

### 猪德尔塔冠状病毒和猪流行性腹泻病毒双 重荧光 RT-PCR 检测方法

Dual real-time RT-PCR method for detection of porcine deltacoronavirus  
and porcine epidemic diarrhea virus

(报批稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

浙江省市场监督管理局 发布



## 前 言

本标准按照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。请注意本标准的某些内容可能涉及专利。本标准的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由浙江省农业农村厅提出。

本标准由浙江省畜牧兽医和饲料标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:浙江大学、浙江省动物疫病预防控制中心。

本标准主要起草人:赵灵燕、冯肖肖、吴贇竝、李肖梁、方维焕、单颖、谢荣辉、徐计东、毕淑珍、刘爱军、吴雪军、黄晓兵、周蕾、章杭建。



# 猪德尔塔冠状病毒和猪流行性腹泻病毒双重荧光 RT-PCR 检测方法

## 1 范围

本标准规定了猪德尔塔冠状病毒和猪流行性腹泻病毒双重荧光RT-PCR检测方法的术语和定义、缩略语、仪器、耗材和试剂、样品采集和处理、荧光RT-PCR操作程序、结果判定及生物安全措施。

本标准适用于猪德尔塔冠状病毒和猪流行性腹泻病毒的核酸检测。

## 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标准必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本标准；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

- 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
- NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范
- NY/T 1948 兽医实验室生物安全要求通则
- SN/T 4835 实验室生物废弃物管理要求

## 3 术语与定义

下列术语和定义适用于本标准。

### 3.1

#### RT-PCR

反转录聚合酶链式反应（reverse transcription-polymerase chain reaction），将 RNA 的反转录 (RT) 和 cDNA 的聚合酶链式扩增 (PCR) 相结合的技术。

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

$\beta$ -Actin: 肌动蛋白，是细胞的一种重要骨架蛋白，其在不同物种之间高度保守，是PCR常用的内部参照。

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

DEPC: 焦磷酸二乙酯（diethylpyocarbonate）。

DNA酶: 脱氧核糖核酸酶（deoxyribonuclease）。

PBS: 磷酸盐缓冲液（phosphate buffered solution）。

PDCoV: 猪德尔塔冠状病毒（porcine deltacoronavirus）。

PEDV: 猪流行性腹泻病毒（porcine epidemic diarrhea virus）。

RNA: 核糖核酸 (ribonucleic acid)。

RNA酶: 核糖核酸酶 (ribonuclease)。

RT-Enzyme Solution: 反转录酶溶液 (reverse transcription enzyme solution)。

Taq酶: Taq DNA聚合酶 (Taq DNA polymerase)。

Taqman探针: 一种检测寡核苷酸的荧光探针。

TE缓冲液: Tris-EDTA缓冲液 (tris-EDTA buffer)。

## 5 仪器

- 5.1 荧光 PCR 检测仪。
- 5.2 高速台式冷冻离心机: 可控温至 4 °C、离心速度可达 12 000 r/min 以上。
- 5.3 组织研磨器或者研钵。
- 5.4 分析天平。
- 5.5 生物安全柜。
- 5.6 冰箱: 可控温在 2 °C~8 °C 和 -20 °C~-40 °C。
- 5.7 超低温冰箱: 可控温至 -70 °C 以下。
- 5.8 微量移液器: 2 μL、10 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL, 并配备与移液器匹配的吸头。
- 5.9 高压灭菌锅和干燥箱: 可控温至 160 °C。

