

T/GXAS

团 体 标 准

T/GXAS 721—2024

鸡传染性支气管炎病毒荧光重组酶介导 等温扩增检测方法

Fluorescent recombinase-aided amplification method for detection of
avian infectious bronchitis virus

2024 - 05 - 24 发布

2024 - 05 - 30 实施

广西标准化协会 发 布

前 言

本文件参照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、归口并宣贯。

本文件起草单位：广西大学、广西璞缔恩葳生物技术有限公司、广西祝氏农牧有限责任公司、广西参皇养殖集团有限公司、广西鸿光农牧有限公司、南宁市良凤农牧有限责任公司、广西金陵农牧集团有限公司、广西富凤农牧集团有限公司、广西园丰牧业集团股份有限公司、广西贵港市港丰农牧有限公司。

本文件主要起草人：磨美兰、张桃妮、唐金文、张愉、陈基明、刘玲、赵文青、韦天超、黄腾、黄鉴妮、陈秋英、何晓霞、梁星雪、黄湘华、胡艳、黄玉敏、林铁昌、李和鸣、杨福剑、唐雪梅、陈莹、张宗尧、黄建烨、甘业仙、李非、李羽娜、韦宗海、覃俊江、卢静、蒋维维、黄超、苏保华、黎卓炎、苏沛州、覃小忠、蒙刚。

鸡传染性支气管炎病毒荧光重组酶介导等温扩增检测方法

1 范围

本文件描述了鸡传染性支气管炎病毒（Infectious bronchitis virus, IBV）荧光重组酶介导等温扩增检测方法。

本文件适用于IBV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 23197 鸡传染性支气管炎诊断技术

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

本文件无需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

IBV: 鸡传染性支气管炎病毒（Infectious bronchitis virus）

RAA: 重组酶介导等温扩增（Recombinase-aided amplification）

5 试剂和材料

5.1 引物和探针

引物和探针序列见附录 A.1，引物和探针的使用浓度均为 10 pmol/μL。

5.2 检测用试剂盒

RNA 抽提试剂盒、反转录试剂盒和荧光型核酸扩增试剂盒（RAA 法）宜选取商品化的试剂盒。

5.3 阴阳性对照

DNase-Free Water 作为阴性对照，按附录 A.2 中 M 基因序列合成的质粒作为阳性对照。

6 仪器设备

所需仪器设备如下：

——等温荧光检测仪；

——普通 PCR 仪；

——天平：称量范围 0 g~500 g，读数精确度 0.01 g；

——低温离心机；

——迷你涡旋震荡器；

——微量可调移液器（0.5 μL~2 μL、1 μL~10 μL、10 μL~100 μL、100 μL~1 000 μL 各 1 支）

——20 °C 冰箱。

7 检测步骤

7.1 样品采集和处理

宜采集肾脏、气管、肛拭子、咽拭子等样品进行检测，采集与处理按照 GB/T 23197 和 NY/T 541 执行。

7.2 病毒 RNA 的抽提及 cDNA 的制备

按照 RNA 抽提试剂盒要求，抽提待检样品的 RNA；并按照反转录试剂盒的要求，将 RNA 反转录获得的 cDNA 直接用于荧光 RAA 实验，或置于 -20 °C 冰箱 保存备用。

7.3 荧光 RAA 反应

将待检样品 cDNA 作为模板按照 RAA 荧光型核酸扩增试剂盒说明书配制荧光 RAA 反应体系，设阴阳性对照，配制完成后，迷你涡旋振荡仪混合均匀，并使用低温离心机离心 10 s 后，放置与试剂盒配套的等温荧光检测仪，恒温 39 °C 反应 20 min。

7.4 结果判定

检测完成后，在阴性对照样品无荧光信号且无扩增曲线，阳性标准样品存在较强的荧光信号且出现明显的扩增曲线的情况下，待检样本存在荧光值且有明显的扩增曲线时，判读为阳性，反之判读为阴性。

附 录 A

(资料性)

荧光 RAA 引物和探针、M 基因序列

A. 1 荧光 RAA 方法引物和探针

荧光RAA方法引物和探针序列见表A. 1。

表A. 1 荧光 RAA 方法引物和探针序列

引物/探针名称	序列(5' →3')	基因位置	扩增片段长度 (bp)
IBV-F	GTTCAATACTCCTAACTAATGGTCAACAAT	377~495	119
IBV-R	CTTAGCAAGCCACTGACCTTCACAATAAAG		
IBV-P	TAATGGTCAACAATGTAATTTTGC/i6FAMdT/ [THF]/iBHQ1dT/AGAGAGTGTGCCAA-C3 Spacer	394~434	41

A. 2 M 基因序列

M 基因序列如下：

ATGTCGAACGGCACGGAAAAATTGCACTCTTAGTACTCAGCAAGCGGCTGAGCTTTTCAAGGAATATAATCTATTTATAACCGCAT
TCCTATTGTTTCTAACCATACTACTTCAGTATGGATATGCAACTAGGAGTCGTGTTATTTACATACTGAAAATGATAGTGTGTGGTGC
TTTTGGCCACTTAACATTGCAGTAGGTGTAATTTTCATGTATATACCCACCAAACACAGGAGGTCTTGTCGCAGCGATAATACTTACAGT
GTTTGCGTGTCTTTCTTTTGTAGGGTATTGGATCCAGAGTATTAGACTCTTTAAGCGGTGTAGATCTTGGTGGTCATTCAACCCTGAGA
GCAATGCCGTAGGTTCAATACTCCTAATAATGGTCAACAATGTAATTTTGCTATAGAGAGTGTGCCAATGGTGCTTTCTCCAATTATT
AAGAATGGTGCTCTTTATTGTGAAGGTCAGTGGCTTGCTAAGTGTGAACCAGGCCACTTGCCTAAAGATATATTTGTTTGACACCTGA
TAGGAGAAATATCTATCGTATGGTGCAGAAATACACTGGTGACCGAAGCGGAAATAAGAAAAGGTTTGCTACATTTGTCTATGCCAAAC
AGTCAGTAGACAGTGGTGAGCTAGAAAGTGTAGCAACGGGAGCAGGTAGTCTTTACACATAA

中华人民共和国团体标准
鸡传染性支气管炎病毒荧光重组酶介导
等温扩增检测方法
T/GXAS 721—2024
广西标准化协会统一印制
版权专有 侵权必究