

团 体 标 准

T/CVMA 200—2024

猫细小病毒实时荧光 RAA 检测方法

Real-time RAA method for detection of feline parvovirus

2024 - 12 - 4 发布

2024 - 12 - 4 实施

中国兽医协会 发布

中国兽医协会
CVMA

前 言

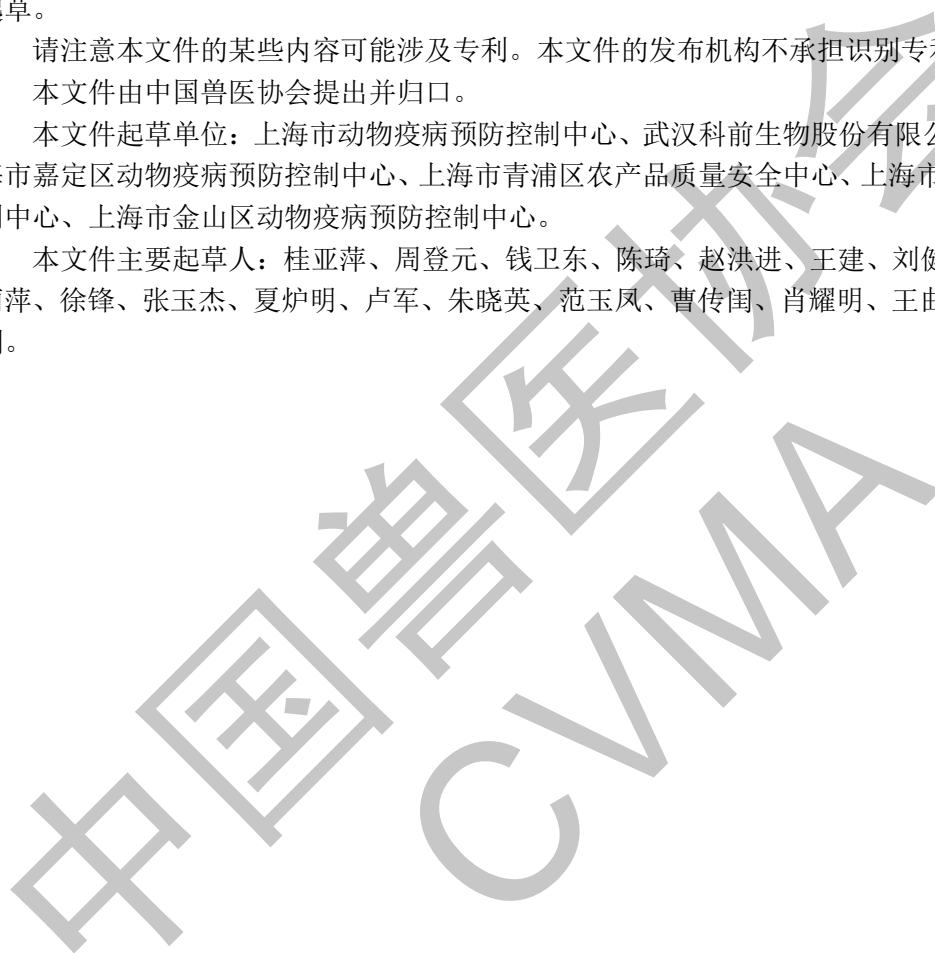
本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

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、武汉科前生物股份有限公司、陕西科技大学、上海市嘉定区动物疫病预防控制中心、上海市青浦区农产品质量安全中心、上海市闵行区动物疫病预防控制中心、上海市金山区动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人：桂亚萍、周登元、钱卫东、陈琦、赵洪进、王建、刘健、夏琦琦、冯桂丹、沈莉萍、徐锋、张玉杰、夏炉明、卢军、朱晓英、范玉凤、曹传闰、肖耀明、王曲直、孙清、郑华、翁永刚。



中国兽医协会
CVMA

猫细小病毒实时荧光 RAA 检测方法

1 范围

本文件描述了猫细小病毒实时荧光RAA检测方法原理、实验材料和操作步骤。
本文件适用于猫细小病毒核酸检测。

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
GB/T 27401 实验室质量控制规范 动物检疫
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。

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）

DNA：脱氧核糖核酸（Deoxyribonucleic acid）

FPV：猫细小病毒（Feline parvovirus）

PBS：磷酸盐缓冲盐水（Phosphate buffered saline）

RAA：重组酶介导的核酸扩增（Recombinase-aided nucleic acid amplification）

RNA：核糖核苷酸（Ribonucleic acid）

5 原理

RAA 是一种核酸恒温扩增技术，在恒温下（一般为 37 °C ~ 42 °C），重组酶和寡核苷酸引物结合形成蛋白-DNA 复合物，该复合物能够移动寻找模板 DNA 中的同源序列，在单链 DNA 结合蛋白的帮助下，打开模板 DNA 的双链结构，在 DNA 聚合酶的作用下，形成新的双链，产物呈指数级扩增。在 *exo* 探针中包含一个四氢呋喃残基(THF)，其两侧分别为 dT-荧光基团(FAM)和 dT-淬灭基团(BHQ-1)。探针 3'端通过适当的修饰（C3 Spacer）被封闭，以阻止聚合酶的进一步延伸。只有当探针和目的 DNA 结合后，核酸外切酶III（ExonucleaseIII, ExoIII）能够识别并切除 THF 残基，并解除 3'端阻断，荧光

