

T/GXAS

团 体 标 准

T/GXAS 970—2025

通用型羊肠道病毒的检测 实时荧光定量 RT-PCR 法

Universal detection of caprine /ovine enterovirus by real-time
fluorescent quantitative RT-PCR

2025 - 03 - 24 发布

2025 - 03 - 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：广西悦牧生物科技有限公司、防城港市动物疫病预防控制中心、广西壮族自治区动物疫病预防控制中心、广西农业职业技术大学。

本文件主要起草人：莫模双、谢守玉、张红云、周明旭、黄张玲、杨丽雪、汤迪沔、欧莹、罗湘尹、宋星桔、韦成威、陆春礼、苏文广、苏子庭、刘胜平、梁凤、吕思明、周媛、侯慧贤、韦芳、陈秋英、黄百花、陆海、何晓霞、王露霞、覃海、袁成进、梁星雪、胡艳、段辰星、裴幸彪、曹显永、杨纯兴、肖永祖、王德玺、樊友净、黄景灿、马麟、郑翔、孙晓琳、何凤愿、卢华闪、韦文飞、熊嘉雪、蓝鑫婷、利茵、吴万佳、蒋大平、熊毅。

通用型羊肠道病毒的检测 实时荧光定量 RT-PCR 法

1 范围

本文件界定了通用型羊肠道病毒的检测 实时荧光定量RT-PCR法涉及的术语和定义、原理、试剂和材料、仪器设备、试验步骤技术要求。

本文件适用于采用实时荧光定量RT-PCR法对羊肠道病毒核酸的检测。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

山羊/绵羊肠道病毒 caprine /ovine enterovirus, CEV/OEV

临床上引起山羊或绵羊呼吸道、消化道疾病以及神经系统紊乱的微核糖核酸病毒科肠道病毒属成员。
注：肠道病毒属分为12个肠道病毒种（A~L），其中绵羊多为G5和G7亚型，山羊多为G20亚型。

3.2

荧光报告基团 reporter

在一定的激发条件下，用于监测生物体系中的分子活性、物质变化等的一种特殊的化学物质。

3.3

荧光淬灭基团 black hole quencher, BHQ

通过吸收荧光基团的光能，将其转化为热能或其他形式的能量，从而使荧光基团无法发光的一种能够抑制荧光发射的化合物。

3.4

实时荧光定量 RT-PCR real-time fluorescent quantitative RT-PCR, qRT-PCR

通过检测PCR反应过程中释放的荧光信号来定量检测目标核酸含量的一种分子生物学技术。

3.5

6-羧基荧光素 6-carboxyfluorescein, FAM

一种主要用于核酸检测和标记的羧基荧光素同分异构体。

3.6

Ct 值 cycle threshold, Ct

检测到靶序列的荧光信号达到设定的阈值所经历的PCR循环数。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

EDTA: 乙二胺四乙酸 (Ethylene diamine tetraacetic acid)。

LB: Luria-Bertani。

PCR: 聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction)。

PBS: 磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffered solution)。

5 原理

根据CEV/OEV基因组序列共同保守片段，设计合成一对特异性引物和一条特异性的荧光双标记探针。探针5'端标记一个荧光报告基团，3'端标记一个荧光淬灭基团。当PCR扩增时，探针被酶切降解，使荧光

报告基团和荧光淬灭基团分离，荧光报告基团发出可被仪器接收的荧光信号，通过标准曲线对未知模板进行定量分析。

6 试剂和材料

除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

6.1 病毒核酸提取试剂和 qRT-PCR 扩增试剂

宜选用商品化的病毒核酸提取试剂盒和qRT-PCR扩增试剂。

6.2 引物和探针

针对CEV/OEV基因组序列的保守片段，设计合成一对特异性引物和一条特异性的荧光双标记探针。预期扩增产物大小为101 bp。引物和探针序列见表1。

表1 引物和探针序列

引物名称	序列（5' -3' ）
上游引物	CCGTGAATGCTGCTAATC
下游引物	GTACCGAAAGTAGTCTGTTC
荧光探针	FAM-CGCACAATCCAGTGTGCTACG-BHQ1

6.3 PBS

宜选用商品化的0.01 mol/L pH 7.2 PBS。

6.4 TA 克隆用连接试剂

宜选用商品化的TA克隆用连接试剂盒。

6.5 LB 培养基

制备按附录A。

6.6 质粒提取试剂盒

宜选用商品化的质粒提取试剂盒。

7 仪器设备

7.1 生物安全柜。

7.2 荧光 PCR 仪。

7.3 组织研磨仪。

7.4 核酸提取仪。

7.5 台式低温高速离心机：离心力 12 000 g 及以上。

7.6 微量移液器：2.5 μL、10 μL、100 μL、200 μL 和 1 000 μL 等不同量程规格。

7.7 冰箱：2℃~8℃和-20℃及以下。

8 样品

8.1 样品采集

8.1.1 拭子/粪便样品

无菌采集羊直肠拭子或新鲜羊粪便，将其浸入内含约1 mL样品保存液（配制见附录A）的离心管中，剪去露出管外的拭子，盖紧离心管盖并标记好编号，密封后冷藏，并于24 h内送至实验室立即检测或置-20℃及以下保存3 d~5 d内完成检测。

