

# 团 体 标 准

T/CVMA X5—2020

## 猫冠状病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

Real-time RT-PCR for detection of feline coronavirus

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上

2020 - XX - XX 发布

2020 - XX - XX 实施

中 国 兽 医 协 会 发 布

## 前 言

本标准按 GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由中国兽医协会提出并归口。

本标准起草单位：上海市动物疫病预防控制中心、中国动物疫病预防控制中心。

本标准主要起草人：杨德全、鞠厚斌、赵洪进、王建、杨显超、刘林青、沈海潇、李鑫、葛菲菲、陶田谷晟。

中国兽医协会  
CVMA

## 猫冠状病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

### 1 范围

本标准规定了猫冠状病毒（FCoV）实时荧光 RT-PCR 检测的操作方法。

本标准适用于实验室对临床疑似猫冠状病毒（FCoV）感染猫腹水、肛拭子、粪便、血液、血清中猫冠状病毒核酸的快速检测。

### 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/T 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 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

荧光 RT-PCR 实时荧光反转录聚合酶链反应（real-time reverse transcript polymerase chain reaction）

BHQ1 无荧光淬灭基团（black hole quencher-1）

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

DEPC 焦碳酸二乙酯（diethyl pyrocarbonate）

FAM 羧基荧光素（carboxyfluorescein）

PBS 磷酸盐缓冲液（phosphate-buffered saline buffer）

RNA 核糖核酸（ribonucleic acid）

### 4 试剂和材料

#### 4.1 引物

上游引物：5' - GATTTGATTTGGCAATGCTAGATTT-3'

下游引物：5' - AACAACTACTAGATCCAGACGTTAGCT-3'

#### 4.2 探针

探针：5' -FAM-TCCATTGTTGGCTCGTCATAGCGGA-BHQ1-3'

#### 4.3 试剂

4.3.1 总则：除非另有说明，所用试剂均为分析纯，试验用水符合 GB/T 6682 的要求，所有试剂均用无 RNA 酶的容器分装。

4.3.2 TRIzol：2 °C~8 °C 保存。

4.3.3 氯仿：2 °C~8 °C 保存。

4.3.4 异丙醇：-20 °C 预冷。

4.3.5 DEPC 水：见附录 A 中 A.1。

4.3.6 75% 乙醇：用新开启的无水乙醇和 DEPC 水配制，-20 °C 预冷。

4.3.7 0.01 mol/L PBS 溶液（pH 7.2~pH 7.4）：见附录 A 中 A.2。

4.3.8 荧光 RT-PCR 反应液配方：见附录 B.1。

4.3.9 阳性对照为灭活的猫冠状病毒；阴性对照为已知猫冠状病毒阴性的猫鼻拭子悬液。

## 5 仪器设备

5.1.1 荧光 PCR 检测仪及配套反应管（板）。

5.1.2 高速冷冻离心机。

5.1.3 振荡器。

5.1.4 微量移液器（10 μL、20 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL）及配套吸头（无核酸酶）。

5.1.5 冰箱（2 °C~8 °C 和 -20 °C 两种）

5.1.6 1.5 mL 离心管（无核酸酶）和采血管。

## 6 样品的采集与前处理

### 6.1 总则

样品的采集、保存与运输按照 NY/T 541 执行。生物安全要求按照 GB 19489 的规定。

### 6.2 样品前处理

6.2.1 血清样品前处理：将采血管采集血液倾斜放置，待血清析出后直接吸取 200 μL 至 1.5 mL 灭菌离心管中。

6.2.2 拭子、粪便样品处理：将拭子或粪便在振荡器上充分混合，捻动、挤压干后弃去拭子。3000 r/min 离心 5 min，吸取上清 200 μL 于 1.5 mL 灭菌离心管中。

