

ICS 11. 220

CCS B 41

团 体 标 准

T/CVMA 110—2022

犬 H3 亚型流感病毒微滴式数字 RT-PCR 检测方法

Method of droplet digital RT-PCR for detection of Canine Influenza Virus
subtype H3

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。

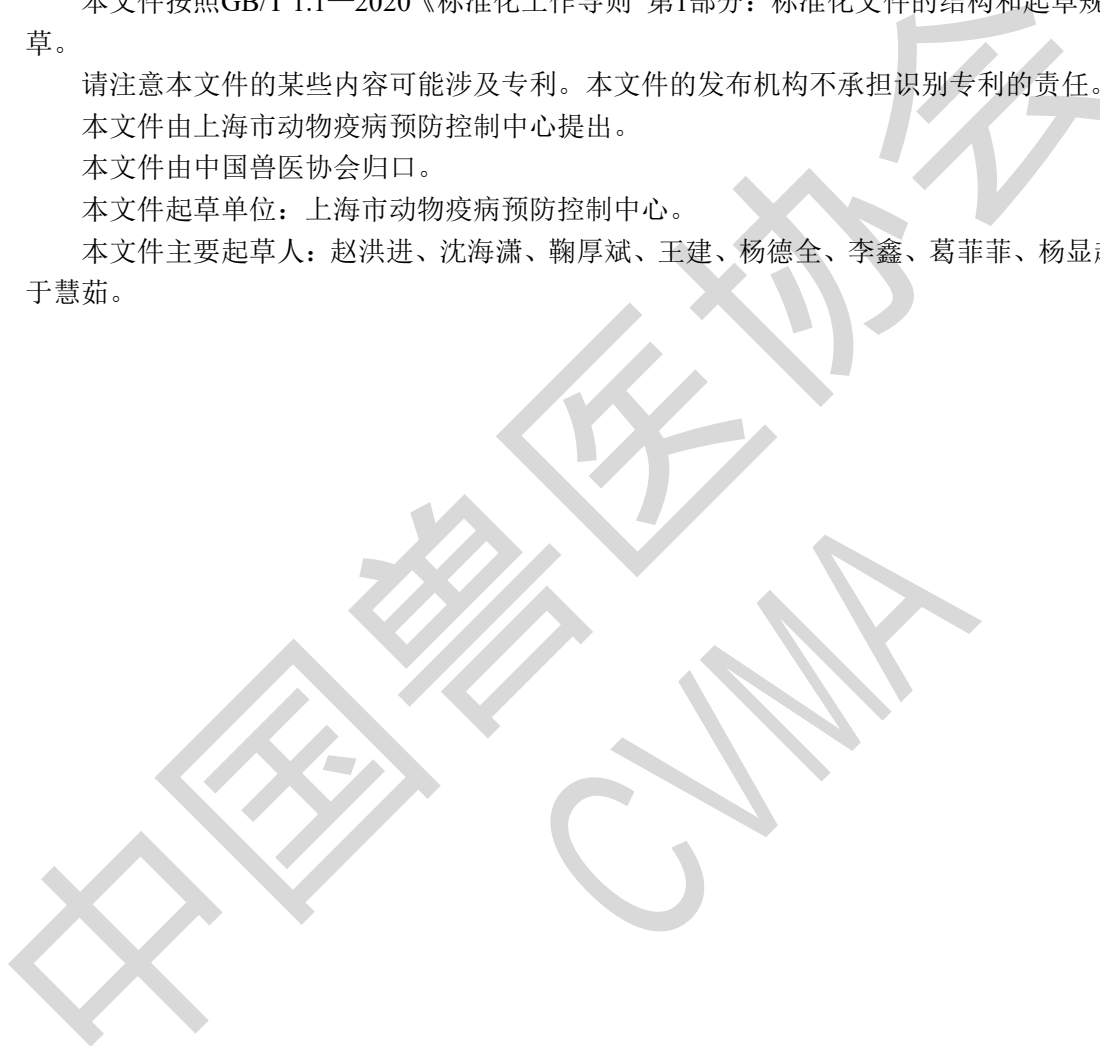
请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

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：赵洪进、沈海潇、鞠厚斌、王建、杨德全、李鑫、葛菲菲、杨显超、陶田谷晟、于慧茹。



犬 H3 亚型流感病毒微滴式数字 RT-PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了犬H3亚型流感病毒（Canine influenza virus, CIV）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。

本文件适用于犬的鼻咽拭子样品中犬H3亚型流感病毒核酸的检测。

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。

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反应（Droplet digital reverse transcript polymerase chain reaction）

BHQ1：无荧光淬灭基团（Black hole quencher-1）

CIV：犬流感病毒（Canine influenza virus）

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。

本文件通过特异性引物和探针进行微滴式数字RT-PCR扩增，从而对犬H3亚型流感病毒核酸实现检测。

6 试剂与材料

6.1 引物和探针

上游引物 H3-CIV F: 5' - CAATCGGTTCCAGATCAAAGG -3'

下游引物 H3-CIV R: 5' - CCCAGCAAGACAACRCAAAGC -3'

