



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4750—2017

## 猪细小环病毒检疫技术规范

Quarantine protocol for swine torque teno sus virus

2017-05-12 发布

2017-12-01 实施

中 华 人 民 共 和 国  
国家质量监督检验检疫总局 发 布

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国江西出入境检验检疫局、深圳市检验检疫科学院、江西省检验检疫科学研究院、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、中华人民共和国上海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：杨春华、孙思扬、张强、陈庆富、周延、孙洁、祝建新、罗秋红、花群义。



# 猪细小病毒检疫技术规范

## 1 范围

本标准规定了猪细小病毒 PCR 检测法和实时荧光 PCR 检测法的操作方法。  
本标准适用于猪及其产品中猪细小病毒核酸的检测。

## 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/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

SN/T 2025 动物检疫实验室生物安全操作规范

## 3 防污染措施

本标准涉及的所有操作应符合 GB 19489,及 SN/T 2025 的有关规定。

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

- 4.1 DEPC:焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate)
- 4.2 DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)
- 4.3 EDTA:乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid)
- 4.4 PCR:聚合酶链式反应(polymerase chain reaction)
- 4.5 RNA:核糖核酸(ribonucleic acid)
- 4.6 SDS:十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate)
- 4.7 TTSuV:猪细小病毒(Swine Torque Teno Sus Virus)(参见附录 A)

## 5 设备、材料和试剂

### 5.1 设备、材料

PCR 仪、实时荧光 PCR 仪、电泳仪、凝胶成像系统、高压灭菌器、冰箱、微量可调移液器及吸头、冷冻离心机、1.5 mL 离心管。

### 5.2 试剂

除特别说明外,本标准所用试剂均为分子生物学级,试验用水应符合 GB/T 6682 的要求:样品裂解缓冲液(见 B.4)、10%SDS、20 g/L 蛋白酶 K、RNA 酶、酚/三氯甲烷/异戊醇(25 : 24 : 1)、异丙醇、70%乙醇(用无水乙醇和 DEPC 水配制)、DEPC 水、PCR 反应预混液、PCR 引物(见 B.6)、电泳缓冲液、琼脂



糖、DNA 分子质量标准(DNA Marker)、胶红(或同等效果核酸染料)、实时荧光 PCR 反应预混液、引物和探针(见 B.7)。

## 6 样品的采集、前处理和 DNA 模板制备

### 6.1 总则

采样过程中样本不得交叉污染,采样及样品前处理应遵循 GB 19489 实验室生物安全通用要求。

### 6.2 样品采集

#### 6.2.1 血液样品

用真空采血管采集样品,每管不少于 5 mL,编号备用。每个样品更换一支采血针头。编号后的血样经 4℃ 静置 30 min,以 4 000 r/min,离心 10 min,吸取血清(上清液)至 1.5 mL 离心管内,编号备用。

#### 6.2.2 组织样品

取 1 g 样品,经匀浆器研磨后,加入 4 mL 的样品裂解缓冲液(见 B.4)悬浮,−20℃ 反复冻融 3 次,然后以 5 000 r/min,离心 5 min,取上清液备用。

### 6.3 样品贮运

样品采集后,放入保温箱中,加冰,密封,送实验室。采集或处理的样本在 2℃~8℃ 条件下保存不应超过 24 h,若需长期保存,应放置 −20℃ (或以下)冰箱,冻融不超过 3 次。

### 6.4 样品 DNA 模板制备

#### 6.4.1 酚/三氯甲烷/异戊醇抽提法

取处理好的血清、组织样品 100 μL 于 1.5 mL 离心管,加入样品裂解液缓冲液 500 μL,混匀,加入 35 μL 10% SDS 和 20 g/L 蛋白酶 K 6 μL,56℃ 水浴作用 30 min。然后加入 RNA 酶 30 μg,37℃ 作用 30 min,待样品冷却至室温,混匀,14 000 r/min,离心 5 min;吸取上清液,加入等体积的酚/三氯甲烷/异戊醇(25:24:1)抽提,14 000 r/min,离心 5 min;吸取上层液体,加入等体积的酚/三氯甲烷/异戊醇(25:24:1)再抽提 1 次,14 000 r/min,离心 5 min;吸取上层液体,加入等体积的异丙醇,沉淀 DNA,室温放置 10 min,14 000 r/min,离心 5 min;倒掉液体,加入 1 mL 70% 乙醇洗涤 1 次,晾干,取 30 μL 灭菌水溶解 DNA,贮存于 −20℃ 备用或立即用于实时荧光 PCR 扩增。

