



团 体 标 准

T/GDAAV XXXX—XXXX

猫呼吸道症候群六种常见病原体实 时荧光 PCR 检测技术规范

Technical Specification for Real-time Fluorescent PCR Detection of
Six Common Pathogens of Feline Respiratory Syndrome

(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

广东省畜牧兽医学会 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 XXXX 提出。

本文件由广东省畜牧兽医学会归口。

主要起草单位：XXXX。

主要起草人：XXXX。

猫呼吸道症候群六种常见病原体实时荧光 PCR 检测技术规范

1 范围

本文件规定了猫呼吸道症候群六种常见病原体包括猫疱疹病毒I型、猫嵌杯病毒、A型流感病毒、猫衣原体、猫支原体、支气管败血波氏杆菌在不同核酸检测仪器上实现快速多重实时荧光PCR检测方法的试剂、材料、仪器设备、样本的采集与处理、操作方法与结果判读。

本文件适用于猫的口腔拭子、鼻拭子、眼分泌物拭子等样本中猫疱疹病毒I型（*Felid alphaherpesvirus 1*）、猫嵌杯病毒（*Feline calicivirus*）、A型流感病毒（*Influenza A virus*）、猫衣原体（*Chlamydia felis*）、猫支原体（*Mycoplasma felis*）、支气管败血波氏杆菌（*Bordetella bronchiseptica*）的快速核酸检测，兼容超快速荧光PCR仪、荧光PCR仪及一体化快速核酸检测仪。

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 19489 实验室 生物安全通用要求

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、保存与运输技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

超快速实时荧光 PCR ultra-fast real-time PCR

一种基于快速温控模块技术（升降温速率40℃/s以上），结合快速启动酶及高特异性预混反应体系所构建的高效核酸扩增检测方法，可在8min~15min内完成45个循环反应。

3.2

一体化快速核酸检测技术 integrated rapid nucleic acid detection technology

基于聚合酶链式反应技术，快速、自动、整合从样本裂解、核酸提取、扩增到产物分析等全部测定步骤，检测时长一般少于1h的一体化快速核酸检测技术。

4 缩略语

下列缩略语适合本文件。

BHQ1: 黑洞淬灭剂1（Black Hole Quencher 1）

BHQ2: 黑洞淬灭剂2（Black Hole Quencher 2）

BHQ3: 黑洞淬灭剂3 (Black Hole Quencher 3)

Bb: 支气管败血波氏杆菌 (*Bordetella bronchiseptica*)

Ct值: 每个反应管内的荧光信号增长达到设定的阈值所经历的循环数 (Cycle threshold)

Cy5: 近红外荧光染料 (Near-infrared fluorescent dyes 5)

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid)

FAM: 6-羧基荧光素 (6-Carboxyfluorescein)

FCV: 猫嵌杯病毒 (Feline calicivirus)

FHV-1: 猫疱疹病毒I型 (Feline herpesvirus 1)

VIC: VIC亚磷酰胺 (VIC Phosphoramidite)

IAV: A型流感病毒 (Influenza A virus)

F: 上游引物 (Forward primer)

R: 下游引物 (Reverse primer)

P: 探针 (Probe)

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

PBS: 磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffer solution)

MGB: 小沟结合物 (Minor Groove Binder)

ROX: 罗丹明类红色荧光染料 (Carboxy-X-Rhodamine)

RNA: 核糖核酸 (Ribonucleic acid)

