ICS 11.220
B 42

T/CVDA

团 体 标 准

T/CVDA 97-2026

猫肥厚型心肌病基因突变实时荧光 PCR 检测方法

Real-time PCR assay for detection of feline hypertrophic cardiomyopathy gene mutation

中国兽药协会

2026-10-22 发布 **2026-10-22 实施**

中 国 兽 药 协 会 发 布

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 缩略语 1
5 试剂和材料 1
6 样品的采集与前处理 2
7 操作方法 2
8 结果判定 3
附录 A（规范性）试剂配制 4

中国兽药协会

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。

本文件由中国兽药协会提出并归口管理。

本文件起草单位：英科新创（苏州）生物科技有限公司、中国农业科学院上海兽医研究所、诺维（苏州）生物科技有限公司。

本文件主要起草人：陈红干、高海英、李兴翠、刘光清、王志宇、樊俊、梅亚军、舒琴、马娇龙、冒佩佩。

中国兽药协会

猫肥厚型心肌病基因突变实时荧光 PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了猫肥厚型心肌病（HCM）基因突变实时荧光 PCR 检测方法的试剂和材料、样品采集与前处理、操作方法、结果判定等。

本文件适用于猫肥厚型心肌病（HCM）基因突变的实验室检测。

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。

实时荧光 PCR：实时荧光聚合酶链反应（real-time polymerase chain reaction，Real-time PCR）

DNA：脱氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid）

FAM：羧基荧光素（carboxyfluorescein）

ROX：羧基-X-罗丹明（carboxy-X-rhodamine）

HEX：六氯荧光素（hexachlorofluorescein）

CY5：花青素 5 染料（cyanine 5）

MGB：小沟结合物（minor groove binder）

HCM：肥厚型心肌病（hypertrophic cardiomyopathy）

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

5 试剂和材料

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 的要求。

5.1.2 核酸提取试剂：DNA 提取试剂盒或其他同等提取效果的 DNA 提取方法。

5.1.3 灭菌去离子水：检测用水应符合 GB/T 6682 中一级水的要求。

5.1.4 生理盐水。

5.1.5 引物和探针序列及反应液配方：见附录 A。

5.1.6 阳性对照为包含猫 MYBPC3-A31P 纯合突变（c.91G>C）和 MYBPC3-R820W 纯合突变（c.2455C>T）质粒 DNA；阴性对照包含猫 MYBPC3-A31P 野生型（c.91G）和 MYBPC3-R820W 野生型（c.2455C）的质粒 DNA。

5.2 仪器设备及耗材

中国兽药协会

5.2.1 荧光定量 PCR 仪。
5.2.2 台式离心机。
5.2.3 涡旋震荡仪。
5.2.4 冰箱（2~8℃和-20℃）。
5.2.5 生物安全柜或超净台。
5.2.6 移液枪（5μL、10μL、100μL、1000μL）及配套吸头（无核酸酶）。
5.2.7 200μLPCR 管（无核酸酶）、1.5mL 离心管（无核酸酶）和采样管。

6 样品的采集与前处理

6.1 总则

采样过程中样品不得交叉污染，采样及样品前处理过程中应戴一次性手套。样品的保存和运输按照 NY/T 541 执行，实验室生物安全管理见 GB 19489。

6.2 采样及处理工具

采样专用商品化无菌拭子、采样管。

6.3 样品采集

采集眼结膜、口腔或鼻腔分泌物。采集方法如下：

眼结膜样本：使用经生理盐水浸润的无菌拭子，涂擦翻转的上、下睑结膜并拭取分泌物；

口腔样本：使用经生理盐水浸润的无菌拭子，采集咽喉深处黏膜分泌物；

鼻腔分泌物样本：使用经生理盐水浸润的无菌拭子，采集鼻腔分泌物。

将采样后的拭子，立即投入含样本保存液的采样管内（可使用等渗盐溶液或磷酸盐缓冲液等），密封保存、编号。

7 操作方法

7.1 核酸提取

在样本制备区进行，待测样本采用市售的 DNA 提取试剂盒按照说明书进行 DNA 提取操作，也可采用其他同等提取效果的 DNA 提取方法。提取过程应设立阴性和阳性对照。可使用 5.1.6 中的对照品，按同样的提取方法进行 DNA 提取。提取后的 DNA 应立即检测或置于-20℃冰箱备用。

7.2 试剂的准备与配制

在反应混合物配制区进行。每个检测反应体系需使用 20μL PCR 反应液。按附表 A.1 配制反应液，充分混匀后分装 N+2 个 PCR 管（N 个待测样本及 2 个对照品），每个 PCR 管 20μL。转移 PCR 管至样本制备区。

