ICS

点击此处添加中国标准文献分类号

团　　体　　标　　准

T/CVMA XXXXX—XXXX

犬瘟热病毒微滴式数字 RT-PCR 检测方法

Method of droplet digital RT-PCR for detection of canine distemper virus

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

（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。

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》的规定起草。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：上海市动物疫病预防控制中心、嘉定区农业技术推广服务中心、崇明区动物疫病预防控制中心、北京新羿生物科技有限公司。

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

中国兽医协会 CVMA

犬瘟热病毒微滴式数字 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了犬瘟热病毒（canine distemper virus，CDV）微滴式数字RT-PCR检测的操作方法。

本标准适用于犬粪便样品中犬瘟热病毒的检测。

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本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

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

本文件没有需界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件：

BHQ： 无荧光淬灭基团（black hole quencher-1）

FAM： 6-羧基荧光素（6-carboxyfluorescein）

PBS：磷酸盐缓冲盐溶液（phosphate buffered saline）

RNA： 核糖核酸（ribonucleic acid）

RT-PCR： 反转录聚合酶链式反应（reverse transcript polymerase chain reaction）

5 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。

6 试剂与材料

中国兽医协会 CVMA

6.1 提取试剂

选取针对病毒RNA的核酸提取试剂盒，或等效的RNA提取试剂。

6.2 微滴式数字 RT-PCR 扩增试剂

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

6.3 引物和探针

CDV 上游引物（CDV F）：5’-CGTCTCAGAATCAGCCATTTGTA-3’
CDV 下游引物（CDV R）：5’-GTCGCCCCTAATGCATTGTT-3’
CDV 探针（CDV P）：5’-FAM-CCAGAACTCCCTATACCCCATGAGCCC-BHQ1-3’

7 仪器与设备

II级生物安全柜、微滴式数字PCR平台（含普通PCR仪）、高速冷冻离心机、纯水仪、涡旋震荡仪。

8 操作步骤

8.1 样品采集及运输

参照NY/T 541中6.8.1，粪便样品：采取疑似感染犬的新鲜粪便样品10 g，装入带螺帽容器和灭菌塑料袋。样品在采集完成后需立即送至实验室，若无法立刻送至实验室，则需在4 ℃环境下保存，但不可以超过24小时。所采集的样品在4 ℃条件下运输。

8.2 样品的处理

粪便样品需加入等量的生理盐水或PBS研磨匀浆，3000 r/min离心15 min收取上清液后，4 ℃保存备用。

8.3 RNA 提取

按照所选取的病毒RNA提取试剂盒说明书进行提取，或其他等效的RNA提取方法。

8.4 微滴式数字 RT-PCR 扩增方法

8.4.1 微滴式数字 RT-PCR 体系配制

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 RT-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
ddRT-PCR supermix [a]	2×	10 μL
上游引物	900 nmol/L	1.8 μL

中国兽医协会 CVMA

下游引物	900 nmol/L	1.8 μL
探针	250 nmol/L	0.5 μL
RNA 模版	/	2 μL
水	/	3.9 μL
总体系	/	20 μL
注：使用微滴式数字 RT-PCR 平台进行实验时，应依据不同微滴式数字 RT-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。		

8.4.2 微滴式数字 RT-PCR 扩增反应

反应液配制后，使用微滴发生器对扩增体系进行微滴生成。微滴生成后，进行微滴式数字 RT-PCR 扩增。荧光分析步骤采用 FAM 单荧光通道，微滴式数字 RT-PCR 扩增程序如表 2 所示。

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	50 ℃	20 min	1
2	95 ℃	10 min	1
3	95 ℃	30 s	40
4	55 ℃	1 min	
5	98 ℃	10 min	1
6	12 ℃	60 min	1
注：升降温速率设置为 2.5 ℃/S。			

8.5 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，应在样品检测的同时设立阳性对照、阴性对照与空白对照。以灭活的犬瘟热病毒的RNA作为阳性对照；以空白质粒作为阴性对照；以无核酸酶水作为空白对照。扩增体系与扩增程序同8.4.1和8.4.2。

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，且核酸拷贝数浓度大于10 copies/ μ L，则实验成立。

中国兽医协会 CVMA

9.2 阈值设定

微滴式数字RT-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。

9.3 结果判定

9.3.1 阴性

样品中未检出阳性微滴，则判定为阴性。

9.3.2 阳性

样品中检测出阳性微滴，且阳性核酸拷贝数浓度≥ 3 拷贝/μL，则判定为阳性。

9.3.3 有效原则

样品中检测出阳性微滴，阳性核酸拷贝数浓度＜ 3 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。

10 生物安全要求

检测过程中涉及的生物安全要求按照GB 19489 实验室生物安全通用要求的规定执行。

中国兽医协会 CVMA