8.1.2 组织样品

无菌采集羊肠道组织或新鲜肠道内容物置于无菌容器，标记好编号，密封后冷藏，并于24 h内送至实验室立即检测或置-20 ℃及以下保存3 d~5 d内完成检测。

8.1.3 全血样品

使用真空管（含EDTA抗凝剂）采集羊全血5 mL，标记好编号，密封后冷藏，并于24 h内送至实验室立即检测或置-20 ℃及以下保存3 d~5 d内完成检测。

8.2 样品处理

8.2.1 拭子/粪便样品

羊直肠拭子或粪便样品高速振荡5 min，12 000 r/min离心5 min取上清，立即进行CEV/OEV核酸提取及检测或-20 ℃及以下储存3 d内完成检测。

8.2.2 组织样品

取适量采集的羊肠道组织或新鲜肠道内容物，加入灭菌的0.01 mol/L PBS（pH 7.2）经组织研磨仪处理制成10%组织匀浆液。12 000 r/min离心5 min取上清，立即进行CEV/OEV核酸提取及检测或-20 ℃及以下储存3 d内完成检测。

8.2.3 全血样品

抗凝全血反复冻融3次后，12 000 r/min离心5 min取上清，立即进行CEV/OEV核酸提取及检测或-20 ℃及以下储存3 d内完成检测用。

9 试验步骤

9.1 核酸提取

采用病毒核酸提取试剂盒或核酸提取仪提取样本中的CEV/OEV核酸。未能在2 h内完成检测的，应置于-20 ℃及以下保存3 d内完成检测。

9.2 核酸扩增

9.2.1 qRT-PCR 扩增体系

建立20 μL反应体系，扩增体系见表2。

表2 qRT-PCR 扩增体系

试剂	体积
qRT-PCR一步法扩增酶预混液（6.1）	10 μL
上游引物、下游引物（20 pmol/μL）（6.2）	各0.5 μL
荧光探针（20 pmol/μL）（6.2）	0.4 μL
核酸模板（9.1）	2 μL
灭菌双蒸水	补足至20 μL

9.2.2 qRT-PCR 扩增条件

在荧光PCR仪上选用FAM通道，设置反应参数：50 ℃反转录30 min，95 ℃预变性3 min，40个循环（95 ℃变性15 s，60 ℃退火延伸30 s），在每一个循环的60 ℃时收集FAM通道的荧光信号。

9.3 阴性及阳性对照

9.3.1 阴性对照

采用灭菌双蒸水作为阴性对照。

9.3.2 阳性对照

采用包含CEV/OEV上游引物、下游引物序列的重组质粒标准品p-CEV作为阳性对照。重组质粒标准品p-CEV制备方法与序列详见附录B。

10 结果判定

10.1 质量控制

阳性对照的Ct值 ≤ 30 且出现特异性扩增曲线；阴性对照无Ct值或阴性对照Ct值 > 35 ，表明试验成立。

10.2 结果判断

待检样品Ct值 ≤ 30 且出现典型的S型扩增曲线，则判为CEV/OEV核酸阳性；待检样品无Ct值或Ct值 > 30 ，则判为CEV/OEV核酸阴性。

附录 A
(规范性)
试剂配制

A.1 LB 液体培养基

胰蛋白胨10 g，酵母提取物5 g，氯化钠10 g，加双蒸水至1 000 mL，用1 mol/L氢氧化钠溶液调节pH至7.0，121 °C高压灭菌20 min，冷却至室温后4 °C储存。

A.2 LB 固体培养基

胰蛋白胨10 g，酵母提取物5 g，氯化钠10 g，加双蒸水至1 000 mL，用1 mol/L的氢氧化钠溶液调节pH值至7.0，然后加入15 g琼脂粉，121 °C高压灭菌20 min，待冷却至50 °C~60 °C，加入氨苄青霉素摇晃混匀后，倒制平板，每个平板倒入3 mL~5 mL培养基，待完全冷却后盖上盖子，用封口胶封口，4 °C储存。

A.3 样品保存液

配制1 000 mL样品保存液：0.01 mol/L PBS(pH7.2) 800 mL，甘油200 mL，头孢西丁钠3 g。-20 °C储存。

GXAS
广西标准化协会

附 录 B

(资料性)

重组质粒标准品制备方法及序列

采用人工合成的方法合成一段包含引物和探针(6.2)核苷酸的靶序列,将靶序列连接至TA克隆用载体形成连接产物,将连接产物转化至大肠杆菌感受态细胞,感受态细胞置37℃振荡复苏1 h后,转移至氨苄抗性的LB固体培养基静置培养24 h,挑取单个重组子菌落至3 mL~5 mL LB液体培养基振荡培养24 h,取1 μL菌液经引物(6.2)PCR鉴定正确,采用质粒抽提试剂盒提取质粒,测算浓度,即完成构建重组质粒标准品p-CEV,作为阳性对照。人工合成靶序列为:

TTTCCTCCGGGGCCGTGAATGCTGCTAATCCCAACCTCCGAGCGTGTGCGCACAATCCAGTGTTGCTACGTCGTAACGCGTAAGT
TGGAGGCGGAACAGACTACTTTTCGGTACCCCGTGTTTCCT

参 考 文 献

- [1] GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- [2] GB 19489 实验室 生物安全通用要求
- [3] NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范



中华人民共和国团体标准
通用型羊肠道病毒的检测
实时荧光定量RT-PCR法
T/GXAS 970—2025
广西标准化协会统一印制
版权专有 侵权必究