ICS 11.220

CCS B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA XXXXX—XXXX

牛呼吸道合胞体病毒微滴式数字 RT-PCR 检测方法

Method of Droplet Digital RT-PCR for Bovine Bovine respiratory syncytial virus

（征求意见稿）

中国兽医协会 CVMA

XXXX－XX－XX 发布　　XXXX－XX－XX 实施

中国兽医协会　　发布

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》给出的规则起草。

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这些专利的责任。

本文件由中国兽医协会提出并归口。

本文件起草单位：吉林省动物疫病预防控制中心、吉林省农业科学院。

本文件主要起草人：肖丹、王思月、吴丹、曲磊、白翠、朱亦菲、杨金鑫、胡泽宇。

中国兽医协会 CVMA

牛呼吸道合胞体病毒微滴式数字 RT-PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了牛呼吸道合胞体病毒(Bovine respiratory syncytial virus,BRSV)微滴式数字RT-PCR检测方法的试验条件、试剂与耗材、仪器与设备、样品、操作步骤、结果分析。

本文件适用于牛上呼吸道合胞体病毒核酸的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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、保存与运输技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

微滴式数字 PCR droplet digital PCR

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 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。

4 试验条件

4.1 生物安全要求

所有样品、培养物和废弃物的处置应符合 GB 19489 的规定。

4.2 防污染措施

防止污染措施应符合 GB/T 27401 的规定。

5 试剂与耗材

中国兽医协会 CVMA

5.1 试剂

5.1.1 核酸提取试剂

宜选取商品化的病毒 RNA 提取试剂盒。

5.1.2 样品处理试剂

生理盐水、青霉素、链霉素、 DMEM 培养液

5.1.3 微滴式数字 RT-PCR 扩增试剂

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 RT-PCR 扩增试剂。

5.1.4 引物和探针

BRF 上游引物 （BRV F）：5′-ACAACGTCAACTCTTTCTGGAAA-3′
BRF 下游引物 （BRV R）：5′-AATCGAAAAGCTGGTGAGTGG-3′
BRF 探针 （BRV P）：5′-FAM-AATATGACACCAGCGGTAGCGGC-TAMRA-3′

5.2 耗材

0.22 μm 微孔针头滤器、滤芯吸头、96 孔 PCR 反应板、无 RNA 酶离心管、微滴式数字 PCR 平台专用耗材。

6 仪器与设备

生物安全柜、离心机、组织研磨仪、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、冰箱、移液器。

7 样品

7.1 样品的采集及运输

样品采集及运输按照 NY/T 541 中 6.7.1、6.7.2 和 6.8.1 中的规定执行。

7.2 样品处理

7.2.1 鼻腔分泌物样品

感染病牛的鼻腔分泌物以5倍PBS(配方见附录A1) 稀释后，3 000 r/min、4℃ 离心30 min，取上清，以灭菌的小滤器过滤除菌，无菌检验合格后，保存于-80 ℃备用。

中国兽医协会 CVMA

7.2.2 组织样品

病死牛取气管病变或肺部病变组织0.2 g，用含有 100 IU 青霉素和 100 μg 链霉素的 DMEM 培养液浸泡冲洗两次，然后剪碎装进研磨器内，在研磨器内加入 2 mL 无血清 DMEM 细胞培养液，研磨成糊状，制成10%组织悬液，10 000 r/min、4℃ 离心 15 min，吸取上清液，用 0.2 μm 微孔针头滤器过滤，滤过液无菌检验合格后于-80℃备用。

7.3 样品保存

采集或处理好的样品在 2 ℃～8 ℃ 条件下保存应不超过 24 h；如需长期保存，应放置 -80 ℃冰箱，但应避免反复冻融（冻融不超过3次）。

8 试验步骤

8.1 RNA 提取

按照所选取的病毒RNA提取试剂盒说明书进行提取。

8.2 微滴式数字 RT-PCR 扩增方法

每个样品微滴式数字RT-PCR扩增体系设置3个平行。微滴式数字RT-PCR扩增体系按表1配制，该步骤根据不同微滴式数字PCR平台的说明书进行操作。

表 1 微滴数字 RT-PCR 反应体系

试剂成分	终浓度	体积
2×酶混合液[a]	/	10.0 μL
BRV F（10 μmol/L）	0.5 μmol/L	1.0 μL
BRV R（10 μmol/L）	0.5 μmol/L	1.0 μL
BRV P（10 μmol/L）	0.1 μmol/L	0.25 μL
RNA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RT- PCR 扩增试剂。		

8.3 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。

8.4 RT-PCR 反应

微滴生成后，在PCR扩增仪上进行微滴式数字RT-PCR扩增。按表2设置微滴式数字RT-PCR扩增程序，荧光分析步骤采用FAM单荧光通道。

表 2　微滴数字 RT-PCR 扩增程序

步骤	温度	持续时间	循环数
1	42℃	60 min	1
2	95 ℃	10 min	1
3	95 ℃	30 s	40
4	58 ℃	1 min	
5	98 ℃	10 min	1
6	4 ℃	60 min	1
升降温速度设置为 2.5 ℃/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。			

8.5　微滴式数字 RT-PCR 反应的质量控制

进行微滴式数字RT-PCR实验时设置阳性对照、阴性对照与空白对照。以提取的含有BRSV的RNA溶液作为阳性对照；以提取的BRSV阴性牛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RT-PCR扩增体系中，除模板外，其余组分一致按照表1操作，RT-PCR扩增程序按照表2操作。

9　结果分析

9.1　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≥ 10 拷贝/μL，则实验成立。

——与以上实验结果不符，需要重复验证实验步骤。

9.2　阈值设定

微滴式数字 RT-PCR 检测结果中，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。

9.3　结果判定

样品中牛上呼吸道合胞体病毒基因未得到扩增，扩增终点荧光信号小于阈值，判定为阴性。

样品中牛上呼吸道合胞体病毒基因得到扩增，扩增终点荧光信号大于或等于阈值，判定为阳性。

中国兽医协会 CVMA