## 6 耗材和试剂

- 6.1 无 RNA 酶的 1.5 mL 离心管。
- 6.2 无 RNA 酶的 0.2 mL PCR 管或八联管及各种规格吸头。
- 6.3 除非另有说明, 在检测中使用的试剂均为分析纯, 实验室用水应符合 GB/T 6682 的要求。
- 6.4 Trizol: 商品化 RNA 抽提试剂, 2 °C~8 °C 保存。
- 6.5 RNA 提取试剂盒: 商品化 RNA 病毒核酸提取试剂盒。
- 6.6 氯仿和异丙醇: -20 °C 预冷。
- 6.7 75%乙醇: 无水乙醇和双蒸水配制, -20 °C 预冷。
- 6.8 DEPC 水: 参照附录 A 配制, 也可购买商品化 DEPC 水。
- 6.9 PBS (0.01 mol/L, pH 7.2): 参照附录 A 配制, 也可购买商品化 PBS。
- 6.10 引物和 TaqMan 探针: 其序列见附录 B, 由生物公司合成, 用 TE 溶液溶解并稀释至 100 μmol/L 存储液, -20 °C 保存备用; 根据需要配制成 10 μmol/L 工作液, -20 °C 保存供检测使用。
- 6.11 病毒阳性对照和阴性对照: 猪德尔塔冠状病毒阳性对照样品和猪流行性腹泻阳性对照样品分别为携带检测靶序列的质粒 (质粒及其检测靶序列见附录 C), 阴性对照样品为空质粒。
- 6.12 内参对照阳性对照样品和阴性对照样品: 内参对照阳性对照样品为带有猪 β-actin 基因的质粒; 内参对照阴性对照样品为空质粒。

## 7 样品采集和处理

### 7.1 采样工具

- 7.1.1 手术刀、剪刀、镊子, 经 121 °C 湿热灭菌 30 min。
- 7.1.2 一次性无菌采样拭子和采样管。

7.1.3 组织研磨器或者研钵，经160 °C干热灭菌2 h。

## 7.2 样品采集

### 7.2.1 粪便或肠内容物采集

将一次性无菌采样拭子用无菌PBS浸湿后，蘸取粪便或肠内容物（不少于0.5 g），置于无菌采样管中备用。

### 7.2.2 肛拭子采集

大猪使用保定器保定，小猪可以双手保定，将一次性无菌采样拭子用无菌PBS浸湿后，探入直肠2 cm~3 cm、旋转3次~5次后，取出含有直肠内容物肛拭子，置于无菌采样管中备用。

### 7.2.3 组织样品采集

用7.1.1处理过的器械，取肠道组织（不少于5 g），置于无菌采样管中备用。

## 7.3 样品保存和运输

上述采集的样品宜立即进行检测。不能立即检测的样品，在2 °C~8 °C条件下保存不应超过24 h，-25 °C~-15 °C条件下保存应不超过1个月，-70 °C以下条件保存应不超过6个月。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。

## 7.4 样品处理

### 7.4.1 粪便或肠内容物

取0.5 g~2.0 g粪便或肠溶物加入500 μL无菌PBS，冻融1次~2次，充分涡旋震荡1 min，于4 °C下以3 000 r/min转速离心5 min，取上清装于1.5 mL灭菌管，用于后续的核酸提取。

### 7.4.2 肛拭子

肛拭子采样管中加入500 μL无菌PBS，冻融1次~2次，充分涡旋震荡1 min，于4 °C下以3 000 r/min转速离心5 min，取上清装于1.5 mL灭菌管，用于后续的核酸提取。

### 7.4.3 组织样品

取1.0 g~2.0 g组织，剪碎，加入1 mL无菌PBS进行研磨，制备组织匀浆，冻融1次~2次，于4 °C下以8 000 r/min转速离心5 min，取上清装于1.5 mL灭菌管，用于后续的核酸提取。

## 8 荧光 RT-PCR 操作程序

### 8.1 RNA 提取

8.1.1 按下列步骤完成RNA提取，并用无RNA酶活性的DNA酶处理，也可采用商品化的病毒RNA提取试剂盒。

8.1.2 取n个灭菌的1.5 mL离心管（n为待检样品数），对每个离心管进行编号。

8.1.3 每管加入750 μL Trizol，加入被检样品250 μL，用力上下反复颠倒数次或涡旋振荡30 s，静置5 min。再加入200 μL预冷的氯仿，震荡混匀，静置5 min，于4 °C条件下以12 000 r/min转速离心15 min。

8.1.4 取与8.1.2中相同数量的灭菌1.5 mL离心管，并对每个离心管进行编号。取8.1.3中离心后的上清液（注意不要吸出中间层）转移至相应的管中，加入等体积预冷异丙醇，混匀，静置30 min。