5 试剂和耗材

5.1 试剂

5.1.1 总则: 除非另有说明, 所用试剂均为分析纯, 试验用水符合GB/T 6682二级水的要求, 所有试剂均用无核酸酶的容器分装。

5.1.2 核酸提取试剂盒: 商品化病毒DNA/RNA提取试剂盒。

5.1.3 PBS (pH 7.2) 溶液: 配制方法按照附录A中A.1。

5.1.4 灭菌生理盐水: 配制方法按照附录A中A.2。

5.1.5 30%甘油-PBS保存液: 配制方法按照附录A中A.3。

5.1.6 2×RT-PCR buffer (含Mg²⁺)。

5.1.7 快速启动聚合酶: 无甘油保存液, 浓度为25 U/μL。

5.1.8 快速逆转录酶: 无甘油保存液, 浓度为2000 U/μL。

5.1.9 RNase抑制剂: 浓度为1500 U/μL。

5.1.10 矿物油: 分子生物学级别。

5.1.11 干燥剂。

5.1.12 阳性对照为猫呼吸道症候群六种病原体靶基因片段的重组质粒。

5.1.13 阴性对照为灭菌生理盐水, 配制方法按照附录A中A.2。

5.2 耗材

5.2.1 微流控卡盒。

5.2.2 吸头: 20 μL、50 μL、200 μL、1 mL等。

5.2.3 RNase free 离心管: 1.5 mL、2 mL。

5.2.4 0.2 mL PCR薄壁管。

5.2.5 超快速荧光PCR反应管（板）。

5.2.6 棉拭子。

5.2.7 乳胶手套/丁腈手套。

5.2.8 一次性医用口罩。

5.3 引物和探针

猫呼吸道症候群六种常见病原体实时荧光PCR扩增用上、下游引物和探针序列参见附录B.1。

6 仪器设备

6.1 核酸提取仪。

6.2 超快速荧光PCR仪：具有FAM、VIC、ROX、Cy5等荧光通道。

6.3 荧光PCR仪：具有FAM、VIC、ROX、Cy5等荧光通道。

6.4 一体化快速核酸检测仪：快速微流控卡盒兼容0.2mL PCR薄壁管，同时具有FAM、VIC、ROX、Cy5等荧光通道。

6.5 移液器（量程：0.5 μL~10 μL、10 μL~100 μL、100 μL~1000 μL）。

6.6 涡旋震荡仪。

6.7 分析天平。

6.8 高压灭菌器。

6.9 冷冻高速离心机。

6.10 pH计。

6.11 冰箱：2℃~8℃和-20℃以下。

6.12 洁净工作台。

6.13 冻干机。

6.14 封膜机。

7 样品采集与处理

7.1 生物安全措施

样品的采集、保存与运输按照NY/T 541执行，采样及样品前处理过程须戴一次性口罩、一次性PE手套、穿防护服，样品不得交叉污染。实验室生物安全符合GB 19489规定。

7.2 样品采集

7.2.1 口腔拭子

用灭菌生理盐水充分湿润拭子，用拭子在猫的口腔内黏膜处（口腔内壁、牙龈等），刮取黏膜细胞，将取样后的拭子立即浸入装有1 mL30%甘油-PBS缓冲液的样本采集管中，折断或剪短拭子杆，盖紧管盖，密封后所取样本立即进行核酸提取，或-20℃保存备用。

7.2.2 鼻拭子

用灭菌生理盐水充分湿润拭子，用拭子插入猫的鼻腔内旋转3圈，刮取黏膜细胞和分泌物，将取样后的拭子立即浸入装有1 mL30%甘油-PBS缓冲液的样本采集管中，折断或剪短拭子杆，盖紧管盖，密封后所取样本立即进行核酸提取，或-20℃保存备用。

7.2.3 眼分泌物拭子

用灭菌生理盐水充分湿润拭子，用拭子轻轻在猫的下眼睑内壁旋转3圈，刮取黏膜细胞和新鲜分泌物，避免采集陈旧分泌物，将取样后的拭子立即浸入装有1 mL30%甘油-PBS缓冲液的样本采集管中，折断或剪短拭子杆，盖紧管盖，密封后所取样本立即进行核酸提取，或-20℃保存备用。

7.3 样品处理

将含有猫的口腔拭子、鼻拭子和/或眼分泌物拭子的样本采集管在涡旋震荡仪上充分混匀，然后3000 r/min离心 1 min，取上清用于核酸提取或-20℃保存备用。

8 扩增试剂的准备、配制、冻干与包装

扩增试剂采用原位冻干技术冻干，也可以采用现配制的液态试剂形式，扩增反应体系与冻干试剂保持一致。

8.1 扩增反应体系

(1) 扩增试剂的准备和配制在试剂储存和准备区进行。

(2) 猫疱疹病毒 I 型、猫嵌杯病毒、A 型流感病毒的多重荧光 PCR 反应体系配制见表 1；猫支原体、猫衣原体、支气管败血波氏杆菌的多重荧光 PCR 反应体系配制见表 2。可以根据一年内样本的测试数量以及对照样本的数量分别配制两管多重荧光 PCR 反应体系，配制完毕后充分混匀分装，每个反应管 24 μL，分装时应尽量避免产生气泡，分装完成后将试剂进行冻干。

(3) 反应体系试剂可采用等效果的商品化试剂盒。

表 1 多重荧光 PCR 反应体系管 1 配制表

反应体系组分		用量 (μL)
2×RT-PCR Buffer		20.00
快速逆转录酶 (2000 U/μL)		0.13
快速启动聚合酶 (25 U/μL)		0.53
RNase抑制剂 (1500 U/μL)		0.01
猫疱疹病毒I型	FHV1-F (50μM)	0.20
	FHV1-R (50μM)	0.20
	FHV1-P (50μM)	0.10
猫嵌杯病毒	FCV-F (50μM)	0.30
	FCV-R (50μM)	0.30
	FCV-P (50μM)	0.15
A型流感病毒	IVA-F (50μM)	0.30
	IVA-R (50μM)	0.30

	IVA-P (50μM)	0.15
内标	β-actin-F (50μM)	0.20
	β-actin-R (50μM)	0.20
	β-actin-P (50μM)	0.10
	ddH ₂ O	0.83
合计		24.00

