



中华人民共和国国家标准

GB/T 35909—2018

猪肺炎支原体 PCR 检测方法

Detection of mycoplasma hyopneumoniae using PCR method

2018-02-06 发布

2018-09-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

订购号: 0100191211052082 防伪编号: 2019-1211-0431-3527-8664 购买单位: 全国动物卫生标准化技术委员会

版权声明

中国标准在线服务网 (www.spc.org.cn) 是中国标准出版社委托北京标科网络技术有限公司负责运营销售正版标准资源的网络服务平台, 本网站所有标准资源均已获得国内外相关版权方的合法授权。未经授权, 严禁任何单位、组织及个人对标准文本进行复制、发行、销售、传播和翻译出版等违法行为。版权所有, 违者必究!

中国标准在线服务网
<http://www.spc.org.cn>

标准号: GB/T 35909-2018
购买者: 全国动物卫生标准化技术委员会
订单号: 0100191211052082
防伪号: 2019-1211-0431-3527-8664
时 间: 2019-12-11
定 价: 21元

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准

猪肺炎支原体 PCR 检测方法

GB/T 35909—2018

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲 2 号 (100029)
北京市西城区三里河北街 16 号 (100045)

网址: www.spc.org.cn

服务热线: 400-168-0010

2018 年 2 月第一版

*

书号: 155066 · 1-59535

版权专有 侵权必究

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。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:江苏省农业科学院。

本标准起草人:邵国青、冯志新、熊祺琰、刘茂军、张磊、王海燕、武昱孜、韦艳娜、刘蓓蓓、甘源、华利忠、王佳、王丽。

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

订单号: 0100191211052082 防伪编号: 2019-1211-0431-3527-8664 购买单位: 全国动物卫生标准化技术委员会

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

猪肺炎支原体 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了猪肺炎支原体 PCR 检测的操作方法。

本标准适用于实验室对猪临床样品(猪鼻拭子、肺组织和支气管肺泡灌洗液)、细菌培养物和动物产品中猪肺炎支原体核酸的快速检测。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室生物安全通用要求

GB/T 27401 实验室质量控制规范 动物检疫

病死及病害动物无害化处理技术规范 农医发[2017]25号

兽医实验室生物安全管理规范(中华人民共和国农业部公告第302号)

3 术语和定义及缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

猪肺炎支原体 *Mycoplasma hyopneumoniae*; MHP

支原体科支原体属(*Mycoplasma*)成员,是猪支原体肺炎(MPS)的主要病原体。

注:猪支原体肺炎又称猪气喘病,是一种经呼吸道感染的慢性病,对养猪业造成严重危害。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

PCR 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction)

PBS 磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline buffer)

TAE TAE 电泳缓冲液(tris-acetate-ethylene diamine tetraacetic acid buffer)

TBE TBE 电泳缓冲液(tris-borate-ethylene diamine tetraacetic acid buffer)

Taq 酶 Taq DNA 聚合酶(Taq DNA polymerase)

dNTPs 脱氧核糖核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphates)

DNA 脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

CCU 颜色变化单位(color change unit)

MPS 猪支原体肺炎(mycoplasmal pneumonia of swine)

4 仪器设备

- 4.1 高速冷冻离心机。
- 4.2 核酸电泳仪。
- 4.3 恒温水浴锅。
- 4.4 凝胶成像系统。
- 4.5 PCR 扩增仪。
- 4.6 水平电泳槽。
- 4.7 微量移液器(量程:0.5 μL ~10 μL ;2 μL ~20 μL ;20 μL ~200 μL ;100 μL ~1 000 μL)。
- 4.8 组织匀浆器。

5 试剂和材料

5.1 引物

上游引物:5'-GAGCCTTCAAGCTTCACCAAGA-3'

下游引物:5'-TGTGTTAGTACTTTTGCCACC-3'

