

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 5668—2023

水禽圆环病毒感染检疫技术规范

Technical specification for circovirus infection in waterfowls

2023-12-29 发布

2024-07-01 实施

中华人民共和国海关总署 发布

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。

本文件由中华人民共和国海关总署提出并归口。

本文件起草单位：中华人民共和国福州海关、福建省农业科学院畜牧兽医研究所、厦门市翰均科检测科技有限公司、中华人民共和国石家庄海关。

本文件主要起草人：郑腾、傅光华、张体银、施少华、张志灯、黄瑜、王武军、程龙飞、王建昌、谢向机、陈翠腾、黄素文、万春和、傅秋玲、姜焱、陈红梅、刘荣昌、陈珍、江南松。

以正式出版文本为准

水禽圆环病毒感染检疫技术规范

1 范围

本文件规定了水禽圆环病毒感染的临床诊断、聚合酶链式反应检测和实时荧光聚合酶链式反应检测要求。

本文件适用于水禽圆环病毒感染(鸭圆环病毒感染和鹅圆环病毒感染)的监测、检疫和鉴定。

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

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

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。

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

DNA:脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic acid)

dNTP:三磷酸脱氧核苷酸(Deoxynucleoside triphosphate)

DuCV:鸭圆环病毒(Duck circovirus)

EB:溴化乙锭(Ethidium bromide)

GoCV:鹅圆环病毒(Goose circovirus)

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

5 疫病概述

水禽圆环病毒感染是近年来倍受关注的新发现传染病之一,该病流行十分广泛,宿主谱广,不同品种、不同日龄的水禽均有报道,以生长迟缓、羽毛紊乱、体况消瘦为主要临床特征。水禽圆环病毒属于圆环病毒科圆环病毒属,基因组为单链环状 DNA,主要包括鸭圆环病毒(Duck circovirus, DuCV)和鹅圆环病毒(Goose circovirus, GoCV)。该病毒主要侵害水禽的淋巴网状内皮组织,引起淋巴器官(特别是法氏囊)淋巴细胞减少,免疫力下降,导致宿主对其他病原(如大肠杆菌、巴氏杆菌或禽流感,鸭甲肝病毒及水禽细小病毒等)二次感染的易感性增加,影响其他疫病病原疫苗的免疫效果。GoCV 最早于 1999 年在发病鹅中被发现,DuCV 于 2003 年首次在患病鸭中被发现。我国自 2005 年和 2008 年首次分别报道了

GoCV 和 DuCV 在水禽中出现以后,各地饲养的水禽均陆续出现感染报道。GoCV 核酸阳性率达 35.4%,种鹅群 GoCV 血清阳性率在 60.0%~90.9%,鸭群 DuCV 阳性率则在 10%~81.6%。值得关注的是,目前已有在患病鹅中检测到 DuCV 的报道,说明两种水禽圆环病毒还存在交叉感染现象。

6 临床诊断

6.1 临床症状

感染圆环病毒的水禽可以出现以下症状:

- a) 水禽群体内个体间生长参差不齐,感染水禽体况消瘦,体重与同日龄未感染健康水禽差异明显;
- b) 羽毛杂乱,易脱落,严重的出现背脊或翅尖羽毛完全脱落。

6.2 病理变化

6.2.1 剖检变化

水禽感染圆环病毒一周以后主要免疫器官开始出现以下变化:

- a) 胸腺出血或萎缩;
- b) 法氏囊萎缩;
- c) 脾脏萎缩。

6.2.2 组织学变化

组织学变化如下:

- a) 法氏囊淋巴滤泡结构消失,淋巴细胞显著减少;
- b) 胸腺淋巴细胞显著减少,细胞核出现碎裂和空泡化;
- c) 脾脏红髓和白髓边界消失,白髓淋巴细胞减少。

6.3 初步诊断

当水禽出现以上临床症状,结合病理变化,可初步诊断为疑似水禽圆环病毒感染,需要进一步进行实验室检测。

7 仪器和设备

7.1 梯度 PCR 扩增仪。

7.2 实时荧光 PCR 仪。

7.3 台式冷冻离心机(转速不低于 12 000 r/min)。

7.4 微量移液器(0.5 μ L~10 μ L, 2 μ L~20 μ L, 20 μ L~200 μ L, 100 μ L~1 000 μ L)。

7.5 组织匀浆器。

7.6 电泳仪。

7.7 电泳槽。

7.8 紫外凝胶成像系统。

7.9 冰箱(2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 和 -70 $^{\circ}$ C)。