## 7 操作方法

## 7.1 样品核酸提取

- 7.1.1 在样本制备区进行，采取 TRIzol 裂解法提取；也可采用其他等效的 RNA 提取方法。
- 7.1.2 待检样品、阳性对照和阴性对照的份数总和用  $n$  表示，取  $n$  个灭菌 1.5 mL 离心管，逐管编号。
- 7.1.3 每管加入 600  $\mu$ L TRIzol。
- 7.1.4 每管对应编号分别加入 200  $\mu$ L 待检样品、阳性对照或阴性对照，混匀。
- 7.1.5 每管加入 200  $\mu$ L 氯仿，充分倒混匀。于 4  $^{\circ}$ C、12000 r/min 离心 15 min。
- 7.1.6 新取  $n$  个灭菌的 1.5 mL 离心管，逐管编号，每管加入 500  $\mu$ L 异丙醇(-20  $^{\circ}$ C 预冷)。
- 7.1.7 吸取本标准 7.1.5 各管中的上清液 500  $\mu$ L，转移至 7.1.6 相应的管中，避免吸出中间层，颠倒混匀。
- 7.1.8 于 4  $^{\circ}$ C、12000 r/min 离心 15 min，轻轻倒去上清，倒置于吸水纸上，沥干液体，不同样品应在吸水纸不同地方沥干。
- 7.1.9 每管加入 600  $\mu$ L 75% 乙醇(-20  $^{\circ}$ C 预冷)，颠倒洗涤。
- 7.1.10 于 4  $^{\circ}$ C、12000 r/min 离心 10 min，轻轻倒去上清，倒置于吸水纸上，沥干液体，不同样品应在吸水纸不同地方沥干。
- 7.1.11 4000 r/min 离心 10 s，将管壁上的残余液体甩到管底部，用微量移液器尽量将其吸干。注意一份样本换用一个吸头，吸头不要碰到有沉淀一面。
- 7.1.12 室温干燥 3 min。不宜过于干燥，以免 RNA 不溶。
- 7.1.13 每管加入 11  $\mu$ L DEPC 水，轻轻混匀，溶解管壁上的 RNA，2000 r/min 离心 5 s，获得 RNA 溶液，可直接用于检测或保存于-20  $^{\circ}$ C 备用。

## 7.2 扩增试剂的准备与配制

- 7.2.1 反应混合物配置区进行。
- 7.2.2 每个检测反应体系需要 22  $\mu$ L 荧光 RT-PCR 反应液。根据 7.1.2 中提到的  $n$  值，按表 B.1 配制反应液，充分混匀后分装，每个反应管 22  $\mu$ L。转移反应管至样本制备区。

## 7.3 加样

- 7.3.1 在样本制备区进行。
- 7.3.2 在上述 7.2.2 的反应管中分别加入 7.1.13 中制备的 RNA 溶液 3  $\mu$ L，使每管总体积达到 25  $\mu$ L，记录反应管对应的样品编号。盖紧管盖后，瞬时离心。

## 7.4 荧光 RT-PCR 反应

- 7.4.1 在检测区进行。
- 7.4.2 将 7.3.2 中加样后的反应管放入荧光 PCR 检测仪中，编辑样品表后，选定 FAM 作为报告基团，BHQ1 为淬灭基团，反应参数设置如下：42  $^{\circ}$ C 10 min，94  $^{\circ}$ C 15 min；95  $^{\circ}$ C 15 s，60  $^{\circ}$ C 45 s，在每个循环第二步（60  $^{\circ}$ C 45 s）收集荧光信号，共 40 个循环。

## 8 结果判定

### 8.1 结果分析条件设定

阈值设定原则：阈值线设定于刚好超过阴性对照扩增曲线的最高点。不同仪器可根据仪器噪音情况进行调整。

### 8.2 实验成立的条件

8.2.1 阴性对照无 Ct 值并且无特定扩增曲线。

8.2.2 阳性对照 Ct 值 $\leq 30$ ，并出现典型扩增曲线（参见附录 C）。

8.2.3 如阴性和阳性对照不满足以上条件，此次试验视为无效。

### 8.3 结果描述及判定

#### 8.3.1 阴性

无 Ct 值并且无扩增曲线，表示样品中无猫冠状病毒核酸。

#### 8.3.2 阳性

Ct 值 $\leq 30$ ，且出现典型的扩增曲线，表示样品中存在猫冠状病毒核酸。

#### 8.3.3 有效原则

Ct 值 $> 30$ ，且出现典型的扩增曲线的样品建议复检。复检仍出现上述结果的，判为阳性，否则判为阴性。

附 录 A  
(规范性附录)  
溶液配制

**A.1 DEPC水配方**

将 DEPC 加入去离子水（符合 GB/T6682 要求）中至终浓度为 0.1%（体积比），充分混合均匀后作用 12 h，分装，121 °C ± 2 °C 高压灭菌 30 min，冷却后冷藏备用。