#### 6.4.2 商品化 DNA 抽提试剂盒提取法

按照使用的商品化 DNA 抽提试剂盒操作说明要求提取病毒 DNA。

## 7 PCR 法检测步骤

### 7.1 PCR 反应体系

设反应数为  $n$ ,  $n$  包括待检样品及重复、阳性对照、阴性对照和空白对照。每个 PCR 检测反应体系见 B.8。



## 7.2 PCR 反应参数

### 7.2.1 TTSuV 1a 型 PCR 反应参数

94 ℃, 5 min 预变性; 94 ℃, 30 s 变性, 60 ℃, 30 s 退火, 72 ℃, 2 min 延伸, 35 个循环; 72 ℃, 5 min 延伸。

### 7.2.2 TTSuV k2 型 PCR 反应参数

94 ℃, 5 min 预变性; 94 ℃, 30 s 变性, 62 ℃, 30 s 退火, 72 ℃, 2 min 延伸, 35 个循环; 72 ℃, 5 min 延伸。

## 7.3 1.5% 琼脂糖凝胶电泳

用电泳缓冲液和琼脂糖配成浓度为 1.5% 的琼脂糖凝胶。取 5  $\mu$ L 扩增产物进行电泳, 同时设置 DNA Marker, 在凝胶成像系统下观察并记录电泳结果。

## 7.4 PCR 对照设立

### 7.4.1 阳性对照

以 TTSuV 1a 型病毒 DNA、TTSuV k2 型病毒 DNA 分别作为 TTSuV 1a 检测、TTSuV k2 检测的阳性对照。

### 7.4.2 阴性对照

以不含 TTSuV 的猪器官组织(或猪血清)DNA 作为阴性对照。

### 7.4.3 空白对照

以水作为空白对照。

## 7.5 PCR 结果判定

### 7.5.1 PCR 阳性对照判定

TTSuV 1a 型阳性对照, 在 272 bp 位置出现目的条带。

TTSuV k2 型阳性对照, 在 226 bp 位置出现目的条带。

### 7.5.2 阴性对照判定

TTSuV 1a 型阴性对照, 在 272 bp 位置无目的片段条带出现。

TTSuV k2 型阴性对照, 在 226 bp 位置无目的片段条带出现。

### 7.5.3 空白对照判定

空白对照, 无扩增条带出现。

### 7.5.4 样品结果判定

#### 7.5.4.1 阴性

阳性对照、阴性对照和空白对照结果均正确的条件下:

在 272 bp 位置无目的片段条带出现, 表示样品中无 TTSuV 1a 型病毒核酸, 表述为 TTSuV 1a 型



核酸阴性。

在 226 bp 位置无目的片段条带出现,表示样品中无 TTSuV k2 型病毒核酸,表述为 TTSuV k2 型核酸阴性。

7.5.4.2 阳性

阳性对照、阴性对照和空白对照结果均正确的条件下:

在 272 bp 位置出现目的条带,表示样品中有 TTSuV 1a 型病毒核酸,表述为 TTSuV 1a 型核酸阳性。

在 226 bp 位置出现目的条带,表示样品中有 TTSuV k2 型病毒核酸,表述为 TTSuV k2 型核酸阳性。

必要时,需进行测序验证,比对序列参见 C.1 和 C.2。

8 实时荧光 PCR 法检测步骤

8.1 实时荧光 PCR 反应体系

设反应数为  $n$ ,  $n$  包括待检样品及重复、阳性对照、阴性对照和空白对照。每个实时荧光 PCR 反应体系见 B.9,目的片段序列参见 C.3 和 C.4。

8.2 实时荧光 PCR 反应参数

反应参数为:95 ℃,90 s 预变性;95 ℃,10 s 变性;55 ℃,30 s 退火延伸(收集荧光信号);反应 40 个循环。

8.3 实时荧光 PCR 对照设立

8.3.1 阳性对照

见 7.4.1。

8.3.2 阴性对照

见 7.4.2。

8.3.3 空白对照

见 7.4.3。

8.4 结果判定

8.4.1 实时荧光 PCR 结果分析条件设定

直接读取检测结果。阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整,以阈值线刚好超过正常阴性样本扩增曲线的最高点为准。

