



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

动物 Q 热病原荧光 PCR 检测方法

Method of Real-Time PCR for detection of pathogen of animal Q fever pathogen

(报批稿)

(本稿完成日期：2018.11.28)

— XX — XX 发布

XXXX — XX — XX 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业农村部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：中国检验检疫科学研究院、乌鲁木齐海关检验检疫技术中心。

本标准主要起草人：王慧煜、冯春燕、李霆、梅琳、张舟、李晓琳、贾广乐、仇松寅、王娜、刘晓飞、景宏丽、孔玉方、石坤、杜方原、史茜、季新成。

动物 Q 热病原荧光 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了动物Q热病原伯奈特柯克斯体荧光PCR检测方法的技术要求。

本标准适用于疑似罹患动物Q热牛羊流产、死胎、弱仔、组织、奶汁或血液中的动物Q热伯奈特柯克斯体的核酸检测，可作为动物Q热病原体的监测和鉴定，以进行牛羊Q热的实验室诊断。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 18088 出入境动物检疫采样

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

陆生动物诊断试验和疫苗手册（Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals）

3 缩略语

下列术语和定义适用于本标准。

Q fever: Q热，是由伯奈特柯克斯体（*Coxiella burnetii*）引起的一种自然疫源性人兽共患传染病，以蜱螨等节肢动物为传播媒介，在动物中主要感染牛、羊，且是人类感染的重要储存宿主。

***Coxiella burnetii*:** 伯奈特柯克斯体，是引起Q热的病原体，属于原菌门、γ亚门、军团菌目、柯克斯体科、柯克斯体属。

DNA: 脱氧核糖核酸。

bp: base pair, 碱基对。

Ct: Cycle Threshold, Ct值，荧光信号量达到设定的阈值时所经历的循环数。

4 试剂和材料

除另有规定外，所用化学试剂均为分析纯。

4.1 Pfu DNA polymerase (2.5U/μL), Pfu DNA polymerase buffer, 10×Thermopol Reaction buffer, dNTP (2.5mmol/L), 均为商品化试剂。

4.2 引物及探针: 包括 TaqMan 荧光定量 PCR 引物, TaqMan 探针。

4.3 DNA 提取液 (pH8.0): 配制方法见附录 A。或可应用等效的市售商品细菌或组织 DNA 提取试剂盒。

5 仪器设备

- 5.1 2℃~8℃冰箱。
- 5.2 -20℃低温冰箱。
- 5.3 -80℃的超低温冰箱。
- 5.4 组织捣碎机/匀浆仪。
- 5.5 冷冻高速离心机和配套的 1.5mL 和 200μL 等离心管。
- 5.6 生物安全柜。
- 5.7 荧光定量 PCR 仪。
- 5.8 高压灭菌锅。
- 5.9 微量可调移液器 (0.1 μL~2.5 μL、0.5 μL~10 μL、2μL~20 μL、20μL~200 μL、100μL~1000 μL) 和相应配套的吸头。

6 荧光定量 PCR 检测方法

由于Q热为人兽共患病，采样时应采取适当的生物安全防护。样品处理及检测过程所涉及的试验操作，须在生物安全柜或隔离设备中进行。活培养物或从感染物采集病料的操作，必须在三级生物安全实验室内进行。

6.1 操作步骤

DNA提取之前，首先要用90℃ 30-60 min灭活处理。

参见附录中提取样品DNA的方法提取待检基因组DNA。除检测样品外，需要设立阴性、阳性及空白对照。

阳性对照：阳性质粒（通过测序与目标扩增序列一致）或标准Q热菌株模板DNA作为阳性对照

阴性对照：取健康动物同类样品作为阴性对照。

注：也可采用商品化的组织基因组DNA提取试剂盒进行。

6.2 引物和探针的序列

上游引物:5'-GGGGTAAAGTGATCTACAC -3'

