ICS 11.220
B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA X17—2020

犬星状病毒 RT-PCR 检测方法

Detection of canine 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

中国兽医协会
CVMA

2020－XX－XX 发布　　2020－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

犬星状病毒 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了犬星状病毒RT-PCR检测方法的缩略语、材料、操作步骤和结果判定。

本标准适用于犬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 transcrition-polymerase chain reation）。

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

中国兽医协会 CVMA

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

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
CaAstV-F	GAGTTTGATTGGACCAGATTTGA	419bp
CaAstV-R	GGCTTAACCCACATTCCAAA	

5 操作步骤

5.1 采样器具前处理

5.1.1 离心管、枪头经 121℃±2℃高压蒸汽灭菌 15min。
5.1.2 医用棉签经 121℃±2℃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犬的直肠，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℃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 犬星状病毒 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	2.5μL
dNTPs	7.5mM
rTaq	3U
CaAstV-F	10pM
CaAstV-R	10pM
cDNA模版	3μL
双蒸水	19.5μL

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　犬星状病毒 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。

中国兽医协会 CVMA