ICS 11.220
B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA 46-2020

犬星状病毒 RT-PCR 检测方法

Detection of canine astrovirus 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。

本文件主要起草人：黄娟、单虎、王媛媛、印春生。

中国兽医协会
CVMA

犬星状病毒 RT-PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了犬星状病毒RT-PCR检测方法。

本文件适用于犬粪便、肛拭子和肠道组织星状病毒核酸的检测。

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。

RT-PCR：逆转录-聚合酶链反应（reverse transcription-polymerase chain reaction）

CaAstV：犬星状病毒（canine astrovirus）

PBS：磷酸盐缓冲溶液（phosphate buffered solution）

DNA：脱氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid）

RNA：核糖核酸（ribonucleic acid）

cDNA：互补脱氧核糖核酸（complementary DNA）

PCR：聚合酶链反应（polymerase chain reaction）

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 商品化 RNA 提取试剂盒。

5.1.3 商品化反转录试剂盒。

5.1.4 r*Taq* DNA 聚合酶。

5.1.5　DNA 分子量标准。

5.1.6　灭菌去离子水。

5.1.7　0.01M PBS 缓冲液（pH7.4，含青霉素 100 U/mL、链霉素 0.1 mg/mL），其配制按照附录 A 中的 A.1 进行。

5.1.8　TAE 电泳缓冲液，其配制按照附录 A 中的 A.2 进行。

5.1.9　2 %琼脂糖凝胶，其配制按照附录 A 中的 A.3 进行。

5.1.10　Goldview 核酸染料。

5.1.11　引物：试验中所用引物及序列如下，CaAstV-F：5'- GAGTTTGATTGGACCAGATTTGA -3'；CaAstV-R：5'- GGCTTAACCCACATTCCAAA -3'。预期扩增片段大小为 419bp。犬星状病毒 RT-PCR 检测方法扩增区域参考序列见附录 B。

5.2　材料

5.2.1　RNase free 离心管：1.5 mL、10 mL

5.2.2　0.2 mL PCR 反应管

5.2.3　医用棉签

5.2.4　微量移液器吸头：10 μL、200 μL、1 000 μL

6　仪器设备

6.1 冰箱：-20 ℃和-70 ℃

6.2 高压蒸汽灭菌器

6.3 恒温水浴锅

6.4 分析天平，感量 0.1 mg

6.5 高速冷冻离心机（8000 g 以上）

6.6 涡旋振荡器

6.7 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

6.8 高通量组织研磨仪

6.9 基因扩增仪

6.10 水平电泳仪

6.11 凝胶成像系统

6.12　生物安全柜或超净工作台

7　样品采集与前处理

7.1　总则

除有特殊说明外，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　采样器具的处理

离心管、PCR反应管、医用棉签、移液器吸头经119 ℃~123 ℃高压蒸汽灭菌15 min。

7.3　样品前处理

7.3.1　粪便

用无菌医用棉签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 PBS液（pH7.4）稀释；漩涡振荡1 min后弃去棉签，样本置于带有冰袋的样品运输箱内，运输至检测实验室后， 8000 g 离心5 min，取上清液待检。

7.3.2 肛拭子

将无菌医用棉签用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3圈，取出放入1.5 mL离心管，加入PBS 1 mL稀释，漩涡震荡1 min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，运输至检测实验室后，8000 g 离心5 min，取上清液待检

7.3.3 肠道组织

取5 cm~10 cm肠道组织，加入5 mL~10 mL PBS，使用高通量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 RNA 的提取

在样本制备区进行。取离心好的上清液，按照商品化 RNA 提取试剂盒说明书提取 RNA，也可采用其他等效的 RNA 提取方法，RNA 样本即用或-70 ℃冻存备用。RNA 的提取应在生物安全柜或超净工作台进行，提取过程应设立阴性和阳性对照，按照同样方法提取 RNA。

8.2 反转录

在样本制备区进行。按照商品化反转录试剂盒说明书，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。

8.3 PCR 反应

8.3.1 扩增试剂的准备与配制

8.3.1.1 在反应混合物配制区进行。

8.3.1.2 每个检测反应体系需要 22 μL PCR 反应液，按照附录 A 中的表 A 配制单管 PCR 反应混合液（除模板外），也可以根据需要配制在单管中配制多管反应液，充分混匀后分装，每个反应管 22 μL。转移反应管至样本制备区。

