

ICS 11.220
CCS B 41

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4436—2023

动物冠状病毒通用RT-PCR检测方法

Universal RT-PCR assay for animal coronavirus

2023-12-22 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。

本文件由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本文件起草单位：中国动物卫生与流行病学中心。

本文件主要起草人：王楷宸、庄青叶、王素春、潘俊慧、李阳、张富友、李超、李金平、侯广宇、蒋文明、王静静、刘朔、于晓慧、袁丽萍、左媛媛、尹馨、刘华雷。



引 言

冠状病毒在分类地位上属于套式病毒目(Nidovirales)、冠状病毒亚目(Cornidovirineae)、冠状病毒科(Coronaviridae)。2018年,国际病毒学分类委员会(International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)将冠状病毒科分为 Letovirinae 病毒亚科和正冠状病毒亚科(Orthocoronavirinae)2个亚科。其中, Letovirinae 病毒亚科仅包括一个属,即 *Alphaletovirus* 属;而正冠状病毒亚科则包括 α 、 β 、 γ 和 δ 4个属。冠状病毒具有宿主多样性,人和多种动物,如猪、牛、羊、禽、犬、猫、鼠、骆驼、蝙蝠、鲸鱼等均可感染,甚至引发严重疾病,严重威胁人类健康和畜牧业生产安全。目前发现的人和动物冠状病毒至少包括46个种,有的种还包含多个不同的病毒株。我国常见的动物冠状病毒,如猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)、猪流行性腹泻病毒(PEDV)、牛冠状病毒(BCoV)、马冠状病毒(ECoV)、猫传染性腹膜炎病毒(FCoV)、犬冠状病毒(CCoV)和鸡传染性支气管炎病毒(IBV)等动物冠状病毒可引起动物发病、死亡,给畜牧业造成严重的经济损失。基于国内外动物冠状病毒的流行形势,亟须建立一种动物冠状病毒通用筛查方法。本文件可用于检测各类动物冠状病毒,对动物疫病防控和公共卫生安全具有重要意义。

动物冠状病毒通用 RT-PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了动物冠状病毒通用 RT-PCR 检测方法的技术要求。
本文件适用于动物组织、分泌物、排泄物及其培养物等样品中动物冠状病毒核酸的检测。

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
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。
bp:碱基对(Base Pair)
PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate-Buffered Saline Buffer)
RdRp:RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA Polymerase)
RNA:核糖核酸(Ribonucleic Acid)
RT-PCR:逆转录-聚合酶链反应(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

5 试剂和材料

5.1 试剂

- 5.1.1 除另有规定外,所用试剂均为分析纯,所用水符合 GB/T 6682 规定的二级水。
- 5.1.2 PBS(0.01 mol/L,pH 7.4),配制方法按照附录 A 中 A.1 的规定执行。
- 5.1.3 RNA 提取试剂盒。
- 5.1.4 RT-PCR 一步法扩增试剂盒或其他等效的 RT-PCR 扩增试剂盒。
- 5.1.5 DNA 分子量标准(DL 2 000 bp 或其他等效力分子量标准)。
- 5.1.6 上样缓冲液(参照所选购上样缓冲液的说明使用)。
- 5.1.7 电泳缓冲液,配制方法按照 A.2 的规定执行。
- 5.1.8 阳性对照:经过培养的鸡传染性支气管炎或猪流行性腹泻病毒。
- 5.1.9 阴性对照:SPF 鸡胚尿囊液或 Vero 细胞培养物。

5.2 引物

引物针对冠状病毒的 *RdRp* 基因的保守区域设计,上游引物 CoV-F 的序列为:5'-GGTTGGGAT-TAYCCWAARTGYGA-3',下游引物 CoV-R 的序列为:5'-YTGTGAACAAAAYTCRTGWGGACC-3',Y 为简并碱基(Y:C/T),R 为简并碱基(R:A/G),W 为简并碱基(W:A/T)。扩增产物大小为 600 bp。

