

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4667—2025

犬瘟热病毒、犬细小病毒检测 二重荧光PCR法

Method of duplex real-time PCR for detection of canine
distemper virus and canine parvovirus

2025-01-09 发布

中华人民共和国农业农村部 发布



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。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国伴侣动物(宠物)标准化技术委员会(SAC/TC 541)归口。

本文件起草单位：上海市动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人：赵洪进、鞠厚斌、杨德全、刘佩红、王建、周锦萍、吴秀娟、李鑫、沈海潇、葛菲菲、刘健、李凯航、杨显超、王晓旭、邓波、卢军、葛杰、陶田谷晟。



犬瘟热病毒、犬细小病毒检测 二重荧光 PCR 法

1 范围

本文件规定了犬瘟热病毒和犬细小病毒二重荧光 PCR 检测方法的试剂和材料、仪器设备、样品的采集与处理、操作方法、结果判定和检测要求。

本文件适用于犬的全血、组织(脑、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、小肠、肠系膜淋巴结等)、粪便、鼻拭子、眼分泌物及细胞培养物犬瘟热病毒和犬细小病毒核酸的检测。

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

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

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。

荧光 PCR: 荧光聚合酶链式反应(real-time polymerase chain reaction)

BHQ: 无荧光淬灭基团(black hole quencher)

CDV: 犬瘟热病毒(canine distemper virus)

CPV: 犬细小病毒(canine parvovirus)

C_t 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)

DEPC: 焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate)

DNA: 脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

dNTP: 脱氧核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate)

EDTA: 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid)

FAM: 6-羧基荧光素(6-carboxyfluorescein)

HEX: 六氯-6-甲基荧光素(hexachloro fluorescein)

PBS: 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline)

RNA: 核糖核酸(ribonucleic acid)

SDS: 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate)

5 试剂和材料

5.1 试剂

5.1.1 总则: 除特别说明外,本文件所用的试剂均为分析纯,实验室用水符合 GB/T 6682 的要求。所有试剂用无 RNA 酶污染的容器配制和分装。

5.1.2 Trizol: 2℃~8℃保存。

5.1.3 三氯甲烷: 2℃~8℃保存。

- 5.1.4 75%乙醇:用无水乙醇和 DEPC 水配制, -20℃预冷。
- 5.1.5 异丙醇: -20℃预冷。
- 5.1.6 AMV 反转录酶(10 U/ μ L)。
- 5.1.7 5 $\times$ 反转录反应预混液。
- 5.1.8 2 $\times$ PCR 反应预混液。
- 5.1.9 *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L)。
- 5.1.10 dNTP (2.5 mmol/L)。
- 5.1.11 RNase 抑制剂(40 U/ μ L)。
- 5.1.12 蛋白酶 K 溶液(10 mg/mL):取 100 mg 蛋白酶 K 加入 9.5 mL 水中,轻轻摇动,直至蛋白酶 K 完全溶解,加水定容到 10 mL。
- 5.1.13 10% SDS:取 10g SDS 溶于 100 mL 去离子水。
- 5.1.14 PBS (0.01 mmol/L, pH7.4):磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 29.02 g,磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)2.96 g,氯化钠(NaCl)8.50 g,将上述试剂溶于 1 000 mL 去离子水中,pH 调至 7.4 后,121℃高压灭菌 20 min,4℃保存备用。
- 5.1.15 DEPC 水:将 DEPC 加入去离子水中至终浓度为 0.1%(体积比),充分混合均匀后作用 12 h,分装,121℃高压灭菌 30 min,冷却后冷藏备用。

5.2 引物与探针

二重荧光 PCR 扩增用上、下游引物和探针序列应符合附录 A 的规定。

6 仪器设备

- 6.1 多通道荧光 PCR 检测仪。
- 6.2 恒温水浴锅。
- 6.3 涡旋震荡仪。
- 6.4 微量移液器:量程为 0.5 μ L~10 μ L、2 μ L~20 μ L、20 μ L~200 μ L 和 200 μ L~1 000 μ L。

7 样品的采集与处理

7.1 样品的采集

7.1.1 全血

压迫犬肘部使前臂头静脉怒张,绷紧头静脉两侧皮肤,采样针头斜面朝上、呈 15°角由远心端向近心端刺入静脉血管,见有血液流出时,缓慢抽取 1 mL 血液置于含 0.2 mL EDTA 的抗凝采血管中,并上下颠倒不少于 5 次,充分混匀,4℃保存备用。