5.2 猪肺炎支原体阳性对照样品及阴性对照样品

以灭活前浓度为 1×10^5 CCU/mL~ 1×10^8 CCU/mL 的猪肺炎支原体菌液培养物(由指定单位提供),经 PCR 检测不含猪絮状支原体、猪滑液支原体和猪鼻支原体后作为阳性对照样品,以无菌双蒸水作为阴性对照样品。

5.3 试剂

- 5.3.1 除另有规定外,所用生化试剂均为分析纯,试验用水符合 GB/T 6682 的要求。
- 5.3.2 *Taq* 酶。
- 5.3.3 PCR 反应缓冲液(与 *Taq* 酶匹配)。
- 5.3.4 氯化镁(MgCl_2 , 25 mmol/L)。
- 5.3.5 dNTPs(dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 各 2.5 mmol/L)。
- 5.3.6 酚/三氯甲烷/异戊醇(体积比 25 : 24 : 1)。
- 5.3.7 三氯甲烷。
- 5.3.8 异丙醇($-20\text{ }^\circ\text{C}$ 预冷)。
- 5.3.9 琼脂糖。
- 5.3.10 DNA 相对分子质量标准 Marker DL 2000。
- 5.3.11 0.01 mol/L PBS 液(pH 7.2 ~ pH 7.4)(配制方法见附录 A)。
- 5.3.12 DNA 提取液(配制方法见附录 A)。
- 5.3.13 75%乙醇(配制方法见附录 A)。
- 5.3.14 TE 溶液(pH 8.0)(配制方法见附录 A)。
- 5.3.15 电泳缓冲液($1 \times$ TBE 或 $1 \times$ TAE)(配制方法见附录 A)。
- 5.3.16 溴化乙锭溶液(10 mg/mL)(配制方法见附录 A)。
- 5.3.17 上样缓冲液(配制方法见附录 A)。

6 操作程序

6.1 样品采集、运输、处理和检测的生物安全要求

有关生物安全和防止交叉污染的措施见附录 B。

6.2 样品采集和运输

6.2.1 新鲜肺组织样品采集和运输

剖检未腐败病死猪或发病猪,采集具有特征病变与正常组织连接处的肺组织 0.5 g~1.0 g,置于无菌密封袋或密封容器中,于 2 °C~8 °C 下 24 h 内完成运送工作。如样品不能被及时送到实验室,应置于-20 °C 以下保存。

6.2.2 支气管肺泡灌洗液采集和运输

采集新鲜解剖的未破损的猪肺脏,气管注入 50 mL~100 mL 灭菌的 0.01 mol/L PBS(pH 7.2 ~ pH 7.4)溶液,轻揉肺脏 3 min~5 min,转移 5 mL~10 mL 灌洗液至无菌容器中,运输与保存方法同 6.2.1。

6.2.3 鼻拭子采集和运输

采样人员将猪保定后,用棉拭子轻轻插入鼻腔,稍作拐弯,绕过骨状瓣膜,与鼻中隔平行方向插入约 2 cm~5 cm,轻轻旋转棉拭子,当猪出现喷嚏反射后,轻轻抽出棉拭子,将鼻拭子样品端置于含有 1 mL PBS 溶液的灭菌离心管中,运输与保存方法同 6.2.1。

6.3 样品处理与 DNA 提取

6.3.1 肺组织的处理与 DNA 提取

取 0.5 g~1.0 g 肺组织样品,加入 5 mL 0.01 mol/L PBS 溶液后,充分匀浆,制成 0.1 g/mL~0.2 g/mL 的悬液。取该悬液 200 μ L,加入 750 μ L DNA 提取液,65 °C 温浴 30 min,加酚/三氯甲烷/异戊醇 500 μ L,振荡混匀,12 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液加入等体积的三氯甲烷,振荡混匀,12 000 r/min 离心 5 min,吸取 500 μ L 上清液与 400 μ L 的异丙醇充分混合,12 000 r/min 离心 5 min,75%乙醇洗涤沉淀一次,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清,沉淀干燥后溶于 30 μ L TE 溶液中,即可用于检测或保存于-20 °C。

