



# 团 体 标 准

T/GDAAV 0611—2025

## 鹦鹉热衣原体超快速荧光 PCR 检测 技术规范

Technical Specification for Ultra-fast Real-time PCR Detection of  
*Chlamydia Psittaci*

2025-09-26 发布

2025-10-01 实施

广东省畜牧兽医学会 发布



## 目 次

前言 .....	II
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
3.1 超快速荧光 PCR .....	1
4 缩略语 .....	1
5 试剂和耗材 .....	1
5.1 试剂 .....	2
5.2 引物和探针 .....	2
6 仪器设备 .....	2
7 样品采集与处理 .....	2
7.1 生物安全措施 .....	2
7.2 样品采集 .....	2
7.3 样品前处理 .....	3
8 操作方法 .....	3
8.1 样品核酸提取 .....	3
8.2 反应体系的配制 .....	3
8.3 超快速荧光 PCR 反应 .....	4
9 质控标准与结果判定 .....	4
9.1 阈值设定 .....	4
9.2 质控标准 .....	4
9.3 结果判定 .....	4
附录 A 溶液配制 .....	5
附录 B pUC57-OmpA 重组质粒和内参的制备 .....	6
附录 C 鸚鵡热衣原体和内参引物、探针的名称、序列 .....	8
附录 D DNA 提取方法（磁珠法） .....	9

## 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。

本文件由东莞市动物疫病预防控制中心、广东省畜牧兽医学会提出。

本文件由广东省畜牧兽医学会归口。

主要起草单位：东莞市动物疫病预防控制中心、广东省动物疫病预防控制中心、超快生物技术（广州）有限公司、广东省疾病预防控制中心、广州市疾病预防控制中心、广东省农业科学院动物卫生研究所、深圳市动植物疫病预防控制中心、珠海市动物疫病预防控制中心、海南省疾病预防控制中心、广州国家实验室、东莞市洪梅镇农业技术服务中心、东莞市东坑镇农业技术服务中心。

主要起草人：张险朋、叶 健、刘雪怡、管知深、李柏生、吴新伟、曹 蓝、柯艳坤、曾 平、徐振娜、洪伟彬、陈 晶、李丹丹、李小军、张远龙、卢受昇、徐 强、吴智民、赖笑娴、曾瀚熙、王晓虎、韩 霄、林仰孝、卢伟昌、李 敏、谢柱彬、钟群芳、谭铭光、林梦哲。

# 鸚鵡热衣原体超快速荧光 PCR 检测技术规范

## 1 范围

本文件描述了鸚鵡热衣原体超快速荧光PCR检测方法。

本文件适用于哺乳动物、禽类和环境样品中鸚鵡热衣原体的检测。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过本文件的规范性引用而成为本文件必不可少的条款。其中，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 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

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1 超快速荧光 PCR ultra-fast Real-time PCR

一种基于快速温控模块技术（升降温速率40 °C/s以上），结合快速启动酶及高特异性预混反应体系所构建的高效核酸扩增检测方法，可在8min~15 min内完成45个循环反应。

## 4 缩略语

下列缩略语适合本文件。

PCR: 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction)

Ct值: 阈值循环数 (Cycle threshold)

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid)

F: 上游引物 (Forward primer)

R: 下游引物 (Reverse primer)

P: 探针 (Probe)

BHQ2: 黑洞淬灭剂2 (Black Hole Quencher 2)

FAM: 6-羧基荧光素 (6-Carboxyfluorescein)

MGB: Minor Groove Binder Quencher淬灭基团

Cy5: 近红外荧光染料 (Near-infrared fluorescent dyes 5)

PBS: 磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffer solution)

Cps: 鸚鵡热衣原体 (*Chlamydia psittaci*)

