

ICS 11.220
CCS B 41

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 572—2023

代替 NY/T 572—2016、NY/T 2960—2016

兔出血症诊断技术

Diagnostic techniques for rabbit haemorrhagic disease

2023-12-22 发布

中华人民共和国农业农村部 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。

本文件代替 NY/T 572—2016《兔病毒性出血病血凝和血凝抑制试验方法》和 NY/T 2960—2016《兔病毒性出血症病毒 RT-PCR 检测方法》，与 NY/T 572—2016 和 NY/T 2960—2016 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 增加了临床诊断(见第 5 章)；
- b) 更改了兔出血症病毒血凝和血凝抑制试验方法的试剂(见 6.2.1,2016 年版的 3.4 和 3.5)、样品(见 6.2.2,2016 年版的 3.5)、HA 试验(见 6.2.5,2016 年版的第 5 章)、HI 试验(见 6.2.6,2016 年版的第 7 章)；
- c) 删除了玻片血凝法(2016 年版的第 6 章)；
- d) 更改了 RT-PCR 试验的引物(见 6.3.2.1,2016 年版的第 5 章)、RT-PCR 步骤(见 6.3.4,2016 年版的 6.4、6.5)、结果判定(见 6.3.6,2016 年版的第 7 章)；
- e) 增加了实时荧光定量 RT-PCR 试验(见 6.4)；
- f) 增加了综合判定(见第 7 章)。

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。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本文件起草单位：江苏省农业科学院、中国动物卫生与流行病学中心。

本文件主要起草人：王芳、胡波、宋艳华、王志亮、陈萌萌、邵卫星、魏后军、范志宇、仇汝龙、朱伟峰。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2002 年首次发布为 NY/T 572—2002,2016 年第一次修订；

——2016 年首次发布为 NY/T 2960—2016,本次为第一次整合修订。



兔出血症诊断技术

1 范围

本文件规定了兔出血症临床诊断、血凝和血凝抑制试验、RT-PCR 试验、实时荧光定量 RT-PCR 试验的技术要求。

本文件适用于兔出血症流行病学调查、诊断、检疫以及病原鉴定。

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 19489 实验室 生物安全通用要求

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。

RHD1:兔出血症 1 型(rabbit haemorrhagic disease type 1)

RHD2:兔出血症 2 型(rabbit haemorrhagic disease type 2)

RHDV1:兔出血症病毒 1 型(rabbit haemorrhagic disease virus type 1)

RHDV2:兔出血症病毒 2 型(rabbit haemorrhagic disease virus type 2)

5 临床诊断

5.1 易感动物

5.1.1 兔出血症病毒 1 型(RHDV1)主要感染 2 月龄以上家兔并出现明显的临床症状。

5.1.2 兔出血症病毒 2 型(RHDV2)可感染家兔和野兔,家兔更易感,7 日龄以上的哺乳仔兔出现明显的临床症状和死亡。RHDV2 对其他动物,如地中海松田鼠和白齿鼯等,也有易感性。

5.2 临床症状

5.2.1 兔出血症(RHD)具有高度传染性和致死率,病兔的死亡率可达 70%~90%。

5.2.2 最急性型:主要表现为突然死亡,死前表现短暂的兴奋,突然倒地,划动四肢呈游泳状继之昏迷,濒死时抽搐,角弓反张,典型病例可见鼻孔流出血样液体,肛门松弛,肛周有少量淡黄色黏液附着。

5.2.3 急性型:主要表现为精神不振,食欲减退,渴欲增加,呼吸急促乃至呼吸困难。死前有短期兴奋、挣扎、狂奔、咬笼,全身颤抖,四肢划动。肛门松弛,肛周有少量淡黄色黏液附着,少数病死兔鼻孔中流出血样液体。

