ICS 11.220
B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA 16—2020

羊传染性脓疱病毒微滴式数字 PCR 检测方法

Method of droplet digital PCR for ovine contagious ecthyma virus

中国兽医协会
CVMA

2020-12-22 发布　　2020-12-22 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、吉林省动物疫病预防控制中心、中国动物疫病预防控制中心，长春科技学院。

本文件主要起草人：邵洪泽、王楠、于钦磊、葛晨霞、王建超、马晓媛、白翠、原霖、董航、任锐、王欣宇、李昱洁、张兴菊、宋天辉、田春雨。

中国兽医协会
CVMA

引　　言

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，提高了核酸序列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。本文件针对羊传染性脓疱病毒设计特异性引物和探针进行微滴式数字PCR扩增，并根据扩增结果来判断羊传染性脓疱病毒核酸含量。

中国兽医协会
CVMA

羊传染性脓疱病毒微滴式数字 PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了羊传染性脓疱病毒微滴式数字PCR检测方法的试验条件、试剂与耗材、仪器设备、样品、试验步骤、结果分析。

本文件适用于羊传染性脓疱病毒核酸的检测。

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 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、保存与运输技术要求

NY/T 3235 羊传染性脓疱诊断技术

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

5.1 核酸提取试剂

商品化的手动或自动化病毒DNA提取试剂盒。

5.2 微滴式数字 PCR 扩增试剂与耗材

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PCR扩增试剂与耗材。

5.3 引物和探针

上游引物（F）：5’-TTGCACATGTCCGTGAAGAAGT-3’
下游引物（R）：5’-AGGCGGTGGAATGGAAAGAC-3’
探针（P）：5’-（FAM）-CGGGTAGTCTTTGGAGTC -（TAMRA）-3’

6 仪器设备

生物安全柜、组织研磨仪、核酸提取仪、高速冷冻离心机、涡旋震荡仪、核酸定量仪、数字PCR微滴发生器、PCR扩增仪、数字PCR微滴分析仪。

7 样品

7.1 样品采集及运输

样品采集及运输按照 NY/T 541 的规定执行。

7.2 样品处理

样品处理按照 NY/T 3235 的规定操作。

7.3 样品保存

采集或处理好的样品在2 ℃~8 ℃保存应不超过24 h。如需长期保存，应置-70 ℃以下保存，避免反复冻融。

8 试验步骤

8.1 DNA 提取

按照所选取的病毒DNA提取试剂盒说明书进行提取。

8.2 微滴式数字 PCR 扩增方法

微滴式数字PCR扩增体系配制按照表1进行。该步骤按照不同微滴式数字PCR平台的说明书进行操作。

中国兽医协会 CVMA

表1　微滴数字 PCR 反应体系

试剂成分	终浓度	体积
2×酶混合液[a]	1×	10.0 μL
F（10 μmol/L）	0.5 μmol/L	1.0 μL
R (10 μmol/L）	0.5 μmol/L	1.0 μL
P（10 μmol/L）	0.1 μmol/L	0.2 μL
DNA模板	/	2.0 μL
无核酸酶水	/	5.8 μL
总体系	/	20.0 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 PCR 扩增试剂。		

8.3　微滴生成

反应液配制后，利用数字PCR微滴发生器上完成20 μL反应体系的生成。

8.4　PCR 反应

微滴生成后，在PCR扩增仪上扩增，扩增程序按照表2进行，扩增后在数字PCR微滴分析仪上分析，分析步骤采用FAM单荧光通道。

表2　微滴数字 PCR 扩增程序

步骤	温度	持续时间	循环数
1	95 ℃	5 min	1
2	95 ℃	15 s	40
3	58 ℃	1 min	
4	98 ℃	10 min	1
5	4 ℃	60 min	1
注：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　反应的对照

在进行微滴式数字PCR实验时，应设置阳性对照、阴性对照与空白对照。以提取的含有羊传染性脓疱病毒DNA溶液作为阳性对照。以提取的健康羊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PCR扩增体系中，除模板外，其余组分一致按照表1操作，PCR扩增程序按照表2操作。

9　结果分析

9.1　实验成立条件

阳性对照羊传染性脓胞病毒基因有明显扩增，扩增终点荧光信号大于或等于阈值；阴性对照羊传染性脓胞病毒基因无扩增，扩增终点荧光信号小于阈值；空白对照羊传染性脓胞病毒基因无扩增，扩增终点荧光信号小于阈值。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

根据数字PCR体系中阴性分割体系的终点荧光值设定荧光的阈值限。阈值限需要对空白和阳性扩增结果进行明显的区分。

9.3 结果判定

样品中羊传染性脓胞病毒基因未得到扩增，扩增终点荧光信号小于阈值，可判定样品结果为阴性，报告未检出羊传染性脓胞病毒基因。

样品中羊传染性脓胞病毒基因得到扩增，扩增终点荧光信号大于或等于阈值，可判定该样品结果为阳性，报告检出羊传染性脓胞病毒基因。

中国兽医协会
CVMA