



中华人民共和国国家标准

GB/T 21674—2008

猪圆环病毒聚合酶链反应试验方法

Detecting porcine circovirus with polymerase chain reaction

2008-04-09 发布

2008-06-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准附录 A 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：农业部兽医诊断中心。

本标准主要起草人：田克恭、王宏伟、孙明、王传彬、陈西钊。



引 言

猪圆环病毒依据其致病性和基因组差异分为无致病性的猪圆环病毒Ⅰ型(porcine circovirus type1, PCV-1)和有致病性的猪圆环病毒Ⅱ型(porcine circovirus type2, PCV-2)。PCV-2 是引发仔猪断奶后多系统衰弱综合征(post-weaning multisystem wasting syndrome, PMWS)的主要病原。该病主要以患畜生长迟缓、进行性消瘦和多系统病理损伤为特征,给世界各国主要养猪地区的规模化养猪业造成了一定的经济损失。



猪圆环病毒聚合酶链反应试验方法

1 范围

本标准规定了猪圆环病毒(PCV)聚合酶链反应(PCR)检测方法的技术要求。

本标准适用于猪血清和组织中的猪圆环病毒检测,以及其Ⅰ型(PCV-1)和Ⅱ型(PCV-2)的鉴别。

2 实验室生物安全要求

试验操作应在生物安全Ⅱ级(BSL-2级)以上的实验室进行。

3 实验材料、仪器设备和试剂

3.1 实验材料

眼科剪、眼科镊、称量纸、10 mL 一次性注射器、1.5 mL 灭菌离心管、0.2 mL 薄壁 PCR 管、琼脂糖、500 mL 量筒、500 mL 锥形瓶、吸头(10 μ L、200 μ L、1 000 μ L)、灭菌双蒸水。

3.2 仪器设备

分析天平、高速离心机、真空干燥器、PCR 扩增仪、电泳仪、电泳槽、紫外凝胶成像仪(或紫外分析仪)、液氮罐或-70℃冰箱、微波炉、组织研磨器、-20℃冰箱、水浴锅、可调移液器(最大量程为 2 μ L、20 μ L、200 μ L、1 000 μ L)。

3.3 试剂

本标准所用试剂,除特殊标注外,均为分析纯。

3.3.1 消化液(见第 A.1 章)。

3.3.2 2%蛋白酶 K 溶液(见第 A.2 章)。

3.3.3 酚-三氯甲烷-异戊醇混合液(见第 A.3 章)。

3.3.4 2.5 mmol/L dNTP(见第 A.4 章)。

3.3.5 10 pmol/ μ L PCV 引物(见第 A.5 章)。

3.3.6 0.5 U/ μ L Taq DNA 聚合酶(见第 A.6 章)。

3.3.7 10 倍 PCR 缓冲液(见第 A.7 章)。

3.3.8 溴化乙锭(EB)溶液(见第 A.8 章)。

3.3.9 电泳缓冲液(50 倍)(见第 A.9 章)。

3.3.10 1%琼脂糖凝胶(见第 A.10 章)。

3.3.11 上样缓冲液(见第 A.11 章)。

3.3.12 异丙醇。

3.3.13 75%乙醇(见第 A.12 章)。

3.3.14 15 mmol/L 氯化镁(见第 A.13 章)。

3.3.15 灭菌双蒸水(见第 A.14 章)。

3.3.16 电泳缓冲液(1 倍)(见第 A.15 章)。

4 操作程序

4.1 样品的采集与处理

4.1.1 样品的采集:濒死猪、扑杀的成年猪和流产胎儿取肺脏和淋巴结;幼龄猪取心脏;待检活猪,用注射器取血 2 mL~4 mL,立即送往实验室。

4.1.2 样品的处理:每份样品分别处理

4.1.2.1 组织样品处理:取待检病料约 0.2 g 置研磨器中剪碎并研磨,加入 2 mL 消化液(3.3.1)继续研磨。取已研磨好的待检病料上清 100 μ L,置 1.5 mL 灭菌离心管中,再加入 500 μ L 消化液(3.3.1)和 10 μ L 2%蛋白酶 K 溶液(3.3.2),混匀后,置 55℃水浴中 4 h~16 h。