8 试剂、引物和探针

- 8.1 水:符合 GB/T 6682 中二级水的规格。
- 8.2 蛋白酶 K。
- 8.3 10%十二烷基磺酸钠(SDS):配制方法按附录 A 中 A.1。
- 8.4 Tris 饱和苯酚。
- 8.5 酚:三氯甲烷:异戊醇(25:24:1)。
- 8.6 3 mol/L 的醋酸钠溶液:配制方法按 A.2。
- 8.7 无水乙醇。
- 8.8 75%乙醇:配制方法按 A.3。
- 8.9 溴化乙锭溶液:配制方法按 A.4。
- 8.10 1×TAE 缓冲液:配制方法按 A.5。
- 8.11 1.0% 琼脂糖凝胶:配制方法按 A.6。
- 8.12 DNA 分子量标准物:100 bp~2 000 bp。
- 8.13 10×加样缓冲液:配制方法按 A.7。
- 8.14 普通 PCR 引物:

检测 DuCV、GoCV 共有上游引物 F1:5'-AAY CWC GCG GGA AGT GGT GGG A-3';

检测 DuCV 的下游引物 R1:5'-TTC TAR GCA TAA ACG AGA TC-3';

检测 GoCV 的下游引物 R2:5'-ATA MGA TTC GGA CAA TGG ACT G-3'。

引物序列中的简并碱基 Y 表示 C 或 T, W 表示 A 或 T, M 表示 A 或 C, R 表示 A 或 G, F1 与 R1 用于检测 DuCV, 扩增条带为 554 bp 大小的基因片段, F1 与 R2 用于检测 GoCV, 扩增条带为 407 bp 大小的基因片段。各引物的工作浓度均为 10 μmol/L, 保存于-20℃备用。

8.15 荧光 PCR 引物和探针。

8.15.1 检测鸭圆环病毒的 SYBR Green I 荧光 PCR 检测引物:

上游引物 DuCV-F:5'-GGC GAA GAG CGG CAA CTA-3';

下游引物 DuCV-R:5'-CCG ACG ATA GCG AAC TTG C-3'。

扩增片段约 123 bp, 用水溶解至 10 μmol/L 后, 保存于-20℃备用。

8.15.2 检测鹅圆环病毒荧光 PCR 检测引物和探针:

上游引物 GoCV-F:5'-AGG TAA TGG TTG CTT CTA CTG TTA G-3';

下游引物 GoCV-R:5'-GTG GTA TTC TAC GGA ATG GGT ATG-3';

探针为 GoCV-p:5'-ACA AGC CGA RGA CAC CGC AGC ACC-3'。

引物序列中的简并碱基 R 表示 A 或 G, 探针 GoCV-p 其 5 末端标记荧光报告基团 FAM, 3 末端标记荧光淬灭基团 Eclipse, 扩增片段约 82 bp, 用水溶解至 10 μmol/L 后, 保存于-20℃备用。

9 样品的采集与处理

对生长不良、羽毛紊乱、体况消瘦或发病的水禽, 按 NY/T 541—2016 的要求无菌采集水禽的法氏囊、脾脏等器官合并进行检测。采集的器官剪碎后与磷酸盐缓冲液(PBS, 按 A.8)按体积比 1:5 的比例制成组织匀浆液, 反复冻融 3 次, 8 000 r/min 离心 30 min, 取上清, 用于 DNA 抽提, 或置-20℃条件下冻存备用。

对被检水禽, 以棉拭子分别采集咽喉和泄殖腔分泌物合并进行检测。以无菌棉拭子在咽喉或泄殖腔内来回刮取 3 次后, 合并放置于 2 mL 含抗生素的磷酸盐缓冲液中, 用于 DNA 抽提, 或置-20℃冻

存备用。

若采集的样品需放置 6 h 后再进行处理,应先置-20℃条件下保存备用,应在冷冻状态下运输。

10 水禽圆环病毒聚合酶链式反应

10.1 设立对照

分别以已知阳性样品作为阳性对照。以已知阴性样品作为阴性对照。以水作为空白对照。

10.2 DNA 的提取

10.2.1 取 540 μL 匀浆上清液或棉拭子浸出液,加入 60 μL 10% 的 SDS,再加入蛋白酶 K 至终浓度 5 mg/mL,充分混匀 15 s,56℃水浴 2 h。

