



中华人民共和国国家标准

GB/T 35942—2018

隐孢子虫套式 PCR 检测方法

Nested PCR method for detection of *Cryptosporidium* spp.

2018-02-06 发布

2018-09-01 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部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:中国农业科学院上海兽医研究所、中国动物卫生与流行病学中心。

本标准主要起草人:陈兆国、米荣升、黄燕、刘陆世、王岩。



隐孢子虫套式 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了隐孢子虫套式 PCR 检测方法。
本标准适用于动物的隐孢子虫感染的检测、流行病学调查和出入境检验检疫。

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
WS/T 230—2002 临床诊断中聚合酶链反应(PCR)技术的应用

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。
PCR:聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction)。
PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline)。
TAE:Tris-乙酸电泳缓冲液(Tris Acetate-EDTA Buffer)。
EB:溴化乙锭(Ethidium Bromide)。
BSA:牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin)。

4 仪器、材料与试剂

4.1 仪器

- 4.1.1 PCR 基因扩增仪。
- 4.1.2 高速台式冷冻离心机。
- 4.1.3 低速大容量离心机。
- 4.1.4 微量可调移液器:2 μ L、10 μ L、20 μ L、200 μ L、1 000 μ L。
- 4.1.5 核酸电泳仪。
- 4.1.6 核酸电泳槽。
- 4.1.7 凝胶成像分析系统。
- 4.1.8 生物样品均质研磨仪。
- 4.1.9 高压蒸汽灭菌器。

4.2 材料

- 4.2.1 一次性封口袋。
- 4.2.2 棉拭子。
- 4.2.3 一次性 PE 手套。

- 4.2.4 压舌板或玻棒。
- 4.2.5 烧杯:100 mL。
- 4.2.6 纱布。
- 4.2.7 漏斗。
- 4.2.8 铁架台。
- 4.2.9 离心管:1.5 mL、2.0 mL、15.0 mL、50.0 mL。
- 4.2.10 200 μ L PCR 管。

4.3 试剂

- 4.3.1 磷酸盐缓冲液(PBS)(见附录 A)。
- 4.3.2 5%重铬酸钾溶液(见附录 A)。
- 4.3.3 1 $\times$ TAE(见附录 A)。
- 4.3.4 10 mg/mL 溴化乙锭(EB)或同类核酸染料。
- 4.3.5 土壤基因组 DNA 提取试剂盒:市售产品。
- 4.3.6 水:实验中配制溶液的用水应为蒸馏水或去离子水;PCR 用水符合 GB/T 6682 中一级水的规格。
- 4.3.7 DNA 聚合酶:市售产品。
- 4.3.8 2 $\times$ PCR Buffer:市售产品。
- 4.3.9 2.5 mmol/L dNTPs(含 MgCl_2):市售产品。
- 4.3.10 20 mg/mL 牛血清白蛋白(BSA)。
- 4.3.11 引物(上、下游外引物和内引物浓度分别配成 100 μ m/mL,引物序列见附录 B)。
- 4.3.12 100 bp DNA 分子质量标准。
- 4.3.13 琼脂糖(电泳级)。
- 4.3.14 质控标准卵囊:微小隐孢子虫(*Cryptosporidium parvum*)Iowa 株、贝氏隐孢子虫(*C.baileyi*)、泰泽隐孢子虫(*C.tyzzeri*)、安氏隐孢子虫(*C.andersoni*)或其他种类的隐孢子虫卵囊,浓度为每克粪便 10^5 个卵囊。阴性质控对照为不含隐孢子虫卵囊的去离子水或其他适宜的溶液。

5 废弃物处理和防止污染的措施

废弃物处理和检验过程中防止交叉污染的措施,按照 WS/T 230—2002 中第 6 章“污染的预防和控制”的规定执行(见附录 C)。

6 样品的采集、保存和运输

6.1 样品的采集

用棉拭子从禽类泄殖腔或直接从哺乳动物直肠采集粪便,或用一次性手套采集新鲜粪便约 20 g,装入一次性封口袋。采样过程中应戴一次性手套,采样过程中样本间避免交叉污染。每份样品标记样品编号、名称、动物来源、动物年龄、采样时间、采集单位或畜主姓名及地址。

