

ICS 65.020.30

B 44



中国实验动物学会团体标准

T/CALAS 66—2019

实验动物 猫细小病毒检测方法

Laboratory animals - Method for examination of feline parvovirus

2019-07-10 发布

2019-08-01 实施

中国实验动物学会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则编写。

本标准附录为资料性附录。

本标准由中国实验动物学会归口。

本标准由全国实验动物标准化技术委员会（SAC/TC281）技术审查。

本标准由中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会提出并组织起草。

本标准起草单位：中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

本标准主要起草人：曲连东、刘家森、姜骞、郭东春、杨鸣发、康洪涛、李志杰、胡晓亮、刘明、田进。

实验动物 猫细小病毒检测方法

1 范围

本标准规定了实验动物猫细小病毒的检测方法。

本标准适用于猫细小病毒的检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本标准的应用是必不可少的。凡是注明日期的引用文件，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

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存和运输技术规范

3 病毒的分离

3.1 主要仪器与试剂

3.1.1 仪器

3.1.1.1 二氧化碳培养箱

3.1.1.2 离心机

3.1.1.3 组织研磨器械

3.1.1.4 倒置显微镜

3.1.1.5 微量加样器

3.1.2 耗材

3.1.2.1 吸管

3.1.2.2 孔径 0.22 μ m 滤器

3.1.2.3 注射器

3.1.2.4 细胞培养瓶

3.1.3 试剂

3.1.3.1 CRFK 细胞 [feline (*Felis catus*) renal cell]

3.1.3.2 MEM 培养基 (minimum essential media)

3.1.3.3 新生牛血清

3.1.3.4 胰酶

3.1.3.5 无菌 PBS

3.1.3.6 实验用水应符合 GB/T 6682 要求。

3.2 操作步骤

3.2.1 样品处理

取直肠棉拭子、新鲜粪便，加10倍体积的无菌PBS，混合振荡，5000g离心30min，吸取离心上清，经0.22 μ m滤器过滤，-20℃保存备用。取肠组织，加10倍体积的无菌PBS匀浆研磨制成悬液，研磨过程中冻融3次，5000g离心30min，吸取离心上清，经0.22 μ m滤器过滤，-20℃保存备用。样品的采集可参考NY/T 541。

3.2.2 病毒接种

用含8%新生牛血清的MEM培养基，在细胞培养瓶培养CRFK细胞。待长满单层的细胞，经无菌PBS清洗2~3次，加入胰酶消化细胞，再加入含8%新生牛血清的MEM培养基吹打细胞，分瓶传代培养。分瓶传代细胞悬液中，按1:20比例(V:V)分别接入经处理后的病料上清，置于37℃、5% CO₂培养箱中培养，每天观察细胞病变(CPE)的出现情况。未出现CPE则继续盲传到第三代，记录细胞病变情况，并将第三代培养物保存于-20℃。出现CPE，则继续增殖传代到第三代，将培养物保存于-20℃。

3.3 结果判定

若接入的CRFK细胞中未出现细胞病变，则判定病毒分离阴性；若CRFK细胞出现病变，则初步判定病毒分离阳性。

4 PCR方法

4.1 主要仪器与试剂

4.1.1 仪器

4.1.1.1 PCR仪

4.1.1.2 离心机

4.1.1.3 组织研磨器械

4.1.1.4 微量加样器

4.1.1.5 水平电泳仪

4.1.1.6 凝胶成像系统

4.1.2 耗材

4.1.2.1 吸管

4.1.2.2 PCR管

4.1.3 试剂

4.1.3.1 引物

上游引物：5'-TGGTTCTGGGGGTGTGGG-3'；

下游引物：5'-GCTGCTGGAGTAAATGGC-3'。

扩增产物为468bp。配制成20pmol/ μ L，-20℃储存。

4.1.3.2 病毒DNA提取试剂盒

4.1.3.3 电泳缓冲液

5×TBE缓冲液(附录A.1)，使用时用去离子水稀释成1×TBE缓冲液。

4.1.3.4 1%琼脂糖凝胶(附录A.2)

