

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2417—2013

副猪嗜血杆菌PCR检测方法

Polymerase chain reaction (PCR) for detection of
Haemophilus parasuis

2013-09-10 发布

2014-01-01 实施

中华人民共和国农业部 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。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:中国农业科学院兰州兽医研究所。

本标准主要起草人:逯忠新、贺英、储岳峰、赵萍、高鹏程。

副猪嗜血杆菌 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了检测副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*, HPS)的聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)技术。

本标准适用于副猪嗜血杆菌病的病原学检测。

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(配制方法参见 A. 1)、TAE 电泳缓冲液(配制方法参见 A. 2)、RNase A 酶、蛋白酶 K、Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)、 $10\times$ PCR 缓冲液(含 Mg^{2+})、脱氧三磷酸核苷酸混合液(dNTPs, 各 2.5 mmol/ μ L)、125 bpDNA 分子质量标准、无水乙醇、酚—氯仿—异戊醇(25:24:1)、三羟甲基氨基甲烷(Tris 碱)、琼脂糖、乙二胺四乙酸二钠(Na_2EDTA)、冰醋酸、氯化钠、溴酚蓝、溴化乙锭、十二烷基硫酸钠(SDS)、灭菌超纯水。

2.3 引物

引物序列:F1:5'-TAT CGG GAG ATG AAA GAC-3';F2:5'-GTA ATG TCT AAG GAC TAG-3';Revx:5'-CCT CGC GGC TTC GTC-3'。引物在使用时用灭菌超纯水稀释为 20 μ mol/L。靶基因片段序列及引物在靶基因中的位置参见 A. 3。

2.4 样品采集

2.4.1 气管分泌物

用灭菌棉拭子蘸取气管分泌物,放入无菌试管中。

2.4.2 肺脏

无菌采集肺脏病变部位或病变/非病变部位交界处的样品。

2.4.3 关节液

若有关节囊肿,在囊肿部位表面常规碘酊消毒,用 2 mL 或 5 mL 灭菌注射器穿刺,无菌吸取 1 mL~2 mL 关节渗出液。

2.4.4 采集的样品

应在 4℃ 条件下立即送到实验室。

2.5 DNA 提取

2.5.1 样品处理

2.5.1.1 气管分泌物拭子

将每支拭子浸入 1 mL~2 mL NET 缓冲液中 30 min,反复挤压。将浸出液经 4℃ 7 500 g 离心 15 min 后,弃上清。收集沉淀,用 1 mL NET 缓冲液重悬。

2.5.1.2 肺组织

将肺组织样品剪碎,按 1 g 加入 0.9 mL NET 缓冲液研磨后,用双层灭菌纱布过滤。收集过滤液于 2 mL 灭菌离心管,4℃ 7 500 g 离心 15 min,弃上清。收集沉淀,用 1 mL NET 缓冲液重悬。

2.5.1.3 关节液

将 500 μL 关节液和 500 μL NET 缓冲液等体积混匀后,4 $^{\circ}\text{C}$ 7 500 g 离心 20 min,弃上清,收集沉淀,用 1 mL NET 缓冲液重悬。

2.5.2 DNA 的提取方法

2.5.2.1 取 2.5.1 中制备的样品悬液 500 μL ,加入 100 μL 20% 的 SDS(终浓度 3.4%),混匀。在 95 $^{\circ}\text{C}$ ~100 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min 后,迅速放置于冰上冷却 10 min~15 min。

2.5.2.2 在样品中加入 RNaseA 至终浓度为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$,50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min。然后,加入蛋白酶 K 至终浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$,50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min。

2.5.2.3 加入等体积的酚—氯仿—异戊醇(25:24:1),手颠倒摇匀 2 次~3 次,4 $^{\circ}\text{C}$ 9 000 g 离心 10 min。

2.5.2.4 转移上清液于另一离心管中。

2.5.2.5 重复 2.5.2.3、2.5.2.4 操作过程,加入 2.5 倍体积的预冷无水乙醇,手颠倒摇匀 2 次~3 次,-20 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀 30 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 g 离心 10 min,弃去液相。

2.5.2.6 用 1 mL 70% 乙醇漂洗,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 g 离心 2 min,弃上清,真空或室温下干燥 DNA 沉淀。

2.5.2.7 DNA 沉淀用 25 μL ~50 μL 无菌超纯水溶解作为模板,保存在-20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

3 PCR 试验

3.1 反应体系

10 \times PCR buffer(含 Mg^{2+})	5 μL
脱氧三磷酸核苷酸混合液(dNTPs)	4 μL
F1 引物和 F2 引物	各 0.5 μL
Revx 引物	1 μL
模板(被检样品总 DNA)	2 μL
无菌超纯水	36.5 μL
Taq DNA 聚合酶	0.5 μL