10.2.2 加入等体积 Tris 饱和苯酚,充分混匀 15 s,4℃下 12 000 r/min 离心 15 min。

10.2.3 取离心后上清液加入等体积酚:三氯甲烷:异戊醇(25:24:1),颠倒混匀 15 s,静置 5 min 后,在 4℃下 12 000 r/min 离心 15 min。

10.2.4 重复 10.2.3 步骤 1 次。

10.2.5 取离心后的上清液加入 1/10 体积的 3 mol/L 的醋酸钠溶液(pH 为 5.2)、2.5 倍体积的无水乙醇,颠倒混匀 15 s,-20℃沉淀 2 h。

10.2.6 随后在 4℃下 12 000 r/min 离心 15 min。轻轻倾去上清液,加入 800 μL 75%乙醇清洗沉淀 2 次,瞬时离心后,吸尽残余液体,室温静置 5 min。

10.2.7 加入 50 μL 水重悬,轻轻混匀溶解管壁上的 DNA,冰上保存备用。提取的 DNA 应在 2 h 内进行 PCR 扩增或保存于-20℃条件下。

注:DNA 提取也能选用等效的商品化试剂盒。

10.3 PCR 反应操作

10.3.1 PCR 反应液配制

在 0.2 mL PCR 反应管中,按表 1 配制反应体系,加样宜按空白对照、阴性对照、待检样品、阳性对照的次序分别加入模板,充分混匀。

表 1 水禽圆环病毒 PCR 反应体系(25 μL)

组分	加样量/μL	终浓度
10× <i>Taq</i> DNA 聚合酶 PCR 反应缓冲液	2.5	1×
MgSO ₄ (50 mmol/L)	0.5	1 mmol/L
dNTPs(10 mmol/L each)	0.5	0.2 mmol/L
<i>Taq</i> DNA 聚合酶(5 U/μL)	0.5	0.1 U/μL
引物 F1(10 μmol/L)	0.75	0.3 μmol/L
引物 R1(10 μmol/L)	0.5	0.2 μmol/L
引物 R2(10 μmol/L)	0.5	0.2 μmol/L
水	17.25	—
模板/对照	2	—

10.3.2 PCR 反应步骤

混匀后瞬时离心,使反应混合液都沉降到 PCR 管底。将上述混合物按照以下步骤进行 PCR:95 ℃ 预热 5 min 后,按以下循环参数循环:94 ℃ 30 s,53 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,循环 35 次;72 ℃ 延伸 8 min,反应结束后保存于 4 ℃。

10.4 琼脂糖凝胶电泳

分别取待检样品、阴性对照样品、阳性对照样品和空白对照样品各 5 μ L 的 PCR 产物与 0.5 μ L 的 10 $\times$ 加样缓冲液混合均匀,分别加入 1.0% 琼脂糖凝胶板的样孔中,同时在另一样孔中加 5 μ L DNA 分子量标准物;以 5 V/cm 的电压电泳 30 min 后,经紫外凝胶成像系统观察结果。

10.5 凝胶成像分析和测序

使用凝胶成像分析系统观察核酸条带并判断结果,经核酸扩增电泳后如出现 407 bp 或 554 bp 大小的扩增条带,应对其切胶回收后进行测序,也可直接送 PCR 产物进行测序,参考序列见附录 B 中 B.1 (GoCV) 和 B.2 (DuCV)。

10.6 结果判定

10.6.1 试验成立条件

当阳性对照样品中,GoCV 样品出现 407 bp 大小的扩增条带(见附录 C 电泳图 2 号泳道),DuCV 样品出现 554 bp 大小的扩增条带(见附录 C 电泳图 3 号泳道),空白对照样品和阴性对照样品均无特异性扩增条带(见附录 C 电泳图 1 号、4 号泳道),本次试验结果有效。

10.6.2 待检样品结果判定

当待检样品出现 407 bp 左右特异性条带(参见附录 C 电泳图 7 号泳道),所获扩增产物与参考序列(见 B.1)同源性达到 90% 以上,可判样品为 GoCV 核酸阳性。当待检样品出现 554 bp 左右特异性条带(见附录 C 电泳图 5、6 号泳道),所获扩增产物与参考序列(见 B.2)同源性达到 80% 以上,可判样品为 DuCV 核酸阳性。无特异性扩增条带(见附录 C 电泳图 4 号泳道),则判样品为水禽圆环病毒核酸阴性。