4.1.2.2 血清样品处理:待血液凝固后,取上清放于离心管中,4℃ 8 000 g 离心 5 min,取上清 100 μ L,置 1.5 mL 灭菌离心管中,加入 500 μ L 消化液(3.3.1)和 10 μ L 2%蛋白酶 K 溶液(3.3.2),混匀,置 55℃水浴中 4 h~16 h。

4.1.2.3 阳性对照处理:分别取 PCV-1 和 PCV-2 细胞培养液各 100 μ L,置 1.5 mL 灭菌离心管中,每管加入 500 μ L 消化液(3.3.1)和 10 μ L 2%蛋白酶 K 溶液(3.3.2),混匀,置 55℃水浴中 4 h~16 h。

4.1.2.4 阴性对照处理:取灭菌双蒸水 100 μ L,置 1.5 mL 灭菌离心管中,加入 500 μ L 消化液(3.3.1)和 10 μ L 2%蛋白酶 K 溶液(3.3.2),混匀,置 55℃水浴中 4 h~16 h。

4.2 DNA 模板的提取

4.2.1 取出已处理的待检样品及阴性、阳性对照样品,每管加入 600 μ L 酚-三氯甲烷-异戊醇混合液(3.3.3),用力颠倒 10 次混匀,13 000 g 离心 10 min。

4.2.2 取上清 500 μ L 置 1.5 mL 灭菌离心管中,加入等体积异丙醇(3.3.12),混匀,置液氮中 3 min 或 -70℃冰箱中 30 min。取出离心管,室温融化,4℃ 20 000 g 离心 15 min。

4.2.3 弃上清,沿离心管开口方向管壁缓缓滴入 1 mL -20℃预冷的 75%乙醇(3.3.13)溶液,轻轻旋转洗一次后倒掉,将离心管倒扣于吸水纸上 1 min,真空抽干 15 min。

4.2.4 取出离心管,用 50 μ L 灭菌双蒸水溶解沉淀,作为模板备用。

4.3 PCR 扩增

每管取灭菌双蒸水 8 μ L,2.5 mmol/L dNTP(3.3.4)、10 pmol/ μ L PCV 引物(3.3.5)、15 mmol/L 氯化镁(3.3.14)、10 倍 PCR 缓冲液(3.3.7)、0.5 U/ μ L Taq DNA 聚合酶(3.3.6)各 2 μ L,DNA 模板 2 μ L,混匀,作好标记,加入矿物油约 20 μ L,覆盖(有热盖的自动 DNA 热循环仪不用加矿物油)。扩增条件为 94℃ 30 s、62℃ 45 s、72℃ 45 s,35 个循环后,72℃延伸 10 min。

4.4 电泳

将 PCR 扩增产物 15 μ L 与 3 μ L 上样缓冲液(3.3.11)混合,点样于 1%琼脂糖凝胶(3.3.10)孔中,琼脂糖凝胶板一侧点样孔加入 100 bp Ladder Marker(分子质量标准物),以 5 V/cm 电压电泳 40 min,紫外凝胶成像仪下观察结果。

5 结果判定

当 PCV-1 阳性对照出现 652 bp 扩增带,PCV-2 阳性对照出现 1 154 bp 扩增带,阴性对照未出现目的带时,实验结果成立。被检样品出现 652 bp 扩增带为 PCV-1 阳性,出现 1 154 bp 扩增带为 PCV-2 阳性,未出现相应扩增带的样品判为阴性。

附 录 A
(规范性附录)
试剂的配制

A.1 消化液

A.1.1 1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCL)(pH8.0)

三羟甲基氨基甲烷	12.11 g
灭菌双蒸水	80 mL
浓盐酸	调 pH 至 8.0
灭菌双蒸水	加至 100 mL

A.1.2 0.5 mol/L 乙二铵四乙酸二钠(EDTA)溶液 (pH8.0)

二水乙二铵四乙酸二钠	18.61 g
灭菌双蒸水	80 mL
氢氧化钠	调 pH 至 8.0
灭菌双蒸水	加至 100 mL

A.1.3 20%十二烷基硫酸钠(SDS)溶液 (pH7.2)

十二烷基硫酸钠	20 g
灭菌双蒸水	80 mL
浓盐酸	调 pH 至 7.2
灭菌双蒸水	加至 100 mL

A.1.4 消化液

1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCL)(pH8.0)	2 mL
0.5 mol/L 乙二铵四乙酸二钠溶液(pH8.0)	0.4 mL
20%十二烷基硫酸钠溶液(pH7.2)	5 mL
5 mol/L 氯化钠	4 mL
灭菌双蒸水	加至 200 mL