## 5 试剂和耗材

## 5.1 试剂

- 5.1.1 试验用水符合 GB/T 6682 二级水的要求。
- 5.1.2 PBS (pH 7.2) 配制方法见附录 A 中 A.1, 试剂药品采用分析纯。
- 5.1.3 阴性对照为灭菌生理盐水, 配制方法按照附录 A 中 A.2。
- 5.1.4 阳性对照为鸚鵡热衣原体 pUC57-*OmpA* 重组质粒, 制备方法见附录 B 中 B.1。
- 5.1.5 内参为健康猪肝脏 (不含鸚鵡热衣原体), 制备方法按照附录 B 中 B.3。
- 5.1.6 5×PCR buffer (含 Mg<sup>2+</sup>)。
- 5.1.7 dNTP。
- 5.1.8 快速启动聚合酶。
- 5.1.9 DNA 提取试剂盒。
- 5.1.10 超快速荧光 PCR 反应板。

## 5.2 引物和探针

超快速荧光 PCR 扩增 (鸚鵡热衣原体和内参) 上、下游引物和探针序列参见附录 C.1。

## 6 仪器设备

- 6.1 超快速荧光 PCR 仪。
- 6.2 移液器 (量程: 0.5 μL~10 μL、10 μL~100 μL、100 μL~1000 μL)。
- 6.3 生物样品均质器。
- 6.4 冷冻高速离心机。
- 6.5 II 级生物安全柜。
- 6.6 高压灭菌器。
- 6.7 pH 计。

## 7 样品采集与处理

### 7.1 生物安全措施

采样及样品前处理过程须戴一次性口罩、乳胶手套/丁腈手套、穿防护服, 样品不得交叉污染。实验室生物安全符合 GB 19489 规定。

### 7.2 样品采集

#### 7.2.1 采样工具

剪刀、镊子、棉拭子、离心管、2 mL 组织研磨管等无菌处理。

#### 7.2.2 待检样品

样品可包括动物内脏、排泄物、喉拭子、环境拭子。动物组织: 用75%酒精棉球对样品体表进行擦拭消毒后, 无菌操作取适量组织; 排泄物: 将无菌棉拭子伸入泄殖腔内旋转一圈并沾取少量粪便; 喉拭子: 将无菌棉拭子伸入喉头来回涂刮2次~3次, 取咽喉分泌液; 环境拭子: 将无菌拭子在待采样表面来回涂抹2次~3次, 采集环境样品; 所有拭子样本采集后应立即浸入装有50%甘油-PBS缓冲液的离心管中, 剪去或折断露出的拭子杆, 盖紧离心管盖, 密封后冷藏保存。

#### 7.2.3 样品运输

样品运输应符合 NY/T 541 的规定。

### 7.3 样品前处理

#### 7.3.1 环境拭子/排泄物/喉拭子前处理

将棉拭子充分震荡混匀，12000 r/min 离心 1 min，弃上清液，取沉淀物进行核酸提取并编号备用。

#### 7.3.2 组织样品前处理

取适量组织样品放入 2 mL 组织研磨管中，加入 1 mL PBS 溶液，用生物样品均质器 7000 r/min 进行 3 次匀浆，每次 20 s，间隔 20 s，制备成组织匀浆液。2000 r/min 离心处理 10 min，取 200  $\mu$ L 进行核酸提取并编号备用。

## 8 操作方法

### 8.1 样品核酸提取

样品前处理后，除了哺乳动物组织样品以外，其他类型样品均加入内参参与提取。在提取样品核酸时，取处理后的样品 160  $\mu$ L，加入内参 40  $\mu$ L。DNA 提取方法见附录 D，也可以采用经过验证的等效核酸提取方法。

### 8.2 反应体系的配制

每个样品检测反应体系配制见表1，总体积为50  $\mu$ L。配制完毕分装时应尽量避免产生气泡，加入超快速荧光PCR反应板中。反应体系试剂可采用经过验证的等效商品化试剂盒。

