

ICS 11.220

B 41

团 体 标 准

T/CVMA X3—2019

羊传染性脓疱病毒微滴数字 PCR 检测方法

Method of Droplet Digital PCR for Orf Virus

2019- XX-XX 发布

2019 - XX -XX 实施

中 国 兽 医 协 会 发 布

前 言

本标准按照 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：吉林省畜牧兽医科学研究所、吉林省动物疫病预防控制中心、中国动物疫病预防控制中心。

本标准主要起草人：邵洪泽、王楠、原霖、于钦磊、马晓媛、高春生、白翠、呼延含蓉、董航、任锐、王欣宇、李昱洁、张兴菊、宋天辉。

中国兽医协会
CVMA

羊传染性脓疱病毒微滴数字 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了羊传染性脓疱病毒微滴式数字PCR检测方法的试剂与耗材、仪器与设备、样品、操作步骤、结果分析。

本标准适用于羊传染性脓疱病毒核酸的检测。

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，仅所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 27401 实验室质量控制规范 动物检疫

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术要求

3 原理

微滴式数字 PCR（Droplet Digital PCR，ddPCR）的技术原理是利用微滴化技术将一份反应体系分成数万个纳升级的微滴进行定量 PCR 检测，本质上是将传统定量 PCR 的一次检测变成数万次检测，提高了核酸序列检测的灵敏度和精准度。微滴发生器可以将每一份扩增体系分成数万个均匀的纳升级微滴，每个微滴不含或者含有一个至数个待检核酸靶分子。每个微滴都将作为一个独立的 PCR 扩增体系，在 PCR 扩增仪上进行终点 PCR 扩增。利用微滴分析仪对每个微滴进行检测，有荧光信号的微滴判读为 1，没有荧光信号的微滴判读为 0。然后根据泊松分布原理以及阳性微滴的比例，计算出待检靶分子的浓度或拷贝数。

4 试剂与耗材

4.1 核酸提取试剂

宜选取商品化的病毒 DNA 提取试剂盒。

4.2 微滴式数字 PCR 扩增试剂与耗材

宜按照不同的微滴式数字 PCR 平台的说明书选取推荐的微滴式数字 PCR 扩增试剂与耗材。

4.3 引物和探针

ORF 上游引物（ORFV F）：5' -TTGCACATGTCCGTGAAGAAGT-3'

ORF 下游引物 (ORFV R) : 5' -AGGCGGTGGAATGGAAAGAC-3'

ORF 探针 (ORFV P) : 5' - (FAM) -CGGGTAGTCTTTGGAGTC - (TAMRA) -3'

5 仪器与设备

生物安全柜、PCR 扩增仪、数字 PCR 微滴发生器、数字 PCR 微滴分析仪、纯水仪、核酸定量仪、涡旋震荡仪。

6 样品

6.1 样品的采集

样品采集及运输按照 NY/T 541 的规定执行。

6.2 样品处理

取 0.1 g 痂皮病料按 1 : 1 体积比加入 pH 7.0-7.2 磷酸缓冲液。充分研磨后, 制成混悬液, 然后装入离心管封闭, 置 4 °C 冰箱 6 h, 中间振荡 2~3 次, 然后 1 000 r/min (离心力) 离心 10 min, 取上清为待检样品。

6.3 样品保存

采集或处理好的样品在 2 °C~8 °C 条件下保存应不超过 24 h; 如需长期保存, 应放置 -70 °C 冰箱, 但应避免反复冻融 (冻融不超过3次)。

7 操作步骤

7.1 DNA 提取

按照所选取的病毒DNA提取试剂盒说明书进行提取。

7.2 微滴式数字 PCR 扩增方法

每个样品微滴式数字PCR扩增体系设置3个平行。微滴式数字PCR扩增体系配制如表1。该步骤按照不同微滴式数字PCR平台的说明书进行操作。

表1 微滴数字 PCR 反应体系

试剂成分	终浓度	体积
2×酶混合液 ^a	1×	10.0 μL
ORFV F (10 μmol/L)	0.5 μmol/L	1.0 μL
ORFV R (10 μmol/L)	0.5 μmol/L	1.0 μL
ORFV P (10 μmol/L)	0.1 μmol/L	0.2 μL

DNA模板	/	2.0 μL
无核酸酶水	/	5.8 μL
总体系	/	20 μL
注：使用微滴式数字 PCR 平台进行实验时应依据不同微滴式数字 PCR 平台说明调整扩增体系的组分和最终体积，表中所列组分的终浓度不变。		
a 微滴式数字 PCR 扩增试剂。		

7.3 微滴生成

反应液配制后，利用微滴生成仪完成 20 μL 反应体系的分割。

7.4 PCR 反应

微滴生成后，进行微滴式数字PCR扩增，荧光分析步骤采用FAM单荧光通道，微滴式数字PCR扩增程序（见表2）。

表2 微滴数字 PCR 扩增程序

步骤	温度	持续时间	循环数
1	95 $^{\circ}\text{C}$	5 min	1
2	95 $^{\circ}\text{C}$	15 s	40
3	58 $^{\circ}\text{C}$	1 min	
4	98 $^{\circ}\text{C}$	10 min	1
5	4 $^{\circ}\text{C}$	60 min	1
升降温速度设置为 2.5 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ ，不同PCR反应平台可以根据说明书对热启动步骤程序进行修改，但不能对扩增程序进行修改。			

7.5 微滴式数字 PCR 反应的对照

在进行微滴式数字PCR实验时，应设置阳性对照、阴性对照与空白对照。以提取的含有ORFV的DNA溶液作为阳性对照；以提取的ORFV阴性羊组织悬液核酸作为阴性对照；以无核酸酶水作为空白对照。各对照PCR扩增体系中，除模板外，其余组分和PCR扩增程序同7.4。

8 结果分析

8.1 实验成立条件

微滴式数字 PCR 扩增结果，有效微滴数不得低于理论微滴数的 60 %。阴性对照组和空白对照组均未检出阳性微滴，阳性对照有明显阳性微滴，且核酸拷贝数浓度 $> 10 \text{ copies}/\mu\text{L}$ ，则实验成立。

8.2 阈值设定

微滴式数字 PCR 结果中，阴性微滴和阳性微滴明显分开，阈值设在阴性微滴和阳性微滴分开的区域。

8.3 结果判定

样品中检测出阳性微滴，且阳性核酸拷贝数浓度 ≥ 10 copies/ μ L，则判定为阳性。

样品中检测出阳性微滴，阳性核酸拷贝数浓度 < 10 copies/ μ L，则需复检。若复检结果仍检测出阳性微滴，则判定为阳性，否则判定为阴性。

样品中未检出阳性微滴，则判定为阴性。

中国兽医协会
CVMA