6.2 样品的保存和运输

采集的样品在 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存应不超过 72 h,长期保存需加入等体积 5%重铬酸钾溶液,装入灭菌容器内 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。检出的阳性样品,发出报告后 30 d 方可无害化处理。

样品运送应放在一个不透水、防泄漏的容器内,保证完全密封。将上述容器置于结实、不透水和防

泄漏的辅助包装中。冷冻剂放在辅助包装周围,使样品保持低温,确保样品在 48 h 内送达实验室。所有样品应附有一份说明,包括样品提交人、样品来源地、动物种类和年龄、与动物有关的病史、测试要求以及联系方式等。

7 样品的预处理

7.1 穿上防护服,戴上一次性手套。将经高压灭菌或 80 °C~100 °C 烘烤 20 min 的 60 目~100 目铜筛网置于无菌漏斗中,放置在固定好的铁架台上,漏斗下端置于 50 mL 离心管中。取 10 g 待检样品(若是成形的粪便应混匀;若粪便是液体,混匀后取 10 mL)放入烧杯中,加 30 mL PBS,玻棒或压舌板混匀后经 60 目~100 目铜筛网过滤至离心管中。

7.2 滤液用移液器吸取 1.5 mL 放入 2 mL 离心管中,−20 °C 保存,用于 DNA 提取。

7.3 剩余滤液 1 500 g 离心 10 min,弃上清。沉淀加入等体积 5%重铬酸钾溶液,装入灭菌容器内 4 °C 保存备用。

8 操作程序

8.1 DNA 抽提

将保存于 2 mL 离心管中的样品以 1 500 g 离心 5 min 后,弃上清,沉淀用于 DNA 的提取,按从粪便、土壤中提取 DNA 的商品化试剂盒推荐的操作方法进行。

8.2 套式 PCR 检测

8.2.1 第一轮 PCR 扩增

按下列方法配制 50 μ L PCR 扩增反应体系:

2 $\times$ PCR Buffer(含 $MgCl_2$)	25 μ L
dNTP Mixture(2.5 mmol/L)	6 μ L
BSA(20 mg/mL)	1.5 μ L
P1-1(100 μ mol/L)	1 μ L
P1-2(100 μ mol/L)	1 μ L
DNA 聚合酶(1.0 U/ μ L)	1 μ L
DNA 模板	2 μ L
PCR 用水	12.5 μ L

第一轮 PCR 扩增参数:94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 45 s,55 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 1 min,35 个循环;72 °C 延伸 7 min。外引物为 P1-1 和 P1-2(见 B.1)。阳性对照模板为 10^5 个 4.3.14 中所列的隐孢子虫卵囊或适宜的质控隐孢子虫卵囊加入 10 g 不含隐孢子虫卵囊的同种动物新鲜粪便,按照 8.1 所列方法提取的、浓度在 10^2 拷贝/ μ L~ 10^5 拷贝/ μ L 的隐孢子虫基因组 DNA 样品;阴性对照模板为 10 g 不含隐孢子虫卵囊的同种动物新鲜粪便按 8.1 所列方法提取的 DNA。

8.2.2 第二轮 PCR 扩增

按下列方法配置 50 μ L PCR 扩增反应体系:

2 $\times$ PCR Buffer(含 $MgCl_2$)	25 μ L
dNTP Mixture(2.5 mmol/L)	6 μ L
BSA(20 mg/mL)	1.5 μ L

P2-1(100 $\mu\text{mol/L}$)	1 μL
P2-2(100 $\mu\text{mol/L}$)	1 μL
DNA 聚合酶(1.0 U/ μL)	1 μL
第一轮 PCR 扩增产物	2 μL
PCR 用水	12.5 μL

第二轮 PCR 扩增参数:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。外引物为 P2-1 和 P2-2(见 B.2)。阳性对照模板为 2 μL 第一轮阳性对照扩增产物;阴性对照模板为第一轮阴性对照 PCR 扩增产物。

8.3 琼脂糖凝胶电泳

用 1 $\times$ TAE 缓冲溶液配制 1.0%琼脂糖凝胶,取第二轮 PCR 产物 5 μL ,在 1.0%~1.2%浓度的琼脂糖凝胶中以 1 V/cm~10 V/cm 凝胶的电压下进行电泳,每 100 mL 凝胶中加入 5 μL EB 或同类核酸染料,凝胶成像分析系统观察电泳结果并拍照。

