ICS 11.220
B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA 44-2020

犬冠状病毒 RT-PCR 检测方法

Detection of canine coronavirus by RT-PCR

中国兽医协会
CVMA

2020-12-22 发布　　2020-12-22 实施

中　国　兽　医　协　会　　发 布

前　言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由青岛农业大学提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：青岛农业大学、中国动物卫生与流行病学中心、中国兽医药品监察所、青岛海润检测股份有限公司、上海基灵生物科技有限公司、莱阳市农业农村局。

本文件主要起草人：张传美、单虎、王媛媛、印春生、刘刚、朱旭、刘佳卉、张洪亮、杨海燕、孙建华、于静静。

中国兽医协会
CVMA

犬冠状病毒 RT-PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了犬冠状病毒RT-PCR检测方法的操作步骤和结果判定。

本文件适用于犬、狐狸等犬科动物粪便、肛拭子或肠道组织中犬冠状病毒核酸的实验室检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 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 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 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）

CCV：犬冠状病毒（canine coronavirus）

RNA：核糖核酸（ribonucleic acid）

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

5 试剂和材料

5.1 试剂

5.1.1 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。

5.1.2 市售商品化病毒 RNA 提取试剂盒。

5.1.3 市售商品化一步法 RT-PCR 试剂盒，包括一步法 RT-PCR 缓冲液、*Taq* DNA 聚合酶-反转录酶-RNA 酶抑制剂混合物、灭菌去离子水。

5.1.4 PBS 溶液，按附录 A.1 配制。

5.1.5 TAE 电泳缓冲液：50×TAE 贮存液，按附录 A.2 配制，临用时加蒸馏水配成 1×TAE 缓冲液。

5.1.6 1%琼脂糖凝胶，按附录 A.3 配制。

5.1.7 Goldview 核酸染料。

5.1.8 DNA 分子量标准：DL2000 DNA marker。

5.1.9 上游引物 CTCGTGGYCGGAAGAATAAT-3’；下游引物：5’-GCAACCCAGAMRACTCCATC-3’；目的片段 280 bp。M、R 为兼并碱基；M：A、C；R：A、G。

5.2 材料

5.2.1 RNase free 离心管：1.5 mL、10 mL
5.2.2 0.2 mL PCR 薄壁管
5.2.3 移液器吸头：10 μL、200 μL、1000 μL
5.2.4 医用棉签

6 仪器设备

6.1 生物安全柜或超净工作台
6.2 冰箱：2 ℃~8 ℃、-20 ℃
6.3 高压蒸汽灭菌器
6.4 组织研磨仪
6.5 涡旋振荡器
6.6 微量移液器（0.1 μL~2.5 μL、0.5 μL~10 μL、10 μL~100 μL、100 μL~1000 μL）
6.7 基因扩增仪
6.8 高速离心机（8000 g 以上）
6.9 分析天平
6.10 水平电泳仪
6.11 凝胶成像系统

7 样品的采集和前处理

7.1 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。

7.2 采样器具处理

医用棉签、离心管及 PBS 溶液经 119 ℃~123 ℃高压蒸汽灭菌 15 min。

7.3 样品前处理

7.3.1 粪便

采集新鲜粪便中间未暴露部分 0.5 g~1 g，放入 10 mL 离心管中，加入 5mL~10 mL PBS 稀释，震荡混匀，将稀释后的样品置于带有冰袋的样品运输箱内，送至实验室，8000 g 离心 5 min，取上清液待检。

7.3.2 肛拭子

将无菌棉签用 PBS 浸湿后，轻轻旋转插入肛门深处 3 cm~5 cm，稍作停顿并旋转棉签，放入 1.5 mL 离心管，加入 1 mL PBS 稀释，震荡混匀后弃去棉签，将稀释后的样品置于带有冰袋的样品运输箱内，送至实验室，8000 g 离心 5 min，取上清液待检。

7.3.3 肠道组织

取 0.5 g~1 g 肠道组织，加入 5 mL~10 mL PBS，使用组织研磨仪研磨匀浆，或刮取病变肠道肠粘膜 0.5 g~1 g 加入 10 mL PBS 混匀，制成组织悬液，将稀释后的样品置于带有冰袋的样品运输箱内，送至实验室，8000 g 离心 5 min，取上清液待检。

8 操作方法

8.1 病毒 RNA 的提取

8.1.1 在样本制备区进行。

8.1.2　采用市售的病毒 RNA 提取试剂盒按照说明书操作，也可采用其他等效的 RNA 提取方法。在生物安全柜或超净工作台中提取样品 RNA，提取过程应设立阴性和阳性对照。获得 RNA 溶液，可直接用于检测或保存于-20 ℃备用。