8.3.2 加样

8.3.2.1 在样本制备区进行。

8.3.2.2 在上述 8.3.1.2 的反应管中分别加入 8.2 中制备的 cDNA 或质粒溶液 3 μL，使每管总体积达到 25 μL。同时以 CaAstV 或以含扩增区域序列的质粒作为 PCR 阳性对照，以灭菌去离子水为阴性对照，记录反应管对应的样品编号。盖紧管盖后，瞬时离心。

8.3.3 PCR 扩增

8.3.3.1 在样本检测区进行。

8.3.3.2 将 8.3.2.2 中加样后的反应管放入基因扩增仪中，反应参数设置如下：94 ℃ 预变性 5 min，然后 94 ℃ 30 s，50 ℃ 30 s，72 ℃ 45 s，共 40 个循环，最后 72 ℃ 5 min。

8.4 琼脂糖凝胶电泳

在样本电泳区进行。PCR 反应完成后，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，在 2 %琼脂糖凝胶上进行电泳（80 V，30 min）。每次电泳同时设 DNA 分子量标准。电泳完毕将凝胶置于使用凝胶成像系统中观察。

9 结果判定

9.1 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。若阳性对照泳道出现与预期（419 bp）大小一致的片段，阴性对照泳道没有出现条带，则判定反应体系成立。

9.2 结果描述与判定

若待检样本泳道出现阳性对照大小的条带，则判定为阳性；若与阴性对照一样未出现目的条带，或条带大小与预期不一致，则判定为阴性。

中国兽医协会
CVMA

附　录　A
（规范性）
试剂配制

A.1　0.01M PBS缓冲液

称取磷酸二氢钾(KH_2PO_4)：0.27 g；磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)：1.42 g；氯化钠(NaCl)：8 g；氯化钾(KCl)0.2 g；加去离子水约 800 mL 充分搅拌溶解，然后加入浓盐酸调 pH 至 7.4，最后定容到 1 L，高压灭菌。从-20 ℃冰箱里取出青链霉素混合液(100×，青霉素的含量为 10 kU/mL,链霉素的含量为10mg/mL)，室温放置使其融化，超净台内操作,按 1 %的比例加入上述溶液中，混匀后即可使用。

A.2　TAE电泳缓冲液

称取下列试剂于1 L烧杯中： Tris （三羟甲基氨基甲烷）242 g，$Na_2EDTA.2H_2O$ 37.2 g，向烧杯中加入约600 mL的去离子水，充分搅拌溶解。加入57.1 mL的醋酸，充分搅拌。加去离子水将溶液定容至1 L后，室温保存。使用时50倍稀释即可。

A.3　2%琼脂糖凝胶

称取2 g琼脂糖（分析纯），置于100 mL TAE电泳缓冲液中，微波炉加热溶解，冷却至55 ℃左右，加入少量Goldview核酸染料，倒入模中，冷却凝固。

A.4　PCR反应混合液

PCR反应总体积25 μL，应按照表A进行配制。

表 A　PCR 反应混合液

试剂名称	加入量
10×r*Taq* buffer	2.5 μL
dNTPs Mixture（各2.5 mM）	3 μL
r*Taq* (5 U/μL)	0.5 μL
CaAstV-F (20 μM)	0.5 μL
CaAstV-R (20 μM)	0.5 μL
核酸模板	3 μL
灭菌去离子水	15 μL

中国兽医协会 CVMA

附　录　B
（资料性）
犬星状病毒 RT-PCR 检测方法扩增区域参考序列

```
  1  gagtttgat tggaccagat ttgatggtac tataccatct gatttgattc gacatatcaa
 60 gaaactccgc tggagtttgg ttaatgccga acagaggagg aaatatcaaa aacttcatga
120 ttggtatgtt gaaaatctgg tcaatcgtac tgtgctactt ccatctggtg aggttacaga
180 acaacatcgt ggtaacccat ctggccaatt ctccactacc atggacaaca acatgatcaa
240 cacatggctc caggcttttg aatttgccta tttccatgga cctaataaac agctttggct
300 gaactatgac accttggtct atggtgatga caggctgtca acaaccccac tcattcctga
360 caactatgtt gagagagttg tactaatgta caaagatgtc tttggaatgt gggttaagcc
```

中国兽医协会
CVMA