|  |  |
| --- | --- |
| ICS | 11.220 |
| CCS | |  | | --- | | D:\000000部门项目\09标准化插件开发\程序源代码\StandardEditor_ShanDongKeXieYuan\团标首页面字母T.pngD:\000000部门项目\09标准化插件开发\程序源代码\StandardEditor_ShanDongKeXieYuan\团标首页面字母T后面的反斜杠.png GX |   B 41 |

团体标准

T/GX XXXX—XXXX

A型塞尼卡病毒与O型、A型、亚洲I型口蹄疫病毒鉴别检测 多重RT-PCR和多重qRT-PCR法

Differential detection of Senecavirus A and serotype O, A, Asia I foot-and-mouth disease virus

（本草案完成时间：2022年7月25日）

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

广西标准化协会  发布

1. 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这些专利的责任。

本文件由广西兽医协会提出并归口。

本文件起草单位：广西壮族自治区动物疫病预防控制中心、广西桂垦西江牧业有限公司、广西中科基因科技有限公司、广西民生中检联检测有限公司。

本文件起草人：施开创、屈素洁、林昌华、冯淑萍、黄海愉、龙凤、文金华、尹彦文、苏丽娟、文俞、宋靖萱、蒋家霞、陆文俊、谢守玉、黄美芝、李军。

A型塞尼卡病毒与O型、A型、亚洲I型口蹄疫病毒鉴别检测 多重RT-PCR和多重qRT-PCR法

* 1. 范围

本文件规定了用于A型塞尼卡病毒与O型、A型、亚洲I型口蹄疫病毒的鉴别检测的多重RT-PCR和qRT-PCR方法，包括试剂、主要仪器设备、操作步骤及结果判定等技术要求。

本文件适用于广西壮族自治区行政区域内 A 型塞尼卡病毒与O型、A型、亚洲I型口蹄疫病毒鉴别检测诊断。

* 1. 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 18935-2018 口蹄疫诊断技术

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

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

* 1. 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

SVA：A型塞尼卡病毒（Senecavirus A）

FMDV：口蹄疫病毒（Foot-and-mouth disease virus）

RT-PCR:反转录聚合酶链反应（Reverse transcription polymerase chain reaction）

qRT-PCR: 实时荧光定量反转录聚合酶链反应（Real-time RT-PCR）

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）

* 1. 试剂
     1. 引物探针

引物序列见附录A，上游、下游引物的使用浓度均为25pmol/µL。

* + 1. RNA提取试剂盒

宜选取商品化的病毒RNA提取试剂试剂盒。

* + 1. PCR和qRT-PCR扩增试剂

应按照不同的PCR和实时荧光PCR平台的说明书选取推荐的PCR和qRT-PCR扩增试剂。

* + 1. 其他试剂

宜选取商品化的反转录试剂盒、胶回收试剂盒、T4连接酶试剂盒、质粒提取试剂盒和电泳缓冲液。

* 1. 主要仪器设备

生物安全柜、普通PCR仪、荧光PCR仪、高速台式冷冻离心机、电热恒温水槽、混匀器、组织匀浆机、凝胶成像系统、微量移液器。

* 1. 操作步骤
     1. 操作环境

有相应的生物安全设施和不同功能分区，如样品处理区、核酸提取区、样品配液区、PCR 扩增区、结果观察区等，各功能区须有专用试剂和实验耗材，不可交叉混用。操作时，应在生物安全 Ⅱ 级及以上防护实验室内、无 RNA酶的环境下进行。

* + 1. 待检样品处理

无菌采取发病猪淋巴结、水疱皮、痂皮等约1g样品，置于 2.0 mLEP 管中，加入灭菌的1 mol/LPBS（pH 7.2）1mL，用组织匀浆机或研钵充分研磨后，反复冻融 3 次；以 10 000 ×g 离心5min，收集上清，用于RNA抽提，或置-20 ℃保存备用。

* + 1. 待检样品RNA/DNA提取

取200µL待检样品于无RNA/DNA酶的1.5mL离心管中，按照RNA/DNA提取试剂盒操作说明书抽提RNA/DNA。

* + 1. 反转录(RT)