基团和淬灭基团分开并产生荧光信号，RAA 产物与荧光信号的增长存在对应关系。

6 实验材料

6.1 试剂

6.1.1 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。

6.1.2 PBS 缓冲盐水（0.01 mol/L PBS，pH 7.4）：用 800 mL 蒸馏水溶解 8 g NaCl，0.2 g KCl，1.44 g Na_2HPO_4 和 0.24 g KH_2PO_4 ，用 HCl 调节溶液的 pH 值至 7.4，加水定容至 1 L，121 °C 高压灭菌 15 min。

6.1.3 DNA 提取试剂盒。

6.1.4 RAA 预混液：聚乙二醇 10%，二硫苏糖醇 2 mmol/L，磷酸肌酸 100 mmol/L，肌酸激酶 200 ng/ μL ，三磷酸腺苷 6 mmol/L，三（羟甲基）氨基甲烷（pH 7.9）100 mmol/L，乙酸钾 200 mmol/L，脱氧核苷三磷酸 400 mmol/L。

6.1.5 引物和探针，按照附录 A 配制。

6.1.6 RAA 荧光基础反应单元：包含重组酶，单链结合蛋白和 DNA 聚合酶的冻干粉。

6.1.7 280 mmol/L 乙酸镁。

6.1.8 阳性对照，见附录 B。

6.1.9 阴性对照：pMD18-T 空载体质粒。

6.2 耗材

6.2.1 带滤芯无 DNA 酶和 RNA 酶移液器吸头（规格：10 μL 、20 μL 、200 μL 和 1 000 μL ）。

6.2.2 1.5 mL 无 DNA 酶和 RNA 酶灭菌离心管。

6.2.3 0.2 mL PCR 光学反应管。

6.2.4 冰盒（-20 °C 以下预冷）。

6.3 仪器设备

6.3.1 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 ）。

6.3.2 冰箱（2 °C ~ 8 °C 和 -20 °C 以下）。

6.3.3 高速冷冻离心机。

6.3.4 实时荧光 PCR 仪。

7 实验步骤

7.1 通则

样品的采集、保存与运输按照 NY/T 541 的规定执行；实验室生物安全要求按照 GB 19489 的规定执行；检测过程中防止交叉污染的措施按照 GB/T 27401 的规定执行。

7.2 样品的采集与处理

7.2.1 采样工具

非抗凝真空采血管、注射器、无菌植绒拭子、5 mL 灭菌离心管、灭菌剪刀、组织研磨器。

7.2.2 样品采集

7.2.2.1 发病动物样品采集

用无菌棉拭子采集猫新鲜粪便,或插入肛门转圈3次~4次采集肛拭子,将拭子放入已加入2 mL PBS 缓冲盐水的5 mL 灭菌离心管中,浸泡20 min~30 min。

7.2.2.2 死亡动物样品采集

无菌采集病死猫肝脏、脾脏、肺脏、肾脏和淋巴结等组织样品;采集十二指肠管时,用线扎紧病变明显处(约5 cm~10 cm)的两端,自扎线外侧剪断,将采集的组织 and 段肠样品放入5 mL 灭菌离心管中。

7.2.2.3 细胞培养上清液采集

无菌吸取细胞培养上清液放入5 mL 灭菌离心管中。

7.2.3 样品保存和运输

采集的样品可立即用于检测。不能立即检测的样品,在2℃~8℃下保存应不超过24 h, -18℃及以下可以稳定保存3个月, -70℃及以下可长期保存,应避免反复冻融(最多不超过3次)。样品运送采用低温保存进行运输,并在规定温度下的保存期内送达实验室。

7.2.4 样品处理

7.2.4.1 粪便或肛拭子样品处理

采集的样品振荡、挤干拭子,浸泡液采用5 000 r/min 离心10 min,吸取1 mL 上清液至1.5 mL 灭菌离心管内备用。

7.2.4.2 肠道等组织样品处理

取1 g 组织样品,剪碎,加入2 mL PBS 缓冲盐水,匀浆研磨制成悬液,反复冻融3次,5 000 r/min 离心10 min,吸取1 mL 上清液至1.5 mL 灭菌离心管内备用。