表 1 Cps 超快速荧光 PCR 反应体系配制表

反应体系组分		用量 ( $\mu$ L)
5 $\times$ PCR Buffer (含Mg <sup>2+</sup> )		10.00
快速启动聚合酶 (5U/ $\mu$ L)		4.00
dNTP (25mmol/L)		0.80
CPS	F1 (10 $\mu$ mol/L)	5.00
	R1 (10 $\mu$ mol/L)	5.00
	P1 (10 $\mu$ mol/L)	2.50
内参	F2 (10 $\mu$ mol/L)	2.00
	R2 (10 $\mu$ mol/L)	2.00
	P2 (10 $\mu$ mol/L)	1.00
模板		10.00

ddH <sub>2</sub> O	7.70
合计	50.00

### 8.3 超快速荧光 PCR 反应

#### 8.3.1 反应条件

95℃ 预变性, 1 min; 95℃ 变性 1 s, 60℃ 退火延伸 (收集荧光信号), 10 s (升降温速率 40 °C /s), 循环 45 次。

#### 8.3.2 荧光通道设定

鸚鵡热衣原体选择 FAM 通道; 内参选择 Cy5 通道。

## 9 质控标准与结果判定

### 9.1 阈值设定

阈值由超快速荧光 PCR 仪自动分析并设定。

### 9.2 质控标准

阳性对照 FAM 通道 (鸚鵡热衣原体) 和 Cy5 通道 (内参) 的 Ct 值 ≤ 30.0, 并出现典型的 “S” 型扩增曲线; 阴性对照 FAM 通道无 Ct 值或无典型扩增曲线, Cy5 通道 (内参) 的 Ct 值 ≤ 30.0, 并出现典型的 “S” 型扩增曲线。阳性对照和阴性对照同时成立可判定试验有效, 否则试验无效。

### 9.3 结果判定

9.3.1 FAM 通道无 Ct 值或无典型 “S” 型扩增曲线, Cy5 通道 Ct 值 ≤ 30.0, 判为鸚鵡热衣原体核酸阴性。

9.3.2 FAM 通道出现典型 “S” 型扩增曲线, 且 Ct 值 ≤ 35, Cy5 通道 Ct 值 ≤ 30.0 表示样品中鸚鵡热衣原体核酸阳性。

9.3.3 FAM 通道  $35 < Ct \text{ 值} < 45$  且有典型 “S” 型扩增曲线, Cy5 通道 Ct 值 ≤ 30.0, 判为可疑。结果为可疑时应用提取的核酸重新进行检测, 若重 FAM 通道无特异性扩增曲线或无 Ct 值或 Ct 值等于 45 则为鸚鵡热衣原体核酸阴性, 若 FAM 通道 Ct 值小于 45 且有典型 “S” 型扩增曲线则判为鸚鵡热衣原体核酸阳性。

9.3.4 如 Cy5 通道 Ct 值 > 30.0 或无 Ct 值, 则样品应重新检测, 重测如 Cy5 通道 Ct 值 ≤ 30.0 则结果可采用。

附 录 A  
(规范性)  
溶液配制

A.1 0.01mol/L PBS(pH7.2)溶液的配制

称取磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 3.0g, 磷酸氢二钾 ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 0.2g, 氯化钠 ( $\text{NaCl}$ ) 8g, 加二级水定容至1000 mL, 完全溶解后用3 mol/L NaOH调pH为7.2经 $121^\circ\text{C}$  ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ), 高压灭菌15min, 室温保存。

A.2 生理盐水的配制及灭菌

称取0.9g氯化钠, 加入蒸馏水溶解, 定容至100ml,  $121^\circ\text{C}$  ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ), 高压灭菌15min, 常温保存备用。

## 附录 B

(资料性)

### pUC57-*OmpA* 重组质粒和内参的制备

#### B.1 pUC57-*OmpA* 重组质粒的制备

扩增鸚鵡热衣原体 *OmpA* 基因序列片段，将扩增产物进行胶回收和双酶切后，连接至 pUC57 载体上，再转化至 DH5 $\alpha$  大肠杆菌感受态细胞中，得到重组质粒，提取重组质粒进行 PCR 检测和测序，鉴定为 pUC57-*OmpA* 重组质粒，质粒浓度约为  $3.702 \times 10^9$  copies/ $\mu$  L，将其稀释为工作浓度约  $3.702 \times 10^7$  copies/ $\mu$  L。