表 2 多重荧光 PCR 反应体系管 2 配制表

反应体系组分		用量 (μL)
2×RT-PCR Buffer		20.00
快速启动聚合酶 (25 U/μL)		0.53
支气管败血波氏杆菌	Bb-F (50 μ M)	0.30
	Bb-R (50 μ M)	0.30
	Bb-P (50 μ M)	0.15
猫支原体	MF-F (50 μ M)	0.30
	MF-R (50 μ M)	0.30
	MF-P (50 μ M)	0.15
猫衣原体	C. F-F (50 μ M)	0.30
	C. F-R (50 μ M)	0.30
	C. F-P (50 μ M)	0.15
内标	β-actin-F (50μM)	0.20
	β-actin-R (50μM)	0.20
	β-actin-P (50μM)	0.10
ddH ₂ O		0.72
合计		24.00

8.2 扩增试剂的冻干

- (1) 扩增试剂的冻干需要在冻干操作区进行。
- (2) 先将冻干铝板标识产品名称，分别标记为猫呼吸道六项管 1、猫呼吸道六项管 2，将分装有扩增试剂的 PCR 8 联管放置到冻干铝板，并将 PCR 管盖轻轻地盖在 8 联管上，管盖无需压紧，预留孔隙用

于冻干水蒸气升华。

(3) 确认冻干机状态正常，所有进气阀已关闭，后箱已排水，排水旋钮拧紧，冻干机提前预冷。

(4) 将冻干铝板按照中间对称原则放置在冻干板层上，参考附录 E 设置冻干参数，完成参数设置后，关闭前门，并确保前门处于紧闭状态，旋钮旋到最紧，开启设备执行冻干作业。

(5) 待冻干程序结束，通过操作将管盖压实，打开舱门，取出冻干铝板，关闭冻干机电源。

8.3 冻干试剂的包装

(1) 冻干扩增试剂的包装在低湿区进行。

(2) 提前确认低湿区温湿度，其中温度处于 18℃~26℃ 区间，湿度保证处于≤30%。

(3) 下机后的冻干产品分开摆放，做好产品标识和物理隔离，防止混淆。对外观质检合格产品使用切割机进行切割，采用铝箔袋进行装袋，按每袋装入冻干试剂（1 个）、干燥剂（1 个），采用真空包装机对铝箔袋进行真空封口，对完成真空封口的产品贴上标签，标签内容应包含：名称、数量、批号、日期等信息，并在 2℃~30℃ 环境下储存，并制作包装好的冻干试剂数目台账，后续根据实验需求数量进行登记取用。

9 超快速荧光 PCR 仪检测

9.1 核酸提取

在样本制备区进行，取处理后的样本 200 μL，核酸提取方法见附录 D，也可采用具有同等核酸抽提效果的其他方法或使用商品化核酸提取试剂盒，比如采用自动化核酸提取仪，和配套的核酸提取试剂盒进行核酸提取。

9.2 加样

(1) 在样本制备区进行。

(2) 根据检测样本数量取出 8.2.3 制备的冻干扩增试剂，即猫呼吸道六项管 1、猫呼吸道六项管 2 铝箔袋，撕开铝箔袋，取出装有冻干试剂的 PCR 管，观察冻干试剂形态是否正常，确认外观正常后，管 1、管 2 分别放置于 PCR 管架上，

(3) 管 1、管 2 分别加入 9.1 提取的核酸溶液 40 μL，盖紧管盖，涡旋混匀，观察冻干粉全部溶解后瞬时离心，然后将 40 μL 反应液加入超快速荧光 PCR 反应管（板）中，加样顺序为阴性对照、样本、阳性对照，记录反应管（板）对应的样本编号，转移至样本扩增区。（备注：确保检测性能等效的前提下，其他超快速荧光 PCR 仪根据 PCR 反应管体积可以调整加入到反应管中的反应液体积。）

(4) 采用液体形式的试剂体系，加入 9.1 提取的核酸溶液 16 μL，总体积为 40 μL，超快速荧光 PCR 仪可依据反应管规格，灵活调整反应液加样量。

9.3 超快速荧光 PCR 反应

9.3.1 上机

在扩增区进行，将 9.2 中加样后的反应管（板）放入超快速荧光 PCR 仪中，记录样品放置顺序。

9.3.2 循环条件设置

超快速荧光 PCR 仪反应程序见表 3。

表 3 超快速荧光 PCR 反应扩增程序

步骤	温度	时间	循环数	是否收集荧光
1	50℃	300s	1	否
2	95℃	60s*	1	否
3	95℃	1s*	40	否
4	55℃	10s*		是
注：*可根据仪器参数进行设置。				

