

ICS 11.220

CCS B 41

团 体 标 准

T/CVMA 113—2023

猫疱疹病毒 1 型微滴式数字 PCR 检测方法

Method of droplet digital PCR for detection of Feline Herpesvirus type 1

2023-5-17 发布

2023-5-17 实施

中国兽医协会 发布

中国兽医协会
CVMA

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、湖南冠牧生物科技有限公司、南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

本文件主要起草人：李鑫、杨德全、赵洪进、王建、鞠厚斌、沈海濂、葛菲菲、杨显超、白艺兰、陈伟锋、杨忠萍、聂俊伟、赵和平、瞿志鹏、邹莉娜。

中国兽医协会
CVMA

猫疱疹病毒 1 型微滴式数字 PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了猫疱疹病毒1型（Feline herpesvirus type 1, FHV-1）微滴式数字PCR检测方法的试剂与材料、仪器与设备、操作步骤、结果分析。

本文件适用于猫的眼、鼻、口腔等拭子及全血中猫疱疹病毒1型核酸的检测。

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 PCR: 微滴式数字聚合酶链反应（Droplet digital polymerase chain reaction）

BHQ1: 无荧光淬灭基团（Black hole quencher-1）

DNA: 脱氧核糖核苷酸（Deoxyribonucleic acid）

FHV-1: 猫疱疹病毒 1 型（Feline herpesvirus type 1）

HEX: 六氯-6-甲基荧光素（Hexachlorofluorescein）

5 原理

微滴式数字PCR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拷贝数。本文件通过特异性引物和探针进行微滴式数字PCR扩增，从而对猫疱疹病毒1型核酸实现检测。

6 试剂与材料

6.1 引物和探针

FHV-1上游引物（FHV-1 F）：5'-AGAGGCTAACGGACCATCGA-3'。

FHV-1下游引物（FHV-1 R）：5'-GCCCGTGGTGGCTCTAAAC-3'。

FHV-1探针（FHV-1 P）：5'-HEX-TATATGTGTCCACCACCTTCAGGATCTACTGTCGT-BHQ1-3'。

6.2 核酸提取试剂

病毒DNA的提取试剂盒，或等效的其他DNA提取试剂。

6.3 微滴式数字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，或等效的其他反应试剂。

6.4 阴性对照与阳性对照

阴性对照选取已知的FHV-1阴性样品。阳性对照选取已知的FHV-1阳性样品或含有目的基因片段的阳性质粒，其中阳性质粒序列见附录B。

6.5 30%甘油磷酸盐缓冲液

配制方法见附录A。

6.6 带滤芯吸头

吸头规格为10 μL、20 μL、200 μL、1000 μL。

6.7 其他材料

样品保存管、离心管。

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 高速台式冷冻离心机

离心机可控温至4 °C，离心速度可达12000 g以上。

7.3 微量移液器

移液器量程为0.5 μL~10 μL、2 μL~20 μL、20 μL~200 μL和200 μL~1 000 μL。

7.4 冰箱

冰箱温度为2 °C~8 °C和-20 °C以下。

7.5 其他仪器

纯水仪、涡旋震荡仪、核酸提取仪。

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 眼分泌物拭子采集

用无菌拭子轻轻擦拭分泌物后，置于装有1 mL 30%甘油磷酸盐缓冲液的样品保存管中，4 °C保存备用。

8.1.3 鼻拭子采集

用无菌拭子插入鼻道内，轻轻擦拭并慢慢旋转至少3圈，将拭子置于装有1 mL 30%甘油磷酸盐缓冲液的样品保存管中，4 °C保存备用。

8.1.4 口腔拭子采集

用无菌拭子在口腔内转动至少3圈，采集口腔分泌物，将拭子置于装有1 mL 30%甘油磷酸盐缓冲液的样品保存管中，4 °C保存备用。

8.1.5 全血样品采集

压迫猫肘部使前臂头静脉怒张，绷紧头静脉两侧皮肤，采样针头斜面朝上、呈15°角由远心端向近心端刺入静脉血管，见有血液流出时，缓慢抽取1 mL左右的血液置于含0.2 mL EDTA的抗凝采血管中，并上下颠倒不少于5 次，充分混匀，4 °C保存备用。

8.2 样品处理

8.2.1 拭子样品

将含有眼分泌物拭子或鼻拭子或口腔拭子的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 °C下3000 g离心5 min，取上清液，转入1.5 mL灭菌离心管中，4 °C保存备用。

8.2.2 全血样品

血液混匀后，转入1.5 mL灭菌离心管中，直接用于核酸提取或4 °C保存备用。

8.3 DNA 提取

待测样品按照所选取的病毒DNA提取试剂或试剂盒说明书进行提取。若选取已知的FHV-1阴性样品和已知的FHV-1阳性样品作为阴、阳性对照，则需同步提取；若选取阳性质粒作为阳性对照，则不需提取。提取的DNA可直接用于检测或保存于-20 °C备用。

