



中华人民共和国国家标准

GB/T 34728—2017

无乳支原体 PCR 检测方法

PCR for Mycoplasma agalactiae

2017-11-01 发布

2018-05-01 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

订单号: 0100191216052483 防伪编号: 2019-1216-0945-2569-8695 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

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:中国农业科学院兰州兽医研究所。

本标准起草人:储岳峰、赵萍、高鹏程、陈胜利、贺英、逯忠新。

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

订单号: 0100191216052483 防伪编号: 2019-1216-0945-2569-8695 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

无乳支原体 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了无乳支原体 PCR 检测方法的技术要求。

本标准适用于检测羊(山羊和绵羊)临床样品和分离培养物中无乳支原体的核酸。

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

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CA:接触传染性无乳症(Contagious Agalactia)

Maga:无乳支原体(*Mycoplasma agalactiae*)

PCR:聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction)

TAE:核酸电泳缓冲液(Tris-Acetic acid-EDTA)

CCU:颜色变化单位(Color change unit)

Taq 酶:*Taq* DNA 聚合酶(*Taq* DNA Polymerase)

DNA:脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic Acid)

dNTPs:脱氧核糖核苷三磷酸(Deoxyribonucleoside Triphosphates)

bp:碱基对(Base Pair)

4 仪器器材

4.1 仪器

高速冷冻离心机、PCR 扩增仪、核酸电泳仪、水平电泳槽、恒温水浴锅、普通冰箱、低温冰箱(−70 ℃)、凝胶成像系统、高压灭菌锅、组织匀浆设备。

4.2 器材

微量加样器(0.5 μL~10 μL、2 μL~20 μL、20 μL~200 μL、100 μL~1 000 μL)、0.22 μm 无菌滤器、无菌棉拭子、灭菌采样容器。

5 试剂

5.1 2×PCR 反应预混合液(含 *Taq* 酶、dNTPs 和上样缓冲液)。

5.2 DL2000 DNA 分子质量标准。

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

- 5.3 电泳缓冲液(TAE)、1%琼脂糖、0.85%生理盐水、*Maga* 培养基,配制方法见附录 A。
- 5.4 6×PCR 上样缓冲液。
- 5.5 阴、阳性对照(制备方法见附录 B)。
- 5.6 商业合成的引物,上游引物(MAGAUVRCl-L)的序列为:5'-CTCAAAAATACATCAACAAGC -3';下游引物(MAGAUVRCl-R)的序列为:5'-CTTCAACTGATGCATCATAA-3'。合成的引物用符合 GB/T 6682 规定的分析实验室用水(蒸馏水)配成 20 pmol/μL。

6 操作程序

6.1 样品采集

6.1.1 奶样

乳腺炎病羊无菌采集的新鲜奶样置于灭菌容器中(不少于 1.5 mL)。

6.1.2 关节液

关节炎病羊无菌采集的关节液置于灭菌容器中(不少于 1.5 mL)。

6.1.3 眼拭子

角膜结膜炎病羊用灭菌棉拭子在的眼结膜表面和眼角轻轻擦拭后置于灭菌容器中。

6.1.4 组织

刚扑杀或死亡时间不超过 24 h 病畜采集乳房病变部位组织及其附近淋巴结,置于灭菌容器中。

6.2 样品的运输与储存

6.2.1 以上样品采集后应立即置于带有冰袋的运输箱中,送至实验室检测。样品被运到实验室时,附带的冰袋应没有完全融化。

6.2.2 如样品不能被及时送到实验室,应置于-20℃冰箱中保存,保存期应不超过 1 个月;如需长期保存样品,应置于-70℃冰箱。

6.3 样品的处理

6.3.1 奶样的处理

与生理盐水等体积混匀后,4℃、13 000 r/min 离心 10 min,弃上清,收集沉淀。

6.3.2 关节液的处理

与生理盐水等体积混匀后,4℃、13 000 r/min 离心 10 min,弃上清,收集沉淀。

6.3.3 眼拭子的处理

浸入 1 mL 生理盐水中 30 min,充分捻动,挤干后弃去拭子,将浸出液在 4℃、13 000 r/min 离心 10 min,弃上清,收集沉淀。

6.3.4 组织样品的处理

剪成小块,按 1 g 加入 0.9 mL 生理盐水研磨后,在 4℃、3 000 r/min 离心 10 min,弃沉淀。取上清在 4℃、13 000 r/min 离心 10 min 后,弃上清,收集沉淀。