5.2.4 慢性型:主要表现为精神不振,食欲减退或废绝,消瘦严重,衰竭而死。少数耐过兔,则发育不良,生长迟缓。

5.2.5 RHDV1 感染死亡兔与 RHDV2 感染死亡兔的症状相似。

5.3 剖检病变

5.3.1 肝脏淤血、肿大、质脆,表面呈淡黄色或灰白色条纹,切面粗糙;脾脏淤血、肿大,呈黑紫色;肾脏肿

大、淤血,并有出血点。

5.3.2 胸腺水肿、肿大、出血;肺脏有不同程度充血、淤血、水肿、出血;心脏淤血,心包膜有点状出血。

5.3.3 鼻腔、喉头和气管黏膜淤血、出血;气管和支气管内有泡沫状血液。

5.3.4 胃肠多充盈,浆膜出血;小肠黏膜充血、出血;肠系膜淋巴结水肿,其他淋巴结多数充血。

5.3.5 胸腔和腹腔有血液样渗出物。

5.4 结果判定

出现 5.1、5.2、5.3 的情况,初步判为兔出血症临床疑似病例,需要进一步开展实验室诊断。

6 实验室诊断

6.1 样品采集、保存、运输和处理

6.1.1 总则

样品采集、保存和运输按照 NY/T 541 的规定执行。涉及病原检测应在生物安全二级实验室操作,按照 GB 19489 的规定执行。

6.1.2 组织样品采集

无菌采集病死兔肝脏组织,装入无菌采样袋或一次性灭菌的 15 mL 或 50 mL 离心管并编号。

6.1.3 样品保存和运输

样品采集后置于保温箱中,加入预冷的冰袋,密封,24 h 内送实验室;如未能在 24 h 送达实验室,应冰冻样品,加冰袋低温运输。样品应尽快处理,在 2 °C~8 °C 保存宜不超过 24 h;若需长期保存,样品应放在 -70 °C 以下冰箱中。

6.1.4 样品处理

6.1.4.1 取兔肝脏组织,剪碎、研磨或匀浆,按 1 g 组织加 10 mL PBS 的比例配成悬液,反复冻融 3 次,再以 8 000 r/min 离心 30 min,取上清液作为血凝和血凝抑制试验材料。

6.1.4.2 取兔肝脏组织,剪碎、研磨或匀浆,按 1 g 组织加 10 mL DEPC 水的比例配成悬液,反复冻融 3 次,再以 8 000 r/min 离心 30 min,取上清液作为核酸检测材料。

6.2 血凝(HA)和血凝抑制(HI)试验

6.2.1 试剂

6.2.1.1 PBS 配置方法应符合附录 A 中 A.3 的规定。

6.2.1.2 人“B”型或“O”型红细胞悬液(首选“B”型)应符合 A.4 的规定。

6.2.1.3 25%高岭土悬液配方应符合 A.5 的规定。

6.2.1.4 抗兔出血症病毒 1 型特异性血清、抗兔出血症病毒 2 型特异性血清、阴性血清(SPF 兔血清)血清需进行非特异性凝集和非特异性抑制因子处理,见附录 B。用于抗原检测时,用 PBS 稀释将阳性血清至 HI 效价为 1:64~1:256。

6.2.2 样品

待检兔肝脏悬液、阳性对照 RHD1 病死兔肝脏悬液(或 RHDV1 重组 VP60 蛋白)、阳性对照 RHD2 病死兔肝脏悬液(或 RHDV2 重组 VP60 蛋白)、阴性对照健康兔肝脏悬液。

6.2.3 RHDV1 重组 VP60 蛋白的制备

将重组兔出血症病毒 1 型 VP60 杆状病毒接种 Sf 9 昆虫细胞,5 d 后,收集细胞培养物,反复冻融 3 次后,以 3 000 r/min 离心 5 min,取上清液即为 RHDV1 重组 VP60 蛋白,置于 2 °C~8 °C 条件下备用。

6.2.4 RHDV2 重组 VP60 蛋白的制备

将重组兔出血症病毒 2 型 VP60 杆状病毒接种 Sf 9 昆虫细胞,5 d 后,收集细胞培养物,反复冻融 3 次后,以 3 000 r/min 离心 5 min,取上清液即为 RHDV2 重组 VP60 蛋白,置于 2 °C~8 °C 条件下备用。

