

# 团 体 标 准

T/CVMA 168—2024

## 鸡传染性支气管炎病毒 QX 型荧光 RT-PCR 检测方法

Real-time RT-PCR for detection of infectious bronchitis virus genotype  
QX

2024-7-4 发布

2024-7-4 实施

中国兽医协会 发布

中国兽医协会  
CVMA  
全国动物卫生大会

## 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专利的责任。

本文件由中国兽医协会提出并归口。

本文件起草单位：中国农业大学、北京亿森宝生物科技有限公司、成都海关技术中心、重庆市动物疫病预防控制中心、四川省动物疫病预防控制中心、北京市动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人：张国中、王新杰、林华、杨慧明、赵静、赵焯、孙晓明、高姗姗、张棕瑶、安徽、曾政、骆璐、陈忠琼、凌洪权、裴超信、陈斌、王慧强、梅力。

中国兽医协会  
CVMA  
全国动物卫生大会

# 鸡传染性支气管炎病毒 QX 型荧光 RT-PCR 检测方法

## 1 范围

本文件描述了鸡传染性支气管炎病毒QX型荧光RT-PCR检测方法。

本文件适用于鸡咽喉拭子及气管、肺脏、肾脏、输卵管等组织中鸡传染性支气管炎病毒QX型的核酸检测。

## 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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

## 3 术语和定义

本文件没有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。

bp: 碱基对 (base pair)

DEPC: 焦炭酸二乙酯 (Diethyl pyrocarbonate)

IBV: 鸡传染性支气管炎 (Infectious Bronchitis Virus)

PBS: 磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffer Solution)

PCR: 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction)

RNA: 核糖核酸 (Ribonucleic Acid)

## 5 原理

在 PCR 反应体系中，除采用特异性的引物外，同时加入与 DNA 双链非特异性结合的 SYBR Green I 荧光染料。当它与 DNA 双链结合时，发出荧光，从 DNA 双链上释放出来时，荧光信号急剧减弱。随着 PCR 反应的进行，每经过一个循环，收集一次荧光强度信号，这样就可以通过荧光强度变化监测产物量的变化，从而得到一条荧光扩增曲线。

## 6 试剂和引物

除另有规定外，所有试剂均为分析纯，实验用水应符合GB/T 6682中相关规定。PCR检测引物见附录A，阴性对照和阳性对照见附录B。

## 7 仪器用具

高速冷冻离心机、电子天平、荧光定量PCR仪、-20 °C低温冰箱和-80 °C超低温冰箱、微波炉、磁力搅拌器、恒温水浴锅、高压灭菌锅、超净工作台、可调移液器（2.5 μL，10 μL，20 μL，100 μL，200 μL，1000 μL）和各规格移液器枪头、离心管、0.2 mL PCR反应管、研钵等。

## 8 样品的采集处理及储存

### 8.1 样品采集与处理

#### 8.1.1 样品的采集

##### 8.1.1.1 咽喉拭子

将医用棉签插入鸡喉头、上腭裂，来回轻刮3~5次并慢慢旋转，使其蘸有咽喉分泌液，然后将咽喉拭子放入盛1.0 mL PBS的离心管中，编号备用。

##### 8.1.1.2 组织样品

采集待检鸡的气管、肺脏、肾脏、输卵管等5 g~10 g组织，置于15 mL无菌离心管中或自封袋中，每份样品单独保存，作好标记，编号备用。

#### 8.1.2 样品的处理

##### 8.1.2.1 咽喉拭子的处理

将装有棉拭子的离心管反复振荡，使用高速冷冻离心机3000 r/min离心15 min，取上清液待检。

##### 8.1.2.2 组织样品的处理

将组织样品按质量体积比（1:10）加入PBS保存液，用组织匀浆器或研钵研磨匀浆，3000 r/min离心15 min，取上清液待检。

### 8.2 样品的储存

#### 8.2.1 拭子样品

样品采集后，置于加冰袋的保温箱中，密封，24 h内送至实验室进行检测。如不能立即检测，需将样品注明采样点名称、样品名称、编号及样品数量置于-20 °C低温冰箱保存。