9.4 荧光通道设定

(1) 管1中的猫疱疹病毒1型的探针 5' 端标记报告荧光基团FAM, 3' 端标记淬灭荧光基团BHQ1; A型流感病毒的探针 5' 端标记报告荧光基团VIC, 3' 端标记淬灭荧光基团BHQ1; 猫嵌杯病毒的探针 5' 端标记报告荧光基团ROX, 3' 端标记淬灭荧光基团BHQ2; 内标基因的探针 5' 端标记报告荧光基团Cy5, 3' 端标记淬灭荧光基团BHQ3。

(2) 管2中的支气管败血波氏杆菌的探针 5' 端标记报告荧光基团FAM, 3' 端标记淬灭荧光基团BHQ1; 猫衣原体的探针 5' 端标记报告荧光基团VIC, 3' 端标记淬灭荧光基团BHQ1; 猫支原体的探针 5' 端标记报告荧光基团ROX, 3' 端标记淬灭荧光基团BHQ2; 内标基因的探针 5' 端标记报告荧光基团Cy5, 3' 端标记淬灭荧光基团BHQ3。

9.5 结果判定

9.5.1 阈值设定

反应结束后自动保存结果, 仪器对六种病原体的曲线和内标的曲线进行分析, 根据分析后图像自动调节阈值 (Threshold 值) 并设定。针对于不同仪器, 用户也可根据仪器基线期噪音实际情况调整。

9.5.2 质控标准

- (1) 阳性对照各个荧光通道的Ct值 ≤ 30.0 , 并均出现典型的“S”型扩增曲线。
- (2) 阴性对照各个荧光通道均无Ct值, 并无典型“S”型扩增曲线。
- (3) 样品中的Cy5通道 (内标) 的Ct值 ≤ 35.0 , 并出现典型的“S”型扩增曲线。
- (4) 阳性对照、阴性对照和内标通道同时成立可判定试验有效, 否则试验无效。

9.5.3 结果判定

- (1) 相应的检测通道无Ct值且无典型“S”型扩增曲线, 判为该通道对应的病原体核酸阴性。
- (2) 相应的检测通道出现典型“S”型扩增曲线, 且Ct值 ≤ 35 , 判为该通道对应的病原体核酸阳性。
- (3) 相应的检测通道 $35 < \text{Ct值} < 40$ 且有典型“S”型扩增曲线, 判为可疑。可疑样品核酸应在超快速荧光PCR仪或荧光PCR仪重新检测, 若重新检测后如仍有明显扩增曲线, 且Ct值 < 40 的, 判为阳性, 根据相应检测通道, 报告检出阳性。

10 荧光 PCR 仪检测

10.1 核酸提取

操作步骤参考步骤9.1。

10.2 加样

(1) 在样本制备区进行。

(2) 根据检测样本数量取出 8.2.3 制备的冻干扩增试剂，即猫呼吸道六项管1、猫呼吸道六项管2铝箔袋，撕开铝箔袋，取出装有冻干试剂的PCR管，观察冻干试剂形态是否正常，确认外观正常后，管1、管2分别放置于PCR管架上，

(3) 管1、管2分别加入10.1 提取的核酸溶液 40 μL ，盖紧管盖，涡旋混匀，观察冻干粉全部溶解后瞬时离心，加样顺序为阴性对照、样本、阳性对照，记录反应管对应的样本编号，转移至样本扩增区。

(4) 采用液体形式的试剂体系，加入 10.1 提取的核酸溶液 16 μL ，总体积为40 μL 。

10.3 荧光 PCR 反应

10.3.1 上机

在扩增区进行，将 10.2 中加样后的反应管放入荧光 PCR 仪中，记录样品放置顺序。

10.3.2 循环条件设置

荧光PCR仪反应程序见表4。

表 4 荧光 PCR 反应扩增程序

步骤	温度	时间	循环数	是否收集荧光
1	50°C	300s	1	否
2	95°C	60s	1	否
3	95°C	5s	40	否
4	60°C	30s		是

10.4 荧光通道设定

管1和管2各荧光通道信息参考9.4内容。

10.5 结果判定

10.5.1 阈值设定

反应结束后自动保存结果，仪器对六种病原体的曲线和内标的曲线进行分析，根据分析后图像自动调节阈值（Threshold 值）并设定。针对于不同仪器，用户也可根据仪器基线期噪音实际情况调整。