6.3.5 培养物样品的处理

分离的疑似 *Maga* 培养物取 1 mL, 4 °C、13 000 r/min 离心 10 min 后, 弃上清, 收集沉淀。

6.3.6 阴、阳性对照的处理

阴、阳性对照样品各 1 mL, 4 °C、13 000 r/min 离心 10 min 后, 弃上清, 收集沉淀。

6.4 样品 DNA 的提取

用适宜的基因组 DNA 提取试剂盒, 按照说明书提取样品基因组 DNA, 提取物最终体积为 50 μ L。DNA 提取操作应在通风柜中进行。

6.5 PCR 反应

6.5.1 反应体系

按下列方法配制 50 μ L 反应体系:

DNA 模板	5 μ L
2 \times PCR 反应液	25 μ L
上游引物	1 μ L
下游引物	1 μ L
灭菌去离子水	18 μ L

每次反应设阴、阳性样品对照和空白对照, 阴性样品对照用 *Maga* 培养基提取的 DNA 作为模板, 阳性对照用 *Maga* 灭活培养物提取的 DNA 作为模板, 空白对照用灭菌去离子水作为模板。

6.5.2 反应扩增程序

加样后, 置于 PCR 扩增仪进行反应, 反应条件如下: 95 °C 5 min 进行 PCR 预变性, 然后进行 35 个循环的扩增(94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 60 s), 最后 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。

6.6 电泳观察

取 PCR 产物各 5 μ L(包括被检样品、阴、阳性对照样品、阳性质粒对照和空白对照), 分别和 1 μ L 6 \times PCR 上样缓冲液混合均匀后, 连同 DNA 分子质量标准在 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳, 凝胶成像系统中观察结果(参见附录 C)。

7 结果判定

7.1 实验成立的条件

电泳观察显示, 阳性对照有 1 624 bp 的特异性扩增条带, 阴性和空白对照没有相应条带, 则试验成立。

7.2 实验结果判定

符合 7.1 的条件, 样品出现 1 624 bp 的特异性扩增条带判为 PCR 结果阳性, 表述为检出无乳支原体核酸。样品无特异性的阳性扩增条带判为 PCR 结果阴性, 表述为未检出无乳支原体核酸。

附 录 A
(规范性附录)
溶液的配制

A.1 TAE 电泳缓冲液(pH 8.0)的配制

Tris 碱	242 g
EDTA	37.2 g
冰乙酸	57.1 mL

加去离子水至 1 000 mL,使用前用去离子水 50 倍稀释。

A.2 1%的琼脂糖电泳凝胶板制备

将琼脂糖 1 g 加入 100 mL 1×TAE 电泳缓冲液中,加热融化,温度降至 60 ℃左右时加入适宜的核酸染料,均匀铺板,厚度为 3 mm~5 mm。

A.3 0.85%生理盐水的配制

将 8.5 g 氯化钠溶于 1 000 mL 去离子水中,分装后在 121 ℃灭菌 20 min,或过滤除菌,置 2 ℃~8 ℃保存。

A.4 *Maga* 培养基制法

A.4.1 成分

PPLO 肉汤(不含结晶紫)	21 g/L
25%鲜酵母浸液	100 mL/L
灭活马血清	200 mL/L
5%醋酸铊溶液	4 mL/L
青霉素	20 万 IU/L
葡萄糖	2 g/L
丙酮酸钠	2 g/L
0.4%酚红	0.18 mL

A.4.2 制备方法

将 21 g PPLO 肉汤溶于 700 mL 去离子水中,116 ℃高压灭菌 30 min,其余成分混合溶解后用 0.22 μm 滤膜过滤,无菌加入冷却的 PPLO 肉汤中,用灭菌的 1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.6~7.8,分装试管或三角瓶等,2 ℃~8 ℃保存备用。

附 录 B

(规范性附录)

无乳支原体阳性样品和阴性样品制备

B.1 阳性样品制备

取 *Maga* 培养物,向培养物中加入 40% 甲醛溶液,使终浓度为 0.2% (40% 甲醛溶液),37 °C 灭活 18 h,用 *Maga* 培养基 10 倍梯度稀释至 1 000 CCU/mL,分装 0.5 mL/管备用。

