

团 体 标 准

T/CVMA 206—2024

猫呼吸道症候群五种病原荧光 RAA 检测方法

Real-time RAA detection method for five pathogens of feline respiratory
syndrome

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
全国动物卫生大会

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：浙江农林大学动物科技学院动物医学院、杭州迅灵生物科技有限公司、浙江领与生物科技有限公司。

本文件主要起草人：林淦、孙静、邵春艳、吴芹、曾欢、付玉和、金霞、刘怡炜、唐浩、雷晨曦、谢铭。

中国兽医协会
CVMA
全国团体

猫呼吸道症候群五种病原荧光 RAA 检测方法

1 范围

本文件描述了猫呼吸道症候群五种病原荧光RAA检测方法。

本文件适用于猫呼吸道症候群（猫杯状病毒、猫疱疹病毒I型、猫支原体、猫衣原体、支气管败血波氏杆菌）的快速定性检测。

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。

BHQ1: 黑洞淬灭基团 1 (black hole quencher 1)
CTAB: 十六烷基三甲基溴化铵 (cetyltrimethylammonium bromide)
DNA: 脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid)
EDTA: 乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid)
FAM: 6-羧基荧光素 (6-carboxyfluorescein)
MMLV: 莫洛尼氏鼠白血病逆转录病毒 (moloney murine leukemia retrovirus)
PBS: 磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffered saline buffer)
RNA: 核糖核酸 (ribonucleic acid)
RAA: 重组酶介导链替换核酸扩增 (recombinase-aid amplification)
RT-RAA: 反转录重组酶介导链替换扩增 (reverse transcription-recombinase-aid amplification)
Tris: 三(羟甲)基氨基甲烷 (tri-methylolaminomethane)

