

T/SNLT

石河子农产品流通协会团体标准

T/SNLT XXXX—XXXX

牛结核病数字 PCR 检测操作技术规程

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

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 主要设备及耗材	1
5.1 数字 PCR 系统	1
5.2 核酸提取设备	1
5.3 生物安全柜	1
5.4 冰箱和超低温冰箱	1
5.5 移液器及配套吸头	2
5.6 无酶离心管	2
5.7 其他设备	2
6 材料与试剂	2
6.1 材料与试剂要求	2
6.2 引物和探针序列	2
6.3 核酸提取试剂	2
6.4 数字 PCR 反应配套试剂	2
6.5 阳性对照	2
7 生物安全要求	2
8 数字 PCR 操作方法	2
8.1 样品前处理	2
8.2 核酸提取	2
8.3 数字 PCR 检测	2
9 结果分析与表述	3
9.1 阈值的设定	3
9.2 质量控制	3
9.3 结果分析	3
9.4 结果判定与报告	3

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。

本文件由第八师石河子市畜牧水产发展服务中心提出并归口。

本文件起草单位：第八师石河子市畜牧水产发展服务中心、艾普拜生物科技（苏州）有限公司、新疆满得拉生物技术股份有限公司、石河子大学。

本文件主要起草人：窦立静、郑祖亮、陈强斌、房文斌、冯晓燕、杨洁、于祥春、赵艳梅、刘强、蔺文龙、王宏伟、叶俊生、刘颖、屈阳、叶翠芳。

牛结核病数字 PCR 检测操作技术规程

1 范围

本文件规定了牛结核病病原数字PCR检测方法的技术要求和操作规范。

本文件适用于牛血液、组织（如淋巴结、肺脏）、拭子、乳汁、粪便、等样品中结核分枝杆菌复合群、牛分枝杆菌的检测。

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 19489 实验室生物安全通用要求

GB/T 18645 动物结核病诊断技术

GB/T 27401 实验室质量控制规范 兽医学检测

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。

4.1

DNA

脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid)。

4.2

dPCR

数字 PCR (digital polymerase chain reaction)。

4.3

PCR

聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction)。

5 主要设备及耗材

5.1 数字 PCR 系统

扩增仪及相关配套设备。

5.2 核酸提取设备

组织研磨仪、涡旋振荡器、台式高速冷冻离心机（离心力可达15000 g）、恒温水浴锅或金属浴、核酸提取仪。

5.3 生物安全柜

II级A2型或以上。

5.4 冰箱和超低温冰箱

用于试剂和样品保存。

5.5 移液器及配套吸头

100 μL~1 000 μL、20 μL~200 μL、10 μL~100 μL、2 μL~20 μL、1 μL~10 μL。

5.6 无酶离心管

0.1 mL、0.2 mL、1.5 mL、2.0 mL、15 mL和50 mL。

5.7 其他设备

涡旋混匀振荡器、PCR管离心机。

6 材料与试剂

6.1 材料与试剂要求

除另有说明，本方法仅使用分析纯试剂和重蒸馏水或符合 GB/T 6682 规定的一级水。

6.2 引物和探针序列

数字PCR扩增所用的引物和探针序列见表1。

表 1 引物和探针序列

类别	名称	核酸序列
结核分枝杆菌复合群 (IS6110)	IS6110-F	5' -GCAGGGTTCGCCTACGTG-3'
	IS6110-R	5' -CGGGTCCAGATGGCTTGC-3'
	IS6110-P	5' -FAM-TGTCACCGACGCCTACGCTCGC-3' -BHQ1
牛分枝杆菌	MB-F	5' -ACGCCTTCCTAACCAGAATTG-3'
	MB-R	5' -GGCTATTGACCAGCTAAGATATCC-3'
	MB-P	5' -Cy5-AATTCATACAAGCCGTAGTCGTGCAGAA-3' -BHQ3