探针 H3-CIV P: 5' - FAM-TGTGGATTTCCTTTGCCATATCATGCTTTT-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 RT-PCR 反应试剂盒，或等效的其他反应试剂。

7 仪器与设备

7.1 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）。

7.2 纯水仪。

7.3 高速冷冻离心机（可控温至 4℃；离心速度可达 12000 g 以上）。

7.4 涡旋震荡仪。

8 操作步骤

8.1 样品采集及运输

8.1.1 总体要求

样品的采集、保存与运输按照 NY/T 541 执行。

8.1.2 鼻咽拭子

用无菌鼻咽拭子插入鼻道内鼻腭处，轻轻擦拭并慢慢旋转至少 3 圈，或用无菌鼻咽拭子擦拭双侧咽扁桃体至少 3 次，将拭子置于装有 1 mL 30% 甘油磷酸盐缓冲液（0.01 mol/L pH7.6）的样品保存管中，4℃ 保存备用。

8.2 样品处理

将含有鼻咽拭子样品保存管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℃ 下 3000 g 离心 5 min，取上清液，转入 1.5 mL 灭菌离心管中，4℃ 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进行提取，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

微滴式数字 RT-PCR 扩增体系配制按表 1 所示。该步骤按照不同品牌微滴式数字 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 RT-PCR 扩增试剂 ^a | / | 8 μL |
| H3-CIV F (10 μmol/L) | 0.9 μmol/L | 0.9 μL |
| H3-CIV R (10 μmol/L) | 0.9 μmol/L | 0.9 μL |
| H3-CIV P (10 μmol/L) | 0.25 μmol/L | 0.5 μL |
| RNA 模板 | / | 2 μL |
| 无核酸酶水 | / | 7.7 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。 | | |
| ^a 微滴式 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。以含犬 H3 亚型流感病毒目的基因片段的质粒 DNA 作为阳性对照；以已知犬 H3 亚型流感病毒阴性的鼻咽拭子悬液作为阴性对照；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

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 扩增程序按表 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 | 10 min | 1 |
| 3 | 95 °C | 30 s | 40 |
| 4 | 55 °C | 1 min | |
| 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%。阴性对照和空白对照均无阳性微滴，阳性对照有阳性微滴，且核酸拷贝数浓度 ≥ 10 拷贝/ μL ，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 ≥ 10 拷贝/ μL ，则判定为犬 H3 亚型流感病毒核酸扩增阳性。

9.3.2 阴性

样品中未检出阳性微滴，则判定为犬 H3 亚型流感病毒核酸扩增阴性。

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/ μL ，则需复检。若复检结果仍检测出阳性微滴，则判定为犬 H3 亚型流感病毒核酸阳性。否则，判定为犬 H3 亚型流感病毒核酸扩增阴性。

附录 A
(资料性)
阳性对照序列

A.1 阳性对照序列

CAATCGGTTCCAGATCAAAGGTGTTGAGTTAAAGTCTGGATACAAAGACTGGATCTTGTG
GATTCCTTTGCCATATCATGCTTTTTGCTTTGTGTTGTCCTGCTGGG

注：粗体为引物和探针序列。

中国兽医药品
CVMA

附 录 B
(规范性)
犬 H3 亚型流感病毒阳性对照

B.1 阳性样品制备

B.1.1 按照附录A.1中阳性对照序列合成基因片段，并克隆至pMD19-T载体，再转化至DH5 α 感受态细胞，构建重组质粒。

B.1.2 重组质粒经测序鉴定正确即为目的阳性重组质粒。利用超微量分光光度计测定阳性重组质粒浓度，并按下面公式将浓度换算成拷贝数，DNA拷贝/ μ L=[6.02 \times 10²³ \times DNA浓度(ng/ μ L) \times 10⁻⁹]/(DNA碱基数 \times 660)。即为所制备的犬H3亚型流感病毒阳性对照母液。

B.1.3 将阳性对照母液10倍系列稀释之后，选取10³ 拷贝/ μ L稀释度的阳性对照，经B.2检验方法检测阳性后，即可作为微滴式数字RT-PCR方法的阳性对照。

B.2 阳性样品检验方法

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 每个反应体系为25 μ L，具体为2 \times One Step RT-PCR Buffer 10 μ L、dNTP(2.5 mmol/L) 1 μ L、MgCl₂(25 mmol/L) 1 μ L、RNA酶抑制剂(40 U/ μ L) 0.5 μ L、*Taq* DNA聚合酶(5 U/ μ L) 0.5 μ L、M-MLV 反转录酶(200 U/ μ L) 0.5 μ L、上、下游引物(10 μ mol/L)各0.5 μ L、探针(10 μ mol/L) 1 μ L、DEPC水4.5 μ L、核酸5 μ L。

B.2.3 选定FAM作为报告基团，淬灭基团选none，反应参数设置如下：42 $^{\circ}$ C 5 min, 95 $^{\circ}$ C 10 s; 94 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 35 s，在每个循环第二步（60 $^{\circ}$ C 35 s）收集荧光信号，共40个循环。

B.2.4 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。