5 试剂和材料

5.1 试剂

5.1.1 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。

5.1.2 CTAB 提取缓冲液 (pH8.0)：10 g/L CTAB，0.7 mol/L NaCl，0.05 mol/L Tris-HCl，0.01 mol/L Na₂EDTA。

5.1.3 DNA/RNA 抽提液：酚：三氯甲烷：异戊醇 (25：24：1)。

5.1.4 异丙醇。

5.1.5 70% (体积分数) 乙醇。

5.1.6 TE 缓冲液 (pH 8.0)：10 mmol/L Tris-HCl (pH8.0)，1 mmol/L EDTA (pH8.0)。

5.1.7 PBS 缓冲液 (pH 7.4)：8 g NaCl，0.2 g KCl，1.42g Na₂HPO₄，0.27g KH₂PO₄，定容 1L。

5.1.8 启动剂：15% 聚乙二醇，280 mmol/L 乙酸镁。

5.1.9 商品化 RAA 荧光反应单元：包含重组酶、单链结合蛋白、DNA 聚合酶的冻干粉。

5.1.10 商品化 RT-RAA 荧光反应单元：包含 MMLV 逆转录酶、重组酶、单链结合蛋白、DNA 聚合酶的冻干粉。

5.1.11 猫杯状病毒的阳性对照的制备见附录 A 中 A.1，猫疱疹病毒、猫支原体、猫衣原体、支气管败血波氏杆菌的阳性对照见附录 A 中 A.2。

5.1.12 阴性对照为已知猫疱疹病毒、猫杯状病毒、猫支原体、猫衣原体、支气管败血波氏杆菌阴性的猫口鼻拭子或眼分泌物拭子悬液。

5.2 引物和探针

5.2.1 猫杯状病毒荧光 RT-RAA 的引物探针按照附录 B 中表 B.1，特异性扩增片段序列见附录 C 中 C.1。

5.2.2 猫疱疹病毒荧光 RAA 的引物探针按照附录 B 中表 B.2，特异性扩增片段序列见附录 C 中 C.2。

5.2.3 猫支原体荧光 RAA 的引物探针按照附录 B 中表 B.3，特异性扩增片段序列见附录 C 中 C.3。

5.2.4 猫衣原体荧光 RAA 的引物探针按照附录 B 中表 B.4，特异性扩增片段序列见附录 C 中 C.4。

5.2.5 支气管嗜血波氏杆菌荧光 RAA 的引物探针按照附录 B 中表 B.5，特异性扩增片段序列见附录 C 中 C.5。

6 仪器设备

6.1 恒温荧光检测仪。

6.2 冷冻高速离心机。

6.3 微量移液器：量程 0.5 μL ~ 10 μL，10 μL ~ 100 μL，20 μL ~ 200 μL，200 μL ~ 1000 μL。

6.4 涡旋振荡器。

- 6.5 纯水仪。
- 6.6 -80℃超低温冰箱。
- 6.7 冰箱：2℃~8℃。

7 样品的采集与处理

7.1 通则

样品的采集、保存与运输按照NY/T 541执行。实验室生物安全要求按照GB 19489的规定。

7.2 样品的采集

7.2.1 鼻拭子

用无菌拭子插入鼻腔。轻轻擦拭并慢慢旋转至少3圈，将拭子置于1 mL的PBS缓冲液样品保存管，4℃保存备用。

7.2.2 口腔拭子

用无菌拭子在口腔内转动至少3圈，采集口腔分泌物，将拭子置于1 mL的PBS缓冲液样品保存管，4℃保存备用。

7.2.3 眼分泌物拭子

用无菌拭子轻轻擦拭眼分泌物后，置于1 mL的PBS缓冲液样品保存管，4℃保存备用。

7.3 样品处理

将含有口腔（鼻）拭子或眼分泌物拭子样品保存管在旋涡震荡仪上充分混匀，在4℃下3000 r/min离心5 min，取上清液，转移至1.5 mL灭菌离心管中即用。

8 操作方法

8.1 核酸提取

8.1.1 在样本制备区进行，核酸提取使用CTAB法提取，也可采用其他等效核酸提取方法。

8.1.2 待检样品、阳性对照和阴性对照的份数总和用n表示，取n个灭菌1.5 mL离心管，逐管编号。

8.1.3 将7.3处理后的样本上清液转移至1.5 mL离心管中，加入600 μL CTAB提取缓冲液，涡旋振荡混匀后于70℃孵育15 min，期间颠倒离心管2~3次。12000 r/min离心5 min，取上清液于一新的1.5 mL离心管中。

8.1.4 加入500 μL酚：三氯甲烷：异戊醇（25：24：1），上下颠倒离心管2~3次后涡旋振荡混匀，12000 r/min离心5 min；转移上层水相至一新的1.5 mL离心管中。

8.1.5 加入0.7倍体积异丙醇，上下颠倒离心管2~3次，4℃静置30 min，4℃下12000 r/min离心3 min，小心弃去上清液。

8.1.6 加入700 μL 70%（体积分数）乙醇，重悬沉淀，12000 r/min离心1 min，小心弃去上清液。

8.1.7 打开管盖，室温挥发干液体，加入 50 μL ~ 100 μL TE 缓冲液（pH8.0）溶解核酸，可直接进行检测或-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。

8.2 扩增试剂的准备与配置

8.2.1 在试剂储存和准备区进行。

8.2.2 扩增反应体系：猫杯状病毒的 RT-RAA 反应体系见附录 D 中表 D.1；猫疱疹病毒、猫支原体、猫衣原体和支气管败血波氏杆菌的 RAA 反应体系见附录 D 中表 D.2。根据 8.1.2 中提到的 n 值，按照 $n+1$ 分别配制五种反应体系，充分混匀后分装，每个反应管 20 μL ，转移至样本制备区。

8.3 加样

8.3.1 在样本制备区进行。

8.3.2 每个反应管盖加入 5 μL 提取的核酸，加样顺序为阴性对照、样本、阳性对照，记录反应管对应样本编号，盖紧管盖后，转移至样本扩增区。

8.4 荧光 RAA 和 RT-RAA 反应

8.4.1 样本扩增区进行。

8.4.2 将 8.3 加样后的反应管瞬时离心混匀后放入恒温荧光检测仪中，设置选定 FAM 作为报告基团，选择 None 作为淬灭基团，RAA 和 RT-RAA 的反应程序如下：39 $^{\circ}\text{C}$ ，60 s，一个循环；39 $^{\circ}\text{C}$ ，30 s，40 个循环，在第二阶段循环结束收集荧光。

9 结果判断与表述

9.1 质量控制

按 GB/T 27401 结果质量控制规定执行，阴性对照无荧光对数增长，无相应 T 值（时间）；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 T 值（时间） ≤ 15 min。阴性对照同时成立，实验结果才能判定有效。

9.2 阳性

如 T 值（时间） ≤ 15 min，则判定被检样品阳性，表述为“检出阳性片段”。如 15 min $<$ T 值（时间） < 20 min，则重复一次。如再次检测结果仍然是 15 min $<$ T 值（时间） < 20 min，则判定被检样品阳性，表述为“检出阳性片段”。