7.2.4.3 细胞培养上清液处理

细胞培养上清液8 000 r/min 离心5 min,吸取1 mL 上清液至1.5 mL 灭菌离心管内备用。

7.3 操作程序

7.3.1 扩增模版制备

采用DNA 提取试剂盒提取各类样品中的病毒核酸,如在2 h 内检测可将提取的核酸置于冰上保存,否则应置于-20℃冰箱保存。

7.3.2 检测

7.3.2.1 实时荧光 RAA 反应体系

实时荧光RAA反应体系按照表1配制。

表1 实时荧光RAA反应体系

组分	1 个检测反应的加入量 (μL)
RAA 预混液	25.0
FPV-F (10 μmol/L)	2.1
FPV-R (10 μmol/L)	2.1
FPV-P (10 μmol/L)	0.6
去离子水	13.2
DNA 模板	2.0
乙酸镁	5.0
总体积	50

注：在试剂配制区进行。先将荧光 RAA 反应混合液加入 RAA 荧光基础反应单元中，接着将 DNA 模板加入每个反应管中，最后将乙酸镁加在反应单元管盖上，盖上盖子，短暂离心后进行检测。每次进行荧光 RAA 扩增时均应设立阳性、阴性及空白对照。阳性对照应为阳性质粒，阴性对照应为空载体质粒，空白对照应为去离子水。配制反应液在冰盒中进行。

7.3.2.2 实时荧光 RAA 反应程序

实时荧光RAA反应程序按照表2设置。

表2 实时荧光RAA反应程序

仪器	温度	反应时间	循环数
荧光PCR检测仪	39 °C	60 s	1
	39 °C	30 s	40

7.4 判定

7.4.1 试验成立条件

阳性对照有荧光对数增长，且荧光通道出现典型的扩增曲线，相应的 Ct 值 \leq 30.0，阴性对照无荧光对数增长且无报告 Ct 值，空白对照无荧光对数增长，相应的无报告 Ct 值，试验结果有效；否则应重新进行试验。

7.4.2 结果判定

被检样品 Ct 对数增长，且荧光通道出现典型的扩增曲线，相应的 Ct 值 \leq 30.0，则判为 FPV 核酸阳性；被检样品检测结果无 Ct 值或 Ct 值 $>$ 35，且无典型的扩增曲线，则判定为 FPV 核酸阴性；被检样品检测结果 $30 < \text{Ct 值} \leq 35$ ，且出现典型的扩增曲线，判定为可疑，可疑样品重新检测，如重复检测结果仍然 Ct 值 \leq 35，且为典型的扩增曲线，则判定为 FPV 核酸阳性，否则为阴性。

附 录 A
(规范性)
引物和探针

引物、探针的名称和序列见表A.1。

表A.1 引物、探针的名称和序列

名称	序列
FPV-F (上游引物)	5'-TGATGGCACAACCAGGAGGTGAAAATCTTT-3'
FPV-R (下游引物)	5'-AATCCAATTCCATCCGTGCATTCTAAATAT-3'
FPV-P (探针)	5'- ATTTGAATTAATACTTGAAAAAGCAGATAAT[FAM-dT] (THF) CT[BHQ1-dT]AAACTAACTACTTT (C3-Spacer) -3'

注：[FAM-dT]，THF，[BHQ1-dT]，和C3-Spacer均为探针修饰基团。引物和探针可由生物公司合成，用去离子水稀释至100 μmol/L储存浓度，-20℃以下保存备用；根据需要配制成10 μmol/L工作浓度，-20℃以下保存供检测使用。

附录 B
(资料性)
阳性对照质粒制备

B.1 阳性对照质粒序列 (FPV-BJ04 株NS1 基因序列, GenBank Accession No.MH165481.1)

5-tcaatcaaatgtactttgcgggacttggttagtaaaagagtaacatcacctgaagactggatgatgttacaaccagatagttatattgaaatgatggcaca
accaggaggtgaaaatcttttaaaaaatacacttgaaattgtactttgactttagcaagaacaaaaacagcattgaattaatacttgaaaaagcaaataatact
aaactaactaactttgatcttgcaaatctagaacatgtcaaat**tttagaatgcacggatggaattggatt**aaagttgtcacgctatagcatgtgtttaaataga
caagtggtaaaagaatacagttcttttcatggaccagcaagtacaggaaaatctattattgetcaagccatagcacaagctgtggg-3

注: 下划线部分为连入pMD18-T载体中的目标检测片段; 黑体为引物序列; 斜体为探针序列。

B.2 阳性对照质粒的制备与鉴定

按照B.1中阳性对照序列合成基因片段, 并克隆至pMD18-T载体, 再转化至DH5 α 感受态细胞, 得到重组菌, 提取重组质粒进行PCR检测和测序分析, 鉴定为重组阳性质粒。

B.3 阳性对照质粒的标定

利用超微量分光光度计测定阳性重组质粒浓度, 并按下面公式将浓度换算成拷贝数, DNA拷贝/ $\mu\text{L}=[6.02\times 10^{23}\times\text{DNA 浓度}(\text{ng}/\mu\text{L})\times 10^{-9}]/(\text{DNA 碱基数}\times 660)$ 。作为阳性对照时, 选取浓度为 10^4 拷贝/ μL 。