

团 体 标 准

T/CVMA XXXXX—XXXX

布鲁氏菌、牛型结核分枝杆菌双重实时荧光
定量 PCR 检测方法

Detection method of bovine brucella and mycobacterium bovis by double real-time
fluorescence quantitative PCR

(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》的规则起草。

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这些专利的责任。

本文件由中国兽医协会提出并归口。

本文件起草单位：中国动物疫病预防控制中心、青海省动物疫病预防控制中心、广西壮族自治区动物疫病预防控制中心、北京亿森宝生物科技有限公司、江西省动物疫病预防控制中心、山东省动物疫病预防与控制中心、重庆市动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人：孙雨、王睿男、蔡金山、邹联斌、王传彬、宋晓晖、肖颖、杨林、党安坤、王贵升、孙航、阚威、王新杰、孙晓明、高姗姗、王真真、胡祥钰、甘平、马英、毕一鸣、黄辉、姚强、凌洪权、武焯、彭强、董春霞。

布鲁氏菌、牛型结核分枝杆菌双重实时荧光定量 PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了布鲁氏菌、牛型结核分枝杆菌双重实时荧光定量PCR检测方法检测试剂、仪器设备、实验操作步骤。

本文件适用于牛组织、分泌物和培养物、以及全血或血清中布鲁氏菌、牛型结核分枝杆菌的核酸检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范。

3 试剂

除另有规定外，所有试剂均为分析纯，实验用水应符合GB/T 6682 中相关规定，DNA提取相关试剂见附录A，实时荧光PCR检测试剂见附录B。

4 仪器用具

高速冷冻离心机、电子天平、荧光PCR仪、水平电泳系统、-20℃低温冰箱和-80℃超低温冰箱、凝胶成像分析系统、pH计、微波炉、磁力搅拌器、恒温水浴锅、高压灭菌锅、超净工作台、可调移液器（2.5μL，10μL，20,100μL，200μL，1000μL）和可调移液器枪头、离心管、研钵等。

5 样品采集

样品采集按照NY/T 541进行。

采集静脉血时，每头牛使用一个注射器。进行尾部静脉无菌采血。

针对布鲁氏菌，对于妊娠母牛，取胎膜组织或用拭子取子宫绒毛膜间隙渗出物；对于流产胎牛，取脾、淋巴结、肺脏等组织；对于公牛，取睾丸组织，放在含有保护液（50%甘油生理盐水）的同一离心管中，加盖，编号。

针对牛型结核分枝杆菌，取牛的淋巴结、肺脏、肝脏组织，鼻汁、痰液、粪便和乳汁等分泌物放在含有保护液（50%甘油生理盐水）的同一离心管中，加盖，编号。

6 样品处理

6.1 样本采集及处理

按常规方法抽取2~3 mL血液置洁净干燥的试管中，静置约1小时待血液凝固后，取血清200 μ L，置于1.5 mL灭菌离心管中。

6.2 组织样品

每份组织分别从三个不同位置取样，称取样品约1g，用手术剪剪碎混匀后取0.1g于研磨器中研磨，加入1.5ml生理盐水继续研磨，待匀浆后转至1.5ml灭菌离心管中，12000 r/min离心2分钟，取上清200 μ l备用。

6.3 渗出物样品

将渗出物棉拭子在振荡器上充分混合，捻动、挤压干后弃去拭子。12000 r/min离心5 min，吸取上清200 μ L于1.5 mL灭菌离心管中。

6.4 培养物样品

将培养物12000 r/min离心5 min，取上清200 μ L于1.5 mL灭菌离心管中。

7 DNA 的提取

7.1 若选用附录 A 中所列试剂提取 DNA，则参照以下步骤进行操作。

- 7.1.1 取已处理的样品、阴性对照和阳性对照，分别加入裂解液 600 μ L，充分颠倒混匀，室温静置 3~5 min；
- 7.1.2 将液体吸入吸附柱中，12,000 rpm 离心 30 s；
- 7.1.3 弃去收集管中液体，加入 600 μ L 洗涤液，12,000 rpm 离心 30 s；
- 7.1.4 重复上述步骤 7.1.3；
- 7.1.5 弃去收集管中液体，12,000 rpm 离心 2 min，以除去残留的洗涤液；
- 7.1.6 将吸附柱移入新的 1.5 mL 无菌离心管中，向柱中央加入洗脱液 60 μ L。
- 7.1.7 室温静置 2 min，12,000 rpm 离心 1 min，离心管中液体为模板 DNA。得到的核酸模板尽量在 2 小时内进行实时荧光扩增，若需长时间保存须放置-70 $^{\circ}$ C 冰箱，但应避免反复冻融。
- 7.2 若使用 DNA 试剂盒提取 DNA，则按试剂盒说明书进行操作。