A.2 2%蛋白酶 K 溶液

蛋白酶 K(分析纯)	5 g
灭菌双蒸水	加至 250 mL

A.3 酚-三氯甲烷-异戊醇混合液

碱性酚	25 mL
三氯甲烷	24 mL
异戊醇	1 mL

A.4 2.5 mmol/L dNTP

dATP(100 mmol/L)	20 μ L
dTTP(100 mmol/L)	20 μ L
dGTP(100 mmol/L)	20 μ L
dCTP(100 mmol/L)	20 μ L
灭菌双蒸水	加至 800 μ L

A.5 10 pmol/μL PCV 引物

引物序列：

P₁:5'-CCGCGGGCTGGCTGAACTT-3'

P₂:5'-CTCGGCTATGCGCTCCAAAATG-3'

P₃:5'-ACCCCCGCCACCGCTACC-3'

上游引物 P₁ (2 OD₂₆₀) 加入 375.4 μL 灭菌双蒸水溶解, 下游引物 P₂ (2 OD₂₆₀) 加入 326.6 μL 灭菌双蒸水溶解, 下游引物 P₃ (2 OD₂₆₀) 加入 401.9 μL 灭菌双蒸水溶解, 分别取 P₁、P₂、P₃ 溶液各 300 μL, 混匀即为 10 pmol/μL PCV 引物。

A.6 0.5 U/μL Taq DNA 聚合酶

5 U Taq DNA 聚合酶	1 μL
灭菌双蒸水	加至 10 μL
现用现配。	

A.7 10 倍 PCR 缓冲液

A.7.1 1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCL)(pH9.0)

羟基甲基氨基甲烷(分析纯)	15.8 g
灭菌双蒸水	80 mL
浓盐酸(分析纯)	调 pH 至 9.0
灭菌双蒸水	加至 100 mL

A.7.2 10 倍 PCR 缓冲液

1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCL)(pH9.0)	1 mL
氯化钾(分析纯)	0.373 g
曲拉通 X-100(分析纯)	0.1 mL
灭菌双蒸水	加至 100 mL

A.8 溴化乙锭(EB)溶液

溴化乙锭	0.2 g
双菌双蒸水	加至 20 mL

A.9 电泳缓冲液(50 倍)

A.9.1 0.5 mol/L 乙二铵四乙酸二钠(EDTA)溶液(pH8.0)

二水乙二铵四乙酸二钠(分析纯)	18.61 g
灭菌双蒸水	80 mL
氢氧化钠	调 pH 至 8.0
灭菌双蒸水	加至 100 mL

A.9.2 TAE(三羟甲基氨基甲烷-乙酸)电泳缓冲液(50 倍)

羟基甲基氨基甲烷(Tris)(分析纯)	242 g
冰乙酸	57.1 mL
0.5 mol/L 乙二铵四乙酸二钠溶液(pH8.0)	100 mL
灭菌双蒸水	加至 1 000 mL
用时用灭菌双蒸水稀释使用。	

A. 10 1%琼脂糖凝胶

琼脂糖(电泳级)	2 g
TAE 电泳缓冲液(50 倍)	4 mL
灭菌双蒸水	196 mL
微波炉中完全融化,加溴化乙锭(EB)溶液 20 μ L。	

A. 11 上样缓冲液

溴酚蓝 0.2 g,加双蒸水 10 mL 过夜溶解。50 g 蔗糖加入 50 mL 水溶解后,移入已溶解的溴酚蓝溶液中,摇匀定容至 100 mL。

A. 12 75%乙醇

无水乙醇(100%)(分析纯)	750 mL
灭菌双蒸水	250 mL

A. 13 15 mmol/L 氯化镁

氯化镁(分析纯)	0.143 g
灭菌双蒸水	100 mL

A. 14 灭菌双蒸水



1 000 mL 双蒸水(电阻 $\geq$ 18.2 Ω),放于高压锅中,121℃高压 20 min 后取出备用。

A. 15 电泳缓冲液(1 倍)

电泳缓冲液(50 倍)	10 mL
灭菌双蒸水	490 mL