#### 8.2.2 病料组织

样品采集后，置于加冰袋的保温箱中，密封，24 h内送至实验室进行检测，如不能立即检测，需将样品注明采样点名称、样品名称、编号及样品数量置于-80 °C超低温冰箱保存。

## 9 RNA的提取

9.1 若选用 Trizol 裂解法提取病毒 RNA，参照以下步骤进行：

- a) 取灭菌的 1.5 mL 离心管，做好标识；
- b) 每管加入 600  $\mu\text{L}$  Trizol，再分别加入已处理的样品、阴性对照和阳性对照各 200  $\mu\text{L}$ ，充分混匀后室温静置 5 min；
- c) 加入 200  $\mu\text{L}$  三氯甲烷，充分颠倒混匀，4  $^{\circ}\text{C}$  12000 r/min 离心 15 min；
- d) 吸取 500  $\mu\text{L}$  上层水相于新的 1.5 mL 灭菌离心管中，加入 500  $\mu\text{L}$  -20  $^{\circ}\text{C}$  预冷的异丙醇，颠倒混匀，4  $^{\circ}\text{C}$  静置 10 min，4  $^{\circ}\text{C}$  12000 r/min 离心 15 min；
- e) 弃去全部上清液，加入 1 mL 无 RNase 水配制的 75 % 乙醇溶液，上下轻缓颠倒 2 次，4  $^{\circ}\text{C}$  12000 r/min 离心 5 min；
- f) 弃去上清液，12000 r/min 离心 2 min，吸弃底部剩余液体，室温干燥数分钟（不宜过于干燥，以免 RNA 不溶）；
- g) 每管加入 25  $\mu\text{L}$  DEPC 水，轻轻混匀，溶解管壁上的 RNA，2000 r/min 离心 5 s，获得 RNA 溶液，4 $^{\circ}\text{C}$  保存备用。若需长期保存放置 -80  $^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱。

9.2 若使用 RNA 试剂盒提取病毒 RNA，则按试剂盒说明书进行操作。也可采用其他等效的 RNA 提取方法。

## 10 反转录

使用市售的反转录试剂盒按照说明书操作，获得待检样本的 cDNA。制备的 cDNA 放置 -20  $^{\circ}\text{C}$  低温冰箱保存备用。

## 11 配制反应液

11.1 实验前 20 min 从 -20  $^{\circ}\text{C}$  低温冰箱中取出试剂盒相应试剂，使试剂完全溶解。

11.2 核算实验所需要的反应数 ( $n$ )，并按照下表计算当次实验所需要的各种试剂量。

$n$  = 阴性对照数 (1 反应) + 阳性对照数 (1 反应) + 误差预留量 + 样本数。每个反应的体系为：10  $\mu\text{L}$  2 $\times$  M5 Hiper SYBR Green Mix，10  $\mu\text{mol/L}$  上下游引物各 0.4  $\mu\text{L}$ ，ddH<sub>2</sub>O 7.2  $\mu\text{L}$ 。向设定的  $n$  个 PCR 反应管中各分装 18  $\mu\text{L}$ 。

11.3 盖紧 PCR 反应管盖后将 PCR 反应管转移至样本准备区，剩余试剂放回 -20  $^{\circ}\text{C}$  低温冰箱冷冻保存。

## 12 加样（样本准备区）

12.1 在已分装有 PCR 反应混合液的 PCR 反应管中分别加入反转录的 cDNA 2  $\mu\text{L}$ ，记录加样顺序。

12.2 盖紧 PCR 反应管盖，瞬时离心 30 s。转移至扩增区。

## 13 荧光 RT-PCR 反应

13.1 开机预热，检查仪器性能。

13.2 将 PCR 反应管放在样品槽中相应位置，记录顺序。

13.3 设置扩增参数，荧光定量 PCR 反应程序为：95°C预变性 30 s；95°C变性 5 s、60°C退火及延伸 20 s，共 40 个循环，在每次循环进入退火时收集荧光。检测结束后，根据扩增曲线和 Ct 值判定结果。荧光 RT-PCR 扩增实例见附录 C。

