

### 鸭圆环病毒检测 聚合酶链式反应法

Identification of duck circle virus——PCR method

地方标准信息服务平台

2019 - 12 - 25 发布

2020 - 01 - 30 实施

---



## 前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由广西壮族自治区农业农村厅提出。

本标准由广西畜牧业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：广西壮族自治区动物疫病预防控制中心。

本标准起草人：粟艳琼、郑敏、张步娴、莫胜兰、屈素洁、胡杰、尹彦文、邹联斌、施开创、李军。

地方标准信息服务平台



# 鸭圆环病毒检测 聚合酶链式反应法

## 1 范围

本标准规定了应用聚合酶链反应法检测鸭圆环病毒 (Duck circovirus, DuCV) 的生物安全措施、防污染措施、试剂与仪器设备、操作方法及结果判定。

本标准适用于鸭圆环病毒 (Duck circovirus, DuCV) 检测。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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 19489 实验室生物安全通用要求

NY/T 541 动物疫病实验室检验采样方法

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**鸭圆环病毒** Duck circovirus, DuCV

属于圆环病毒科、圆环病毒属,无囊膜,单股环型 DNA 结构。主要是侵害宿主的免疫系统,而导致宿主免疫力低下,进而引发二重或多重感染。

### 3.2

**聚合酶链式反应** polymerase chain reaction

模拟体内DNA的天然复制过程,在体外扩增DNA分子的一种分子生物学技术,用于扩增位于两段已知序列之间的DNA区段。在待扩增的DNA片段两侧和与其两侧互补的两个寡核苷酸引物,经变性、退火和延伸若干个循环后,DNA扩增 $2^n$ 倍。

### 3.3

**特异性引物** sequence specific primer

与待检测的DuCV特异性引物扩增的DNA片段,两侧互补的一小段寡核苷酸。

## 4 生物安全措施

应在兽医生物安全二级以上实验室,由具备相应资质的工作人员检测鸭圆环病毒,所有废弃物应按照GB 19489中的有关规定执行。

## 5 防污染措施

应符合NY/T 541的规定。

## 6 试剂与仪器设备

### 6.1 试剂

#### 6.1.1 特异性引物

特异性引物引物序列参见附录A.1。上、下游引物的使用浓度均为25 pmol/μL。

#### 6.1.2 DNA 抽提试剂盒

商品化DNA抽提试剂盒主要成分参见附录B.2。

#### 6.1.3 PCR 试剂盒

商品化PCR试剂盒主要成分参见附录B.3。

#### 6.1.4 电泳试剂

电泳试剂如下：

- DL2000 DNA MARKER；
- 琼脂粉；
- 10 000×DNA 染料；
- 1×Tris-硼酸电泳缓冲液。

注：配制方法参见附录B.4。

#### 6.1.5 其他试剂

其他试剂如下：

- 1 mol/L 灭菌 PBS (pH7.2)；
- DEPC H<sub>2</sub>O。

注：配制方法按附录中的B.5、B.6。

#### 6.1.6 一次性耗材

一次性耗材如下：

- 乳胶手套；
- 离心管；
- PCR 反应管；
- 吸头。

### 6.2 仪器设备

仪器设备如下：

- PCR 仪；
- 电泳仪；
- 凝胶成像系统；

- 高速台式冷冻离心机；
- 小型高速离心机；
- 水浴锅；
- 乳钵或玻璃研磨器；
- 微量加样器；
- 冰箱。

## 7 操作方法

### 7.1 待检样品处理

无菌采取待检鸭的肝、肾、脾、肺、法氏囊等器官组织样品各约2 g，置于乳钵或玻璃研磨器中，充分研磨后，加入1 mL无菌PBS（pH 7.2）；收集组织悬液反复冻融3次后，以3 000 r/min 4℃离心5 min，收集上清，供总DNA提取用，或置-20℃保存备用。

### 7.2 待检样品总 DNA 提取

取经处理的待检样品上清200 μL置于无RNA酶的1.5 mL离心管中，按照DNA提取试剂盒操作说明书抽提总DNA。直接取总DNA作为模板进行PCR，或置-20℃保存备用。

### 7.3 PCR 检测

#### 7.3.1 PCR 扩增

反应液总量25 μL。在冰浴条件下，按下列试剂用量在PCR反应管中分别加入各成分：

- 2×Taq PCR MasterMix：12.5 μL；
- 上游引物（25 pmol/μL）：0.5 μL；
- 下游引物（25 pmol/μL）：0.5 μL；
- 待检总 DNA 模板：5.5 μL；
- DEPC H<sub>2</sub>O：6 μL。

加完试剂后瞬时离心混匀。将PCR反应管置于PCR仪内，反应程序为：94℃预变性3 min；94℃40 s，60℃30 s，72℃2 min，共35个循环；72℃延伸7 min。PCR产物直接用于电泳，或置4℃保存备用。

#### 7.3.2 阴性及阳性对照

##### 7.3.2.1 阴性对照

用5.5 μL DEPC H<sub>2</sub>O代替总DNA为模板作阴性对照模板。

##### 7.3.2.2 阳性对照

取鸭圆环病毒重组质粒（浓度：1.39×10<sup>3</sup>拷贝/μL）3 μL作为PCR 阳性对照模板。

## 7.4 电泳

### 7.4.1 1.2%琼脂糖凝胶制备

将凝胶托架水平放置在工作台上，放上梳子，使梳齿下沿距离托架底板0.5 mm~1.0 mm。配制100 mL的1.2%凝胶：称取1.2 g琼脂糖，加入100 mL 1×Tris-硼酸电泳缓冲液，煮沸溶解琼脂糖。待琼脂糖溶液冷却至约50℃时，加入10 000×DNA染料10 μL，充分混合，避免起泡。倒入凝胶托架，把凝胶厚度控