6.2.5 HA 试验

6.2.5.1 在 96 孔 U 型微量反应板上,从第 2 孔至第 21 孔,每孔加入 25 μL PBS。

- 6.2.5.2 在第 1、第 2 孔加入待检兔肝脏悬液 25 μL 。
- 6.2.5.3 从第 2 孔开始,充分混合后用 25 μL 微量移液器等量倍比稀释至第 21 孔,稀释后第 21 孔弃去 25 μL 。
- 6.2.5.4 第 22 孔加入 RHD1 病死兔肝脏悬液(或 RHDV1 重组 VP60 蛋白)25 μL 、第 23 孔加入 RHD2 病死兔肝脏悬液(或 RHDV2 重组 VP60 蛋白)25 μL 作为阳性对照,第 24 孔加入健康兔肝脏悬液 25 μL 为阴性对照。
- 6.2.5.5 每孔加 1%人红细胞 25 μL ,立即置于微型振荡器上摇匀,于 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 静置 45 min~60 min,待阴性对照孔中红细胞完全沉积后观察结果。
- 6.2.5.6 结果判定。当 RHD1 病死兔肝脏悬液(或 RHDV1 重组 VP60 蛋白)、RHD2 病死兔肝脏悬液(或 RHDV2 重组 VP60 蛋白)阳性对照红细胞 100%凝集,健康兔肝脏悬液红细胞 100%沉积时,试验成立。被检样品红细胞 100%凝集的最高稀释度作为其血凝效价,HA 效价 $\geq 1:80$ 判为阳性,HA 效价 $\leq 1:10$ 判为阴性;HA 效价为 1:20 或 1:40 判为可疑,应重复试验,重复后 HA 效价 $\geq 1:20$ 的判为阳性,否则判为阴性。

6.2.6 HI 试验

- 6.2.6.1 4 个血凝单位(4 HAU)悬液配置。根据 6.2.5 测定的待检兔肝悬液 HA 效价,用 PBS 配制成 4 HAU 的悬液。
- 6.2.6.2 在 96 孔 U 型微量反应板上,自第 2 孔至第 24 孔,每孔加入 PBS 25 μL 。
- 6.2.6.3 吸取处理后的血清 25 μL 于第 1、第 2 孔,第 2 孔充分混匀后用 25 μL 移液器等量倍比稀释至第 24 孔,稀释后第 24 孔弃去 25 μL 。
- 6.2.6.4 第 1~第 24 孔,每孔分别加 4 HAU 的抗原 25 μL ,摇匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱作用 30 min~60 min。
- 6.2.6.5 每孔各加 1%人红细胞 25 μL ,立即置于微型振荡器上摇匀,于 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱静置 45 min~60 min,待 PBS 对照孔的红细胞完全沉积后观察结果。
- 6.2.6.6 每次测定须设已知效价的阳性血清对照、阴性血清对照(SPF 兔血清)、4 HAU 抗原对照、被处理血清对照(含 PBS 25 μL 、待检处理血清 25 μL 、1%人红细胞 25 μL)、PBS 对照(含 PBS 50 μL 、1%人红细胞 25 μL)。
- 6.2.6.7 结果判定。当阳性血清 HI 效价与已知结果相比,误差不高于 1 个滴度时,阴性对照血清 HI 效价不高于 1:2,4 个血凝单位对照 HA 效价为 1:4,试验成立。以完全抑制 4 HAU 抗原凝集的血清最高稀释度为被检血清 HI 抗体效价。用于抗体检测时,被检血清 HI 效价 $\geq 1:16$ 时,判为阳性。用于抗原(病毒)检测时,4 HAU 待检兔肝悬液能被抗兔出血症病毒 1 型特异性血清和抗兔出血症病毒 2 型特异性血清抑制,判为疑似 RHDV1 阳性;4 HAU 待检兔肝悬液的血凝能被抗兔出血症病毒 2 型特异性血清抑制,不能被抗兔出血症病毒 1 型特异性血清抑制,判为疑似 RHDV2 阳性。