也可使用其他经验证的 DNA 提取方法或等效的商品化 DNA 提取试剂盒,按其使用说明书操作。

6.3.2 支气管肺泡灌洗液的处理与 DNA 提取

取 5 mL~10 mL 支气管肺泡灌洗液,12 000 r/min 离心 20 min,弃去上清,沉淀用 200 μ L 0.01 mol/L PBS 溶液重悬后,加入 750 μ L DNA 提取液提取 DNA,方法同 6.3.1。

也可使用其他经验证的 DNA 提取方法或等效的商品化 DNA 提取试剂盒,按照其使用说明书操作。

6.3.3 鼻拭子样品的处理与 DNA 提取

采用水煮法提取待检猪鼻拭子样品 DNA。将浸有鼻拭子的离心管振荡 5 s,2 °C~8 °C 放置 2 h,用无菌镊子取出棉拭子,12 000 r/min 离心 20 min,弃去上清。沉淀用 50 μ L 灭菌水重悬,于 100 °C 水浴 10 min 后立即放置到冰浴中冷却 10 min,于-20 °C 以下保存作为 DNA 模板。

6.3.4 培养物和阳性对照样品的处理与 DNA 提取

采用水煮法提取待检培养物样品和阳性对照样品 DNA。取 1 mL 培养菌液,12 000 r/min 离心 20 min, 弃去上清。其 DNA 提取的操作方法同 6.3.3。

6.4 PCR 反应

6.4.1 PCR 反应体系

10×PCR 反应缓冲液 2.5 μL、dNTPs(10 mmol/L)2 μL、氯化镁(25 mmol/L)2 μL、引物(10 μmol/L)各 0.5 μL、*Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL)0.5 μL、模板 DNA 2 μL~5 μL,用灭菌的双蒸水补足反应体积至 25 μL。

也可使用等效商品化 PCR 反应预混液。

6.4.2 PCR 反应程序

95 °C 预变性 12 min 后进入 PCR 循环;94 °C 变性 20 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 40 s,进行 30 个循环;最后 72 °C 延伸 7 min;2 °C~8 °C 保存反应产物。

6.4.3 PCR 产物电泳

PCR 扩增产物与上样缓冲液按 5 : 1 比例混合,加样于已制备好的 1% 琼脂糖凝胶中(见附录 A),同时分别加 Marker DL2000(0 bp~2 000 bp)、阴性对照和阳性对照,100 V~120 V 恒压电泳 20 min~40 min,凝胶成像系统观察并记录结果。

6.5 结果判定

6.5.1 试验成立判定

若阳性对照样品出现 649 bp 的目标扩增条带,同时阴性对照样品无目标扩增条带,则试验成立(参见 C.1)。否则试验不成立。

6.5.2 检测结果判定

符合 6.5.1 的条件,被检样品扩增产物出现 649 bp 目的条带,则判定为猪肺炎支原体核酸阳性;被检样品未出现 649 bp 目的条带,则判定为猪肺炎支原体核酸阴性;

若进一步验证,可对 PCR 扩增产物进行测序,其目标序列参见 C.2。

附 录 A
(规范性附录)
溶液的配制

A.1 0.01 mol/L PBS 溶液 (pH 7.2~pH 7.4)

准确称量下面各试剂,加入到 800 mL 蒸馏水中溶解,调节溶液的 pH 至 7.2~7.4,加水定容至 1 L。分装后在 121 °C 灭菌 15 min~20 min,或过滤除菌,保存于室温。

氯化钠(NaCl)	8.00 g
氯化钾(KCl)	0.20 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	0.24 g
磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)	3.65 g
蒸馏水	加至 1 000 mL

A.1 电泳缓冲液的配制(1×TAE 或 1×TBE)**A.1.1 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)的配制**

