

团 体 标 准

T/CVMA 281—2025

犬细小病毒和犬冠状病毒双重 RT-PCR 检测方法

Detection method of duplex RT-PCR for canine parvovirus and canine
coronavirus

2025 - 8 - 13 发布

2025 - 8 - 13 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。

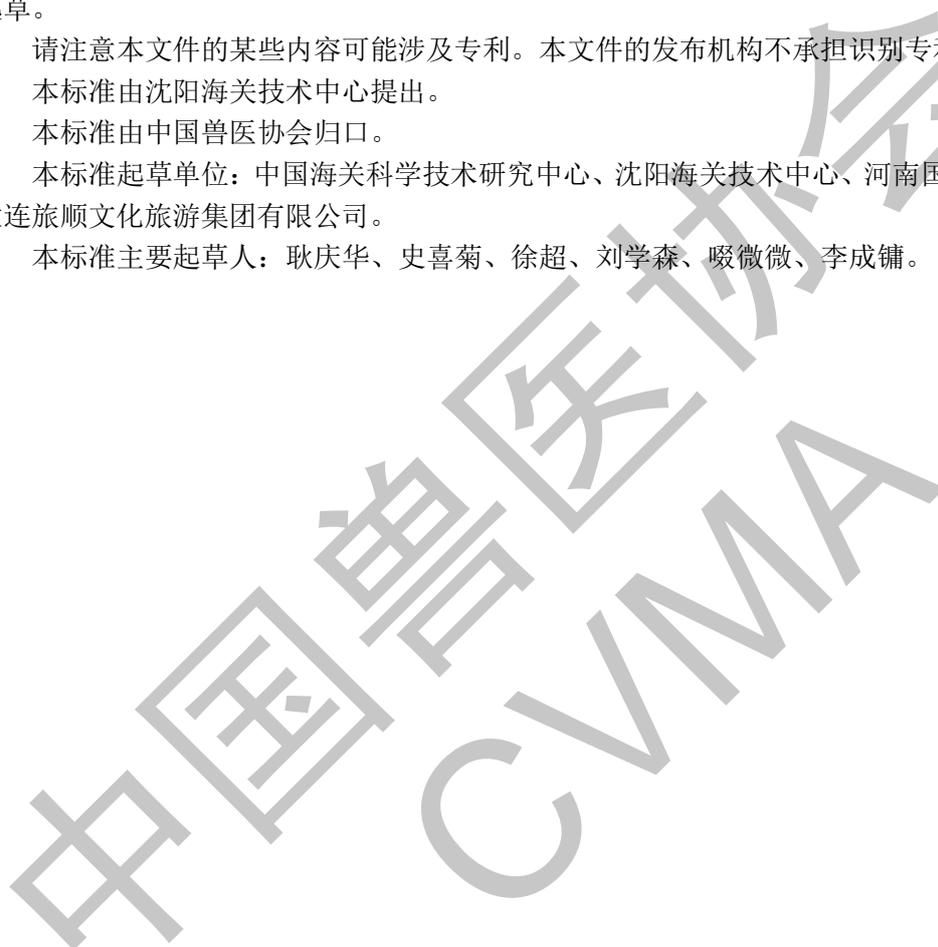
请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本标准由沈阳海关技术中心提出。

本标准由中国兽医协会归口。

本标准起草单位：中国海关科学技术研究中心、沈阳海关技术中心、河南国际旅行卫生保健中心和大连旅顺文化旅游集团有限公司。

本标准主要起草人：耿庆华、史喜菊、徐超、刘学森、啜微微、李成镛。



中国兽医协会
CVMA

犬细小病毒和犬冠状病毒双重 RT-PCR 检测方法

1 范围

本文件规定犬细小病毒和犬冠状病毒的双重RT-PCR的检测方法。

本文件适用于犬、猫等伴侣动物和犬、貉、狐狸等野生动物的犬细小病毒和犬冠状病毒检测及结果判定。

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 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。

CPV: 犬细小病毒 (canine parvovirus)

CCV: 犬冠状病毒 (canine coronavirus)

DEPC: 焦碳酸二乙酯 (diethylpyrocarbonate)

RT-PCR: 反转录聚合酶链式反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction)

RNA: 脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid)

5 仪器与设备

梯度 PCR 仪、生物安全柜、凝胶成像系统、台式冷冻离心机、组织匀浆机、漩涡振荡器、高压灭菌锅、移液器及吸头 (10 μ L、200 μ L 和 1000 μ L)，冰箱 (2 $^{\circ}$ C ~ 8 $^{\circ}$ C 和 -20 $^{\circ}$ C)。

6 试剂和耗材

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。所有试剂均用无核酸酶的容器分装。

6.1.2 病毒核酸提取试剂：Trizol 试剂、三氯甲烷、异丙醇。也可选取商品化的病毒核酸提取试剂盒或自动核酸提取设备进行核酸提取。

6.1.3 灭菌 DEPC 水。

6.1.4 2×Multiplex RT-PCR 缓冲液。

6.1.5 Multiplex 酶混合液。

6.2 阳性对照

含 CPV 和 CCV 的犬肾传代细胞（MDCK）细胞毒或 CPV 和 CCV 的疫苗株或 CPV 和 CCV 的 DNA 片段的重组质粒（阳性参考序列见附录 B）或其他商业化的 CPV 和 CCV 的阳性质控品均可作为阳性对照。

