



团 体 标 准

T/GDAAV 1013—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

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

广东省畜牧兽医学会 发布

目 次

前言	II
1 范围	错误!未定义书签。
2 规范性引用文件	错误!未定义书签。
3 术语和定义	错误!未定义书签。
3 术语和定义	错误!未定义书签。
3.1 超快速荧光 PCR ultra-fast Real-time 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 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 加样	4
8.4 超快速荧光 PCR 反应	4
9 结果判定	4
9.1 阈值设定	4
9.2 质控标准	4
9.3 结果描述及判定	5
附录 A（规范性） 溶液配置	6
附录 B（资料性） pUC57-OmpA 重组阳性质粒和内参质粒的制备	7
附录 C（规范性） 引物、探针的名称、序列和工作浓度	8
附录 D（资料性） DNA 提取试剂盒方法（磁珠法）	9

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、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、李彩虹、管知深、迟庆安、韦正吉、李秋剑、李丹丹、邹丽容、张欣、孙长云、吴新伟、曹兰、徐强、韩霄、阮周曦、王婉君、林仰孝、李小军、张远龙、卢受昇、黄伟平、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、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8-15分钟内完成45个循环检测。

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 Quencher1)

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)

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

5 试剂和耗材

5.1 试剂

- 5.1.1 除非另有说明，所用试剂均为分析纯，试验用水符合 GB/T 6682 二级水的要求。
- 5.1.2 PBS (pH 7.2) 配制方法按照附录 A 中 A.1。
- 5.1.3 阳性对照为布鲁氏菌灭活抗原或 pUC-virB10 重组阳性质粒，重组阳性质粒制备方法按照附录 B 中 B.2。
- 5.1.4 阴性对照为灭菌生理盐水，配制方法按照附录 A 中 A.2。
- 5.1.5 内参为哺乳动物 β -*actin* 基因重组质粒，制备方法按照附录 B 中 B.4。
- 5.1.6 超快速荧光 PCR 预混液 (包含 $5\times$ PCR buffer、 Mg^{2+} 、dNTP)。
- 5.1.7 快速启动聚合酶 (5 U/ μ L)。
- 5.1.8 DNA 提取试剂盒。
- 5.1.9 超快速荧光 PCR 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 μ L~10 μ L、10 μ L~100 μ L、100 μ L~1000 μ 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 高压灭菌器。
- 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、一次性 PE 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、研磨管等采样工具经过 121 $^{\circ}$ C ($\pm 2^{\circ}$ C)，高压灭菌 15min，冷却后，烘干，备用。采样瓶使用前用 5% HCL 溶液浸泡 1 h 以上，0.2 μ m 滤膜过滤的双蒸去离子水冲洗，密闭包装后置高压灭菌锅，121 $^{\circ}$ C ($\pm 2^{\circ}$ C)，高压灭菌 20min，冷却后，烘干，备用。

7.1.2 样品采集

待检样品可包括动物阴道拭子、全血、乳汁样品、流产胎儿及流产物、粪便、尿液、脾脏、肝脏、肾脏、淋巴结、关节液、骨髓、环境拭子等样品。流产胎儿及流产物、脾脏、肝脏、肾脏、淋巴

结：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。全血：取 10mL 于灭菌的抗凝管中。阴道拭子和环境拭子：采集阴道或环境拭子时，将拭子来回刮 2 次~3 次。粪便/尿液：取适量/10mL 于样品收集管。

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 粪便前处理

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。

7.2.2 拭子样品前处理

每支拭子加入 1mL PBS 溶液，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。

7.2.3 细菌培养物

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

7.2.4 组织样品前处理

样品放入 2mL 研磨管中，加入 1mL PBS 溶液，放入生物样品均质器 7000 r/min 匀浆 3 次，每次 20s，每次间隔 20s 进行匀浆，瞬时离心后获组织匀浆液，取 200μL 可直接用于核酸提取或 -20℃ 保存备用。

7.2.5 乳汁样品前处理

取乳汁 10mL，12000 r/min 离心 5min，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，加入 5μL 内参参与核酸提取，DNA 提取过程详见附录 D，也可采用其他等效的 DNA 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 40μL。配制完毕分装时应尽量避免产生气泡。反应体系试剂可采用等效效果的商品化试剂盒。

