|  |  |
| --- | --- |
| ICS |  |
| B | 点击此处添加CCS号 |

|  |
| --- |
| 22 |

吉林省地方标准

DB 22/T XXXX—XXXX

华支睾吸虫卵检测方法 PCR和实时荧光PCR法

Detection methods of Clonorchis sinensis metacercaria eggs: PCR and real time PCR

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

吉林省市场监督管理厅  发布

1. 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。

本部分由长春海关提出并归口。

本部分起草单位： 长春海关。

本部分主要起草人： 马文晨、孟庆峰、王准、王玮琳、刘金华、孟日增、王伟利。

华支睾吸虫卵检测方法

* 1. 范围

本标准规定了人粪便中华支睾吸虫卵检测方法的原理、试验条件、试剂与材料、仪器设备、样品、试验步骤和试验数据处理及试验报告。

本标准适用于人粪便中华支睾吸虫卵核酸检测。

* 1. 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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

* 1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

实时荧光PCR real-time PCR

在 PCR 扩增时加入带有荧光基团的特异性探针(Taqman 探针) 或荧光染料, 使 PCR 产物的积累与荧光信号的积累完全同步, 实现 PCR 产物的实时监测。

Ct 值 cyclethresholdvalue

每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

* 1. 缩略语

bp: 碱基对(base pair)

CTAB: 十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrithylammonium bromide)

DNA: 脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

dNTP: 脱氧核苷酸三磷酸(deoxyribonucleosidetriphosphate)

EDTA: 乙二胺四乙酸(ethylene diaminetetraacetic acid)

FAM:6-羧基荧光素(6-carboxyfluorescein)

OD: 光密度值(optical density)

PCR: 聚合酶链式反应(polymerase chainreaction)

Taq 酶: 从水生热栖菌中分离出的具有热稳定性的 DNA 聚合酶(thermus aquaticu)

TE:Tris-HCl、EDTA 缓冲液

Tris: 三(羟甲基) 氨基甲烷[tris (hydroxymethyl) aminomethane]

* 1. 试剂和材料

除另有规定外, 试剂为分析纯或生化试剂。 试验用水应符合 GB/T 6682 中一级水的规定。 所有试剂均用无 DNA 酶污染的容器分装。

液氮

0.5 mol/L EDTA 缓冲液(pH 8.0)。

CTAB 提取缓冲液 (2.0% ): 20 g/L CTAB, 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0 ), 1.4 mol/L NaCl,0.02 mol/L EDTA(pH 8.0)。

CTAB 沉淀液(0.5% ):5 g/L CTAB,40 mmol/L NaCl。

蛋白酶 K 溶液(20 mg/mL)。

NaCl 溶液(1.2 mol/L)。

三氯甲烷。

三氯甲烷 / 异戊醇(24 ：1，V/V)。

异丙醇。

70% 乙醇。

TE 缓冲液:10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),1 mmol/L EDTA 缓冲液(pH 8.0)。

10×PCR缓冲液：100 mmol/L KCl，160 mmol/L (NH4)2SO4, 20mmol/L MgSO4，200 mmol/L Tris-HCl (pH8.8)，1% Triton X-100，1 mg/ml BSA。如果具有等效的商品化试剂盒, 则可使用这些等效产品。

荧光 PCR 反应混合液:10 μL 反应体系包括:1 U ~ 2 U(unit, 酶学单位) 的 Taq 酶、1×PCR缓冲液、2.5 mmol/L ~ 4.0 mmol/L 的 Mg2+ 、0.2 mmol/L 的 d (A, C, G) TPs、0.2 mmol/L ~ 0.4 mmol/L dUTP、400 nmol/L ROX 染料 ( 某些荧光 PCR 仪不需要 ROX 校正 )。如果具有等效的商品化试剂盒, 则可使用这些等效产品。

普通PCR引物华支睾吸虫的 PCR 检测所用的引物序列见表1 。

1. 普通PCR引物序列

| 名称 | 序列 | 目的基因名称 |
| --- | --- | --- |
| 5’端引物 | 5’-TTGTCTGGGTAGGGTGGTTTG-3’ | 细胞色素c氧化酶亚基1 ( cox1 )基因 |
| 3’端引物 | 5’-ACTATCCCAGTAACCCCGCC-3’ |

实时荧光 PCR引物与探针: 华支睾吸虫的实时荧光 PCR 检测所用的引物和探针序列见表2

1. 实时荧光 PCR引物序列

| 名称 | 序列 | 目的基因名称 |
| --- | --- | --- |
| 5’端引物 | 5’-TATAGTTTGTCTGGGTAGGGTGGTT-3’ | 细胞色素c氧化酶亚基1 ( cox1 )基因 |
| 3’端引物 | 5’-AACAGCAGTCCCCAAATCCA-3’ |
| 探针 | 5’-FAM-AGCTCATCATATGTTTACTG-MGB-3’ |

