



团 体 标 准

T/GDAAV 1014—2025

布鲁氏菌超快速荧光 PCR 检测技术 规范

Technical Specification for Ultra-fast Real-time PCR Detection of
Brucella

2025-09-26 发布

2025-10-01 实施

广东省畜牧兽医学会 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

 3.1 超快速荧光 PCR.....1

4 缩略语.....1

5 试剂和耗材.....2

 5.1 试剂2

 5.2 引物和探针.....2

6 仪器设备.....2

7 样品采集与处理.....2

 7.1 生物安全措施.....2

 7.1 样品采集.....2

 7.2 样品前处理.....3

8 操作方法.....3

 8.1 DNA 提取3

 8.2 反应体系的配制.....3

 8.3 超快速荧光 PCR 反应.....4

9 质控标准与结果判定.....4

 9.1 阈值设定.....4

 9.2 质控标准.....4

 9.3 结果判定.....5

附录 A（规范性） 溶液配制.....6

附录 B（资料性） pUC57-*virB10* 重组质粒和内参的制备.....7

附录 C（规范性） 布鲁氏菌和内参引物、探针的名称、序列.....9

附录 D（资料性） DNA 提取方法10

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。

本文件由东莞市动物疫病预防控制中心、广东省畜牧兽医学会提出。

本文件由广东省畜牧兽医学会归口。

主要起草单位：东莞市动物疫病预防控制中心、广东省疾病预防控制中心、广东省动物疫病预防控制中心、广州市番禺区动物疫病预防控制中心、超快生物技术（广州）有限公司、海南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、深圳市动植物疫病预防控制中心、珠海市动物疫病预防控制中心、肇庆市动物疫病预防控制中心、海南省疾病预防控制中心、广州市疾病预防控制中心、广州国家实验室、深圳海关动植物检验检疫技术中心、华润五丰肉类食品（河南）有限公司深圳分公司、东莞市洪梅镇农业技术服务中心、东莞市南城农业技术服务中心。

主要起草人：张险朋、李柏生、徐振娜、胡辛凯、李彩红、管知深、迟庆安、韦正吉、李秋剑、黄铮、周美芳、李丹丹、邹丽容、张欣、孙长云、吴新伟、曹蓝、徐强、韩霄、陈亮、阮周曦、王婉君、林仰孝、李小军、张远龙、卢受昇、黄伟平、曾瀚熙、谭铭光、林梦哲。

布鲁氏菌超快速荧光 PCR 检测技术规范

1 范围

本文件描述了布鲁氏菌超快速荧光PCR检测方法。

本文件适用于细菌培养物、组织样品、动物产品、分泌物、排泄物和环境样品中布鲁氏菌的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过本文件的规范性引用而成为本文件必不可少的条款。其中，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 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

GB/T 18088 出入境动物检疫采样

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。

4 缩略语

下列缩略语适合本文件。

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

Ct值: 阈值循环数 (Cycle threshold)

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid)

F: 上游引物 (Forward primer)

R: 下游引物 (Reverse primer)

P: 探针 (Probe)

BHQ2: 黑洞淬灭剂2 (Black Hole Quencher 2)

FAM: 6-羧基荧光素 (6-Carboxyfluorescein)

MGB: Minor Groove Binder Quencher淬灭基团

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

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

5 试剂和耗材

5.1 试剂

- 5.1.1 试验用水符合 GB/T 6682 二级水的要求。
- 5.1.2 PBS 液 (pH 7.2) 配制方法按照附录 A 中 A.1, 试剂药品采用分析纯。
- 5.1.3 阴性对照为灭菌生理盐水, 配制方法按照附录 A 中 A.2。
- 5.1.4 阳性对照为布鲁氏菌灭活抗原或 pUC57-*virB10* 重组质粒, 重组质粒制备方法按照附录 B 中 B.1。
- 5.1.5 内参为健康猪肝组织 (不含布鲁氏菌), 制备方法按照附录 B 中 B.3。
- 5.1.6 $5\times$ PCR buffer (含 Mg^{2+})。
- 5.1.7 dNTP。
- 5.1.8 快速启动聚合酶。
- 5.1.9 DNA 提取试剂盒。
- 5.1.10 超快速荧光 PCR 反应板。