8.4 微滴式数字 PCR 扩增方法

8.4.1 微滴式数字 PCR 体系配制

微滴式数字 PCR 扩增体系配制按表 1 所示。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 PCR 扩增体系

试剂	终浓度	体积
微滴式数字 PCR 扩增试剂 ^a	/	10 μL
10 μmol/L 的 FHV-1 F	0.5 μmol/L	1 μL
10 μmol/L 的 FHV-1 R	0.5 μmol/L	1 μL
10 μmol/L 的 FHV-1 P	0.25 μmol/L	0.5 μL
DNA 模板	/	2 μL
无核酸酶水	/	5.5 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 微滴式数字 PCR 扩增试剂，内含 DNA 聚合酶。

8.4.2 微滴式数字 PCR 反应的对照设置

在进行微滴式数字 PCR 试验时，应设置阳性对照、阴性对照与空白对照。以已知的 FHV-1 阳性样品 DNA 或含有目的基因片段的阳性质粒作为阳性对照；以已知的 FHV-1 阴性样品 DNA 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 PCR 扩增体系中，除模板外，其余组分与 8.4.1 相同。

8.4.3 微滴生成、数字 PCR 扩增及结果读取

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 PCR 扩增。荧光分析步骤采用 HEX 单荧光通道，微滴式数字 PCR 扩增程序按表 2 所示。

表 2 微滴式数字 PCR 扩增程序与扩增条件

步骤	温度	持续时间	循环数
1	95 °C	10 min	1
2	94 °C	30 s	40
3	55 °C	1 min	
4	98 °C	10 min	1
5	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

9.1.1 微滴式数字 PCR 扩增结果, 有效微滴数不得低于理论微滴数的 60 %。

9.1.2 阴性对照和空白对照均未检出阳性微滴, 阳性对照有阳性微滴, 且核酸拷贝数浓度 ≥ 10 拷贝/ μL 。

9.1.3 同时满足 9.1.1 和 9.1.2, 则试验成立。

9.2 阈值设定

微滴式数字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FHV-1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 FHV-1 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 , 则判定为可疑, 需复检。若复检结果仍检测出阳性微滴, 则判定为FHV-1核酸扩增阳性, 否则判定为FHV-1核酸扩增阴性。

附录 A
(规范性)
30%甘油磷酸缓冲溶液配制

30%甘油磷酸缓冲溶液配制方法: 将表A.1中的试剂依次加入200 mL锥形瓶中, 加热溶化, 校正pH为7.6, 100 kPa, 15 min灭菌, 冰箱保存备用。

表A.1 30%甘油磷酸缓冲溶液配制

名称	用量
甘油	30.00 mL
氯化钠 (NaCl)	4.20 g
磷酸二氢钾 (KH ₂ PO ₄)	1.00 g
磷酸氢二钾 (K ₂ HPO ₄)	3.10 g
0.02%酚红	1.50 mL
蒸馏水	加至100 mL

附录 B
(资料性)
FHV-1 核酸阳性质粒制备

B. 1 FHV-1 核酸阳性对照序列

ATCCCAAATAGAGGCTAACGGACCATCGACTTTATATGTGTCCACCACCTTCAGGATC
TACTGTCGTGCGTTAGAGCCACCACGGGCCTGTCCA

注：阳性对照序列为 gB 基因片段，粗体为引物和探针序列。

B. 2 阳性质粒制备

按照附录B.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。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，并将浓度换算成拷贝数（DNA拷贝/ μ L=[$6.02 \times 10^{23} \times$ DNA浓度（ng/ μ L） $\times 10^{-9}$]/（DNA碱基数 $\times 660$ ））。即为所制备的FHV-1阳性对照母液。将阳性对照母液10倍系列稀释之后，选取 10^3 拷贝/ μ L稀释度的阳性对照，经B.3检验方法检测阳性后，即可作为微滴式数字PCR方法的阳性对照。

B. 3 阳性质粒的质量控制

采用本文件中的引物和探针，建立阳性对照的荧光PCR检验方法。每个反应体系为25 μ L，具体为2 \times qPCR Buffer 12.5 μ L、浓度为10 μ mol/L的上、下游引物各1 μ L、浓度为10 μ mol/L的探针0.5 μ L、无核酸酶水8 μ L、核酸2 μ L。选定HEX作为报告基团，淬灭基团选none，反应参数设置如下：95 $^{\circ}$ C 10 min；95 $^{\circ}$ C 15 s，60 $^{\circ}$ C 35 s 收集荧光信号，共40个循环。

B. 4 阳性对照的成立条件

C_t 值应小于 32，需出现明显的扩增曲线。