6.3 核酸提取试剂

经验证适用于分枝杆菌细胞壁破壁（如溶菌酶、机械研磨、磁珠法结合化学裂解）的DNA提取试剂盒。

6.4 数字 PCR 反应配套试剂

数字PCR反应预混液。

6.5 阳性对照

牛分枝杆菌ATCC 27289或等效菌株或含目的片段的DNA。

7 生物安全要求

采样、样品处理及检测过程所涉及的实验操作，应按 GB 19489 和 GB/T 27401 的有关规定执行。

8 数字 PCR 操作方法

8.1 样品前处理

按照 GB/T 18645 的规定执行。

8.2 核酸提取

按照商品化试剂盒说明书要求提取相应样品的 DNA。

8.3 数字 PCR 检测

8.3.1 对照和平行

检测过程中分别设置阳性对照和空白对照。以牛分枝杆菌ATCC 27289或等效菌株或含目的片段的DNA作为阳性对照，用等体积的一级水代替模板DNA作为空白对照。每个待检样品提取的DNA溶液进行3个平行数字PCR检测。

8.3.2 反应体系

按照表2配制数字PCR反应体系。

表2 数字PCR反应体系

试剂名称	储备液浓度	终浓度	体积 μL
数字PCR反应预混液	5×	1×	1
IS6110-F	20 $\mu\text{mol/L}$	0.8 $\mu\text{mol/L}$	0.2
IS6110-R	20 $\mu\text{mol/L}$	0.8 $\mu\text{mol/L}$	0.2
IS6110-P	20 $\mu\text{mol/L}$	0.4 $\mu\text{mol/L}$	0.1
IS1081-F	20 $\mu\text{mol/L}$	0.8 $\mu\text{mol/L}$	0.2
IS1081-R	20 $\mu\text{mol/L}$	0.8 $\mu\text{mol/L}$	0.2
IS1081-P	20 $\mu\text{mol/L}$	0.4 $\mu\text{mol/L}$	0.1
MB-F	20 $\mu\text{mol/L}$	0.8 $\mu\text{mol/L}$	0.2
MB-R	20 $\mu\text{mol/L}$	0.8 $\mu\text{mol/L}$	0.2
MB-P	20 $\mu\text{mol/L}$	0.4 $\mu\text{mol/L}$	0.1
DNA模板	—	—	2.5
体系总体积	—	—	5

8.3.3 微滴生成和PCR扩增

将配制好的数字PCR反应混合液，加入微滴芯片加样孔中，将芯片转移至微滴生产和扩增仪中，按仪器操作说明生成微滴和PCR扩增。扩增条件为95℃，5 min，1个循环；95℃ 30 s，58℃ 30 s，45个循环。升降温速度设置为 ≤ 2 °C/s。

8.3.4 荧光信号读取

扩增反应结束后，将芯片放入数字PCR检测仪中对每个微滴进行荧光检测，采用FAM、HEX和Cy5通道读取荧光信号。

9 结果分析与表述

9.1 阈值的设定

根据体系中空白对照扩增体系终点荧光值设定荧光的阈限值。阈限值应明确区分空白对和阳性扩增体系中的阴性微滴和阳性微滴。

9.2 质量控制

以下条件有一项不符合者，实验结果视为无效，查找原因后再次进行数字PCR检测：

- 1) 体系分隔产生的有效微滴的总数量满足所用数字PCR仪器型号要求。
- 2) 空白对照中没有任何扩增现象，阳性对照组出现明显的扩增现象

9.3 结果分析

阴性反应结果判定：受试样本未出现明显的扩增现象，其扩增终点荧光信号值位于阈限值之下，这表明试样中未检测出目的基因，表述为“试样中未检测出，检测结果为阴性”。

阳性反应结果判定：受试样本出现明显的扩增现象，其扩增终点荧光信号值超过荧光阈限值，这表明试样中检测出目的基因，表述为“试样中检测出，检测结果为阳性”。

9.4 结果判定与报告

先进行结核分枝杆菌复合群的判定，受试样本呈结核分枝杆菌复合群IS6110和（或）IS1081结果阳性，均判为结核分枝杆菌复合群核酸检测阳性。然后进行牛分枝杆菌的判定，受试样本呈牛分枝杆菌检测反应呈阳性，判为牛分枝杆菌核酸检测阳性。
