

DB4415

汕 尾 市 地 方 标 准

DB4415/T XX—202X

鸭病毒分子检测技术规程

Technical specifications for molecular detection of duck virus

202x-xx-xx 发布

202x-xx-xx 实施

汕尾市市场监督管理局 发布

目 次

目 次 II

前 言 III

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 检测病毒种类 2

5 仪器与设备 2

6 试剂和材料 2

7 操作步骤 3

8 结果判定 5

9 记录和归档 5

10 生物安全管理和废弃物处理 5

附 录 A 6

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》的规定编写。

本文件由汕尾市市场监督管理局提出并归口。

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。

本文件起草单位： 。

本文件主要起草人： 。

鸭病毒分子检测技术规程

1 范围

本文件规定了鸭感染病毒核酸检测技术的术语与定义、检测病毒种类、仪器与设备、试剂和材料、操作步骤、结果判定、记录和归档、生物安全管理和废弃物处理。

本文件适用于汕尾地区感染鸭的病毒核酸检测。

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

NY/T 1948 兽医实验室生物安全要求通则

SN/T 4835 实验室生物废弃物管理要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

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

可以看作是生物体外的特殊DNA复制过程，其主要特点是能将微量的DNA大幅增加。PCR的基本过程包括高温下DNA的双链结构解开（变性），低温下引物与DNA单链按照碱基互补配对的原则结合，以及在适中的温度下DNA聚合酶延伸引物，合成新的DNA链。这个过程在一个周期中进行，并多次循环以实现目的DNA的迅速扩增。

3.2

逆转录聚合酶链式反应 Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

先将RNA通过逆转录酶的作用合成与之互补的DNA链，再以该链作模板进行聚合酶链反应扩增特定RNA序列的方法。

3.3

引物 Primer

一种具有特定核苷酸序列的大分子，与反应物以氢键形式连接，这样的分子称为引物。引物通常是人工合成的两段寡核苷酸序列，一个引物与靶区域一端的一条DNA模板链互补，另一个引物与靶区域

另一端的另一条DNA模板链互补，其功能是作为核苷酸聚合作用的起始点，核酸聚合酶可由其3'端开始合成新的核酸链。

4 检测病毒种类

4.1 DNA 病毒

4.1.1 鸭细小病毒 (Duck parvovirus, DPV)

4.1.2 鸭肠炎病毒 (Duck enteritis virus, DEV)

4.1.3 鸭腺病毒 (Duck adenovirus, DAdV)

4.1.4 鸭圆环病毒 (Duck circovirus, DuCV)

4.2 RNA 病毒

4.2.1 鸭坦布苏病毒 (Duck Tembusu virus, DTMUV)

4.2.2 鸭呼肠孤病毒 (Duck reovirus, DRV)

4.2.3 禽流感病毒 (Avian influenza virus, AIV)

4.2.4 新城疫病毒 (Newcastle disease virus, NDV)

5 仪器与设备

5.1 PCR 扩增仪。

5.2 台式低温高速离心机：最大转速 14000 rpm，温控范围：-9℃~40℃。

5.3 电泳仪：电压输出范围 6 V~600 V，电流 4 mA~400 mA，功率最大 240 W。

5.4 紫外线凝胶成像系统。

5.5 组织破碎仪。

5.6 控温水浴锅。

5.7 核酸提取仪。

5.8 微波炉。

5.9 生物安全。

5.10 微量移液器，最大量程：2.5 μL，10 μL，50 μL，200 μL，1000 μL。

6 试剂和材料

6.1 核酸提取试剂盒。

6.2 焦炭酸二乙酯 (diethylpyrocarbonate, DEPC) 处理水，实验室用水符合 GB/T 6682 的要求。

- 6.3 磷酸盐缓冲液（Phosphate Buffered Saline, PBS），见附录 A.1。
- 6.4 TAE 电泳缓冲液，见附录 A.2。
- 6.5 DNA 分子量标准 Marker：100 bp~2000 bp。
- 6.6 核酸染料。
- 6.7 1.5%琼脂糖凝胶，配置方法见附录 A.3。
- 6.8 阳性对照样品：只含有单独病毒的组织提取核酸样本。
- 6.9 核阴性对照样品：未含有病毒的鸭组织提取核酸样本。
- 6.10 空白对照：灭菌 PBS。
- 6.11 引物序列及预期片段长度说明见表 1：

表1		
病毒名称	引物序列 5'-3'	预期片段长度
鸭细小病毒 DPV	F: CAAACGGGAGGGCAAATAAGA R: GTGGTCGCAGGTCCGTAGAGC	600 bp
鸭肠炎病毒 DEV	F: GGACAGCGTACCACAGATAA R: ACAAATCCCAAGCGTAG	520 bp
鸭腺病毒 DAdV	F: CACCTCAACAAGGAGCACAA R: AGTCGGAGCTAAAGGGAATG	633 bp
鸭圆环病毒 DuCV	F: CGGCGCTTGACTCCGTACTC R: CCCGCGTGGTTGTAACTTG	619 bp
鸭坦布苏病毒 DTMOV	F: CATAGGCTGGAATCTGGGAAC R: TCTGGATTCTGTCTCAGTC	300 bp
鸭呼肠孤病毒 DRV	F: GCATGAACATGCCAGTTGAG R: AAGCCATAACGATGGCAGTC	300 bp
禽流感病毒 AIV	F: TTCTAACCGAGGTCGAAAC R: AAGCGTCTACGCTGCAGTCC	229 bp
新城疫病毒 NDV	F: CTCAGTGATGTGCTCGGACC R: CCTGGGGAGAGGCATTGCTA	350 bp