10.5.2 质控标准

(1) 阳性对照各个荧光通道的Ct值 ≤ 30.0 ，并均出现典型的“S”型扩增曲线。

(2) 阴性对照各个荧光通道均无Ct值，并无典型“S”型扩增曲线。

(3) 样品中的Cy5通道（内标）的Ct值 ≤ 35.0 ，并出现典型的“S”型扩增曲线。

(4) 阳性对照、阴性对照和内标通道同时成立可判定试验有效，否则试验无效。

10.5.3 结果判定

- (1) 相应的检测通道无Ct值且无典型“S”型扩增曲线，判为该通道对应的病原体核酸阴性。
- (2) 相应的检测通道出现典型“S”型扩增曲线，且Ct值 ≤ 35 ，判为该通道对应的病原体核酸阳性。
- (3) 相应的检测通道 $35 < \text{Ct值} < 40$ 且有典型“S”型扩增曲线，判为可疑。可疑样品核酸应在荧光PCR仪重新检测，若重新检测后如仍有明显扩增曲线，且Ct值 < 40 的，判为阳性，根据相应检测通道，报告检出阳性。

11 一体化快速核酸检测仪检测

11.1 微流控卡盒的准备

- (1) 每份样本检测需要2个微流控卡盒，待测样本数量为n，需要准备微流控卡盒数量为2n。
- (2) 按照附录F 图1说明将提取试剂加入到配套微流控卡盒对应的腔室中备用。
- (3) 也可使用具有同等性能的商品化微流控卡盒。

11.2 卡盒安装与加样

- (1) 在样本制备区进行。
- (2) 根据检测样本数量取出 8.2.3 制备的冻干扩增试剂，即猫呼吸道六项管1、猫呼吸道六项管2铝箔袋，撕开铝箔袋，取出装有冻干试剂的PCR管，观察冻干试剂形态是否正常，确认外观正常后，管1、管2分别放置于卡盒支架对应的位置，根据附录G 图2示意 将PCR管安装在微流控卡盒上，卡盒安装后检查PCR管安装是否正确，无松动，无裂痕等情况。
- (3) 向安装好PCR管管1和管2卡盒的样本仓中分别加入处理后的样本200 μL 。

11.3 上机操作

- (1) 如果采用自配的微流控卡盒，将加样后的微流控卡盒放入一体化快速核酸检测仪中，根据微流控卡盒放置的位置，点击屏幕对应卡盒图标，在仪器操作界面录入样本信息，选择对应的项目程序，按压卡盒锁扣锁紧卡盒，关闭舱门，点击屏幕“开始检测”启动仪器运行。
- (2) 如果采用商品化的微流控卡盒，点击屏幕“检测”，在屏幕上方选择卡盒放置位置，将卡盒上的二维码对准仪器下方的扫描器，自动录入猫呼吸道六项项目信息，然后卡盒放入一体化快速核酸检测仪中对应的卡槽中，按压卡盒锁扣锁紧卡盒，关闭舱门，点击屏幕“开始检测”启动仪器运行。
- (3) 试验结束后，盖紧卡盒密封条，打开卡盒锁扣，取出卡盒，放入自封袋中，然后丢入医疗垃圾箱中。医疗垃圾需要尽快处理，避免产生气溶胶污染。
- (4) 一体化快速核酸检测仪的扩增程序可以在电脑界面进行编辑，扩增程序见表 5。

表 5 一体化快速核酸检测仪反应扩增程序

步骤	温度	时间	循环数	是否收集荧光
1	50℃	300s	1	否
2	95℃	30s	1	否
3	52℃	5s	40	否

4	60℃	3s		是
5	100℃	6s		否

11.4 荧光通道设定

管1和管2各荧光通道信息参考9.4内容。

11.5 结果判定

11.5.1 阈值设定

反应结束后自动保存结果，仪器对六种病原体的曲线和内标的曲线进行分析，根据分析后图像自动调节阈值（Threshold 值）并设定。针对于不同仪器，用户也可根据仪器基线期噪音实际情况调整。

11.5.2 质控标准

- （1）阳性对照各个荧光通道的Ct值≤30.0，并均出现典型的“S”型扩增曲线。
- （2）阴性对照各个荧光通道均无Ct值，并无典型“S”型扩增曲线。
- （3）样品中的Cy5通道（内标）的Ct值≤35.0，并出现典型的“S”型扩增曲线。
- （4）阳性对照、阴性对照和内标通道同时成立可判定试验有效，否则试验无效。

11.5.3 结果判定

试验结束后，一体化快速核酸检测仪会自动根据下述结果判定标准给出判定结果。

- （1）相应的检测通道无Ct值且无典型“S”型扩增曲线，判为该通道对应的病原体核酸阴性。
- （2）相应的检测通道出现典型“S”型扩增曲线，且Ct值≤35，判为该通道对应的病原体核酸阳性。
- （3）相应的检测通道 35<Ct值<40且有典型“S”型扩增曲线，判为可疑。可疑样品核酸应在一体化快速核酸检测仪或荧光PCR仪重新检测，若重新检测后如仍有明显扩增曲线，且Ct值≤40的，判为阳性，根据相应检测通道，报告检出阳性。

附录 A (规范性)