11 鸭圆环病毒实时荧光 PCR

11.1 设立对照

以已知阳性样品作为阳性对照。以已知阴性样品作为阴性对照。以水作为空白对照。

11.2 DNA 提取

同 10.2。

11.3 实时荧光 PCR 扩增

11.3.1 反应体系

在 0.2 mL PCR 反应管中,按表 2 配制反应体系,加样宜按空白对照、阴性对照、待检样品、阳性对照的次序分别加入模板,充分混匀。

表 2 鸭圆环病毒实时荧光 PCR 反应体系(20 μL)

组分	加样量/μL	终浓度
SYBR® Premix Ex Taq™ II (2×)	10	1×
DuCV-F(10 μmol/L)	0.2	0.1 μmol/L
DuCV-R(10 μmol/L)	0.2	0.1 μmol/L
水	8.6	—
模板/对照	1	—

11.3.2 反应程序

设定 SYBR Green I 实时荧光 PCR 检测 DuCV 的反应参数。

第一阶段,预变性 95 °C 10 min。

第二阶段,95 °C 10 s, 60 °C 30 s,40 个循环;荧光信号的收集设置在第二阶段每次循环的退火延伸时进行,以获得样本的扩增动力学曲线。

第三阶段,反应结束后先加热至 95 °C,然后再降至 60 °C,开始以 0.5 °C/s 递增至 95 °C 检测荧光信号得出扩增产物的熔解曲线。

11.4 结果判断

综合分析仪器给出的各项结果,基线以仪器给出的默认值作为参考,阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照扩增曲线的最高点为准,具体根据仪器噪声情况进行调整,选择 FAM 通道进行分析。

阳性对照样品有对数扩增曲线,而且 Ct 值≤30,在扩增产物的 DNA 熔解温度(T_m)=(80.55±0.18)°C 时出现单一的特异性峰;阴性对照和空白对照无扩增曲线,而且 Ct 值>38 或无 Ct 值,二者均成立才可判定试验成立。

检验样本 Ct 值≤35,且在扩增产物 DNA 熔解温度(T_m)=(80.55±0.18)°C 时出现单一的特异性峰,并且曲线有明显的对数增长期,报告 DuCV 核酸阳性;检验样本 35<Ct 值≤38 时,且在 T_m =(80.55±0.18) °C 出现单一的特异性峰,重复一次,如果 Ct 值仍然≤38,并且曲线有明显的对数增长期,报告 DuCV 核酸阳性,否则报告 DuCV 核酸阴性;样本没有 Ct 值或 Ct 值>38 时,报告未检出 DuCV 核酸。扩增区序列见 B.3。

12 鸭圆环病毒实时荧光 PCR

12.1 设立对照

以已知阳性样品作为阳性对照。以已知阴性样品作为阴性对照。以水作为空白对照。

12.2 DNA 提取

同 10.2。

12.3 实时荧光 PCR 扩增

12.3.1 反应体系

在 0.2 mL PCR 反应管中,按表 3 配制反应体系,加样宜按空白对照、阴性对照、待检样品、阳性对

照的次序分别加入模板,充分混匀。

表 3 鹅圆环病毒实时荧光 PCR 反应体系 (20 μL)

组分	加样量/ μL	终浓度
Probe qPCR Mix($2\times$)	10	$1\times$
GoCV-F($10\ \mu\text{mol/L}$)	0.2	$0.1\ \mu\text{mol/L}$
GoCV-R($10\ \mu\text{mol/L}$)	0.2	$0.1\ \mu\text{mol/L}$
GoCV-p($10\ \mu\text{mol/L}$)	0.4	$0.2\ \mu\text{mol/L}$
水	8.2	—
模板/对照	1	—

12.3.2 反应程序

将已加样的 PCR 反应管短暂离心后放入 PCR 仪,扩增反应条件设定: $95\ ^\circ\text{C}$ 预变性 2 min; 之后 $95\ ^\circ\text{C}$ 变性 15 s, $65\ ^\circ\text{C}$ 退火 20 s, 收集荧光, 共 45 个循环。同时设阳性、阴性对照和空白对照。

12.4 结果判断

综合分析仪器给出的各项结果,基线以仪器给出的默认值作为参考,阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照扩增曲线的最高点为准,具体根据仪器噪声情况进行调整,选择 FAM 通道进行分析。