提取样品总RNA后，以样品总RNA为模板，按下列反应体系进行反转录：

5×RT缓冲液 4µL

AMV反转录酶（5U/µL） 0.5µL

dNTP混合物（各10mM/L） 1µL

RNA酶抑制剂（40U/µL） 0.5µL

随机引物6聚体（50pmol/µL） 1.5µL

待检总RNA模板 5µL

灭菌双蒸水 补足总体积至50µL

加完试剂后瞬时离心混匀。将PCR反应管置于普通RT-PCR仪内进行反转录。反应程序为：30℃，10 min；48℃，45min；95℃，5min。获得的cDNA直接用于多重PCR扩增，或置-20℃保存备用。

* + 1. 多重PCR扩增
       1. 反应体系的配置

反转录后，以获得的cDNA为模板,建立25µLPCR反应体系。在冰浴条件下，在PCR反应管中按下列用量分别加入各成分：

2×TaqPCR MasterMix 12.5µL

SVA和O型FMDV上游、下游引物（10 pmol/µL） 各0.75µL

亚洲I型和A型FMDV上游、下游引物（10 pmol/µL） 各0.6µL

cDNA模板 2.5µL

灭菌双蒸水 补足总体积至25µL

* + - 1. 多重PCR反应

加完试剂后瞬时离心混匀。将PCR反应管置于PCR仪内，设置如下反应参数：

94℃3min；然后94℃30s，58℃30s,72℃30s,循环40次；最后72℃10min。PCR产物直接用于电泳，或置4℃保存备用。

* + 1. 多重qRT-PCR
       1. 反应体系的配置

采用20µL反应体系，扩增体系配制如下：

Premix Ex TaqTM (ProbeqPCR) 10µL

SVA、A型及亚洲I型FMDV上、下游引物（20 pmol/µL） 各0.5µL

SVA、A 型及亚洲I型FMDV探针（20 pmol/µL） 各0.4µL

O型FMDV特异性上、下游引物及探针（20 pmol/µL） 各0.3µL

样品RNA 2µL

灭菌双蒸水 补足总体积至20µL

* + - 1. 多重qRT-PCR反应

在荧光PCR仪上选用CY5、FAM和JOE通道，设置如下反应参数：

42℃反转录15min，95℃预变性30s；然后40个循环（95℃5s；58℃34s），在每次循环的退火延伸时分别收集CY5、FAM和JOE通道的荧光信号。

* + 1. 阴性及阳性对照
       1. 阴性对照

用灭菌双蒸水作为阴性对照，与待检样品同时提取，再反转录和PCR扩增。

* + - 1. 阳性对照

已知病毒SVA分离株，FMDV O型疫苗株（O/Mya98/XJ/2010）、亚洲I型疫苗株（JSL株），A型疫苗株（AF/72株）作为阳性对照，与待检样品同时提取，再反转录和PCR扩增。

* 1. 结果判定
     1. 多重RT-PCR结果判定
        1. 琼脂糖凝胶制备

称取1.5g琼脂糖加入到100mL1倍电泳缓冲液，煮沸溶解琼脂糖，冷却至约50℃时，加入10 mg/mL的琼脂糖凝胶10µL，充分混合后倒入水平的已插入合适梳子的凝胶盘中，凝胶厚度控制在3 mm~5 mm之间。待凝胶充分凝固后，拔出梳子，将凝胶连同托架一起放入电泳槽中，加入1倍电泳缓冲液，使之没过凝胶表面2mm，以备加样电泳。

* + - 1. 加样

将5µLPCR产物与1µL加样缓冲液混合均匀，加入一个琼脂糖凝胶样品孔中。每次电泳应加阳性和阴性对照的扩增产物，并且设立DNA分子质量标准作为分子质量大小的对照。