溶液配制

A.1 0.01 mol/L PBS(pH 7.2)溶液的配制

称取磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 3.0 g, 磷酸氢二钾 (K_2HPO_4) 0.2 g, 氯化钠 (NaCl) 8 g, 氯化钾 (KCl) 0.2 g, 加二级水定容至 1000 mL, 完全溶解后用 3 mol/L NaOH调pH为 7.2 经 121℃ ($\pm 2^\circ\text{C}$), 高压灭菌 15 min, 室温保存。

A.2 生理盐水的配制及灭菌

称取 0.9 g氯化钠, 溶解在少量蒸馏水后, 定容至 100 mL, 121℃ ($\pm 2^\circ\text{C}$), 高压灭菌 15 min, 常温保存备用。

A.3 30%甘油-PBS 保存液的配制

取30 mL甘油, 加入70 mL0.01 mol/L PBS(pH 7.2)溶液, 充分混合均匀至完全透明, 可用0.22 μm 滤膜过滤, 不用高压灭菌, 分装成小瓶, 室温或4℃保存。

附 录 B
(规范性)

引物、探针的名称、序列信息

B.1 猫呼吸道症候群六种常见病原体和内标引物、探针的名称、序列信息见表 B.1。

表 B.1 猫呼吸道症候群六种常见病原体和内标引物、探针的名称、序列信息

病原体名称	引物名称	序列 (5' → 3')	目的基因
猫疱疹病毒1型	FHV1-F	TTAAATCTGGAAGGAACCCCTGA	thymidine kinase gene
	FHV1-R	GTGCATATCACATGCGGCTATAA	
	FHV1-P	FAM-CGCCGCCTTGGGAGCACT-BHQ1	
猫嵌杯病毒	FCV-F	CGCYAATCAACATGTGGTAACYG	ORF1
	FCV-R	AGCACATCATATGCGGCTCTRA	
	FCV-P	ROX-CAGTGTTTGATYTGCCCTGGGCTC-BHQ2	
A型流感病毒	IVA-F	CAAGACCAATYYTGTCACCTHTGACYA	M
	IVA-R	GGAYAAAGCGTCTACGYTGCA	
	IVA-P	VIC-ACGCTCACCGTGCCCAGTGAGC-BHQ1	
支气管败血波氏杆菌	Bb-F	CCAACGCCACCGACATG	flagellin A
	Bb-R	TCTTGATATCGATCGTTTCGTTGT	
	Bb-P	FAM-CTGTCGATCCAGGTCGGCGC-BHQ1	
猫支原体	MF-F	AATTCGAAGCTGCAATTTATGTTCTTA	elongation factor Tu
	MF-R	CTCCACCAGTAACGTCTGTTGTTCT	
	MF-P	ROX-AAGAAGGTGGGCGTCACACCCAT-BHQ2	
猫衣原体	C. F-F	CGGATTGATTGGTCTTGCAG	OmpA
	C. F-R	GGTATCTGTGTATAGCTCTACAATGCC	
	C. F-P	VIC-CGCCAATCAGCGTCCAAACGT-BHQ1	
内标	β-actin-F	AGTCCGCCTAGAAGCATTTG	β-actin
	β-actin-R	TGTCCACCTTCCAGCAGATG	
	β-actin-P	Cy5-AGTCCGGCCCCCTCCATCGTCCA-BHQ3	

附录 C (资料性)

重组质粒标准品的制备方法与序列

C.1 采用人工合成的方法

采用人工合成的方法合成一段含有猫疱疹病毒1型、猫嵌杯病毒、猫衣原体、猫支原体、A型流感病毒、支气管败血波氏杆菌等特定保守靶序列片段，该靶序列片段包含本文件5.3中引物和探针的核苷酸序列，将靶序列片段克隆至

UC57载体，再将该载体转化至DH5α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，鉴定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，并将浓度转换成拷贝数($\text{DNA拷贝}/\mu\text{L}=[6.02\times 10^{23}\times \text{DNA浓度}(\text{ng}/\mu\text{L})\times 10^{-9}]/(\text{DNA碱基数}\times 660)$)，即构建成阳性对照母液，将阳性对照母液进行稀释，选取浓度为 10^4 拷贝/ μL 稀释液作为阳性对照。

C.2 人工合成重组质粒标准品序列

TTAAATCTGGAAGGAACCCCTGATGAATGTGCCGCCGCTTGGGAGCACTGAGACAAGATA
TGGATATGACATTTATAGCCGCATGTGATATGCACCGCCAATCAACATGTGGTAACCGTTAACTC
GGTGTGTTGATTTGGCCTGGGCTCTTCGCCGTCACCTAACACTAACTGGACAGTTTCAAGCAATCA
GAGCCGCATATGATGTGCTCAAGACCAATCCTGTACCTCTGACTAAGGGGATTTTGGGATTTGT
GTTACGCTCACCGTGCCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCCCAACGCCACCG
ACATGACCCTGTGATCCAGGTCGGCGCCAAGGACAACGAAACGATCGATATCAAGAAATTCGA
AGCTGCAATTTATGTTCTTAAAAAAGAAGAAGGTGGGCGTCACACACCATTCTTTAAAAACTATA
AACCACAATTCTACTTTAGAACAAACAGACGTTACTGGTGGAGCGGATTGATTGGTCTTGCAGGAA
CTGATTTTCGCCAATCAGCGTCCAAACGTTGAAATTTCTCAAGGCATTGTAGAGCTATACACAGAT
ACC。