5.2 引物和探针

超快速荧光 PCR 扩增 (布鲁氏菌和内参) 上、下游引物和探针序列参见附录 C.1。

6 仪器设备

- 6.1 超快速荧光 PCR 仪。
- 6.2 移液器 (量程: $0.5\mu\text{L}\sim 10\mu\text{L}$ 、 $10\mu\text{L}\sim 100\mu\text{L}$ 、 $100\mu\text{L}\sim 1000\mu\text{L}$)。
- 6.3 生物样品均质器。
- 6.4 冷冻高速离心机。
- 6.5 II 级生物安全柜。
- 6.6 高压灭菌锅。
- 6.7 pH 计。

7 样品采集与处理

采样及样品前处理过程须戴一次性口罩、乳胶手套/丁腈手套、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。

7.1 样品采集

7.1.1 采样工具

剪刀、镊子、注射器、棉拭子、1.5mL 离心管、研磨管、采样瓶等无菌处理。

7.1.2 样品采集

样品可包括动物内脏器官 (淋巴结、肝脏、脾脏、生殖器官等)、分泌物 (羊水、阴道分泌物、乳汁、精液、关节液等)、排泄物、细菌培养物、环境拭子。内脏器官: 用 75%酒精棉球对样品体表进行擦拭消毒后, 无菌操作取适量组织器官。分泌物: 抽取适量分泌物放入离心管内或采用棉拭子采集。细菌培养物: 取适量培养液于离心管内。环境拭子: 将棉拭子来回涂抹 2 次~3 次后, 立即放入装有 50% 的甘油-PBS 液的离心管中, 剪去露出部分, 盖紧离心管盖, 密封后冷藏保存。

7.1.3 样品运输

样品运输应符合 NY/T 541 的规定。

7.2 样品前处理

7.2.1 内脏器官样品前处理

取绿豆大小样品放入组织研磨管内，加入1mL PBS溶液，匀浆（7000r/min，20s/次，3次，每次间隔20s），瞬时离心后取200μL，用于核酸提取或-20℃保存备用。

7.2.2 分泌物样品前处理

取适量分泌物，12000r/min离心5min，弃上清，沉淀物用于核酸提取或-20℃保存备用。

7.2.3 粪便样品前处理

取适量样品放入1.5mL离心管中，加入1mL PBS溶液，静置充分溶解，溶解后用于核酸提取或-20℃保存备用。

7.2.4 细菌培养物样品前处理

取细菌培养液 1mL，12000 r/min 离心 5 min，弃上清，沉淀物用于核酸提取或-20℃保存备用。取可疑菌落，加入 1mL PBS 溶液，充分震荡混匀，12000r/min 离心 5min，弃上清，沉淀物用于核酸提取或-20℃保存备用。

7.2.5 环境拭子样品前处理

将待检棉拭子充分震荡混匀，12000 r/min离心1min，弃上清，沉淀物用于核酸提取或-20℃保存备用。

8 操作方法

8.1 DNA 提取

样品前处理后，除了动物组织样品、动物产品样品和分泌物以外，其他类型样品均加入内参参与提取。在提取细菌培养物、粪便和环境拭子样品核酸时，取处理后的样品 160μL，加入内参 40μL。DNA 提取方法见附录 D，也可以采用经过验证的等效核酸提取方法。

8.2 反应体系的配制

每个样品检测反应体系配制见表1，总体积为100μL。配制完毕分装时应尽量避免产生气泡，加入超快速荧光PCR反应板中。反应体系试剂可采用经过验证的等效商品化试剂盒。