制在3 mm~5 mm之间。待凝胶充分凝固后，将凝胶连同托架一起放入电泳槽中，加入1×Tris-硼酸电泳缓冲液，使之没过凝胶表面约2 mm，轻轻拔出梳子，以备加样电泳。

#### 7.4.2 加样

将5 μL PCR产物加至琼脂糖凝胶样品孔中。同时设置DL2 000DNA MARKER标准加样孔作为对照。

#### 7.4.3 电泳条件

以80 V~100 V稳压电泳，直至溴酚蓝指示剂到达离琼脂糖凝胶末端2 cm~3 cm时停止。

### 7.5 注意事项

7.5.1 本操作程序应在无RNA酶的环境下和超净工作台中进行，并使用一次性乳胶手套。

7.5.2 离心管、PCR反应管、加样吸头应使用一次性塑料制品，使用前均应经DEPC H<sub>2</sub>O处理或直接购买无RNA酶产品，然后进行 $1.034 \times 10^5$  Pa高压灭菌30 min。

## 8 结果判定

8.1 将电泳后的琼脂糖凝胶用凝胶成像系统观察并拍照。阴性对照无任何DNA扩增带，而阳性对照在408bp位置出现DNA扩增带，则试验结果成立。

8.2 若被检样品在408bp位置出现DNA扩增带，判定为鸭圆环病毒阳性。

注：鸭圆环病毒PCR产物凝胶电泳结果参见附录A.2。

地方标准信息服务平台



附 录 A  
(资料性附录)  
引物序列及检测结果判定

A.1 鸭圆环病毒特异性引物寡核苷酸序列

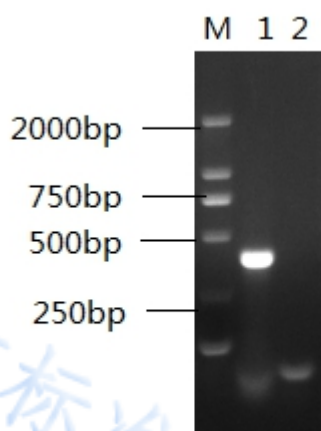
引物序列见表A.1。

表A.1 鸭圆环病毒特异性引物序列

引物名称	引物序列 (5' →3' )	片段大小(bp)
DUCK-aF	5' -MGAGCTGCCGCCCTTGAG-3'	408
DUCK-aR	5' -TCCCGAGTAACCGTCCCACCAC-3'	

A.2 鸭圆环病毒PCR产物琼脂糖凝胶电泳图

PCR产物琼脂糖凝胶电泳结果见图A.1。



M:DNA分子质量标准；1：408bp片段的PCR产物；  
2：阴性对照。

图A.1 鸭圆环病毒 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

附录 B  
(资料性附录)  
溶液的配制

B.1 试剂

本附录所用试剂均为分析纯。

B.2 商品化DNA抽提试剂盒主要成分

商品化DNA抽提试剂盒主要成分如下：

- 细胞裂解液；
- 氯仿；
- 无水乙醇；
- 75%乙醇；
- 洗脱缓冲液；
- DFPC H<sub>2</sub>O；
- 过滤柱。

B.3 商品化PCR试剂盒主要成分

商品化PCR试剂盒主要成分如下：

- 2×Tap PCR MasterMix；
- DECP H<sub>2</sub>O。

B.4 三羟甲基氨基甲烷(Tris)-硼酸电泳缓冲液配制

B.4.1 5×Tris-硼酸电泳缓冲液配制

试剂如下：

- Tris：54 g；
- 硼酸：27.5 g；
- 0.5 mol/L EDTA (pH8.0)：20 mL；
- 双蒸水：定容至1 000 mL。

在800 mL双蒸水中加入54 g Tris、27.5 g硼酸和20 mL 0.5 mol/L EDTA (pH8.0)，磁力搅拌以确保其完全溶解，然后定容至1 000 mL，移至棕色瓶中。室温保存。

B.4.2 1×Tris-硼酸电泳缓冲液配制

试剂如下：

- 5×Tris-硼酸电泳缓冲液：100 mL；
- 双蒸水：400 mL。

在400 mL双蒸水中加入100 mL 5×Tris-硼酸电泳缓冲液，混匀。室温保存。

#### B.5 PBS配制

试剂如下：

- 氯化钠：8 g；
- 氯化钾：0.2 g；
- 磷酸氢二钠：1.44 g；
- 磷酸二氢钾：0.24 g；
- 双蒸水：定容至1 000 mL。

在800 mL的双蒸水中依次加入其余成分，用1 mol/L盐酸调节溶液的pH值至7.2，加双蒸水定容至1 000 mL， $1.034 \times 10^5$  Pa高压灭菌25 min。室温保存。

#### B.6 0.1%焦碳酸二乙酯（DEPC）水配制

试剂如下：

- DEPC：0.1 mL；
- 双蒸水：100 mL。

将0.1 mL DEPC加入100 mL双蒸水中配成0.1%的水溶液。室温作用12 h以上，其间间歇摇混几次或在室温下磁力搅拌20 min，然后 $1.034 \times 10^5$  Pa高压灭菌30 min。室温保存。

---

地方标准信息服务平台

地方标准信息服务平台

中华人民共和国广西地方标准

鸭圆环病毒检测 聚合酶链式反应法

DB 45/T 2103--2019

广西壮族自治区市场监督管理局统一印刷

版权专有 侵权必究