

团 体 标 准

T/CVMA XXXXX—XXXX

犬猫细小病毒 PCR 检测方法

PCR Detection Method of Canine and Feline Parvovirus

(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

目 次

前言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 主要仪器.....	1
5 试剂和材料.....	1
6 实验步骤.....	2
附录 A（资料性） 溶液配方.....	3
附录 B（资料性） 引物序列、PCR 反应体系.....	4
附录 C（资料性） 扩增核酸序列.....	5

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。

本文件由中国农业科学院北京畜牧兽医研究所提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：中国农业科学院北京畜牧兽医研究所、上海基灵生物科技有限公司、东莞博盛生物科技有限公司、北京市动物疫病预防控制中心

本文件主要起草人：梁瑞英、崔尚金、梁琳、汤新明、朱旭、王弋、刘昕、张启龙

中国兽医协会
CVMA

犬猫细小病毒 PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了PCR诊断技术，可以同时检测犬细小病毒、猫泛白细胞减少症病毒（又称猫细小病毒）的通用PCR诊断技术。

本文件适用于检测犬猫细小病毒核酸，适用于临床样品中不同型犬细小病毒和猫细小病毒的快速检测。

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 19289 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

CPV: 犬细小病毒（Canine Parvovirus）；

FPV: 猫细小病毒（Feline Parvovirus）；

PCR: 聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction）；

CPV-2、CPV-2a、CPV-2b、CPV-2c:不同的犬细小病毒分型

5 主要仪器

冰箱、台式离心机、高速台式冷冻离心机、高压蒸汽灭菌器、PCR仪、单道微量移液器（0.1-2.5 μl ， 0.5-10 μl ， 1-100 μl ， 1-1000 μl ）、组织研磨器、水平电泳仪、紫外观察灯或凝胶成像仪。

6 试剂和材料

试验用水均为灭菌超纯水，应符合GB/T 6682中一级水的要求、医用棉签、枪头（10 μl ， 200 μl ， 1000 μl ）、1.5 ml EP管、0.2 ml PCR管、dNTP（含dATP、dTTP、dCTP、dGTP各10 mmol/L，-20℃保存。）、PCR检测引物序列及反应液配方见附录B。10%十二烷基硫酸钠：配制参见附录A.1、蛋白酶K贮备液：配制参见附录A.2、5×TBE电泳缓冲液：配制参见附录A.3。

7 实验步骤

7.1 样品的采集与处理

7.1.1 血清样品采集

怀疑细小病毒感染的犬猫，使用非抗凝管采集全血，详细标记，登记，室温静置 30 min~1 h，放入离心机并配平，4000r/min，离心 5 min，用移液器取离心后的上层血清至做好标记的 EP 管，保存备用。

7.1.2 粪便或肛拭子样品采集

使用粪便盒收集发生腹泻的犬猫新鲜粪便，或使用棉拭子肛门转圈采集粪便样品加适量 PBS (pH7.0) 或灭菌超纯水，充分混匀后，10000r/min 离心 5min；取上层水加盖，编号，保存备用。

7.2 核酸 DNA 提取

1) 取样品处理液 465 μ l，加入 25 μ l 10% 十二烷基硫酸钠和 10 μ l 的 20 mg/mL 蛋白酶 K，56 $^{\circ}$ C 水浴摇床上放置 2h；

2) 加入等量的饱和酚溶液 500 μ l，振荡混匀 20 s，12000 g 离心 5 min，取上清液；

3) 加入等量的酚：三氯甲烷：异戊醇 (25：24：1)，振荡混匀 20 s，12000 r/min，离心 5 min，取上清液；

4) 再加入等量的三氯甲烷：异戊醇 (24：1)，振荡混匀 20 s，12000 r/min 离心 5 min，取上清液；

5) 最后加入两倍体积的无水乙醇，上下颠倒混匀，12000 r/min 离心 10 min，弃上清；

6) 室温干燥后，加入 30 μ l 灭菌双蒸水溶解沉淀，即得 DNA 模板，-20 $^{\circ}$ C 贮存备用。

7) 另外，DNA 抽提也可采用市售的商品化 DNA 抽提试剂盒进行。

7.3 PCR 检测

反应体系见附录 B.2。按下述条件进行扩增：96 $^{\circ}$ C 预变性 5min、(96 $^{\circ}$ C 30s、52 $^{\circ}$ C 30s、72 $^{\circ}$ C 45s，重复此循环 30 次) 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。反应完毕，取 PCR 反应液进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳。

