

ICS

点击此处添加中国标准文献分类号

团 体 标 准

T/CVMA XXXXX—XXXX

猫弓形虫微滴式数字 PCR 检测方法

Method of Droplet Digital PCR for *Toxoplasma gondii* in cat

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国兽医协会 发布

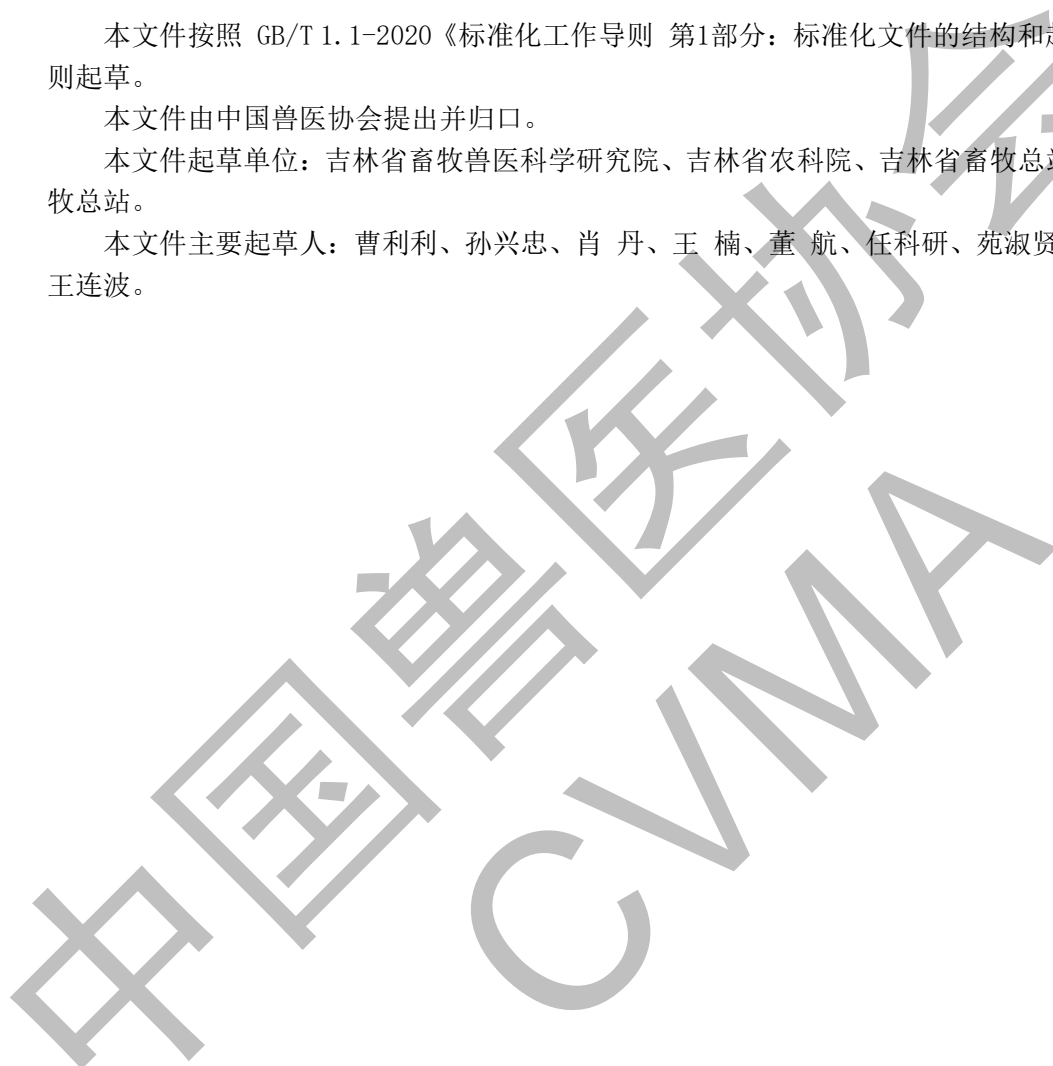
前 言

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》给出的规则起草。

本文件由中国兽医协会提出并归口。

本文件起草单位：吉林省畜牧兽医科学研究所、吉林省农科院、吉林省畜牧总站、吉林省东丰县畜牧总站。

本文件主要起草人：曹利利、孙兴忠、肖丹、王楠、董航、任科研、苑淑贤、郭衍冰、刘沂霖、王连波。



猫弓形虫微滴式数字 PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了猫的弓形虫(*Toxoplasma Gondii*)微滴式数字 PCR 检测方法的试剂与耗材、仪器与设备、样品、操作步骤、结果分析。

本文件适用于猫粪便中弓形虫核酸检测。

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 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

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 微滴式数字

微滴式数字 PCR (droplet digital PCR) 利用微滴化技术将一份反应体系分成数万个纳升级的微滴进行定量 PCR 检测，本质上是将传统 PCR 的一次检测变成数万次检测，提高了核酸序列检测的灵敏度和精准度。