#### B.2 鸚鵡热衣原体 *OmpA* 基因序列 (GenBank 登录号: MK751471.1)

```
ATGAAAAA ACTCTTGAAATCGGCATTATTGTTTGCCGCTACGGGTTCCGCTCTCTCCTTACAAG
CCTTGCCTGTAGGGAACCCAGCTGAACCAAGTTTATTAATCGATGGCACTATGTGGGAAGGTGCTT
CAGGAGATCCTTGCATCCTTGCCTACTTGGTGTGACGCCATTAGCATCCGCGCAGGATACTACG
GAGATTATGTTTTCGATCGTGTATTA AAAAGTTGATGTGAATAAAACTTTTAGCGGCATGGCTGCAGC
TCCTACCCAGGCTACAGGTAACGCAAGTAATACTAATCAGCCAGAAGCAAATGGCAGACCCGAACA
TCGCTTACGGAAGGCATATGCAAGATGCAGAGTGGTTTTCAAATGCAGCCTTCCTAGCCTTAAACA
TTTGGGATCGCTTCGACATTTTCTGCACCTTAGGGGCATCCAATGGATACTTCAAAGCAAGTTTCGCC
TGCATTCAACTTGGTTGGGTTAAAAGGGTTTTTCAGCTACAAGCTCAATCTCTACCGATCTTCCAAC
GCAACTTCCTAACGTAGGCATTACCCAAGGTGTTGTGGAATTTTATAACAGACACATCATTTTCTTGG
AGCGTAGGTGCACGTGGAGCTTTATGGGAATGTGGTTGTGCAACTTTAGGAGCTGAGTTCCAATAC
GCTCAATCTAATCCTAAGATTGAAATGCTCAACGTCACCTTCAAGCCCAGCACAATTTGTGATTAC
AAACCAAGAGGCTATAAAGGAGCTAGCTCGAATTTTCTTTACCTATAACGGCTGGAACAACAGAA
GCTACAGACACCAAATCAGCTACAATTAATACCATGAATGGCAAGTAGGCCTCGCCCTGTCTTAC
AGATTGAATATGCTTGTTCATATATTGGCGTAAACTGGTCAAGAGCAACTTTTGTGCTGATACTAT
CCGCATTGCTCAACCTAAATTA AAAATCGGAGATTCTTAACATTACTACATGGAACCCAAGCCTTATA
GGATCAACCACTGCTTTGCCCAATAATGCTGGTAAGGATGTTCTATCTGATGTCTTGCAAATTGCTT
CGATTGATCAACAAAATGAAGTCTAGAAAAGCTTGTGGTGTAGCTGTTGGTGC AACGTTAATCG
ACGCTGACAAATGGTCAATCACTGGTGAAGCACGCTTAATCAATGAAAGAGCTGCTCACATGAAT
GCTCAATTCAGATTCTAA
```

#### B.3 内参的制备

取绿豆大小的健康猪肝脏（不含鸚鵡热衣原体）（约0.2g）置于研磨管内，加入1 mL PBS溶液匀浆（速度7 200 r/min；匀浆4次，每次15 s，每次间隔30 s），离心后备用。

#### B.4 管家基因 $\beta$ -actin 基因序列 (NCBI 序列号: NM\_001195845.3)

```
ATGGATGACGATATCGCTGCGCTTGTGGTCGACAACGGCTCCGGCATGTGCAAGGCCGGCTT
CGCAGGCGACGACGCCCCCGGGCCGTCTTCCCTCCATCGTGGGGCGCCCCCGGCACCAGGGC
GTGATGGTGGGCATGGGCCAGAAGGACTCCTACGTGGGCGATGAGGCCAGAGCAAGAGGGGC
ATCCTGACCCTGAAGTACCCATTGAGCACGGCATCGTCACCAACTGGGACGACATGGAGAAGA
```

