

团 体 标 准

T/CVMA X16—2020

犬腺病毒 PCR 检测方法

Rapid Detection of Canine Adenovirus by 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。（注：后面继续增加）

本标准主要起草人：单虎，于永乐，张传美，张洪亮，刘春风。（注：后面继续增加）

中国兽医协会
CVMA

犬腺病毒 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了犬腺病毒PCR检测方法的材料、操作步骤和结果判定。
本标准适用于犬、狐狸等犬科动物腺病毒的实验室诊断。

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

GB 19489 实验室生物安全通用要求

3 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)

dNTP: 脱氧核糖核苷三磷酸 (Deoxyribonucleoside triphosphate)

4 主要仪器

4.1 冰箱 (2℃-8℃、-20℃、-70℃)。

4.2 台式离心机 (最高离心速度不低于 5000 r/min)。

4.3 高速台式冷冻离心机 (最高离心速度不低于 12 000 r/min)。

4.4 高压蒸汽灭菌器。

4.5 PCR 检测仪。

4.6 单道微量移液器 (0.1-2.5 μL, 0.5-10 μL, 1-100 μL, 100-1000 μL)。

4.7 组织研磨器。

4.8 水平电泳仪。

4.9 紫外观察灯或凝胶成像仪。

5 试剂和材料

5.1 试验用水均为灭菌超纯水，试验用水应符合 GB/T 6682 中一级水的要求。

5.2 医用棉签

5.3 枪头（10 μL ，200 μL ，1000 μL ）。

5.4 1.5 mL Eppendorf 管。

5.5 0.2 mL PCR 薄壁管。

5.6 dNTP:含 dATP、dTTP、dCTP、dGTP 各 10 mmol/L， -20°C 保存。

5.7 PCR 检测引物序列及反应液配方见附录 B。

5.8 10%十二烷基硫酸钠：配制参见附录 A.2。

5.9 蛋白酶 K 贮备液：配制参见附录 A.3。

5.10 5 \times TBE 电泳缓冲液：配制参见附录 A.4。

6 操作步骤

6.1 实验室生物安全管理

实验室生物安全管理见 GB 19489。

6.2 采样器具前处理

6.2.1 医用棉签经 $121\pm 2^{\circ}\text{C}$ 高压蒸汽灭菌 15 min。

6.2.2 离心管、枪头经 $121^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 高压蒸汽灭菌 15 min。

6.3 病料的采集及处理

采集的样品包括犬的泪液、鼻液、唾液、粪便及病死犬的肝、脾、肺、肠等组织器官。将待检组织或粪便样品加等体积生理盐水研磨匀浆，3000 g 离心 15 min，收集上清液待检，口腔拭子、粪拭子用少量生理盐水浸润后，取上清液待检。CAV 阳性对照样品和阴性对照样品的同样处理。

6.4 DNA 抽提

取上清液 465 μL ，加入 25 μL 10% 十二烷基硫酸钠和 10 μL 的 20 mg/mL 蛋白酶 K， 56°C 水浴摇床上放置 2h；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；加入等量的酚：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；再加入等量的三氯甲烷：异戊醇 (24：1)，振荡混匀 20 s，12000 g 离心 5 min，取上清液；最后加入两倍体积的无水乙醇，上下颠倒混匀，12000 g 离心 10 min，弃上清，室温干燥后，加入 50 μL 双蒸水溶解沉淀，即得 DNA 模板， -20°C 贮存备用。CAV 阳性对照样品和阴性对照样品与待检样品同步进行样品处理，并进行 DNA 抽提。另外，DNA 抽提也可采用市售的商品化 DNA 抽提试剂盒进行。

6.5 PCR 检测

单个PCR检测体系为25 μL 反应液，具体配制过程见附录B，所有样品上机前要充分振荡混匀。将PCR管置PCR仪上，按如下程序扩增：首先 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min；再 94 $^{\circ}\text{C}$ 、30s，55 $^{\circ}\text{C}$ 、45 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 、60 s 进行35个循环；最后72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min。用TBE电泳缓冲液配制1.5%的琼脂糖平板(含0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EB)，参见附录A中A. 5，将平板放入水平电泳仪，使电泳缓冲液刚好没过胶面，将10 μL PCR产物和2 μL 加样缓冲液(6X)，参见附录A中A. 6，混匀后加入样品孔。在电泳时设立DNA标准分子量作对照。5V/cm电泳约30 min，当溴酚蓝到达底部时停止，用凝胶成像系统观察结果。

6.6 结果判定

6.6.1 经PCR检测，CAV-1 阳性对照样品可扩增出大小为 493 bp 的核酸片段；CAV-2 阳性对照样品可扩增出大小为 1015 bp 的核酸片段，且阴性对照样品无扩增条带，否则试验结果视为无效。

6.6.2 在符合 6.6.1 的条件下，若待检样品扩增出了大小为 493 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 1015 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 493 bp 和 1015 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大小不为 493 bp 或 1015 bp，则判定 CAV 核酸阴性。

6.6.3 待检样品扩增出的阳性基因片段应进行核酸序列测定，若其序列与阳性对照的比对序列的同源性大于等于 90%，则可确诊为 CAV 核酸阳性，否则判定 CAV 核酸阴性。

6.6.4 待检样品扩增出的阳性基因片段应进行核酸序列测定，若其序列与提供的比对序列的同源性大于等于 90%，则可确诊为 CAV 核酸阳性，否则判定 CAV 核酸阴性。

附录 A
(规范性附录)

溶液配制

A.1 0.9%生理盐水

称取9 g无水氯化钠溶于1000 L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)

每升三蒸水中加入三羟甲基氨基甲烷(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入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 EB核酸染色剂

在10 mL三蒸水中加入100 mg 溴化乙锭(EB)配制成10 mg/mL的浓缩液。

A.6 加样缓冲液(6×)

每100 mL三蒸水中加入溴酚蓝0.25 g和蔗糖40 g。

附 录 B
(规范性附录)

引物序列及PCR反应液配方

B.1 引物序列

CAV病毒核酸PCR检测方法所用的引物序列见表B.1。

表 B.1 引物序列

引物	引物序列 (5'-3')	CAV-1 扩增片段 (bp)	CAV-2 扩增片段 (bp)
上游	AGGATGGCCTATACATCGCC	493	1015
下游	TGGTGAACGGGAAGCTGT		

B.2 PCR反应液配方

CAV病毒核酸PCR反应液配方见表B.2。

表 B.2 PCR反应液配方

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