

团 体 标 准

T/CVMA XXXXX—XXXX

牛呼吸道合胞体病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

Real-time fluorescence RT-PCR detection method of Bovine Respiratory
Syncytial Virus

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国兽医协会 发布

中国兽医协会
征求意见稿

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。

本文件由湖南冠牧生物科技有限公司提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

中国兽医协会
征求意见稿

中国兽医协会
征求意见稿

牛呼吸道合胞体病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了牛呼吸道合胞体病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法的技术要求。
本文件适用于牛鼻拭子、血样以及肺脏组织样品中牛呼吸道合胞体病毒的核酸检测。

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

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

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。

实时荧光 RT-PCR：实时荧光反转录聚合酶链式反应（Real-time fluorescence reverse transcript polymerase chain reaction）

BRSV：牛呼吸道合胞体病毒（Bovine Respiratory Syncytial Virus）

BHQ：无荧光淬灭基团（Black hole quencher）

Ct值：每个反应管内的荧光信号量达到设定的阈值所经历的循环数（Cycle threshold）

DNA：脱氧核糖核酸（Deoxyribonucleic acid）

FAM：羧基荧光素（Carboxyfluorescein）

HEX：六氯-6-甲基荧光素（Hexachlorofluorescein）

PBS：磷酸盐缓冲液（Phosphate buffered saline）

RNA：核糖核酸（Ribonucleic acid）

Taq 酶：Taq DNA 聚合酶（Taq DNA polymerase）

5 原理

本标准方法采用了 TaqMan 探针实时荧光 RT-PCR 技术原理。反应体系中包括一对用于扩增 DNA 的引物和一条能与 PCR 产物特异杂交的荧光标记探针。探针的 5'端标记了被称为报告基团，荧光素 3'端标记了淬灭基团。在进行 RT-PCR 延伸反应时，首先将一条 RNA 链逆转录成为互补 DNA，再以此

为模板经过 PCR 进行 DNA 复制，Taq 酶的 5'外切酶活性将 5'端荧光基团从探针上切割下来，使其与淬灭基团分离，从而仪器能检测到 5'端荧光基团所发出的荧光信号，一分子 PCR 扩增产物的生成伴随一分子荧光信号的产生。随着扩增循环次数的增加，仪器检测到的荧光信号的累积反应了扩增产物量的变化。本标准方法以 BRSV 的 M 基因序列为基础设计合成了一对特异性引物及探针达到检测 BRSV 病原核酸的目的，同时在体系中引入人工合成的外源 DNA 片段作为外源内标，有效监控因试剂失效、操作错误、样本中存在 PCR 抑制物等原因带来的假阴性结果，建立了牛呼吸道合胞体病毒实时荧光 RT-PCR 反应体系。

6 试剂和材料

6.1 试剂

6.1.1 总则：除非另有说明，所用试剂均为分析纯，试验用水符合 GB/T 6682 的要求，所有试剂均用无 RNA 酶的容器分装。

6.1.2 FastKing 一步法反转录-荧光试剂盒（探针法），含 RT-PCR 扩增所需的逆转录酶、Taq 酶、buffer、Mg²⁺、dNTPs 等组分。

6.1.3 TE Buffer (pH 8.0)：配制方法按附录 A 中 A.1。

6.1.4 阳性对照、阴性对照、外源内标见附录 A 中 A.2、A.3 和 A.4，其中阳性对照质粒和外源内标质粒序列见附录 C 中 C.1 和 C.2。

6.2 引物和探针

实时荧光 RT-PCR 扩增 BRSV 病原 M 基因及外源内标基因用上、下游引物和探针序列参见附录 B 中表 B.1。

7 仪器设备

7.1 荧光 PCR 仪及配套反应管（板）。

7.2 组织匀浆器。

7.3 普通台式离心机。

7.4 振荡器。

7.5 微量移液器（量程：0.5 μL~10 μL、2 μL~20 μL、20 μL~200 μL 和 200 μL~1 000 μL）。

7.6 冰箱（2℃~8℃和-20℃以下）。

7.7 高压灭菌锅。

8 样品的采集与处理

8.1 总则

实验室生物安全要求符合GB 19489的规定。

8.2 样品采样工具

采样专用商品化棉拭子、剪刀、镊子、5 mL采样管、商品化一次性采样袋。除商品化棉拭子、采样袋外，上述采样工具应经 $121^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，15 min高压灭菌并烘干或经 160°C 干烤2 h。

