

T/GXAS

团 体 标 准

T/GXAS 717—2024

动物鹦鹉热衣原体实时荧光 PCR 检测方法

Detection of Animal-origin Chlamydia psittaci by Real-time PCR

2024 - 05 - 10 发布

2024 - 05 - 16 实施

广西标准化协会 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。

本文件由广西兽医协会提出并宣贯。

本文件由广西兽医协会归口。

本文件起草单位：广西悦牧生物科技有限公司、桂林市动物疫病预防控制中心、广西壮族自治区动物疫病预防控制中心、广西农业职业技术大学、防城港市动物疫病预防控制中心、河池市动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人：谢守玉、黄张玲、张红云、周明旭、易春华、潘杰、魏园园、谢颖、覃伦、周媛、侯慧贤、黄小洁、欧莹、杨丽雪、吕思明、林斌、梁乔雨、班雪花、李雪珍、覃芳芸、熊毅、罗湘尹、莫模双、苏子庭、韦成威、谢婷、苏文广、温新瑞、孙晓琳、覃海、裴幸彪、曹显永、陈梦、磨玉武、严小东。

动物鹦鹉热衣原体实时荧光 PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了动物鹦鹉热衣原体实时荧光PCR检测方法涉及的术语和定义、原理、试剂和材料、仪器设备、试验步骤等技术要求。

本文件适用于动物鹦鹉热衣原体的核酸检测。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

BHQ black hole quencher

无荧光淬灭基团。

3.2

Cps chlamydia psittaci

鹦鹉热衣原体。

3.3

Ct cycle threshold

每个反应管内的荧光信号量达到设定的阈值所经历的循环数。

3.4

FAM 6-carboxyfluorescein

6-羧基荧光素。

3.5

MOMP major outer membrane protein

主要外膜蛋白。

4 原理

根据Cps基因特定序列的保守片段，合成一对特异性引物和一条特异性的荧光双标记探针。TaqMan探针两端分别标记一个荧光报告基团和一个荧光淬灭基团。当PCR扩增时，探针被酶切降解，使荧光报告基团和荧光淬灭基团分离，荧光报告基团发出可被仪器接收的荧光信号，通过标准曲线对未知模板进行定量分析。

5 试剂和材料

5.1 DNA 提取试剂盒

选用商品化的DNA提取试剂盒。

5.2 荧光 PCR 扩增试剂

根据不同型号的荧光PCR仪，选取合适的实时荧光PCR扩增试剂。

5.3 引物和探针

针对Cps MOMP基因保守序列设计引物和探针，预期扩增产物大小为145 bp。引物和探针序列详见附件A。

5.4 质粒提取试剂盒

选用商品化的质粒提取试剂盒。

6 仪器设备

6.1 生物安全柜。

6.2 荧光 PCR 仪。

6.3 组织研磨仪。

6.4 台式低温高速离心机：离心力 12 000 g 及以上。

6.5 微量可调移液器：2.5 μL、10 μL、100 μL、200 μL 和 1 000 μL 等不同量程规格。

6.6 冰箱：2℃～8℃和-20℃及以下

7 安全要求

兽医实验室生物安全要求应符合 GB 19489 的规定。

8 样品

8.1 样品采集

8.1.1 拭子样品采集

用无菌棉拭子采集喉头、泄殖腔、眼眶分泌物，浸入1 mL 50%甘油-PBS保存液中，剪去露出管外部分，盖紧离心管盖，密封后冷藏，并于24 h内送至实验室立即检测或置-20℃及以下保存。