**A.2 0.01 mol/L PBS溶液（pH 7.2~ pH 7.4）**

准确称量下面各试剂，加入到 800 mL 蒸馏水中溶解，调节溶液的 pH 至 7.2~7.4，加水定容至 1 L。分装后在 121 °C 灭菌 15 min~20 min，或过滤除菌，保存于室温。

氯化钠(NaCl)	8.00 g
氯化钾(KCl)	0.20 g
磷酸二氢钾(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.24 g
磷酸氢二钠(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O)	3.65 g
蒸馏水	加至 1000 mL

附 录 B  
(规范性附录)  
荧光 RT-PCR 反应液配方

B.1 荧光RT-PCR反应液配方

猫冠状病毒核酸荧光 RT-PCR 反应液配方见表 B.1。

表B.1 荧光 RT-PCR 反应液配方

组分	1个检测体系的加入量
2×One Step RT-PCR Buffer III	12.5 μL
5U/μL TaKaRa Ex Taq™ HS	0.5 μL
PrimeScript™ RT Enzyme Mix II	0.5 μL
上游引物 (10 pmol/μL)	1.8 μL
下游引物 (10 pmol/μL)	1.8 μL
探针 (10 pmol/μL)	0.6 μL
DEPC水	4.3μL
核酸	3.0μL

B.2 注意事项

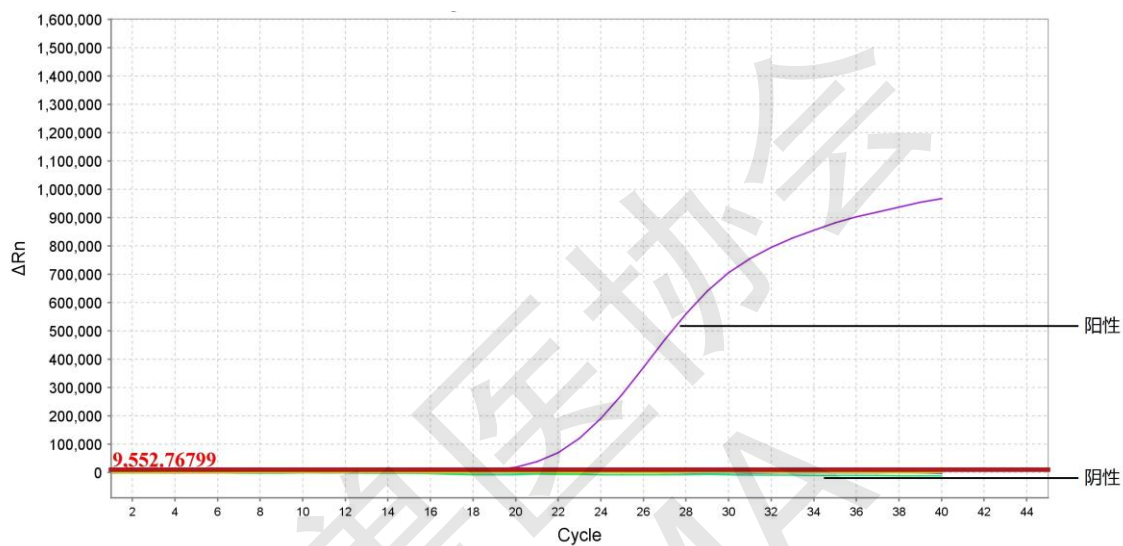
在检测过程中，应严防不同样品间的交叉污染。

反应液分装时应避免产生气泡，上机前检查各反应管是否盖紧，以免荧光物质泄漏污染仪器。



附录 C  
(资料性附录)  
典型扩增曲线示意图

猫冠状病毒荧光 RT-PCR 检测方法阳性和阴性典型扩增曲线见图 C.1。



图C.1 猫冠状病毒荧光 RT-PCR 典型扩增曲线示意图