表1 超快速荧光 PCR 反应体系配制表

反应体系组分	用量（μL）
5×PCR Buffer（含Mg ²⁺ ）	20.00
快速启动聚合酶（5 U/μL）	8.00

dNTP (25mmol/L)		1.60
布鲁氏菌	F1 (10 μmol/L)	8.00
	R1 (10 μmol/L)	8.00
	P1 (10 μmol/L)	4.00
内参	F2 (10 μmol/L)	6.00
	R2 (10 μmol/L)	6.00
	P2 (10 μmol/L)	3.00
ddH ₂ O		15.40
模板		20.00
合计		100.00

8.3 超快速荧光 PCR 反应

8.3.1 反应条件

95℃预变性, 1min; 95℃、1s, 55℃, 6s (收集荧光信号) (升降温速率40℃/s), 45个循环。

8.3.2 荧光通道设定

布鲁氏菌选择FAM通道; 内参选择Cy5通道。

9 质控标准与结果判定

9.1 阈值设定

阈值由超快速荧光 PCR 仪自动分析并设定。

9.2 质控标准

阳性对照 FAM 通道 (布鲁氏菌) Ct 值≤30.0, Cy5 通道 (内参) 的 Ct 值≤35.0, 并出现典型的“S”型扩增曲线。阴性对照 FAM 通道无 Ct 值, 或无典型扩增曲线; Cy5 通道 (内参) 的 Ct 值≤35.0, 并出现典型的“S”型扩增曲线。样品中的 Cy5 通道 (内参) 的 Ct 值≤35.0, 并出现典型的“S”型扩增曲线。阳性对照、阴性对照和内参通道同时成立可判定试验有效, 否则试验无效。

9.3 结果判定

9.3.1 FAM 通道无 Ct 值或无典型“S”型扩增曲线, Cy5 通道 (内参) 的 Ct 值≤35.0, 判为布鲁氏菌核酸阴性。

9.3.2 FAM 通道出现典型“S”型扩增曲线，且 Ct 值 ≤ 36 ，Cy5 通道（内参）的 Ct 值 ≤ 35.0 ，判为布鲁氏菌核酸阳性。

9.3.3 FAM 通道 $36 < \text{Ct 值} < 45$ 且有典型“S”型扩增曲线，Cy5 通道（内参）的 Ct 值 ≤ 35.0 ，判为可疑。结果为可疑时应用提取的核酸重新进行检测，若 FAM 通道无特异性扩增曲线或无 Ct 值或等于 45 则为布鲁氏菌核酸阴性，若 FAM 通道 Ct 值小于 45 且有典型“S”型扩增曲线则判为布鲁氏菌核酸阳性。

附 录 A

(规范性)

溶液配制

A.1 0.01mol/L PBS(pH7.2)溶液的配制

称取磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 3.0g, 磷酸氢二钾 (K_2HPO_4) 0.2g, 氯化钠 (NaCl) 8g, 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°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), 高压灭菌15min, 室温保存。

A.2 生理盐水的配制及灭菌

称取0.9g氯化钠, 加入蒸馏水溶解, 定容至100ml, 121°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), 高压灭菌15min, 常温保存备用。

附 录 B

(资料性)

pUC-*virB10* 重组质粒和内参的制备B.1 pUC-*virB10*重组质粒的制备

扩增布鲁氏菌 *virB10* 基因序列片段, 将扩增产物进行胶回收和双酶切后, 连接至 pUC57 载体上, 再转化至 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞中, 得到重组质粒, 提取重组质粒进行 PCR 检测和测序, 鉴定为 pUC57-*virB10* 重组质粒, 质粒浓度约为 3.3×10^{10} copies/ μ L, 将其稀释为工作浓度约 1×10^6 copies/ μ L。

B.2 布鲁氏菌 *virB10* 基因序列 (GenBank 登录号: AF226278.1)

