ICS 11.220
B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA 45-2020

犬腺病毒 PCR 检测方法

Detection of canine adenovirus by 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、上海基灵生物科技有限公司。

本文件主要起草人：单虎、于永乐、王媛媛、印春生、朱旭、张传美、张洪亮。

中国兽医协会
CVMA

犬腺病毒 PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了犬腺病毒PCR检测方法的材料、操作步骤和结果判定。

本文件适用于犬、狐狸等犬科动物分泌物、组织、粪便等样品中腺病毒核酸的检测。

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。

CAV： 犬腺病毒（canine adenovirus）

CAV-1： 犬腺病毒1型（canine adenovirus type 1）

CAV-2： 犬腺病毒2型（canine adenovirus type 2）

PCR： 聚合酶链式反应（polymerase chain reaction）

DNA： 脱氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid）

*Taq*酶： *Taq* DNA 聚合酶（Taq DNA polymerase）

dNTPs： 脱氧核糖核苷三磷酸（deoxyribonucleoside triphosphate）

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 0.9 %生理盐水（按照附录 A.1 配制）

5.1.3 dNTPs:各 10 mmol/L，-20 ℃保存

5.1.4 10 %十二烷基硫酸钠（按照附录 A.2 配制）

5.1.5 蛋白酶 K 贮备液（按照附录 A.3 配制）
5.1.6 5×TBE 电泳缓冲液（按照附录 A.4 配制）
5.1.7 Goldview 核酸染料
5.1.8 加样缓冲液（按照附录 A.5 配制）
5.1.9 DNA 分子量标准：DL2000 DNA Marker
5.1.10 琼脂糖

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

5.3 引物

上游引物：5’-AGGATGGCCTATACATCGCC -3’；下游引物：5’- TGGTGAACGGGAAGCTGT -3’；CAV-1 扩增片段 516 bp；CAV-2 扩增片段 1038 bp。

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（量程 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 缓冲液经 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 5 mL~10 mL 生理盐水稀释，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

将无菌棉签用生理盐水浸湿后，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 生理盐水稀释，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 组织器官

取0.5 g~1 g 病死犬或者狐狸的肝、脾、肺、肠等组织器官，加入5mL~10 mL 生理盐水，使用组织研磨仪研磨匀浆，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 DNA 的提取

8.1.1 在样本制备区进行，采取酚抽提法提取；也可采用其他等效的 DNA 提取方法。

8.1.2 取上清液 465 μL，加人 25 μL 10 %十二烷基硫酸钠和 10 μL 的 20 mg/mL 蛋白酶 K，56 ℃水浴摇床上放置 2 h。

8.1.3 加入等量的饱和酚溶液 500 μL，振荡混匀 20 s，12000 g 离心 5 min，取上清液。

8.1.4 加人等量的酚：三氯甲烷：异戊醇(25：24：1)，振荡混匀 20 s，12000 g 离心 5 min，取上清液。

8.1.5 再加人等量的三氯甲烷：异戊醇(24：1)，振荡混匀 20 s，12000 g 离心 5 min，取上清液。

8.1.6 最后加人两倍体积的无水乙醇，上下颠倒混匀，12000 g 离心 10 min，弃上清。

8.1.7 室温于燥后，加人 50 μL 双蒸水溶解沉淀，即得 DNA 模板，-20 ℃贮存备用。

8.1.8 在生物安全柜或超净工作台中提取样品 DNA，提取过程应设立阴性和阳性对照。

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 PCR 反应液。按附录 A.6 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 DNA 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 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：首先 94 ℃ 变性 5 min；再 94 ℃、30 s， 55 ℃、45 s，72 ℃、60 s 进行 35 个循环；最后 72 ℃、10 min。

8.5 扩增产物电泳检测

8.5.1 在电泳成像区进行。

中国兽医协会 CVMA

8.5.2　取 10 μL PCR 扩增产物和 2 μL 加样缓冲液(6X)，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

经 PCR 检测，CAV 阳性电泳示例见附录 B，CAV-1 阳性对照样品可扩增出大小为 516 bp 的核酸片段；CAV-2 阳性对照样品可扩增出大小为 1038 bp 的核酸片段，且阴性对照样品无扩增条带，否则检测结果视为无效。

9.2　结果描述与判定

在符合9.1的条件下，若待检样品扩增出了大小为516 bp的核酸片段，则初步判定CAV-1核酸阳性；若待检样品扩增出了大小为1038 bp的核酸片段，则初步判定CAV-2核酸阳性；若待检样品同时扩增出了大小为516 bp和1038 bp的核酸片段，则初步判定CAV-1和CAV-2核酸双阳性；若待检样品无扩增条带或扩增条带与预期大小不符，则判定CAV核酸阴性。

中国兽医协会
CVMA

附　录　A
（规范性）
溶液配制

A.1　0.9%生理盐水

称取9 g无水氯化钠溶于1000 mL去离子水中配成0.9 %生理盐水，121.3 ℃灭菌15 min。

A.2　10%十二烷基硫酸钠(SDS)

在90 mL三蒸水中溶解10 g十二烷基硫酸钠(电泳级)，加热至60 ℃助溶，用盐酸调pH值至7.8，加三蒸水定容至100 mL。

A.3　蛋白酶K贮备液(20 mg/mL)

每升三蒸水中加人三羟甲基氨基甲烷(Tris)1.21 mg，乙二胺四乙酸(EDTA) 1.86 mg， 十二烷基硫酸钠(SDS) 5 g，用盐酸调pH值至7.8。取该溶液按每毫升加人20 mg蛋白酶K，充分溶解后分装。

A.4　5×TBE电泳缓冲液

每升三蒸水中加入三羟甲基氨基甲烷(Tris)54.0 g，乙二胺四乙酸(EDTA) 2.9 mg，硼酸27.5 g，用5 mol/L的盐酸调pH值至8.0。

A.5　加样缓冲液(6×)

每 100 mL 三蒸水中加人溴酚蓝 0.25 g 和蔗糖 40 g。

A.6　PCR反应液配方

CAV 核酸 PCR 反应液配方见表 A。

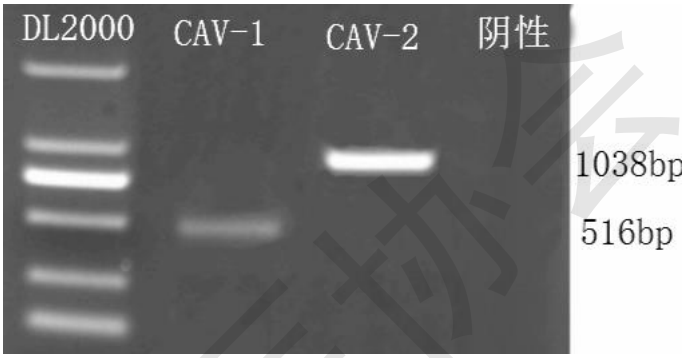
表 A　PCR反应液配方

PCR反应液组分	1个检测体系的加入量
10x*Taq*酶浓缩液	2.5 μL
*Taq*酶（5U/μL）	0.5 μL
dNTPs（10 μM）	1.0 μL
上游引物（20 μM）	1.0 μL
下游引物（20 μM）	1.0 μL
待检样品DNA模板	2.0 μL
灭菌超纯水	17.0 μL

中国兽医协会 CVMA

附　录　B
（资料性）
CAV 阳性电泳示例

CAV-1阳性对照、CAV-2阳性对照及阴性样品PCR检测结果见图B。



图B CAV阳性电泳结果图

中国兽医协会
CVMA