附录 D
(资料性)

病毒 DNA/RNA 提取方法 (磁珠法)

D.1 裂解结合液准备

按照样本数量、阴性对照、阳性对照等总数量准备裂解结合液,每样本按 250 μL 裂解液、250 μL 无水乙醇、15 μL 蛋白酶 K (Proteinase K) 溶液、15 μL 磁珠的比例提前将以上溶液混合成裂解结合液,然后按照每样本 480 μL 的体系分装到 1.5 mL 离心管中。

注意:磁珠在使用前振荡混匀,确保磁珠彻底重悬。

D.2 吸取 200 μL 样本 (阳性对照、阴性对照、经过处理的样本) 加入到**裂解结合液**中,振荡混匀。

D.3 室温条件下孵育 5 min,瞬时离心,放置磁力架上静置 1 min,磁珠完全吸附后,小心吸弃液体。

D.4 将离心管从磁力架上取下,加入 500 μL 洗涤液 1 (**确保已加入无水乙醇**),振荡混匀,室温静置 30 s。将离心管放置磁力架上静置 30s,磁珠完全吸附后,小心吸弃上清液。

D.5 将离心管从磁力架上取下,加入 500 μL 洗涤液 2 (**确保已加入无水乙醇**),振荡混匀,室温静置 1 min。将离心管放置磁力架上静置 30 s,磁珠完全吸附后,小心吸弃上清液。

D.6 将离心管从磁力架上取下,加入 500 μL 洗涤液 3,振荡混匀 10 s。将离心管放置磁力架上,磁珠完全吸附后,小心吸弃液体。

D.7 将离心管从磁力架上取下,加入 100 μL 洗脱液,振荡混匀,置于振荡恒温金属浴中,转速 1000 r/min, 56 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min。

D.8 将离心管放置磁力架上,静置 1 min,待磁珠完全吸附后,小心吸取 90 μL 含有核酸的上清液转移至一个新的收集管中,做好标记,尽快用于下游实验,如不能立即使用,应置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 下储存。

附 录 E
(资料性附录)
冻干参数

E.1 冻干参数见表 E1。

表E1 冻干参数见

运行时间与温度设置	区段	运行时间	结束温度	备注
	1	1 时 20 分	-50℃	不包含预冷时间
	2	0 时 40 分	-20℃	/
	3	2 时 00 分	-50℃	/
	4	4 时 00 分	-25℃	/
	5	2 时 00 分	-10℃	/
	6	4 时 00 分	30℃	/
	7	4 时 00 分	40℃	/
真空控制阶段	总区段数		7	
	真空控制区段		4	
真空调节与区段设置	项目	开始区段	结束区段	/
	真空调节 1:	6	7	/
	真空调节 2:	0	0	/
加热与真空调节设置	项目	下限值	上限值	
	真空加热:	0	0	/
	真空调节 1:	10	30	/
	真空调节 2:	0	0	/
	控温范围: 0℃			/

附 录 F
(资料性)

