

团 体 标 准

T/CVMA X18—2020

猫星状病毒 RT-PCR 检测方法

Detection of feline astrovirus by RT-PCR method

(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

XXXX - XX - XX 实施

中国兽医协会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2020 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：青岛农业大学（后面继续增加）。

本标准主要起草人：黄娟，单虎（后面继续增加）。

中国兽医协会
CVMA

猫星状病毒 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了猫星状病毒RT-PCR检测方法的缩略语、材料、操作步骤和结果判定。
本标准适用于猫的星状病毒的实验室诊断。

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)。

DNA: 脱氧核糖核酸 (DeoxyriboNucleic acid)。

cDNA: 互补脱氧核糖核酸 (complementary DNA)。

PBS: 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline)

4 材料

4.1 仪器设备

- 4.1.1 -20℃冰箱
- 4.1.2 高压蒸汽灭菌器
- 4.1.3 干热箱
- 4.1.4 恒温水浴锅
- 4.1.5 分析天平，感量 0.1mg
- 4.1.6 高速冷冻离心机，12 000r/min 以上
- 4.1.7 旋涡振荡器、
- 4.1.8 PCR 扩增仪
- 4.1.9 核酸电泳仪
- 4.1.10 凝胶成像系统

4.2 耗材与器械

- 4.2.1 1.5ml 离心管。
- 4.2.2 医用棉签

- 4.2.3 0.22 μ m 过滤器。
- 4.2.4 枪头, 10 μ L, 200 μ L, 1 000 μ L。
- 4.2.5 移液器, 0.1-2.5 μ L, 0.5-10 μ L, 1-100 μ L, 100-1000 μ L。

4.3 试剂

- 4.3.1 RNA 提取试剂盒。
- 4.3.2 反转录试剂盒。
- 4.3.3 Taq DNA 聚合酶。
- 4.3.4 灭菌双蒸水, 实验用水应符合 GB/T 6682 中一级水的要求。
- 4.3.5 PBS 缓冲液 (pH7.4, 含青霉素 100U/mL、链霉素 0.1mg/mL)。
- 4.3.6 琼脂糖 (分析纯)。
- 4.3.7 DNA 电泳缓冲液。
- 4.3.8 Goldview 核酸染料。

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

引物名称	引物序列5' --3'	片段大小
FeAstV-F	GAAATGGATTGGACACGYTAYGA	419bp
FeAstV-R	GGCTTGACCCACATRCCGAA	

5 操作步骤

5.1 采样器具前处理

- 5.1.1 离心管、枪头经 121 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C 高压蒸汽灭菌 15min。
- 5.1.2 医用棉签经 121 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C 高压蒸汽灭菌 15min。

5.2 样品的采集和处理

采集新鲜粪便; 或用灭菌棉拭子插入猫的直肠, 旋转3圈, 将肛门拭子放入含有适量青、链霉素的 PBS液 (pH7.4) 中, 漩涡振荡1 min后弃去棉拭子, 8000 r/min离心5min, 取上清液进行检测。

5.3 RNA 的提取

取离心好的上清液, 按照 RNA 提取试剂盒说明提取 RNA, 即用或冻存备用。

5.4 反转录

按照反转录试剂盒说明, 将提取的RNA反转录为cDNA, 所得到的cDNA放于-20 $^{\circ}$ C 保存备用或者直接用于之后的PCR反应。

5.5 PCR 反应

5.5.1 PCR 反应体系

- 5.5.1.1 猫星状病毒 PCR 反应体系见表 2。

表2 PCR反应体系

试剂名称	加入量
10×rTaq buffer	2.5 μL
dNTPs	7.5mM
rTaq	3U
FeAstV-F	10pM
FeAstV-R	10pM
cDNA模版	3 μL
双蒸水	19.5 μL

5.5.1.2 以灭菌双蒸水为阴性对照，以含扩增区域序列的质粒为阳性对照。

5.5.2 PCR反应程序

5.5.2.1 猫星状病毒 PCR 反应条件见表3。

表3 PCR反应程序

温度	时间
94℃	5min
94℃	30s
50℃	30s
72℃	45s
72℃	5min
共40个循环	

5.6 琼脂糖凝胶电泳

PCR反应完成后，取10μL PCR反应产物在2%琼脂糖凝胶上进行电泳，电泳完毕将凝胶置于使用凝胶成像系统中观察。

6 结果判定

6.1 结果分析条件设定

电泳结束后，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。