

ICS 11. 220

CCS B 41

# 团 体 标 准

T/CVMA 107—2022

## 狂犬病病毒微滴式数字 RT-PCR 检测方法

Method of droplet digital RT-PCR for detection of Rabies Virus

2022 - 12 - 23 发布

2022 - 12 - 23 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。

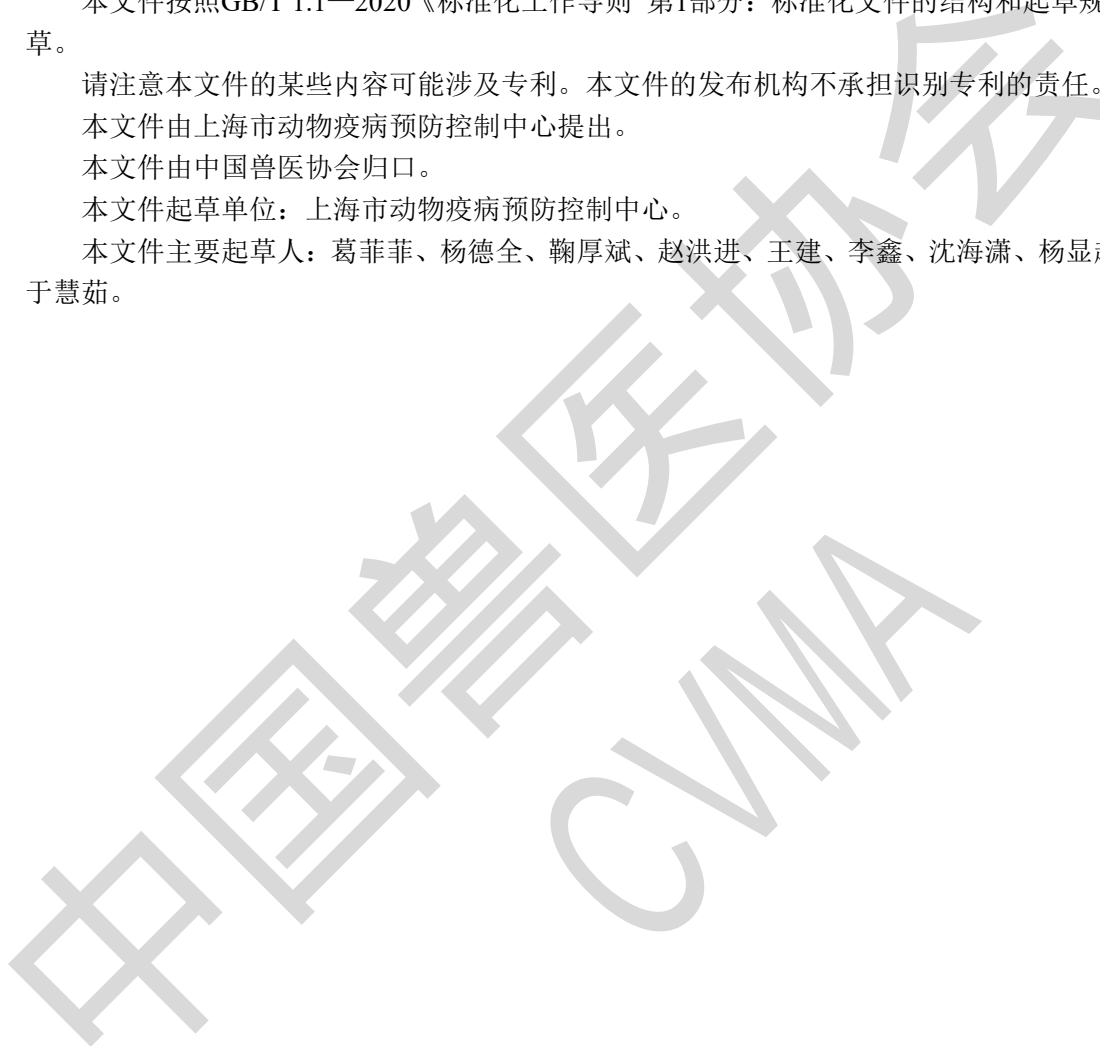
请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由上海市动物疫病预防控制中心提出。

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。

本文件主要起草人：葛菲菲、杨德全、鞠厚斌、赵洪进、王建、李鑫、沈海潇、杨显超、陶田谷晟、于慧茹。



# 狂犬病病毒微滴式数字 RT-PCR 检测方法

## 1 范围

本文件规定了狂犬病病毒（Rabies virus, RABV）微滴式数字RT-PCR检测方法的试剂与材料、仪器与设备、操作步骤、结果分析。

本文件适用于生前唾液和死后脑组织狂犬病病毒核酸的检测。

## 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

GB/T 36789 动物狂犬病病毒核酸检测方法

## 3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

微滴式数字 RT-PCR: 微滴式数字反转录聚合酶链式反应(Droplet digital reverse transcript polymerase chain reaction)

