

DB3212

泰州市地方标准

DB3212/T 2050—2022

鸭甲型肝炎病毒 1 型与 3 型荧光定量 PCR 鉴别诊断技术规范

2022-05-10发布

2022-05-10实施

泰州市市场监督管理局 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。

本文件由江苏农牧科技职业学院提出。

本文件由泰州市农业农村局归口。

本文件起草单位：江苏农牧科技职业学院、国家水禽基因库（江苏）。

本文件主要起草人：吴双、吴植、朱善元、王健、孙国波、林梦舟、纪荣超、谢军、吕海玲。

鸭甲型肝炎病毒 1 型与 3 型荧光定量 PCR 鉴别诊断技术规范

1 范围

本文件定了鸭甲型肝炎病毒 1 型与 3 型核酸检测的反转录-荧光定量 PCR 鉴别诊断的操作技术规范。本文件适用于泰州市所属区域鸭甲型肝炎病毒 1 型与 3 型的检测、疫情监测和流行病学调查。

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。

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 仪器设备与试剂

4.1 仪器设备

4.1.1 组织匀浆仪。

4.1.2 高速台式冷冻离心机（12000 g 以上）。

4.1.3 可调微量移液器（200 μL ~1000 μL 、20 μL ~200 μL 、2 μL ~20 μL 、0.2 μL ~2 μL ）。

4.1.4 实时荧光定量 PCR 扩增仪（QuantStudio 3 Real-time PCR System）。

4.1.5 水浴锅（室温~100 $^{\circ}\text{C}$ ）。

4.1.6 冰箱（4 $^{\circ}\text{C}$ ，控温精度 1 $^{\circ}\text{C}$ ）。

4.1.7 冰箱（-20 $^{\circ}\text{C}$ ，控温精度 1 $^{\circ}\text{C}$ ）。

4.1.8 超净工作台。

4.2 试剂

4.2.1 RNA 提取试剂 Trizol（分析纯）。

4.2.2 氯仿（分析纯）。

4.2.3 异丙醇（分析纯）。

4.2.4 焦碳酸二乙酯（DEPC）处理水（超纯水）：配制方法见附录 A.1。

4.2.5 70%乙醇（分析纯）：配制方法见附录 A.2。

5 样品采集与处理

采集发病、濒死或病死雏鸭的肝脏、脾脏、胰腺等新鲜组织样品。与磷酸盐缓冲液（PBS，配制方法见附录 A.3）按照体积比 1:10 的比例制成组织匀浆液；反复冻融 3 次，8000 r/min ~10000 r/min 离心 10 min，取上清用于 RNA 抽提，或置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。若需在 6 h 以后处理的样品，应先置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存备用，需托运时应确保冷藏或冰冻状态运输。

6 引物设计

6.1 DHAV-1 标准品引物

上游引物 F：5'-AACACCTGTTTGGGAGGCAATG-3'，下游引物 R：5'-GGGCAGGGAGTGGAAAGAAGAGGATTGTGCTACCATTGCTGGT-3'，用于扩增目的条带 429 bp 大小的基因片段。DHAV-1 实时荧光定量 PCR 引物 F：5'-CAGGCCAACTCGACCAAT-3'，R：5'-GGCTTTTGGAGACCCATA-3'，探针为 5'-FAM-CACATCAGAGGCAACTTTTGGCAGACT-BHQ1-3'。

6.2 DHAV-3 标准品引物

上游引物 F：5'-GCACACTCTTATACAATGGACAATC-3'，下游引物 R：5'-GTGTTGTGTAGTTGGTGCAGGTAG-3'，用于扩增目的条带 274 bp 大小的基因片段。DHAV-3 实时荧光定量 PCR 引物 F：5'-CCCATTTTATTCTGTTACACCTTACG-3'，R：5'-TGCCAAATATACAACCTGCTAAAAGTC-3'，探针为 5'-VIC-CCCACACGACCCATGCCAGCAT-BHQ1-3'。上、下游引物和探针的使用浓度均为 10 pmol/ μ L。参考序列见附录 B。

7 病毒 RNA 提取

7.1 病毒 RNA 提取可以使用市售商品化 RNA 提取试剂盒或实验室操作方法。使用市售商品化 RNA 提取试剂盒为宜，按照使用说明提取 RNA。

7.2 实验室操作方法

7.2.1 取 250 μ L 组织匀浆上清液加入 1.5 mL DEPC 处理的灭菌指形管（配置方法见附录 A.4）中，加入 480 μ L RNA 提取试剂 Trizol，混匀后室温静置 5 min ~10 min；

7.2.2 加入 200 μ L 氯仿，剧烈振荡混匀，室温放置 2 min~3 min；

7.2.3 4 $^{\circ}$ C、12000 r/min 离心 10 min，取上清 400 μ L，加入 0.4 mL 的异丙醇，反复多次颠倒混匀，-20 $^{\circ}$ C 5min；

