ICS

点击此处添加中国标准文献分类号

团　　体　　标　　准

T/CVMA XXXXX—XXXX

牛贾第虫荧光定量 PCR 检测方法

Method of Quantitative Real-time PCR for Giardia duodenalis in cattle

（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。

本文件由中国兽医协会提出并归口。

本文件起草单位：吉林省畜牧兽医科学研究院、吉林大学动物医学院、吉林省农业科学院、吉林省畜牧总站、吉林省东丰县畜牧总站。

本文件主要起草人：董 航、宫鹏涛、曹利利、孙兴忠、肖 丹、王 楠、苑淑贤、刘沂霖、任科研、王连波。

中国兽医协会 CVMA

牛贾第虫荧光定量 PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了牛十二指肠贾第虫（*Giardia duodenalis*）荧光定量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。

本文件适用牛贾第虫核酸的检测。

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 荧光定量 PCR

荧光定量 PCR 一般指实时荧光定量 PCR。实时荧光定量 PCR（Quantitative Real-time PCR）是一种在 DNA 扩增反应中，以荧光化学物质测每次聚合酶链式反应（PCR）循环后产物总量的方法。通过内参或者外参法对待测样品中的特定 DNA 序列进行定量分析的方法。

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 核酸提取试剂

宜选取商品化的粪便 DNA 提取试剂盒。

5.2 荧光定量 PCR 扩增试剂与耗材

宜按照不同的荧光定量 PCR 平台的说明书选取推荐的荧光定量 PCR 扩增试剂与耗材。

5.3 引物

上游引物 F：5’-GACGGCTCAGGACAACGGTT - 3’
下游引物 R：5’-TTGCCAGCGGTGTCCG- 3’
探针引物 P：5’- FAM-CCCGCGGCGGTCCCTGCTAG- BHQ1-3’
使用时配制成 10 μmol/L 工作液，置-20℃保存。

6 仪器与设备

生物安全柜、组织研磨仪、荧光定量 PCR 仪、核酸定量仪、涡旋震荡仪、冰箱、移液器、离心机。

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的规定执行。从腹泻的牛采用直肠取粪法或取刚排出的新鲜粪便，每头约采集50-100 g，装入做好相应标记的一次性塑料袋中，低温运回，4 ℃冰箱待检。

7.2 样品处理

将待检粪便于灭菌烧杯中充分的混匀，取出150-300 mg于2 ml离心管中，加入粪便DNA提取试剂盒中溶解液后，在液氮和37 ℃ 水浴中反复冻融3次，剩余步骤按照粪便DNA提取试剂盒要求进行操作，无菌检验合格后，保存于-20 ℃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。

8 操作步骤

8.1 荧光定量 PCR 扩增反应体系

采用25 μL反应体系，依次加入下列试剂。
2×酶混合液　　12.5 μL；

中国兽医协会 CVMA

F（10 μmol/L）	0.5 μL；
R（10 μmol/L）	0.5 μL；
P（10 μmol/L）	0.5 μL；
DNA模板	2.0 μL；
用灭菌蒸馏水补至	25.0 μL。

8.2 反应程序

95 ℃预变性60 s；95 ℃变性5 s，60 ℃退火30 s，72 ℃延伸30 s，40个循环。观察在60 ℃退火温度下扩增曲线。

9 结果分析

9.1 实验成立条件

进行实时荧光定量PCR检测，阳性对照能够扩增出S型曲线，Ct值在预期的范围之内（< 35），阴性对照无荧光增幅现象，则表明反应体系运行正常，可以进行结果判定。

9.2 结果判定

阴性反应结果判定：检测结果无Ct值的反应判为阴性反应，即检验样品中贾第虫核酸阴性。

阳性反应结果判定：检测结果Ct值<35，且扩增曲线有明显的对数增长期，判为阳性反应，即检验样品中贾第虫核酸阳性。

对于35< Ct值<40的样品，应进行重复试验。如果重复试验的Ct值< 40，且曲线有明显的对数增长期，判为阳性反应。

中国兽医协会 CVMA