6.3 阴性对照

正常未接毒的犬肾传代细胞或正常犬组织或细胞可作为阴性对照。

6.4 引物和探针序列

CPV 和 CCV 引物和探针序列见附录 C.1。

7 样品采集和处理

7.1 采样工具

手术刀、剪刀、镊子，研钵等，经 160℃干热灭菌 2 h。一次性无菌采样拭子、无菌注射器、真空采血管，无菌 Eppendorf 管、记号笔、低温保藏箱。

7.2 样品采集

7.2.1 活犬用拭子采集眼周分泌物、鼻液、粪便，采集样品的拭子用少量 PBS 浸润后，3000 r/min 离心 15 min，取上清液待检。

7.2.2 病死犬可采集肺、肝、脾等器官组织，每份组织分别从三个不同的位置称取样品约 2~3 g 于研磨器中，用手术剪剪碎混匀后取 0.3 g，将待检组织加等 3 mL PBS 研磨匀浆，8000 r/min 离心 2 min，取上清液备用。也可使用全自动组织研磨仪对样品进行处理，8000 r/min 离心 2 min，取上清液备用。

7.2.3 血液样品：血清、血浆或全血，用无菌注射器直接吸取至无菌 Eppendorf 管中，编号备用。

7.3 病毒核酸的提取

7.3.1 病毒核酸抽提使用 Trizol 手工提取，也可以使用等效的商品化病毒核酸提取试剂盒提取，在核酸提取区操作。

7.3.2 取 n 个灭菌的 1.5 mL 离心管，其中 n 为待检样品数、阳性对照数和阴性对照数之和，对每个离心管进行编号。

7.3.3 每管加入 800 μL Trizol，分别加入被检样品、阳性对照、阴性对照各 200 μL，上下颠倒使其充分混匀，4℃下 10000 r/min 离心 10 min。

7.3.4 取 900 μL 上清, 置新的 1.5 mL 灭菌离心管中, 加入 500 μL 无水乙醇, 混匀, 室温放置 3 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 10000 r/min 离心 5 min。

7.3.5 弃上清, 沿管壁缓缓加入 0.8 mL ~ 1 mL 75 % 乙醇, 颠倒 3 ~ 6 次混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 10000 r/min 离心 5 min。反复洗涤两次后, 将离心管倒扣于吸水纸上, 自然晾干或用移液器移去残液。

7.3.6 用 30 μL DEPC 水溶解沉淀, 核酸在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱可保存 1 ~ 2 天, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱可保存 2 年。

8 RT-PCR反应

8.1 RT-PCR 反应体系

按照附录D.1配置RT-PCR反应体系。将混合液充分混合后, 最后加入模板, 瞬时离心。也可参考使用等效的商业化的RT-PCR检测试剂盒的反应体系。

8.2 RT-PCR 反应程序

RT-PCR反应程序按照D.2进行。程序设定也可根据引物序列与该标准一致的商品化试剂盒说明书操作。

8.3 琼脂糖电泳

用TAE电泳缓冲液配制1%的琼脂糖凝胶。将5 μL PCR扩增产物加入样品孔。电泳时设立DNA标准分子量Marker作对照, 120 V电泳约30 ~ 40 min时停止。

8.4 琼脂糖电泳

用TAE电泳缓冲液配制1%的琼脂糖凝胶。将5 μL PCR扩增产物加入样品孔。电泳时设立DNA标准分子量Marker作对照, 120 V电泳约30 ~ 40 min时停止。

8.5 结果判定

在紫外灯下观察结果, CPV阳性对照出现337 bp特异性扩增片段, CCV阳性对照出现852 bp特异性扩增片段, 而阴性对照没有特异性扩增片段, 试验结果成立。

待测样品电泳后若出现337 bp特异性扩增条带, 将该扩增片段回收, 送至测序公司进行序列测定, 并在BLAST网站进行序列比对, 与CPV同源性大于98 %, 判定为CPV核酸阳性, 若出现852 bp特异性扩增片段, 将该扩增片段回收, 送至测序公司进行序列测定, 并在BLAST网站进行序列比对, 与CCV同源性大于98 %, 判定为CCV核酸阳性, 若无核酸条带或核酸条带的大小与阳性对照不一致则判为PCR阴性。

9 生物安全要求

实验室生物安全要求应符合GB19489的相关要求。

附录 A
(规范性)
相关试剂的配置

A.1 8 mM NaOH溶液

称量0.32 g NaOH，溶解到1000 mL去离子水中，混匀，分装，常温保存。

A.2 磷酸盐缓冲液 (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 Na₂HPO₄和0.24 g KH₂PO₄。用HCl调节溶液的pH值至7.4，加水至1 L。分装后经121 °C、15 min高压灭菌后备用。

中国兽医协会
CVMA

附 录 B
(资料性)
阳性对照参考基因序列

B.1 犬细小病毒阳性对照参考基因序列 (GenBank Accession No.OM523076.1)