5.3 仪器设备

- 5.3.1 高速台式冷冻离心机:最高转速为 16 000 r/min。
- 5.3.2 PCR 扩增仪。
- 5.3.3 组织匀浆器。
- 5.3.4 4 ℃冰箱、-20 ℃冰箱和-70 ℃冰箱。
- 5.3.5 高压灭菌锅。
- 5.3.6 微量可调移液器(10 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL 等不同规格),以及与其配套的无核酸酶吸头。
- 5.3.7 核酸电泳系统。
- 5.3.8 凝胶成像系统。
- 5.3.9 生物安全柜。

5.4 耗材

- 5.4.1 1.5 mL 和 2 mL 的无菌 Eppendorf 管。
- 5.4.2 0.2 mL PCR 管。

6 样品采集与处理

6.1 采样方法

6.1.1 分泌物或排泄物拭子样品

- 6.1.1.1 咽喉拭子:采取时,要将拭子深入喉头或上腭裂来回刮擦 3 次~5 次,取咽喉分泌液。
- 6.1.1.2 泄殖腔/肛拭子:将拭子深入肛门或泄殖腔,转 2 圈~3 圈沾取黏液和粪便。
- 6.1.1.3 将咽喉拭子、肛/泄殖腔拭子分别或一起放入盛有 1.0 mL PBS 的 Eppendorf 管中,编号备用。样品的采集按照 NY/T 541 的规定执行。

6.1.2 内脏或组织样品

用镊、剪无菌采集气管、肺、脾等样品,置于自封塑料袋中,编号备用。

6.1.3 环境拭子样品

采集时,将拭子在待检测环境位置来回刮擦 3 次~5 次,并置于盛有 1.0 mL PBS 的 Eppendorf 管中,编号备用。

6.2 样品保存与运输

采集的样品密封后,采用保温箱或保温桶加冰密封,尽快运送到实验室。采集的样本立即置于 2 ℃~8 ℃冷藏箱或者保温箱暂存,时间不超过 24 h;样品不能被及时送到实验室时,应置于-20 ℃冰箱中保存;若需长期保存,应置于-70 ℃冰箱,避免反复冻融(最多冻融 3 次)。样品的保存与运输按照 NY/T 541 的规定执行。

6.3 样品处理

6.3.1 拭子样品处理

将 6.1.1 中所采集的分泌物、排泄物或环境拭子样品放至室温,混匀,置于高速台式冷冻离心机中 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液备用。

6.3.2 内脏或组织样品处理

将 6.1.2 中所采集的内脏或组织样品,无菌取待检样品约 2.0 g,置于研钵中充分研磨,再加 10 mL PBS 混匀,或置于组织匀浆器中,加入 10 mL PBS 匀浆,然后将组织悬液转入无菌 Eppendorf 管中 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液转入 Eppendorf 管中,备用。样品处理要符合 GB 19489 的要求。

7 RT-PCR

7.1 核酸提取

选择 RNA 提取试剂盒提取 RNA,或等效的其他 RNA 提取试剂提取 RNA。每次提取 RNA,应同时

包括阳性对照样品和阴性对照样品。

7.2 扩增试剂准备与配制

在反应混合物配制区进行,按照 RT-PCR 一步法扩增试剂盒操作说明配制。RT-PCR 反应体系各组分配制按照表 1 的规定执行。

表 1 RT-PCR 反应体系的配制

组分	体积, μL
2×1 step Buffer	12.5
上游引物 CoV-F(10 $\mu\text{mol/L}$)	1.0
下游引物 CoV-R(10 $\mu\text{mol/L}$)	1.0
一步法酶混合物	1.0
ddH ₂ O	6.5
模板 RNA	3.0
总体积	25.0

7.3 加样

在样本处理区进行。在各设定的 PCR 管中分别加入 7.1 中制备的 RNA 溶液各 3 μL ,盖紧管盖后,500 r/min 离心 30 s。每次扩增时,应当设立阳性对照、阴性对照及空白对照。阳性对照应用阳性对照样品提取核酸作为模板,阴性对照应用阴性对照样品所提取核酸作为模板,空白对照应用 ddH₂O。