8.3 样品采集与处理

8.3.1 鼻拭子

用无菌棉拭子采集牛鼻道分泌物，采集时，将拭子反复刮擦牛鼻道分泌物，蘸取分泌物后，立即将棉拭子浸入1 mL~2 mL灭菌0.01 mol/L pH 7.2的PBS中，溶液配制方法按附录A中A.5。4°C储存，尽快送达实验室。取样进行检验时，充分振动、挤干拭子，4°C 4 000 r/min离心1 min，取上清备用。

8.3.2 血样

牛常用颈静脉采血，采血时先将采血部位的毛发清洗干净，用75%的酒精消毒，待干燥后采血。用一次性采血器或注射器，用针头（一般用三棱针）穿刺静脉后，将血液滴到直径为3 mm~4 mm抗凝管内（长度一般为5 cm），并立即连续摇动后将口封好，竖立存放。

保存：如用全血样品，样品中加抗凝剂（在采血前直接加入），并充分摇匀；如用血清样品，则血液不加抗凝剂，在室温下（不能曝晒）静置，待血清析出，经离心机离心分离出血清（与血凝块分开放置），若要长时间保存，则将血清置冰箱冷冻层保存（保存时间视冰箱的温度），但不可反复冻融。

8.3.3 肺脏组织

采集牛肺脏组织时，如已死亡的动物应尽快采集，夏天应不超过2 h，冬天不超过6 h（还要视具体温度）。采集的动物病料必须新鲜，尽可能减少污染。采样时用无菌剪、镊取适量样品按1:5的比例加入灭菌0.01 mol/L pH 7.2的PBS（例：1 g组织样品加5 mL PBS）。使用组织匀浆器研磨，后分装到离心管中，冻融2次~3次4 000 r/min离心5 min，取上清备用，并尽快送实验室检验。

8.4 样品保存与运输

上述采集的样品需尽快用于检测；如不能立即检测的样品，在 $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 下保存应不超过24 h， $-20^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ 下应不超过3个月， -70°C 下应不超过一年。样品运送采用低温保存进行运输，并在规定温度下的保存期内送达。

9 操作方法

9.1 样品核酸提取

9.1.1 在样本制备区进行。使用商品化病毒基因组RNA提取试剂盒提取病毒基因组RNA，也可采用其他等效的RNA提取方法。

9.1.2 实验前准备（使用当天准备）：取出吸附柱（已套好收集管），加入250 μL 平衡液，12 000 r/min离心1 min，弃收集管中废液，将吸附柱重新放回收集管中备用。

9.1.3 取1.5 mL离心管，依次加入500 μL 裂解液和250 μL 待测样本和10 μL 蛋白酶K，漩涡混匀，

瞬时离心，室温静置 5min。

9.1.4 将步骤 9.1.3 中的混合液全部转移至吸附柱中，12 000 r/min 离心 1 min，弃收集管中废液，将吸附柱重新放回收集管中。

9.1.5 向吸附柱中加入 800 μ L 洗涤液 A，12 000 r/min 离心 1 min，弃收集管中废液，将吸附柱放入收集管中。

9.1.6 向吸附柱中加入 800 μ L 洗涤液 B，12 000 r/min 离心 1 min，弃收集管中废液，将吸附柱放入收集管中。

9.1.7 重新将吸附柱安置于收集管上，12 000 r/min 离心 1 min，除尽残留洗液，否则洗涤液中的乙醇会影响后续实验。

9.1.8 丢弃收集管，将吸附柱放入一个干净的 1.5 mL 离心管中，向吸附膜中央悬空滴加 50 μ L~80 μ L 洗脱液（对于杂质、抑制物较多的复杂样本，建议将洗脱液预热至 65 $^{\circ}$ C 后使用），室温放置 2 min，12 000 r/min 离心 1 min，丢弃吸附柱，1.5 mL 离心管中液体即为提取的核酸产物。可直接用于检测或保存于-20 $^{\circ}$ C 备用。

9.2 扩增试剂的准备与配制

9.2.1 在试剂储存和准备区进行。

9.2.2 每个反应的体系见附录 B 中表 B.2，根据所需反应数 n，按 n+1 配制反应液，充分混匀后分装，每个反应管 20 μ L。转移反应管至样本制备区。

9.3 加样

9.3.1 在样本制备区进行。

9.3.2 在上述 9.2.2 的反应管中分别加入 9.1.8 中提取的 RNA 溶液，以及阴性对照和阳性对照各 5 μ L，使每管总体积达到 25 μ L，记录反应管对应的样品编号。盖好管盖，震荡或摇晃混匀后，3 000 r/min 离心 30 s。转移至扩增区。

