ICS 11.220
B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA 39-2020

猫冠状病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

Real-time RT-PCR method for detection of feline coronavirus

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

本文件由中国兽医协会提出并归口。

本文件起草单位：上海市动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人：杨德全、鞠厚斌、赵洪进、王建、沈悦、杨显超、沈海潇、李鑫、葛菲菲、陶田谷晟、于讳茹。

中国兽医协会
CVMA

猫冠状病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了猫冠状病毒实时荧光 RT-PCR 检测的操作方法。

本文件适用于实验室对临床疑似猫冠状病毒感染的腹水、肛拭子、粪便、血液、血清中猫冠状病毒核酸的快速检测。

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 541-2016 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。

荧光 RT-PCR： 实时荧光反转录聚合酶链式反应（real-time reverse transcript polymerase chain reaction）

BHQ1： 无荧光淬灭基团（black hole quencher-1）

Ct 值： 每个反应管内的荧光信号量达到设定的阈值所经历的循环数（cycle threshold）

DEPC： 焦碳酸二乙酯（diethyl pyrocarbonate）

FAM： 6-羧基荧光素（6-carboxyfluorescein）

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

RNA： 核糖核酸（ribonucleic acid）

5 试剂和材料

5.1 引物和探针

上游引物： 5′-GATTTGATTTGGCAATGCTAGATTT-3′

下游引物： 5′-AACAATCACTAGATCCAGACGTTAGCT-3′

TaqMan 探针： 5′-FAM-TCCATTGTTGGCTCGTCATAGCGGA-BHQ1-3′

5.2 试剂

5.2.1 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。

5.2.2 TRIzol：2 ℃~8 ℃保存。
5.2.3 氯仿：2 ℃~8 ℃保存。
5.2.4 异丙醇：-20 ℃预冷。
5.2.5 DEPC 水：配制方法按附录 A 中 A.1。
5.2.6 75% 乙醇：用新开启的无水乙醇和 DEPC 水配制，-20 ℃预冷。
5.2.7 0.01 mol/L PBS 溶液（pH 7.2~ pH 7.4）：配制方法按附录 A 中 A.2。
5.2.8 阳性对照为灭活的猫冠状病毒；阴性对照为已知猫冠状病毒阴性的猫鼻拭子悬液。

6 仪器设备

6.1 荧光 PCR 检测仪。
6.2 高速冷冻离心机。
6.3 振荡器。
6.4 微量移液器（量程：0.5 μL~10 μL、2 μL~20 μL、20 μL~200 μL 和 200 μL~1 000 μL）。
6.5 冰箱（2 ℃~8 ℃和-20 ℃以下）

7 样品的采集与前处理

7.1 总则

样品的采集、保存与运输按照NY/T 541-2016执行。生物安全要求按照GB 19489的规定。

7.2 样品的采集

血液、粪便、肛拭子和腹水样品采集分别按照 NY/T 541-2016 中 6.1.2.7、6.8.1、6.8.2 和 6.16 中的规定执行。

7.3 样品处理

7.3.1 全血、血清样品：分别按照 NY/T 541-2016 中 6.1.3.1 和 6.1.3.3 中的规定执行。
7.3.2 粪便样品：3000 r/min 离心 5 min，取上清液，转入 1.5 mL 灭菌离心管中，用于后续的核酸提取。
7.3.3 肛拭子样品：将肛拭子样品在振荡器上充分混合后，将拭子中的液体挤出后弃去拭子。3000 r/min 离心 5 min，取上清液，转入 1.5 mL 灭菌离心管中，用于后续的核酸提取。
7.3.4 腹水样品：3000 r/min 离心 5 min，取上清液，转入 1.5 mL 灭菌离心管中，用于后续的核酸提取。

8 操作方法

8.1 样品核酸提取

8.1.1 在样本制备区进行。RNA 抽提使用 TRIzol 裂解法提取，也可采用其他等效的 RNA 提取方法。
8.1.2 待检样品、阳性对照和阴性对照的份数总和用 n 表示，取 n 个灭菌 1.5 mL 离心管，逐管编号。
8.1.3 每管加入 600 μL TRIzol。
8.1.4 每管对应编号分别加入 200 μL 待检样品、阳性对照和阴性对照，混匀。
8.1.5 每管加入 200 μL 氯仿，充分颠倒混匀。于 4 ℃、12000 r/min 离心 15 min。
8.1.6 新取 n 个灭菌的 1.5 mL 离心管，逐管编号，每管加入 500 μL 异丙醇(-20 ℃预冷)。
8.1.7 吸取本文件 8.1.5 各管中的上清液 500 μL，转移至 8.1.6 相应的管中，避免吸出中间层，颠倒混匀。

8.1.8　于 4 ℃、12000 r/min 离心 15 min，轻轻倒去上清，倒置于吸水纸上，沥干液体，不同样品应在吸水纸不同地方沥干。

8.1.9　每管加入 600 μL 75% 乙醇(-20 ℃预冷)，颠倒洗涤。

8.1.10　于 4 ℃、12000 r/min 离心 10 min，轻轻倒去上清，倒置于吸水纸上，沥干液体，不同样品应在吸水纸不同地方沥干。

8.1.11　4000 r/min 离心 10 s，将管壁上的残余液体甩到管底部，用微量移液器将其吸干。注意一份样本换用一个吸头，吸头不要碰到有沉淀一面。

8.1.12　室温干燥 3 min。

8.1.13　每管加入 11 μL DEPC 水，轻轻混匀，溶解管壁上的 RNA，2000 r/min 离心 5 s，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　在试剂储存和准备区进行。