ATGACACAGGAAAACATTCCGGTGCAGCCGGGCACACTTGACGGTGAGCGTGGCCTACCCA
CCGTGAACGAAAACGGCTCCGGCCGCACCCGCAAGGTGTTGCTCTTTCTCTTTGTCGTGGGCTTC
ATCGTCGTGCTGCTGTTGCTGCTCGTGTTCACATGAGGGGCAATGCAGAGAATAATCACCATT
AGACAAGACGATGGTGCAGACCAGCACAGTTCCGATGCGAACTTTCAAGCTGCCACCCCGCCA
CCACCAGCACCACCAGAACCACCAGCCCCGCCACCGGCCCCAGCCATGCCCATCGCGGAACCCG
CAGCGGCGGCGCTGAGCCTGCCACCATGCCGGATGATACGCCGGCAAAGGACGATGTACTGGA
CAAATCGGCCAGCGCGTTGATGGTCGTCACCAAGTCCAGCGGCGATACGAACGCTCAAACGGCC
GGCGATACGGTCGTTCAAACGACCAATGCGCGCATTCAAGCCCTGCTCGACAGTCAAAAGAACA
CCAAGCAGGATGCTGGATCGCTGGGTACTCTCCTTCACGGCACACAAACGGATGCACGCATGGC
GAGCCTTCTGCGCAACCGTGATTTCTGCTCGCGAAGGGCAGCATCATCAATTGCGCGCTGCAAA
CCCGTCTGGATTCGACGGTGCCGGGCATGGCTGCCTGCGTGGTCACACGCAACATGTATAGCGAT
AACGGCAAGGTGTTGCTGATTGAGCGCGGTTCAACCATCTCGGGTGAATATGATGCCAACGTAA
AGCAGGGCATGGCTCGCATTTATGTCTGTGGACGCGCGTGAAGACGCCGAACGGTGTCGTGATC
GATCTCGACTCTCCAGGCGCCGACCCCTGGGCGGGGCAGGCTTGCCCGGCTACATCGACTCCCA
CTTCTGGAAGCGCTTTGGCGGCGCCTTGATGTTGAGCACGATCGAGACCCTCGGCCGCTATGCAA
CCCAGAAGGTCGGCGGCGGGGGTTCAAATCAGATCAACCTCAATACCGGCGGAGGTGAATCGAC
GAGCAACCTGGCTTCAACTGCCTTGAAGGATACGATCAACATTCCGCCGACACTGTACAAGAACC
AGGGCGAAGAGATCGGCATCTATATCGCCCGCGACCTAGATTTTTCGAGTGTGTATGATGTCCAA
CCGAAGTGA

B.3 内参的制备

取健康的猪肝脏 (不含布鲁氏菌), 绿豆大小置于研磨管内, 加入 1 mL PBS 溶液匀浆 (速度 7200 r/min; 匀浆 4 次, 每次 15 s, 每次间隔 30 s), 离心后备用。

B.4 哺乳动物 β -actin 基因序列 (NCBI 序列号: NM_001195845.3)

ATGGATGACGATATCGCTGCGCTTGTGGTCGACAACGGCTCCGGCATGTGCAAGGCCGGCTT
CGCAGGCGACGACGCCCCCGGGCCGTCTTCCCCTCCATCGTGGGGCGCCCCGGCACCAAGGGC
GTGATGGTGGGCATGGGCCAGAAGGACTCCTACGTGGGCGATGAGGCCAGAGCAAGAGGGGC
ATCCTGACCCTGAAGTACCCCATGAGCACGGCATCGTCACCAACTGGGACGACATGGAGAAGA
TCTGGCACCACACCTTCTACAACGAGCTGCGCGTGGCCCCCGAGGAGACCCGGTGCTGCTGACC
GAGGCCCCCCTGAACCCCAAGGCCAACCGTGAGAAGATGACCCAGATCATGTTTCGAGACTTTCA