9.4 实时荧光 RT-PCR 反应

9.4.1 在扩增区进行。

应使用能采集并区分 FAM 和 HEX 这两种不同荧光信号的多通道荧光 PCR 仪。

9.4.2 将 9.3.2 中加样后的反应管放入荧光 PCR 检测仪中，编辑样品表后选定 FAM 检测通道读取 BRSV 检测结果；选定 HEX 检测通道读取外源内标检测结果，淬灭基团均选择无（None）荧光。之后如下设置反应参数：

----第一阶段，反转录 50 $^{\circ}$ C 15 min；

----第二阶段，预变性 95 $^{\circ}$ C 2 min；

----第三阶段，95 $^{\circ}$ C 15 s，60 $^{\circ}$ C 30 s，40 个循环，在第三阶段每个循环的退火延伸收集荧光信号，试验结束后，根据收集的荧光曲线和 Ct 值判断结果。

10 结果判定

10.1 结果分析条件设定

阈值设定原则：阈值线设定于刚好超过阴性对照扩增曲线的最高点。不同仪器可根据仪器噪音情况进行调整。

10.2 试验成立的条件

10.2.1 阴性对照：HEX 通道 $Ct \leq 35$ ，呈典型扩增曲线，且 FAM 通道无 Ct 值，无典型扩增曲线。

10.2.2 阳性对照：HEX 通道 $Ct \leq 35$ ，呈典型扩增曲线，且 FAM 通道 Ct 值 ≤ 35 ，呈典型扩增曲线。

10.2.3 10.2.1 和 10.2.2 要求需在同一次试验中同时满足，否则，本次试验无效，需重新进行。

10.3 结果描述及判定

10.3.1 被检样品 HEX 通道 $Ct \leq 35$ ，呈典型扩增曲线，且 FAM 通道无 Ct 值，无典型扩增曲线，判定样品中 BRSV 核酸阴性。

10.3.2 被检样品 HEX 通道 $Ct \leq 35$ ，呈典型扩增曲线，且 FAM 通道 $Ct \leq 35$ ，呈典型扩增曲线，判定样品中 BRSV 核酸阳性。

10.3.3 被检样品 HEX 通道 $Ct \leq 35$ ，呈典型扩增曲线，且 FAM 通道 $35 < Ct \leq 40$ ，判定结果可疑，应进行重复试验。如果重复试验 FAM 通道 $Ct \leq 40$ ，且典型扩增曲线，判定样品中 BRSV 核酸阳性，Ct 值 > 40 或无 Ct 值判定为阴性。

10.3.4 被检样品 HEX 通道 $Ct > 35$ ，说明此次样本检测结果无效，需重复进行试验。

附录 A
(规范性)
溶液配制

A.1 TE Buffer (pH 8.0)

量取下列溶液于 500 mL 烧杯中，1 M Tris-HCl Buffer pH 8.0 5 mL，0.5 M EDTA pH 8.0 1 mL，向烧杯中加入约 400 mL ddH₂O 均匀混合；将溶液定容到 500 mL 后；进行无菌过滤，室温保存。

A.2 阳性对照

用 500 μL TE Buffer (pH 8.0) 将含 BRSV 检测目标片段的质粒进行溶解和 10 倍梯度稀释，用本文件方法测定 FAM 通道 Ct 值，选择值在 25~35 之间的稀释倍数作为阳性对照。

A.3 阴性对照

为灭菌生理盐水：称取 0.9 g 氯化钠，溶解在少量蒸馏水后，定容到 100 mL，高压灭菌后作为阴性对照。

A.4 外源内标

用 500 μL TE Buffer (pH 8.0) 将含人工合成的 DNA 外源内标片段的质粒进行溶解和 10 倍梯度稀释，用本文件方法测定 HEX 通道 Ct 值，选择值在 25~35 之间的稀释倍数作为外源内标。

A.5 0.01 mol/L pH 7.2 的 PBS

A 液：0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液：磷酸二氢钠 (NaH₂PO₄ · H₂O) 27.6 g，溶于蒸馏水中，最后稀释至 1000 mL。

B 液：0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液：磷酸氢二钠 (Na₂HPO₄ · 12H₂O) 71.6 g，加蒸馏水溶解，最后稀释至 1000 mL。

0.2 mol/L A 液 14 mL，0.2 mol/L B 液 36 mL，加氯化钠 (NaCl) 8.5 g，用蒸馏水稀释至 1000 mL。

附录 B

(规范性)