8 试剂准备

- 8.1 实验前 20 分钟从-20 $^{\circ}$ C 冰箱中取出试剂盒相应试剂，使试剂完全溶解。
- 8.2 核算实验所需要的反应数（n），并按照以下公示计算当次实验所需要的各种试剂量。

$$n = \text{阴性对照数 (1 反应)} + \text{阳性对照数 (1 反应)} + \text{误差预留量} + \text{样本数}$$

向设定的 n 个 PCR 管中各分装 23 μ l 荧光 PCR 反应液。

- 8.3 盖紧 PCR 反应管盖后将 PCR 反应管转移至样本准备区，剩余试剂放回-20 $^{\circ}$ C 冰箱冷冻保存。

9 加样（样本准备区）

- 9.1 分别向上述 PCR 管中加入样本核酸提取所获得的样本各 2 μ l，阳性对照和阴性对照液各加 2 μ l，记录加样顺序。
- 9.2 盖紧管盖，瞬时离心 30 秒。转移至扩增区。

10 荧光定量 PCR 反应

10.1 机预热，检查仪器性能。

10.2 将 PCR 反应管放在样品槽中相应位置，记录顺序。

10.3 设置扩增参数，布鲁氏菌病毒 (Bru) -FAM 通道采集荧光信号；牛型结核分枝杆菌 (Mtb) -HEX 通道采集荧光信号。实时荧光 PCR 反应程序为：95℃ 2min，1 个循环；95℃ 30s，58℃ 30s，40 个循环，在每次循环的退火时收集荧光。检测结束后，根据扩增曲线和 Ct 值判定结果。每个样品设置三个平行的反应体系，检测过程中应分别设立阴性对照、阳性对照。以含布鲁氏菌、牛型结核分枝杆菌阳性质粒作为阳性对照，同时以双蒸水代替模板作为阴性对照。分别提取样品和对照品的 DNA 进行实时荧光 PCR 检测。

11 结果判定

11.1 结果分析条件设定

直接读取检测结果。合理调整阈值线，不同仪器可根据仪器噪音情况进行调整。

11.2 对照结果的判定

阴性对照：检测结果线形应为直线或轻微斜线，无明显指数增长期和平台期，且 Ct 值>35 或无 Ct 值。

阳性对照 Ct 值≤20，有明显指数增长，呈典型的 S 型曲线。

以上要求需在同一次实验中同时满足，否则，本次实验无效，需重新进行。

11.3 检测结果的判定

阳性：若被检样本的 PCR 反应体系通道出现 2 条典型扩增曲线，且 Ct 值≤32，则判定样本中同时存在布鲁氏菌核酸和牛型结核分枝杆菌核酸。

可疑：若被检样本的 PCR 反应体系通道出现典型扩增曲线，且 Ct 值在 32~35 之间，此时应对样本进行重复检测。如重复实验结果 Ct 值仍在 32~35 之间，有明显指数增长，则判定为阳性，否则为阴性。

阴性：若被检样本的 PCR 反应体系通道无典型扩增曲线，且 Ct 值>35 或无 Ct 值，则判定样本布鲁氏菌核酸和牛型结核分枝杆菌核酸阴性。

附录 A

(规范性)

DNA 提取试剂的配制

A.1 保护液 (50% 生理盐水)

将生理盐水缓慢倒入盛有甘油的容器中, 按 1:1 体积比充分混合。

A.2 裂解液

异硫氰酸胍	236.4 g
氯化钠	23.2 g
0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液 (EDTA) (pH=8.0)	40 mL
灭菌双蒸水	加至 2000 mL

A.3 EDTA (0.5 mol/L, pH=8.0) 溶液配制

EDTA	18.61 g
灭菌双蒸水	80 mL
氢氧化钠	调 pH 至 8.0
灭菌双蒸水	加至 100 mL

A.4 洗脱液

磷酸氢二钠	143.2g
磷酸二氢钾	62.4g
氯化钠	18g
灭菌双蒸水	加至 2000 mL

再加入 6000mL 无水乙醇, 充分混匀。

A.5 洗脱液

磷酸氢二钠	143.2 g
磷酸二氢钾	62.4 g
灭菌双蒸水	加至 2000 mL

中国兽医协会
CVMA

附录 B

(规范性)

实时荧光 PCR 检测

B.1 10× PCR 缓冲液的配制

Tris base	6.06 g
KCl	18.64 g
Triton X-100	5.00 mL

加无核酸酶灭菌蒸馏水至400 mL，用HCl调pH值至9.0（25℃），定容至500 mL。高压灭菌冷却后置于2~8℃保存备用。

B.2 引物序列

根据已报道的布鲁氏菌、牛型结核分枝杆菌基因组序列设计 1 对用于特异性扩增的引物，具体引物信息与基因片段大小如下表所示。

表 B.1 布鲁氏菌引物序列及目的片段长度

引物	引物序列 (5'→3')	预期片段大小 /bp
正向引物	GGCCGGCATCGAAGATC	85
反向引物	CAGGTTGTTCTGTCTCAGGAT	
引物探针	FAM-TCTCCAGACAGGCGGCATCAATATCC-BHQ	

表 B.2 牛型结核分枝杆菌引物序列及目的片段长度

引物	引物序列 (5'→3')	预期片段大小 /bp
正向引物	TTGGTCATCAGCCGTTCTGA	81
反向引物	CGGTGCCCCGAAAGTG	
引物探针	FAM-CTGGCCACCTCGATGCCCTCAC-BHQ	