7.1.2 组织

病死犬可采集脑、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、小肠、肠系膜淋巴结等含毒量高的组织脏器。取 1 g 组织样品并加入 2 mL 的 PBS 研磨匀浆,将组织匀浆液收集至无菌保存管中,4℃保存备用。

7.1.3 粪便

取 1 g 粪便样品置于 5 mL 的无菌保存管中,加入 1 mL 的 PBS 后混匀,4℃保存备用。

7.1.4 鼻拭子

用无菌鼻拭子插入鼻腔内,轻轻擦拭并慢慢旋转至少 3 圈,将拭子置于装有 1 mL PBS 的无菌保存管中,4℃保存备用。

7.1.5 眼分泌物

用无菌拭子轻轻擦拭眼分泌物后,置于装有 1 mL PBS 的无菌保存管中,4℃保存备用。

7.2 样品的处理

7.2.1 全血样品

血液混匀后,转入 1.5 mL 灭菌离心管中,直接用于核酸提取或 4 ℃ 保存备用。

7.2.2 组织或粪便

将含有组织或粪便匀浆液无菌保存管在涡旋震荡仪上充分混合后,在 4 ℃ 下 12 000 *g* 离心 5 min,取上清液,转入 1.5 mL 离心管中,4 ℃ 保存备用。

7.2.3 拭子

将含有鼻拭子或眼分泌物拭子无菌保存管在涡旋震荡仪上充分混合后,在 4 ℃ 下 3 000 *g* 离心 5 min 取上清液,转入 1.5 mL 离心管中,4 ℃ 保存备用。

7.2.4 细胞培养物

取培养物反复冻融 3 次,分装到 1.5 mL 离心管中,4 000 *g* 离心 1 min,取上清液待检。如果不能及时检测,则应 -20 ℃ 保存备用。

8 操作方法

8.1 样品 RNA 提取及反转录

8.1.1 在样本制备区进行。

8.1.2 样品 RNA 提取及反转录按附录 B 中 B.1 的规定执行。

8.2 样品 DNA 提取

8.2.1 在样本制备区进行。

8.2.2 样品 DNA 提取按 B.2 的规定执行。

8.3 扩增试剂的准备与配制

8.3.1 在试剂储存和准备区进行。

8.3.2 二重荧光 PCR 反应体系。每个检测反应体系需要 19 μL 荧光 PCR 反应液,具体为 2 $\times$ PCR 反应预混液 12.5 μL ,Ex *Taq* (5U/ μL) 0.5 μL ,上、下游引物 P1、P2、P3、P4 (20 pmol/ μL) 各 0.8 μL ,探针 P5、P6 (20 pmol/ μL) 各 0.6 μL ,DEPC 水 1.6 μL ,混合均匀。

同时设置阳性对照(取 CDV、CPV 细胞培养物的 RNA 反转录产物或 DNA 为模板)、阴性对照(不含 CDV、CPV 细胞培养物的 RNA 反转录产物或 DNA 模板)和空白对照(DEPC 水,在扩增反应阶段设置)。

8.4 加样

8.4.1 在样本制备区进行。

8.4.2 在 8.3.2 的反应管中分别加入 8.1.2 中制备的 RNA 反转录产物和 8.2.2 中制备的 DNA 溶液各 3 μL ,使每管总体积达到 25 μL ,记录反应管对应的样品编号。盖紧管盖后,500 *g* 离心 30 s。转移至扩增区。

8.5 荧光 PCR 反应

8.5.1 在扩增区进行。

8.5.2 将 8.4.2 中加样后的反应管放入荧光 PCR 检测仪中,设置探针:报告基团选择 FAM 和 HEX 两个荧光通道,淬灭基团均选择无(None)荧光。在荧光 PCR 仪上进行以下反应:95 ℃ 5 min;95 ℃ 5 s,60 ℃ 35 s,在每个循环第二步(60 ℃ 35 s)收集荧光信号,共 40 个循环。

9 结果判定

9.1 阈值设定

阈值线设定于刚好超过阴性对照扩增曲线的最高点。不同仪器可根据仪器噪音情况进行调整。

9.2 质量控制

阳性对照均有对数扩增曲线,且 C_t 值 ≤ 30 ;阴性对照没有对数扩增曲线,且无 C_t 值,二者均成立可判定试验成立,否则试验无效。

9.3 结果描述及判定

9.3.1 阴性

无 Ct 值且无典型的扩增曲线,表明犬瘟热病毒或犬细小病毒核酸阴性。

9.3.2 阳性

选择 FAM 通道,Ct 值 ≤ 35 ,且出现典型的扩增曲线,表明犬瘟热病毒核酸阳性。

选择 HEX 通道,Ct 值 ≤ 35 ,且出现典型的扩增曲线,表明犬细小病毒核酸阳性。

9.3.3 可疑

如被检通道 $35 < \text{Ct 值} \leq 40$,且出现典型扩增曲线的样品,判为可疑。可疑样品应重复试验,重复试验结果仍为 $35 < \text{Ct 值} \leq 40$,且出现典型扩增曲线的样品判为阳性,否则为阴性。