样品检测时,同时要设阳性对照和空白对照,阳性对照模板为靶基因(副猪嗜血杆菌 16S rRNA 基因片段)重组质粒,空白对照为灭菌超纯水。

3.2 PCR 反应程序

94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 min,然后 35 个循环,分别为:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

3.3 电泳

3.3.1 1% 琼脂糖凝胶板的制备

称取 1 g 琼脂糖置于 100 mL TAE 电泳缓冲液中,加热融化。待温度降至 60 $^{\circ}\text{C}$ 左右时,加入 10 mg/mL 溴化乙锭(EB)3 μL ~5 μL ,均匀铺板,厚度为 3 mm~5 mm。

3.3.2 加样

PCR 反应结束,取扩增产物 5 μL (包括被检样品、阳性对照、空白对照)、125 bp DNA 分子质量标准 5 μL 、上样缓冲液 1 μL 进行琼脂糖凝胶电泳。

3.3.3 电泳条件

100 V 电泳 30 min。

3.3.4 凝胶成像仪观察

扩增产物电泳结束后,用凝胶成像仪观察、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。

- a) 125 bp DNA 分子质量标准电泳道, 从上到下依次出现 2 000 bp、1 250 bp、1 000 bp、750 bp、500 bp、375 bp、250 bp、125 bp 共 8 条清晰的条带。
- b) 阳性样品电泳道出现一条约 1 090 bp 清晰的条带。
- c) 阴性样品电泳道不出现约 1 090 bp 条带。

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 1 090 bp 的条带, 判为阳性(+); 被检样品电泳道没有出现大小为 1 090 bp 的条带, 判为阴性(-)。结果判定参见附录 B。

附录 A
(资料性附录)
PCR 试验试剂的配制

A.1 NET 缓冲液(pH7.6)的配制

Tris 碱	6.06 g(0.05 mol/L)
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	0.37 g(1 mol/L)
NaCl	8.77 g (0.151 mol/L)
超纯水	930 mL

待上述混合物完全溶解后,加超纯水至 1 L,用 1 mol/L HCl 滴度至 pH7.6,置于室温保存。

A.2 TAE 电泳缓冲液(pH 约 8.5)的配制

50×TAE 电泳缓冲液储存液:

三羟甲基氨基甲烷(Tris 碱)	242 g
乙二胺四乙酸二钠(Na ₂ EDTA)	37.2 g
超纯水	800 mL

待上述混合物完全溶解后,加入 57.1 mL 的醋酸充分搅拌溶解,加超纯水至 1 L 后,置室温保存。使用前,用超纯水将 50×TAE 电泳缓冲液 50 倍稀释。

A.3 靶基因片段序列及引物在靶基因中的位置

A.3.1 引物 F1、Revx(适合于副猪嗜血杆菌血清型 1-4,6-11)。

```

agagtttgatcatggctcagattgaacgctggcggcaggcttaacacatgcaagtcgaacggtagcaggaagaag
cttgcctctttgctgacgagtggcggacgggtgagtaatgcttgggaatctggccttatggaggggataactacg
ggaaactgtagctaataccgc
F1→ gtagtatcgggagatgaaagactgggaccgcaaggccagttgccataagatgagcccaagtgggattaggtagtt
ggtaggggtaaaagccctaccaagccgacgatctctagctggctgagaggatgaccagccacactggaactgagac
acggtccagactcctacgggaggcagcagtgagggaatattgcacaatggggggaaccctgatgcagccatgccgc
gtgaatgaagaaggccttcgggttgtaaaattcttcggtgatgaggaagggtgatgtttaatagagcattaca
ttgacgtagtgcagaagaagcaccggcctaactccgtgccagcagcccggtaatagcggaggtgagcagcgtta
atcggaatgactggcgtaaaaggcagcagcggtgacttaagtgggatgtgaaagcccagacttaacttggg
aattgcatttcatactgggtgctagagtattttaggagggtagaattccacgttagcggtagaatgacgttag
agatgtggaggaataaccgaaggcgaaggcagcccttgggaaaaactgacgctcatgtgcgaaagcgtggggag
caaacaggatagataccctgtagtccacgctgtaaacgctgtcgatttggggatgggctttatgtttgggtgc
ccgtagctaacgtgataaatcgaccgctggggagtagcggccgaagggtaaaactcaaatgaattgacgggggc
ccgcacaagcggtagcatgtggtttaatcgatgcaacgcgaagaaccttacctactcttgacatcctaagaa
gaactcagagatgagttgtgccttcgggaacttagagacaggtgctgcatggctgtcgtcagctcgtttgtga
aatgttgggttaagtcgccaacgagcgaacccttatcctttgttccagcattcggtcggaactcaagga
gactgcagtgataaactggaggaagggtgggatgacgtcaagtcacatggcccttacgagtagggctacacac
gtgctaca
Revx→ atggtgcatacagaggcagcgaagccgcgaggtggagtgaatcagaaagtcacatcaagtcggattgga
gtctgcaactcgactccatgaagtcggaatcgctagtaatcgcaatcagaatgctcgggtgaatacgttcccgg
gccttgtagacaccgcccgtcacaccatgggagtggtgtgaccagaagtagatagcttaactgaaagggggcgt
ttaccacggtatgattcatgact
    
```

