

ICS 11.220

B 41

团 体 标 准

T/CVMA X9—2019

布鲁氏菌荧光 PCR 检测方法

Real-Time PCR for detection of *Brucella* spp.

2019 - XX - XX 发布

2019 - XX - XX 实施

中 国 兽 医 协 会 发 布

前 言

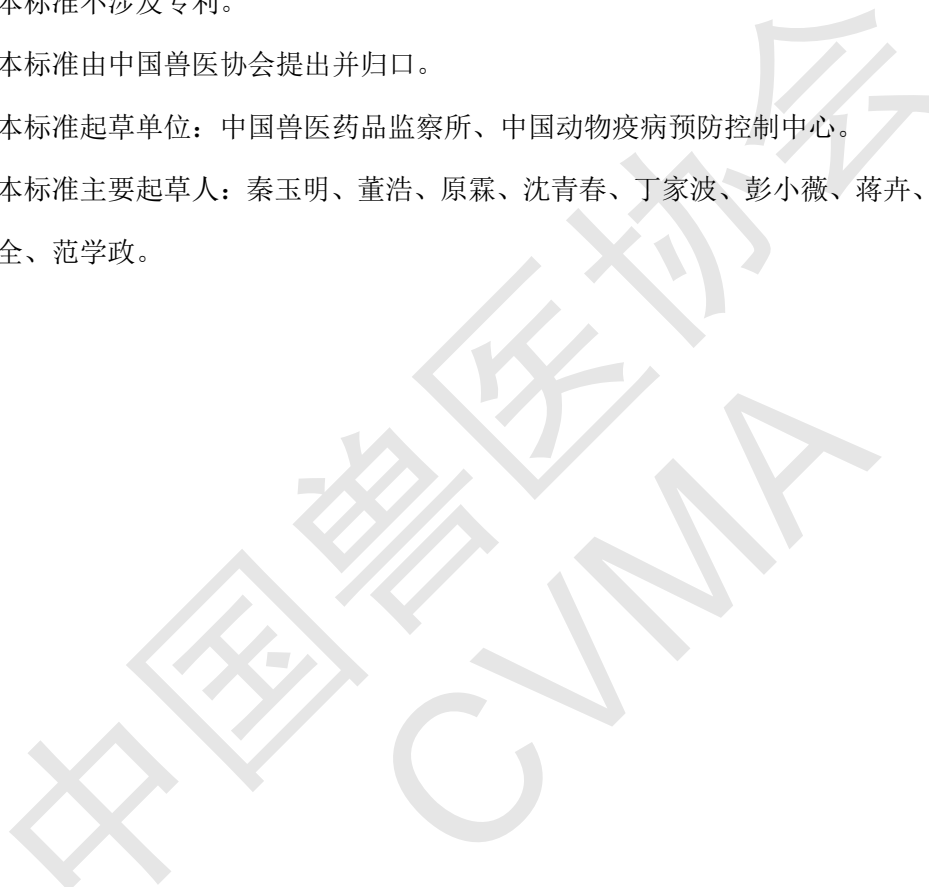
本标准按 GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准不涉及专利。

本标准由中国兽医协会提出并归口。

本标准起草单位：中国兽医药品监察所、中国动物疫病预防控制中心。

本标准主要起草人：秦玉明、董浩、原霖、沈青春、丁家波、彭小薇、蒋卉、冯宇、许冠龙、朱良全、范学政。



布鲁氏菌荧光 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了布鲁氏菌（*Brucella* spp.）荧光 PCR 诊断技术。

本标准主要用于动物中布鲁氏菌(*Brucella* spp.)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 18646 动物布鲁氏菌病诊断标准

NY/T1467 奶牛布鲁氏菌病PCR诊断技术

3 试剂与耗材

3.1 提取试剂

宜选取商品化的细菌基因组 DNA 提取试剂盒。

3.2 荧光 PCR 扩增试剂

宜按照不同的荧光 PCR 平台的说明书选取推荐的荧光 PCR 扩增试剂。

3.3 引物探针

Brucella 上游引物(Bru F): 5' -cgctcgcgcggtgat-3'

Brucella 下游引物(Bru R): 5' -cttgaagcttgccgacagtcacc-3'

Brucella 探针 (Bru P): 5' -FAM- acgaccaagctgcatgctgttgcgatg-BHQ1-3'

4 仪器与设备

生物安全柜、分析天平、水浴锅、高速离心机、荧光 PCR 仪、组织研磨器、-20℃冰箱、涡旋震荡仪。

5 操作步骤

5.1 样品的采集及运输

按照GB/T 18646和NY/T1467 执行。

5.2 样品的处理

按照GB/T 18646和NY/T1467 执行。

5.3 细菌基因组提取

按照所选取的细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行提取。

5.4 荧光 PCR 扩增方法

按照表 1 配制布鲁氏菌 (*Brucella spp.*) 荧光 RT-PCR 扩增反应体系。

表1 布鲁氏菌 (*Brucella spp.*) 荧光PCR扩增反应体系

试剂	终浓度	体积
2×酶混合液 ^a	/	10 μL
Bru F (10 μmol/L)	0.3 μmol/L	0.6 μL
Bru R (10 μmol/L)	0.3 μmol/L	0.6 μL
Bru P (10 μmol/L)	0.3 μmol/L	0.6 μL
DNA 模板	/	2 μL
无菌无核酸酶水	/	6.2 μL
总体积		20.0 μL
注：a 为荧光 PCR 扩增试剂。		

将表1中所有试剂加到荧光PCR反应管后，充分混匀，做好标记。布鲁氏菌 (*Brucella spp.*) 荧光 PCR 扩增所用荧光报告基因为FAM，淬灭基因为BHQ或None。在荧光PCR仪上按表2所示程序进行扩增反应。

表2 布鲁氏菌 (*Brucella* spp.) 荧光PCR扩增程序

步骤	温度	持续时间	循环数
1	95 °C	2 min	1
2	95 °C	15 s	40
3	60 °C	1 min	

注：在每个循环第二步（60 °C 1min）收集荧光信号。

5.5 荧光 PCR 扩增反应的对照

在进行荧光PCR实验时，应设置阳性对照和阴性对照。以提取的布鲁氏菌基因组DNA溶液或含有目的片段的质粒作为阳性对照；以细菌基因组提取试剂盒的洗脱液替代DNA模板作为阴性对照。各对照PCR扩增体系中，除模板外，其余组分和PCR扩增程序同5.4。

6 结果判定

6.1 阈值设定

阈值线设定于刚刚超过阴性对照扩增曲线的最高点。不同仪器可根据仪器噪音情况进行调整。

6.2 结果判定

6.2.1 阳性对照Ct值 ≤ 35 并出现特定的扩增曲线，阴性对照无Ct值并且无特定扩增曲线，实验结果成立，否则实验结果不成立。

6.2.2 被检样品FAM荧光信号Ct值 ≤ 35 并出现特定的扩增曲线，判断为阳性。

6.2.3 被检样品 $35 < \text{Ct值} \leq 40$ 并出现特定的扩增曲线，需重新取样提取基因组DNA，扩增后结果判定仍是可疑的，可判定为阳性。

6.2.4 无扩增曲线，判断为阴性。