4.2 操作步骤

4.2.1 样品处理

取直肠棉拭子、新鲜粪便,加入0.5mL生理盐水,振荡混匀,5000g离心2min,取上清液备用;全血样品,抗凝血经5000g离心2min,取上清液备用;肠组织样品,称取0.05g于研磨器中加入1.0mL生理盐水研磨,匀浆经5000g离心2min,取上清液备用;细胞培养物,反复冻融3次后,经5000g离心2min,取上清液备用。

4.2.2 DNA 提取

取待检样品、猫细小病毒阳性样品和阴性样品各0.2mL,经商业化病毒DNA提取试剂盒提取DNA。

4.2.3 PCR 扩增

在PCR反应管中分别加入灭菌ddH₂O 7μL、2×*Taq* PCR Mix 10μL、上下游引物(20pmol/μL)各0.5μL、模板2μL,共20μL PCR扩增体系。

PCR反应条件:95℃预变性5min;95℃变性30s,50℃延伸30s,72℃延伸30s,共进行30个循环;最后72℃延伸7min,4℃保存。

4.2.4 PCR 产物分析

制备1%琼脂糖凝胶板(附录A.1),置于电泳槽中,加入电泳液至刚刚没过凝胶。取20μL PCR产物与4μL 6×上样缓冲液混合,加入琼脂糖凝胶板的加样孔中,同时加入DNA分子质量标准。插好电极,打开电泳仪,5V/cm恒压下电泳30min,当示踪剂到达底部时停止电泳。用紫外凝胶成像系统在302nm波长的紫外光下观察,并对图片拍照、存档。用分子质量标准比较判断PCR片段大小。

4.3 结果判定

4.3.1 PCR 检测,猫细小病毒阳性对照样品可扩增出大小为468bp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。

4.3.2 在符合4.3.1的条件下,若待检样品扩增出了大小为468bp的核酸片段,则初步判定猫细小病毒核酸阳性;若待检样品无扩增条带或扩增条带大小不是468bp,则判定猫细小病毒核酸阴性。

4.3.3 待检样品扩增出的阳性基因片段应进行核酸序列测定,若其序列与提供的比对序列(附录B)的同源性大于或等于90%,则可判定为猫细小病毒核酸阳性,否则判定猫细小病毒核酸阴性。

附录 A

(资料性附录)

试剂的配制

A.1 5×TBE 缓冲液

二水乙二铵四乙酸二钠 ($\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	3.72g
三羟甲基氨基甲烷 (Tris)	54g
硼酸	27.5g
灭菌去离子水	加至1L

2℃ ~ 8℃保存

A.2 1%琼脂糖凝胶

琼脂糖	1.0g
0.5×TBE电泳缓冲液	加至100mL

微波炉中完全融化，待冷至50℃ ~ 60℃时，加溴化乙锭 (EB) 溶液15μL，摇匀，倒入电泳板上，凝固后取下梳子，备用。

附 录 B

(资料性附录)

参 考 序 列

TGGTTCTGGGGGTGTGGGGATTCTACGGGTACTTTCAATAATCAGACGGAATTTAAATTTT
TGGAAAACGGATGGGTGGAAATCACAGCAAACCTCAAGCAGACTTGTACATTTAAATATGCC
AGAAAGTGAAAATTATAAAGAGTAGTTGTAAATAATATGGATAAACTGCAGTTAAAGGA
AACATGGCTTTAGATGATACTCATGTACAAATTGTAACACCTTGGTCATTGGTTGATGCAA
TGCTTGGGGAGTTTGGTTTAATCCAGGAGATTGGCAACTAATTGTTAATACTATGAGTGAGT
TGCATTTAGTTAGTTTTGAACAAGAAATTTTAATGTTGTTTTAAAGACTGTTTCAGAATCTG
CTACTCAACCACCAACTAAAGTTTATAATAATGATTTAACTGCATCATTGATGGTTGCATTAG
ATAGTAATAATACTATGCCATTTACTCCAGCAGC