7.4 RT-PCR 反应条件

50 °C 反转录 30 min;94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,50 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,进行 35 个循环;72 °C 延伸 10 min。

7.5 电泳

7.5.1 制备 1.0% 琼脂糖凝胶板,配制方法按照 A.3 的规定执行。

7.5.2 取 5 μL PCR 产物,与 1 μL 上样缓冲液混合,加入琼脂糖凝胶板的加样孔中。

7.5.3 加入 DNA 分子量标准,作为对照。

7.5.4 盖好电泳仪,插入电极,5 V/cm 电压电泳,30 min。

7.5.5 用紫外凝胶成像系统查看并保存结果。

7.5.6 用 DNA 分子量标准进行比较,判断 PCR 扩增片段大小。

8 综合判定

8.1 试验成立的条件

RT-PCR 扩增产物电泳后,阳性对照有约 600 bp 大小的特异性条带,阴性对照和空白对照没有任何条带(见附录 B 中的图 B.1),则试验结果成立;否则,结果不成立。

8.2 阳性判定

在阳性对照、阴性对照和空白对照试验结果都成立的前提下,若样品的 RT-PCR 产物电泳后有约 600 bp 条带,判定为动物冠状病毒核酸阳性。如需确认动物冠状病毒具体种类,须对 PCR 产物进行测序,通过遗传演化分析确认。

8.3 阴性判定

在阳性对照、阴性对照和空白对照试验结果都成立的前提下,如果检测样品在约 600 bp 位置未出现特异性条带,判定为动物冠状病毒核酸阴性。

附 录 A
(规范性)
相关试剂的配制

A.1 磷酸盐缓冲液(PBS)配制

配制磷酸盐缓冲液所需试剂如下：

- a) 8 g 的氯化钠(NaCl)；
- b) 0.2 g 的氯化钾(KCl)；
- c) 1.44 g 的磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)；
- d) 0.24 g 的磷酸二氢钠(KH_2PO_4)。

试剂加水溶解至 1 L, 调整 pH 为 7.2~7.4, 然后高压灭菌, 室温保存。

A.2 电泳缓冲液的配制

配制 50×TAE 所需试剂如下：

- a) 242 g 三羟甲基氨基甲烷；
- b) 57.1 mL 的冰乙酸；
- c) 100 mL 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸(pH 8.0)。

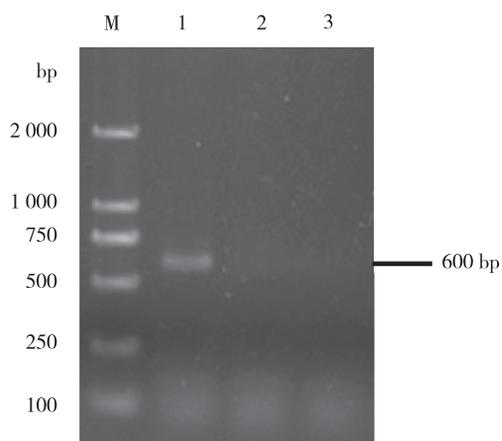
试剂加水溶解至 1 L, 室温保存。使用时, 用蒸馏水稀释成 1 倍浓度使用。

A.3 1.0%琼脂糖凝胶的配制

准确称取琼脂糖 1.0 g, 加入 100 mL 1×TAE 电泳缓冲液, 微波炉中完全融化, 待冷却至 50℃~60℃时, 摇匀, 加入适量的染料, 混匀, 倒入制胶板中, 凝固后取下梳子, 备用。

附录 B
(资料性)
动物冠状病毒 RT-PCR 检测结果

图 B.1 为动物冠状病毒 RT-PCR 检测电泳结果参照图。



标引序号说明：
M——DNA 分子标准(DL 2 000)；
1——阳性对照；
2——阴性对照；
3——空白对照。

图 B.1 动物冠状病毒 RT-PCR 检测电泳结果