

犬巴贝斯虫荧光定量 PCR 检测方法

Detection of fluorescent quantitation PCR for Babesia canis

地方标准信息服务平台

2018 - 10 - 30 发布

2018 - 11 - 30 实施

目 次

前 言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 缩略语	1
4 原理	1
5 仪器和器材	1
6 试剂和引物	2
7 样品的采集和前处理	2
8 操作步骤	2
9 检测过程中防止交叉污染的措施	3
10 废弃物处理	4

地方标准信息服务平台

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由辽宁省畜牧兽医局提出并归口。

本标准起草单位：辽宁省动物疫病预防控制中心、辽宁省动物医学研究院。

本标准主要起草人：高志峰、张才、杨国丽、邓文超、张健、马建山、高原、兰德松。

地方标准信息服务平台

犬巴贝斯虫荧光定量 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了犬巴贝斯虫的荧光定量PCR检测方法的技术要求，包含规范性引用文件、缩略语、原理、仪器和器材、试剂和引物、样品的采集和前处理、操作步骤、检测过程中防治交叉污染的措施、废弃物处理等。

本标准适用于在生物安全 II 级(BSL-2)以上的实验室进行全血液样品中犬巴贝斯虫核酸的检测，适用于犬巴贝斯虫病的确诊及流行病学调查。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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 19495.2 转基因产品检测 实验室技术要求

中华人民共和国农业部公告2003年第302号《兽医实验室生物安全技术管理规范》

中华人民共和国农业部公告2017年第25号《病死及病害动物无害化处理技术规范》

3 缩略语

该部分对本技术规范中用到的缩略语进行了注解：

DNA：脱氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid）

bp：碱基对（base pair）

PCR：聚合酶链式反应（polymerase chain reaction）

dNTP：脱氧核糖核苷三磷酸（Deoxy-ribonucleoside triphosphate）

Taq酶：Ex Taq DNA聚合酶（Taq DNA polymerase）

TAE：三羟甲基氨基甲烷-乙酸电泳缓冲液（Tris acetate-EDTA buffer）

4 原理

巴贝斯虫病是指由巴贝斯科的原虫所引起的一种梨形虫病，主要以侵害家畜的红细胞为特征的血液原虫病。犬巴贝斯虫病是一种经硬蜱传播的血液原虫病，临床上以严重贫血、高热、黄疸、呼吸困难为特征。根据犬巴贝斯虫（*Babesia cains*, *B. canis*）裂殖子基因序列设计一对引物，在DNA聚合酶催化下，以母链DNA为模板，以引物为延伸起点，通过变性、退火和延伸，体外复制出与母链模板DNA互补的子链DNA。

5 仪器和器材

- 5.1 低温高速离心机（最大离心力 12 000 rpm）。
- 5.2 冰箱：4℃±1℃冰箱，-20℃±1℃冰箱，-70℃±1℃冰箱。
- 5.3 生物安全柜。
- 5.4 荧光 PCR 扩增仪。
- 5.5 分析天平。
- 5.6 离心管：1.5 ml 离心管和 0.2 ml PCR 专用离心管。
- 5.7 微量可调移液器：1000 μl，200 μl，100 μl，50 μl，20 μl，10 μl，2 μl。

6 试剂和引物

注：本技术规范中使用的试剂，除另有说明外，所有实验使用的试剂等级均为不含RNA或RNase的分析纯或生化试剂；所有试剂均用无菌的容器分装。

- 6.1 5 mMol/L 的 Tris/HCl (pH 7.5~8.0)
- 6.2 灭菌双蒸水
- 6.3 70%乙醇
- 6.4 犬巴贝斯虫阳性对照组基因
- 6.5 特异性引物：
正向引物：5' - TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAG TTG-3'
反向引物：5' - TCCATGCTGAAGTATTCAAGA CACA-3'。
- 6.6 基因组 DNA 纯化试剂盒 100 次、购自 TaKaRa 公司，常温保存
- 6.7 荧光定量试剂盒 FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)。产品在-15至-25℃条件下可稳定存放至标签上的有效期之前。若存放于2~8℃条件，仅可短期储存不超过1个月。

7 样品的采集和前处理

- 7.1 于犬前肢臂头静脉取300 μl抗凝血，4℃保存，4h内使用全血基因组DNA提取试剂盒提取DNA。将获得的DNA放置 -20℃保存。
- 7.2 采样时避免接触血液，尽量使用一次性采血针及配套采血管（EDTA，2Na-EDTA，肝素均可）采血。
- 7.3 采集或处理的样品在2~8℃条件下保存应不超过24 h；若需长期保存，应放置-70℃冰箱，但应避免反复冻融（冻融不超过3次）。采集的样品密封后，采用保温壶或保温桶加冰密封，在6~8 h之内运送到实验室。
- 7.4 按照《兽医实验室生物安全技术管理规范》进行样品的生物安全标识。

