

# 团 体 标 准

T/CVMA X8—2020

## 犬致病性钩端螺旋体荧光 PCR 检测方法

Real-time PCR Assay for Detection of Pathogenic Leptospira in Dog

(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

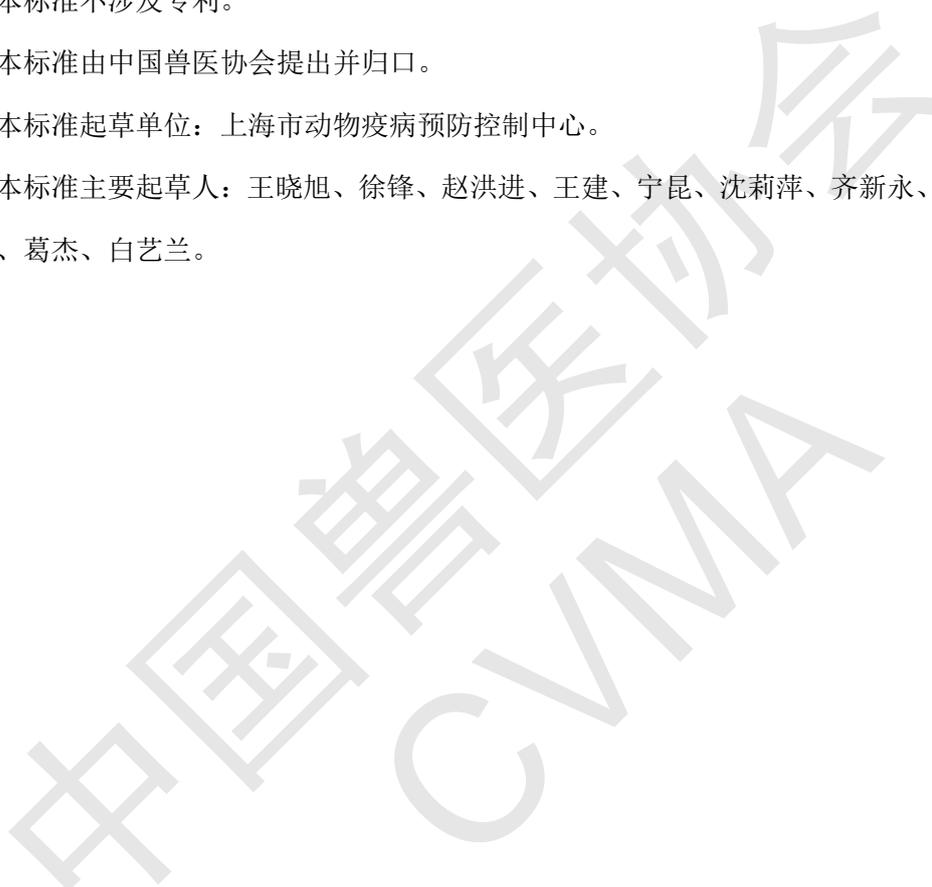
本标准按 GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

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：上海市动物疫病预防控制中心。

本标准主要起草人：王晓旭、徐锋、赵洪进、王建、宁昆、沈莉萍、齐新永、杨显超、朱九超、周立晨、葛杰、白艺兰。



# 犬致病性钩端螺旋体荧光 PCR 检测方法

## 1 范围

本标准规定了犬致病性钩端螺旋体荧光PCR检测方法的试剂与耗材、仪器与设备、操作步骤、结果分析和生物安全要求。

本标准适用于犬的血液、尿液、组织等样本中致病性钩端螺旋体核酸的检测。

## 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 14926.46 实验动物 钩端螺旋检测方法  
GB 19489 实验室生物安全通用要求  
SN/T 1717 出入境口岸钩端螺旋体病监测规程

## 3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

- PCR 聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction）  
DNA 脱氧核糖核酸（Deoxyribonucleic acid）  
BHQ 无荧光淬灭基团（black hole quencher）  
FAM 羧基荧光素（carboxyfluorescein）  
ddH<sub>2</sub>O 双蒸水（Distillation-Distillation H<sub>2</sub>O）

## 4 试剂与耗材

### 4.1 试剂

- 4.1.1 DNA 提取试剂：核酸提取液配制详见附录 A，可选，也可选取商品化 DNA 提取试剂盒。  
4.1.2 核酸扩增试剂：核酸扩增预混液（Premix Ex Taq）、ddH<sub>2</sub>O 等商品化核酸扩增试剂。

## 4.2 引物和探针

本标准参照致病性钩端螺旋体特有的 LipL32 基因序列，设计引物序列如下：

上游引物：5' - RCCAGGCGAYGGAGACT-3'

下游引物：5' - GGTTTTGCTTTCGCAGCTTT-3'

探针序列：5' -FAM- ATGCCACATTGGTTTGA-BHQ-3'

