

团 体 标 准

T/CVMA X3—2020

猫杯状病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

Real-time RT-PCR for detection of feline calicivirus

（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、青岛农业大学、中国动物疫病预防控制中心。

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

中国兽医协会
CVMA

猫杯状病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了猫杯状病毒（FCV）实时荧光 RT-PCR 检测的缩略语、试剂和材料、仪器设备、样品的采集和前处理、操作方法和结果判定。

本标准适用于实验室对临床疑似猫杯状病毒（FCV）感染猫鼻拭子、肛拭子、粪便、血液、血清以及细胞培养物中猫杯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 引物和探针

下列两个引物和探针组合中，任一个都可以用于FCV的荧光定量PCR：

a) 正向引物：CCGTTAAYTCRGTGTTTGATTTG；反向引物：GGCTCTGATDGCTTGAAACTG；
TaqMan 探针：5' -FAM-CCTGGGCTCTTCGCCGTCACC-BHQ1-3'。

b) 正向引物：TGA ACTACCCGCCAATCAACA；反向引物：AAGAGCCCAGGCCAAATCAA；
TaqMan 探针：5' -FAM-CGTTAATTCCGGTGTGTTTGATTTGGC-BHQ1-3'。

4.2 试剂

4.2.1 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。

4.2.2 TRIzol：2 °C~8 °C 保存。

4.2.3 氯仿：2 °C~8 °C 保存。

4.2.4 异丙醇：-20 °C 预冷。

4.2.5 DEPC 水：见附录 A 中 A.1。

4.2.6 75% 乙醇：用新开启的无水乙醇和 DEPC 水配制，-20 °C 预冷。

4.2.7 0.01 mol/L PBS 溶液（pH 7.2~pH 7.4）：见附录 A 中 A.2。

4.2.8 荧光 RT-PCR 反应液配方：见附录 B.1。

4.2.9 阳性对照为灭活的猫杯状病毒；阴性对照为已知猫杯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。

6.2.3 细胞培养物样品处理：将细胞培养物以 4 °C 条件下，3000 r/min 离心 5 min，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 μ L TRIzol。

7.1.4 每管对应编号分别加入 200 μ L 待检样品、阳性对照或阴性对照，混匀。

7.1.5 每管加入 200 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ L，使每管总体积达到 25 μ 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 °C 10 min，94 °C 15 min；95 °C 15 s，60 °C 45 s，在每个循环第二步（60 °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 ≤ 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，表示样品中无猫杯状病毒核酸。

8.3.2 阳性

Ct 值 ≤ 35 ，且出现典型的扩增曲线，表示样品中存在猫杯状病毒核酸。

8.3.3 有效原则

Ct 值 > 35 ，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 ₂ PO ₄)	0.24 g
磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ 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

猫杯状病毒核酸荧光 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	12.5 μL
5U/μL TaKaRa Ex Taq™ HS	0.5μL
PrimeScript™ RT Enzyme Mix II	0.5μL
10μM 上游引物	0.5μL
10μM下游引物	0.5μL
10μM探针	1.0μL
核酸	3.0μL
ddH ₂ O	6.5μL

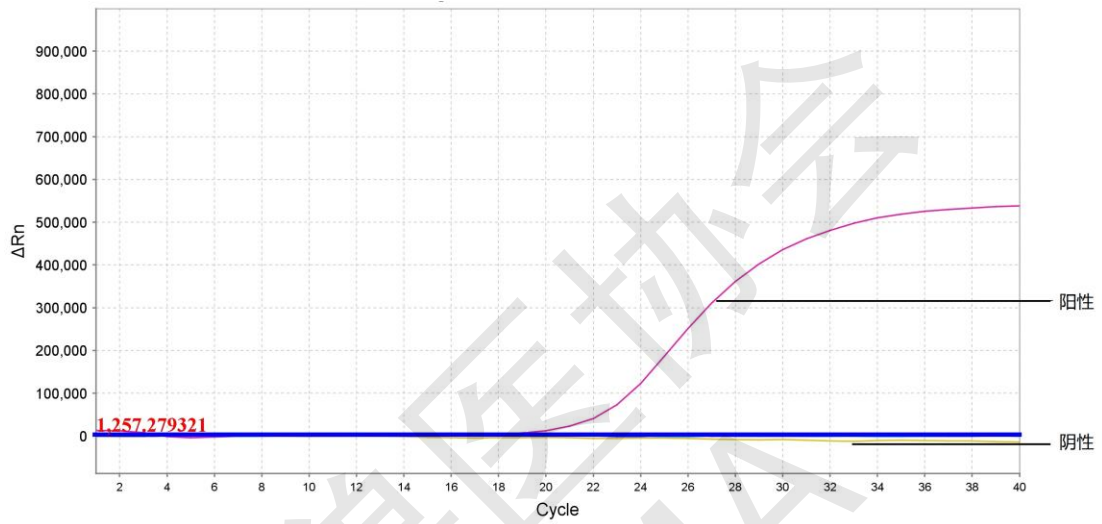
B.2 注意事项

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

猫杯状病毒荧光 RT-PCR 检测方法阳性和阴性典型扩增曲线见图 C.1。



图C.1 猫杯状病毒荧光 RT-PCR 典型扩增曲线示意图