 mol/L PBS溶液 （pH 7.2~ pH 7.4）

准确称量下面各试剂，加入到 800 mL 蒸馏水中溶解，调节溶液的 pH 至 7.2～7.4，加水定容至 1 L。分装后在 121 ℃灭菌 15 min～20 min，或过滤除菌，保存于室温。

氯化钠(NaCl)	8.00 g
氯化钾(KCl)	0.20 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.24 g
磷酸氢二钠($Na_2HPO_4·12H_2O$)	3.65 g
蒸馏水	加至 1000 mL

A.3 组织悬液

在0.01 mol/LPBS液中添加青霉素(2000 IU/mL)，链霉素(2 mg/mL)、庆大霉素(50 pg/mL)和制霉菌素(1000 IU/mL)。

A.4 拭子悬液

在0.01 mol/L PBS液中添加青霉素(10000 IU/mL)，链霉素(10 mg/mL)、庆大霉素(250 pg/mL)和制霉菌素(5000 IU/mL)，调pH值至7.2～7.4。

A.5 阳性对照

为含TGEV、PEDV和PDCoV基因目的片段的质粒DNA。

A.6 阴性对照

为不含TGEV、PEDV和PDCoV基因目的片段的质粒DNA。

中国兽医协会 CVMA

附 录 B
（规范性）
荧光 RT-PCR 反应液配方

B.1 荧光RT-PCR反应液配方

荧光 RT-PCR 反应液配方见表 B.1。

组分	1个检测反应的加入量（μL）
5× One step U+ Mix	5
One step U+ Enzyme Mix	1
TGEV-1F	0.5
TGEV-1R	0.5
TGEV-1P	0.2
PEDV -2F	0.6
PEDV -2R	0.6
PEDV -2P	0.5
PDCoV-3F	0.8
PDCoV-3R	0.8
PDCoV-3P	0.4
ddH2O	9.1
RNA	5

B.2 注意事项

在检测过程中，应严防不同样品间的交叉污染。
反应液分装时应避免产生气泡，上机前检查各反应管是否盖紧，以免荧光物质泄漏污染仪器。

中国兽医协会 CVMA

附 录 C
（资料性附录）
引物和探针

表 C.1 引物、探针的名称与序列

名称	序列（5′- 3′）
TGEV-1F	TCTGCTGAAGGTGCTATTATATGC
TGEV-1R	CCACAATTTGCCTCTGAATTAGAAG
TGEV-1P	FAM-C/TAAGGGCTCACCACCTACTACCACCA-BHQ1
PEDV -2F	CCGTGGTGAGCGAATTGAA
PEDV -2R	GGTCCTGTTCCGAGGTAGTAGAAA
PEDV -2P	HEX-AACCTTCCAATTGGC-MGB
PDCoV-3F	GAGAGTAGACTCCTTGCAGGGATTAT
PDCoV-3R	GCTTGCCATGCTTAACGACTG
PDCoV-3P	Cy5-AATGCACCTCCATGTACC-BHQ2

中国兽医协会 CVMA