9.3 阴性

如无报告 T 值（时间）或无荧光对数增长则判定被检样品阴性，表述为“未检出阳性片段”。

附录 A
(资料性)
阳性对照的制备

A.1 猫杯状病毒阳性对照制备

合成猫杯状病毒装甲RNA假病毒（MS2噬菌体假病毒），将装甲RNA假病毒载体转化至大肠杆菌BL21（DE3）表达系统后诱导表达纯化获得装甲RNA病毒颗粒，并对提取后装甲RNA病毒颗粒进行逆转录和猫杯状病毒的荧光PCR检测。检测阳性的，即为猫杯状病毒荧光RT-RAA检测的阳性对照母液。将阳性对照母液10倍系列稀释之后，选取 10^4 拷贝/ μL 稀释度作为阳性对照。

A.2 猫疱疹病毒、猫支原体、猫衣原体、支气管败血波氏杆菌阳性对照制备

分别合成猫疱疹病毒、猫支原体、猫衣原体、支气管败血波氏杆菌特异性扩增片段，克隆至pUC57载体，再转化至DH5 α 感受态细胞，构建重组质粒，提取重组质粒进行PCR检测和测序分析，结果正确的为阳性重组质粒。利用超微量分光光度计测定阳性重组质粒浓度，并将浓度换算成拷贝数（DNA拷贝/ μL ）= $[6.02 \times 10^{23} \times \text{DNA浓度} (\text{ng}/\mu\text{L}) \times 10^{-9}] / (\text{DNA碱基数} \times 660)$ ，即为用于猫支原体、猫衣原体、支气管败血波氏杆菌实时RAA荧光检测的阳性对照母液。将阳性对照母液10倍系列稀释之后，选取 10^4 拷贝/ μL 稀释度作为阳性对照。

附 录 B
(规范性)
引物和探针序列

B.1 猫杯状病毒引物探针序列

猫杯状病毒荧光RT-RAA引物探针序列见表B.1。

表 B.1 猫杯状病毒 RT-RAA 引物探针序列

名称	引物/探针序列 (5'→3')	扩增长度	基因
FCV-F	TTTGGAGCATTACAACAGCCAGTTTAATGG	139	ORF1
FCV-R	AGTATTTAAGCACGTTAGCGCAGGTTGAG		
FCV-P	ATTTGAGTGGCATGACCGCCCTACACTGTGA[FAM-dT] [THF][BHQ1-dT]GTTTCGAAGTTTGAG-C3 Spacer		

B.2 猫疱疹病毒引物探针序列

猫疱疹病毒荧光RAA引物探针序列见表B.2。

表 B.2 猫疱疹病毒 RAA 引物探针序列

名称	引物/探针序列 (5'→3')	扩增长度	基因
FHV-F	GTACCTGGTCAGAGCGGATGAAAATCG	187	UL23
FHV-R	TCTTGCTTGATAGTGGCGGTGATATAGG		
FHV-P	GTCTCTTTGAAACTGATGTTGTCGGTGG[FAM-dT] [THF][BHQ1-dT]CTATGCCGTCCAGGA-C3 Spacer		

B.3 猫支原体引物探针序列

猫支原体荧光RAA引物探针序列见表B.3。

表 B.3 猫支原体 RAA 引物探针序列

名称	引物/探针序列 (5'→3')	扩增长度	基因
MYC.F-F	TGCAGGAGATAACGCTGGATTACTTCG	105	tuf
MYC.F-R	AATTCTGTGTGAGGGATAATTGAACCTG		
MYC.F-P	TGGATTACTTCGTGGAGTAAACCGTGAAGA[FAM-dT] [THF][BHQ1-dT] TGAACGTGGACAAG-C3 Spacer		

B.4 猫衣原体引物探针序列

猫衣原体荧光RAA引物探针序列见表B.4。

表 B.4 猫衣原体荧光 RAA 引物探针序列

名称	引物/探针序列 (5'→3')	扩增长度	基因
C.F-F	GCTATACGGGTTTCGATCATCTTTTCAGG	103	pmp9
C.F-R	TAGATGGGCTCCTTTTTCTAAACTAAA		

名称	引物/探针序列 (5'→3')	扩增长度	基因
C.F-P	ATGAAGCATGTTTCTAAATTTTCCCAACC[FAM-dT] [THF][BHQ1-dT] TACCCTATCCGCAG-C3 Spacer		

