

团 体 标 准

T/CVMA X1—2019

猫杯状病毒与猫疱疹病毒双重巢氏 RT-PCR 检测方法

Rapid Detection of Feline Calicivirus and Feline Herpesvirus

by Duplex Nested RT-PCR

(征求意见稿)

2019- xx-xx 发布

2019 - xx -xx 实施

中 国 兽 医 协 会 发 布

前 言

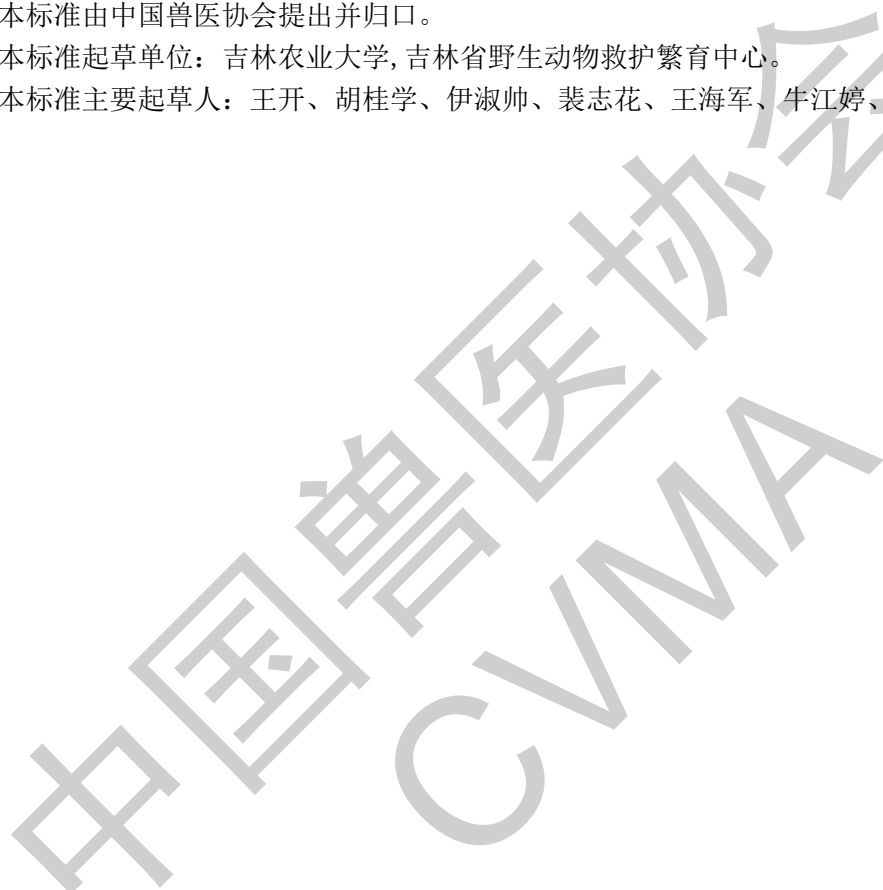
本标准按照 GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准不涉及专利。

本标准由中国兽医协会提出并归口。

本标准起草单位：吉林农业大学, 吉林省野生动物救护繁育中心。

本标准主要起草人：王开、胡桂学、伊淑帅、裴志花、王海军、牛江婷、董浩、赵艳丽。



猫杯状病毒与猫疱疹病毒双重巢氏 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了猫杯状病毒与猫疱疹病毒双重巢氏RT-PCR检测方法的缩略语、材料、操作步骤和结果判定。

本标准适用于猫、老虎等猫科动物的杯状病毒与疱疹病毒的实验室诊断。

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，仅所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。

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

RT-PCR：逆转录-聚合酶链反应（Reverse transcription-polymerase chain reaction）。

RNA：核糖核酸（Ribonucleic acid）。

cDNA：互补脱氧核糖核酸（complementary DNA）。

4 材料

4.1 仪器设备

- 4.1.1 分析天平，感量 0.1 mg。
- 4.1.2 高速冷冻离心机，12 000 r/min 以上。
- 4.1.3 高压蒸汽灭菌器。
- 4.1.4 干热箱。
- 4.1.5 恒温水浴锅，控温范围为室温至 100 ℃。
- 4.1.6 冰箱，-20 ℃。
- 4.1.7 PCR 扩增仪。
- 4.1.8 凝胶成像系统。

