

DB45

广西壮族自治区地方标准

DB 45/T 1506—2017

牛支原体的检测 多重聚合酶链反应法

Detection of mycoplasma bovis by multi-polymerase chain reaction

2017 - 04 - 15 发布

2017 - 05 - 15 实施

广西壮族自治区质量技术监督局 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
4 生物安全措施	2
5 防污染措施	2
6 试剂、仪器及耗材	2
7 检测程序	3
8 结果判定	4
附录 A（资料性附录） 特异性引物序列及检测结果凝胶电泳图示	5
附录 B（资料性附录） 其他试剂的配制	7
附录 C（资料性附录） 溴化乙锭溶液及废弃溴化乙锭接触物的净化处理	8

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准的某些内容可能涉及专利，本标准的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准起草单位：广西壮族自治区兽医研究所。

本标准主要起草人：李军、彭昊、杨威、潘艳、陈泽祥、陶立、冯世文、韦志锋、许力干、马春霞、兰美益、秦若甫、谢永平。

牛支原体的检测 多重聚合酶链反应法

1 范围

本标准规定了多重聚合酶链反应法 (Multi-PCR) 检测牛支原体的术语和定义、生物安全措施、防污染措施、试剂、仪器及耗材、检测程序、结果判定。

本标准适用于牛支原体的检测。

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

NY/T 541 动物疫病实验室检验采样方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

牛支原体 *Mycoplasma bovis*, *M. bovis*

是感染并引起牛的肺炎、关节炎、乳房炎、角膜结膜炎、耳炎、生殖道炎、流产与不孕等多种疾病的一种类似细菌但不具有细胞壁的原核微生物。

3.2

聚合酶链式反应 *polymerase chain reaction*, PCR

又称特异性DNA序列体外引物定向酶促扩增技术, 简称PCR技术, 是模板DNA在引物和4种脱氧核糖核苷酸及Mg²⁺存在的条件下, 依赖于Taq DNA聚合酶的酶促反应。

3.3

多重聚合酶链反应 *multiplex polymerase chain reaction*, Multi-PCR

简称Multi-PCR, 是PCR技术的一种特殊形式。Multi-PCR技术是在同一PCR反应体系里加入两对或两对以上引物, 同时扩增出多个核酸片段的PCR反应。

3.4

引物 *primer*

与待扩增 DNA 片段两端互补的一段寡核苷酸。

3.5

特异性引物 *specific primer*

针对特定模板DNA片段设计的一段互补寡核苷酸, 在PCR反应中与模板DNA特异性结合。

4 生物安全措施

实验室人员的安全，应在具备生物安全操作条件的实验室（兽医生物安全二级及以上实验室）以及相应资质的工作人员检测牛支原体，所有培养物和废弃物应按照GB 19489中的要求进行。

5 防污染措施

应按照NY/T 541的规定执行。

6 试剂、仪器及耗材

6.1 试剂

6.1.1 特异性引物

牛支原体、无乳支原体扩增目的片段大小分别为448 bp、375 bp，引物使用浓度为 25 mmol/L。引物序列见附录A中的1。使用前用灭菌双蒸水稀释，然后分装成小剂量置于-20 °C 保存备用。

6.1.2 基因组提取试剂盒

细菌基因组提取试剂盒。

6.1.3 PCR 试剂

2× *Taq* PCR Master Mix。

6.1.4 电泳试剂

10 mg/mL 溴化乙锭

1× Tris-硼酸电泳缓冲液。

6.1.5 其它试剂

除另有规定外，试剂为分析纯或生化试剂，水为灭菌双蒸水。其它试剂如下：

——灭菌双蒸水：纯度至少为分析纯以上；

——双抗。

6.1.6 其他试剂配制方法

试剂配制方法参见附录 B。

6.2 仪器

本方法使用下列仪器设备：

——PCR 仪；

——电泳仪：输出直流电压 0 V~600 V；

——电泳槽；

——紫外光透射仪或凝胶成像系统；

——小型高速离心机：转速 12 000 r/min 及以上；

——冰箱：-20 °C；

- 旋涡振荡器；
- 烧杯；
- 微量加样器：100 μL ~1 000 μL 、20 μL ~200 μL 、10 μL ~100 μL 、0.5 μL ~10 μL 等多种规格。