BHQ1: 无荧光淬灭基团 (Black hole quencher-1)

DTT: 二硫苏糖醇 (Dithiothreitol)

FAM: 6-羧基荧光素 (6-carboxyfluorescein)

PBS: 磷酸盐缓冲液 (Phosphate-buffered saline)

RNA: 核糖核酸 (Ribonucleic acid)

## 5 原理

微滴式数字PCR (Droplet Digital PCR, ddPCR) 的技术原理是利用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拷贝数。

为了提高对狂犬病病毒核酸检测的敏感性和特异性，分别采用了2条上游引物，1条下游引物，1条

探针的设计和简并引物的运用。本文件通过特异性引物和探针进行微滴式数字RT-PCR扩增，从而对狂犬病毒核酸实现检测。

## 6 试剂与材料

### 6.1 引物和探针

上游引物 F1-1: 5'-ACGCTTAACAACCAGATCAAAGAA -3'  
上游引物 F1-2: 5'-ACGCTTAACAACAAAATCADAGAAG -3'  
下游引物 R1: 5'-CMGGGTAYTTRTAYTCATAYTGRTC -3'  
探针 P1: 5'-(FAM) AACACCYCTACAATGGA (BHQ1)-3'

### 6.2 核酸提取试剂

病毒 RNA 的提取试剂盒，或其他等效 RNA 提取试剂。

### 6.3 微滴式数字 RT-PCR 反应试剂

按照不同的微滴式数字 PCR 平台的说明书选取其推荐的微滴式数字 PCR 反应试剂盒，或其他等效反应试剂。

## 7 仪器与设备

### 7.1 II级生物安全柜。

### 7.2 微滴式数字 PCR 平台（PCR 扩增仪、数字 PCR 微滴发生器、数字 PCR 微滴分析仪）。

### 7.3 纯水仪。

### 7.4 高速台式冷冻离心机（可控温至 4 °C，离心速度可达 12000 g 以上）。

### 7.5 组织研磨器。

### 7.6 涡旋震荡仪。

## 8 操作步骤

### 8.1 样品采集及运输

采集生前犬唾液拭子或死后犬脑组织，具体按照GB/T 36789 要求执行。

### 8.2 样品处理

#### 8.2.1 脑组织

取待检脑组织，按1: 10体积加入PBS（0.01 mol/L pH7.4），置于组织研磨器中充分研磨。将研磨后的样品，反复冻融3次，在4 °C下10000 g离心5 min，取500 μL上清液至无菌离心管中，4 °C保存备用。

### 8.2.2 唾液

将唾液拭子样品置于1 mL PBS (0.01 mol/L pH7.4) 中, 在涡旋震荡仪上充分混合后, 将拭子中的液体挤出后弃去拭子。在4 °C下3000 g离心5 min, 取500 μL上清液至无菌离心管中, 4 °C保存备用。

### 8.3 RNA 提取

按照所选取的病毒RNA提取试剂或试剂盒说明书, 对样品及阴、阳性对照进行提取。

### 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

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
微滴式数字 RT-PCR 扩增试剂 <sup>a</sup>	/	8.0 μL
RV F1-1	10 μmol/L	0.9 μL
RV F1-2	10 μmol/L	0.9 μL
RV R1	10 μmol/L	1.8 μL
RV P1	10 μmol/L	0.5 μL
RNA 模板	/	2.0 μL
无核酸酶水	/	5.9 μL
总体系	/	20 μL
注: 使用微滴式数字 PCR 平台进行试验时, 应依据不同微滴式数字 PCR 平台调整扩增体系的组分和最终体积, 并保持表中所列组分的终浓度不变。		
<sup>a</sup> 微滴式数字 RT-PCR 扩增试剂: 内含 DNA 聚合酶、反转录酶、RNA 酶抑制剂和 DTT。		

#### 8.4.2 微滴式数字 RT-PCR 反应的对照

在进行微滴式数字 RT-PCR 试验时, 应设置阳性对照、阴性对照与空白对照。以含有狂犬病病毒属目的基因的假病毒作为阳性对照, 目的基因序列见附录 A 中 A.1; 以未感染狂犬病动物的唾液作为阴性对照; 以无核酸酶水作为空白对照。各对照微滴式数字 RT-PCR 扩增体系中, 除模板外, 其余组分与 8.4.1 相同。