注:在实际检测工作中,由于人的血细胞不易获取,也不易保存,而且不同操作者的判定结果缺乏一致性,所以可用其他方法代替 HA 和 HI 试验。

6.3 RT-PCR 试验

6.3.1 仪器设备

- 6.3.1.1 PCR 扩增仪。
- 6.3.1.2 高速冷冻离心机(最大离心力在 12 000 g 以上)。
- 6.3.1.3 核酸电泳仪和水平电泳槽。
- 6.3.1.4 微量移液器(0.5 μL ~10 μL ;2 μL ~20 μL ;20 μL ~200 μL ;100 μL ~1 000 μL)。
- 6.3.1.5 凝胶成像系统或紫外透射仪。

6.3.2 试剂与材料

- 6.3.2.1 引物,见附录 C 中的 C.1。
- 6.3.2.2 50 \times TAE 储存液,配制方法按照附录 A 中的 A.1 执行。

6.3.2.3 1.2%琼脂糖凝胶,配制方法按照 A.2 执行。

6.3.2.4 DEPC 水,配制方法按照 A.6 执行。

6.3.2.5 样品。待检兔肝脏悬液、阳性对照 RHD1 病死兔肝脏悬液(或重组质粒 pMD19-T-vp60-1, *vp60* 基因序列 GenBank:FJ794180)、阳性对照 RHD2 病死兔肝脏悬液(或重组质粒 pMD19-T-vp60-2, *vp60* 基因序列 GenBank:MT383749)、阴性对照健康兔肝脏悬液(或 DEPC 水)。

6.3.3 肝脏样品 RNA 的提取

取样品 200 μL ,加入 Trizol 700 μL ,振荡混匀后,室温放置 10 min;加入氯仿 300 μL ,剧烈振荡后,室温放置 1 min,以 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 11 000 r/min 离心 15 min;取上层水相 500 μL ,加入 500 μL 异丙醇,混匀,−20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 15 min,以 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 11 000 r/min 离心 10 min;去上清液,缓缓加入 75%乙醇 1 mL 洗涤,以 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 8 000 r/min 离心 5 min;去上清液,室温干燥 20 min,加入 DEPC 水 20 μL ,使充分溶解。或者按 RNA 抽提试剂盒的方法进行。

6.3.4 RT-PCR 步骤

6.3.4.1 反转录反应

取提取的 RNA 5 μL 加入反转录反应液(配方见附录 D 中的 D.1)中,瞬间离心混匀后置于 PCR 仪中,反应参数为:65 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min,42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,同时设立阴性对照和阳性对照,产物于 −20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

6.3.4.2 PCR 反应

取反转录产物 4 μL 加入 PCR 反应液(配方见 D.2)中,反应参数为:95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min;然后进入循环 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,35 个循环;于 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min,2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

6.3.5 结果观察

将 PCR 反应产物于 1.2%琼脂糖凝胶进行电泳,电压为 120 V,时间为 30 min,紫外灯下观察结果,并进行拍照。

6.3.6 结果判定

RHDV1 阳性对照有唯一一条约 347 bp 的目的条带,RHDV2 阳性对照有唯一一条约 748 bp 的目的条带,阴性对照、空白对照无相应的目的条带的情况下,检测样品出现与阳性对照相同目的条带的判为阳性,即判定为 RHDV1 或/和 RHDV2 核酸阳性。