下游引物:5'-CCCATAAACGTCCGATAC -3'

TaqMan 探针:5'-FAM-TCAGTATGTATCCACCGTAGCCA-Eclipse -3'

引物、探针合成后采用灭菌ddH₂O均稀释为10μmol/L，预期扩增片段长度为130bp（具体序列参见附录B.1）。

6.3 反应体系

在PCR管内，加入

反应液	用量
Pfu DNA polymerase buffer	2.5μL
Pfu DNA polymerase	0.5μL
10μmol/L 上游引物	0.5μL
10μmol/L 下游引物	0.5μL
10μmol/L TaqMan 探针	0.5μL
dNTPs	2μL
模板DNA	5μL
补充ddH ₂ O至	25μL

每个检测样本设置重复，除检测样品外，需要设立阴性、阳性及空白对照（以灭菌双蒸水作为模板设置空白对照）。可使用其他等效商品化的试剂。

6.4 反应程序

95℃预变性 5min；95℃变性 15s，57.7℃退火延伸 45s，40 个循环。退火延伸步骤采集荧光。

6.5 荧光 PCR 结果分析

用荧光定量PCR仪自带分析软件对扩增结果进行分析。

6.6 结果判定

阴性和空白对照无扩增曲线。阳性对照Ct值应小于28.0，并出现典型的扩增曲线则视为该实验成立。否则此次试验视为无效。

在实验成立的前提下，若检测样品Ct值 ≤ 38 ，且出现典型的扩增曲线，则荧光PCR结果为阳性，显示样品中存在Q热伯奈特柯克斯体病原。若检测样品无Ct值且无扩增曲线，则荧光PCR结果为阴性。38 < Ct值 < 45，样本为可疑，需重新取样进行重复检测，如果重复检测的Ct值 < 38，且出现典型的扩增曲线，判为阳性，否则判为荧光PCR阴性反应。

附 录 A

(规范性附录)

样品基因组 DNA 的提取及溶液配制

A.1 DNA提取液(pH8.0): 100mmol/L Tris-HCl; 100mmol/L Na₂EDTA; 100mmol/L 磷酸钠; 1.5mol/L NaCl; 1% CTAB。

A.2 样品DNA的提取方法

A.2.1 将处理好的样品中加入1.5mL EP管中,加20 μ L蛋白酶K,再加SDS至终浓度为1%,上下颠倒混匀,混合液置于55 $^{\circ}$ C水浴2.5h;

A.2.2 向匀浆液中按1:1比例加入酚/氯仿/异戊醇混合液(25:24:1),轻轻震荡混匀5min,12000 \times g离心5min;

A.2.3 吸上层水相800 μ L于一灭菌EP管中,加入等体积酚/氯仿/异戊醇混合液,轻轻震荡混匀5min,12000 \times g离心5min;

A.2.4 吸上层水相500 μ L于一灭菌EP管中,加入两倍体积的无水乙醇,-20 $^{\circ}$ C放置2h;

A.2.5 12000 \times g离心5min,沉淀DNA,倾去上清液;

A.2.6 于沉淀中加入75%乙醇溶液500 μ L,轻轻混匀后12000 \times g离心5min,倾去上清液,室温凉干;

A.2.7 向DNA沉淀中加TE缓冲液100 μ L溶解,-20 $^{\circ}$ C保存备用。

A.2.8 也可采用等效的DNA提取试剂盒,按照说明书进行操作。

附录 B (资料性附录)

B.1 动物Q热伯奈特柯克斯体TaqMan荧光定量PCR 130 bp目标扩增序列

```
gg ggtaaagtga tctacacgag acgggtaag cgtgctcagt atgtatccac cgtagccagt cttaaggtgg  
gctgcgtggt gatggaagcg tgtggaggag cgaaccattg gtatcggacg tttatggg
```

B.2 动物Q热伯奈特柯克斯体Taq man荧光定量PCR方法扩增曲线