4 试验条件

4.1 生物安全要求

所有样品、培养物和废弃物的处置应符合 GB 19489 的规定。

4.2 防污染措施

防止污染措施应符合 GB/T 27401 的规定。

5 试剂与耗材

T/CVMA XXXXX—XXXX

5.1 核酸提取试剂

宜选取商品化的粪便 DNA 提取试剂盒。

5.2 微滴式数字 PCR 扩增试剂与耗材

宜按照不同的微滴式数字 PCR 平台的说明书选取推荐的微滴式数字 PCR 扩增试剂与耗材。

5.3 引物和探针

上游引物 (F) : 5' -TCCCCTCTGCTGGCGAAAAGT-3'

下游引物 (R) : 5' -AGCGTTCGTGGTCAACTATCGATTG-3'

探针 (P) : 5' -FAM-TCTGTGCAACTTTGGTGTATTTCGCAG-BHQ1-3'

6 仪器与设备

生物安全柜、PCR 扩增仪、数字 PCR 微滴发生器、数字 PCR 微滴分析仪、纯水仪、核酸定量仪、涡旋震荡仪、冰箱、移液器。

7 样品

7.1 样品的采集及运输

样品采集及运输按照 NY/T 541 的规定执行。取待检猫的新鲜粪便 25g~40g, 装入做好相应标记的一次性塑料袋中, 低温运回, 4℃ 冰箱待检。

7.2 样品处理

将待检粪便混匀, 取粪便样本 150~300 mg 于灭菌的离心管中, 经过液氮反复冻融 3 次, 按照粪便基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取基因组。

7.3 样品保存

采集或处理好的样品在 2℃~8℃ 条件下保存应不超过 24 h; 如需长期保存, 应放置 -80℃ 冰箱, 但应避免反复冻融 (冻融不超过 3 次)。

8 操作步骤

8.1 DNA 提取

按照所选取的商品粪便 DNA 提取试剂盒说明书进行提取。

8.2 微滴式数字 PCR 扩增方法

每个样品微滴式数字 PCR 扩增体系设置 3 个平行。微滴式数字 PCR 扩增体系配制如表 1。该步骤按照不同微滴式数字 PCR 平台的说明书进行操作。

表 1 微滴数字 PCR 反应体系

试剂成分	终浓度	体积
2×酶混合液	/	10.0 μL
上游引物 F (10 μmol/L)	0.5 μmol/L	1.0 μL
下游引物 R (10 μmol/L)	0.5 μmol/L	1.0 μL
探针 P (10 μmol/L)	0.1 μmol/L	0.20 μL
DNA模板	/	2.0 μL
无核酸酶水	/	5.8 μL
总体系	/	20 μL

注：使用微滴式数字 PCR 平台进行实验时应依据不同微滴式数字 PCR 平台说明调整扩增体系的组分和最终体积，表中所列组分的终浓度不变。

8.3 微滴生成

反应液配制后，利用微滴生成仪完成 20 μL 反应体系的分割。

8.4 PCR 反应

微滴生成后，在 PCR 扩增仪上进行微滴式数字 PCR 扩增。荧光分析步骤采用 FAM 单荧光通道，微滴式数字 PCR 扩增程序（见表 2）。

表 2 微滴数字 PCR 扩增程序

步骤	温度	持续时间	循环数
1	95 °C	5min	1
2	95 °C	30 s	40
3	58 °C	1 min	40
4	98 °C	10 min	1
5	4 °C	60 min	1

注：升降温速度设置为 2.5 °C/s，不同 PCR 反应平台可以根据说明书对热启动步骤程序进行修改，但不能对扩增程序进行修改。

8.5 微滴式数字 PCR 反应的对照

在进行微滴式数字 PCR 实验时，应设置阳性对照、阴性对照与空白对照。以提取的含有弓形虫的 DNA 样品核酸作为阳性对照；以提取的弓形虫阴性样品核酸作为阴性对照；以无核酸酶水作为空白对照。各对照 PCR 扩增体系中，除模板外，其余组分一致按照表 1 操作，PCR 扩增程序按照表 2 操作。

9 结果分析

9.1 实验成立条件

阳性对照弓形虫基因有明显扩增,扩增终点荧光信号大于或等于阈值;阴性对照弓形虫基因无扩增,扩增终点荧光信号小于阈值;空白对照弓形虫基因无扩增,扩增终点荧光信号小于阈值。与以上实验结果不符,需要重复验证实验步骤。

9.2 阈值设定

微滴式数字 PCR 结果中,阴性微滴和阳性微滴明显分开,阈值设在阴性微滴和阳性微滴分开的区域。

9.3 结果判定

样品中弓形虫基因未得到扩增,扩增终点荧光信号小于阈值,可判定样品结果为阴性,报告未检出弓形虫基因。

样品中弓形虫基因得到扩增,扩增终点荧光信号大于或等于阈值,可判定该样品结果为阳性,报告检出弓形虫基因。