

### 猫细小病毒 PCR 检测方法

PCR detection technique for feline panleukopenia virus

2020 - 06 - 30 发布

2020 - 07 - 30 实施

## 前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009的规定编写。

本标准由浙江省农业农村厅提出。

本标准由浙江省畜牧兽医和饲料标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：浙江省动物疫病预防控制中心。

本标准主要起草人：张红丽、徐 辉、赵灵燕、周彩琴、吴贇竑、黄 靖、吕见涛、刘爱军、刘 霞、吴雪军、孙冰冰、章杭建。

# 猫细小病毒 PCR 检测方法

## 1 范围

本标准规定了猫细小病毒PCR (polymerase chain reaction) 的实验条件、操作步骤、结果判定。本标准适用于猫细小病毒 (猫泛白细胞减少症病毒) 的检测。

## 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

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**猫细小病毒** Feline panleukopenia virus, FPLV

属细小病毒科, 细小病毒亚科, 牛犬细小病毒属成员, 又称猫泛白细胞减少症病毒、猫传染性胃肠炎病毒或猫瘟病毒。

## 4 实验条件

### 4.1 试剂

#### 4.1.1 要求

除另有规定外, 所用试剂为分析纯或生化试剂, 水为符合GB/T 6682要求的灭菌双蒸水或超纯水。

#### 4.1.2 试剂

4.1.2.1 核糖核酸酶 (20 mg/mL)。

4.1.2.2 10%十二烷基磺酸钠溶液。

4.1.2.3 10 mg/mL 蛋白酶 K。

4.1.2.4 Tris-盐酸饱和酚 (pH 7.6)。

4.1.2.5 酚-氯仿-异戊醇混合液 (25: 24: 1): 在一灭菌棕色瓶中按 25: 24: 1 比例分别加入酚、氯仿、异戊醇。

4.1.2.6 3 mol/L 乙酸钠 (pH 5.4)。

4.1.2.7 琼脂糖。

4.1.2.8 10 μg/μL 溴化乙锭 (ethidium bromide, EB): 溴化乙锭 20 mg、加灭菌双蒸水至 20 mL 充分溶解混匀而成。

4.1.2.9 50×TAE 缓冲液: 羟基甲基氨基甲烷 (Tris) 242 g、冰乙酸 57.1 mL、0.5 mol/L 乙二铵四乙酸二钠溶液 (pH 8.0) 100 mL, 加灭菌双蒸水至 1 000 mL 充分混匀。

4.1.2.10 加样缓冲液: 聚蔗糖 25 g、溴酚蓝 0.1 g、二甲苯青 0.1 g, 加灭菌双蒸水至 100 mL 充分溶解混匀而成。

4.1.2.11 2.5 mmol dNTPs (deoxyribonucleoside triphosphates, 脱氧核糖核苷三磷酸)。

4.1.2.12 10×PCR Buffer。

4.1.2.13 DNA 分子量标准: DL2000。

4.1.2.14 引物序列 FPLV-F: 5'—CCAGCTGAGGTTGGTTATAGTG—3'; FPLV-R: 5'—GGTGCATTACATGAAGTCTTGG—3'。

## 4.2 仪器设备

4.2.1 高速冷冻离心机: 要求最大离心力在 12 000×rpm 以上。

4.2.2 PCR 扩增仪。

4.2.3 核酸电泳仪和水平电泳槽。

4.2.4 微波炉。

4.2.5 分析天平。

4.2.6 恒温水浴锅。

4.2.7 冷藏冰箱和低温冷冻冰箱。

4.2.8 微量移液器。

4.2.9 凝胶成像系统 (或紫外透射仪)。

4.2.10 高压灭菌锅。

4.2.11 超净工作台或生物安全柜。

## 5 操作步骤

### 5.1 样品的采集和处理

5.1.1 采集动物粪便、肛拭子、全血或肠道等组织样品并进行处理:

- a) 肛拭子、粪便 (加适量 PBS) 等样品经 4 °C 5 000 rpm/min 离心 2 min, 取上清液;
- b) 全血样品待血凝后经 5 000 rpm/min 离心 2 min, 取血清;
- c) 取 0.1 g 肠道等样品与灭菌 PBS (全称、浓度) 按 1: 5 的重量体积比制成悬液, 匀浆后, 反复冻融 3 次, 在涡旋混合器上混匀后经 4 °C 5 000 rpm/min 离心 10 min, 取上清液。

5.1.2 制备的样品在 2 °C~8 °C 保存时间不应超过 24 h, 长期保存应分装成小管, 置于-20 °C 以下, 避免反复冻融。

### 5.2 DNA 的提取

5.2.1 设立阳性、阴性样品对照, 阳性对照为猫细小病毒阳性样品, 阴性对照为灭菌双蒸水。

5.2.2 按下列步骤完成 DNA 的提取, 也可选择市售商品化 DNA 提取试剂盒, 完成 DNA 的提取:

- a) 取 1.5 mL 灭菌离心管, 加入处理样品 5.1.1 上清液 400 μL 和 30 μL (20 mg/mL) 核糖核酸酶, 混匀后, 室温下作用 20 min;

- b) 加入 43  $\mu\text{L}$  10%的十二烷基磺酸钠溶液和 5  $\mu\text{L}$  蛋白酶 K, 42  $^{\circ}\text{C}$  水浴温育过夜 (或 55  $^{\circ}\text{C}$  30 min 以上);
- c) 加入等量的 Tris-盐酸饱和酚, 充分混匀, 12 000 rpm/min 离心 5 min, 小心吸出上层水相于新的 1.5 mL 灭菌离心管中;
- d) 加等量的酚-氯仿-异戊醇 (25: 24: 1), 充分混匀, 12 000 rpm/min 离心 5 min, 小心吸出上层水相至新的 1.5 mL 灭菌离心管中;
- e) 加 1/10 体积 3 mol/L 的乙酸钠 (pH 5.4), 2.5 倍体积预冷的无水乙醇 15 000 rpm/min 离心 20 min, 弃去乙醇, 75%的乙醇洗涤沉淀一次后真空干燥。用 20  $\mu\text{L}$  灭菌双蒸水溶解沉淀, -20

盖好电泳仪，插好电极，5 V/cm 电压电泳，30 min~45 min（指示试剂跑至 1/3 处）。

#### 5.4.4 结果观察

用紫外凝胶成像仪或者紫外透射仪观察扩增结果。

### 6 结果判定

在阳性对照出现 464 bp 的扩增带、阴性对照无目的条带的条件下，待检样品出现 464 bp 的扩增条带，则判定为样品阳性，否则判定为阴性。

---