阳性对照样品有对数扩增曲线,而且 Ct 值 ≤ 30 ; 阴性对照和空白对照无扩增曲线,而且 Ct 值 > 40 或无 Ct 值,二者均成立才可判定试验成立。

检验样本 Ct 值 ≤ 35 时,报告 GoCV 核酸阳性; 检验样本 $35 < \text{Ct}$ 值 ≤ 40 时,重复一次,如果 Ct 值仍然 ≤ 40 , 并且曲线有明显的对数增长期,报告 GoCV 核酸阳性,否则报告 GoCV 核酸阴性; 样本无 Ct 值或 Ct 值 > 40 时,报告未检出 GoCV 核酸。扩增区序列见 B.4。

13 综合判定

13.1 临床判定为疑似病例,经 PCR 扩增出现 407 bp 左右特异性条带,且经序列分析证明所获扩增产物与参考序列(见 B.1)同源性达到 90% 以上的;或实时荧光 PCR 检测呈阳性的,可判定为 GoCV 感染。

13.2 临床判定为疑似病例,经 PCR 扩增出现 554 bp 左右特异性条带,且经序列分析证明所获扩增产物与参考序列(见 B.2)同源性达到 80% 以上;或实时荧光 PCR 检测呈阳性的,可判定为 DuCV 感染。

13.3 临床判定为疑似病例,经 PCR 扩增出现 407 bp 和 554 bp 左右特异性条带,且经序列分析证明所获扩增产物分别与参考序列(见 B.1)同源性达到 90% 以上的,或实时荧光 PCR 检测呈阳性的;以及参考序列(见 B.2)同源性达到 80% 以上,或实时荧光 PCR 检测呈阳性的;可判定为 DuCV 和 GoCV 共感染。

13.4 被检水禽虽没有明显的临床症状和剖检变化,但病原检测符合 13.1 中病原检测判定标准,可判样品为 GoCV 感染;病原检测符合 13.2 中病原检测判定标准,可判样品为 DuCV 感染。

附 录 A
(规范性)
试剂的配制

A.1 10%十二烷基磺酸钠(SDS)

称取 SDS 100 g 置于 1 000 mL 烧杯中,加入水 800 mL,68 ℃加热溶解,温度降至室温后滴加浓盐酸调节 pH 至 7.2,再加水定容至 1 000 mL,室温保存备用。

A.2 3 mol/L 的醋酸钠溶液(NaOAc)

称取 40.8 g NaOAc · 3H₂O 加入水 40 mL 搅拌溶解,用冰醋酸调节 pH 至 5.2,加水定容至 100 mL,经 1.034×10^5 Pa 高压灭菌 30 min 后常温保存备用。

A.3 75%乙醇

取无水乙醇 750 mL 加入水 250 mL,定容至 1 000 mL,−20 ℃保存备用。

A.4 溴化乙锭(EB)溶液

取溴化乙锭 20 mg 加水至 20 mL。

A.5 1×TAE 电泳缓冲液

A.5.1 配制 0.5 mol/L 乙二铵四乙酸二钠(EDTA)溶液 (pH 8.0)

称取二水乙二铵四乙酸二钠 18.61 g 溶解于适量水中,混匀后用 10%氢氧化钠溶液调 pH 至 8.0,最后加水至 100 mL。

A.5.2 配制 50 × TAE 电泳缓冲液

羟基甲基氨基甲烷(Tris)	242 g
冰乙酸	57.1 mL
0.5 mol/L 乙二铵四乙酸二钠溶液(pH 8.0)	100 mL
水	至 1 000 mL

用时用水稀释 50 倍后使用。

A.5.3 配制 1×TAE 电泳缓冲液

取 50 × TAE 电泳缓冲液 20 mL 加水至 1 000 mL。

A.6 1.0%琼脂糖凝胶

取琼脂糖 1.0 g 加入 1×TAE 电泳缓冲液至 100 mL,加热至完全融化后冷却至 50 ℃~60 ℃时,再加溴化乙锭(EB)溶液 5 μL,摇匀后倒入制胶板中,待完全凝固后取下加样梳,备用。

A.7 10×加样缓冲液

聚蔗糖	25 g
溴酚蓝	0.1 g

二甲苯青	0.1 g
水	至 100 mL

A.8 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.9 g
KH_2PO_4	0.2 g

将上述试剂溶于 800 mL 蒸馏水中,定容至 1 000 mL, 1.034×10^5 Pa 高压灭菌 30 min,4 ℃ 保存备用。

以正式出版文本为准

附 录 B

(资料性)

参 考 序 列

B.1 PCR 扩增的鹅圆环病毒基因序列(共 407 bp)