称取 Na₂EDTA·2H₂O 18.61 g,用 80 mL 蒸馏水充分搅拌,用 NaOH 颗粒调 pH 值至 8.0,再用蒸馏水定容至 100 mL。

EDTA 二钠盐需加入 NaOH 将 pH 调至接近 8.0 时,才会溶解。

A.1.2 TAE 的配制

分别准确称取 Tris 碱 242.0 g,冰乙酸 57.1 mL,加入配制好的 0.5 mol/L EDTA (pH8.0) 100 mL 溶解并调 pH 至 8.0,用蒸馏水补足至 1 000 mL,充分混匀后即为 50×TAE,4 °C 保存备用;使用前用蒸馏水将其作 50 倍稀释即为 1×TAE,现用现配。

A.1.3 TBE 的配制

分别准确称取 Tris 碱 54.0 g,硼酸 27.5 g,加入配制好的 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 20 mL,加蒸馏水 800 mL 溶解并调 pH 至 8.0,用蒸馏水补足至 1 000 mL,充分混匀后即为 5×TBE,2 °C~8 °C 保存备用;使用前用蒸馏水将其作 5 倍稀释即为 1×TBE,现用现配。

A.2 DNA 提取液

配制终浓度分别为:100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0),25 mmol/L EDTA (pH 8.0),500 mmol/L NaCl,1% SDS 的混合溶液,混匀后 4 °C 保存备用。具体配法如下:

母液配制:

溶液 1:500 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)。称取 15.14 g Tris,加入 150 mL 蒸馏水,加入 HCl 调 pH 至 8.0,定容至 250 mL。

溶液 2:100 mmol/L EDTA(pH 8.0)。称取 8.46 g Na₂EDTA·2H₂O,加入 200 mL 蒸馏水,调 pH 至 8.0,定容至 250 mL。

溶液 3:5 mol/L NaCl。称取 29.22 g NaCl,加入蒸馏水溶解,并定容至 100 mL。

溶液 4:10% SDS。称取 10 g SDS,加入蒸馏水溶解,并定容至 100 mL。

配制 1 000 mL DNA 提取液:加入 200 mL 溶液 1,250 mL 溶液 2,100 mL 溶液 3,100 mL 溶液 4,用蒸馏水补足至 1 000 mL。

也可使用经验证的等效的商品化 DNA 提取试剂盒,具体操作参照试剂盒说明书进行。

A.3 上样缓冲液(6×)

配制终浓度分别为:0.25%溴酚蓝,0.25%二甲苯青 FF,40%蔗糖的混合溶液,混匀后 2℃~8℃保存备用。

也可使用商品化的核酸凝胶电泳上样缓冲液,具体制备参照说明书要求进行操作。

A.4 TE 溶液(pH 8.0)

配制终浓度为 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)和 1 mmol/L EDTA (pH 8.0)的混合溶液,高压灭菌后,2℃~8℃保存备用。具体配法如下:

母液配制:

溶液 1:1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)。称取 Tris 碱 12.12 g,加蒸馏水 80 mL 溶解,滴加浓 HCl 调 pH 至 8.0,定容至 100 mL。

溶液 2:0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)。称取 $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 18.61 g,用 80 mL 蒸馏水充分搅拌,用 NaOH 颗粒调 pH 值至 8.0,再用蒸馏水定容至 100 mL。EDTA 二钠盐需加入 NaOH 将 pH 调至接近 8.0 时,才会溶解。

配制 100 mL TE 溶液(pH 8.0):加入 1 mL 溶液 1,0.2 mL 溶液 2,用蒸馏水补足至 100 mL。

A.5 溴化乙锭溶液(10 mg/mL)

准确量取溴化乙锭 0.1 g,加蒸馏水 10.0 mL,充分溶解后即为 10 mg/mL 溴化乙锭溶液。

也可使用商品化的溴化乙锭溶液或其他等效商品化的核酸电泳染料,按照说明书要求进行操作。

A.6 1%琼脂糖凝胶

称取 1.0 g 琼脂糖,加入 100 mL 电泳缓冲液加热溶解,加入溴化乙锭溶液至终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,15℃~25℃冷却至固体,现用现配。