* + - 1. 电泳条件

以100V稳压进行电泳，直至溴酚蓝指示剂到达离琼脂糖凝胶末端2cm 3cm时停止。

* + - 1. 电泳结果判定
         1. 将电泳后的琼脂糖凝胶用凝胶成像系统观察并拍照。当阴性对照无任何DNA扩增带，而阳性对照在460bp、320bp、240bp和157bp位置出现DNA扩增带，则实验结果成立；否则，此次检测无效。
         2. 若被检样品在460bp位置出现DNA扩增带，判定为Asia I型FMDV阳性，标记为I-FMDV（+）；若被检样品在460bp位置未出现DNA扩增带，判定为Asia I型FMDV阴性，标记为I-FMDV（-）。
         3. 被检样品在320bp位置出现DNA扩增带，判定为A型FMDV阳性，标记为A-FMDV（+）；若被检样品在320bp位置未出现DNA扩增带，判定为A型FMDV阴性，标记为A-FMDV（-）。
         4. 被检样品在240bp位置出现DNA扩增带，判定为O型FMDV阳性，标记为O-FMDV（+）；若被检样品在329bp位置未出现DNA扩增带，判定为O型FMDV阴性，标记为O-FMDV（-）。
         5. 被检样品在157bp位置出现DNA扩增带，判定为SVA阳性，标记为SVA（+）；若被检样品在157bp位置未出现DNA扩增带，判定为SVA阴性，标记为SVA（-）。

1. 多重RT-PCR产物凝胶电泳结果图见附录A中的图A.1。
   * 1. 多重qRT-PCR结果判定
        1. 结果分析条件设定

阈值设定根据仪器噪声情况进行调整，以阈值线刚好超过正常阴性对照样品扩增曲线的最高点为准。

* + - 1. 质控标准
         1. 阴性对照样品Ct值≥37。
         2. 阳性对照样品的Ct值均应<28，并出现典型的S型扩增曲线。反之，此次检测无效。
      2. 结果描述及判定
         1. 被检样品在CY5通道出现扩增曲线，判定为SVA阳性，标记为SVA（+）；若被检样品在CY5通道未出现扩增曲线，判定为SVA阴性，标记为SVA（-）。
         2. 被检样品在FAM通道出现扩增曲线，判定为O型FMDV阳性，标记为O-FMDV（+）；若被检样品在FAM通道未出现扩增曲线，判定为O型FMDV阴性，标记为O-FMDV（-）。
         3. 被检样品在TXR通道出现扩增曲线，判定为A型FMDV阳性，标记为A-FMDV（+）；若被检样品在TXR通道未出现扩增曲线，判定为A型FMDV阴性，标记为A-FMDV（-）。
         4. 被检样品在JOE通道出现扩增曲线，判定为Asia I型FMDV阳性，标记为I-FMDV（+）；若被检样品在JOE通道未出现扩增曲线，判定为Asia I型FMDV阴性，标记为I-FMDV（-）。

1. 多重TaqMan荧光定量RT-PCR产物扩增曲线图见附录A中的图A.2。
3. （规范性）  
   引物探针序列及结果判定
   1. 多重RT-PCR特异性引物序列及扩增片段长度

见表A.1。

* 1. 引物序列及扩增片段长度

| 引物名称 | 引物序列（5′→3′） | 扩增片段长度bp |
| --- | --- | --- |
| SVA-F | CTACTTCAAACCAGGAACACT | 157 |
| SVA-R | ACAAGGCCCTCCATCT |
| FMDV-O-F | GTCCAGAGACGCCAACACACG | 240 |
| FMDV-O-R | GGTGTTGTCCAACGCTGTCTCG |
| FMDV-A-F | AGCCCCACGCACGTCATTGAC | 320 |
| FMDV-A-R | ACCCGCGCCGCGAGAGACC |
| FMDV-AsiaI-F | AGCCCAAGAGCACCCAAACCC | 460 |
| FMDV-AsiaI-R | ACGGCGGTCTTGTGTGGTGTC |