10 检测要求

核酸提取及检测过程应符合 SN/T 1193 的要求。

附 录 A
(规范性)
引物和探针

引物和探针的名称和序列见表 A. 1。

表 A. 1 引物和探针的名称与序列

名称	序列	简称
CDV-Primer-F1	5'-CGTCTCAGAATCAGCCATTTGTA-3'	P1
CDV-Primer-R1	5'-GTCGCCCCCTAATGCATTGTT-3'	P2
CDV-Probe-FAM	5'-FAM-CCAGAACTCCCTATACCCCATGAGCCC-BHQ1-3'	P5
CPV-Primer-F1	5'-GCTATGAGATCTGAGACATTGGGTTT-3'	P3
CPV-Primer-R1	5'-AGTTCCAGTATGAGATGGTATTAATGTTCT-3'	P4
CPV-Probe-HEX	5'-HEX-TATCCATGGAAACCAACCATACCAACTCCA-BHQ2-3'	P6

附 录 B

(规范性)

核酸提取

B.1 样品 RNA 提取及反转录

B.1.1 样品 RNA 提取

B.1.1.1 分别取 200 μL 处理后的待检样品、阳性对照(已知含 CDV 的细胞培养物)或阴性对照(不含 CDV 的细胞培养物),加 600 μL Trizol 试剂,混匀,室温静置 5 min。

B.1.1.2 加入 200 μL 三氯甲烷,充分混匀,室温静置 5 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 g 离心 15 min。

B.1.1.3 将无色的上层水相转移到新的 DEPC 处理的 1.5 mL 离心管,加入 500 μL 预冷的异丙醇,充分混匀,室温静置 5 min。

B.1.1.4 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 g 离心 15 min;弃上清,加入预冷的 1 mL 75%乙醇,洗涤沉淀。

B.1.1.5 4 $^{\circ}\text{C}$ 7 500 g 离心 10 min;弃上清,室温干燥至无乙醇残留。

B.1.1.6 加入 30 μL DEPC 水溶解,随即进行反转录或 -20°C 储存备用。

B.1.1.7 也可用等效的 RNA 提取方法提取样品 RNA。

B.1.2 反转录

反转录反应体系 20 μL :RNA 模板 5 μL ,5 $\times$ 反转录反应预混液 4 μL ,AMV 反转录酶(10 U/ μL) 1 μL ,dNTP (2.5 mmol/L) 3 μL ,下游引物 P2 (20 pmol/ μL) 1 μL ,RNase 抑制剂(40 U/ μL) 1 μL ,DEPC 水 5 μL 。将上述混合物加入到 PCR 管中,混匀,瞬时离心。

B.1.3 将 PCR 管先放入 72 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min,立即冰浴,放入荧光 PCR 仪,37 $^{\circ}\text{C}$ 反转录 1 h,94 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 3 min,直接用于检测,或置 -20°C 备用。

B.2 犬细小病毒 DNA 提取

B.2.1 分别取 200 μL 处理好的待检样品、阳性对照(已知含 CDV 的细胞培养物)或阴性对照(不含 CDV 的细胞培养物),加 200 μL pH 7.4 PBS 缓冲液,加 SDS 和蛋白酶 K 至终浓度分别为 1%和 0.5 mg/mL,混匀器上振荡混匀。

B.2.2 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min,置于沸水中孵育 8 min。

B.2.3 加 400 μL 三氯甲烷,振荡混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 g 离心 10 min,取上清。

B.2.4 可重复三氯甲烷处理步骤 1 次。

B.2.5 加 400 μL 异丙醇(-20°C 预冷),振荡混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 g 离心 10 min,弃上清。

B.2.6 加 400 μL 70%乙醇,振荡混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 g 离心 10 min。

B.2.7 小心吸弃上清,保留管底或管壁附着 DNA 沉淀,将离心管倒置于吸水纸上,尽量弃去管壁和管内液体(注意样品管分开放置以避免交叉污染),室温干燥 5 min。

B.2.8 加入 50 μL DEPC 水,轻轻混匀,溶解管壁上的核酸,室温放置 10 min,直接用于检测,或置于 -20°C 备用。

B.2.9 也可用等效的 DNA 提取方法提取犬细小病毒的 DNA。