9 结果描述及判定

9.1 质控标准

阳性对照出现一条大小约为 830 bp 条带,阴性对照无条带时判定为试验有效。

9.2 结果判定

9.2.1 阳性:被检样品泳道出现一条大小约为 830 bp 条带时,判为阳性,必要时进行测序。

9.2.2 阴性:被检样品没有出现大小约为 830 bp 的带,经重复 2 次套式 PCR 检测后仍未出现扩增条带时,判为阴性。

10 对于检测过程中出错或结果出现疑问的处理

对于检测过程中,由于错误操作造成样品处理不当或者 DNA 提取不当,以及结果出现疑问时,可用保存于 5%重铬酸钾中的样品,充分混匀后取 1.5 mL 重新进行 DNA 提取和 PCR 扩增,以验证结果的可靠性。



附 录 A
(规范性附录)
试剂的配制

A.1 0.01 mol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲液(PBS)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.39 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.93 g
NaCl	8.5 g

加入 800 mL 蒸馏水,用 HCl 调节溶液的 pH 值至 7.2,加蒸馏水定容至 1 000 mL,在 1.034×10^5 Pa 高压下蒸汽灭菌 20 min,保存于室温。

A.2 5%重铬酸钾溶液

重铬酸钾	5.0 g
------	-------

加蒸馏水定容至 100 mL,在 1.034×10^5 Pa 高压下蒸汽灭菌 20 min,保存于室温。



A.3 50×TAE 贮存液

Tris 碱	242 g
冰醋酸	57.1 mL
EDTA(0.5 mol/L,pH 8.0)	100 mL

加蒸馏水定容至 1 000 mL,在 1.034×10^5 Pa 高压下蒸汽灭菌 20 min,使用时用蒸馏水稀释成 $1 \times \text{TAE}$ 。

A.4 10 mg/mL 溴化乙锭

溴化乙锭	1 g
------	-----

加蒸馏水定容至 100 mL,磁力搅拌数小时,确保完全溶解,用棕色瓶或铝箔包好,室温保存。

附 录 B
(规范性附录)
引 物 序 列

B.1 外引物

P1-1;5'-TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG-3'
P1-2;5'-CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA-3'。

B.2 内引物

P2-1;5'-GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG-3'
P2-2;5'-CTC ATA AGG TGC TGA AGG AGT A-3'。



附录 C

(规范性附录)

检测过程中防止交叉污染的措施

C.1 制样过程

制样工具应清洗干净, 1.034×10^5 Pa 高压下蒸汽灭菌 20 min, 一套洁净工具限于一份样品使用。存放样品的容器应该经过清洗、高压, 或为一次性灭菌容器。

C.2 检测过程

C.2.1 PCR 实验室应分为样品制备区、前 PCR 区、PCR 区和后 PCR 区。将模板提取、PCR 反应液配制、PCR 循环扩增及 PCR 产物的鉴定等步骤分区或分室进行。实验室的运作应从“洁净区”到“污染区”单向进行。

C.2.2 实验过程中, 应穿戴实验服和手套, 手套要经常更换。各区要有专用实验服, 经常清洗。

C.2.3 各区所有的试剂、器材(尤其是移液器)、仪器都应专用, 不得带出该区。

C.2.4 所有溶液、水、耗材和器具要 1.034×10^5 Pa 高压下蒸汽灭菌 20 min, 避免核酸和/或核酸酶污染。每种溶液应使用高质量的成分和新蒸馏的双蒸水。在 $20\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮存的试剂中, 可加入 0.025% 的叠氮钠。所有试剂应该以大体积配制, 然后分装成仅够一次使用的量进行贮存。

C.2.5 DNA 模板或引物的离心管打开之前, 要短暂离心, 离心管不能用力崩开, 以免产生气溶胶。

C.2.6 前 PCR 区中, 应在 PCR 操作台中加入 PCR 反应各组分。

C.2.7 实验前后, 实验室用紫外线消毒以破坏残留的 DNA。

C.2.8 可使用 dUTP/UDG 法控制污染。
