

团 体 标 准

T/CVMA X4—2020

猫杯状病毒微滴式数字 RT-PCR 检测方法

Method of droplet digital RT-PCR For detection of feline calicivirus

(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

2020 - XX - XX 发布

2020 - 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。

本标准由中国兽医协会提出并归口。

本标准起草单位：上海市动物疫病预防控制中心、中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

本标准主要起草人：鞠厚斌、杨德全、李鑫、赵洪进、王建、刘春国、沈海潇、杨显超、葛菲菲、陶田谷晟。

中国兽医协会
CVMA

猫杯状病毒微滴式数字 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了猫杯状病毒（Feline Calicivirus, FCV）微滴式数字RT-PCR检测的操作方法。
本标准适用于猫杯状病毒检测的微滴数字RT-PCR法。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

数字 RT-PCR: 数字反转录聚合酶链反应 (digital reverse transcript polymerase chain reaction)

FAM 羧基荧光素 (carboxyfluorescein)

MGB 小沟结合分子 (Minor Groove Binder)

RNA 核糖核酸 (ribonucleic acid)

4 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。利用微滴分析仪逐个对每个微滴进行检测,有荧光信号微滴判读为1,没有荧光信号微滴判读为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。本标准通过特异性引物和探针进行数字RT-PCR扩增,从而对猫杯状病毒进行快速检测。

5 试剂和材料

5.1 引物

上游引物: 5' - CCGTTAAYTCRGTGTTTGATTG-3'

下游引物: 5' - GGCTCTGATDGCTTGAAACTG-3'

5.2 探针

探针：5' -FAM-CCTGGGCTCTTCGCCGTCACC-MGB-3'

5.3 试剂

5.3.1 实验室用水：应符合 GB/T 6682 中一级水的规格。

5.3.2 核酸提取试剂：推荐针对提取病毒 RNA 的提取试剂盒。

5.3.3 数字 RT-PCR 反应试剂盒：推荐按照不同的数字 PCR 平台的说明书选取其推荐的数字 RT-PCR 反应试剂盒。

6 仪器和设备

6.1 生物安全柜。

6.2 PCR 扩增仪。

6.3 数字 PCR 系统：微反应体系发生器或其他具有同样功能的仪器、微反应体系荧光检测仪或其他具有同样功能的仪器。

6.4 分析天平：感量 0.1g 和 0.1mg。

6.5 纯水仪。

6.6 核酸定量仪。

6.7 涡旋震荡仪。

6.8 微量移液器（10 μL 、20 μL 、100 μL 、200 μL 、1 000 μL ）及配套吸头。

6.9 96 孔荧光定量 PCR 反应板和封膜。

6.10 数字 PCR 微反应体系生成联排管。

6.11 离心管。

7 操作步骤

7.1 样品采集及运输

按照 NY/T 541 执行。

7.2 RNA 提取

按照所选取的病毒 RNA 提取试剂盒说明书进行提取。

7.3 微滴式数字 RT-PCR 扩增方法

7.3.1 微滴式数字 RT-PCR 体系配制

每个样品微滴式数字 RT-PCR 扩增设置 3 个平行。微滴式数字 RT-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 微滴式数字 RT-PCR 扩增体系

试剂	终浓度	体积
2×酶混合液 ^a	/	10 μL
FCV F (10 μmol/L)	0.5 μmol/L	1 μL
FCV R (10 μmol/L)	0.5 μmol/L	1 μL
FCV P (10 μmol/L)	0.1 μmol/L	0.2 μL
RNA 模板	/	2 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 平台依据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 RT-PCR 扩增试剂。

7.3.2 微反应体系生成、数字 RT-PCR 扩增及结果读取

根据仪器要求，将配制好的反应液加入微反应体系生成装置的加样孔中，按仪器说明书生成微反应体系。将微反应体系放置于 PCR 扩增仪中，按照表 2 的程序进行 RT-PCR 扩增。荧光分析步骤采用 FAM 单荧光通道，记录阳性和阴性微反应体系数量及其比值。根据比值计算数字 RT-PCR 反应体系中的 FCV 拷贝数（拷贝/μL）。

表2 微滴式数字 RT-PCR 扩增程序

步骤	温度	持续时间	循环数
1	42 °C	60 min	1
2	95 °C	10 min	1
3	95 °C	30 s	40
4	55 °C	1 min	
5	98 °C	10 min	1
6	4 °C	60 min	1

注：升降温速率设置为 2.5 °C/s。

7.4 微滴式数字 RT-PCR 反应的对照

在进行微滴式数字RT-PCR实验时，应设置阳性对照、阴性对照与空白对照。以含有猫杯状病毒的RNA作为阳性对照；以未感染猫杯状病毒动物的鼻拭子上清液基因组作为阴性对照；以无核酸酶水作为空白对照。各对照RT-PCR扩增体系中，除模板外，其余组分和RT-PCR扩增程序与7.3.1和7.3.2相同。

8 结果分析

8.1 阈值设定

根据数字RT-PCR体系中阴性分割体系的终点荧光值设定荧光的阈值限。阈值限需要对空白和阳性扩增结果进行明显的区分。

8.2 实验成立条件

微滴式数字RT-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，且核酸拷贝数浓度大于10 拷贝/ μL ，则实验成立。

8.3 结果判定

样品中检测出阳性微滴，且阳性核酸拷贝数大于10 拷贝/ μL ，则判定为阳性。

样品中检测出阳性微滴，阳性核酸拷贝数小于10 拷贝/ μL ，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。