8.4.2 阳性对照判定

TTSuV 1a 型阳性对照,FAM 检测通道呈现出典型的阳性扩增曲线。

TTSuV k2 型阳性对照,HEX 检测通道呈现出典型的阳性扩增曲线。

#### 8.4.3 阴性对照判定

TTSuV 1a 型阴性对照,无典型扩增曲线。

TTSuV k2 型阴性对照,无典型扩增曲线。

#### 8.4.4 空白对照判定

空白对照,FAM 通道和 HEX 通道 Ct 值均无典型扩增曲线。

#### 8.4.5 样品结果判定

##### 8.4.5.1 阴性

阳性对照、阴性对照和空白对照结果均正确的条件下:

FAM 通道无典型扩增曲线,表示样品中无 TTSuV 1a 型病毒核酸,表述为 TTSuV 1a 型核酸阴性。

HEX 通道无典型扩增曲线,表示样品中无 TTSuV k2 型病毒核酸,表述为 TTSuV k2 型核酸阴性。

##### 8.4.5.2 阳性

阳性对照、阴性对照和空白对照结果均正确的条件下:

FAM 检测通道  $Ct \leq 35$ ,且有典型扩增曲线,表示样品中有 TTSuV 1a 型病毒核酸,表述为 TTSuV 1a 型核酸阳性。

HEX 检测通道  $Ct \leq 35$ ,且有典型扩增曲线,表示样品中有 TTSuV k2 型病毒核酸,表述为 TTSuV k2 型核酸阳性。

##### 8.4.5.3 复验

无论 FAM 通道或 HEX 通道, $35 < Ct \leq 40$  建议复验,若复验后 Ct 值仍  $35 < Ct \leq 40$ ,表示样品中含有相应的 TTSuV 核酸,判为阳性。若复验后  $Ct > 40$ ,或无典型扩增曲线,则判为阴性。



附 录 A  
(资料性附录)  
猪细环病毒概述

猪细环病毒(Torque teno Sus virus,TTSuV)属指环病毒科(Anellovirus),分为 I 细环病毒属和 K 细环病毒属 2 个属。TTSuV 是一个无包膜、单股、环状、负链的 DNA 分子,氯化铯浮力密度为  $1.31\text{ g/cm}^3\sim 1.35\text{ g/cm}^3$ ,蔗糖中浮力密度是  $1.26\text{ g/cm}^3$ ,基因组长度约 3 000 bp,在不同种属间基因序列和长度差异极大,核酸同源性较小,具有种专一性。

细环病毒可感染人,以及猫、狗、猪、牛、鸡、羊、老鼠等动物。细环病毒在人群中通过血液和血液制品途径进行传播,在粪便、唾液、胆汁、乳汁、活组织甚至毛发中均能检测到该病毒,人群的感染率多在 10%以上,呈无症状带毒;在猪群中主要传播方式包括空气传播、粪-口途径、性传播、垂直传播等,呈持续感染,不同类型的细环病毒在猪群中常呈共感染,母猪感染率高于公猪,感染率 60%以上。

TTSuV 单独感染猪致病,至今尚未有报道。TTSuV 与圆环病毒 2 型(PCV2)共感染,可引起断奶仔猪多系统衰竭综合征(PMWS),与猪呼吸与繁殖综合征病毒(PRRSV)混合感染引起皮炎肾病综合征(PDNS)。致病机理尚不明确。





附 录 B  
(规范性附录)  
试剂配制

B.1 1 mol/L Tris-Cl 缓冲液, pH 8.0

称取 121.1 g Tris-Cl,溶于 800 mL 水中,混匀,缓慢加入浓盐酸 42 mL,冷却至室温,用稀盐酸调整 pH 至 8.0,加蒸馏水至 1 L,分装灭菌备用。

B.2 0.5 mol/L EDTA, pH 8.0

800 mL 水中加入 186.1 g Na<sub>2</sub>-EDTA · 2H<sub>2</sub>O,用磁力搅拌器搅拌均匀,稀盐酸调整 pH 至 8.0,加蒸馏水至 1 L,分装灭菌备用。

