

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1467—2007

奶牛布鲁氏菌病 PCR 诊断技术

PCR for diagnosis of brucellosis in dairy cattle

2007-12-18 发布

2008-03-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

目前,我国家畜布鲁氏菌病的诊断主要方法包括虎红平板凝集试验、试管凝集试验、补体结合试验、乳牛全乳环状试验等血清学方法(GB/T 18646 - 2002),没有列入病原诊断的内容。对牛布鲁氏菌病的诊断,OIE 推荐或指定的血清学诊断方法包括血清凝集试验(SAT)、补体结合试验(CFT)、酶联免疫吸附试验(ELISA);病原诊断采用常规病原分离鉴定技术,并认为 PCR 方法的建立为该病的诊断提供了新的检测手段,可标准化后推广使用。

本标准的附录 A 为资料性附录,附录 B 为规范性附录,附录 C 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:中国农业科学院兰州兽医研究所

本标准主要起草人:邱昌庆、曹小安、周继章。

奶牛布鲁氏菌病 PCR 诊断技术

1 范围

本标准规定了检测牛种布鲁氏菌(*B. abortus*)套式聚合酶链反应诊断方法要求。

本标准适用于奶牛布鲁氏菌病的病原诊断、奶牛场检疫、疫情监测和流行病学调查。其他偶蹄动物布鲁氏菌病 PCR 诊断可参照本标准。

2 材料准备

2.1 器材:PCR 扩增仪、1.5 mL 离心管、2.0 mL 离心管、0.2 mL PCR 反应管、水浴箱、台式高速温控离心机、电泳仪、移液器、移液器吸管、紫外凝胶成像仪、冰箱。

2.2 试剂:NET 缓冲液,自配,配方见附录 A;Rnase A 酶、蛋白酶 K、*Taq* DNA 聚合酶、PCR 缓冲液、dNTPs、DL 2000 DNA 分子质量标准、无水乙醇、酚—氯仿—异戊醇(25:24:1)、Tris、琼脂糖、EDTA、冰乙酸、氯化钠、溴酚蓝、二甲基苯青 FF、溴化乙锭、十二烷基硫酸钠(SDS)、乙酸钠、盐酸、聚蔗糖。

2.3 引物:

Bp1 5'-CGT GCC GCA ATT ACC CTC-3'

Bp2 5'-CCG TCA GCT TGG CTT CGA-3'

Bp3 5'-GAT GCT GCC CGC CCG ATAA-3'

Bp4 5'-GCA CCG AGC GAG CCT TGA AA-3'

引物在使用时用灭菌双蒸水稀释为 50 pmol/L。

2.4 被检材料:奶牛新鲜原乳、流产母牛乳汁、流产母牛阴道分泌物、血液(血清)、流产胎儿胃液、种公牛精液。布鲁氏菌病疑似病例病料采集和运输注意事项见附录 B。

2.5 布鲁氏菌总 DNA 的提取。

2.5.1 原乳乳样中布鲁氏菌总 DNA 的提取方法。

2.5.1.1 在室温下溶解冻存乳样(乳样长期保存应置于一20℃,当日检测可置于4℃),取 500 μL 奶样于 2 mL 离心管中,加入 100 μL NET 缓冲液。

2.5.1.2 加入 100 μL 20% 的 SDS(终浓度 3.4%),混匀。在 95℃~100℃孵育 10 min 后,迅速放置于冰上冷却 10 min~15 min。

2.5.1.3 在样品中加入 Rnase A 酶至终浓度为 75 μg/μL,50℃作用 2 h。然后加入蛋白酶 K 至终浓度为 325 μg/μL,50℃作用 2 h。

2.5.1.4 在消化液中加入等体积的酚—氯仿—异戊醇(25:24:1),颠倒 2 次~3 次,摇匀,4℃下 7 000 r/min 离心 10 min。

2.5.1.5 移上清液于另一离心管中。

2.5.1.6 重复 2.5.1.4、2.5.1.5 操作过程,加入 2.5 倍体积的预冷无水乙醇,-20℃沉淀 30 min,12 000 r/min 离心 10 min,弃去所有液相。