B.2 阴性样品制备

用 *Maga* 培养基,分装 0.5 mL/管备用。

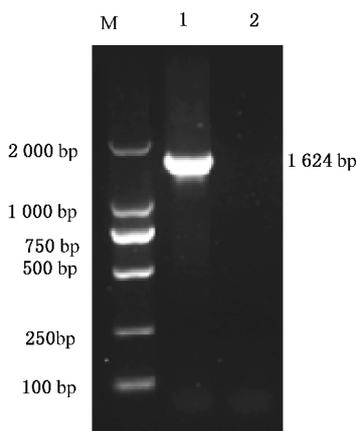
全国动物卫生标准化技术委员会 专用

附录 C
(资料性附录)

检测样品电泳例图及靶基因片段的核苷酸序列

C.1 检测样品电泳例图

检测样品电泳例图见图 C.1。



说明：

- 1 —— 阳性样品对照；
- 2 —— 阴性样品对照；
- M—— DNA 分子质量标准 DL2000。

图 C.1 PCR 检测电泳例图

C.2 PCR 扩增靶基因片段序列

大写字母为引物所在位置(PG2 株, Genbank Accession No.: AF003960)：

CTCAAAAATACATCAACAAGCcccgggtgtttatattgaaaagatgctaagcaaaatgtttgtatgttgcaagccaaa
aatttgcgtaagagattgctgcaatattttgatggcgcaattaattcatataaaacaagtaaactaatgtcttttagtcgctgattttgaggtttatatttgc
aaaacaaataaggaagctttactactagaaaaagctatgggtgatagattcaaccctgaatttaatatcttgcttttagatgacagaaaaatccttattta
aaagtccaacttttaaaagattcgctgcttataactttgtctagaaaagttaatacaaaaatacaciaaacattatactatgggccatttccctctggtt
atggagctaaacctattttaaaacttttacagcatgaagctttatatgaaagtggattattaataaaaaataatgatagtagcttttgagtaaatcagtttg
caaaaattaaggaataactaagttttaaacaataatttttaaatgaattaactaataaaatgcatactgctgctaataatgcaatttgaactagccc
tgtttttacgtgatggttcaataacttaaaaaagcttaaaagagagccaaattattgagcttagtcaatataaaaaattgacgtattcgccataaaaacag
atgaaaaattaattatgctactgtactttttaccgttatggcgttttaataacaaagtaaattaacaataaccattaggaataagattgatgaatcaat
tagagtatttttgaacaattttatgcagataaaaatttgectgataattttattgtgcaagaagaatcttaaaatgatcttaacttatctagtactata
aatttattagccaaaaataggtacaaacaaaaaggttttagactctgctttgcttaatttaaatgattattatgaaaaagaacatcttattatgcaaaatca
gcttgaaaaagctgatagtagcttagttcactaaataaatatttaaaacttgctaaattaaaaaacattgtgatttttgataactctaattaataacata
aatccagtaggcgtagcaattgtttatactaatggcattaaaaacaaaagtttatatcgaaaattcaatcttgaagcactaagctatcgtagtctgatgt
tgattatattagacaatcaattacaaagtttttagcagtgataaaaacacaaaagactttgacttaattatcaccgatggcggcttacaacaagttaatga

订购号：0100191216052483 防伪编号：2019-1216-0945-2569-8695 购买单位：全国动物卫生标准化技术委员会

agctaaaaaacacttaaagcttaggcatcaatatacctgtaattggactagtaaaaaatgaatatcataaaacaagagcattaattgattgaacttaa
atgaaatttatgttaatgacttagaactgcataattatttagcacaattcaaattgaggtagatagatttgctaagtcgcactttagaataagacaaaa
attagctcactgaaggtaaactaagaacattaaaggcctaggacacaatatggagcaaaagcttttaaatcattttaaaagctatgccaagatTTA
TGATGCATCAGTTGAAG(1 624 bp)

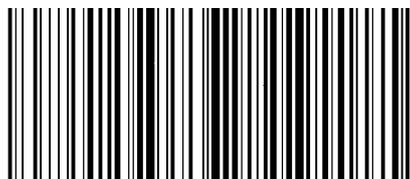
全国动物卫生标准化技术委员会
专用

 **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 34728-2017
购买者: 全国动物卫生标准化技术委员会
订单号: 0100191216052483
防伪号: 2019-1216-0945-2569-8695
时 间: 2019-12-16
定 价: 21元



GB/T 34728-2017

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准

无乳支原体 PCR 检测方法

GB/T 34728—2017

*

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

2017年11月第一版

*

书号: 155066·1-57479

版权专有 侵权必究