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		20.00
快速启动聚合酶（5 U/μL）		8.00
dNTP（0.4mmol/μL）		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
合计		80.00

8.3 加样

在各设定的超快速荧光PCR管中分别加入8.1提取的DNA溶液20 μL，盖紧管后瞬时离心，取100 μL反应液加入超快速荧光PCR反应板中。

8.4 超快速荧光 PCR 反应

8.4.1 上机

将8.3中加样后的反应板放入超快速荧光PCR仪中，记录样品放置顺序。

8.4.2 循环条件设置

95℃预变性，1min；95℃、1s，55℃，6s(收集荧光信号)（升降温速率40℃/s），42个循环。

8.4.3 荧光通道设定

布鲁氏菌为探针5'端标记报告荧光基团FAM，3'端标记淬灭荧光基团MGB；内参为探针5'端标记报告荧光基团Cy5，3'端标记淬灭荧光基团BHQ2。

9 结果判定

9.1 阈值设定

超快速荧光 PCR 仪自动分析。

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 ，表示样品中布鲁氏菌核酸阳性。

9.3.3 FAM 通道 $36 < \text{Ct 值} < 42$ 且有典型“S”型扩增曲线，Cy5 通道（内参）的 Ct 值 ≤ 35.0 ，判为可疑。可疑样品应重新检测，若重新检测 FAM 通道无特异性扩增曲线或无 Ct 值或等于 42 则为布鲁氏菌核酸阴性，若 FAM 通道 Ct 值小于 42 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)
溶液配置

A.1 0.01mol/L PBS (pH7.2) 溶液的配置

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 阴性对照

为灭菌生理盐水: 称取0.9g氯化钠, 溶解在少量蒸馏水后, 定容至100 ml, 121°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), 高压灭菌15 min后作为阴性对照使用。

附 录 B

(资料性)

pUC-virB10 重组阳性质粒和内参的制备

B.1 布鲁氏菌 *virB10* 基因序列

GGGGTTCAAATCAGATCAACCTCAATACCGGCGGAGGTGAATCGACGAGCAACCTGGCTTCAACTGCCTTGAAGGATACGATCAA
CATTCCGC

B.2 pUC-virB10重组阳性质粒的制备

使用表 C.1 的布鲁氏菌引物，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，鉴定为重组阳性质粒 (pUC57-*virB10*)，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.3 哺乳动物 β -actin 基因序列

TGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCAGCAAGCAGGAGTACGACGAGTCCGGCCCCTCCATCGTCCACCGCAAATGCTTCTAGGC
GGACT

B.4 哺乳动物 β -actin基因重组质粒的制备

使用表 C.1 的内参引物，扩增 β -actin 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，鉴定为重组阳性质粒 (pUC57- β -actin)，质粒浓度约为 1.3×10^{10} copies/ μ L，将其稀释为工作浓度约 1×10^7 copies/ μ L。

附录 C

(规范性)

引物、探针的名称、序列和工作浓度

C.1 引物、探针的名称、序列和工作浓度

表C.1列出了超快速荧光PCR引物、探针信息和工作浓度。

表 C.1 引物、探针的名称、序列和浓度

名称	序列 (5'—3')	工作浓度 (μmol/L)
布鲁氏菌F1	GGGGTTCAAATCAGATCAACCTC	10
布鲁氏菌R1	GCGGAATGTTGATCGTATCCTTC	10
布鲁氏菌P1	FAM-CTCGTCGATTCACCTCCGCCGGTA-MGB	10
内参F2	AGTCCGCCTAGAAGCATTG	10
内参R2	TGTCCACCTTCCAGCAGATG	10
内参P2	Cy5-AGTCCGGCCCCCTCCATCGTCCA-BHQ2	10

附录 D

(资料性)

DNA 提取试剂盒方法 (磁珠法)

- D.1 取 195 μ L 经过处理的样品、阳性对照和阴性对照分别加入 5 μ L 内参, 然后分别加入装有 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.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.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.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.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。
-