2.5.1.7 用 1 mL 70% 乙醇漂洗,12 000 r/min 离心 2 min,重复 2 次~3 次。

2.5.1.8 真空或室温干燥,DNA 沉淀物用 25 μL 无菌双蒸水溶解作为模板,保存在-20℃备用。

2.5.2 血液中布鲁氏菌总 DNA 的提取。

2.5.2.1 血液分离血清。

2.5.2.2 布鲁氏菌总 DNA 的提取方法同 2.5.1。

2.5.3 胃液中布鲁氏菌总 DNA 的提取

胃液中布鲁氏菌总 DNA 的提取方法同 2.5.1。

2.5.4 流产母牛阴道分泌物中布鲁氏菌总 DNA 的提取

2.5.4.1 用 NET 缓冲液 2 mL 冲洗棉签蘸取的流产母牛阴道分泌物。

2.5.4.2 牛阴道分泌物中布鲁氏菌总 DNA 的提取方法同 2.5.1。

2.5.5 流产胎衣中布鲁氏菌总 DNA 的提取

2.5.5.1 取病变明显的一小块流产胎衣剪碎或刮下黏膜层,将碎组织块或黏膜层置于 2 mL 离心管中,加入 400 μ L NET 裂解缓冲液(pH 7.6)。

2.5.5.2 胎衣中布鲁氏菌总 DNA 的提取方法同 2.5.1。

2.5.6 公牛精液中布鲁氏菌总 DNA 的提取

2.5.6.1 取 100 μ L 精液,加入 500 μ L NET 裂解缓冲液(pH 7.6)。

2.5.6.2 公牛精液中布鲁氏菌总 DNA 的提取方法同 2.5.1。

3 PCR 试验

3.1 反应体系

第一次 PCR 扩增:

10 \times PCR buffer(含 Mg^{2+})	5 μ L
脱氧三磷酸核苷酸混合液(dNTPs)	4 μ L
BP1 和 BP2 引物	各 1 μ L
模板(被检样品总 DNA)	4 μ L
无菌双蒸水	34.75 μ L
Taq DNA 聚合酶	0.25 μ L

第二次 PCR 扩增:

10 \times PCR buffer(含 Mg^{2+})	5 μ L
dNTPs	4 μ L
BP3 和 BP4 引物	各 1 μ L
模板(一扩产物)	2 μ L
无菌双蒸水	36.75 μ L
Taq DNA 聚合酶	0.25 μ L

样品检测时,同时要设阳性对照和空白对照,阳性对照模板为布鲁氏菌 omp25 阳性质粒,空白对照为双蒸水。

3.2 反应程序

第一次 PCR 扩增:首先 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min,然后 35 个循环,分别为:94 $^{\circ}$ C 变性 1 min;49 $^{\circ}$ C 退火 1 min;72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min。最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

第二次 PCR 扩增:20 个循环,分别为:94 $^{\circ}$ C 变性 30 s;51 $^{\circ}$ C 退火 1 min;72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min。最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 6 min。

3.3 电泳

3.3.1 制板

1%琼脂糖凝胶板的配方和制备,将 1 g 琼脂糖放入 100 mL TAE 电泳缓冲液中,加热融化。温度降至 60 $^{\circ}$ C 左右时,加入 10 mg/mL 溴化乙锭(EB)3 μ L~5 μ L,均匀铺板,厚度为 3 mm~5 mm。

3.3.2 加样

PCR 反应结束,取第二次扩增产物各 5 μ L(包括被检样品、阳性对照、空白对照)、DL 2000 DNA 分子质量标准 5 μ L、上样缓冲液 1 μ L 进行琼脂糖凝胶电泳。

3.3.3 电泳条件

凝胶电泳的条件和操作同常规。

3.3.4 胶成像仪观察

扩增产物电泳结束后,用凝胶成像仪观察检测结果、拍照,记录试验结果。

4 PCR 试验结果判定

4.1 将扩增产物电泳后用凝胶成像仪观察,DNA 分子质量标准、阳性对照、空白对照为如下结果时试验方成立,否则应重新试验。

DL 2000 DNA 分子质量标准(Marker)电泳道,从上到下依次出现 2 000 bp、1 000 bp、750 bp、500 bp、250 bp、100 bp 6 条清晰的带。