5'-CAATCAAACCAACCTGGCGTACTCACAA**AAGACGTGCAAGCGAGTCCA**ACGTGGTCCGA
AATAGAGGCAGACCTGAGAGCCATCTTTACTTCTGAACAATTGGAAGAAGATTTTCGAGACGACT
TGGATTAAGGTACGATGGCACCTCCGGCAAAGAGAGCCAGGAGAGGTAAGGGTGTGTTAGTGAA
GTGGGGGGAGGGGAAAGATTTAATAACTTAACTAAGTATGTATTTTTTTGTAGGACTTGTGCCTC
CAGGTTATAAATATCTTGGGCCTGGGAACAGTCTTGACCAAGGAGAACCAACTAACCCCTTCTGAC
GCCGCTGCAAAGAACACGACGAAGCT**TTACGCTGCTTATCTTCGCTCT**TGGTAAAACCCATAC
TTATATTT -3'

注：上述序列为连入pMD-18T载体中的包含犬细小病毒目标检测片段部分，下划线粗体部分为引物序列。

B.2 犬冠状病毒阳性对照参考基因序列 (GenBank Accession No. MT114543.1)

5'-AACAA**AGATGTTGCGTGTATTGGT**AAATTCCTTAAGACAAACTGTTCAAGATTTAGGAA
TTTGACAAACATGATGCCTACTACATTGTCAAACGTTGTACAAAGACCGTTATGGACCATGAGC
AAGTCTGTTATAACGATCTTAAAGATTCTGGTGCAGTTGCTGAGCATGACTTCTTTACTTACAAGG
AAGGCAGATGTGAATTCGGCAATATCGCACGTAGGGATCTTACAAAGTACACAATGATGGATCT
TTGTTATGCTATTAGAACTTTGATGAAAAGAACTGTGAAGTTCTCAAAGAAATACTCGTGACAG
TAGGTGCTTGCCTGAAGAATTCTTTGACAACAAAGATTGGTTTGTATCCAGTTGAAAATGAAGCC
ATACACGAAGTTTACGCAAACTTGGACCCATTGTAGCCAATGCTATGCTTAAATGCGTTGCTTT
TTGTGATGCCATAGTAGAAAAGGGCTATATAGGTATTATAACACTTGACAACCAAGATCTTAATG
GCAATTTCTACGACTTCGGAGATTTTCGTAAAACTGTCCCCGTTTTGGTTGTGCCTGTGTTACAT
CATATTACTCTTATATGATGCCTTTAATGGGAATGACTTCATGCTTAGAGTCTGAAAACCTTTGTGA
AAAGTGAAATTTATGGTTCTGATTACAAGCAGTATGATTTACTGGCTTATGATTTCACTGAACAT
AAGGAGTACCTTTTCCAGAAATACTTTAAGTACTGGGATCGCACGTACCACCCAAATTGTTCTGA
TTGTACTAGTGATGAGTGTATCATTGCTAATTTCAACACACTATTTTCTATGACA**ATACC**
AATGACTGCTTTCGGACCACCTTGCCGTAAAGTTCACATTGATGGTGTGCCGTTGTTGTTACTG
CAGGTTACCATTTTAAACAACCTTGGTATTGTGTGGAATCTTGATGTGAAATTGGACACAATGA-3'

注：上述序列为连入pMD-18T载体中的包含犬冠状病毒目标检测片段部分，下划线粗体部分为引物序列。

附 录 C
(资料性)
引物和探针序列

C.1 引物、探针的名称与序列见表C.1。

表C.1 引物和探针序列

病原	名称	序列	扩增片段
CPV	P1	5'-AAGACGTGCAAGCGAGTCC-3'	337 bp
	P2	5'-GAGCGAAGATAAGCAGCGTAA-3'	
CCV	C1	5'-AGATGTTGCGTGTATTGGT-3'	852 bp
	C2	5'-CCGAAAGCAGTCATTGGTAT-3'	

注：引物和探针可由生物公司合成，用TE溶液溶解并稀释至100 μ M储存浓度，-20 $^{\circ}$ C保存备用，保存期为1年；根据需要配制成10 μ M工作液，-20 $^{\circ}$ C保存供检测使用，如经常使用反复冻融，有效期为3个月。

附 录 D
(资料性)
双重 RT-PCR 反应体系和反应程序

D.1 双重RT-PCR反应体系

双重 RT-PCR 反应体系见表 D.1。

表D.1 双重RT-PCR反应体系

混合液组分	体积 (μL)	终浓度 (nM)
2×Multiplex RT-PCR 缓冲液	10	1×
Multiplex 酶混合液	1.0	1×
引物 P1	0.8	400
引物 P2	0.8	400
引物 C1	0.8	400
引物 C2	0.8	400
病毒核酸模版	5.0	/
DEPC 水补至总体积	25	/

D.2 双重RT-PCR反应程序

双重 RT-PCR 反应程序见表 D.2。

表D.2 荧光PCR反应程序

温度	反应时间	循环数
50 °C	5min	1
95 °C	2 min	1
95 °C	30 s	40
55 °C	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	10 min	1