7.4 结果判定

若待检样品可扩增出大小为 669 bp 的核酸片段（参考核酸序列见附录 C），则判定细小病毒核酸阳性；若待检样品未扩增出核酸片段，同时加入的阴性对照（即核酸模板用灭菌水替代）成立，则判定核酸检测阴性。

附录 A
(资料性)
溶液配方

A.1 10%十二烷基硫酸钠(SDS)

在45 ml 三蒸水溶解5 g 十二烷基硫酸钠(电泳级), 加热至60℃溶解, 用盐酸调pH值至7.8, 加三蒸水定容至50 ml。

A.2 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.3 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。

中国兽医协会
CVMA

附 录 B
(资料性)
引物序列、PCR 反应体系

B.1 引物序列

B.1.1 犬猫细小病毒核酸PCR检测方法通用引物序列见表B.1。

表 B.1 引物序列

引物	引物序列 (5' -3')	犬猫细小病毒扩增片段(bp)
上游	GTAAGCTTCCAGGAGACTTT	669
下游	GTAAGCTTCGTCGTGTTC	

B.2 PCR反应液配方

B.2.1 犬猫细小病毒核酸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	反应体系
10 ×PCR Buffer(with Mg ²⁺)	5 μl
Taq DNA Polymerase (5U/μL)	0.5 μl
dNTP (2.5mM each)	4 μl(终浓度0.2mM each)
上游引物 (100 mM)	0.2 μl(终浓度0.2μM)
下游引物 (100 mM)	0.2 μl(终浓度0.2μM)
待检样品DNA模板	2.0 μl (推荐0.1~1μg)
灭菌超纯水 (至终体积50μl)	38.1 μl

B.2.2 注意事项

通常引物终浓度为0.2μM时可以获得良好的检测效果，可根据情况在0.1~1μM范围内调整引物的终浓度。扩增效率不高时，可提高引物浓度，发生非特异性反应时，可降低引物浓度。

附录 C
(资料性)

扩增核酸序列

AAGCTTCCAGGAGACTTTGGTTTGGTTGATAAAGAAGAATGGCCTTTAATATGTGCATGGTTAGT
TAAACATGGTTATGAATCAACCATGGCTAACTATACACATCATTGGGGAAAAGTACCAGAATGG
GATGAAAAGTGGGCGGAGCCTAAAATACAAGAAGGTATAAATTCACCAGGTTGCAAAGACTTAG
AGACACAAGCGGCAAGCAATCCTCAGAGTCAAGACCAAGTTCTAACTCCTCTGACTCCGGACGT
AGTGGACCTTGCACTGGAACCGTGGAGTACTCCAGATACGCCTATTGCAGAAACTGCAAATCAA
CAATCAAACCAACTTGGCGTTACTCACAAAGACGTACAAGCGAGTCCGACGTGGTCCGAAATAG
AGGCAGACCTGAGAGCCATCTTTACTTCTGAACAATTGGAAGAAGATTTTCGAGACGACTTGGAT
TAAGGTACGATGGCACCTCCGGCAAAGAGAGCCAGGAGAGGTAAGGGTGTGTTAGTAAAGTGGG
GGGAGGGGAAAGATTTAATAACTTAACTAAGTATGTGTTTTCTTATAGGACTTGTGCCTCCAGGT
TATAAATATCTTGGGCCTGGGAACAGTCTTGACCAAGGAGAACCAACTAACCTTCTGACGCCGC
TGCAAAGAACACGACGAAGCTTAC

中国兽医协会
CVMA