B.3 1 mol/L NaCl 溶液

58.5 g NaCl 溶于 1 000 mL 蒸馏水中,分装灭菌备用。

B.4 样品裂解缓冲液, pH 7.5

含 0.01 mol/L Tris-Cl,0.001 mol/L EDTA,0.1 mol/L NaCl。

B.5 10% SDS

10 g SDS 溶解于 100 mL 灭菌蒸馏水。

B.6 PCR 检测法引物序列

PCR 检测法引物序列见表 B.1。

表 B.1 PCR 检测法引物序列

名称	序列(5'→3')	位置	产物大小
V 1a-S3	CAATTTGGCTCGCTTCGCTCGC	24~295	272 bp
V 1a-S4	TACTTATATTCGCTTTCGTGGGAAC		
V k2-T3	CCAAACCACAGGAAACTGTGC	121~346	225 bp
V k2-T4	CTTGACTCCGCTCTCAGGAG		
S3/T3:上游引物。 S4/T4:下游引物。			



B.7 实时荧光 PCR 检测法引物探针序列

实时荧光 PCR 检测法引物探针序列见表 B.2。

表 B.2 实时荧光 PCR 检测法引物和探针序列

名称	序列(5'→3')	位置
V 1a-F	GGTTCAGGAGGCTCAATTTGG	12~100
V 1a-R	TTTGAATTTAACGGTTTTTCAGTCTTC	
V 1a-P	FAM-TCGCTTCGCTCGCACCACGT-BHQ1	
V k2-F	TATCGGGCAGGCGGTAATC	353~421
V k2-R	TACGCTACCGTCAGCCATCTTT	
V k2-P	HEX-AACCGGGCCCCCTCGATG-BHQ1	
F:上游引物。 R:下游引物。 P:探针。		

B.8 PCR 检测反应体系

PCR 检测反应体系见表 B.3。

表 B.3 PCR 反应体系

试剂	体积
Master Mix(2×)	10 μL
上游引物(10 μmol/L)	0.6 μL
下游引物(10 μmol/L)	0.6 μL
DNA 模板	4 μL
Add ddH <sub>2</sub> O to	20 μL

B.9 实时荧光 PCR 反应体系

实时荧光 PCR 反应体系见表 B.4。



表 B.4 实时荧光 PCR 反应体系

试剂	体积
Master Mix(2×)	10 μL
上游引物(10 μmol/L)	1.2 μL
下游引物(10 μmol/L)	1.2 μL
探针(10 μmol/L)	0.6 μL
DNA 模板	3 μL
Add ddH <sub>2</sub> O to	20 μL



附 录 C  
(资料性附录)  
扩增目的片段序列

C.1 TTSuV 1a 型 PCR 扩增目的片段

1 tacacttccg ggttcaggag gctcaatttg gctcgettcg ctgcaccac gtttgctgcc  
61 aggcggacct gattgaagac tgaaaaccgt taaattcaaa ttgaaaatg gcgggcaaaa  
121 tggcggacag ggggcgggga ttatgcaaat taatttatgc aaagtaggag gagctcgatt  
181 ttaatttatg caaagtagga ggagtcattt ctgattggtc gggagctcaa gtcttcattt  
241 gcatagggtg taaccaatca gatttaagge gtcccacta aagtgaatat aagtgagtgc

C.2 TTSuV k2 型 PCR 扩增目的片段

121 ccaaaccaca ggaaactgtg caaaaaagag gaaataaatt tcattggctg ggctgaagt  
181 cctcattaga ataataaaag aaccaatcag aagaacttcc tcttttagag tatataagta  
241 agtgcgca cgaatggctg agtttatgcc gctgggtgta gacacgaaca gagctgagt  
301 tctaaccgcc tgggcgggtg ccggagctcc tgagagcgga gtcaaggggc ctatcgggca

C.3 TTSuV 1a 型实时荧光 PCR 扩增目的片段

1 tacacttccg ggttcaggag gctcaatttg gctcgettcg ctgcaccac gtttgctgcc  
61 aggcggacct gattgaagac tgaaaaccgt taaattcaaa ttgaaaatg gcgggcaaaa

C.4 TTSuV k2 型实时荧光 PCR 扩增目的片段

301 tctaaccgcc tgggcgggtg ccggagctcc tgagagcgga gtcaaggggc ctatcgggca  
361 ggcggtaatc cagcgg aacc gggccccct cgaagggaaga aagatggctg acggtagcgt  
421 actgcgcaca cggattattc tgcagctgta aagaccgaa aaaacatctt gaaaaatgcc