6.4 实时荧光定量 RT-PCR 试验

6.4.1 仪器设备

6.4.1.1 实时荧光定量 PCR 仪。

6.4.1.2 其他器材同 6.3.1.2~6.3.1.5。

6.4.2 试剂与材料

6.4.2.1 引物和探针,见附录 E 中的 E.1。

6.4.2.2 DEPC 水,配置方法按照 A.6 执行。

6.4.2.3 样品。待检兔肝脏悬液、阳性对照 RHD1 病死兔肝脏悬液(或重组质粒 pMD19-T-vp60-1, *vp60* 基因序列 GenBank:FJ794180)、阳性对照 RHD2 病死兔肝脏悬液(或重组质粒 pMD19-T-vp60-2, *vp60* 基因序列 GenBank:MT383749)、阴性对照健康兔肝脏悬液(或 DEPC 水)。

6.4.3 肝脏样品 RNA 的提取

同 6.3.3。

6.4.4 实时荧光定量 RT-PCR 操作

取提取的 RNA 2 μL 加入反应液(配方见 E.4)中,瞬间离心混匀后,置于实时荧光定量 PCR 仪中。按下列参考反应条件进行扩增(可根据仪器及试剂进行适当调整):42 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s;然后进入循环 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s,40 个循环。

6.4.5 结果观察

试验检测结束后,根据收集的荧光曲线和 C_t 值判定结果。

6.4.6 结果判定

阳性对照品 C_t 值 ≤ 35 且扩增曲线有明显对数增长期,同时阴性对照扩增曲线无对数增长期的情况下,试验成立。检测样品的 C_t 值 ≤ 35 ,且出现标准的 S 形扩增曲线,判为阳性,即样品中存在 RHDV1 或/和 RHDV2 核酸;无 C_t 值或 C_t 值 > 38 ,且无标准扩增曲线,判为阴性,即样品中不存在 RHDV1 或/和 RHDV2 核酸。当检测样品 $35 < C_t$ 值 ≤ 38 ,且扩增曲线均呈标准的 S 形曲线,判为可疑,需进行一次重复实验,如重复后仍然为上述结果,判为阳性;如 C_t 值 ≤ 35 ,判为阳性;如 C_t 值 > 38 ,判为阴性。

7 综合判定

7.1 疑似 RHDV 感染引起的 RHD

符合 5.1、5.2、5.3,且 6.2 病原样品 HA 试验阳性,判定为疑似兔出血症;可根据 6.2 病原样品 HI 试验进一步分型,HI 试验为疑似 RHDV1 阳性的判定为疑似兔出血症 1 型,HI 试验为疑似 RHDV2 阳性的判定为疑似兔出血症 2 型。

7.2 确诊 RHDV 感染引起的 RHD

7.2.1 符合 7.1,且 6.3 或 6.4 试验结果为 RHDV1 核酸阳性,判定为兔出血症 1 型。

7.2.2 符合 7.1,且 6.3 或 6.4 试验结果为 RHDV2 核酸阳性,判定为兔出血症 2 型。

7.2.2 符合 7.1,且 6.3 或 6.4 试验结果为 RHDV1 和 RHDV2 核酸阳性,判定为 RHDV1、RHDV2 混合感染的兔出血症。

附 录 A
(规范性)
试剂的配制

A.1 核酸电泳缓冲液(TAE)

A.1.1 50×TAE 储存液:分别称量 $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 37.2 g、冰醋酸 57.1 mL、Tris · Base 242 g,加灭菌双蒸水定容至 1 000 mL。或商品化的试剂。

A.1.2 1×TAE 溶液:取 10 mL 储存液加 490 mL 蒸馏水即可。

A.2 1.2% 琼脂糖凝胶

将 1.2 g 琼脂糖干粉加到 100 mL TAE 溶液中,沸水浴或微波炉加热至琼脂糖熔化,待凝胶稍冷却后加入溴化乙锭,终浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

A.3 PBS 溶液(0.01 mol/L PBS,pH 7.0~7.2)

分别量取 KH_2PO_4 0.24 g、 Na_2HPO_4 1.44 g、NaCl 8.0 g、KCl 0.2 g,加灭菌双蒸水定容至 1 000 mL,调节 pH 至 7.0~7.2,2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。或商品化的试剂。