B.5 支气管败血波氏杆菌引物探针序列

支气管败血波氏杆菌荧光RAA引物探针序列见表B.5。

表 B.5 支气管败血波氏杆菌 RAA 引物探针序列

名称	引物/探针序列 (5'→3')	扩增长度	基因
Bb-F	ACTCGAATACCAGGTCGCTGATCGCAGT	152	dnt
Bb-R	GGTTTCCAATTTGAAGAAAATGCAGGTG		
Bb-P	CAGTGGTTGATCGCACTCGATGTCTA [FAM-dT][THF][BHQ1-dT]CGGCGTGTGATCG-C3 Spacer		

附录 C
(资料性)
目的基因序列

C.1 猫杯状病毒阳性对照参考序列 (GenBank Accession No.PP554943.1)

TTTGGAGCATTACAACAGCCAGTTTAATGGCGTGGAGGCGCGGTATGACCAGATCGATTT
GAGTGGCATGACCGCCCTACACTGTGATGTGTTTGAAGTTTGAGCATGTGCTCAACCTGCGCTA
ACGTGCTTAAATACT

注：黑体为上下游引物序列；下划线为探针序列。

C.2 猫疱疹病毒阳性对照参考序列 (GenBank Accession No.PQ323570.1)

GTACCTGGTCAGAGCGGATGAAAATCGACCGGGATATACTTACTACTTCCCAGAACCAAT
GCTATACTGGCGTAGTCTCTTTGAAACTGATGTTGTGCGGTGGTATCTATGCCGTCCAGGACCGGA
AACGACGTGGTGAATTATCAGCTGAAGATGCTGCCTATATCACCGCCACTATCAAGCAAGA

注：黑体为上下游引物序列；下划线为探针序列。

C.3 猫支原体阳性对照参考序列 (GenBank Accession No.FJ896388.1)

TGCAGGAGATAACGCTGGATTACTTCGTGGAGTAAACCGTGAAGATATTGAACGTGG
ACAAGTTTTAGCTAAACCAGGTTCAATTATCCCTCACACAGAATT

注：黑体为上下游引物序列；下划线为探针序列。

C.4 猫衣原体阳性对照参考序列 (GenBank Accession No. MW756209.1)

GCTATACGGGTTTCGATCATCTTTTCAGGAAGGTATATCCCTAGTACTCAAGAAATAATGA
AGCATGTTTCTAAATTTCCCAACCTATTACCCTATCCGCAGGATCTTTAGTTTTAGAAAAGGA
GCCCATCTA

注：黑体为上下游引物序列；下划线为探针序列。

C.5 支气管败血波氏杆菌阳性对照参考序列 (GenBank Accession No.LR134480.1)

ACTCGAATACCAGGTCGCTGATCGCAGTGCGGGACAAGGCGGCGATCAACACGCCGAGA
TAGACATCGAGTGCATCAACCACTGCAGGATCAATGACTCAGGCTCGAGACGAGCACGAATCG
CCACCTGCATTTTCTTCAAATTGGAACC

注：黑体为上下游引物序列；下划线为探针序列。

附 录 D
(资料性)
反应体系

D.1 猫杯状病毒荧光 RT-RAA 反应体系

猫杯状病毒荧光 RT-RAA 反应体系见表 D.1。

表 D.1 猫杯状病毒荧光 RT-RAA 扩增体系

反应液组分	体积 (μL)
RT-RAA 荧光反应单元 (25μL 冻干粉)	-
启动剂	14
正向引物 (10 μmol/L)	1.0
反向引物 (10 μmol/L)	1.0
探针	0.3
ddH ₂ O	3.7
总体积	20

D.2 猫疱疹病毒、猫支原体、猫衣原体和支气管败血波氏杆菌荧光 RAA 反应体系

猫疱疹病毒、猫支原体、猫衣原体和支气管败血波氏杆菌荧光 RAA 反应体系见表 D.2。

表 D.2 猫疱疹病毒、猫支原体、猫衣原体和支气管败血波氏杆菌荧光 RAA 反应体系

反应液组分	体积 (μL)
RAA 荧光反应单元 (25μL 冻干粉)	-
启动剂	14
正向引物 (10 μmol/L)	1.0
反向引物 (10 μmol/L)	1.0
探针	0.3
ddH ₂ O	3.7
总体积	20