#### 8.4.3 微滴式数字 RT-PCR 扩增反应参数

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 °C	20 min	1
2	95 °C	3 min	1

表 2 微滴式数字 RT-PCR 扩增程序 (续)

步骤	温度	持续时间	循环数
3	94 °C	15 s	40
4	55 °C	45 s	
5	98 °C	10 min	1
6	12 °C	60 min	1

注：升降温速率设置为 2.5 °C/s。

## 9 结果分析

### 9.1 试验成立条件

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，阳性对照有阳性微滴，且核酸拷贝数浓度 $\geq 10$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ，则试验成立。

### 9.2 阈值设定

微滴式数字RT-PCR结果中，阳性微滴和阴性微滴明显分开，阈值设在阳性微滴和阴性微滴分开的区域。

### 9.3 结果判定

#### 9.3.1 阳性

样品中检测出阳性微滴，且阳性核酸拷贝数浓度 $\geq 10$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ，则判定为狂犬病病毒核酸扩增阳性。

注：只针对样品扩增结果判定。唾液拭子扩增结果阴性时，不能用于排除狂犬病感染。

#### 9.3.2 阴性

样品中未检出阳性微滴，则判定为狂犬病病毒核酸扩增阴性。

注：只针对样品扩增结果判定。唾液拭子扩增结果阴性时，不能用于排除狂犬病感染。

#### 9.3.3 可疑

样品中检测出阳性微滴，阳性核酸拷贝数浓度 $< 10$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ，则需复检。若复检结果仍检测出阳性微滴，则判定为狂犬病病毒核酸扩增阳性，否则判定为狂犬病病毒核酸扩增阴性。

注：只针对样品扩增结果判定。唾液拭子扩增结果阴性时，不能用于排除狂犬病感染。

## 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。

附录 A  
(资料性)  
阳性对照序列

A.1 阳性对照序列

**ACGCUAACAACCAGAUCAAAGAAAAACAGACA**UUGUCAAUUGCAAAGCAAAAUGUA  
**ACACCCCUACAAUGGAUGCCGACAAGAUUGUAUUC**AAAGUCAAAUAAUCAGGUGGUCUCUUUG  
**AAGCCUGAGAUUAUCGUGGAUCAAU**AUGAGUACAAGUACCCUG

注：粗体为引物和探针序列。

中国兽医药学  
CVMA

附 录 B  
(规范性)  
狂犬病病毒阳性对照

### B.1 阳性对照制备

B.1.1 将附录A.1中阳性对照序列构建到慢病毒载体pGWL01中,与PSPAX2, pMD2.G共转染293T细胞。转染后48 h和72 h分别收获含病毒的上清。3000 g离心20 min, 0.45 μm滤膜过滤, 去除细胞沉淀。12000 g 离心浓缩细胞, 标记为狂犬病病毒假病毒, 分装-80 °C贮存。

B.1.2 用B.2中荧光RT-PCR方法验证假病毒浓度, 检测使用假病毒标准品(10<sup>4</sup> 拷贝/μL~10<sup>8</sup> 拷贝/μL)制作标准曲线。根据标准曲线计算慢病毒颗粒拷贝数。拷贝数计算公式: 每mL病毒颗粒拷贝数=10指数×100(反转录产物总体积为100 μL)×3(基因组产物洗脱体积为21 μL, 取7 μL进行反转录)×20(病毒液提取基因组体积为50 μL)/2(病毒基因组为双拷贝)。

B.1.3 选取10<sup>3</sup>拷贝/μL的假病毒, 作为微滴式数字RT-PCR方法的阳性对照。

### B.2 阳性对照的质量标准及检验方法

B.2.1 采用本文件中的引物和探针, 建立阳性对照的荧光RT-PCR检验方法。

B.2.2 按照本文件中8.3进行核酸提取。

B.2.3 每个反应体系为25 μL, 具体为2×One Step RT-PCR Buffer 10 μL、dNTP(2.5 mmol/L) 1 μL、MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/L) 1 μL、RNA酶抑制剂(40 U/μL) 0.5 μL、Taq DNA聚合酶(5 U/μL) 0.5 μL、M-MLV 反转录酶(200 U/μL) 0.5 μL、上、下游引物(10 μmol/L)各0.5 μL、探针(10 μmol/L) 1 μL、DEPC水6.5 μL、核酸3 μL。

B.2.4 选定FAM作为报告基团, 淬灭基团选none, 反应参数设置如下: 42 °C 10 min, 94 °C 15 min; 95 °C 15 s, 60 °C 45 s, 在每个循环第二步(60 °C 45 s)收集荧光信号, 共40个循环。

B.2.5 阳性对照的质量标准: Ct 值应小于32, 而且出现明显的扩增曲线。