A.4 人“B”型或“O”型红细胞悬液的制备

取人“B”型或“O”型红细胞以 20 倍量 PBS(0.01 mol/L,pH 7.0~7.2)混匀洗涤红细胞,以 2 000 r/min 离心 5min,弃上清液,重复洗涤 4 次。最后,将沉积的红细胞用 PBS 配成 1%和 20%(体积分数)的红细胞悬液,置于 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 条件下备用。

A.5 25% 高岭土悬液

取高岭土粉末 25 g,加入按 A.3 配置的 PBS 溶液,定容至 100 mL,2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存。使用前摇匀。

A.6 DEPC 水

将 DEPC 加入去离子水中至终浓度为 0.1%,充分混匀后作用 12 h,分装,121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 30 min,冷却后置于 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 条件下备用。

附 录 B

(资料性)

血清非特异性凝集因子和非特异性抑制因子的处理方法

B.1 血清非特异性凝集因子的处理

兔血清会对人红细胞产生非特异性凝集,可用人红细胞对待检血清进行吸附。具体方法:取 100 μL 血清,56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴灭活 30 min,加入 100 μL 20% 人“B”型红细胞悬液,振荡混匀,2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h 后(其间振荡混匀 3 次),以 2 000 r/min 离心 5 min(2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$),收集上清液。

B.2 血清非特异性抑制因子的处理

利用高岭土处理血清中的非特异性抑制因子。具体方法:将按 B.1 处理的兔血清加入 200 μL 25% 高岭土的沉淀中,振荡混匀,20 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h 后(其间振荡混匀 3 次),以 8 000 r/min 离心 5 min,收集的上清液即为 1:2 稀释的血清。

附 录 C
(资料性)
RT-PCR 试验用引物

C.1 引物

vp60 基因扩增引物序列如表 C.1 所列。

表 C.1 *vp60* 基因扩增引物序列

检测目的	引物序列(5'-3')	扩增大小, bp
<i>RHDV1-vp60</i> 基因	上游引物: TATTCTGGGAACAACCTCCAC	347
	下游引物: AACAGTCCGGTTGGATTTTG	
<i>RHDV2-vp60</i> 基因	上游引物: CCCTGGAAGCAGTTCGTCAAAC	748
	下游引物: GATGTCAACAAGGTCTGACAG	

C.2 兔出血症病毒 1 型中国 WF/2007 株 PCR 扩增 *vp60* 基因靶序列

TATTCTGGGAACAACCTCCACCAACGTGCTTCAGTTTTGGTACGCTAATGCTGGGTCTGCG
ATTGACAACCCTATCTCCAGGTTGCACCAGACGGCTTCCCTGACATGTCATTCGTGCCCTTT
AACAGCCCCAACATTCCGACCGCGGGGTGGGTTCGGGTTTGGTGGTATTTGGAACAGTAACAA
CGGTGCCCCCGCTGCTACAACGTGTCAGGCCTATGAGTTAGGTTTTGCCACTGGGGCACCAAA
CAGCCTCCAGCCCACCACCAACACTTCAGGTGCACAGACTGTCGCTAAGTCCATTTATGCCGT
GGTAACCGGCACAAACCAAAATCCAACCGGACTGTT(347 bp)