8.1.5 于4℃条件下以12 000 r/min转速离心15 min，弃上清，缓缓加入1 mL 75%预冷乙醇，颠倒洗涤沉淀及管壁。

8.1.6 于4℃条件下以12 000 r/min转速离心10 min，弃上清，室温条件下干燥后，加入30.0 μL DEPC处理水，轻轻混匀，溶解管中的RNA，以4 000 r/min转速离心10 s，置于冰上保存备用。提取的RNA应在2 h内进行荧光RT-PCR扩增，若需长期保存，应置于-70℃以下条件的冰箱保存。

## 8.2 荧光 RT-PCR 反应

### 8.2.1 反应体系的配制

在试剂配制区分别配制病毒检测反应体系和内参对照检测反应体系。病毒检测反应管数为n+3（n为待检样品数，包括1份PEDV阳性对照、1份PDCoV阳性对照和1份阴性对照），反应体系组成见下表1。内参对照检测反应管数为n+2（n为待检样品数，包括1份内参对照阳性对照和1份内参对照阴性对照），反应体系组成见下表2。各反应液体积宜按多1管进行配制，且在使用RT-Enzyme Solution时至少用1 μL。配制反应液应在冰盒中进行。

表1 PDCoV 和 PEDV 双重荧光 RT-PCR 反应体系

组 分	1个检测反应的加入量/μL
2×RT-PCR Reaction Mix	10.0
200×RT-Enzyme Solution	0.1
PDCoV上游引物（PDVF）	0.4
PDCoV下游引物（PDVR）	0.4
PDCoV探 针（PDVP）	0.1
PEDV上游引物（PEDVF）	0.4
PEDV下游引物（PEDVR）	0.4
PEDV探 针（PEDVP）	0.1
DEPC处理水	3.1
合计	15.0

表2 内参对照荧光 RT-PCR 反应体系

组 分	1个检测反应的加入量/μL
2×RT-PCR Reaction Mix	10.0
200×RT-Enzyme Solution	0.1
上游引物（ACTF）	0.4
下游引物（ACTR）	0.4
探 针（ACTP）	0.1
DEPC处理水	4.0
合计	15.0

### 8.2.2 反应液的分装



将8.2.1中配制的荧光RT-PCR反应液充分混匀，按照每管15.0 μL分装于无RNA酶的0.2 mL PCR管内，将PCR管置于96孔板上，按顺序加样并做好标识，转移至核酸提取区。

### 8.2.3 加样

在核酸提取区进行。按照阴性、样品RNA溶液或阳性对照的顺序加入各5.0 μL溶液，盖上盖子，轻微震荡混匀，以500 r/min~1 000 r/min转速离心30 s，转移至检测区。

### 8.2.4 上机检测

#### 8.2.4.1 荧光通道设置

在检测区进行。将8.2.3中离心后的PCR管放入荧光PCR检测仪中，设定荧光检测通道。其中，PDCoV检测通道为FAM，PEDV检测通道为Cy3；内参对照检测通道为FAM。

#### 8.2.4.2 循环条件设置与检测

反应条件为：50℃反转录10 min；95℃预变性30 s；然后95℃变性5 s，60℃退火40 s，共循环45次，每次在60℃40 s时收集荧光信号；最后40℃复性30 s。检测结束后，保存结果，根据收集的荧光曲线和Ct值判定结果。