引物探针序列与实时荧光RT-PCR反应液配方

B.1 引物、探针的名称和序列见表 B.1。

表 B.1 引物、探针的名称与序列

| 名称 | 序列 (5'-3') |
|------------|---|
| BRSV-F | TGCATATCTAGAGAAAGAGAGCATATATTATG |
| BRSV-R | TCTGTTGTGTTAAGATAAGTTGTRTGAGA |
| BRSV-P-FAM | FAM-ACACACGGCCACTAAATTCTCCATTAAGCC-BHQ1 |
| IC-F | TGGTACATGGCGGCGAAT |
| IC-R | TCGGCGAGAAGCTGATGTCT |
| IC-P-HEX | HEX-ACAGCATCCAGGGCCATTCAGATGTC-BHQ1 |

B.2 实时荧光 RT-PCR 反应液配方见表 B.2。

表 B.2 实时荧光 RT-PCR 反应液配方

| 组分 | 1个检测反应的加入量 (μL) |
|--|-----------------|
| RNase-Free ddH ₂ O | 4.125 |
| 2× FastKing One Step Probe RT-qPCR MasterMix | 12.5 |
| 25× FastKing Enzyme Mix | 1 |
| BRSV-F(10 μmol/L) | 0.5 |
| BRSV-R(10 μmol/L) | 0.5 |
| BRSV -P-FAM(10 μmol/L) | 0.25 |
| IC-F(10 μmol/L) | 0.25 |
| IC-R(10 μmol/L) | 0.25 |
| IC-P-HEX(10 μmol/L) | 0.125 |
| 外源内标 | 0.5 |
| Template | 5 |

B.3 注意事项

在检测过程中，应严防不同样品间的交叉污染。

反应液分装时宜避免产生气泡，上机前检查各反应管是否盖紧，瞬时震荡混匀后离心，以免荧光物质泄漏污染仪器。

附录 C
(资料性)
阳性对照质粒序列

C.1 阳性对照质粒序列

TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCT
TGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGT
GTCGGGGCTGGCTTAACATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTGCACCATATGCGGTGTG
AAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGC
AACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATG
TGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGG
CCAGTGAATTCtgcatatctagagaagagagcatatattatgtaactacaaattggaaacacacggccactaaattctccattaagcctatagagga
ctgattctcacacaacttatcttaacacaacagaAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTG
TTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTA
ATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTC
GTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGCTATTGGGCGCTCTC
CGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTC
AAAGGCGGTAATACGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAG
GCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCC
CCTGACGAGCATCAGAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAA
GATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCG
GATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCT
CAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCCGACC
GCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGG
CAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAG
TGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTT
ACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTT
TTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTC
TACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAA
AAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGT
AAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCG
TTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGC
CCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAG
CCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAAT
TGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCT
ACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCTAACGATCA
AGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTT
GTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTG
TCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGTGACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTG
TATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAAATACCGCGCCACATAGCAGAAC
TTTAAAAGTGCTCATCATTGAAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTT
GAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACCTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGC
GTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGG

AAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTATTGTCTCATG
AGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGTCCGCGCACATTTCCCGAA
AAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCAC
GAGGCCCTTTCGTC

注：下划线部分为连入 PUC19 载体中的包含 BRSV 目标检测片段部分，粗体为引物序列，高亮部分为探针序列。

C.2 外源内标质粒序列

TCGCGGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCT
TGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGT
GTCGGGGCTGGCTTAACCTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGAGTGCACCATATGCGGTGTG
AAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGC
AACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATG
TGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAACGACGG
CCAGTGAATTCctggtacatggcgggaataacagcatccaggccattcagatgtcggagacatcagettctcggcgagAAGCTTGG
CGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACG
AGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTT
GCGCTCACTGCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACG
CGCGGGGAGAGGCGGTTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCGCTCACTGACTCGCTGCGCTC
GGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATC
AGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAA
GGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAATAATCGACGCTC
AAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCC
TCGTGCGCTCTCCTGTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCTTCTCCCTTCGGGAAG
CGTGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTG
GGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCGACCCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAG
TCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGC
GAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAA
CAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGAT
CCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGA
AAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAA
CTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA
AAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAA
TCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTCGTTTACCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGT
GTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCC
ACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTG
GTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTC
GCCAGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTT
GGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCA
AAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAAGTGTATCAC
TCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACT
GGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCG
TCAATACGGGATAATAACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCT
TCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCA

T/CVMA XXXX—XXXX

CCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAA
AATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTCAA
TATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAT
AAACAAATAGGGGTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATT
ATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTC

注：下划线部分为连入 PUC19 载体中的包含外源内标片段部分，粗体为引物序列，高亮部分为探针序列。

中国兽医药协会
征求意见稿