* 1. 多重qRT-PCR特异性引物及探针序列

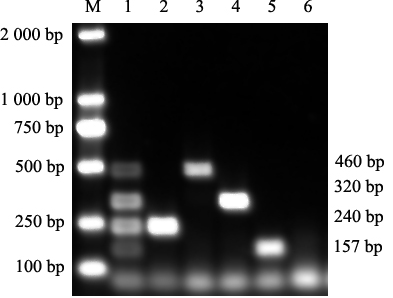
见表A.2。

* 1. 引物序列、探针序列及扩增片段长度

| 引物和探针 | 序列(5'→3') | 扩增片段长度bp |
| --- | --- | --- |
| SVA-Fq | TTAAAGAATTTGGAAGCCATGCT | 70 |
| SVA-Rq | AACAGATTGCAGCTTCTCGAGTAG |
| SVA-P | CY5-CCTACTTCAAACCAGGAAC-BHQ3 |
| FMDV-O-Fq | AACAGCTGAGGAYTTYGTGAGC | 111 |
| FMDV-O-Rq | GAATGAGTCGYTGGTGMC |
| FMDV-O-P | FAM-AACGGTTCTTCAAAACCCACCTGTT-BHQ1 |
| FMDV-A-Fq | CATGAAGCGTGCTGAGCTCTA | 64 |
| FMDV-A-Rq | GTCTTGCGCTGTCACTTCCA |
| FMDV-A-P | TXR-TGCCCCAGGCCACTACTGGCA -BHQ2 |
| FMDV-Asia I-Fq | CCTTCAACTACGGCGCAGTT | 71 |
| FMDV-Asia I-Rq | TGTCTCCGCGCGTTTCAT |
| FMDV-Asia I-P | JOE- CGAAAACATCACTGAGCTGCTGATCCG-BHQ1 |

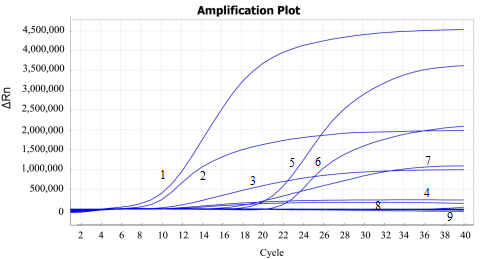
* 1. SVA和O型、A型、亚洲I型FMDV多重RT-PCR产物凝胶电泳

见图 A.1。



1. M.DNA 分子质量标准（DL2000 Marker）；1.阳性对照；2.O-FMDV（+）；3.I-FMDV（+）；4.A-FMDV（+）；
2. 5.SVA（+）；6.阴性对照
   1. SVA和O型、A型、亚洲I型FMDV多重RT-PCR扩增结果电泳图
   2. SVA和O型、A型、亚洲I型FMDV多重qRT-PCR扩增曲线

见图A.2。



1. 1.qpO-VP1质粒；2.qpSVA-3D质粒； 3.qpA-VP1质粒； 4.qpAsia I-VP1质粒；5.O型FMDV（+）；6.SVA（+）；

7.A型FMDV（+）；8.亚洲I型FMDV（+）；9.阴性对照

* 1. 多重qRT-PCR扩增曲线图

1. （规范性）  
   重组质粒标准品制备
   1. 特异性引物

特异性引物序列及扩增片段长度见附录A中的表A.1、A.2。

* 1. 多重RT-PCR重组质粒标准品的制备

以人工合成的含有SVA目的片段，以及O型、亚洲I型、A型FMDV疫苗株的cDNA为模板，应用特异性引物进行PCR扩增，获得SVA3D基因157bp、O型FMDV VP1基因240bp、A型FMDV VP1基因320bp和亚洲I型FMDV VP1基因460bp的目的片段。经回收PCR产物，连接pMD18-T载体，转化DH5α感受态细胞，阳性克隆增菌培养后提取质粒。经PCR、酶切及测序鉴定正确后，获得的重组质粒分别命名为pSVA-3D、pO-VP1、pAsia I-VP1及pA-VP1，作为质粒标准品。

* 1. 多重qRT-PCR重组质粒标准品的制备

提取SVA以及O型、A型、亚洲I型FMDV病毒液的总RNA，反转录成cDNA后作为模板，应用特异性引物进行PCR扩增，获得SVA 3D基因（70bp）以及O型（111bp）、A型（64bp）、亚洲I型（71 bp）FMDV VP1基因的目的片段。回收PCR产物、pMD18-T载体，转化DH5α感受态细胞，阳性菌落扩大培养后抽提质粒，经PCR、酶切及测序鉴定正确后，获得的重组质粒分别命名为qpSVA-3D、qpO-VP1、qpA-VP1、qpAsia I-VP1，作为质粒标准品。