## 9 结果判定

### 9.1 阈值设定

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产品扩增曲线的最高点为准。

### 9.2 成立条件

9.2.1 PDCoV 阴性对照：FAM 通道无报告 Ct 值或无典型的 S 型扩增曲线。PEDV 阴性对照：Cy3 通道无报告 Ct 值或无典型的 S 型扩增曲线。

9.2.2 PDCoV 阳性对照：FAM 通道 Ct 值 $\leq$ 30，且扩增曲线为典型的 S 型。PEDV 阳性对照：Cy3 通道 Ct 值 $\leq$ 30，且扩增曲线为典型的 S 型。

9.2.3 内参对照阴性对照：FAM 通道无报告 Ct 值或无典型的 S 型扩增曲线。

9.2.4 内参对照阳性对照：FAM 通道 Ct 值 $\leq$ 30，且扩增曲线为典型的 S 型。

9.2.5 内参对照检测：FAM 通道 Ct 值 $\leq$ 33，且扩增曲线为典型的 S 型。

9.2.6 检测结果判定需同时满足 9.2.1~9.2.5。否则，本次检测无效，应重新进行。

### 9.3 结果判定

9.3.1 被检样品检测结果中FAM通道Ct值 $<$ 35，且出现典型扩增曲线，报告为PDCoV核酸阳性。被检样品检测结果中Cy3通道Ct值 $<$ 30，且出现典型扩增曲线，报告为PEDV核酸阳性。

9.3.2 被检样品检测结果中FAM通道 $35\leq$ Ct值 $\leq$ 37，且出现典型扩增曲线，报告为可疑，应重复试验。重复试验结果仍为可疑，报告为PDCoV核酸阳性，否则报告为PDCoV核酸阴性。被检样品检测结果中Cy3通道 $30\leq$ Ct值 $\leq$ 32，且出现典型扩增曲线，报告为可疑，应重复试验。重复试验结果仍为可疑，报告为PEDV核酸阳性，否则报告为PEDV核酸阴性。

9.3.3 被检样品检测结果中FAM通道Ct值 $>$ 37，且无典型扩增曲线，报告为PDCoV核酸阴性。被检样品检测结果中Cy3通道Ct值 $>$ 32，且无典型扩增曲线，报告为PEDV核酸阴性。

## 10 生物安全措施

本标准中样品的采集、处理、保存、运输、检测和废弃物处理等涉及到的生物安全措施应按照GB 19489、NY/T 541、NY/T 1948、SN/T 4835等要求进行。

附 录 A  
(资料性)  
溶液配制

A.1 DEPC 水

每升去离子水中加入 1 mL DEPC，充分混匀，37 °C 放置 12 h 以上，再经 121 °C 高压灭菌 15 min 后备用。

A.2 PBS (0.01 mol/L, pH 7.2)

用 800 mL 蒸馏水溶解 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>。用 HCl 调节溶液 pH 至 7.2，加水至 1 L。分装后经 121 °C 高压灭菌 15 min 后备用。

附 录 B  
(规范性)  
引物和探针

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

检测靶标	名 称	序 列
PDCoV	上游引物 (PDVF)	5' -CGACCACATGGCTCCAATTC-3'
	下游引物 (PDVR)	5' -CAGCTCTTGCCCATGTAGCTT-3'
	探 针 (PDVP)	5' -FAM-CACACCAGTCGTTAAGCATGGCAAGC-ZEN-3'
PEDV	上游引物 (PEDVF)	5' -CGCAAAGACTGAACCCACTAACCT-3'
	下游引物 (PEDVR)	5' -TTGCCTCTGTTGTTACTTGGAGAT-3'
	探 针 (PEDVP)	5' -Cy3 - TGTTGCCATTACCAGACTCCTGC-BHQ2-3'
内参对照	上游引物 (ACTF)	5' -CTCGATCATGAAGTGCACGT -3'
	下游引物 (ACTR)	5' -GTGATCTCCTTCTGCATCCTGTC -3'
	探 针 (ACTP)	5' -FAM-ATCAGGAAGACCTCTACGCCAACACGG -TAMRA-3'