阳性对照电泳道出现一条 419 bp 清晰的带。

空白对照电泳道不出现任何带。

4.2 被检样品结果判定

在同一块凝胶板上电泳后,当 DNA 分子质量标准、各组对照同时成立时,被检样品电泳道出现一条 419 bp 的带,判为阳性(+);被检样品电泳道没有出现大小为 419 bp 的带,判为阴性(-)。结果判定参见附录 C 图 1。

附 录 A

(资料性附录)

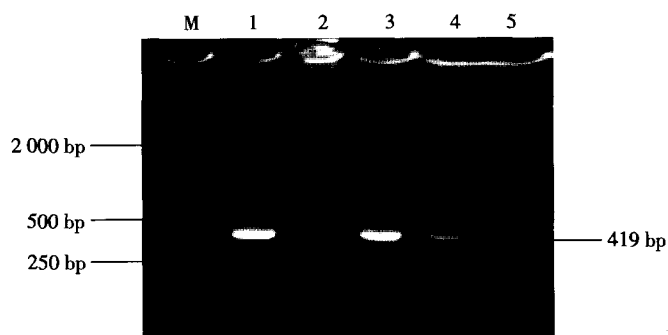
NET 缓冲液(pH 7.6)配方

Tris - HCl	50 mmol/L
EDTA	125 mmol/L
NaCl	50 mmol/L

附录 B**(规范性附录)****布鲁氏菌病疑似病例病料采集和运输注意事项**

- B.1** 法律依据:《中华人民共和国动物防疫法》、《病原微生物实验室生物安全管理条例》、《动物检疫管理办法》、《国家动物疫情测报体系管理规范》。
- B.2** 怀孕奶牛发生流产,一律先按布鲁氏菌病疑似病例对待采样。
- B.3** 现场采样的工作人员要穿工作服和胶鞋、戴上口罩、防风眼镜和一次性塑料手套或乳胶手套,做好个人安全防护。
- B.4** 采病料用的工具,手术刀、剪、镊子分别包装并提前干烤消毒,灭菌的加盖塑料管,灭菌的塑料袋,一次性注射器、灭菌棉签、胶布,胶带,记号笔,保温桶。使用前要仔细检查塑料管、消毒的塑料袋,有破损者不得使用。
- B.5** 病料采集:用一次性注射器抽取流产胎儿的胃液 5 mL~8 mL;用手术刀、剪、镊子采病变明显的流产胎衣 2 cm×2 cm 两份;用消毒棉签蘸取流产母牛阴道分泌物或排出物取样两份;用一次性注射器采取流产母牛静脉血 3 mL 两份;采流产母牛乳汁 5 mL~10 mL 两份。一份病料放入一只塑料管,盖好盖子,胶布封口,在塑料管壁记录畜种、编号、病料名、采样时间,然后将同一头牛的各种病料塑料管放入一个塑料袋封口,在塑料袋上同样记录畜种、编号、病料名、采样时间。将装有病料的塑料管竖直口朝上和冰袋一块放入保温桶,盖好盖子,胶带封口。派车专程送往有条件的实验室进行布鲁氏菌 PCR 检测。检测完成后,要及时无害化处理。阳性病料放入密封袋中,登记后冻存在专用柜中,备复检。
- B.6** 在运送病料的过程,装病料的保温桶不得倾倒,以防液体外溢。到达目的地后,对车体应全面消毒。
- B.7** 现场采完病料,立即无害化处理胎衣、流产胎儿,现场要用 2%烧碱溶液或其他有效的消毒剂彻底消毒。将流产母牛隔离,由专人饲养,待检测结果出来后,再做进一步处理。如果确诊为布鲁氏菌病,要按相关规定淘汰流产母牛。同时,禁止该畜群外调,并对整个牛群进行布鲁氏菌病检疫,逐头检测,淘汰阳性牛只,半年复检一次,直到全部阴性。
- B.8** 种公牛每次鲜精采集后的处理分装,应在生物安全柜或生物安全实验室内进行,以防污染,然后随机取两份样品,密封、登记,送往有条件的实验室用 PCR 方法进行布鲁氏菌检测。检测完成后,要及时无害化处理。阳性精液放入密封袋中,登记后冻存在专用柜中,备复检。

附录 C
(规范性附录)
样品检测结果判定图



M. DL 2000marker

1. 阳性对照

2. 阴性对照

3、4. 为检出的阳性样品

5. 检出的阴性样品

图 1 奶样 PCR 检测结果电泳图