R: A/G, Y: C/T

## 4.3 耗材

4.3.1 1.5ml 指形离心管。

4.3.2 10  $\mu$ L、100  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1 000  $\mu$ L 仪器配套灭菌吸头。

4.3.3 荧光定量 PCR 反应板和封膜。

## 5 仪器与设备

5.1 生物安全柜。

5.2 可调节微量移液器：10  $\mu$ L、100  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1 000  $\mu$ L。

5.3 荧光定量 PCR 扩增仪。

5.4 微量台式离心机。

5.5 低温冷藏柜。

5.6 涡旋震荡仪。

## 6 操作步骤

### 6.1 样品采集

样品采集步骤参照 GB/T 14926.46 和 SN/T 1717 执行。

### 6.2 DNA 提取

6.2.1 若选取附录 A 所列试剂，则按照下列方法提取

6.2.1.1 向 1.5mL 指形管中加入 200 $\mu$ L DNA 提取液 1（见附录 A.1），然后加入待测样品和阴性对照、阳性对照各 200 $\mu$ L。混合震荡均匀后，于 4 $^{\circ}$ C、130000r/min 离心 10min。

6.2.1.2 吸去上清液后，加入 10 $\mu$ L DNA 提取液 2（见附录 A.2），混匀震荡后，于 4 $^{\circ}$ C、120000r/min 离心 10s。

6.2.1.3 100 $^{\circ}$ C 干浴或沸水浴 10min。

6.2.1.4 加入90 $\mu$ L无DNA酶的去离子水，130000r/min离心10min，上清则为所提取DNA。提取的DNA若需保存，须保存在-20 $^{\circ}$ C

6.2.2 若商品化DNA提取试剂盒，则参照产品说明书进行提取。

### 6.3 荧光PCR扩增方法

#### 6.3.1 配置反应液

将所有试剂和引物、探针、核酸模板加入荧光定量PCR反应板。配置反应体系参照表1。配置完反应液后应充分震荡混匀并离心。

表1 致病性钩端螺旋体荧光PCR扩增体系

试剂	体积
Premix Ex Taq (Probe qPCR)	10 $\mu$ L
上游引物 (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ L
下游引物 (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ L
探针 (20 $\mu$ M)	0.8 $\mu$ L
核酸模板	2 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	6.4 $\mu$ L
总体系	20 $\mu$ L

#### 6.3.2 设置扩增程序

致病性钩端螺旋体扩增程序如表2所示。在荧光PCR仪上设置好程序，本反应等荧光报告基因为FAM，淬灭基因为BHQ或none。

表2 犬致病性钩端螺旋体荧光PCR扩增程序

步骤	温度	持续时间	循环数
1	95 $^{\circ}$ C	15 s	1
2	94 $^{\circ}$ C	5 s	40
3	58 $^{\circ}$ C	10 s	
4	72 $^{\circ}$ C	15 s	
注：在每个循环第二步 58 $^{\circ}$ C时收集荧光信号。			

## 7 结果分析

## 7.1 阈值设定

阈值设定于阴性对照扩增曲线的最高点。

## 7.2 结果判定

7.2.1 当阳性对照Ct值 $\leq 28.0$ ，且出现典型“S”型扩增曲线，阴性对照无Ct值，且无扩增曲线时，实验成立。

7.2.2 当检测样品出现典型的扩增曲线，且Ct值 $\leq 38.0$ 时，判定为致病性钩端螺旋体核酸阳性。

7.2.3 当检测样品无Ct值时，判定为阴性。

7.2.4 当检测样品Ct值 $> 38.0$ ，且出现典型当扩增曲线时，应重检。当重检结果仍旧出现以上结果，则判定为核酸阳性，否则判定为阴性。

## 8 生物安全要求

8.1 本实验所涉及当病原微生物为人畜共患病，实验应当在生物安全二级实验室中进行。具体要求参见GB 19489 实验室生物安全通用要求。

8.2 使用完毕和使用过程中产生当固体、液体废弃物，应当按照相应要求，进行灭菌处理后再按照医疗废弃物处理方法进行废弃。

附录A  
(规范性附录)  
DNA提取试剂及其配制

A.1 DNA 提取液 1

PEG 8000 20.74g, NaCl 17.53g, 加去离子水定容至100mL。

A.2 DNA 提取液 2

1 mol/L Tris.HCl 2mL, 2 mol/L KCl 5 mL, 0.5 mol/L EDTA 0.5 mL, NP-40 1 mL, 加去离子水定容至100mL。

即 KCl 14.912g, Tris 碱 12.114g, 1.2068 mL浓HCl, EDTA 14.612g, NaOH 6g。加去离子水定容至100mL。

A.3 无 DNA 酶的去离子水

使用1%DEPC处理去离子水，处理后电阻应大于18.2mΩ。