附录 C  
(规范性)  
质粒及其检测靶序列

### C.1 质粒

#### C.1.1 质粒基因组图谱

对样品使用的质粒基因组图谱见图C.1。

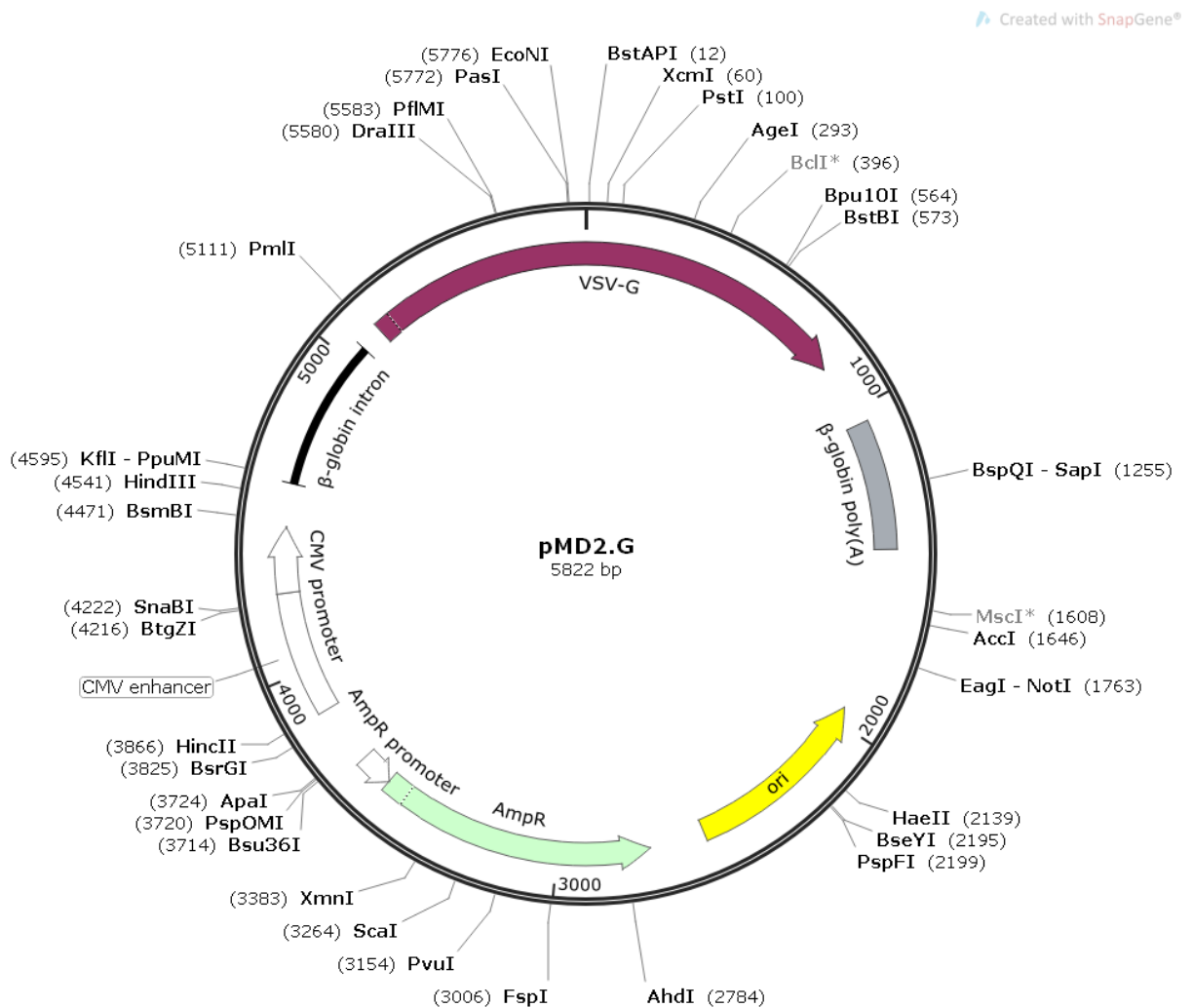


图 C.1 质粒基因组图谱

#### C.1.2 质粒序列

TGGAGGCAAGGCCTGCAAAATGCAATACTGCAAGCATTGGGGAGTCAGACTCCCATCAGGTGTCTGGTTCGAGATGGCTGATAA  
GGATCTCTTTGCTGCAGCCAGATTCCCTGAATGCCAGAAGGGTCAAGTATCTCTGCTCCATCTCAGACCTCAGTGGATGTAAGTCTA  
ATTCAGGACGTTGAGAGGATCTTGATTATTCCTCTGCCAAGAAACCTGGAGCAAAATCAGAGCGGGTCTTCCAATCTCTCCAGTGG