7 操作步骤

7.1 操作要求

以下所有实验室操作均按照 GB 19489 和 NY/T 541 中的要求执行。

7.2 样品采集

7.2.1 咽肛拭子采集

将无菌棉拭子深入喉部或肛直肠部分转三圈，将采集到拭子液的棉签放入含有1.0 mL PBS的1.5 mL离心管中，并编号。

7.2.2 组织采集

剖检病鸭，用剪刀采集肺脏、脾脏、肾脏等组织，放入2 mL离心管，并编号。

7.2.3 样品运输

样品采集后放入塑料密封袋密封，样品的储存与运输按照NY/T 541执行。

7.3 样品处理

7.3.1 咽肛拭子

将装有拭子液的离心管在振荡器上充分混匀，4℃条件下5000 rpm离心1 min，取200 μL上清液放入无菌1.5mL离心管中备用，并编号。

7.3.2 组织

将采集的组织称取0.1 g，放入装有3颗钢珠和1 mL PBS的2 mL离心管中，将离心管放入组织破碎仪震荡打碎组织；4℃条件下6000 rpm离心5 min；取200 μL上清液放入无菌1.5mL离心管中备用，并编号。

7.3.3 核酸提取

使用商品化病毒核酸提取试剂盒，将7.3.1 和7.3.2准备好的200 μL上清液按照说明书操作提取核酸。

7.4 DNA 病毒 PCR 检测方法

7.4.1 PCR反应体系

PCR反应体系为25 μL：12.5 μL 2×Taq MasterMix，8.5 μL无菌DEPC水，2 μL 7.3.3中提取核酸，上下游引物各1 μL（10 μM）。混匀后瞬时离心。

7.4.2 PCR扩增条件

PCR扩增条件：95℃ 3 min；95℃ 15 sec，58℃ 15 sec，72℃ 40 sec，32个循环；72℃ 5 min；扩增反应结束后4℃保存，待进行判定。

7.5 RNA 病毒 RT-PCR 检测方法

7.5.1 RT-PCR反应体系

RT-PCR反应体系为25 μL：12.5 μL 2×One Step Mix (Dye Plus)，7.25 μL无RNA酶的去离子水，1.25 μL One Step Enzyme Mix，上下游引物各1 μL（10 μM），2 μL 7.3.3中提取核酸。混匀后瞬时离心。

7.5.2 RT-PCR扩增条件

RT-PCR扩增条件：50 ℃ 30 min；94 ℃ 3 min；94℃ 30 sec，60 ℃ 30 sec，72 ℃ 40 sec，32个循环；72 ℃ 7 min；扩增反应结束后4 ℃保存，待进行判定。

7.6 扩增产物电泳检测

电泳槽内加入1×TAE电泳缓冲液。取5 μL扩增产物加到1.5%琼脂糖凝胶中，加入DNA分子量标准marker（100 bp），130 V恒压下电泳20 min~30 min，在凝胶成像系统中拍照观察结果。

8 结果判定

PCR产物经电泳检测，阳性对照组在预期片段大小位置均出现特异性条带，同时阴性对照组没有出现任何条带，表明试验有效，否则试验无效。在试验成立的条件下，判定检测样品是否有与阳性对照组位置相同的条带，如果有则判定检测结果为阳性，如果无则判定检测结果为阴性。

9 记录和归档

记录包括样品来源、种类、检测时间、检测地点、检测方法、检测结果以及检测人签字等。检测样品经检测鉴定为阳性的，其样本应妥善保存于-80 ℃低温冰箱中，并做好登记以备复核。

10 生物安全管理和废弃物处理

生物安全管理和废弃物处理按照GB 19489、NY/T 1948和SN/T 4835规定执行。

附 录 A
(资料性)
相关试剂的配制

A.1 配制PBS缓冲液

试剂配方：NaCl：8.0 g；KCl：0.2 g；Na₂HPO₄·12H₂O：2.9 g；KH₂PO₄：0.2 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 20 min，4 °C 保存备用。

A.2 配制1×TAE电泳缓冲液

A.2.1 配制 0.5 mol/L EDTA 溶液 (pH 8.0)

称取 EDTA 18.61 g，加入灭菌蒸馏水 80 mL，用氢氧化钠调节 pH 至 8.0，用灭菌蒸馏水补齐至 100 mL。

A.2.2 配制 50×TAE 电泳缓冲液

称取 Tris 242 g，冰乙酸 57.1 mL，0.5 mol/L EDTA 100 mL，加灭菌双蒸水至 1000 mL。

A.2.3 配制 1×TAE 电泳缓冲液

取 50×TAE 电泳缓冲液 20 mL，加入灭菌双蒸水至 1000 mL。

A.3 配制1.5%琼脂糖凝胶

称取琼脂糖1.5 g，放入100 mL 1×TAE电泳缓冲液中，微波炉加热融化，待温度降至60 °C时，加入5 μL核酸染料，混匀后均匀铺板，厚度为5 mm~7 mm，冷凝后即可使用。