## 14 结果判定

### 14.1 阈值设定

直接读取检测结果。根据仪器噪声情况对阈值设定进行调整，以阈值线刚好超过阴性对照扩增曲线的最高点为准。

### 14.2 试验成立条件

14.2.1 阴性对照：无典型扩增曲线，且 Ct 值  $>32$  或无 Ct 值。

14.2.2 阳性对照：出现典型扩增曲线，且 Ct 值  $\leq 25$ 。

14.2.3 14.2.1 和 14.2.2 应在同一次实验中同时满足，否则，本次实验无效，需重新进行。

### 14.3 结果判定

14.3.1 阳性：出现典型扩增曲线，且 Ct 值  $\leq 30$ ，表明样本中存在 QX 型鸡传染性支气管炎病毒核酸。

14.3.2 可疑：出现典型扩增曲线，且 Ct 值在 30~32 的样品应复检，复检仍出现上述结果的，判为阳性，否则为阴性。

14.3.3 阴性：无典型扩增曲线，且 Ct 值  $>32$  或无 Ct 值，表明样本中无 QX 型鸡传染性支气管炎病毒核酸。

附录 A  
(资料性)  
引物序列

根据已报道的QX型鸡传染性支气管炎病毒的S1 基因序列设计 1 对用于特异性扩增的引物, 具体引物信息与基因片段大小如表A.1 所示。

表A.1 鸡传染性支气管炎引物序列及目的片段长度

引物	引物序列(5'→3')	预期片段大小/bp
正向引物	ATGACAGCACCTCTTCAG	115
反向引物	ACCCGCTACCACTACTAT	

附录 B  
(资料性)  
阳性对照和阴性对照

B.1 阳性对照

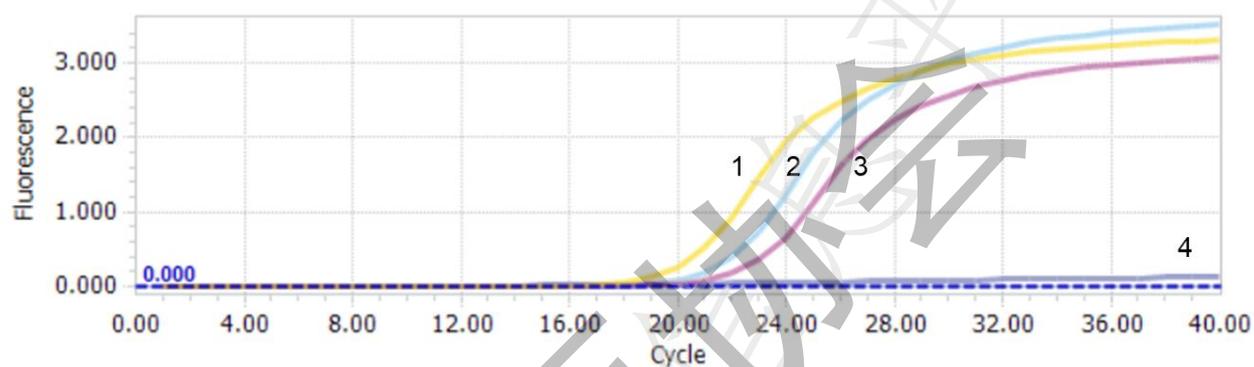
阳性对照制备方法：人工合成QX型IBV S1基因片段，将S1基因连接于pMD19-T载体制成阳性质粒pMD19-T-QX，使用无核酸酶水或TE溶液将质粒稀释至浓度为 $10^5$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ， $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

B.2 阴性对照

使用无核酸酶水。

附录 C  
(资料性)  
荧光 RT-PCR 扩增实例参照

C.1 鸡传染性支气管炎病毒 QX 型荧光 RT-PCR 扩增实例参照



注：扩增曲线1阳性对照，扩增曲线2、3为QX型鸡传染性支气管炎病毒样品，扩增曲线4为阴性对照。

图 C.1 QX 型鸡传染性支气管炎病毒荧光 RT-PCR 典型扩增曲线示意图