C.3 兔出血症病毒 2 型中国 SC2020/04 株 PCR 扩增 *vp60* 基因靶序列

CCCTGGAAGCAGTTCGTCAAACGTGCTTGAGCTTTGGTATGCTAGTGCCGGGTCTGCAGC
TGACAACCCCATCTCCCAAATTGCTCCAGATGGTTTTCCCTGACATGTCATTTGTACCCTTCAG
CGGTATCACCATCCCTACCGCAGGGTGGGTTCGGGTTTCGGTGGGATCTGGAACAGCAGTAATGG
TGCCCCCTACGTCACGACCATGCAGGCTTATGAGTTGGGTTTTGCCACTGGAGTACCGAGCAA
CCCCAACCCACCACCACCACTTCAGGGGCTCAGATTGTTGCCAAGTCCATCTATGGCGTTGCA
AATGGCATAAACCAGACAACAGCCGGGTTGTTTGTGATGGCATCTGGTGTCATATCCACTCCA
AACAGCAGTGCCACTACGTACACACCTCAGCCAAACAGGATTGTTAACGCACCTGGCACCCCT
GCTGCTGCCCTATTGGCAAGAACACACCCATCATGTTTCGCGTCTGTTGTTAGGCGCACCGGC
GACATCAACGCTGAGGCCGTTCAACTAACGGAACCCAGTACGGCGCGGGATCACAACCGCTG
CCGGTGACAATTGGACTTTCCTGAACAATTATTCATCGGCACTTATGCCTGGGCAGTTCTTC
GTTTGGCAGCTAAACTTTGCTTCCGGCTTCATGGAACCTGGCTTGAGTGTTGATGGATA CTTC
TACGCGGGAACAGGGGCTTCAGCCACCCTCATGACCTGTCAGACCTTGTTGACATC(748 bp)

附 录 D
(资料性)
RT-PCR 反应液配制

D.1 反转录反应液

反转录反应液的配方见表 D.1。

表 D.1 反转录反应液配方

组分	1 个检测体系的加入量, μL
Anchored Oligo(dT)18 Primer(0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	1
2 \times TS Reaction Mix	10
TransScriptRT/RI Enzyme Mix	1
gDNA Remover	1
RNase-free Water	2
RNA 模板	5

D.2 PCR 反应液

PCR 反应液的配方见表 D.2。

表 D.2 PCR 反应液配方

组分	1 个检测体系的加入量, μL
2 \times Rapid Taq Master Mix	20
RHDV1 上游引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)	1
RHDV1 下游引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)	1
RHDV2 上游引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)	1
RHDV2 下游引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)	1
反转录产物	1

附录 E
(资料性)

实时荧光定量 RT-PCR 引物及反应液

E.1 引物和探针

vp60 基因扩增引物和探针序列见表 E.1。

表 E.1 *vp60* 基因扩增引物和探针序列

检测目的	引物序列(5'-3')	扩增大小, bp
<i>RHDV-vp60</i> 基因	上游引物:CGGTTTGCCGMCATTG	78
	下游引物:CCTAAARCTSAAGCAGTTKG	
	RHDV1 探针:VIC-AGTGCAAGTTATTCTGGSAACTC-BHQ1	
	RHDV2 探针:FAM-AACGCAAGTTCCCTGGAAGCAGTTC-BHQ1	

E.2 兔出血症病毒 1 型中国 WF/2007 株 PCR 扩增 *vp60* 基因靶序列

CGGTTTGCCGACATTGACCATCGAAGAGGCAGTGCAAGTTATTCTGGGAACAACCTCCAC
CAACGTGCTTCAGTTTTGG(78 bp)

E.3 兔出血症病毒 2 型中国 SC2020/04 株 PCR 扩增 *vp60* 基因靶序列

CGGTTTGCCGCCATTGACCACGACAGAGGCAACGCAAGTTTCCCTGGAAGCAGTTCGTCA
AACGTGCTTGAGCTTTGG(78 bp)

E.4 实时荧光 RT-PCR 反应液

实时荧光 RT-PCR 反应液的配方见表 E.2。

表 E.2 实时荧光 RT-PCR 反应液配方

组分	1 个检测体系的加入量, μL
2×One Step RT-PCR Buffer III	10
TaKaRa Ex Taq HS (5 U/ μL)	0.4
PrimeScript RT Enzyme Mix II	0.4
上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.6
下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.6
ROX Reference Dye II (50×)	0.4
RHDV1 荧光探针(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.8
RHDV2 荧光探针(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.8
RNA 产物	2
灭菌水	4

注:无需 ROX 的荧光定量 PCR 检测仪,反应液中以灭菌水替代 ROX。