

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 553—2015
代替 NY/T 553—2002

禽支原体PCR检测方法

Detection of avian *mycoplasmas*
by polymerase chain reaction(PCR)

2015-05-21 发布

2015-08-01 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。

本标准代替 NY/T 553—2002《禽支原体病诊断技术》。

本标准与 NY/T 553—2002 相比,删除了血清凝集实验,选取了 PCR 方法检测鸡毒支原体和滑液囊支原体。

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:中国动物卫生与流行病学中心。

本标准主要起草人:王娟、李卫华、王玉东、黄秀梅、龚振华、郭福生。

本标准的历次版本发布情况为:

——NY/T 553—2002。

禽支原体 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了禽支原体 PCR(聚合酶链式反应)的检测技术要求。
本标准适用于禽支原体病的流行病学调查和辅助性诊断。

2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

MG: *mycoplasma gallisepticum* 鸡毒支原体。

MS: *mycoplasma synoviae* 滑液囊支原体。

PBS: *phosphate buffered solution* 磷酸盐缓冲液。

3 实验室设备要求

3.1 仪器

基因序列分析仪、台式高速冷冻离心机、电泳仪、电泳槽、冰箱、紫外凝胶成像系统、微量移液器、水浴锅、涡旋仪等。

3.2 操作区域

样品处理区要有相应的生物安全设施;配液区要求高度洁净;电泳区要与其他操作区域相互隔离。

3.3 操作者

操作者应接受过 PCR 技术培训,熟悉防止核酸污染和溴乙锭污染的具体措施,熟悉电泳结果的判断方法。

4 相关试剂

4.1 2×Taq Master Mix

生物试剂公司生产。

4.2 1.5% 琼脂糖凝胶

见 A. 1。

4.3 1×TAE 缓冲液

见 A. 2。

4.4 溴乙锭(10 μg/μL)

见 A. 3。

4.5 商品化的 DNA 分子量标准

要求在 100 bp~300 bp 之间有 5 条以上的指示条带。

4.6 标准菌株

S6 株、WVU1853 株购自中国兽医药品监察所。

4.7 阴性对照品

用高压灭菌的 PBS 作为阴性对照标准品。

5 操作程序

5.1 样品处理

将气管拭子、关节囊穿刺液、关节面拭子样品悬浮于 1 mL PBS 溶液中,混匀成悬浮液;气管、肺、气囊等组织器官充分研磨后,加入适量的 PBS 溶液,制成混悬液,备用;也可用分离培养后的菌液作为样品。

5.2 DNA 提取

将制成的悬浮液或悬液 2 000 r/min 离心 5 min,将离心后的上清或分离培养后的菌液置于 1.5 mL 带盖的微量离心管中,在 4℃ 条件下,14 000 g 离心 30 min。用微量加样器仔细除去上清液,并将沉淀悬浮于 25 μL 双蒸水中。将置于离心管中的内容物隔水煮沸 10 min,然后冰浴 10 min,14 000 g 离心 10 min,上清液为 DNA 模板,用于扩增其 16 S rDNA。

5.3 引物

5.3.1 MG 引物序列

MG-14F:5'-GAG CTA ATC TGT AAA GTT GGT C-3';

MG-13R:5'-GCT TCC TTG CGG TTA GCA AC-3'。

5.3.2 MS 引物序列

MS-F:5'-GAG AAG CAA AAT AGT GAT ATC A-3';

MS-R:5'-CAG TCG TCT CCG AAG TTA ACA A-3'。

5.4 PCR 反应体系

25 μL PCR 反应体系包括:

ddH ₂ O	9.5 μL
DNA 模板	2.0 μL
2×Taq Master Mix	12.5 μL
上、下游引物混合物	1.0 μL

每次试验应设阳性对照和阴性对照。

先 94℃ 变性 5 min,然后按 94℃ 变性 30 s、55℃ 退火 30 s、72℃ 延伸 60 s 的顺序循环,共循环 35 次,最后在 72℃ 温度下延伸 10 min,于 4℃ 保存,备用。