6.3 一次性耗材

本方法使用下列一次性耗材：

- 一次性手套；
- 离心管：1.5 mL；
- PCR 反应管：0.2 mL；
- 吸头：1 000 μL 、200 μL 、10 μL 等多种规格。

7 检测程序

7.1 待检样品处理

取1 g~5 g待检病料样品（肺脏、关节液和鼻拭子）用含双抗的双蒸水浸泡后研磨，置灭菌烧杯充分搅匀，然后取0.5 g~1 g至1.5 mL离心管中供DNA提取或置-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

7.2 待检样品 DNA 提取

将7.1处理过的病料样品反复冻融处理三次后，按基因组DNA提取说明书提取模板DNA，获得50 μL DNA。所提取的模板DNA，直接放入PCR管中进行后续反应或置-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

7.3 多重 PCR 检测

在冰浴条件下，在PCR反应管中按总体积为25 μL ，分别加入2 \times Taq PCR Master Mix 12.5 μL ；牛支原体上、下游引物（见附录A中1的M. bovie P1和M. bovie P2）各1 μL ；无乳支原体上、下游引物（见附录A中1的M. agalactiae P1和M. agalactiae P2）各1 μL ；待检样品DNA 3 μL ，用灭菌双蒸水定容到25 μL ；。加完试剂后瞬时离心混匀。

将PCR反应管置于PCR仪内，按如下程序进行PCR反应：95 $^{\circ}\text{C}$ 4 min；然后进入95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，55 $^{\circ}\text{C}$ 40 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s的连续30次循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min；4 $^{\circ}\text{C}$ 结束扩增。PCR产物直接进行琼脂糖凝胶电泳分析或置-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

7.4 阳性及阴性对照

7.4.1 阳性对照

用牛支原体和无乳支原体作为阳性对照，DNA提取程序按照7.2进行，多重PCR检测程序按照7.3进行。

7.4.2 阴性对照

用灭菌双蒸水作为阴性对照，多重PCR检测程序按照7.3进行。

7.5 电泳

7.5.1 制胶

制备1.5%琼脂糖凝胶板，将琼脂糖溶液倒入灌胶盒中，在卡口位置插上梳子。灌胶前要确保灌胶盒放置在水平面上。凝胶厚度一般在3 mm~5 mm之间。凝胶配方见附录B.1。

7.5.2 加样

将10 μ L PCR产物，加至琼脂糖凝胶板样品孔中。同时设置标准DNA分子量对照。

7.5.3 电泳条件

以 5 V/cm 凝胶长稳压电泳，直至溴酚蓝指示剂到达离琼脂糖凝胶末端 2 cm~3 cm 时停止。

7.5.4 废弃物处理

废弃的溴化乙锭或含溴化乙锭的电泳液、凝胶等要集中回收处理，按照附录C的方法处理。

8 结果判定

每次检测应设置阳性与阴性对照。结果判定时，应在阳性与阴性对照结果均正确时才能进行受检样本的结果判断。结果判定规则如下：

- 若样品按照牛支原体双重 PCR 体系扩增后的产物在 448 bp、375 bp 位置出现特异性条带，判定为牛支原体阳性、无乳支原体阳性；在 448 bp、375 bp 位置均未出现特异性条带，判定为牛支原体阴性、无乳支原体阴性；
- 若样品在 448 bp 位置出现特异性条带，而在 375 bp 位置未出现特异性条带，判定为牛支原体阳性、无乳支原体阴性；
- 若样品在 375 bp 位置出现特异性条带，而在 448 bp 位置未出现特异性条带，判定为牛支原体阴性、无乳支原体阳性。检果凝胶电泳图见附录 A。

附录 A
(资料性附录)