F.1 微流控卡盒提取试剂位置示意信息见图 F1。

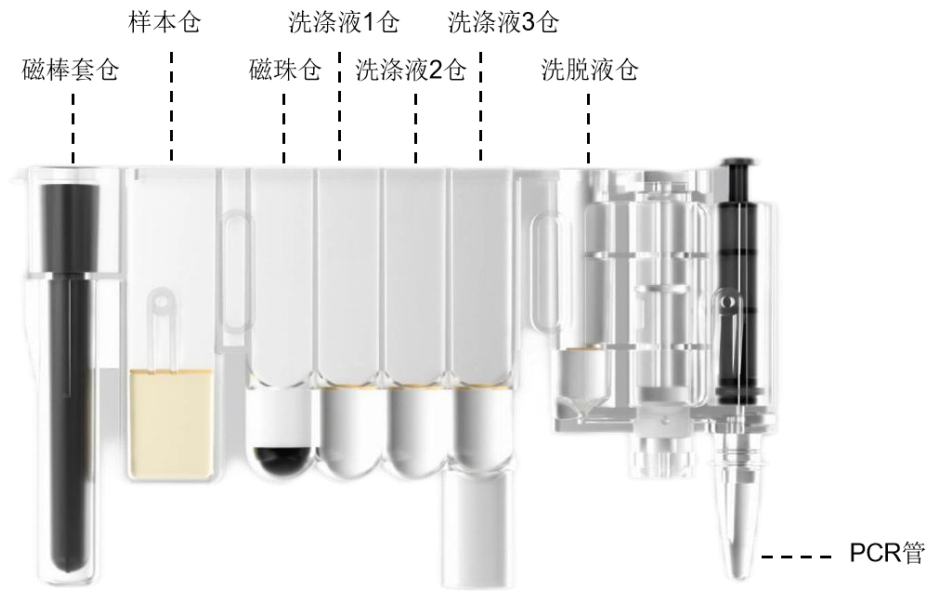


图 F1 微流控卡盒提取试剂位置示意信息

提取试剂按照上图示意进行添加，添加量参考下列数据：

样本仓：裂解液800 μ L、300 μ L矿物油。

磁珠仓：20 μ L（50 mg/mL）磁珠、500 μ L磁珠保存液。

洗涤液1仓：洗涤液1（已添加无水乙醇）500 μ L、200 μ L矿物油。

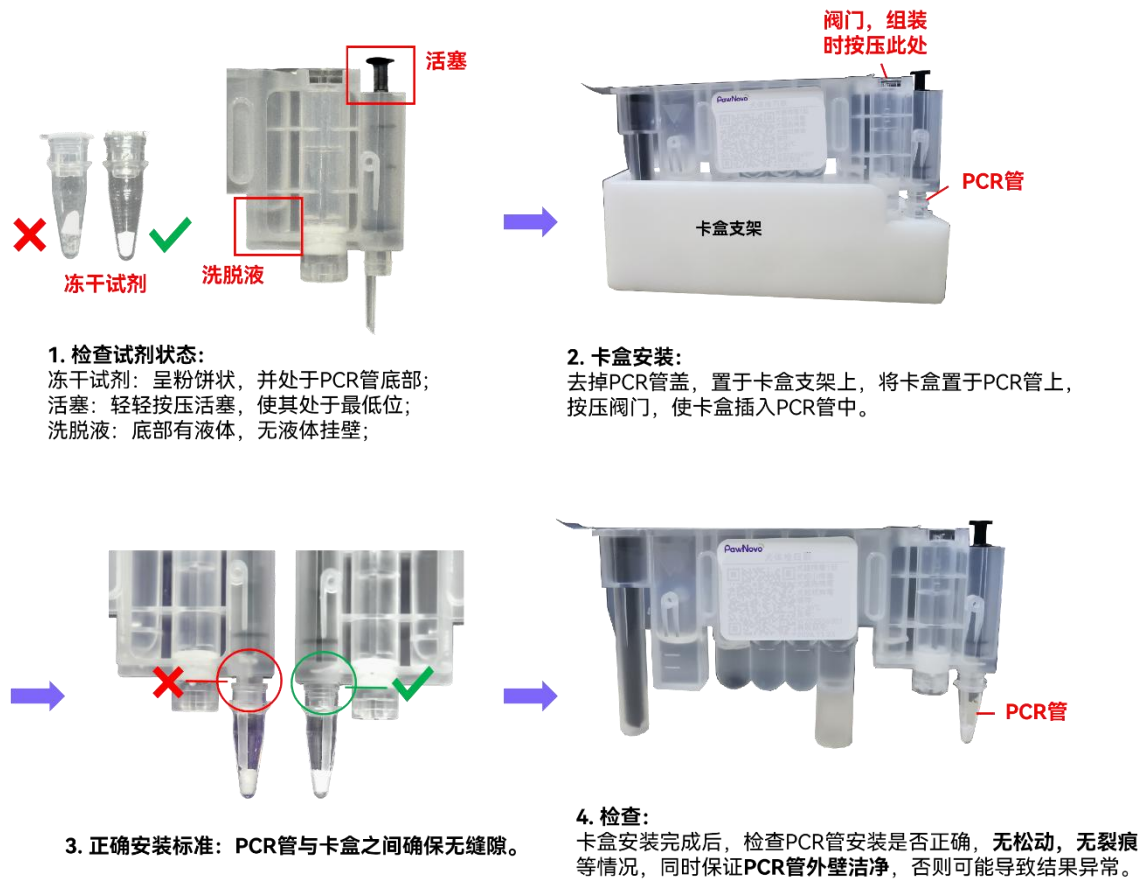
洗涤液2仓：洗涤液2（已添加无水乙醇）500 μ L、200 μ L矿物油。

洗涤液3仓：洗涤液3 500 μ L、200 μ L矿物油。

洗脱液仓：洗脱液40 μ L、80 μ L矿物油。

附 录 G
(资料性)
微流控卡盒组装示意图

G. 1 微流控卡盒组装见图G1。



图G1 微流控卡盒组装示意图