5.5 PCR 产物电泳

PCR 反应结束后,每个 PCR 管中加入 5 μL 加样缓冲液,充分混匀,再每管取 5 μL 加入琼脂糖凝胶板的加样孔中,在位于凝胶中央的孔加入 DNA 分子量标准。加样后,按照 5 V/cm 电压,电泳 20 min~40 min(每次电泳时,每隔 10 min 观察 1 次。当加样缓冲液中溴酚蓝电泳过半至凝胶下 2/5 处时,可停止电泳)。电泳后,置于紫外凝胶成像仪下观察,用分子量标准判断 PCR 扩增产物大小。

6 结果判定

阳性对照出现相应大小的扩增条带,且阴性对照无此扩增带时,判定检测有效;否则判定检测结果无效,不能进行判断。

MG 的 PCR 产物为 185 bp。如果在阳性对照出现 185 bp 扩增带,阴性对照无带出现(引物二聚体除外)时,试验成立。被检样品出现 185 bp 扩增带为 MG 阳性,否则为阴性。

MS 的 PCR 产物为 207 bp。如果在阳性对照出现 207 bp 扩增带,阴性对照无带出现(引物二聚体除外)时,试验成立。被检样品出现 207 bp 扩增带为 MS 阳性,否则为阴性。

附 录 A
(规范性附录)
相关试剂的配制

A.1 1.5%琼脂糖凝胶的配制

琼脂糖 1.5 g
0.5×TAE 电泳缓冲液加至 100 mL

微波炉中完全融化,待冷至 50℃~60℃时,加入溴乙锭(EB)溶液 5 μL,摇匀,倒入电泳板上,凝固后取下梳子,备用。

A.2 1×TAE 缓冲液的配制**A.2.1 配制 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na₂)溶液(pH 8.0)**

二水乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na₂·2H₂O) 18.61 g
灭菌双蒸水 80 mL
氢氧化钠调 pH 至 8.0
灭菌双蒸水加至 100 mL

用于配制 A.2.2 中的 50×TAE。

A.2.2 配制 50×TAE 电泳缓冲液

羟基甲基氨基甲烷(Tris) 242 g
冰乙酸 57.1 mL
0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液(pH 8.0) 100 mL
灭菌双蒸水加至 1 000 mL

用于配制 A2.3 中的 1×TAE。

A.2.3 配制 1×TAE 缓冲液

50×TAE 电泳缓冲液 100 mL
灭菌双蒸水加至 1 000 mL

A.3 溴乙锭(10 μL)的配制

溴乙锭 20 mg
灭菌双蒸水加至 20 mL

A.4 10×加样缓冲液

聚蔗糖 25 g
灭菌双蒸水 100 mL
溴酚蓝 0.1 g
二甲苯青 0.1 g

附录 B
(规范性附录)
PBS 溶液的配制

PBS 溶液的配制如下：

NaCl	3.9 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
双蒸馏水加至	1 000 mL

附录 C
(规范性附录)
PCR 产物大小对照

PCR 产物大小对照见图 C.1。

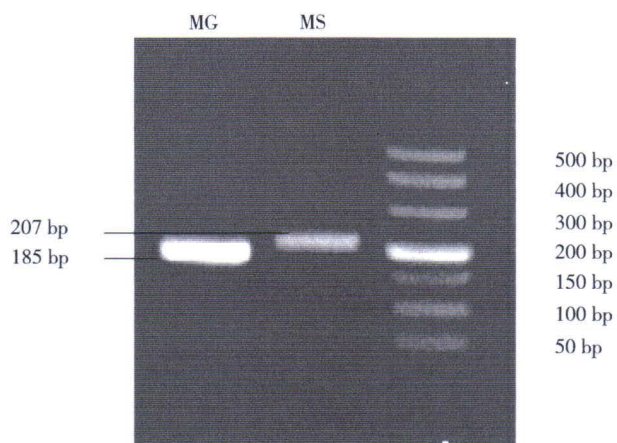


图 C.1 PCR 产物大小对照