8.2　扩增试剂的准备与配制

8.2.1　反应混合物在配制区进行。

8.2.2　每个检测反应体系需要 23 μL RT-PCR 反应液。按附录 A.4 配制反应液，转移反应管至样本制备区。

8.3　加样

8.3.1　在样本制备区进行。

8.3.2　在上述 8.2.2 的反应管中分别加入 8.1.1 中制备的 RNA 溶液 2 μL，使每管总体积达到 25 μL，记录反应管对应的样品编号。盖紧管盖后，瞬时离心。

8.4　RT-PCR 反应

8.4.1　在扩增区进行。

8.4.2　将 8.3.2 中加样后的反应管放入基因扩增仪中，反应参数设置如下：50 ℃ 30 min；94 ℃ 3 min；94 ℃ 30 s，50 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，35 个循环；72 ℃ 5 min。

8.5　扩增产物电泳检测

8.5.1　在电泳成像区进行。

8.5.2　取 5 μL PCR 扩增产物和 1 μL 6×Loading buffer 加样缓冲液混匀后加入一个加样孔。每次电泳同时设标准 DNA Marker、阴性对照、阳性对照。

8.5.3　设置电压 80 V，电泳 30 min。

8.5.4　电泳结束后由凝胶成像系统观察并拍照记录。

9　结果判定

9.1　结果分析条件设定

阳性对照品出现 280 bp 扩增条带，同时阴性对照品无扩增条带（见附录 B）。

9.2　结果描述与判定

待检样品扩增产物电泳出现 280 bp 目标条带，判为 RT-PCR 扩增阳性，表明样品中存在犬冠状病毒核酸；待检样品无扩增条带或扩增条带与预期大小不符，判为 PCR 扩增阴性，表明样品中无犬冠状病毒核酸。

中国兽医协会 CVMA

附　录　A
（规范性）
溶液的配制

A.1　0.01 mol/L PBS溶液（pH 7.2~pH 7.4）

准确称量下面氯化钠(NaCl) 8.00 g、氯化钾(KCl) 、磷酸二氢钾(KH_2PO_4) 0.24 g、磷酸氢二钠($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) 3.65 g，加入到 800 mL 蒸馏水中溶解，调 pH 至 7.2~7.4，加水定容至 1 L。分装后 121 ℃灭菌 15 min~20 min，或过滤除菌，保存于室温。

A.2　TAE电泳缓冲液

50×TAE 贮存液：三羟甲基氨基甲烷（Tris）242.0 g、冰乙酸 57.1 mL、0.5 mol/L 乙二胺四乙酸（EDTA）（pH8.0）100.0 mL，加双蒸水至 1000 mL。使用时稀释至 1×工作浓度。

A.3　1%琼脂糖凝胶

称取1 g琼脂糖置于锥形瓶中，加入100 mL 1×TAE缓冲液。微波炉加热煮沸至琼脂糖全部融化，加入适量染料，混匀，倒入制胶板中，即成1 %琼脂糖凝胶。

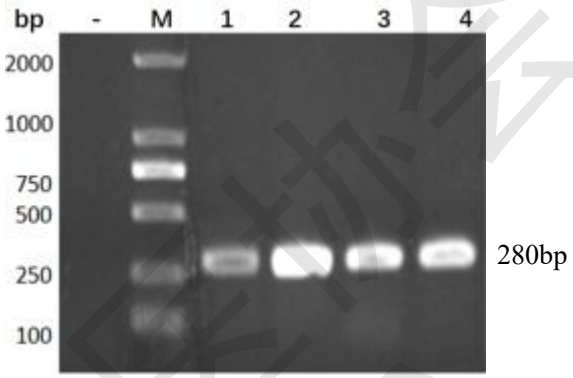
A.4　RT-PCR反应液配方

组分	1个检测体系的加入量
2×一步法RT-PCR缓冲液	12.5 μL
Taq DNA聚合酶-反转录酶-RNA酶抑制剂	1.25 μL
上游引物（10 μM）	1.0 μL
下游引物（10 μM）	1.0 μL
待检样品RNA模板	2.0 μL
灭菌超纯水	7.25 μL

中国兽医协会 CVMA

附　录　B
（资料性）
检测样品电泳图示

检测样品中犬冠状病毒电泳例图



图B 检测样品中犬冠状病毒电泳图

说明：
“-”——阴性对照；
“M”——DNA分子量标准DL2000；
1——肛拭子样品；
2——肠道组织样品；
3——粪便样品；
4——阳性对照。

中国兽医协会 CVMA

参 考 文 献

[1] Erles K,Brownlie J. Sequence analysis of divergent canine coronavirus strains present in a UK dog population[J]. Virus Res, 2009, 141(1):21-5.

[2] Decaro N.Recombinant canine coronaviruses in dogs, Europe[J]. Emerg Infect Dis, 2010, 16(1): 41-7.

[3] 孙秋艳,李舫,蔡国栋.山东省部分地区宠物犬冠状病毒病的流行病学调查[J]. 中国预防兽医学报, 2016,38(11):874-878.

中国兽医协会
CVMA