A. 3. 2 引物 F2、Revx(适合于副猪嗜血杆菌血清型 5,12-15)。

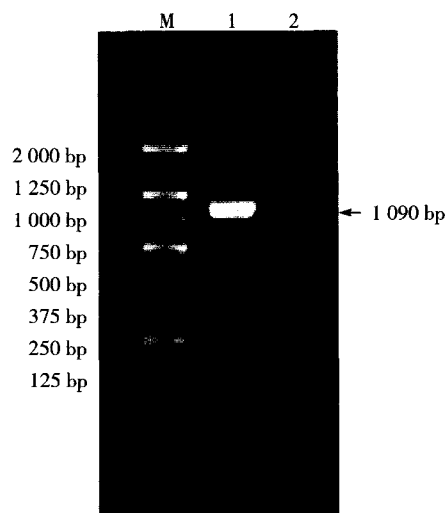
agagtttgatcatggctcagattgaacgctggcggcaggetttaacacatgcaagtcgaacggtagcaggaaggaa
gcttgctttctttgctgacgagtgccggacgggtgagtaatgcttggggatctggccttatggagggggataacga
cgggaaactgtcgtactaacgc

F2→ **gtaatgtctaaggactag**agggtgggactttcgggccacctgccataagatgagcccaagtgggattaggtagtt
ggtgggttaaaggcctaccaagccgacgatctctagctggcttgagaggatgaccagccacactggaactgagac
acggtccagactcc tacgggagcagcagtggggaatattgcacaatgggggaaacctgatgcagccatgccgc
gtgaatgaagaaggccttcgggttgtaaagtctttcgggtgatgaggaagggtgatgttttaatagagcattaca
ttgacttagtcacagaagaagcaccggctaaactccgtgccagcagccggtaatacggagggtgcgagcgtta
atcggaatgactggcgtaaagggcagcagcggtgacttaagtgagatgtgaaagccccgagcttaacttggg
aatgcatctcactgggttgctagagtattttaggaggggtagaattccacgtgtagcgggtgaaatgcgtag
agatgtggaggaataccgaaggcgaaggcagcccttgggaaaatactgacgctcatgtgcgaaagcgtggggag
caaacaggattagataccctggtagtccacgctgtaaacgctgtcgatttggggattgggctttatgtttgtgc
ccgtagtaacgtgataaatcgaccgctggggagtacggcccaaggttaaaactcaatgaattgacgggggc
ccgcacaagcgggtggagcatgtggtttaattcgatgcaacggaagaaccttacctactcttgacatcctaagaa
gctttcagagatgagagtgtccttcgggaacttagagacaggtgctgcatggctgtcgtcagctcgtgtgtga
aatgttgggttaagtcccgaacgagcgaacccttatcctttgttgccagcattcggtcgggaactcaaagga
gactgccagtataaactggaggaaggtggggatgacgtcaagtcacatgcccttacgagtagggctacacac
gtgctaca

Revx→ atggtgcatacagaggcc**gacgaagccgcgagg**tagagtgaatctcagaaagtgcataccttaagtcggattgga
gtctgcaactcgactccatgaagtcggaatcgctagtaatcgcaatcagaatgtcgcggatgcaatcgttccgg
gccttgtagacaccgccgtcacaccatgggagtggtgtaccagaagttagatagcttaactgaaagggggcgt
ttaccacggtatgattcatgact

附录 B
(资料性附录)
样品检测结果判定图

副猪嗜血杆菌 PCR 检测结果电泳图见图 B.1。



说明：

M ——125 bpDNA 分子质量标准；

1 ——阳性；

2 ——阴性。

图 B.1 副猪嗜血杆菌 PCR 检测结果电泳图