ATCTCAGCTATCTTGCTCCTAAAAACCCAGGAACCGGTCTGCTTTCACCATAATCAATGGTACCCTAAAAATACTTTGAGACCAGATA  
CATCAGAGTCGATATTGCTGCTCCAATCCTCTCAAGAATGGTCGGAATGATCAGTGGAACTACCACAGAAAGGGAAGTGTGGGATGAC  
TGGGCACCATATGAAGACGTGAAATTTGGACCCAATGGAGTTCTGAGGACCAGTTCAGGATATAAGTTTCCTTTATACATGATTGGAC  
ATGGTATGTTGGACTCCGATCTTCATCTTAGCTCAAAGGCTCAGGTGTTCGAACATCCTCACATTCAAGACGCTGCTTCGCAACTTCC  
TGATGATGAGAGTTTATTTTTTGGTGATACTGGGCTATCCAAAAATCCAATCGAGCTTGTAAGGTTGGTTTCAGTAGTTGAAAAAGC  
TCTATTGCCCTCTTTTTCTTTATCATAGGGTTAATCATTGGACTATTCTTGGTTCTCCGAGTTGGTATCCATCTTTGCATTAATTA  
AGCACACCAAGAAAAGACAGATTTATACAGACATAGAGATGAACCGACTTGAAAGTAACTCAAATCCTGCACAACAGATTCTTCATG  
TTTGGACCAAATCAACTTGTGATACCATGCTCAAAGAGGCCTCAATTATATTTGAGTTTTAATTTTTATGAAAAAAAAAAAAAAAA  
CGGAATTCACCCACCAGTGCAGGCTGCCTATCAGAAAGTGGTGGCTGGTGTGGCTAATGCCCTGGCCCAAGTATCACTAAGCTCG  
CTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAGGTTCCCTTTGTTCCCTAAGTCCAATACTAACTGGGGGATATTATGAAGGCTTGAGCA  
TCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACATTTATTTTCATTGCAATGATGATTTAAATTTTCTGAATATTTTACTAAAAAGGGAATGTG  
GGAGGTCAGTGCATTTAAACATAAAGAAATGAAGAGCTAGTCAAACCTTGGGAAAATACACTATATCTTAACTCCATGAAAGAAG  
GTGAGGCTGCAACAGCTAATGCACATTGGCAACAGCCCCTGATGCCTATGCCTTATTCATCCCTCAGAAAAGGATTCAAGTAGAGGC  
TTGATTTGGAGGTTAAAGTTTTGCTATGCTGTATTTACATTACTTATTGTTTTAGCTGTCTCATGAATGTCTTTTCACTACCCATT  
TGCTTATCCTGCATCTCTCAGCCTTGACTCCACTCAGTCTCTTGCTTAGAGATAACCACCTTTCCCCTGAAGTGTTCCTTCCATGTTT  
TACGGCGAGATGGTTTCTCCTCGCCTGGCCACTCAGCCTTAGTTGTCTGTGTCTTATAGAGGCTACTTGAAGAAGGAAAAACAG  
GGGCATGGTTTACTGTCTGTGAGCCCTTCTCCCTGCCTCCCCACTCACAGTGACCCGGAATCCCTCGACATGGCAGTCTAGCA  
CTAGTGGCGCGCAGATCTGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGTCACTCAAAG  
GCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAAGAACATGTGAGCAAAAAGCCAGCAAAAAGCCAGGAACCGTAAAA  
AGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAGAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCC  
GACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTG  
TCCGCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGC  
TGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTTCCAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGA  
CTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCT  
AACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTGTGTAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGAT  
CCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAGGATCTCAAGAAGATCC  
TTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTC  
ACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAA  
TCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGTTTATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTGTTAGATAACTACGATACGGGA  
GGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCAGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCC  
GGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTT  
CGCCAGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACAGCTCGTCTTGGTATGGCTTCATTACAGCTC  
CGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGCAGA  
AGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGTTTATGGCAGCACTGCATAATCTCTTACTGTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTG  
TGACTGGTGAAGTACTCAACCAAGTCAATCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATAC  
CGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGCTCATCATTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGA  
TCCAGTTCGATGTAACCACTCGTGCACCAACTGATCTTACAGCATCTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAA  
GGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACAGGAAATGTGAATACTACTACTTCTTTTTCAATATTTATGAAGCATTTA  
TCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTCCGCGCACATTTCCCCGAAAA  
GTGCCACCTGACGTGGATCCCCTGAGGGGGCCCCATGGGCTAGAGGATCCGGCCTCGGCCTCTGCATAAATAAAAAAATTAGTCAG  
CCATGAGCTTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGA  
CATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGGTTACATAACTTA  
CGGTAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGG

GACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCC  
 CCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCT  
 ACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTCC  
 AAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGGTGGCACC AAAATCAACGGGACTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCA  
 TTGACGCAAATGGGCGGTAGCGGTGACGGTGGGAGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCC  
 ATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGACCGATCCAGCCTCCCCTCGAAGCTTACATGTGGTACCGAGCTCGGATCCTG  
 AGAACTTCAGGGTGAGTCTATGGGACCCTTGATGTTTTCTTTCCCTTCTTTTCTATGGTAAAGTTCATGTATAGGAAGGGGAGAAG  
 TAACAGGGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAATTTGCAATTTGTAATTTTAAAAAATGCTTCTTCTTTAATACTTTTTTTGTT  
 TATCTTATTTCTAATACTTCCCTAATCTCTTTCTTTCCAGGGCAATAATGATACAATGTATCATGCCTCTTGCACCATTCTAAAGAA  
 TAACAGTGATAATTTCTGGGTAAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAAATATTTCTGCATATAAATTTGTAAGTATGTAAGAGGTT  
 TCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGTACCATTCTGCTTTTTATTTATGGTTGGGATAAAGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCT  
 AGGCCCTTTTGCTAATCATGTTTCATACCTCTTATCTTCTCCACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTCTGTGTGCTGGCCATCACTT  
 TGGCAAAGCACGTGAGATCTGAATTCTGACACTATGAAGTGCCTTTTGTACTTAGCCTTTTTATTTCATTGGGGTGAATTGCAAGTTCA  
 CCATAGTTTTTCCACACAACCAAAAAGGAAAAGTGGAAAAATGTTCTTCTAATTACCATTATTGCCCGTCAAGCTCAGATTTAAATTG  
 GCATAATGACTTAATAGGCACAGCCTTACAAGTCAAAATGCCCAAGAGTCACAAGGCTATTCAAGCAGACGGTTGGATGTGTCATGCT  
 TCCAAATGGGTCACTACTTGTGATTTCCGCTGGTATGGACCGAAGTATATAACACATTCCATCCGATCCTTCACTCCATCTGTAGAAC  
 AATGCAAGGAAAGCATTGAACAAACGAAACAAGGAACTTGGCTGAATCCAGGCTTCCCTCCTCAAAGTTGTGGATATGCAACTGTGAC  
 GGATGCCGAAGCAGTGATTGTCCAGGTGACTCCTCACCATGTGCTGGTTGATGAATACACAGGAGAATGGGTTGATTACAGTTCATC  
 AACGGAAAATGCAGCAATTACATATGCCCACTGTCCATAACTCTACAACCTGGCATTCTGACTATAAGGTCAAAGGGCTATGTGATT  
 CTAACCTCATTTCATGGACATCACCTTCTTCTCAGAGGACGGAGAGCTATCATCCCTGGGAAAAGGAGGGCACAGGGTTCAGAAGTAA  
 CTACTTTGCTTATGAAAC

## C.2 检测靶序列

### C.2.1 猪德尔塔冠状病毒阳性对照样品检测靶序列

CGACCACATGGCTCCAATTCTCACACCAGTCGTTAAGCATGGCAAGCTCAAGCTACATGGGCAAGAGCTG

### C.2.2 猪流行性腹泻阳性对照样品检测靶序列

CGCAAAGACTGAACCCACTAACCTGGGTGTCAGAAAGCGTCTGAAAAGCCAATCATTCCAAATTTCTCTCAACAGCTTCCCAG  
 CGTAGTTGAGATTGTTGAACCTAACACACCTCCTACTTCACGTGCAAACCTCACGTAGCAGGAGTCGTGGTAATGGCAACAACAGGTCC  
 AGATCTCCAAGTAACAACAGAGGCAA