A.7 75%乙醇

无水乙醇 75 mL,加蒸馏水定容至 25 mL,充分混匀后,-20℃预冷备用。

附录 B
(规范性附录)
操作规范

B.1 检测过程中防止交叉污染的措施

B.1.1 采样和制样过程

采样和制样工具,应清洗干净,121 ℃,15 min~20 min 灭菌,一套清洁工具仅限于一个样品使用。存放样品的容器应该经过清洗、灭菌,或为灭菌一次性容器。

B.1.2 检测过程

B.1.2.1 PCR 实验室应分出试剂准备区、样品制备区、产物扩增区、产物分析区。将模板提取、PCR 反应液配制、PCR 循环扩增及 PCR 产物的鉴定等步骤分区或分室进行。实验室的操作流程应从“清洁区”到“污染区”单方向进行。

B.1.2.2 实验过程中,穿实验服和戴手套,手套应及时更换。各区应有专用实验服,定期清洗。

B.1.2.3 各区所有的试剂、器材(尤其是移液器)、仪器都应专用且不得带出该区。

B.1.2.4 所有溶液、水、耗材和器具应 121 ℃,15 min~20 min 灭菌,避免核酸和(或)核酸酶污染。在常温贮存的试剂中,可加终浓度为 0.25 g/L 的叠氮化钠;所有试剂应该以大体积配制,然后分装成足够一次使用的量进行贮存。

B.1.2.5 样品制备区中,在 PCR 操作箱中加入 PCR 反应各组分。

B.1.2.6 实验前后,实验室用紫外线消毒以破坏残留的 DNA 气溶胶。

B.2 样品采集、运输和处理的生物安全要求

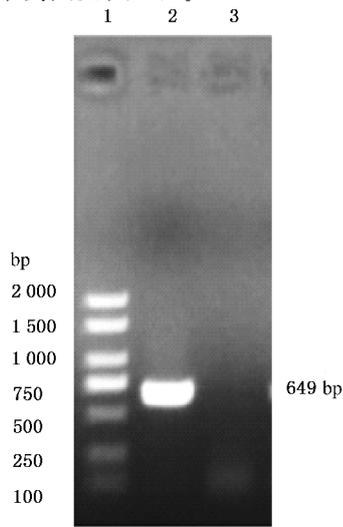
样品的采集、运输和处理的生物安全要求按照 GB 19489、GB/T 27401 和《兽医实验室生物安全管理规范》的规定。病死猪及病料按照《病死及病害动物无害化处理技术规范》处理。

附录 C
(资料性附录)

猪肺炎支原体 PCR 检测电泳例图及产物扩增序列

C.1 猪肺炎支原体 PCR 检测电泳例图

猪肺炎支原体 PCR 检测结果电泳例图见图 C.1。



说明：

- 1——DL2000 Marker；
- 2——阳性对照；
- 3——阴性对照。

图 C.1 猪肺炎支原体 PCR 检测电泳图

C.2 PCR 扩增产物参考序列

649 bp DNA 参考序列：

5'-gagccttcaagcttcaccaagaatgggggtgcgaacattagttagttggtagggtaaaagcctaccaagacgatgatgtttagcggggc
caagaggtgtaccgccacactgggattgagatacggcccagactcctacgggaggcagcagtaaggaatattccacaataagcgaagcttgatgg
agcgacacagcgtgcaggatgaagtctttcgggatgtaaactgctggttaaggaagaaaaactagataggaatgctctagtcttgacggtacct
tattagaaagcgacggcaactatgtgccagcagccggttaatacataggtcgcaagcgttatccggaattattgggcgtaaagcgtccgtaggitt
ttgttaagtttaaagttaaagtctaaagctcaacttagtccgctttagatactggcaaaatagaattatgaagaggttagcggaaattcctagtgagtg
gtggaatacgtagatattaggaagaacaccaatagccgaaggcagctaaactggtcatatattgacactaaggacgaaagcgtggggagcaaacg
gattagataccctggtagtccacgccgtaaacgatgatcattagttggtggcaaaagtcaactaacaca-3'



GB/T 35909—2018

版权专有 侵权必究

*

书号：155066 · 1-59535