7.2.4 4 $^{\circ}$ C、12000 r/min 离心 10 min，弃上清（动作迅速），加 70%乙醇（DEPC 水配置）600 μ L；

7.2.5 4 $^{\circ}$ C、12000 r/min 离心 5 min，倾去液体，瞬离，用微量移液器尽量吸净液体，置超净工作台内放置 10 min ~15 min。

7.2.6 沉淀干燥后加入 20 μ L DEPC 处理水，轻轻混匀溶解离心管壁上核酸 RNA，提取的病毒全基因 RNA 应在 2h 内进行反转录扩增或保存于-20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

8 病毒 RNA 反转录

8.1 病毒 RNA 反转录可以使用市售商品化 RNA 提取试剂盒或实验室操作方法。使用市售商品化反转录试剂盒为宜，按照使用说明反转录。

8.2 实验室操作方法

反应体系为 25 μ L。反应液配置为：依次加入 14 μ L DEPC 处理水溶解的 RNA，5 μ L 5 \times RT-buffer，1.5 μ L 6 nt 随机引物，2.5 μ L Taq 聚合酶缓冲液，1 μ L dNTP（10 mmol//L each），0.5 μ L RNA 酶抑制剂（20 U/ μ L），0.5 μ L AMV 反转录酶（5 U/ μ L）。反应条件为：42 $^{\circ}$ C 60 min，70 $^{\circ}$ C 15 min。

9 双重实时荧光定量 PCR 反应

9.1 反应体系与反应条件

双重实时荧光定量 PCR 反应：12.5 μ L 2 \times Premix Ex Taq（Probe qPCR），0.5 μ L 50 \times ROX Reference Dye，DHAV-1 与 DHAV-3 上下游引物（10 μ mol/L）各 0.625 μ L，探针分别为 0.75 μ L 与 0.5 μ L，1.0 μ L DNA 模板，灭菌超纯水 7.25 μ L。反应条件：95 $^{\circ}$ C 30 s，95 $^{\circ}$ C 5 s，60 $^{\circ}$ C 31 s；40 个循环。

9.2 试验对照

每次检测设立阳性对照和阴性对照。阳性对照为接种了 DHAV-I 和 DHAV-3 72 h ~ 96 h 的 SPF 鸭胚（或鸡胚）尿囊液；阴性对照为未感染的健康 SPF 鸭胚（或鸡胚）尿囊液；以不加模板的反应体系作为空白对照。

9.3 结果判断

当阳性对照样品 DHAV-I 和 DHAV-3 均出现典型的 S 型扩增曲线，空白对照样品和阴性对照样品均无扩增曲线出现，本次实验结果有效（参考附录 C.1）。若 CT 值小于 36，且具有典型 S 型扩增曲线则判定为检测阳性；若 CT 值大于 36，或无典型 S 型扩增曲线则判定为检测阴性。此外，临床样品检测灵敏度参考附录 C.2，反应的组间和组内重复性数据参考附录 C.3。

附录 A
(规范性)
相关试剂的配制

A.1 焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理水

于超纯水按 0.1% 加入 DEPC, 室温静置过夜, 121 °C 高压灭菌 20 min, 冷却备用。

A.2 70% 乙醇

取无水乙醇 70 mL 加入灭菌超纯水 25 mL, 定容至 100 mL, -20 °C 保存备用。

A.3 0.01M 磷酸盐缓冲液 (PBS)

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2.9 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g

将上述试剂溶于 800 mL 灭菌双蒸水中, 定容至 1000 mL, 121 °C 高压灭菌 30 min, 4 °C 保存备用。

A.4 DEPC 处理指形管及微量移液器枪头

将待处理的指形管及微量移液器枪头放入烧杯中, 加适量的含 0.1% DEPC 的超纯水, 37 °C 振摇 24 h ~ 48 h, 121 °C 高压 30 min, 高压完毕后立即倒掉 DEPC 水, 121 °C 再次高压灭菌 15 min 后, 置超净工作台敞口干燥待用。

附 录 B
(资料性)
参考基因序列

B.1 DHAV-1 荧光定量PCR扩增序列

CAGGCCAACTCGACCAATTCTGGCACATCAGAGGCAACTTTTGGCAGACTGTTTATGTGGACTCAATCAGGAAGTCTTTCAGTT
TTTATGGGTCTCAAAAAGCC

B.2 DHAV-1 标准品序列

AACACCTGTTTGGGAGGCAATGGTTAGTTATGACTGTGCAACACGCTTCAACTGTGCAAGAGTTGGACCTCCAAGTCCAGACAG
AGGACATGCCCTCTCATTTCGGTTCTTTGCCTATTTTCTGGAGAGATCATTCTTACCATTGTTAACAATGGCACTACACCAGCAATGG
TAGCACACTCCTATTCTATGGATGACCTCAGTTCAGAGTATGCTGTTACAGCAATGGGAGGTGTGATGATTCCTGCTAACAGTGCCAAA
AATATTTCTGTACCATTCTACTCTGTAACACCACTCAGGCCAACTCGACCAATTCCTGGCACATCAGGGGCAACTTTTGGCAGACTGTT
CATGTGGACTCAATCAGGAAGTCTTTCAGTTTTTATGGGTCTCAAAAAGCCAGCTCTCTTCTTCCACTCCCTGCC