8.2.2　荧光 RT-PCR 反应体系

每个检测反应体系需要 22 μL 荧光 RT-PCR 反应液，具体为 2×One Step RT-PCR Buffer 10 μL、dNTP（2.5 mmol/L）1 μL、$MgCl_2$（25 mmol/L）1 μL、RNA 酶抑制剂（40 U/μL）0.5 μL、Taq DNA 聚合酶（5 U/μL）0.5 μL、M-MLV 反转录酶（200 U/μL）0.5 μL、上下游引物 （10 μmol/L）各 1.8 μL、探针（10 μmol/L）0.6 μL、DEPC 水 4.3 μL。根据 8.1.2 中提到的 n 值，按 n+1 配制反应液，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　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 8.1.13 中制备的 RNA 溶液 3 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，500 r/min 离心 30 s。转移至扩增区。

8.4　荧光 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荧光 PCR 检测仪中，编辑样品表后，选定 FAM 作为报告基团，淬灭基团选 none，反应参数设置如下：42 ℃ 10 min，94 ℃ 15 min；95 ℃ 15 s，60 ℃ 45 s，在每个循环第二步（60 ℃ 45 s）收集荧光信号，共 40 个循环。

9　结果判定

9.1　结果分析条件设定

阈值设定原则：阈值线设定于刚好超过阴性对照扩增曲线的最高点。不同仪器可根据仪器噪音情况进行调整。

9.2　实验成立的条件

9.2.1　阴性对照无 Ct 值并且无典型的 S 型扩增曲线。

9.2.2　阳性对照 Ct 值≤30，并出现典型的 S 型扩增曲线（见附录 B）。

9.2.3　9.2.1 和 9.2.2 要求需在同一次实验中同时满足，否则，本次实验无效，需重新进行。

9.3　结果描述及判定

9.3.1 阴性

无Ct值并且无典型的S型扩增曲线，表示样品中无猫冠状病毒核酸。

9.3.2 阳性

Ct值≤35，且出现典型的S型扩增曲线，表示样品中存在猫冠状病毒核酸。

9.3.3 有效原则

Ct值＞35，且出现典型的S型扩增曲线的样品建议复检。复检仍出现上述结果的，判为阳性，否则判为阴性。

中国兽医协会
CVMA

附　录　A
（规范性）
溶液配制

A.1　DEPC 水配方

将 DEPC 加入去离子水（符合 GB/T 6682 要求）中至终浓度为 0.1 %（体积比），充分混合均匀后作用 12 h，分装，121 ℃高压灭菌 30 min，冷却后冷藏备用。

A.2　0.01 mol/L PBS溶液　（pH 7.2~ pH 7.4）

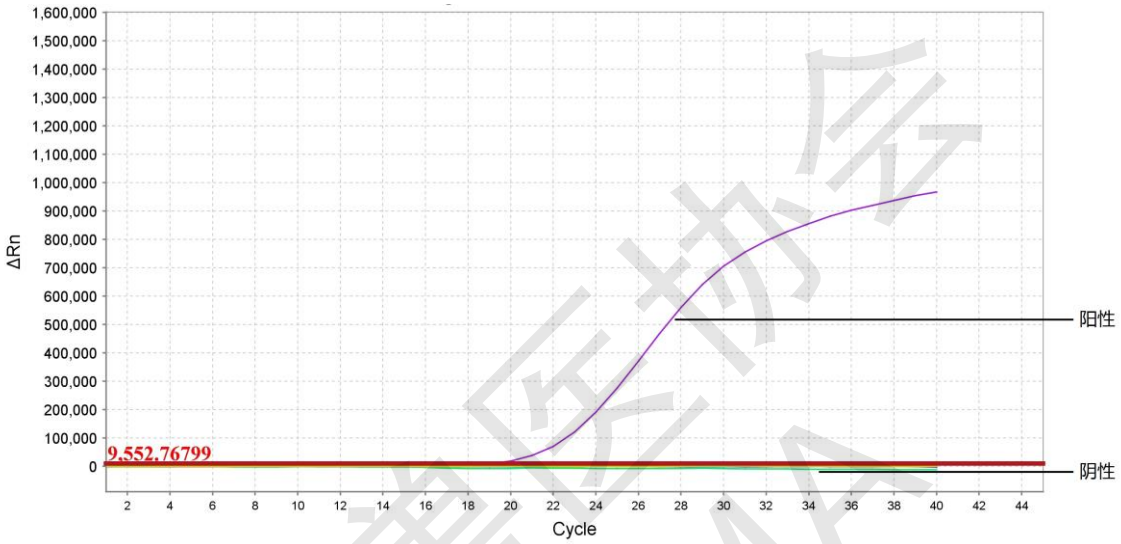
准确称量下面各试剂，加入到 800 mL 蒸馏水中溶解，调节溶液的 pH 至 7.2~7.4，加水定容至 1000 mL。分装后在 121 ℃高压灭菌 15 min~20 min，或过滤除菌，保存于室温。

氯化钠(NaCl)	8.00 g
氯化钾(KCl)	0.20 g
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
蒸馏水	加至 1000 mL

中国兽医协会 CVMA

附　录　B
（资料性）
典型扩增曲线示意图

猫冠状病毒荧光 RT-PCR 检测方法阳性和阴性典型扩增曲线见图 B.1。



图B.1　猫冠状病毒荧光 RT-PCR 典型扩增曲线示意图

中国兽医协会 CVMA