

团 体 标 准

T/CVMA X15—2020

犬冠状病毒 RT-PCR 检测方法

Detection of Canine coronavirus by RT-PCR

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国兽医协会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

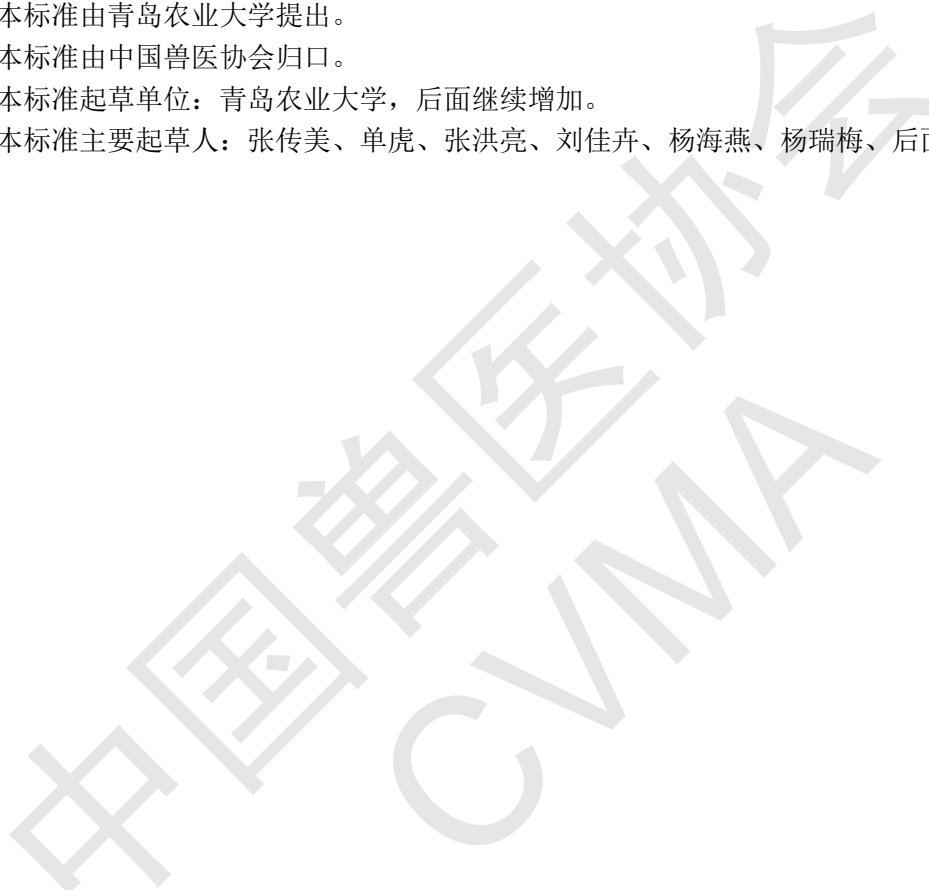
本标准不涉及专利。

本标准由青岛农业大学提出。

本标准由中国兽医协会归口。

本标准起草单位：青岛农业大学，后面继续增加。

本标准主要起草人：张传美、单虎、张洪亮、刘佳卉、杨海燕、杨瑞梅、后面继续增加。



犬冠状病毒 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了犬冠状病毒RT-PCR检测方法的缩略语、材料、操作步骤和结果判定。
本标准适用于犬、狐狸等犬科动物的犬冠状病毒的实验室检测。

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，仅所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 犬冠状病毒 (Canine coronavirus, CCV)
- 3.2 聚合酶链反应 (Polymerase chain reaction, PCR)
- 3.3 核糖核酸 (Ribonucleic acid, RNA)

4 材料

4.1 仪器设备

- 4.1.1 生物安全柜。
- 4.1.2 微量移液器（量程 10-1000 μ L）。
- 4.1.3 PCR 扩增仪。
- 4.1.4 高通量组织研磨仪。
- 4.1.5 台式高速冷冻离心机（12 000 r/min 以上）。
- 4.1.6 微型水平电泳仪。
- 4.1.7 凝胶成像系统。

4.2 耗材

- 4.2.1 RNase free 离心管：0.2 mL、1.5mL。
- 4.2.2 枪头：10 μ L，200 μ L，1000 μ L。
- 4.2.3 0.22 μ m 过滤器。
- 4.2.4 医用棉签。

4.3 试剂

- 4.3.1 病毒 RNA 提取试剂盒。
- 4.3.2 一步法 RT-PCR 试剂盒。
- 4.3.3 RNase free ddH₂O。
- 4.3.4 除有特殊说明外，所有实验用试剂均为分析纯，实验用水应符合 GB/T 6682 中一级水的要求。

4.4 引物

4.4.1 引物序列：

上游引物：5' -CTCGTGGYCGGAAGAATAAT-3' ；
下游引物 5' -GCAACCCAGAMRACTCCATC-3' ，
目的片段 280bp。

4.4.2 引物浓度：将引物稀释到工作浓度 10 pmol/μL。

5 操作步骤

5.1 采样器具处理

医用棉签、离心管及枪头经 121±2℃ 高压蒸汽灭菌 15 min。

5.2 样品的采集和处理

5.2.1 粪便：

采集新鲜粪便中段未暴露部分（如为稀便或水样便可以棉签沾取）放入 1.5mL 离心管中，加入 PBS 1mL 稀释，震荡混匀后弃去棉签，过 0.22μm 过滤器，收集滤液，8000 g 离心 5 min，取上清液待检。

5.2.2 肛拭子：

将无菌棉签用 PBS 浸湿后，轻轻旋转插入肛门深处 3~5 cm，稍作停顿并旋转棉签，取出放入 1.5mL 离心管，加入 PBS 1mL 稀释，震荡混匀后弃去棉签，过 0.22μm 过滤器，收集滤液，8000 g 离心 5 min，取上清液待检。

5.2.3 肠道组织：

取肠道组织适量，加 1mL 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加 1mL PBS 混匀，制成组织悬液，过 0.22μm 过滤器，收集滤液，8000 g 离心 5 min，取上清液待检。

5.3 RNA 的提取

采用市售的病毒 RNA 提取试剂盒按照说明书操作在生物安全柜中提取样品 RNA 后，使用市售的一步法 RT-PCR 试剂盒进行 PCR 扩增，或置于 -20℃ 冰箱备用。

5.4 反应体系

每个PCR管中依次加入6.5 μL RNase free ddH₂O、12.5 μL 2 \times RT-PCR反应液、上游引物和下游引物各1 μL 、RT-PCR酶1 μL 、Taq酶1 μL 。在其中一个PCR管中加入2 μL 病毒RNA，设为阳性对照；在另一个PCR管中加入2 μL 超纯水，作为阴性对照；在其他PCR管中分别加入2 μL 待检样品RNA模板。

5.5 反应程序

50 $^{\circ}\text{C}$ 30 min；94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min；94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，50 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min，30个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。

5.6 扩增产物电泳检测

5.6.1 加样：

取5 μL PCR扩增产物和1 μL 6 \times 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。

5.6.2 电泳：

电压80V~100V或电流40mA~50mA，电泳30min。结束后，由凝胶成像系统观察并拍照记录。

6 结果判定

6.1 试验成立条件

阳性对照品出现280bp扩增条带，同时阴性对照品无扩增条带。

6.2 判定标准

待检样品扩增产物电泳出现280bp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大小不为280bp，判为PCR扩增阴性，表明样品中无犬冠状病毒核酸。