TCTGGCACCACACCTTCTACAACGAGCTGCGCGTGGCCCCGAGGAGCACCCGGTGCTGCTGACC  
GAGGCCCCCTGAACCCCAAGGCCAACCGTGAGAAGATGACCCAGATCATGTTTCGAGACTTTCA  
ACACCCAGCCATGTACGTGGCCATCCAGGCTGTGCTGTCCCTGTACGCCTCTGGCCGCACCACT  
GGCATCGTGATGGACTCCGGTGACGGGGTCACCCACACGGTGCCCATCTATGAGGGGTACGCCCT  
CCCCATGCCATCTTGCGTCTGGACCTGGCTGGCCGGGACCTGACCGACTACCTCATGAAGATCC  
TCACGGAGCGTGGCTACAGCTTCACCACCACCGCCGAGCGGGAAATCGTGCGTGACATCAAGGA  
GAAGCTGTGTTATGTGGCCCTGGACTTCGAGCAGGAGATGGCCACCGCGGCCTCCAGCTCCTCCC  
TGGAGAAGAGCTATGAGCTGCCCCGACGGGCAGGTCATCACTATTGGCAACGAGCGGTTCCGCTG  
CCCAGAGGCTCTCTTCCAGCCTTCCTTCCTGGGCATGGAATCCTGCGGCATCCATGAAACTACCTT  
CAACTCCATCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGCAAGGACCTCTATGCCAACACAGTGCTGTCTG  
GTGGAACCACCATGTACCCTGGCATCGCTGACAGGATGCAGAAGGAGATCACTGCCCTGGCACC  
CAGACAATGAAGATCAAGATCATCGCACCCCCTGAGCGCAAGTACTCTGTGTGGATTGGGGGC  
TCCATCCTGGCCTCACTGTCCACCTTCAGCAAATGTGGATCAGCAAGCAGGAGTACGACGAGTC  
CGGCCCTCCATCGTCCACCGCAAATGCTTCTAG

## 附录 C

(规范性)

## 鸚鵡热衣原体和内参引物、探针的名称、序列

## C.1 鸚鵡热衣原体和内参引物、探针的名称、序列

表 C.1 列出了 Cps 超快速荧光 PCR 引物、探针

表 C.1 鸚鵡热衣原体和内参引物、探针的名称、序列

名称	序列 (5'—3')
Cps-F	CGCTTACGGAAGGCATAT
Cps-R	TGGAAGATCGGTAGAGATTG
Cps-P	FAM-ATGCAGCCTTCCTAGCCTTAAACA-MGB
$\beta$ -actin-F	AGTCCGCCTAGAAGCATTG
$\beta$ -actin-R	TGTCCACCTTCCAGCAGATG
$\beta$ -actin-P	Cy5-AGTCCGGCCCCTCCATCGTCCA-BHQ2

## 附 录 D

(资料性)

### DNA 提取方法 (磁珠法)

D.1 取阳性对照、阴性对照和经过处理的样品200 $\mu$ L, 直接加入装有715 $\mu$ L裂解液管中, 漩涡混匀5s, 室温静置10min使样品充分裂解, 转移离心管至磁力架上, 静置30s, 磁珠完全吸附后吸弃上清液, 将离心管从磁力架上取下。

D.2 加洗涤液700  $\mu$ L至裂解液管中, 振荡混匀30 s, 转移离心管至磁力架上, 静置30 s, 磁珠完全吸附后, 吸取上清液并弃除, 将离心管从磁力架上取下。

D.3 短暂离心收集管壁上的液滴, 转移离心管至磁力架上, 磁珠完全吸附后, 吸取上清液并弃除。

D.4 打开离心管盖, 室温干燥3min晾干磁珠, 将离心管从磁力架上取下。

D.5 加洗脱液100  $\mu$ L至裂解液管中, 振荡混匀, 转移裂解液管至磁力架上, 静置1 min, 磁珠完全吸附后小心将DNA溶液转移至一个新离心管中, 应尽快用于下游试验, 如不能立即使用, 应置于-20 $^{\circ}$ C储存。

---