特异性引物序列及检测结果凝胶电泳图示

A.1 特异性引物序列

A.1.1 牛支原体特异性引物

A.1.1.1 *M. bovie*引物核苷酸序列

M. bovie P1: 5' - CGTTATGCAAGATTAAATACTTACGAC -3'

M. bovie P2: 5' - TGAAAACCTTCTCAGCATTAGCC -3'

A.1.1.2 引物扩增的目的基因

opp D/F基因。

A.1.2 无乳支原体特异性引物

A.1.2.1 *M. agalactiae*引物核苷酸序列

M. agalactiae P1: 5' - AAAGGTGCTTGAGAAATGGC -3'

M. agalactiae P2: 5' - GTTGCAGAAGAAAGTCCAATCA -3'

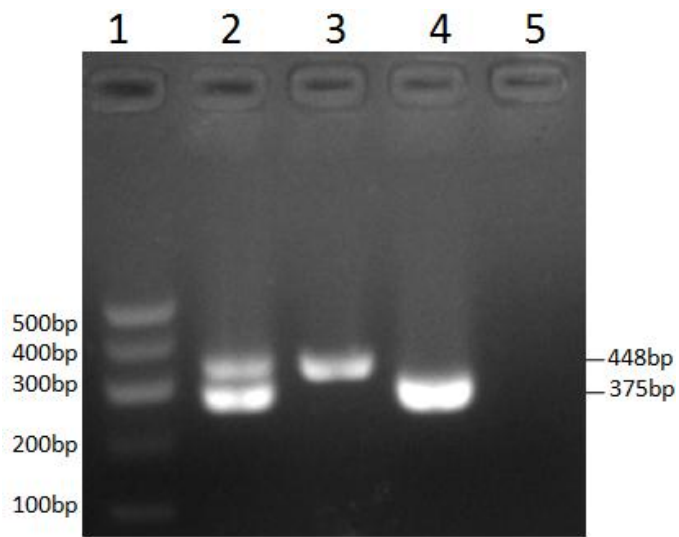
A.1.2.2 引物扩增的目的基因

P 80/F基因。

A.2 多重PCR 检测结果凝胶电泳图示

多重 PCR 检测结果凝胶电泳图如图 A.1 所示。





注1: 1. 标准 DNA 分子量 (DNA marker I) ; 2. 牛支原体 (+), 无乳支原体 (+); 3. 牛支原体 (+), 无乳支原体 (-); 4. 牛支原体 (-), 无乳支原体 (+); 5. 牛支原体 (-), 无乳支原体 (-)。

注2: “+”表示检测结果为阳性; “-”表示检测结果为阴性。

图A.1 多重 PCR 检测结果琼脂糖凝胶电泳图

附录 B
(资料性附录)
其他试剂的配制

B.1 1.5% 琼脂糖的制备

称取琼脂糖1.5 g；再用1 × Tris-硼酸电泳缓冲液定容至100 mL。

B.2 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 的配制

0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 按下列方法进行配制：

在800 mL 双蒸水中加入186.1 g EDTA-Na₂·2H₂O，在磁力搅拌器上剧烈搅拌，用氢氧化钠溶液调节 pH 值至8.0，然后定容至1 000 mL，分装后1.034×10⁵ Pa 高压灭菌30 min。室温保存。

B.3 10 mg/mL 溴化乙锭的配制

10 mg/mL 溴化乙锭按下列方法进行配制：

取1.0 g 溴化乙锭，加入双蒸水定容至100 mL，用铝箔包裹容器，磁力搅拌数小时以确保其完全溶解，然后移至棕色瓶中，室温保存。

注：溴化乙锭是强诱变剂，并有中度毒性，使用含有这种染料的溶液时应戴上手套，称量染料时应戴面罩。

B.4 Tris-硼酸电泳缓冲液的配制

B.4.1 5 × Tris-硼酸电泳缓冲液的配制

5 × Tris-硼酸电泳缓冲液按下列方法进行配制：

- Tris：54.0 g；
- 硼酸：27.5 g；
- 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)：20 mL；
- 双蒸水：定容至1 000 mL。

B.4.2 1 × Tris-硼酸电泳缓冲液的配制

1 × Tris-硼酸电泳缓冲液按下列方法进行配制：

- 5 × Tris-硼酸电泳缓冲液：100 mL；
- 双蒸水：400 mL。

注：本附录所用试剂均为分析纯 (AR) 产品。

附 录 C

(资料性附录)

溴化乙锭溶液及废弃溴化乙锭接触物的净化处理

C.1 浓度高于 0.5 mg/mL 的溴化乙锭溶液的净化处理

将溴化乙锭溶液用水稀释至浓度低于 0.5 mg/mL，加入 1 倍体积的 0.5 mol/L KMnO_4 ，混匀，再加入等量的 25 mol/L HCl ，混匀，置室温数小时，最后加入 1 倍体积的 2.5 mol/L NaOH ，混匀并废弃。

C.2 浓度低于 0.5 mg/mL 溴化乙锭溶液的净化处理

按 1 mg/mL 的量加入活性炭，室温放置 1 h，不时轻摇混匀。用滤纸过滤溶液，丢弃溶液，并将活性炭与滤纸密封后焚化处理

C.3 废弃溴化乙锭接触物的净化处理

回收至黑色的玻璃瓶中，进行无害化处理。

中华人民共和国广西地方标准

牛支原体的检测 多重聚合酶链反应法

DB45/T 1506—2017

广西壮族自治区质量技术监督局统一印刷

版权专有 侵权必究