4.2 器械与耗材

- 4.2.1 医用棉签。
- 4.2.2 离心管，1.5 mL，15 mL，50 mL。
- 4.2.3 0.22μm 过滤器。
- 4.2.4 移液器，0.1-2.5μL，0.5-10μL，1-100μL，100-1000μL。
- 4.2.5 枪头，10 μL，200 μL，1 000 μL。

4.3 试剂

除有特殊说明外，所有实验用试剂均为分析纯，实验用水应符合GB/T 6682中一级水的要求。

4.3.1 RNA 提取试剂盒。

4.3.2 反转录试剂盒。

4.3.3 灭菌双蒸水。

4.4 引物

4.4.1 试验中所用引物见表 1。

表1 引物序列和片段大小

病毒	引物名称	引物序列	片段大小
猫杯状病毒	CaliAF	5'-CAACCTGCGCTAACGTGCTTA-3'	681bp
	CaliAR	5'-TTCCCCAAAAACYCCAGATC-3'	
	CaliBF	5'-CACTCAYGAGGCCATYGAC-3'	336bp
	CaliBR	5'-TTCCCTTGGGTTTCAGATGTGC-3'	
猫疱疹病毒	HerpAF	5'-AGATTTGCCGCACCATACCTTC-3'	513bp
	HerpAR	5'-CCGGGCTTTGAAAACACTGAAT-3'	
	HerpBF	5'-TTGCCGCACCATACCTTCTTTTA-3'	403bp
	HerpBR	5'-TTAAGCTTCCCCACCCATCA-3'	

5 操作步骤

5.1 采样器具前处理

5.1.1 医用棉签经 $121 \pm 2^\circ\text{C}$ 高压蒸汽灭菌 15 min。

5.1.2 离心管、枪头经 $121^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 高压蒸汽灭菌 15 min。

5.2 样品的采集和处理

采集宠物猫的口腔或鼻腔分泌物，加入样品 10% 体积的 PBS 稀释，过 $0.22\mu\text{m}$ 过滤器，收集滤液， 8000g 离心 10 min，取上清液待检。

5.3 RNA 提取

使用RNA提取试剂盒提取样品RNA后，利用反转录试剂盒进行反转录，以提取的cDNA为模板进行巢式PCR扩增，或置于 -20°C 冰箱备用。

5.4 反应体系

5.4.1 猫杯状病毒与猫疱疹病毒外侧引物双重 PCR 反应体系见表 2。

表 2 双重巢式 RT-PCR 第 1 轮反应体系

试剂名称	加入量
10×rTaq buffer	2.5 μL
dNTPs	7.5 mM
rTaq	3.0 U
CaliAF	10 pM
CaliAR	10 pM
HerpAF	10 pM
HerpAR	10 pM
cDNA模板	3 μl
双蒸水	19.5μl

5.4.2 猫杯状病毒与猫疱疹病毒内侧引物双重 PCR 反应体系见表 3。

表 3 双重巢式 RT-PCR 第 2 轮反应体系

试剂名称	加入量
10×rTaq buffer	2.5 μL
dNTPs	7.5 mM
rTaq	3.0 U
CaliBF	10 pM
CaliBR	10 pM
HerpBF	10 pM
HerpBR	10 pM
用外侧引物进行PCR的产物	2.0 μl
双蒸水	20.5μl

5.4.3 以去离子水 (DW) 为阴性对照, 以阳性对照 cDNA 为阳性对照。

5.5 反应程序

5.5.1 猫杯状病毒与猫疱疹病毒外侧引物和内测引物进行 PCR 反应条件见表 4。

表 4 双重巢式 RT-PCR 第 1 轮和第 2 轮反应条件

温度	时间
94 °C	5 min
94 °C	45 s
63 °C	45 s
72 °C	30 s
72 °C	10 min
共35个循环	

6 结果判定

6.1 结果分析条件设定

试验检测结束后，使用凝胶成像系统进行照像，可以通过目视对结果进行判定。若与阳性对照一样出现目的条带，则判定为阳性；若与阴性对照一样未出现目的条带，则判定为阴性。

中国兽医协会
CVMA