* 1. 仪器和设备

实时荧光 PCR 仪。

离心机：离心力不小于 12 000 g。

离心管（1.5 mL，2.0 mL）。

核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。

微量移液器：2.5 μL、20 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL。

研钵或冷冻粉碎装置。

恒温水浴锅或干式恒温器。

天平：感量 0.01 g。

* 1. 检验步骤
     1. 用液氮充分研磨至糜状;或采用合适的冷冻粉碎均质装置对样品进行充分地研磨至糜状。
     2. 称取研磨后的样品 200 mg 于 2.0 mL 离心管中，加入 1.5 mL 2.0% CTAB 提取缓冲液和 10 μL 蛋白酶 K 溶液，65℃ 30 min, 期间每隔10min振荡混匀；12 000 g 离心 10 min，转移上清于洁净的离心管中。
     3. 加 750 μL 三氯甲烷 / 异戊醇，混匀，12 000 g 离心 5 min，转移上清液于洁净的离心管中
     4. 加 2 倍体积 CTAB 沉淀液，室温静止 60 min，12 000 g 离心 15 min，弃上清。
     5. 加入350 μL NaCl溶液将沉淀重悬浮。再加入 350 μL 三氯甲烷，旋涡振荡进行混匀，12 000 g 离心 10 min。
     6. 转移上清后加入 0.6 倍体积的异丙醇用来沉淀核酸，室温放置 20 min，12 000 g 离心 10 min，弃上清。
     7. 加入 500 μL 70% 乙醇洗涤一次，晾干。
     8. 加入 100 μL TE，溶解沉淀。立即使用或－ 20℃保存备用。也可以用等效的 DNA 提取方法提取 DNA 模版。
     9. 可使用等效的商品化 DNA 提取试剂盒，按操作说明书进行操作。
  2. DNA 的浓度和纯度测定

样品 DNA 使用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计测定260 nm 和280 nm 处的吸光值 A260 和A280。 DNA 的浓度按式(1) 进行计算:

()

式中：

c ——DNA 浓度, 单位为纳克每微升(ng/μL);

A ——260 nm 处的吸光值;

N ——核酸稀释倍数。

当 DNA 浓度高于10 ng/μL，A260/A280 比值在1.4~ 2.5 之间时，DNA 模板适宜于 PCR 扩增。

* 1. PCR 检测
     1. 普通PCR检测
        1. PCR反应

按表3配置25 μL反应体系：

1. PCR反应体系

| 成分 | 用量（μL） |
| --- | --- |
| 10×PCR buffer（Mg 2+） | 12.5 |
| 上游引物（25 pmol/μL ） | 1.0 |
| 下游引物（25 pmol/μL ） | 1.0 |
| Ex Taq DNA （5 U/μL ） | 1.0 |
| DNA模板 | 5.0 |
| ddH2O水 | 5.5 |

* + - 1. 扩增程序及反应条件

将PCR反应管置于PCR扩增仪，反应参数设置：

1. 第一阶段，94 ℃预变性2 min。
2. 第二阶段，94 ℃变性30 s、60 ℃退火30 s、72 ℃延伸30s，共30个循环。
3. 第三阶段，72 ℃延伸5 min，最后4℃保存。
   * + 1. PCR产物的电泳检测

用TAE电泳缓冲液配制成1%琼脂糖平板（溴化乙锭终浓度0.5 μg/mL）。将平板放入水平电泳槽中，加入1×TAE电泳缓冲液刚刚高出凝胶表面，将PCR扩增产物6 μL与6 μL上样缓冲液混合，分别加入样品孔中，取5 μL DNA Marker 100 bp加入到标准分子量对照孔内。5 V/cm恒压电泳30 min～45 min。

* + - 1. 结果判定

1. 用凝胶成像系统进行分析。阳性样品扩增一条大小为231 bp的特异性条带，阴性对照和空白对照应无该特异性条带；在阴性和阳性对照成立情况下，如被检样品无条带，则结果为阴性，如被检样品有条带，大小为231 bp，即判定为华支睾吸虫卵核酸阳性。必要时取PCR扩增产物进行序列测定，进一步确认待测样品的结果。
2. 如果出现与设计长度不同的条带，为非特异性反应，需重复试验，两次试验都为非特异性反应时，可判为阴性。

实时荧光PCR检测

* + - 1. 荧光PCR反应体系

按表4配置25 μL反应体系：

1. 荧光PCR反应体系

| 成分 | 用量（μL） |
| --- | --- |
| 2× 荧光定量 PCR 预混液 | 12.5 |
| 上游引物（10 μmol/L） | 1.0 |
| 下游引物（10 μmol/L） | 1.0 |
| 探针（10 μmol/L） | 1.0 |
| DNA模板 | 5.0 |
| ddH2O水 | 4.5 |

* + - 1. 荧光PCR反应参数

在检测区进行。将9.2.1中加样后的PCR管放入荧光PCR检测仪内，记录样本摆放顺序。反应参数设置：

1. 第一阶段，95 ℃ 30s。
2. 第二阶段，95 ℃ 5 s、60 ℃ 30 s（在此收集荧光），40个循环。

如试剂不同需要进行适当调整。

* + 1. 结果判定

9.3.1结果分析条件设定

读取检测结果。阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品扩增曲线的最高点，不同仪器可根据仪器噪音情况进行调整。

9.3.2质控标准

1. 阴性对照和空白对照无Ct值并且无扩增曲线。
2. 阳性对照样品有对数扩增曲线，而且Ct值≤32.0；
3. 如阴性对照和阳性对照条件不满足以上条件，此实验视为无效。

9.3.3结果判定

―― 阴性

无Ct值并且无扩增曲线，表明样品中无华支睾吸虫卵核酸，判定为华支睾吸虫卵核酸阴性。

―― 阳性

检验样本Ct≤35.0，扩增出特定的扩增曲线，报告华支睾吸虫核酸阳性。

检验样本35.0<Ct值≤40.0时，重复一次，如果Ct值仍然≤40.0时,并且曲线有明显的对数增长期，报告华支睾吸虫核酸阳性，否则报告华支睾吸虫核酸阴性。