ACACCCCAGCCATGTACGTGGCCATCCAGGCTGTGCTGTCCCTGTACGCCTCTGGCCGCACCACT
GGCATCGTGATGGACTCCGGTGACGGGGTCACCCACACGGTGCCCATCTATGAGGGGTACGCCCT
CCCCATGCCATCTTGCGTCTGGACCTGGCTGGCCGGGACCTGACCGACTACCTCATGAAGATCC
TCACGGAGCGTGGCTACAGCTTCACCACCACCGCCGAGCGGGAAATCGTGCGTGACATCAAGGA
GAAGCTGTGTTATGTGGCCCTGGACTTCGAGCAGGAGATGGCCACCGCGGCCTCCAGCTCCTCCC
TGGAGAAGAGCTATGAGCTGCCCCGACGGGCAGGTCATCACTATTGGCAACGAGCGGTTCCGCTG
CCCAGAGGCTCTCTTCCAGCCTTCCTTCCTGGGCATGGAATCCTGCGGCATCCATGAAACTACCTT
CAACTCCATCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGCAAGGACCTCTATGCCAACACAGTGCTGTCTG
GTGGAACCACCATGTACCCTGGCATCGCTGACAGGATGCAGAAGGAGATCACTGCCCTGGCACC
CAGCACAATGAAGATCAAGATCATCGCACCCCCTGAGCGCAAGTACTCTGTGTGGATTGGGGGC
TCCATCCTGGCCTCACTGTCCACCTTCAGCAAATGTGGATCAGCAAGCAGGAGTACGACGAGTC
CGGCCCCTCCATCGTCCACCGCAAATGCTTCTAG

附 录 C

(规范性)

布鲁氏菌和内参引物、探针的名称、序列

C.1 布鲁氏菌和内参引物、探针的名称、序列

表C.1列出了超快速荧光PCR引物、探针序列。

表 C.1 布鲁氏菌和内参引物、探针的名称、序列

名称	序列 (5'-3')
布鲁氏菌F1	GGGGTTCAAATCAGATCAACCTC
布鲁氏菌R1	GCGGAATGTTGATCGTATCCTTC
布鲁氏菌P1	FAM-CTCGTCGATTACCTCCGCCGGTA-MGB
内参F2	AGTCCGCCTAGAAGCATTTG
内参R2	TGTCCACCTTCCAGCAGATG
内参P2	Cy5-AGTCCGGCCCCCTCCATCGTCCA-BHQ2

附 录 D
(资料性)
DNA 提取方法

D.1 DNA 提取方法 (磁珠法)

D.1.1 取阳性对照、阴性对照和经过处理的样品 200 μ L, 直接加入装有 715 μ L 裂解液管中, 漩涡混匀 5s, 室温静置 10min 使样品充分裂解, 转移离心管至磁力架上, 静置 30s, 磁珠完全吸附后吸弃上清液, 将离心管从磁力架上取下。

D.1.2 加洗涤液 700 μ L 至裂解液管中, 振荡混匀 30s, 转移离心管至磁力架上, 静置 30s, 磁珠完全吸附后吸弃上清液, 将离心管从磁力架上取下。

D.1.3 短暂离心收集管壁上的液滴, 转移离心管至磁力架上, 磁珠完全吸附后吸弃上清液。

D.1.4 打开离心管盖, 室温干燥 3min 晾干磁珠, 将离心管从磁力架上取下。

D.1.5 加洗脱液 100 μ L 至裂解液管中, 振荡混匀, 转移裂解液管至磁力架上, 静置 1min, 磁珠完全吸附后小心将 DNA 溶液转移至一个新离心管中, 应尽快用于下游试验, 如不能立即使用, 应置于-20 $^{\circ}$ C储存。

D.2 细菌培养液核酸提取方法 (高温裂解法)

取 200 μ l 细菌培养液, 100 $^{\circ}$ C, 15min 后, 12000 r/min, 离心 5min, 上清于-20 $^{\circ}$ C保存。