7.3 加样

在样本制备区进行。在上述 PCR 管中分别加入待测样本核酸 5μL，使每管总体积达到 25μL，记录 PCR 管对应的样品编号。盖紧管盖后，瞬时离心。

7.4 实时荧光 PCR 反应

7.4.1 在检测区进行。应使用能采集并区分 FAM、HEX、ROX、CY5 这四种不同荧光信号的多通道荧光定量 PCR 仪。

7.4.2 将 7.3 中加样后的 PCR 管放入荧光定量 PCR 仪内，编辑样品表后，选定 FAM、HEX、ROX 和 CY5 通道。反应参数设置如下：95℃ 30s；95℃ 5s，60℃ 30s，在每个循环的 60℃ 30s 时收集荧光信号，40 个循环。FAM、HEX、ROX、CY5 分别是 MYBPC3-A31P 纯合突变型（c.91G>C）、MYBPC3-A31P 野生型（c.91G）、MYBPC3-R820W 纯合突变型（c.2455C>T）、MYBPC3-R820W 野生型（c.2455C）的检测通道。

8 结果判定

8.1 结果分析条件设定

阈值设定原则：根据仪器噪声情况进行调整，以阈值线超过阴性对照扩增曲线的最高点、且设置在阳性曲线的指数增长期，确保阈值线高于背景荧光。不同仪器可根据仪器噪音情况进行调整。

8.2 实验成立的条件

8.2.1 阴性对照 HEX、CY5 两个通道均出现典型扩增曲线，且 Ct 值均≤30。FAM、ROX 两个通道均无 Ct 值且无扩增曲线。

8.2.2 阳性对照 FAM、ROX 两个通道均出现典型扩增曲线，且 Ct 值均≤30。HEX、CY5 两个通道均无 Ct 值且无扩增曲线。

8.2.3 如阴性和阳性对照不满足以上条件，此次试验视为无效。

8.3 结果描述及判定

8.3.1 阴性

HEX 和 CY5 通道 Ct 值均≤38 且出现典型扩增曲线，FAM 和 ROX 通道均无 Ct 值且无典型扩增曲线时，判定被检样品中 MYBPC3 基因不存在 c.91G>C 和 c.2455C>T 突变。

8.3.2 阳性

MYBPC3-A31P 杂合突变：FAM、HEX 和 CY5 通道 Ct 值均≤38 且出现典型扩增曲线，ROX 通道无 Ct 值且无典型扩增曲线时，判定被检样品中存在 MYBPC3：c.91G>C/c.91G 杂合突变。

MYBPC3-A31P 纯合突变：FAM、CY5 通道 Ct 值均≤38 且出现典型扩增曲线，HEX、ROX 通道均无 Ct 值且无典型扩增曲线时，判定被检样品中存在 MYBPC3：c.91G>C/ c.91G>C 纯合突变。

MYBPC3-R820W 杂合突变：HEX、ROX、CY5 通道 Ct 值均≤38 且出现典型扩增曲线，FAM 通道无 Ct 值且无典型扩增曲线时，判定被检样品中存在 MYBPC3：c.2455C>T/c.2455C 杂合突变。

MYBPC3-R820W 纯合突变：HEX、ROX 通道 Ct 值均≤38 且出现典型扩增曲线，FAM、CY5 通道均无 Ct 值且无典型扩增曲线时，判定被检样品中存在 MYBPC3：c.2455C>T/ c.2455C>T 纯合突变。

8.3.3 可疑

HEX 和/或 CY5 通道 Ct 值≤38 且出现典型扩增曲线，FAM 或 ROX 通道 38＜Ct 值≤40 且出现典型扩增曲线的样品，建议复验。复验仍出现上述结果的，表明被检样品对应通道阳性，根据 8.3.2 进行判定，否则判定为阴性。

中国兽药协会

附录 A
（规范性）
试剂配制

A.1 荧光定量 PCR 反应液配方

组分	1 个反应的加入量（μL）
2× PCR Mix	12.5
HCM 上游引物 F1 100μM	0.1
HCM 下游引物 R1 100μM	0.1
HCM 突变型探针 M-P1 100μM	0.1
HCM 野生型探针 WT-P1 100μM	0.1
HCM 上游引物 F2 100μM	0.1
HCM 下游引物 R2 100μM	0.1
HCM 突变型探针 M-P2 100μM	0.1
HCM 野生型探针 WT-P2 100μM	0.1
核酸	5
灭菌去离子水	To 25

A.2 引物探针序列

名称	序列 5’-3’	标记
HCM 上游引物 F1	GCCAAGGTCAGTGGAAGTGG	/
HCM 下游引物 R1	GCTGCTAGGCCATACTTGTCA	/
HCM 突变型探针 M-P1	CTCGGGCTCGAAC	5’6-FAM；3’MGB
HCM 野生型探针 WT-P1	TCGAGGCCGAGAC	5’HEX；3’MGB
HCM 上游引物 F2	CCTGGAGCGCAAGAAGAAGA	/
HCM 下游引物 R2	CGCGTAGACTCGCATCTCAT	/
HCM 突变型探针 M-P2	TGGATGTGGCTGAA	5’ROX；3’MGB
HCM 野生型探针 WT-P2	CAGCCGCATCCAC	5’CY5；3’MGB

中国兽药协会