B.3 DHAV-3 荧光定量PCR扩增序列

CCCATTTTATTCTGTTACACCTTTACGCCCCACACGACCCATGCCAGCATCTCAGGGGGGTGGCTTGACTTTTAGCAGGTTGTAT
ATTTGGACA

B.4 DHAV-3 标准品序列

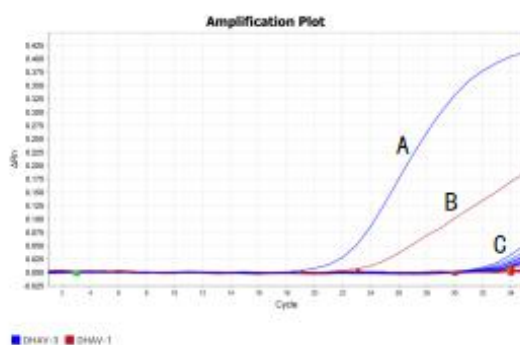
GCACACTCTTATAACAATGGACAATCTCACTTCTGAATATGCTGTCACTGCCATGGGGGTATTCTTATCCCAGCAAACCTTGCCA
AGAATATTAATATCCCATTTTATTCTGTTACACCTTTACGCCCCACACGACCCATGCCAGCATCTCAGGGGGGTGGCTTGACTTTTAGC
AGGTTGTATATTTGGACACAATCAGGAAGTGTCTGTTTTTATGGGCCTCCATAAGCCAGCTTTGTTTTCCCACTACCTGCACCAAC
CTACACAAC

附录 C (资料性)

双重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法参考结果

C.1 该检测方法结果成立条件

应用本研究建立的双重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法对 DHAV-1、DHAV-3，无菌超纯水（阴性对照），空白对照，AIV、GPV、DRV、NDRV、MDRV、NDV、DTMUV、DEV、MDPV、DuCV 等 10 种主要鸭病毒性疫病的 DNA 或 cDNA 进行荧光定量 PCR 检测，结果显示，DHAV-1 和 DHAV-3 应出现 S 型扩增曲线，其它 10 种鸭常见病毒核酸、阴性对照和空白对照均为阴性扩增，表明该检测方法结果成立。



A: DHAV-3; B: DHAV-1; C: 10 种常见鸭病毒性疫病的核酸对照、阴性对照及空白对照

图 C.1 双重荧光定量 PCR 特异性试验

C.2 临床组织样品检测灵敏度

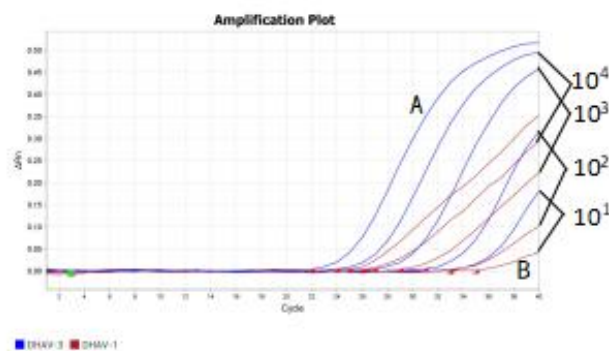


图 C.2 DHAV-1 与 DHAV-3 双重荧光定量 PCR 灵敏度（组织病料）

C.3 双重实时荧光定量PCR重复性试验

表 C.1 双重实时荧光定量 PCR 重复性试验

病毒名称	拷贝数	组内变异系数		组间变异系数	
		X ± SD	CV	X ± SD	CV
DHAV-1	1E4	30.851 ± 0.069	0.22%	30.885 ± 0.115	0.37%
	1E5	27.078 ± 0.042	0.16%	26.977 ± 0.035	0.13%
	1E6	23.876 ± 0.181	0.76%	24.121 ± 0.146	0.61%

表 C.1 双重实时荧光定量 PCR 重复性试验 (续)

病毒名称	拷贝数	组内变异系数		组间变异系数	
		$\bar{X} \pm SD$	CV	$\bar{X} \pm SD$	CV
DHAV-3	1E4	29.396 \pm 0.137	0.47%	29.558 \pm 0.144	0.49%
	1E5	25.712 \pm 0.043	0.17%	25.760 \pm 0.071	0.28%
	1E6	22.592 \pm 0.154	0.68%	22.772 \pm 0.060	0.26%