8 操作步骤

8.1 全血基因组的提取

- 8.1.1 按处理血液样品数准备1.5 ml离心管，并各加入 GenTLE Solution I 500 μl。
- 8.1.2 把混合均匀的100 μl血液，加入到分装好的 GenTLE Solution I 的离心管中，立即振荡数秒钟。不管处理多少样品，血液加入到 GenTLE Solution I 中，要立即进行振荡混合，否则有可能降低收取的DNA量。

8.1.3 室温放置 10 min以上,然后在室温条件下12 000 rpm离心5min。离心时,请注意离心管在离心机里的摆放方向要统一,离心管的小耳朵朝上。此时几乎看不到DNA沉淀。若离心温度低,会对收取的DNA量和纯度有影响,请于20℃以上离心。

8.1.4 用移液器小心除去管中溶液,此时沉淀看不清,紧贴在离心管外侧(带小耳朵一侧)的内壁上,除去溶液时,请一定注意微量移液器吸头不要碰到离心管外侧的内壁,插到离心管内侧的底部,注意不要吸走沉淀物。

8.1.5 加入1 ml的 GenTLE Solution II。此时 GenTLE Solution II 应沿着离心管内侧的内壁加入到离心管中。特别注意操作步骤4(除去 GenTLE Solution I 和血液混合物)以及操作步骤10(除去 GenTLE Solution III 和异丙醇混合物)的实验操作特别重要,请严格按操作方法进行。

8.1.6 轻柔地上下颠倒离心管数次,室温12 000 rpm 以上离心2min,用微量移液器小心地除去上清溶液(方法参见实验操作4)。剧烈振荡将影响收量和纯度。

8.1.7 向离心管中加入 GenTLE Solution III 500 μl,轻微振荡 10 s 充分混合。

8.1.8 室温12 000rpm离心5min,把上清溶液移至另一个新的离心管中。

8.1.9 加入等体积(约500 μl)的异丙醇,轻柔地上下颠倒数次,均匀混合。

8.1.10 4℃、12 000 rpm 离心 5 min,小心除去上清溶液。GenTLE Solution III 中含有影响酶反应的物质,所以一定要除净上清溶液,但应注意不要吸走沉淀。

8.1.11 加入1 ml的70%乙醇清洗沉淀,4℃、12 000 rpm 离心5min,小心地除去上清溶液(方法参见4)。

8.1.12 干燥沉淀。因为该方法提取的DNA较大,完整性好,所以请一定不要干燥过度。Tube(离心管)中看不到有明显的液体或没有乙醇气味后,就可以加入TE进行溶解。如果沉淀已经变白,说明干燥过度,此时加入TE,可能沉淀不能完全溶解,DNA的收量可能会受到影响。

8.1.13根据下一步实验需要,用 10~50 μl 适当的5 mMol/L 的Tris/HCl(pH 7.5~8.0)溶解沉淀。

8.2 荧光定量 PCR 的方法

8.2.1 冰上操作。

8.2.2 准备0.2 ml Tube若干(数目为样品数目+2)。

8.2.3 向每个管中加入

(1) 2×SYBR Master Mix 10.0 μl;

(2) 20 μmol/l正反向引物各0.1 μl;

(3) 去离子水7.8 μl;

(4) 样品2 μl,其中2个管分别加入2 μl灭菌双蒸水和2 μl阳性对照基因。

8.2.4 震荡混匀后使用离心机离心,此时拿出Tube时应小心不可以让聚集在管底的液体弹起。

8.2.5 放入荧光定量PCR仪,反应条件为:95℃ 3 min,95℃ 15 s,60℃ 60 s,72℃ 30 s,35个循环。

8.2.6 荧光定量PCR反应结束后,从荧光定量PCR仪直接调取荧光定量PCR溶解曲线数据,进行溶解曲线分析。

8.3 结果判定

当样品的荧光定量PCR溶解曲线数据与阳性对照一致为有规律的扩增曲线,而空白组(即双蒸水组)无扩增曲线时,则样品为检测阳性样品;若当样品的荧光定量PCR溶解曲线数据与空白组(即双蒸水组)一致无扩增曲线,而阳性对照可见有规律的溶解曲线,则样品为检测阴性样品。

9 检测过程中防止交叉污染的措施

按照GB/T 19495.2的规定执行。

10 废弃物处理

按照 GB19489 的规定执行。

地方标准信息服务平台