8.1.2 组织样品采集

无菌采集适量死亡动物或哺乳动物流产胎儿肺脏、扁桃体、气管和关节液等病料置于无菌容器，密封后冷藏，并于24 h内送至实验室立即检测或置-20℃及以下保存。

8.1.3 全血样品采集

使用真空管（含EDTA抗凝剂）采集动物全血2 mL～5 mL，密封后冷藏，并于24 h内送至实验室立即检测或置-20℃及以下保存。

8.2 样品处理

8.2.1 拭子样品处理

喉头、泄殖腔及眼眶拭子标记编号，立即进行Cps核酸检测或-20℃及以下储存备用。

8.2.2 组织样品处理

取适量采集的组织样品置于组织匀浆器中充分研磨，加入灭菌的0.1 mol/L PBS（pH 7.4）制备10%组织匀浆液。3 000 r/min离心10 min。取上清液，做好标识，立即进行Cps核酸检测或-20℃及以下储存备用。

8.2.3 全血样品处理

抗凝全血标记编号，立即进行Cps核酸检测或-20℃及以下储存备用。

9 试验步骤

9.1 核酸提取

采用DNA提取试剂盒或核酸提取仪提取样本中的Cps核酸。未能在2h内完成检测的，应置于-20℃及以下保存。

9.2 核酸扩增

9.2.1 扩增体系

建立20 μL反应体系，扩增体系见表1。

表1 荧光 PCR 扩增体系

试剂	体积
Premix Ex Taq(Probe qPCR)扩增酶预混液	10 μL
Cps上游引物、下游引物 (20 pmol/μL)	各0.5 μL
Cps探针 (20 pmol/μL)	0.3 μL
DNA模板	2 μL
灭菌双蒸水	补足至20 μL

9.2.2 扩增条件

95℃预变性5 min，40个循环（95℃变性15 s，58℃退火延伸30 s），在每一个循环的58℃时收集FAM通道的荧光信号。

9.3 阳性及阴性对照

9.3.1 阴性对照

采用灭菌双蒸水作为阴性对照。

9.3.2 阳性对照

采用含有Cps特定基因保守序列的重组质粒p-Cps作为阳性对照。重组质粒标准品p-Cps制备方法与序列详见附录B。

10 结果判定

10.1 质量控制

阳性对照的Ct值≤27且出现特异性扩增曲线；阴性对照无Ct值或阴性对照Ct值>35，表明试验成立。

10.2 结果判断

待检样品Ct值≤30且出现典型的S型扩增曲线，则判为Cps核酸阳性；待检样品无Ct值或Ct值>30，则判为Cps核酸阴性。

附 录 A
(资料性)
引物与探针序列

Cps检测引物与探针序列，见表A. 1。

表A. 1 Cps检测引物与探针序列

引物名称	序列
上游引物Cps-Fq	5' -CCAAGAGGCTATAAAGGA-3'
下游引物Cps-Rq	5' -CAAGCATATTCAATCTGTAAG-3'
TaqMan探针Cps-P	FAM-TTACCTATAACGGCTGGAACAACA-BHQ1

附 录 B

(资料性)

重组质粒标准品的制备方法与序列

采用人工合成的方法合成一段含有Cps MOMP基因特定保守靶序列，该靶序列包含本文件5.3中引物和探针的核苷酸序列，将靶序列连接至pMD-18T载体中形成连接产物，将连接产物转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞，挑取重组子菌落经PCR鉴定正确，采用质粒抽提试剂盒提取质粒，测算浓度，即构建成重组质粒标准品 p-Cps，作为阳性对照。人工合成重组质粒标准品序列为：

TCAAGCCCAGCACAATTTGTGATTCACAAACCAAGAGGCTATAAAGGAGCTAGCTCGAATTTTCCTTTACCTATAACGGCTGGAACAAC
AGAAGCTACAGACACCAAATCAGCTACAATTAAATACCATGAATGGCAAGTAGGCCTCGCCCTGTCTTACAGATTGAATATGCTTGTTTC
CATATATTGGCGTAAACTGGTCAAGAGCAACTTTTGATGCTGATACTATCCGCATTGCTCAAC



中华人民共和国团体标准

动物鹦鹉热衣原体实时荧光PCR检测方法

T/GXAS 717—2024

广西标准化协会统一印制

版权专有 侵权必究