AATCTCGCGGGAAGTGGTGGGATGGCTATAATGGGCAGGATGTGGTTGTGATGGATG
ATTTTATGGGTGGCTCCCTTACGATGACCTTTTAAGGATCTGTGATCGCTATCCTTTACG
GGTTGAGTATAAGGGTGGTATGACCCAGTTCGTGTCTAAGACCTTATAATTACTTCTAA
TAGGGAGCCTCGCGATTGGTATAAATGCGAGTGTGATGTGTCCGCATTGTATCGGAGAAT
TAATCAGTACCTGATATTAACCCCGGATGGTTATGCGCCCGCCCCTGATTTTATGCTGCCG
TTCCCAATAAACTACTAGAGACCTGGTTAAGGTTAGAATAAGGATCGTTTATTGTGTAAA
ATTACAATAAAGTTATGGTGCAAGCCAGTCCATTGTCCGAATCTTAT

B.2 PCR 扩增的鸭圆环病毒基因序列(共 554 bp)

AACCACGCGGGAAGTGGTGGGACGGTACTCGGGAAATGACGTAGTCGTCATGGACGA
CTTTTATGGTTGGTTGCCTTATGATGATTTGCTGAGAATTACCGACCGTTACCCTTTACGG
GTTGAATTTAAAGGCGGTATGACTCAGTTTGTGGCTAAGACCTTGATCATAACAAGTAAC
CGCGAGCCTCGTGATTGGTACAAGAGCGAGTTTGACCTTTCAGCTCTGTACCGCAGAATTA
ACAAGTATCTTGTGTATAACATTGACAAGTACGAACCCGCCAGGCATGTACCCTCCCGTT
CCCAATAAACTACTGAGACCAATTTGCCGTGAGTCGTTTATTAAGGTAAACACTTGGCAG
GGTATTACACTTGGGCAGCTCGGTAAAGGTTAGGCACTTGGCAGGGATTAAACACTTGGG
CAGCTCGGTAAAGGTTAGGCACTTGGCAGGGATTAAACACTTGGGCAGCTCGGTAAAGGT
TAGGCACTTGGCAGGGATTAAACACTTGGGCAGCTCGGTAAAGGTTAGAACAAGATCTCG
TTTATGCTTAGAA

B.3 实时荧光 PCR 扩增的鸭圆环病毒基因序列(基于鸭圆环病毒 Cap 蛋白基因,共 123 bp)

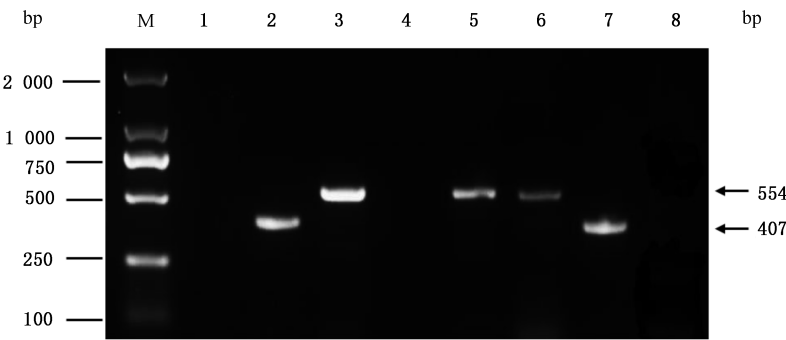
GGCGAAGAGCGGCAACTACTCATACAAGAGGTGGGTCTTTACCATTAATAACCCTACC
TTTGAAGATTATGTTTCATGTTCTAGAGTTTTGCACGCTCGACAATTGCAAGTTCGCTATC
GTCGG

B.4 实时荧光 PCR 扩增的鹅圆环病毒基因序列(基于鹅圆环病毒 Cap 蛋白基因,共 82 bp)

AGGTAATGGTTGCTTCTATTGTCAGAGGTGCTGCGGTGTCCTCGGCTTGTCTTAGTGA
CATACCCATTCCGTAGAATACCAC

附 录 C
(资料性)
PCR 检测结果电泳图例

PCR 检测结果电泳图例见图 C.1。



标引序号说明：

- M ——DNA 分子质量标准物；
- 1 ——空白对照样品扩增结果；
- 2 ——GoCV 阳性样品扩增结果；
- 3 ——DuCV 阳性样品扩增结果；
- 4 ——阴性样品扩增结果；
- 5,6 ——鸭源待检样品扩增结果；
- 7,8 ——鹅源待检样品扩增结果。

图 C.1 PCR 检测结果电泳图